

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Dissecação de mecanismos moleculares de resistência a
antifúngicos em espécies de *Candida* não *albicans***

Tânia Catarina Mirandela Antunes

Mestrado em Microbiologia Aplicada

Dissertação orientada por:
Professor Nuno Pereira Mira
Professora Margarida Barata



O trabalho apresentado nesta Dissertação de Mestrado foi realizado no Instituto Superior Técnico sob a orientação direta do Professor Nuno Pereira Mira.

A Professora Doutora Margarida Barata foi a orientadora interna, designada no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Agradecimentos

Este foi mais um período de aprendizagem e enriquecimento da minha formação académica. Tive a oportunidade de conhecer e experienciar a área de investigação, nomeadamente no Instituto Superior Técnico, e perceber ainda melhor a importância de todo um trabalho conjunto. Assim sendo, não poderia deixar de agradecer a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação.

Primeiramente gostaria de agradecer ao Professor Nuno Pereira Mira e a todos os presentes no laboratório, especialmente à Joana Pinheiro, pelo apoio e disponibilidade que prestaram ao longo do ano. Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia [contratos UIDB/04565/2020, LA/P/0140/2020].

Agradeço também à Professora Margarida Barata pela disponibilidade prestada para a orientação da dissertação.

Expresso também os meus agradecimentos à administração da Conectys, local onde realizei trabalho *part-time* em conjunto com a dissertação. Sempre me proporcionaram flexibilidade de horários para a realização da dissertação, a minha prioridade! Sandra, Beatriz e Sílvia, sou muito grata pela vossa companhia nesta jornada!

Um profundo e sincero obrigada a todos os meus amigos que, mesmo não estando presentes fisicamente, transmitem sempre a serenidade e motivação quando mais preciso. Teria sido mais difícil sem vocês!

Por último e não menos importante, agradeço à minha família e namorado pelo apoio, compreensão e paciência que constantemente manifestaram ao longo da dissertação. São o meu melhor suporte e o meu maior orgulho!

A todos o meu sincero obrigada.

Resumo

As infecções fúngicas são preocupantes para a saúde pública, nomeadamente do género *Candida*, devido ao aumento de estirpes resistentes às terapêuticas convencionais e a estarem associadas a altas taxas de morbilidade e mortalidade. As espécies não *albicans* destacam-se pela emergência persistente de estirpes resistentes, contudo, a sua fisiologia e biologia molecular pouco estudadas têm impedido a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes a estas resistências. Neste estudo foram analisados 628 isolados identificados como *Candida* em pacientes de unidades de saúde da Grande Lisboa verificando-se elevada prevalência de *C. albicans*. Uma percentagem significativa de isolados *Candida* não *albicans* foram também identificados destacando-se *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. Estes isolados de espécies não *albicans* foram analisados quanto à sua suscetibilidade a quatro antifúngicos com relevância na prática clínica. Foram identificados sete isolados como resistentes, seis *C. glabrata* a fluconazol e três (dois *C. glabrata* e um *C. tropicalis*) a voriconazol, e três isolados (dois *C. parapsilosis* e um *C. tropicalis*) foram identificados como maiores tolerantes a caspofungina, resultando em ~5 % de prevalência de resistência. A identificação do isolado de *C. tropicalis* multirresistente, constituiu um importante resultado visto a identificação destas estirpes multirresistentes ser, habitualmente rara e não descrita. O estudo das regiões *hotspots* do gene *CpFKSI* pelos dois isolados de *C. parapsilosis* resistentes revelaram apenas a existência do polimorfismo natural P660A no *hotspot* 1, tendo já sido identificado noutros estudos como responsável pelo aumento da tolerância a equinocandinas. Dos isolados de *C. glabrata* que se identificaram como resistentes, apenas ISTE188 se pode correlacionar o fenótipo de resistência com a codificação de uma nova variante hiperativa do regulador transcricional CgPdr1. Nos restantes cinco isolados resistentes, os resultados obtidos não permitiram concluir que estes são mutantes do regulador, havendo possibilidade destes terem adquirido resistência através de um mecanismo independente de CgPdr1.

Palavras-chave: antifúngicos, *breakpoints*, *Candida* não *albicans*, mutações, resistência antifúngica

Abstract

Fungal infections are of concern to public health, particularly the genus *Candida*, due to the increase in strains resistant to conventional therapies and associated with high morbidity and mortality rates. Non-*albicans* species stand out for the persistent emergence of resistant strains, however, their poorly studied physiology and molecular biology have hindered the understanding of the molecular mechanisms underlying these resistances. In this study we analyzed 628 isolates identified as *Candida* from patients in healthcare unD1/D2 in Lisbon area and found a high prevalence of *C. albicans*. A significant percentage of non-*albicans Candida* isolates were also identified, especially *C. glabrata* and *C. parapsilosis*. These non-*albicans* isolates were analyzed for their susceptibility to four antifungal drugs of relevance in clinical practice. Seven isolates were identified as resistant, six *C. glabrata* to fluconazole and three (two *C. glabrata* and one *C. tropicalis*) to voriconazole, and three isolates (two *C. parapsilosis* and one *C. tropicalis*) were identified as higher tolerant to caspofungin, resulting in ~5 % prevalence of resistance. The identification of the multidrug-resistant *C. tropicalis* isolate was an important result since identification of these multidrug-resistant strains is usually rare and not described. The study of the hotspot regions of the *CpFKSI* gene for the two resistant *C. parapsilosis* isolates revealed only the existence of the natural polymorphism P660A in *hotspot* 1, which has already been identified in other studies as responsible for increased tolerance to echinocandins. Of the *C. glabrata* isolates that were identified as resistant, only ISTE188 could correlate the resistance phenotype with the encoding of a novel overactive variant of the transcriptional regulator CgPdr1. In the remaining five resistant isolates, the results obtained did not allow us to conclude that they are mutants of the regulator, with the possibility that they acquired resistance through a CgPdr1 independent mechanism.

Keywords: antifungals, breakpoints, Non-*albicans Candida*, mutations, antifungal resistance

Índice

1. Introdução	1
1.1 Epidemiologia do género <i>Candida</i>	1
1.2 Antifúngicos e os seus mecanismos de ação	2
1.2.1 Azóis	2
1.2.2 Polienos	3
1.2.3 Equinocandinas	4
1.3 Mecanismos moleculares de resistência desenvolvidos por <i>Candida</i> para combater a terapêutica antifúngica	4
2. Objetivos	9
3. Materiais e métodos	10
3.1 Estirpes e meios de cultura.....	10
3.2 Soluções de antifúngicos.....	10
3.3 Ensaio para determinação da concentração mínima inibitória MIC ₅₀ dos isolados... 10	
3.3.1 Ensaio de fenotipagem em larga escala.....	10
3.3.2 Determinação do valor de MIC ₅₀	11
3.4 Identificação molecular de isolados clínicos por recurso à obtenção da sequência D1/D2	12
3.4.1 Extração de DNA genómico.....	12
3.4.2 Amplificação por PCR da região D1/D2.....	12
3.5 Amplificação e sequenciação do gene <i>CgPDR1</i> de <i>C. glabrata</i>	13
3.6 Quantificação da expressão génica, por PCR em tempo real, dos genes <i>CgCDR1</i> e <i>CgPUP1</i> em isolados de <i>C. glabrata</i>	15
3.6.1 Recolha de células e extração de RNA	15
3.6.2 Transcriptase reversa.....	15
3.6.3 PCR quantitativo	15
3.7 Amplificação e sequenciação dos <i>hotspots</i> 1 e 2 presentes no gene <i>CpFKS1</i> de <i>C. parapsilosis</i>	16
4. Resultados e Discussão	18
4.1 Distribuição epidemiológica dos isolados estudados	18
4.2 Perfil de suscetibilidade a antifúngicos entre os isolados de <i>Candida</i> não <i>albicans</i>	19
4.3 Determinação dos mecanismos moleculares subjacentes aos fenótipos de resistência a azóis nos isolados resistentes a azóis de <i>C. glabrata</i>	25
4.4 Determinação dos mecanismos moleculares subjacentes aos fenótipos de resistência a equinocandinas observadas nos isolados resistentes de <i>C. parapsilosis</i>	28
5. Perspetivas Finais.....	29
6. Referências Bibliográficas	29
Anexos.....	33
Anexo 1 - Distribuição dos produtos a partir dos quais se obtiveram os isolados em estudo.	33
Anexo 2 – Número de produtos diferentes onde cada espécie foi recolhida.....	33
Anexo 3 - Distribuição detalhada de isolados extraídos de produtos não estéreis.	34
Anexo 4 - Distribuição detalhada de isolados extraídos de produtos estéreis.....	34

Anexo 5 - Tabela detalhada dos resultados dos testes de avaliação de suscetibilidade a antifúngicos para <i>C. glabrata</i> . (R – resistente; S – suscetível; T – tolerância aumentada).....	35
Anexo 6 - Tabela detalhada dos resultados dos testes de avaliação de suscetibilidade a antifúngicos para <i>C. parapsilosis</i> . (R – resistente; S – suscetível; T – tolerância aumentada).	37
Anexo 7 - Tabela detalhada dos resultados dos testes de avaliação de suscetibilidade a antifúngicos para <i>C. tropicalis</i> . (R – resistente; S – suscetível).....	38
Anexo 8 - Tabela detalhada dos resultados dos testes de avaliação de suscetibilidade a antifúngicos para <i>C. kefyr</i> . (R – resistente; S – suscetível).	38
Anexo 9 - Tabela detalhada dos resultados dos testes de avaliação de suscetibilidade a antifúngicos para <i>C. lusitaniae</i> . (R – resistente; S – suscetível).	39
Anexo 10 – Alinhamentos das sequências obtidas pelos <i>primers</i> NL1 (A) e NL4 (B) de acordo com a base de dados presente na NCBI.	39
Anexo 11 – Alinhamento obtido pela ClustalW da sequenciação do gene <i>CgPDR1</i> do isolado ISTD289.....	40
Anexo 12 - Alinhamento obtido pela ClustalW da sequenciação do gene <i>CgPDR1</i> do isolado ISTD408.....	41
Anexo 13 - Alinhamento obtido pela ClustalW da sequenciação do gene <i>CgPDR1</i> do isolado ISTE178.	42
Anexo 14 - Alinhamento obtido pela ClustalW da sequenciação do gene <i>CgPDR1</i> do isolado ISTE188.	43
Anexo 15 - Alinhamento obtido pela ClustalW da sequenciação do gene <i>CgPDR1</i> do isolado ISTE189.	44
Anexo 16 - Alinhamento obtido pela ClustalW da sequenciação do gene <i>CgPDR1</i> do isolado ISTE190.	45

Índice de Tabelas

Tabela 3.3.1.1 - *Breakpoints* definidos pela EUCAST para diferentes espécies de *Candida*.

Tabela 3.4.2.1 – Mistura de reação de amplificação da região D1/D2.

Tabela 3.4.2.2 – Condições definidas no termociclador para amplificação da região D1/D2.

Tabela 3.4.2.3 - *Primers* utilizados para amplificação e sequenciação da região D1/D2.

Tabela 3.5.1 – Mistura de reação de amplificação do gene *CgPDR1*.

Tabela 3.5.2– Condições definidas no termociclador para amplificação do gene *CgPDR1*.

Tabela 3.5.3 - *Primers* utilizados para amplificação e sequenciação do gene *CgPDR1*.

Tabela 3.6.2.1 – Mistura de reação para transcriptase reversa.

Tabela 3.6.2.2 – Condições definidas no termociclador para a transcriptase reversa.

Tabela 3.6.3.1 - Mistura de reação utilizada para os métodos de qPCR.

Tabela 3.6.3.2 - *Primers* utilizados para os métodos de qPCR dos gene alvo do *CgPDR1*.

Tabela 3.6.3.3 – Condições definidas no termociclador para a qPCR.

Tabela 4.2.1 - Resultados dos métodos de microdiluição a antifúngicos para espécies de *Candida* não *albicans* potencialmente resistentes (AnfB – Anfotericina B; Casp – Caspofungina; FLC – Fluconazol; R – Resistente; S – Suscetível; VRC - Voriconazol).

Tabela 4.3.1 - Alteração da sequência de aminoácidos do fator de transcrição *CgPdr1* codificados pelo isolados quando comparados com a estirpe de referência CBS138. Estas análises resultam de duas sequenciações independentes. A verde encontram-se as mutações identificadas tanto em estirpes suscetíveis como resistentes, a laranja as mutações identificadas em estirpes resistentes, sendo candidatas a novos GOF's no *CgPdr1* e a azul as mutações que ainda não tinham sido identificadas. As mutações descritas foram verificadas por Ferrari, S., *et al.* 2009, Tantivitayakul, P., *et al.*, 2019 e Salazar, S., *et al.*, 2022.

Índice de Figuras

Figura 1.2.1 – Representação esquemática dos mecanismos de ação conhecidos das diferentes classes de antifúngicos disponíveis para o tratamento de candidíases. Adaptado de Salazar *et al.*, 2020.

Figura 1.2.1.1 – Exemplos representativos dos dois tipos de azóis atualmente disponíveis para a terapêutica de candidíases e a suas estruturas químicas.

Figura 1.2.2.1 – Exemplo representativo do polieno mais comumente utilizado para a terapêutica de candidíases e respetiva estrutura química.

Figura 1.2.3.1 – Exemplo representativo da equinocandina mais comumente utilizada para a terapêutica de candidíases e respetiva estrutura química.

Figura 1.3.1 – Mecanismos documentados de resistência ao fluconazol nas espécies *Candida*. Adaptado de Whaley *et al.*, 2017

Figura 1.3.2 – Representação esquemática de associações reguladoras entre reguladores envolvidos na resistência azólica e genes que codificam bombas de efluxo em espécies do género. Apesar de identificados os transportadores ABC-MDR e MFS-MDR envolvidos na resistência em *C. krusei* e *C. tropicalis*, os reguladores destes genes ainda não foram caracterizados Adaptado de Salazar, S., *et al.*, 2020.

Figura 1.3.3 – Distribuição das mutações de ganho de função relatadas em CgPdr1. As mutações resumidas neste quadro só foram encontradas em isolados ou estirpes clínicas resistentes. A preto encontram-se as mutações definidas como mutações GOF, em que as estirpes, quando introduzidas num *background* suscetível, se tornam resistentes e/ou induzem a upregulação dos genes alvo do CgPdr1. As mutações GOF de elevado potencial que foram identificadas em estirpes após evolução *in vitro* durante a exposição a azóis ou durante a evolução *in vivo* num paciente submetido a tratamento com azóis estão também representadas a cinzento. DBD – DNA-Binding domain; ID - Inhibitory Domains; XDB - Xenobiotic Binding Domain; CDR - Central Regulatory Domain; NLS - Nuclear Localization Signaling; TAD - Transactivation Domain. Adaptado de Salazar, S., 2022

Figura 1.3.4 – Localização esquemática da proteína Fks1 na membrana plasmática. São indicados o terminal N (N) e terminal C (C) de Fks1p. Os segmentos transmembranares da proteína Fks1 são indicados pelos retângulos verdes e as regiões dos *hotspots* da proteína através dos retângulos vermelhos. Adaptado de Papp, C., *et al.*, 2018.

Figura 3.3.2.1 – Preparação das microplacas com antifúngico para o método de microdiluição. Adaptado de Rodriguez-Tudela *et al.*, 2003. (FLC – Fluconazol; AnfB – Anfotericina B; Casp – Caspofungina; VRC – Voriconazol).

Figura 4.1.1 - Distribuição das espécies de isolados *Candida* das coleções (identificados como pertencentes a uma espécie do género *Candida* com base no perfil MALDI-TOF) examinadas neste trabalho de acordo com o produto de onde foram recolhidos. Outros corresponde a produtos em que foram recolhidos menos que cinco isolados.

Figura 4.2.1 – Exemplos de resultados obtidos no método de microdiluição para a determinação do valor de MIC₅₀. A - Análise do MIC₅₀ do isolado de *C. glabrata* ISTE33 para fluconazol; B - Análise do MIC₅₀ do isolado de *C. glabrata* ISTE33 para voriconazol; C - Análise do MIC₅₀ de ISTE139 para caspofungina. As setas representam os *breakpoints* de referência estabelecidos pelo EUCAST, no caso do fluconazol e voriconazol, e estabelecidos para o estudo, no caso da caspofungina.

Figura 4.2.2 – Distribuição dos valores de MIC para *C. glabrata*. A- Distribuição para fluconazol de acordo com os resultados obtidos; B- Distribuição para fluconazol mundialmente; C- Distribuição para voriconazol de acordo com os resultados obtidos; D- Distribuição para voriconazol mundialmente; As barras laranjas correspondem a isolados resistentes, uma vez que possuem concentrações superiores ao *breakpoint* de resistência.

Figura 4.2.3 – Distribuição dos valores de MIC para *C. parapsilosis*. A- Distribuição para fluconazol de acordo com os resultados obtidos; B- Distribuição para fluconazol mundialmente; C- Distribuição para voriconazol de acordo com os resultados obtidos; D- Distribuição para voriconazol mundialmente; E- Distribuição para voriconazol de acordo com os resultados obtidos. As barras laranjas correspondem a isolados resistentes, uma vez que possuem concentrações superiores ao *breakpoint* de resistência.

Figura 4.2.4 – Resultados obtidos pelo método de microdiluição ao isolado de *C. tropicalis* ISTE57. A – a fluconazol; B – a voriconazol; C – a caspofungina. As setas representam os *breakpoints* de referência estabelecidos pelo EUCAST, no caso do fluconazol e voriconazol, e estabelecidos para o estudo, no caso da caspofungina.

Figura 4.3.1 – Exemplo de resultado obtido após amplificação do gene *CgPDR1* utilizando os primers X e Y. A primeira faixa corresponde ao DNA 1kb plus ladder. As setas laranjas representam os fragmentos de 3 kb e 4 kb.

Figura 4.3.2 – Expressão de *CgCDR1* e de *CgPUP1* nos isolados que deram como resistentes a azóis nos testes de fenotipagem e à estirpe de referência de *C. glabrata*, CBS138. O nível de expressão registado no CBS138 foi fixado em 1 e os outros valores comparados com esse.

Figura 4.4.1 – Exemplo de resultado obtido após amplificação do gene *CpFKSI*. A primeira faixa corresponde ao DNA 1kb plus ladder. As setas laranjas representam os fragmentos obtidos.

Abreviaturas

ABC	<i>ATP-Binding Cassete</i>
Atm	<i>Atmospheric pressure</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. dubliniensis</i>	<i>Candida dubliniensis</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>C. guilliermondii</i>	<i>Candida guilliermondii</i>
<i>C. haemulonii</i>	<i>Candida haemulonii</i>
<i>C. inconspicua</i>	<i>Candida inconspicua</i>
<i>C. kefyr</i>	<i>Candida kefyr</i>
<i>C. krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<i>C. lusitaniae</i>	<i>Candida lusitaniae</i>
<i>C. metapsilosis</i>	<i>Candida metapsilosis</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>C. rugosa</i>	<i>Candida rugosa</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
DMSO	<i>Dimetilsulfóxido</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DO	<i>Densidade ótica</i>
ECOFF	<i>Epidemiological cutoff values</i>
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
GOF	<i>Gain of function</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight</i>
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	<i>Rotações por minuto</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RT-PCR	<i>Real time - Polymerase Chain Reaction</i>
Tm	<i>Melting temperature</i>
qPCR	<i>Quantitative Polymerase chain reaction</i>
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>

1. Introdução

As infeções fúngicas, apesar de subestimadas, representam um grave problema de saúde global, devido ao aumento da sua incidência em humanos (Lockhart & Guarner, 2019; Kainz *et al.*, 2020). Anualmente, mais mil milhões de pessoas são identificadas com este tipo de infeções, resultando numa estimativa de 1,5 milhões de mortes anuais (Campoy & Adrio, 2017; Ben-Ami *et al.*, 2021), números estes superiores à mortalidade causada pela tuberculose ou malária (Kainz *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2020). As taxas de morbilidade e mortalidade das infeções fúngicas continuam a aumentar em resultado, entre outros fatores, do aumento da população imunosuprimida (p.e. população idosa ou em tratamento por quimioterapia), da generalização de cirurgias mais invasivas ou da utilização de antibióticos de largo espetro (Silva *et al.*, 2012; Kainz *et al.*, 2020). Entre milhões de espécies fúngicas, apenas um pequeno número é responsável por estas doenças, no entanto, este número é cada vez mais elevado, presumivelmente devido à adaptação destas espécies às alterações climáticas associadas à pressão antropogénica (Ben-Ami *et al.*, 2021).

As infeções fúngicas também se distinguem por poderem ser causadas por espécies que pertencem à microbiota humana dita comensal. Assim, quando a imunidade do hospedeiro se encontra comprometida, estas populações comensais podem sofrer um aumento de proliferação e causar doença. Noutros casos, a infeção pode ser causada por contacto com materiais (como cateteres) colonizados por estas espécies (da Rocha *et al.*, 2021; Gnat *et al.*, 2021). As infeções fúngicas são usualmente classificadas de acordo com a região do hospedeiro afetada, podendo ser denominadas de superficiais (se afetam a pele, o cabelo, as unhas ou as mucosas) ou sistémicas, quando ocorre a disseminação do fungo pela corrente sanguínea e, eventualmente, se dá colonização dos principais órgãos do corpo (Silva *et al.*, 2012).

1.1 Epidemiologia do género *Candida*

O trabalho desenvolvido nesta dissertação foca-se nas infeções causadas por fungos do género *Candida*, sendo estas infeções habitualmente conhecidas como candidíases. A candidíase é uma infeção oportunista em que, das 200 espécies que estão incluídas no género *Candida*, apenas 15 aparentam ter potencial para desenvolver estas infeções no Homem (Gnat *et al.*, 2021). Entre outras razões, essa disparidade de números resulta de cerca de 65% das espécies não conseguirem crescer a 37 °C (Silva *et al.*, 2012). As infeções causadas por *Candida* representam cerca de 50% a 70% das infeções fúngicas consideradas sistémicas (de Oliveira Santos *et al.*, 2018) e são mesmo a causa mais comum das infeções fúngicas em indivíduos imunocomprometidos (Lee *et al.*, 2020).

A espécie mais prevalente nas candidíases é *C. albicans* (van Rhijn & Bromley, 2021), no entanto, tem-se vindo a observar um aumento de incidência de infeções causadas pelas chamadas espécies não *albicans* (Silva *et al.*, 2012; Pfaller *et al.*, 2019; Gnat *et al.*, 2021). Em particular, tem-se observado que, apesar da ocorrência de variações temporais e geográficas, *C. glabrata* é habitualmente a segunda espécie mais prevalente, seguida de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (Pfaller *et al.*, 2019). Notavelmente, entre 1995 e 2015 observou-se um aumento de cerca de 20% da incidência de *Candida* não *albicans* em candidíases sistémicas, comparativamente com dados obtidos entre 1970 e 1990, tendo estas modificações no panorama epidemiológico sido observadas nos continentes americano, europeu e asiático (Gnat *et al.*, 2021). As espécies não *albicans* representam uma séria ameaça de saúde, uma vez que, comparando com *C. albicans*, são mais resilientes aos antifúngicos comumente utilizados na clínica, e apresentam taxas de morbilidade e mortalidade mais elevadas (Silva *et al.*, 2012; Gangneux *et al.*, 2018; Gnat *et al.*, 2021).

1.2 Antifúngicos e os seus mecanismos de ação

Para o combate das infeções causadas por fungos são utilizados antifúngicos, estando disponíveis para terapêutica moléculas que se dividem em três grandes classes: azóis, equinocandinas e polienos. Estes antifúngicos estão segmentados de acordo com o *target*, alvo este presente nos agentes etiológicos. Assim, enquanto os azóis têm a sua ação na enzima Erg11 envolvida na biossíntese de ergosterol, as equinocandinas têm o seu alvo na enzima β -glucano sintase, envolvida na síntese da parede celular, e os polienos atuam ao nível da membrana plasmática (Salazar *et al.*, 2020) (Figura 1.2.1). Na secção seguinte descreve-se com mais algum detalhe a informação recolhida sobre o mecanismo de ação destes antifúngicos.

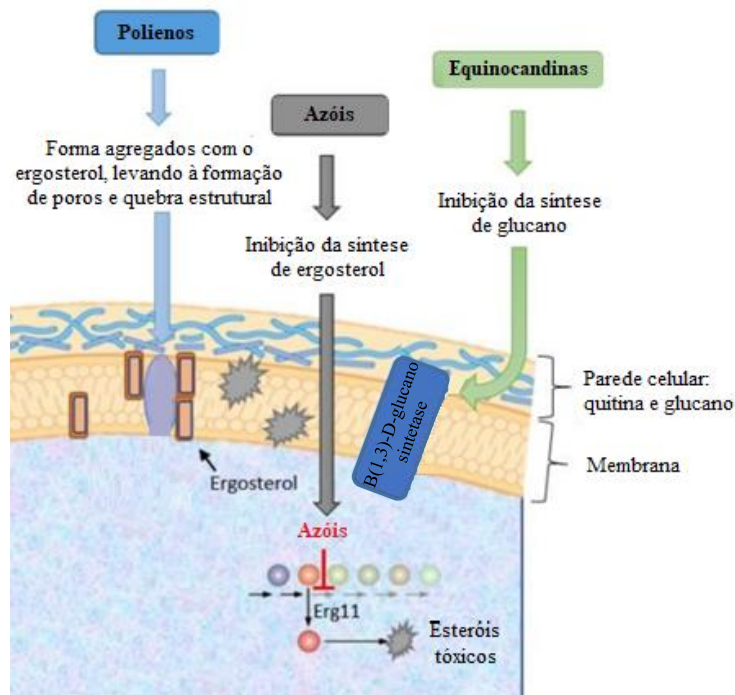


Figura 1.2.1 – Representação esquemática dos mecanismos de ação conhecidos das diferentes classes de antifúngicos disponíveis para o tratamento de candidíases. Adaptado de Salazar, S., *et al.*, 2020.

1.2.1 Azóis

Os azóis são compostos heterocíclicos, introduzidos nos anos 80, e representam a classe mais comum de antifúngicos de uso clínico (Campoy & Adrio, 2017). Os azóis podem ser subdivididos de acordo com o número de átomos de azoto no anel cíclico. Assim, são designados imidazóis os azóis contendo dois átomos de azoto no anel, enquanto os que contêm três átomos de azoto são chamados triazóis (Figura 1.2.1.1). Os imidazóis, como isoconazol e o clotrimazol, foram os primeiros azóis a serem desenvolvidos, no entanto verificou-se que estes possuem elevada toxicidade, interação com outras substâncias medicamentosas e efeitos secundários (Campoy & Adrio, 2017). Deste modo, este tipo de azóis são utilizados principalmente para o tratamento de infeções ao nível das mucosas. Os triazóis, como o fluconazol ou o voriconazol, são os mais utilizados no uso clínico, tanto em infeções superficiais como sistémicas (Prasad *et al.*, 2016).

O processo biológico afetado por todos os azóis é a biossíntese do ergosterol, constituinte chave da membrana celular fúngica (Lee *et al.*, 2020). Em específico observa-se que estes compostos inibem a atividade da 14α -lanosterol desmetilase (CYP51), enzima codificada pelo gene *ERG11* (Campoy & Adrio, 2017). A ligação dos azóis à proteína Erg11 bloqueia a conversão de lanosterol em ergosterol, levando à acumulação de outros esteróis (como o 14α -metil-3,6-diol,) que são aberrantes e que causam toxicidade porque alteram a estabilidade e permeabilidade da membrana plasmática, para além de

perturbarem a atividade enzimática de proteínas membranares (Hani *et al.* 2015; Prasad *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2020).

Uma importante limitação da aplicação de azóis é o facto de serem capazes de promover também a inibição das enzimas do citocromo P450 presentes nas células de mamíferos, especialmente as hepáticas que são responsáveis pela metabolização de fármacos, apresentando assim uma seletividade moderada. Por outro lado, são agentes fungistáticos e por isso apenas levam à paragem do crescimento da célula fúngica, não induzindo diretamente a sua morte. Pensa-se que em resultado dessa ação estática fique facilitado o desenvolvimento de resistência, especialmente quando o seu uso é prolongado (Prasad *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2020).

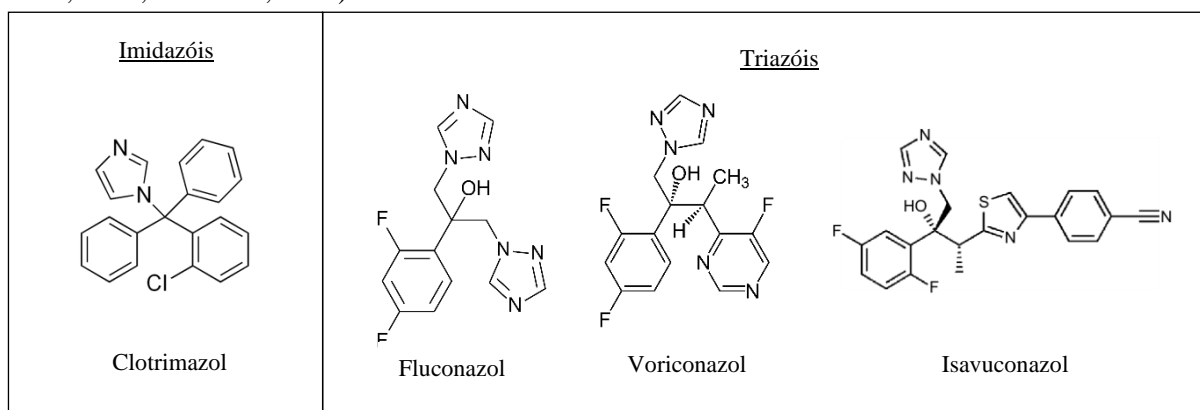


Figura 1.2.1.1 – Exemplos representativos dos dois tipos de azóis atualmente disponíveis para a terapêutica de candidíases e a suas estruturas químicas.

1.2.2 Polienos

Os polienos foram introduzidos nos anos 50 e são a classe de antifúngicos mais antiga, constituída por moléculas anfipáticas naturais das quais a anfotericina B representa o exemplo mais paradigmático (Figura 1.2.2.1). Estes compostos interagem diretamente com o ergosterol presente na membrana plasmática levando à formação de poros transmembranares e, conseqüentemente, a um extravasamento do conteúdo intracelular, desequilíbrio iónico, perda da integridade membranar e morte celular (Prasad *et al.*, 2016; Campoy & Adrio, 2017; Perlin *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2020).

Ao contrário dos azóis, os polienos são fungicidas e embora tenham sido administrados durante muito tempo, hoje sabe-se que exercem importantes efeitos secundários de toxicidade, o que tem vindo a limitar a sua utilização (Prasad *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2020). Em parte, esses efeitos tóxicos decorrem da semelhança estrutural entre o ergosterol e o colesterol levando a que o polieno possa assim inadvertidamente causar efeitos negativos nas células do hospedeiro. Para além disso, também são fármacos de fraca absorção oral, o que torna mais difícil a sua aplicação (Campoy & Adrio, 2017; Lee *et al.*, 2020).

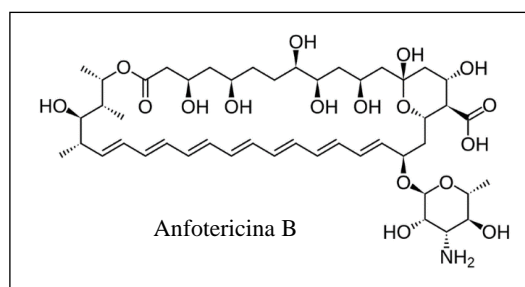


Figura 1.2.2.1 – Exemplo representativo do polieno mais comumente utilizado para a terapêutica de candidíases e respetiva estrutura química.

estas espécies igual ou inferior a 1 %. No entanto, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* possuem uma maior resiliência para esta classe antifúngica e *C. glabrata* destaca-se, tendo sido relatada em estudos de prevalência epidemiológica com uma resistência antifúngica de 2 a 4 % para esta classe antifúngica (Arendrup & Patterson, 2017; Perlin *et al.*, 2017).

Acredita-se que o aumento do uso de azóis e equinocandinas tenha causado pressão seletiva sobre a *C. glabrata*, resultando em estirpes multirresistentes a antifúngicos de classes diferentes, sendo que esse número é relativamente reduzido (Pristov & Ghannoum, 2019). Além de *C. glabrata*, já foram reportados mais isolados multirresistentes de várias espécies de *Candida* (Perlin *et al.*, 2017).

A resistência a polienos é a menos comum, no entanto já foram reportadas infecções resultantes de resistência adquirida a esta classe antifúngica em estirpes de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. rugosa*, *C. lusitaniae* e *C. tropicalis* (Perlin *et al.*, 2017).

As alterações na suscetibilidade da população aos antifúngicos e a pequena disponibilidade de escolha na terapia tornaram importante, e necessária, a existência de base de dados que agreguem de forma precisa os dados colecionados *in vitro* acerca da suscetibilidade aos antifúngicos. Estes testes de suscetibilidade foram desenvolvidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e pelo EUCAST e permitem determinar, *in vitro*, a MIC do antifúngico necessária para inibir o crescimento do agente patogénico. Estes métodos são altamente padronizados e reprodutíveis, sendo clinicamente relevantes para a decisão por parte dos médicos relativamente ao tratamento antifúngico (Sanguinetti *et al.*, 2015; Perlin *et al.*, 2017). No entanto, deve ter-se em consideração que para determinados antifúngicos (como é o caso da caspofungina) e para determinadas espécies (como é o caso de *C. glabrata*) é observada variedade interlaboratorial, dificultando assim o estabelecimento de valores quantitativos bem definidos para os *breakpoints* de resistência (ou seja, fica menos claro qual será a barreira que permite distinguir isolados resistentes de sensíveis)(Perlin *et al.*, 2017). Para além dos testes de suscetibilidade, existem ainda programas de vigilância global que permitem o estudo epidemiológico das resistências através do fornecimento de dados sobre a suscetibilidade aos antifúngicos em hospitais e laboratórios de todo o mundo (Sanguinetti *et al.*, 2015).

Os mecanismos de resistência das espécies de *Candida* a azóis têm vindo a ser relativamente mais estudados, comparando com outras espécies de fungos, apresentando aspetos de alguma similaridade entre espécies e também outros específicos de espécie para espécie (Perlin *et al.*, 2017). Assim, entre estes mecanismos que se têm verificado contribuir para uma maior resistência a azóis inclui-se, de forma geral, a sobre expressão de bombas de efluxo, a sobre expressão ou a alteração da enzima Erg11 (Perlin *et al.*, 2017). Estes mecanismos podem ocorrer isoladamente ou simultaneamente num mesmo isolado, podendo produzir efeitos adicionais ou conduzir a resistência cruzada. Na Figura 1.3.1 encontram-se sumariados os mecanismos de resistência documentados para fluconazol. Deve-se ter em atenção que muita da informação que tem vindo a ser recolhida acaba por advir de estirpes laboratoriais e nem sempre há muita correlação entre estas observações e os isolados clínicos, sugerindo que pode haver fatores que condicionam *in vivo* a resistência e que podem não estar a ser totalmente considerados nas experiências desenhadas *in vitro* (Salazar *et al.*, 2020).

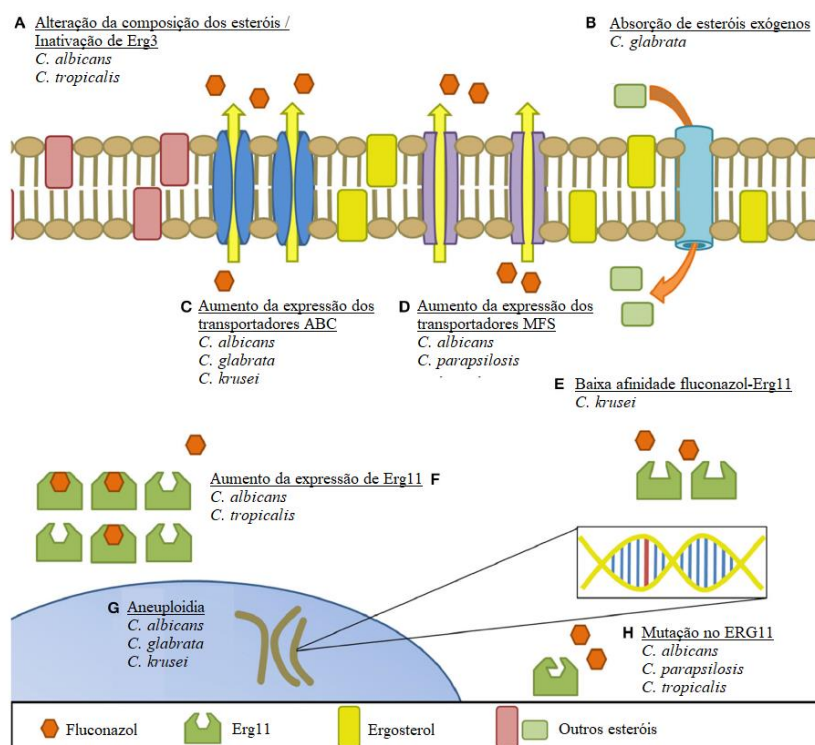


Figura 1.3.1 –Mecanismos documentados de resistência ao fluconazol nas espécies *Candida*. Adaptado de Whaley, S., *et al.*, 2017

A sobre expressão da enzima 14 α -lanosterol demetilase pretende ultrapassar a inibição da atividade enzimática causada pela exposição aos azóis e ocorre habitualmente através da sobre expressão do gene *ERG11* nos isolados resistentes (Perlin *et al.*, 2017). Noutros isolados, como *C. albicans* e *C. tropicalis*, têm sido reportadas mutações no gene *ERG11* codificado por estirpes resistentes, presumindo-se que as alterações de aminoácidos originem alterações estruturais no local ativo da 14 α -lanosterol desmetilase que evitam ou reduzem a ligação dos azóis à proteína. A resistência pode ocorrer também devido à perda da função do gene *ERG3*, o que impossibilita a acumulação de compostos tóxicos, como 14- α -metil-3,6-diol, como é o caso de *C. albicans* e *C. tropicalis* (Perlin *et al.*, 2017; Whaley *et al.*, 2017).

O aumento de expressão das bombas de efluxo é o mecanismo mais comum de resistência aos antifúngicos, resultando numa redução da concentração intracelular do antifúngico. Estas bombas de efluxo dividem-se entre a superfamília *ATP-binding cassette* (ABC) ou entre a *major facilitator superfamily* (MFS) e o aumento da sua expressão tem vindo a ser observada em isolados de diferentes espécies resistentes incluindo *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Os fatores de transcrição que regulam a expressão destas bombas, variam de acordo com o agente patogénico (Figura 1.3.2) (Perlin *et al.*, 2017).

A resistência antifúngica destes isolados ocorre através do aumento da eficiência das bombas de efluxo, provocada pelo aumento da expressão dos fatores de transcrição e, conseqüentemente, do aumento da expressão dos seus genes alvo, como *CDR1/CDR2* ou *MDR*. Desta forma, espera-se que a sobre expressão do gene tenha como consequência um aumento na capacidade de bombeamento do fármaco para fora da célula (Pristov & Ghannoum, 2019; Wang *et al.* 2022). O aumento da expressão destes fatores de transcrição ocorrem pela presença de mutações ganho de função (GOF) nos fatores de transcrição (Wang *et al.* 2022).

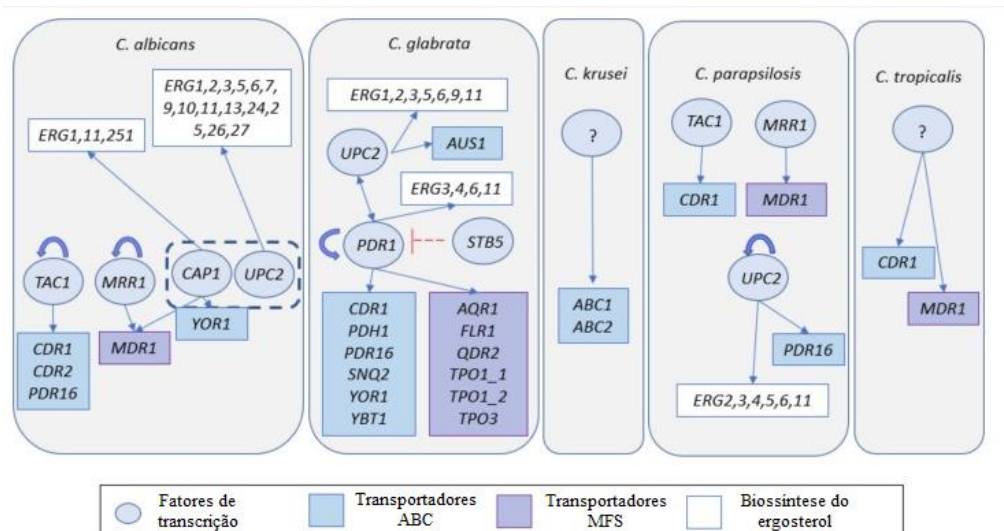


Figura 1.3.2 – Representação esquemática de associações reguladoras entre reguladores envolvidos na resistência azólica e genes que codificam bombas de efluxo em espécies do género. Apesar de identificados os transportadores ABC-MDR e MFS-MDR envolvidos na resistência em *C. krusei* e *C. tropicalis*, os reguladores destes genes ainda não foram caracterizados. Adaptado de Salazar, S., *et al.*, 2020.

Em *C. glabrata*, o desenvolvimento da resistência aos azóis tem estado maioritariamente relacionado com a presença de mutações GOF no fator de transcrição Pdr1 (Figura 1.3.3) (Whaley *et al.*, 2017; Moye-Rowley, 2019). Vários estudos que focaram a aquisição de resistência a azóis em estirpes clínicas de *C. glabrata* verificaram que a maioria destes *CgPDR1* codificados incluem mutações que não se observam nos alelos codificados por isolados suscetíveis (Whaley *et al.*, 2017). Estes alelos de *CgPdr1* com mutações GOF são capazes de aumentar a expressão dos genes alvo, mesmo na ausência de um estímulo. Estas mutações exibem padrões de expressão distintos dos genes alvo, com exceção do aumento da expressão de *CgCDR1* e *CgPUP1* (Whaley *et al.*, 2017).

Em *C. albicans*, os factores de transcrição Tac1 e Mrr1 funcionam como ativadores transcricionais das bombas de efluxo *CaCDR1* e *CaMDR1*, respetivamente e, quando estes factores de transcrição apresentam mutações GOF, podem levar à sobre expressão dos genes alvo e, consequentemente, aumentar o MIC das estirpes para fluconazol (Wang *et al.* 2022). Nas espécies *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, e *C. glabrata*, também se observam existir bombas de efluxo ABC e/ou MFS que se pensa estarem envolvidas na resistência a azóis, contudo nestes casos ainda se encontra por descrever quais os respetivos reguladores transcricionais. (Whaley *et al.*, 2017).

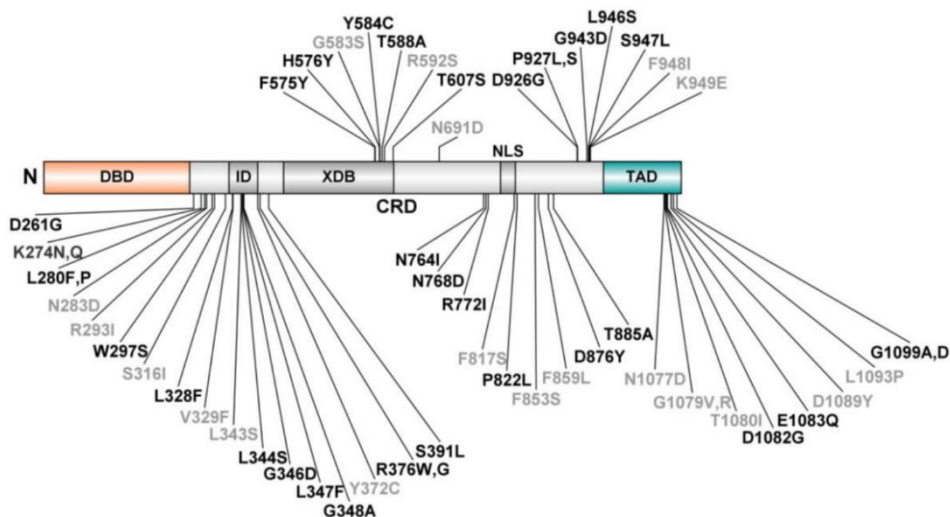


Figura 1.3.3 – Distribuição das mutações de ganho de função relatadas em CgPdr1. As mutações resumidas neste quadro só foram encontradas em isolados ou estirpes clínicas resistentes. A preto encontram-se as mutações definidas como mutações GOF, em que as estirpes, quando introduzidas num *background* suscetível, se tornam resistentes e/ou induzem a upregulação dos genes alvo do CgPdr1. As mutações GOF de elevado potencial que foram identificadas em estirpes após evolução *in vitro* durante a exposição a azóis ou durante a evolução *in vivo* num paciente submetido a tratamento com azóis estão também representadas a cinzento. DBD – DNA-Binding domain; ID - Inhibitory Domains; XDB - Xenobiotic Binding Domain; CDR - Central Regulatory Domain; NLS - Nuclear Localization Signaling; TAD - Transactivation Domain. Adaptado de Salazar, S., 2022a.

Relativamente aos mecanismos de resistência para as equinocandinas, estes parecem estar relacionados com mutações no *FKS*, gene codificante do alvo das equinocandinas, (1,3)- β -D-glucano sintetase. As mutações nesta enzima podem estar relacionadas com a exposição prolongada ou múltipla a equinocandinas. A resistência em espécies de *Candida* não é comum, no entanto, quando ocorre, verifica-se a substituição de aminoácidos nas regiões *hotspot* 1 e *hotspot* 2 de *FKS1* em todas as espécies, enquanto que em *C. glabrata* ocorre também em *FKS2* (Figura 1.3.4) (Perlin *et al.*, 2017; Pristov & Ghannoum, 2019). As mutações estão também relacionadas com o polimorfismo natural de espécies como *C. parapsilosis*, caracterizada por MIC's bem mais elevados comparativamente com as outras espécies. Desta forma, os polimorfismos naturais conferem a estes isolados uma maior tolerância à classe antifúngica (Perlin *et al.*, 2017).

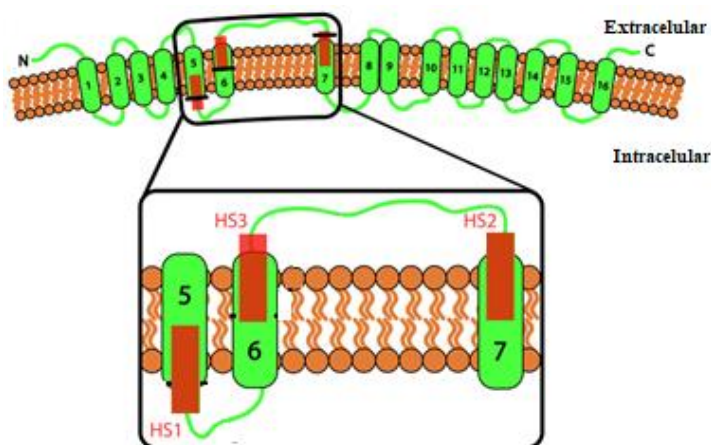


Figura 1.3.4 – Localização esquemática da proteína Fks1 na membrana plasmática. São indicados o terminal N (N) e terminal C (C) de Fks1p. Os segmentos transmembranares da proteína Fks1 são indicados pelos retângulos verdes e as regiões dos hotspots da proteína através dos retângulos vermelhos. Adaptado de Papp, C., et al., 2018.

2. Objetivos

Nas últimas décadas, a maior parte dos estudos que examinam a incidência de infecções fúngicas causadas por leveduras do género *Candida* têm destacado a epidemiologia e mecanismos de resistência de *C. albicans*. No entanto, a incidência das infecções causadas por espécies *Candida* não *albicans* tem sido cada vez maior e há poucos estudos relativos a estas. Além disso, os estudos epidemiológicos realizados em Portugal centrados em leveduras do género *Candida* têm-se focado em isolados recolhidos apenas dos produtos estéreis, havendo muito pouca informação relativamente aos restantes isolados presentes em produtos não estéreis e que constituem a microbiota comensal. Tendo em conta a demonstração recente que estas populações comensais apresentam elevada capacidade de causar infecções sistémicas, o seu estudo, reveste-se pois de grande importância. Nesta dissertação focou-se o estudo da suscetibilidade a antifúngicos de um conjunto alargado de isolados recolhidos em diferentes unidades de saúde da zona de Lisboa, de modo a compreender a epidemiologia e a emergência de resistência entre as leveduras do género *Candida* nesta região geográfica. Para um conjunto de isolados que se observou serem resistentes, foram estudados alguns indicativos preliminares dos mecanismos moleculares que podiam estar subjacentes a essa resistência.

3. Materiais e métodos

3.1 Estirpes e meios de cultura

Neste estudo foi usado um conjunto de 628 isolados recolhidos em diferentes hospitais na área da Grande Lisboa e identificados por MALDI-TOF como pertencentes ao género *Candida*. Além destes isolados, foram usadas as estirpes de referência *C. glabrata* CBS138 e *C. parapsilosis* ATCC 22019. Dos isolados recolhidos foram avaliados apenas os isolados *Candida* não *albicans* relativamente aos perfis de suscetibilidade a antifúngicos: 78 isolados de *C. glabrata*; 12 isolados *C. kefyr*; 17 isolados de *C. lusitaniae*; 19 isolados *C. krusei*; 37 isolados *C. parapsilosis*; 14 isolados *C. tropicalis* e um isolado de *C. inconspicua* e outro de *C. haemulonii*. Todos estes isolados foram criopreservados a -80 °C, em meio YPD suplementado com glicerol.

O crescimento dos isolados e das estirpes de referência foi efetuado a uma temperatura de 30 °C, com uma agitação orbital de 200 rpm, em meio YPD líquido constituído por 20 g/L de glucose (Merck), 20 g/L de peptona bacteriológica (Difco), 10 g/L de extrato de levedura (Difco). Para esterilizar este meio de cultura usou-se uma autoclavagem a 121 °C e 1 atm durante 15 min. Para preparar placas de meio sólido do meio YPD adicionou-se ao correspondente meio líquido 20 g/L de agar (Difco). Nos ensaios de suscetibilidade dos isolados aos antifúngicos foi usado o meio RPMI 2x concentrado contendo 36 g/L de glucose (Merck), 0,3 g/L - glutamina (Merck), 69,06 g/L de MOPS (Ácido 3 – (N – morfolino) propanosulfónico, SERVA) e, 20,8 g/L de meio RPMI-1640 sintético (Sigma). Os componentes do meio RPMI-1640 encontram-se discriminados em EUCAST E. Dis 7.3.2 (EUCAST, 2020). O meio RPMI 2x concentrado foi filtrado usando um filtro com tamanho de poro de 0,22 µm e conservado a 4 °C até uso posterior.

3.2 Soluções de antifúngicos

As soluções stock dos antifúngicos fluconazol (30 mg/L; Sigma), voriconazol (1,6 mg/L; Pfizer), anfotericina B (0,8 mg/L; Sigma) e caspofungina (0,8 mg/L; Merck) foram preparadas a partir de antifúngicos em pó, usando DMSO (Sigma) como solvente. Após preparação as soluções *stock* foram conservadas a -20 °C até ao seu uso.

3.3 Ensaios para determinação da concentração mínima inibitória MIC₅₀ dos isolados

Para a determinação do valor de concentração mínima inibitória (MIC₅₀) de fluconazol, voriconazol, anfotericina B e caspofungina dos isolados identificados como pertencentes a espécies não *albicans* usaram-se dois ensaios: primeiro um ensaio de fenotipagem em larga escala que visou testar a tolerância dos isolados a uma concentração definida de antifúngico e, posteriormente, um ensaio de microdiluição onde a concentração MIC₅₀ foi efetivamente determinada seguindo as recomendações da EUCAST para este tipo de ensaios (Rodriguez-Tudela *et al.*, 2003; Arendrup *et al.*, 2012; EUCAST, 2020).

3.3.1 Ensaio de fenotipagem em larga escala

Para obtenção da suspensão celular a inocular nas placas contendo os diferentes antifúngicos, os isolados não *albicans* usados foram cultivados durante a noite (~17 h) a 30 °C com uma agitação orbital de 200 rpm em microplacas de 96 poços contendo 200 µL de meio YPD líquido. No dia seguinte, as suspensões celulares obtidas foram diluídas (numa nova placa de 96 poços) a 1:20, tendo sido usados 20 uL destas suspensões diluídas, de modo a obter uma DO_{600 nm} próxima de 0,025 nas placas que continham os diferentes antifúngicos a testar. As placas onde foram inoculadas as suspensões celulares diluídas já continham 100 uL de meio RPMI 2x concentrado, 30 uL de H₂O estéril e encontravam-se

suplementadas com 50 uL dos *breakpoints* de resistência estabelecidos pela EUCAST para as espécies em estudo (Tabela 3.3.1.1) Após a inoculação, as placas foram incubadas a 37 °C, sem agitação, durante 24 h, e posteriormente ressuspensas e lidas num leitor de microplacas a densidade ótica DO_{530 nm}. Foram escolhidos para a determinação de MIC₅₀, que se explica em seguida, os isolados que apresentavam um crescimento (medido com base na DO) igual ou superior a metade do crescimento obtido na ausência de antifúngico (controle).

Tabela 3.3.1.1 - Breakpoints definidos pela EUCAST para diferentes espécies de *Candida*.

Espécie	Breakpoint dos antifúngicos (mg/L)			
	Fluconazol	Voriconazol	Anfotericina B	Caspofungina
<i>C. albicans</i>	4	0,25	1	*
<i>C. glabrata</i>	16	EI (1)	1	*
<i>C. kefyr</i>	EI (1)	EI	EI (1)	EI
<i>C. lusitaniae</i>	EI	EI (0,5)	EI	EI
<i>C. krusei</i>	Intrinsecamente resistente	EI (1)	1	*
<i>C. parapsilosis</i>	4	0,25	1	*
<i>C. tropicalis</i>	4	0,25	1	*
<i>C. inconspicua</i>	EI	EI	EI	EI
<i>C. haemulonii</i>	EI	EI	EI	EI

*A EUCAST ainda não estabeleceu *breakpoint* para a caspofungina devido à variação inter laboratorial dos MIC's pelo método da microdiluição para um mesmo isolado. Por este motivo, estabeleceu-se o *breakpoint* de 0,5 como ponto de partida para todas as espécies, exceto *C. parapsilosis*, em que se estabeleceu *breakpoint* de 1 pela sua maior tolerância a este antifúngico. EI – Evidência insuficiente. Nestes casos atribuiu-se os valores de ECOFF. Nas espécies sem informação de ECOFF foram utilizados os *breakpoints* de *C. albicans*.

3.3.2 Determinação do valor de MIC₅₀

Para determinar o valor de MIC₅₀ dos diferentes antifúngicos para os isolados selecionados usou-se o método altamente standardizado preconizado pela EUCAST (EUCAST, 2020). Assim, os isolados selecionados com base nos resultados do ensaio de fenotipagem em larga escala foram cultivados, a 30 °C e com uma agitação orbital de 200 rpm, durante a noite (~17 h) em tubos de vidro contendo 5 mL de YPD. No dia seguinte, diluiu-se a suspensão celular com água desionizada de modo a obter uma DO_{600 nm} de 0,025. As microplacas preparadas com antifúngico foram inoculadas com 100 µL da suspensão celular diluída, sendo posteriormente incubadas a 37 °C, sem agitação, durante 24 h. Ao fim desse tempo, as células foram ressuspensas e lidas a DO_{530 nm} num leitor de microplacas. O valor de MIC₅₀ para cada antifúngico e para cada isolado corresponde à menor concentração para a qual se observou um crescimento igual ou inferior a 50 % do crescimento na ausência do antifúngico.

A preparação das microplacas com os antifúngicos encontra-se esquematizada na Figura 3.3.2.1. O intervalo de concentração para fluconazol nas diferentes colunas foi de 64 mg/L a 0,125 mg/L, enquanto que para o voriconazol, anfotericina B e caspofungina foi de 8 mg/L a 0,016 mg/L.

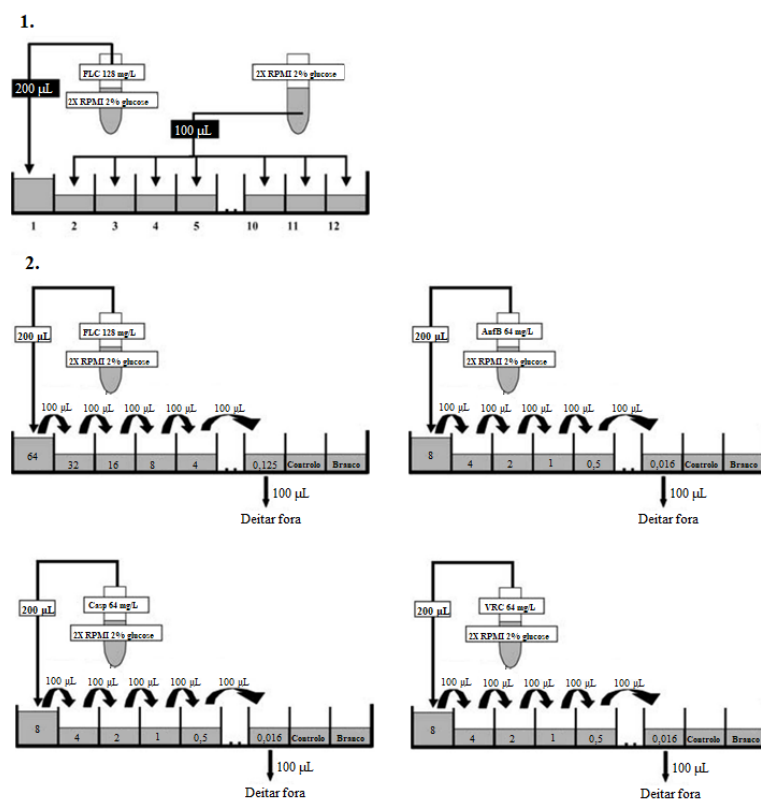


Figura 3.3.2.1 – Preparação das microplacas com antifúngico para o método de microdiluição. Adaptado de Rodriguez-Tudela *et al.*, 2003. (FLC – Fluconazol; AnfB – Anfotericina B; Casp – Caspofungina; VRC – Voriconazol).

3.4 Identificação molecular de isolados clínicos por recurso à obtenção da sequência D1/D2

A identificação molecular do isolado *C. tropicalis* ISTE57, foi feita por recurso à sequenciação da região D1/D2. Para tal, a referida região genómica foi amplificada por PCR e o fragmento obtido posteriormente sequenciado, pelo método Sanger, recorrendo aos serviços de sequenciação de DNA da empresa STABVIDA.

3.4.1 Extração de DNA genómico

A extração de DNA genómico do isolado selecionado foi feita a partir de uma pequena quantidade de biomassa que foi disposta em tubos Eppendorf de 1,5 mL. A esta massa celular foram adicionados 100 µL de esferas de vidro (0,5 mm diâmetro) e 200 µL de tampão de lise (Tris 50 mM, EDTA 50 mM, NaCl 250 mM, SDS 0,3 %). A suspensão celular foi sujeita ao vórtex durante 2 min e posteriormente incubada a 65 °C durante 1 h. De seguida, colocou-se o tubo em gelo durante 2 min, sendo a suspensão de células lisadas posteriormente centrifugada a 13000 rpm durante 15 min a 4 °C, guardando-se o sobrenadante. Ao sobrenadante foram adicionados 20 µL de acetato sódico 3 M (pH 4,8), e 400 µL de etanol frio de forma a induzir a precipitação do DNA, sendo a amostra mantida durante a noite a -20°C. Posteriormente, voltou-se a centrifugar a 13000 rpm, durante 20 min a 4 °C. O *pellet* obtido foi lavado com 500 µL de etanol 70 %, centrifugou-se de novo a 13000 rpm, durante 8 min a 4 °C, e o *pellet* de DNA obtido foi seco usando um *speed vacuum* (15 min a 45 °C) e posteriormente ressuspenso em 50 µL de água desionizada.

3.4.2 Amplificação por PCR da região D1/D2

O DNA genómico extraído foi utilizado como *template* para amplificar, por PCR, a região D1/D2. Na Tabela 3.4.2.1 encontra-se a mistura de reação de amplificação usada ao passo que na Tabela 3.4.2.2 se encontram as condições usadas no termociclador. Os *primers* utilizados estão descritos na Tabela 3.4.2.3.

Tabela 3.4.2.1 – Mistura de reação de amplificação da região D1/D2.

Componente	Volume por amostra
Tampão <i>Buffer</i>	2 µL
dNTPs	0,4 µL
<i>Primer</i> NL1	0,4 µL
<i>Primer</i> NL4	0,4 µL
<i>Template</i> DNA	1 µL
MgCl ₂	1,2 µL
DdH ₂ O	19,4 µL
<i>Taq</i> Polimerase	0,2 µL
Total	25 µL

Tabela 3.4.2.2 – Condições definidas no termociclador para amplificação da região D1/D2.

Tempo	Temperatura	
1 min	94 °C	
30 s	98 °C	
1 min	56 °C	X 25
40 s	72 °C	
7 min	72 °C	
10 s	72 °C	

Tabela 3.4.2.3 - *Primers* utilizados para amplificação e sequenciação da região D1/D2.

Primer	Sequência (5' → 3')
NL1	GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG
NL4	GGT CCG TGT TTC AAG ACG G

Verificou-se a correta amplificação do fragmento correndo uma amostra de 10 uL numa eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.5 Amplificação e sequenciação do gene *CgPDR1* de *C. glabrata*

O gene *CgPDR1* codificado pelos isolados de *C. glabrata* ISTD289, ISTD408, ISTE178, ISTE188, ISTE189 e ISTE190 foi sequenciado após amplificação por PCR. Para tal o DNA genômico dos isolados foi obtido como descrito acima. Na Tabela 3.5.1 encontra-se a mistura de reação usada para a amplificação por PCR do gene *CgPDR1* e na Tabela 3.5.2 encontram-se as condições usadas no termociclador. Os *primers* utilizados estão descritos na Tabela 3.5.3. Verificou-se a correta amplificação do fragmento correndo uma amostra de 10 uL numa eletroforese em gel de agarose 0,8%. Realizaram-se duplicados tanto nas amplificações como nas sequenciações para confirmação dos resultados.

A sequenciação do fragmento de PCR obtido foi realizada pela empresa STABVIDA, recorrendo ao método de Sanger usando os *primers* *CgPDR1_FW2*, *CgPDR1_FW3*, *CgPDR1_FW4*, *CgPDR1_RP_FW*, *CgPDR1_RP_REV*, *CgPDR1_RV2*, *CgPDR1_RV3*, *CgPDR1_FW5* e *CgPDR1_RV5* (Tabela 3.5.3).

Tabela 3.5.1 – Mistura de reação de amplificação do gene *CgPDR1*.

Componente	Volume por amostra
HF buffer (10 mM)	10 µL
dNTP's	1 µL
<i>CgPDR1</i> Fw (100 pmol/µL)	1 µL
<i>CgPDR1</i> Rev (100 pmol/µL)	1 µL
Template DNA (200 ng/µL)	2 µL
MgCl ₂ (50 mM)	2 µL
DMSO	1,5 µL
<i>Phusion polymerase</i> (2 U/µL)	0,5 µL
ddH ₂ O	31 µL
Total	50 µL

Tabela 3.5.2– Condições definidas no termociclador para amplificação do gene *CgPDR1*.

Tempo	Temperatura	
30 s	98 °C	X 20
10 s	98 °C	
20 s	56 °C	
2 min 30 s	72 °C	
7 min	72 °C	
∞	4 °C	

Tabela 3.5.3 - Primers utilizados para amplificação e sequenciação do gene *CgPDR1*.

Primer	Sequência (5' → 3')	Função
<i>CgPDR1_FW2</i>	GCC TAG TAC AAG AAG AAC AAA AGT TG	Sequenciação de <i>CgPDR1</i>
<i>CgPDR1_FW3</i>	TCC ATT GAC GCC ATT GAG TTA CAA C	Sequenciação de <i>CgPDR1</i>
<i>CgPDR1_FW4</i>	TTA CGA CCG CAA TTT GGA CTC AGA GG	Sequenciação de <i>CgPDR1</i>
<i>CgPDR1_RP_FW</i>	GTC AGT ACT ACA CCT GAG TTG TCC	Sequenciação de <i>CgPDR1</i>
<i>CgPDR1_RP_REV</i>	CAG ACT GCA TTG GAT ATT AGT CGC	Sequenciação de <i>CgPDR1</i>
<i>CgPDR1_RV2</i>	CAG AGT GCC AAA GTA TGC AGC CTT	Sequenciação de <i>CgPDR1</i>
<i>CgPDR1_RV3</i>	CGG CGA GGG TAA ATT CAA CTG ATA C	Sequenciação de <i>CgPDR1</i>
<i>CgPDR1_FW5</i>	TTG TAT TCC CAG GTA GAG GCC	Sequenciação de <i>CgPDR1</i>
<i>CgPDR1_RV5</i>	CAC CAA GGT CGT CCT ATG GAA	Sequenciação de <i>CgPDR1</i>
<i>CgPDR1</i> Rev	GAC AGT GTG CAT AGC CTG	Amplificação de <i>CgPDR1</i>
<i>CgPDR1</i> Fw	CTT CCA TTA CTT CGT ACC C	Amplificação de <i>CgPDR1</i>

3.6 Quantificação da expressão gênica, por PCR em tempo real, dos genes *CgCDRI* e *CgPUP1* em isolados de *C. glabrata*

3.6.1 Recolha de células e extração de RNA

A expressão dos genes *CgPDR1* e *CgPUP1* foi comparada nos isolados de *C. glabrata* ISTD289, ISTD408, ISTE178, ISTE188, ISTE189 e ISTE190 e na estirpe laboratorial CBS138. Para tal, as estirpes foram cultivadas durante a noite (~17 h), a 30 °C e com uma agitação orbital de 250 rpm, em meio YPD líquido usando tubos de 5 mL. De seguida, estas estirpes cultivadas foram inoculadas em 150 mL de RPMI a 30 °C e 250 rpm a uma DO inicial de 0,025, correspondendo a cerca de $1,25 \times 10^5$ CFUs/mL. Quando a $DO_{600 \text{ nm}}$ das culturas atingiram aproximadamente 2, correspondendo a uma fase de média expansão, as células foram colhidas por múltiplas centrifugações e lavagens. Primeiramente, as suspensões celulares foram centrifugadas, em tubos de *falcon*, a 7500 rpm durante 5 min a 4 °C, sendo posteriormente descartado o sobrenadante. Ao *pellet* adicionou-se 5 mL de etanol 100 % e repetiu-se a centrifugação, mantendo o *pellet*. Seguidamente, adicionou-se H₂O estéril fria e repetiu-se a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e voltou-se a repetir os últimos três passos referidos. O *pellet* final foi congelado a -80 °C até nova utilização. A extração de RNA foi realizada utilizando *RiboPure™ Yeast Kit* da *Thermo Fisher Scientific*, seguindo-se sempre as instruções definidas pelo fabricante no protocolo do kit.

3.6.2 Transcriptase reversa

Para obtenção do cDNA a partir do RNA extraído, fez-se uma reação de transcrição reversa usando o *NZY First-Strand cDNA Synthesis kit* da *Nzytech*. Para tal usou-se uma mistura de reação com os componentes descritos na Tabela 3.6.2.1, sendo as condições usadas para a amplificação descritas na Tabela 3.6.2.2. Após a transcriptase reversa, adicionou-se 0,5 µL de *NZY RNase H* em cada uma das reações, sendo de seguida, incubadas a 37 °C durante 20 min e armazenadas a -20 °C.

Tabela 3.6.2.1 – Mistura de reação para transcriptase reversa.

Componente	Volume por amostra
NZYRT 2× <i>Master Mix</i>	5 µL
NZYRT <i>Enzyme Mix</i>	1 µL
<i>Template RNA</i>	*
DEPC-treated H ₂ O	até 10 µL

* O volume do RNA varia com o isolado testado, devendo este corresponder a cerca de 2 µg. De acordo com o volume de RNA adicionado, o volume de *DEPC-treated H₂O* varia, sendo o volume final da mistura de reação igual a 10 µL.

Tabela 3.6.2.2 – Condições definidas no termociclador para a transcriptase reversa.

Tempo	Temperatura
10 min	25 °C
30 min	50 °C
5 min	85 °C

3.6.3 PCR quantitativo

Por fim, para a realização do qPCR utilizou-se o *NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (2x)*, *ROX*. Desta forma, numa microplaca de 96 poços procedeu-se a duas réplicas para cada gene em estudo, adicionando-se em cada um dos poços os componentes descritos na Tabela 3.6.3.1. As condições do termociclador encontram-se descritas na Tabela 3.6.3.2 e os *primers* utilizados encontram-se na Tabela 3.6.3.3.

Tabela 3.6.3.1 - Mistura de reação utilizada para os métodos de qPCR.

Componente	Volume por amostra
<i>NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (2x), ROX</i>	10 µL
<i>Primers FW</i>	0,8 µL
<i>Primers REV</i>	0,8 µL
cDNA	5 µL
H ₂ O nuclease free	3,4 µL
Total	20 µL

Tabela 3.6.3.2 - *Primers* utilizados para os métodos de qPCR dos genes *CgPUP1* e *CgCDR1*, alvos de *CgPDR1*

Primer	Sequência (5' → 3')
<i>CgCDR1_FW_RT</i>	GCT TGC CCG CAC ATT GA
<i>CgCDR1_REV_RT</i>	CCT CAG GCA GAG TGT GTT CTT TC
<i>CgPUP1_FW_RT</i>	CAC TGG TGC GCT GAA AGG TG
<i>CgPUP1_REV_RT</i>	TGT CCC AGG CTA TCT TTG CC
<i>CgACT1_FW_RT</i>	AGA GCC GTC TTC CCT TCC AT
<i>CgACT1_REV_RT</i>	TTG ACC CAT ACC GAC CAT GA

Tabela 3.6.3.3 – Condições definidas no termociclador para a qPCR.

Tempo	Temperatura	
2 min	95 °C	
5 s	95 °C	X 40
30 s	60 °C	

3.7 Amplificação e sequenciação dos *hotspots* 1 e 2 presentes no gene *CpFKS1* de *C. parapsilosis*

Para a sequenciação dos *hotspots* 1 e 2 existentes no gene *CpFKS1* (mapeados entre os nucleótidos 537-793 e 1277-1488, respetivamente (Martí-Carrizosa *et al.*, 2015) dos isolados *C. parapsilosis* ISTD139 e ISTD369, usou-se uma estratégia similar à descrita para a sequenciação do gene *CgPDR1* de *C. glabrata*. Dessa forma, após extração do DNA genómico dos isolados (usando o mesmo protocolo descrito acima para os isolados de *C. glabrata*), foram amplificadas por PCR as regiões *hotspots* 1 e 2 do gene *CpFKS1* usando a mistura reacional descrita na Tabela 3.4.2.1 e as condições de amplificação descritas em Tabela 3.4.2.2, respetivamente. Os *primers* utilizados para sequenciação do gene *CpFKS1* estão descritos na Tabela 3.7.1 e foram escolhidos tendo por base a informação publicada (Garcia-Effron *et al.*, 2008; Martí-Carrizosa *et al.*, 2015). A sequenciação foi posteriormente realizada pela STABVIDA, recorrendo ao método de Sanger.

Tabela 3.7.1 - *Primers* utilizados para amplificação e sequenciação dos *hotspots* 1 e 2 do gene *CpFKSI*.

<i>Primer</i>	Sequência (5' → 3')
1HS1F	AAT GGG CTG GTG CTC AAC AT
1HS1R	CCT TCA ATT TCA GAT GGA ACT TGA TG
1HS2F	AAG ATT GGT GCT GGT ATG GG
1HS2R	TAA TGG TGC TTG CCA ATG AG

Verificou-se a correta amplificação do fragmento correndo uma amostra de 10 uL numa eletroforese em gel de agarose 0,8 %. Realizaram-se duplicados tanto nas amplificações como nas sequenciações para confirmação dos resultados.

4. Resultados e Discussão

4.1 Distribuição epidemiológica dos isolados estudados

Neste estudo foram utilizados 628 isolados clínicos, identificados por MALDI-TOF como pertencentes a leveduras do género *Candida*, recolhidos entre junho e novembro de 2022, de pacientes atendidos em unidades de saúde da área da Grande Lisboa. *C. albicans* foi a espécie mais isolada (425 isolados), seguindo-se *C. glabrata* (80 isolados), *C. parapsilosis* (46 isolados), *C. krusei* (30 isolados), *C. tropicalis* (18 isolados), *C. lusitanae* (12 isolados), *C. kefyr* (8 isolados), *C. dubliniensis* (4 isolados), *C. metapsilosis* (2 isolados) e 1 isolado de *C. inconspicua*, de *C. haemulonii* e um de *C. guilliermondii* (Figura 4.1.1). O produto de onde foram recolhidos mais isolados são exsudados vaginais (477 isolados), seguindo-se urina (30 isolados), pus (25 isolados), líquido ascítico (15 isolados), fezes (14 isolados) e exsudado uretral (11 isolados). Nos restantes produtos foram recolhidos menos de 7 isolados (Anexo 1). Deste modo, 96 % dos isolados foram extraídos de produtos não estéreis, enquanto 4% foram extraídos de produtos estéreis (como hemoculturas, líquido ascítico e pleural, bÍlis e cateteres), usualmente associados ao diagnóstico de infeções invasivas. A variedade de nichos onde foi possível isolar estirpes de *Candida* é consistente com a ampla capacidade destas espécies proliferarem em diferentes ambientes refletindo uma grande adaptabilidade e versatilidade (Ben-Ami *et al.*, 2021).

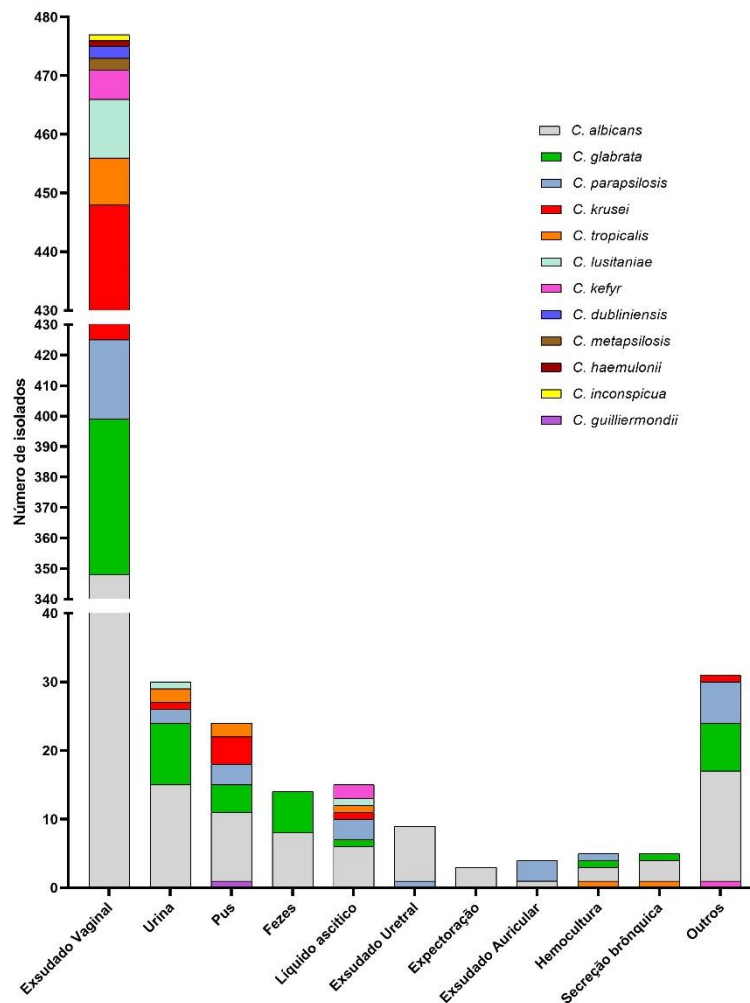


Figura 4.1.1 - Distribuição das espécies de isolados *Candida* das coleções (identificados como pertencentes a uma espécie do género *Candida* com base no perfil MALDI-TOF) examinadas neste trabalho de acordo com o produto de onde foram recolhidos. Outros corresponde a produtos em que foram recolhidos menos que cinco isolados ou a isolados que não possuíam a informação relativamente ao local onde foram recolhidos.

Olhando para o total das amostras recolhidas, *C. albicans* foi a espécie mais isolada, quer nos produtos estéreis, quer nos não estéreis, estando esta observação em linha com estudos anteriores onde também se obteve uma maior incidência de isolamento para esta espécie noutros conjuntos de isolados recolhidos na mesma zona geográfica mas num período temporal anterior (entre 2015 e 2017) (Salazar *et al.*, 2022). Esta elevada frequência de isolamentos (a rondar os 68 %) também está de acordo com outros estudos epidemiológicos previamente realizados em Portugal mas que se focaram apenas no estudo de isolados provenientes de infeções sistémicas (Costa-de-Oliveira *et al.*, 2008; Paulo *et al.*, 2009). A maior incidência de isolamento de *C. albicans* é consistente também com a elevada versatilidade e capacidade de adaptação e de colonização do Homem (Ben-Ami *et al.*, 2021).

Entre as espécies de *Candida* não *albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis* foram, por esta ordem, as mais frequentemente isoladas. Estes resultados são semelhantes aos obtidos anteriormente quer em estudos que focaram apenas produtos estéreis (Costa-de-Oliveira *et al.*, 2008; Paulo *et al.*, 2009; Pfaller *et al.*, 2019), como também os que focaram produtos não estéreis (Salazar *et al.*, 2022). Em termos de diversidade, foi possível verificar que *C. parapsilosis* foi isolada de onze produtos diferentes, ao passo que *C. glabrata* possui menor diversidade nos isolamentos, aparecendo apenas em nove dos diferentes produtos examinados (Anexo 2). As restantes espécies foram todas isoladas com menor incidência, o que também está de acordo com os resultados que têm vindo a ser publicados com outros *cohorts* de isolados onde se verifica uma muito menor incidência destas espécies (Costa-de-Oliveira *et al.*, 2008; Paulo *et al.*, 2009; Pfaller *et al.*, 2019; Salazar *et al.*, 2022). Embora menos incidentes, estas espécies começam a aparecer, indicando que podem começar a tornar-se relevantes como espécies patogénicas (Salazar *et al.*, 2022).

Nos produtos não estéreis, *C. glabrata* (13 %) é a segunda espécie mais prevalente, seguida de *C. parapsilosis* (7 %), *C. krusei* (5 %), *C. tropicalis* (3 %), *C. lusitaniae* (2 %) e *C. kefyr* (1 %) enquanto que, nos produtos estéreis, *C. parapsilosis* (17 %) é mais prevalente, seguindo-se *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. kefyr* (8,3 % cada) e *C. krusei* e *C. lusitaniae* (4,2% cada) (Anexos 3 e 4). Estes dados são relevantes, uma vez que, esta última distribuição está em concordância com estudos epidemiológicos que se focam principalmente em amostras de sangue (Costa-de-Oliveira *et al.*, 2008; Paulo *et al.*, 2009). Além disso, apesar de *C. lusitaniae* e *C. kefyr* possuírem uma baixa frequência de isolamentos, estas espécies já foram identificadas em amostras de sangue dado o seu papel no desenvolvimento de candidemia (Paulo *et al.*, 2009).

4.2 Perfil de suscetibilidade a antifúngicos entre os isolados de *Candida* não *albicans*

Os 179 isolados de *Candida* não *albicans* mais relevantes foram sujeitos a uma avaliação do perfil de suscetibilidade a um conjunto de antifúngicos de aplicação clínica e assim determinar a incidência de resistência. Para tal escolheram-se como antifúngicos a usar fluconazol e voriconazol, dois dos mais importantes azóis usados na prática clínica; anfotericina B, um exemplo de polieno e caspofungina, uma equinocandida. Para determinar a suscetibilidade dos isolados a estes antifúngicos não se começou logo por usar o método *standardizado* preconizado pela EUCAST e baseado no método de microdiluição para determinação do MIC₅₀ uma vez que isso seria bastante laborioso. Assim, foi feito um *screening* preliminar em que cada isolado foi crescido em meio RPMI líquido suplementado com uma concentração inibitória de cada antifúngico. As concentrações selecionadas para este ensaio correspondem aos *breakpoints* de resistência definidos pela EUCAST e que são usados para a classificação dos isolados como resistentes ou sensíveis. No caso da caspofungina, esta classe antifúngica apresenta variação interlaboratorial, não sendo possível estabelecer um valor de *breakpoint* de resistência. Assim sendo, e como também não há um *epidemiological cut-off value* (ECOFF) definido, isto é, o MIC mais abundante quando se estuda toda a população mundial de isolados definiu-

se como ponto de partida o *breakpoint* de 0,5 mg/L (apenas para *C. parapsilosis* é que foi definido um *breakpoint* de 1, uma vez que o *screening* inicial com o valor de 0,5 nesta espécie evidenciou um crescimento praticamente nulo). Assim, quando um isolado foi capaz de crescer na presença desta concentração de antifúngico neste *screening*, ele foi considerado como sendo um candidato a ser resistente. Para confirmar se os isolados candidatos a resistentes eram efetivamente resistentes estes foram sujeitos ao método da microdiluição e o seu valor de MIC efetivamente determinado, comparado com o *breakpoint* de resistência e o isolado classificado em sensível ou resistente ao antifúngico.

Após o *screening* inicial foram identificados 77 isolados (~44 % do total de isolados testados) como sendo possivelmente resistentes aos antifúngicos, com 55 a serem identificados nos ensaios conduzidos na presença de fluconazol, 51 na presença de voriconazol e 35 na presença de caspofungina. Na Figura 4.2.1 apresenta-se o resultado obtido na determinação do valor de MIC₅₀ (com base no método da microdiluição preconizado pela EUCAST) para dois destes 77 isolados, um obtido na presença de fluconazol e voriconazol e outro na presença de caspofungina.

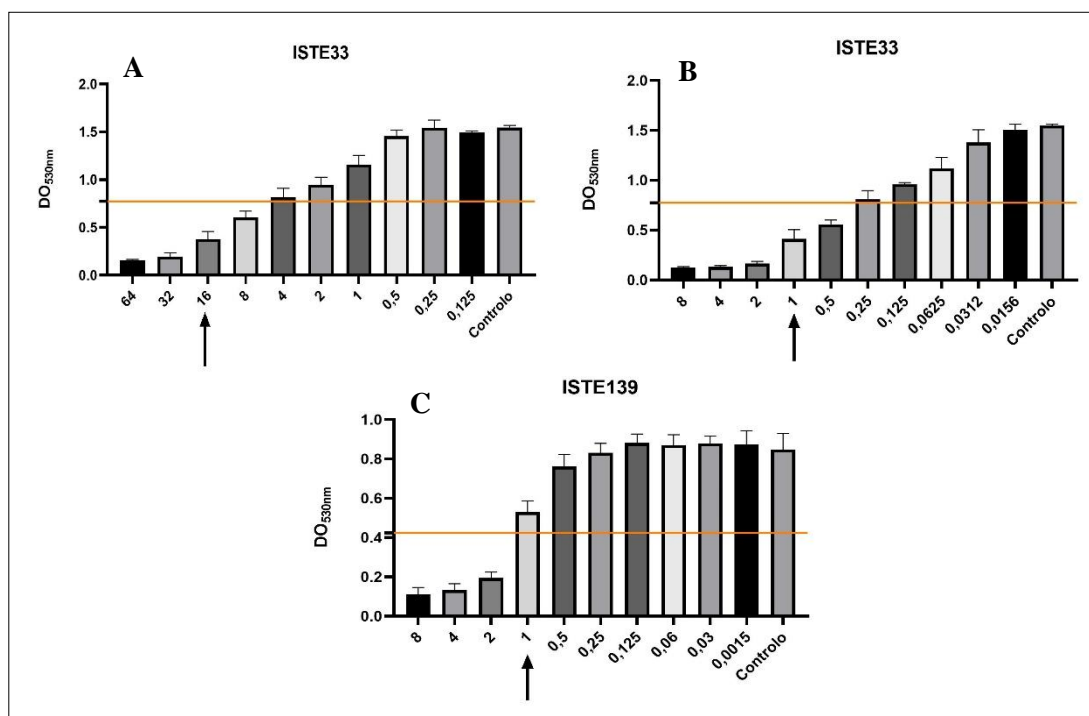


Figura 4.2.1 – Exemplos de resultados obtidos no método de microdiluição para a determinação do valor de MIC₅₀. A - Análise do MIC₅₀ do isolado de *C. glabrata* ISTE33 para fluconazol; B - Análise do MIC₅₀ do isolado de *C. glabrata* ISTE33 para voriconazol; C - Análise do MIC₅₀ de ISTE139 para caspofungina. As setas representam os *breakpoints* de referência estabelecidos pelo EUCAST, no caso do fluconazol e voriconazol, e estabelecidos para o estudo, no caso da caspofungina.

Com base nestes ensaios de microdiluição para determinação MIC₅₀ e na posterior comparação com os valores de *breakpoint* de resistência, foi então possível obter os dados que se mostram na Tabela 4.2.1.

Tabela 4.2.1 - Resultados dos métodos de microdiluição a antifúngicos para espécies de *Candida* não *albicans* potencialmente resistentes (AnfB – Anfotericina B; Casp – Caspofungina; FLC – Fluconazol; R – Resistente; S – Suscetível; T – tolerância aumentada; VRC - Voriconazol).

Isolado	Espécie	Local do Isolamento	Resistência aos antifúngicos (mg/L)			
			FLC	VRC	AnfB	Casp
ISTC1	<i>C. lusitaniae</i>	Exsudado Vaginal	S (0,125)	< 0,25	< 1	S (0,06)
ISTC4	<i>C. lusitaniae</i>	Exsudado Vaginal	S (0,125)	< 0,25	< 1	S (0,06)
ISTC164	<i>C. kefyfyr</i>	Urina Asséptica	S (0,125)	S (< 0,015)	< 1	< 0,5
ISTC485	<i>C. kefyfyr</i>	Exsudado Vaginal	S (0,125)	S (< 0,015)	< 1	< 0,5
ISTC487	<i>C. lusitaniae</i>	Exsudado Vaginal	S (0,125)	< 0,25	< 1	S (0,06)
ISTC641	<i>C. lusitaniae</i>	Não definido	S (0,25)	< 0,25	< 1	S (0,03)
ISTC642	<i>C. lusitaniae</i>	Pus	S (0,25)	< 0,25	< 1	S (0,06)
ISTD22	<i>C. kefyfyr</i>	Exsudado Vaginal	S (0,25)	S (< 0,015)	< 1	< 0,5
ISTD23	<i>C. parapsilosis</i>	Exsudado Vaginal	<4	<0,25	<1	S (0,125)
ISTD26	<i>C. lusitaniae</i>	Exsudado Vaginal	S (< 0,125)	< 0,25	< 1	S (0,015)
ISTD77	<i>C. parapsilosis</i>	Exsudado Uretal	<4	<0,25	<1	S (0,5)
ISTD78	<i>C. parapsilosis</i>	Exsudado Vaginal	<4	<0,25	<1	S (0,5)
ISTD82	<i>C. glabrata</i>	Exsudado Vaginal	S (4)	S (0,06)	< 1	< 0,5
ISTD135	<i>C. parapsilosis</i>	Exsudado Auricular	<4	<0,25	<1	S (0,125)
ISTD137	<i>C. parapsilosis</i>	Exsudado Auricular	<4	<0,25	<1	S (0,125)
ISTD139	<i>C. parapsilosis</i>	Exsudado Vaginal	<4	<0,25	<1	T (1)
ISTD140	<i>C. tropicalis</i>	Exsudado Vaginal	<4	S (0,06)	<1	S (<0,016)
ISTD141	<i>C. tropicalis</i>	Hemocultura	<4	<0,25	<1	S (<0,016)
ISTD223	<i>C. glabrata</i>	Exsudado Vaginal	S (8)	S (0,25)	< 1	< 0,5
ISTD227	<i>C. lusitaniae</i>	Urina	S (< 0,125)	< 0,25	< 1	S (0,125)
ISTD249	<i>C. parapsilosis</i>	Exsudado Vaginal	<4	<0,25	<1	S (0,5)
ISTD254	<i>C. lusitaniae</i>	Exsudado Vaginal	S (0,125)	< 0,25	< 1	S (0,125)
ISTD289	<i>C. glabrata</i>	Exsudado Vaginal	R (32)	S (1)	< 1	< 0,5
ISTD293	<i>C. glabrata</i>	Exsudado Vaginal	S (4)	S (0,125)	< 1	< 0,5
ISTD323	<i>C. glabrata</i>	Exsudado Vaginal	S (4)	S (0,125)	< 1	< 0,5
ISTD326	<i>C. tropicalis</i>	Pus	<4	<0,25	<1	S (<0,016)
ISTD327	<i>C. parapsilosis</i>	Exsudado Auricular	<4	<0,25	<1	S (0,125)
ISTD365	<i>C. glabrata</i>	Exsudado Vaginal	S (2)	S (0,06)	< 1	< 0,5
ISTD366	<i>C. glabrata</i>	Não definido	S (8)	S (0,5)	< 1	< 0,5
ISTD367	<i>C. glabrata</i>	Fezes	S (4)	S (0,125)	< 1	< 0,5
ISTD368	<i>C. tropicalis</i>	Urina	<4	S (0,03)	<1	<1
ISTD369	<i>C. parapsilosis</i>	Exsudado Vaginal	<4	<0,25	<1	T (1)
ISTD370	<i>C. parapsilosis</i>	Exsudado Vaginal	<4	<0,25	<1	S (0,125)
ISTD373	<i>C. kefyfyr</i>	Líquido ascítico	S (0,125)	S (< 0,015)	< 1	< 0,5
ISTD374	<i>C. kefyfyr</i>	Líquido ascítico	S (0,25)	S (< 0,015)	< 1	< 0,5
ISTD408	<i>C. glabrata</i>	Exsudado Vaginal	R (≥ 64)	R (4)	< 1	< 0,5
ISTD409	<i>C. glabrata</i>	Exsudado Vaginal	S (8)	S (0,5)	< 1	< 0,5
ISTD410	<i>C. glabrata</i>	Exsudado Vaginal	S (8)	S (0,125)	< 1	< 0,5
ISTD411	<i>C. glabrata</i>	Exsudado Vaginal	S (4)	S (0,125)	< 1	< 0,5
ISTD413	<i>C. tropicalis</i>	Líquido ascítico	<4	<0,25	<1	S (<0,016)
ISTD414	<i>C. tropicalis</i>	Exsudado Vaginal	<4	<0,25	<1	S (0,016)

Isolado	Espécie	Local do Isolamento	Resistência aos antifúngicos (mg/L)			
			FLC	VRC	AnfB	Casp
ISTD415	<i>C. kefyr</i>	Exsudado Vaginal	S (0,125)	S (< 0,015)	< 1	< 0,5
ISTD416	<i>C. kefyr</i>	Exsudado Vaginal	S (0,125)	S (< 0,015)	< 1	< 0,5
ISTE33	<i>C. glabrata</i>	Exsudado Vaginal	S (4)	S (0,125)	< 1	< 0,5
ISTE37	<i>C. glabrata</i>	Exsudado Vaginal	S (8)	S (0,25)	< 1	< 0,5
ISTE38	<i>C. glabrata</i>	Exsudado Vaginal	S (16)	S (0,5)	< 1	< 0,5
ISTE43	<i>C. glabrata</i>	Urina	S (4)	S (0,125)	< 1	< 0,5
ISTE44	<i>C. glabrata</i>	Urina	S (2)	S (0,06)	< 1	< 0,5
ISTE45	<i>C. parapsilosis</i>	Exsudado Vaginal	S (0,5)	S (<0,016)	<1	S (0,125)
ISTE48	<i>C. parapsilosis</i>	Exsudado Vaginal	S (1)	S (0,016)	<1	S (0,125)
ISTE49	<i>C. parapsilosis</i>	Pus	S (0,5)	S (0,016)	<1	S (0,125)
ISTE50	<i>C. parapsilosis</i>	Exsudado Vaginal	S (0,5)	S (0,03)	<1	S (0,06)
ISTE51	<i>C. parapsilosis</i>	Exsudado Vaginal	<4	<0,25	<1	S (0,125)
ISTE53	<i>C. parapsilosis</i>	Pus	<4	<0,25	<1	S (0,125)
ISTE54	<i>C. parapsilosis</i>	Exsudado Vaginal	<4	<0,25	<1	S (0,25)
ISTE56	<i>C. tropicalis</i>	Exsudado Vaginal	<4	<0,25	<1	S (<0,016)
ISTE57	<i>C. tropicalis</i>	Expectoração	<4	R (≥8)	<1	T (≥8)
ISTE116	<i>C. tropicalis</i>	Exsudado Vaginal	<4	S (<0,016)	<1	S (0,016)
ISTE121	<i>C. parapsilosis</i>	Fanera	S (0,5)	S (0,016)	<1	S (0,125)
ISTE122	<i>C. parapsilosis</i>	Fanera	S (2)	S (0,06)	<1	S (0,25)
ISTE178	<i>C. glabrata</i>					
ISTE181	<i>C. glabrata</i>	Exsudado Vaginal	S (4)	S (0,25)	< 1	< 0,5
ISTE184	<i>C. glabrata</i>	Exsudado Vaginal	S (8)	S (0,125)	< 1	< 0,5
ISTE185	<i>C. glabrata</i>	Exsudado Vaginal	S (2)	S (0,125)	< 1	< 0,5
ISTE187	<i>C. glabrata</i>	Exsudado Vaginal	S (8)	S (0,25)	< 1	< 0,5
ISTE188	<i>C. glabrata</i>	Exsudado Vaginal	R (≥ 64)	R (4)	< 1	< 0,5
ISTE189	<i>C. glabrata</i>	Pus	R (32)	S (1)	< 1	< 0,5
ISTE190	<i>C. glabrata</i>	Exsudado Vaginal	R (≥ 64)	S (0,5)	< 1	< 0,5
ISTE191	<i>C. glabrata</i>	Urina	S (2)	S (0,25)	< 1	< 0,5
ISTE192	<i>C. glabrata</i>	Exsudado Vaginal	S (2)	S (0,125)	< 1	< 0,5
ISTE193	<i>C. glabrata</i>	Exsudado Vaginal	S (8)	S (0,5)	< 1	< 0,5
ISTE194	<i>C. glabrata</i>	Exsudado Vaginal	S (2)	S (0,125)	< 1	< 0,5
ISTE195	<i>C. glabrata</i>	Exsudado Vaginal	S (4)	S (0,25)	< 1	< 0,5
ISTE196	<i>C. glabrata</i>	Exsudado Vaginal	S (4)	S (0,25)	< 1	< 0,5

No global foi então possível identificar sete isolados que puderam ser considerados resistentes a antifúngicos: seis isolados resistentes fluconazol (*C. glabrata* ISTD289, ISTD408, ISTE178, ISTE188, ISTE189 e ISTE190), três resistentes a voriconazol (*C. glabrata* ISTD408 e ISTE188 e *C. tropicalis* ISTE57); e três considerados com tolerância aumentada a caspofungina (*C. parapsilosis* ISTD139, ISTD369 e *C. tropicalis* ISTE57) (Anexos 5 a 9). Cerca de 88% dos isolados classificados como candidatos a resistentes acabaram na verdade por exibir um MIC abaixo do valor do *breakpoint* de resistência e portanto não puderam ser considerados como resistentes. O facto de no *screening* inicial não ser possível standardizar a DO_{600 nm} da suspensão inicial (por exemplo, a 0,025, como o método de microdiluição) poderá afetar os resultados de alguma forma visto que poderá aumentar a proporção de células para a concentração de antifúngico presente. Além disso, o objetivo do ensaio inicial não é obter o MIC, mas sim filtrar os isolados com maior proximidade de serem resistentes.

De forma a ter uma ideia mais clara da distribuição de MIC₅₀ obtida para as diferentes espécies a que pertenciam os 77 isolados selecionados fez-se uma distribuição do valor de MIC obtido (Figuras 4.2.2 e 4.2.3). Para efeitos de comparação representa-se também na figura os valores obtidos para a distribuição mundial de isolados de cada espécie, de acordo com a informação disponibilizada pela EUCAST. Na Fig. 4.2.2 mostram-se os dados obtidos para os 33 isolados de *C. glabrata*.

Relativamente ao fluconazol (Figura 4.2.2.A-B), a distribuição de MICs apresenta a mesma tendência, destacando os valores de MIC mais observados, sendo estes 4, 8 e 2 mg/L.

Relativamente ao voriconazol (Figura 4.2.2.C), a distribuição dos MICs destes é semelhante à publicada pela EUCAST (Figura 4.2.2.D). Desta forma, a distribuição da suscetibilidade a fluconazol e voriconazol neste conjunto de isolados testados de *C. glabrata* apresenta o padrão expectável.

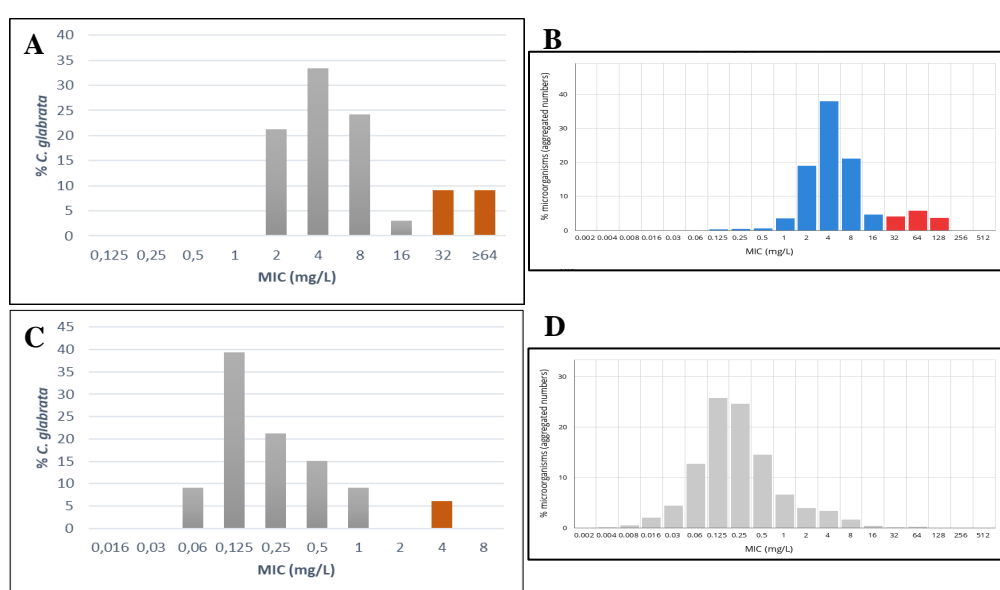


Figura 4.2.2 – Distribuição dos valores de MIC para *C. glabrata*. A- Distribuição para fluconazol de acordo com os resultados obtidos; B- Distribuição para fluconazol mundialmente; C- Distribuição para voriconazol de acordo com os resultados obtidos; D- Distribuição para voriconazol mundialmente; As barras laranjas correspondem a isolados resistentes, uma vez que possuem concentrações superiores ao *breakpoint* de resistência.

Para *C. parapsilosis*, foram testados 19 isolados, treze potencialmente resistentes apenas a caspofungina e seis tanto a caspofungina como azóis, obtendo-se os seguintes resultados (Figura 4.2.3).

Relativamente ao fluconazol, o MIC com frequente é 0,5 mg/L, estando de acordo com os dados da EUCAST. No entanto, os MICs obtidos em estudo e correspondentes a 1 e 2 mg/L apresentaram a mesma distribuição, sendo as segundas maiores frequências, enquanto que na EUCAST, o segundo MIC mais frequente é 0,25 mg/L, seguido de 1 e 2 mg/L.

Em relação ao voriconazol, o MIC mais frequente é o mesmo observado pela EUCAST, sendo este 0,016 mg/L. Fora este, todos os resultados são um pouco discrepantes. Nos dados obtidos, 0,06, 0,03 e MICs abaixo de 0,016 mg/L possuem a mesma distribuição, sendo esta a segunda maior, enquanto que nos dados facultados pela EUCAST, 0,03 mg/L possui a segunda maior frequência, seguida de 0,008 e 0,06 mg/L.

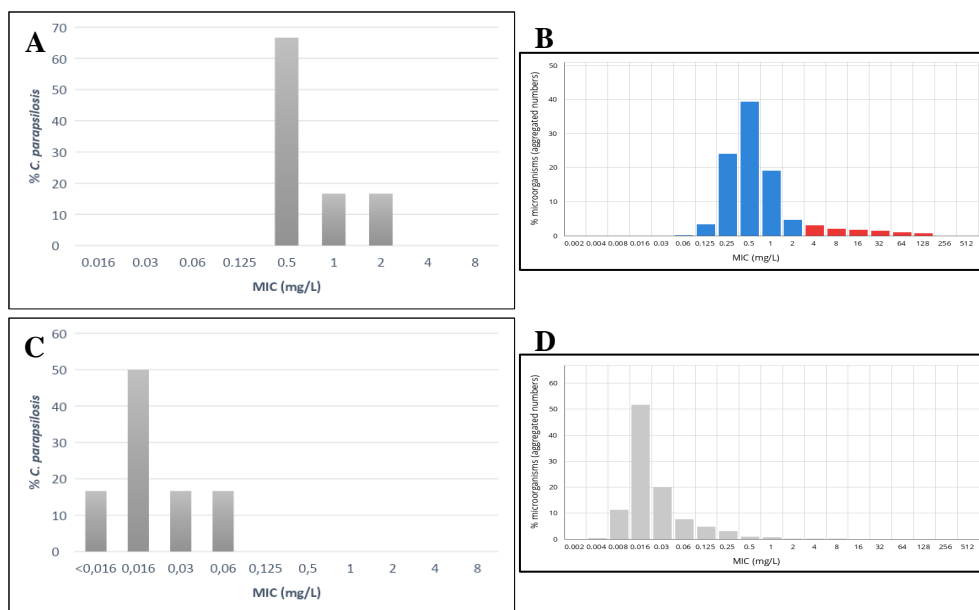


Figura 4.2.3 – Distribuição dos valores de MIC para *C. parapsilosis*. A- Distribuição para fluconazol de acordo com os resultados obtidos; B- Distribuição para fluconazol mundialmente; C- Distribuição para voriconazol de acordo com os resultados obtidos; D- Distribuição para voriconazol mundialmente. As barras laranjas correspondem a isolados resistentes, uma vez que possuem concentrações superiores ao *breakpoint* de resistência.

Dos 7 isolados que no final dos ensaios podemos considerar como resistentes, seis a fluconazol, três a voriconazol e três a caspofungina, observou-se uma muito baixa ocorrência de resistência cruzada visto que apenas dois isolados (*C. glabrata* ISTD408 e ISTE188) apresentaram resistência cruzada a fluconazol e voriconazol e um (*C. tropicalis* ISTE57) resistência aos dois azóis e também a caspofungina. No caso de *C. tropicalis* ISTE57, é de realçar que foi verificada uma constância de crescimento do isolado para as concentrações mais altas dos diferentes antifúngicos (Figura 4.2.4), não sendo esta constância verificada nos outros isolados em estudo (Figura 4.2.1). Este tipo de resistência cruzada a duas classes de antifúngicos distintas é bastante incomum tendo sido descrita em estirpes de *C. albicans*, *C. kefyr*, *C. lusitanae* e, principalmente, em *C. glabrata* (Arendrup & Patterson, 2017). Uma vez que não foi descrita ainda a existência de isolados multirresistentes em *C. tropicalis*, entendeu-se necessário confirmar, por métodos moleculares, a identidade do referido isolado ISTE57. Em específico procedeu-se à sequenciação da região conservada D1/D2 do rRNA tendo os resultados obtidos (Anexo 10) confirmado que efetivamente o isolado pertence à espécie *C. tropicalis* uma vez que a sequência amplificada apresentava níveis de identidade de 100% com outras sequências atribuídas a isolados de *C. tropicalis*.

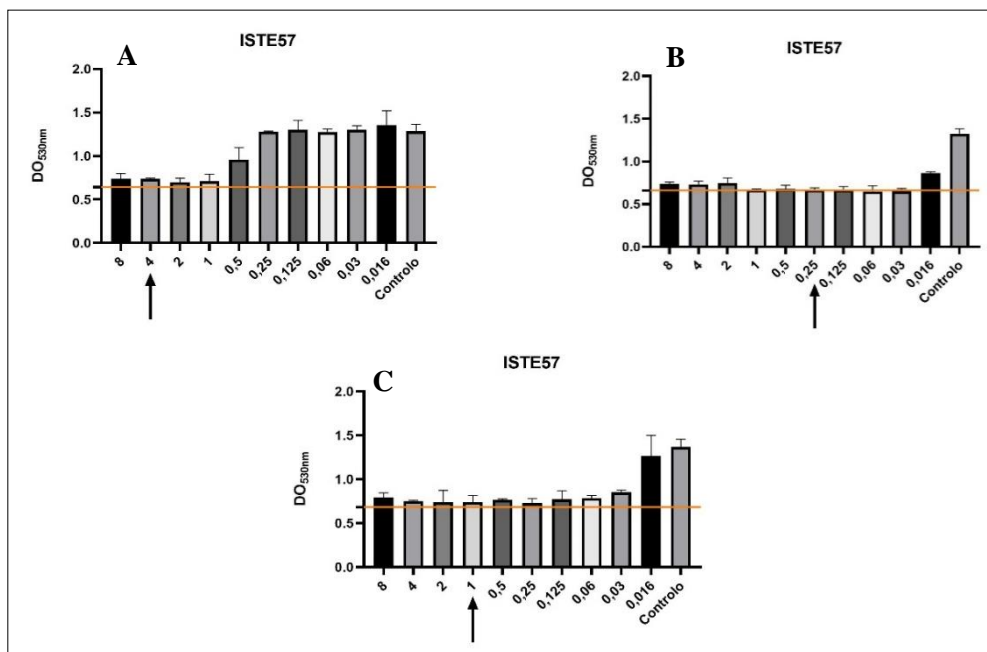


Figura 4.2.4 – Resultados obtidos pelo método de microdiluição ao isolado de *C. tropicalis* ISTE57. A – a fluconazol; B – a voriconazol; C – a caspofungina. As setas representam os *breakpoints* de referência estabelecidos pelo EUCAST, no caso do fluconazol e voriconazol, e estabelecidos para o estudo, no caso da caspofungina.

4.3 Determinação dos mecanismos moleculares subjacentes aos fenótipos de resistência a azóis nos isolados resistentes a azóis de *C. glabrata*.

Os testes de suscetibilidade efetuados resultaram na identificação de seis isolados de *C. glabrata* resistentes a fluconazol por apresentarem um MIC para este antifúngico de 32 mg/L (ISTD289, ISTE178 e ISTE189) ou 64 mg/L (ISTD408, ISTE188 e ISTE190), igual ou superior ao *breakpoint* de resistência definido para esta espécie sendo este de 16 mg/L. De notar que quatro destes isolados (ISTD289, ISTD408, ISTE188 e ISTE190) foram identificados em exsudados vaginais fazendo parte do que podem ser considerados isolados comensais, habitualmente não estudados noutros estudos epidemiológicos que tendencialmente focam apenas isolados recolhidos de produtos estéreis. A identificação deste fenótipo de resistência nestes isolados “comensais” reveste-se de grande importância uma vez que lhes pode fornecer uma vantagem competitiva enquanto potenciais patogénicos. O outro isolado de *C. glabrata* identificado como resistente apenas a fluconazol, ISTE189 foi identificado numa amostra de pus. O isolado ISTE178, também resistente apenas a fluconazol, não tinha qualquer informação sobre o seu produto de recolha. Para compreender quais os mecanismos moleculares responsáveis por este fenótipo de resistência nestes seis isolados, o gene *CgPDR1* codificado por estes foi amplificado por PCR (Figura 4.3.1) e posteriormente sequenciado.



Figura 4.3.1 – Exemplo de resultado obtido após amplificação do gene *CgPDR1*. A primeira faixa corresponde ao DNA 1kb plus ladder. As setas laranjas representam os fragmentos de 3 kb e 4 kb.

Após a sequenciação e respetiva tradução, a sequência de aminoácidos dos alelos *CgPDR1* codificados pelos isolados resistentes foi comparada com a sequência de aminoácidos do alelo *CgPDR1* codificada pela estirpe de referência CBS138, sensível a azóis. Optou-se por iniciar o estudo molecular subjacente ao fenótipo de resistência dos isolados pela sequenciação do *CgPDR1* tendo em conta o papel preponderante que a ocorrência de mutações ganho de função tem tido na emergência de resistência em isolados clínicos de *C. glabrata* (Figura 1.3.3) (Whaley *et al.*, 2017; Moye-Rowley, 2019; Pristov & Ghannoum, 2019; Wang *et al.* 2022). Dessa forma, os resultados que comparam as sequências de aminoácidos codificados pelos diferentes isolados encontram-se sistematizados na Tabela 4.3.1. Nos anexos 11 a 16 é possível observar os resultados dos alinhamentos no ClustalW de cada isolado com a CBS138.

Tabela 4.3.1 - Alteração da sequência de aminoácidos do fator de transcrição CgPdr1 codificados pelo isolados quando comparados com a estirpe de referência CBS138. Estas análises resultam de duas sequenciações independentes. A verde encontram-se as mutações identificadas tanto em estirpes suscetíveis como resistentes, a laranja as mutações identificadas em estirpes resistentes, sendo candidatas a novos GOF's no CgPdr1 e a azul as mutações que ainda não tinham sido identificadas. As mutações descritas foram verificadas por Ferrari, S., *et al.* 2009, Tantivitayakul, P., *et al.*, 2019 e Salazar, S., *et al.*, 2022.

	76	91	98	143	243	332	340
CBS138	S	V	L	T	D	L	E
ISTD289	P	I	S	P			D
ISTD408		I	S		N		
ISTE178	P	I	S	P			D
ISTE188	P	I	S	P		F	
ISTE189	P	I	S	P			
ISTE190		I	S		N		

Nos isolados *C. glabrata* ISTD289 e ISTE178 foram verificadas as mesmas mutações, S76P, V91I, L98S, T143P e E340D, o que é uma observação relativamente surpreendente visto que foram isolados recolhidos em locais diferentes e também em diferentes janelas temporais. Em relação aos

isolados ISTD408 e ISTE190, verificou-se que estes possuíam 3 mutações, V91I, L98S e D243N. O isolado ISTE189 possui 4 mutações já identificadas nos isolados analisados, S76P, V91I, L98S e T143P, enquanto que o isolado ISTE188, além das mesmas mutações, possui a L332F. A ocorrência das substituições não-sinónimas S76P, V91I, L98S, T143P e D243N em isolados de *C. glabrata* clínicos tem vindo a ser amplamente descrita, tanto em isolados suscetíveis, como em isolados resistentes a azóis (Ferrari *et al.*, 2009; Carrete *et al.*, 2019; Tantivitayakul *et al.*, 2019; Salazar *et al.*, 2022), presumindo-se que possam estar relacionadas com a adaptação ao hospedeiro. Neste contexto, não é expectável que estas modificações sejam responsáveis pelo fenótipo de resistência. Relativamente à mutação E340D, esta também já foi identificada em alelos codificados por isolados de *C. glabrata* resistentes a azóis (Ferrari *et al.*, 2009), contudo, ainda não foram efetuados estudos moleculares que de facto comprovem que esta é uma mutação ganho de função da proteína CgPdr1. A modificação L332F observada é uma nova mutação visto que até agora nenhum estudo descreveu a sua ocorrência.

Assim sendo, os isolados ISTD289, ISTE178 e ISTE188 parecem codificar CgPdr1 diferentes da estirpe de referência CBS138 e, eventualmente, parecem codificar uma variante GOF deste fator de transcrição. Para testar essa hipótese procedeu-se à comparação dos níveis de expressão genética dos genes CgCDR1 e CgPUP1 em células crescidas na ausência de qualquer antifúngico visto que as mutações GOF tornam o regulador hiperativo mesmo em condições controlo (Whaley *et al.*, 2017; Pristov & Ghannoum, 2019; Wang *et al.* 2022). A escolha dos genes *CgCDR1* e *CgPUP1* resulta de se observar que estes dois genes são consistentemente sobre expressos em isolados que codificam variantes hiperativas de CgPdr1 (Whaley *et al.*, 2017; Pristov & Ghannoum, 2019; Wang *et al.* 2022). Para tal, as células foram crescidas em meio rico RPMI na ausência de azóis e recolhidas a meio da fase exponencial de crescimento. A comparação da expressão de *CgCDR1* e *CgPUP1* nestas células foi feita recorrendo ao PCR em tempo real (Figura 4.3.2).

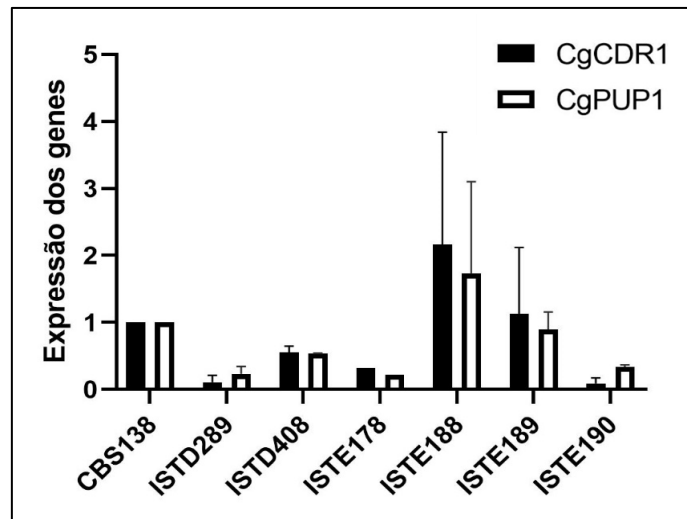


Figura 4.3.2– Expressão de *CgCDR1* e de *CgPUP1* nos isolados que deram como resistentes a azóis nos testes de fenotipagem e à estirpe de referência de *C. glabrata*, CBS138. O nível de expressão registado no CBS138 foi fixado em 1 e os outros valores comparados com esse. A expressão destes genes foi calculada utilizando o gene ACT1 como controlo interno.

Os resultados obtidos permitiram verificar que apenas o isolado ISTE188 apresentou níveis de expressão de *CgCDR1* e *CgPUP1* superiores aos observados na estirpe CBS138. Esta observação parece confirmar que, de facto, a modificação L332F constitui um mutante ganho de função de CgPdr1, levando assim à hiperativação deste regulador e à, conseqüente, sobre expressão dos seus genes alvo.

Nos isolados ISTD289 e ISTE178 não se observou a sobre expressão dos genes em estudo. Caso de facto a modificação E340D fosse um ganho de função, deveria ter-se observado uma sobre expressão

de *CgCDRI* e *CgPUP1*. Assim sendo, deverá-se realizar novas experiências para confirmar os resultados obtidos.

Em relação aos isolados ISTD408, ISTE189 e ISTE190 também não apresentaram sobre expressão dos genes estudados, estando estes resultados em concordância com a teoria de codificarem um Pdr1 inativo na ausência de azóis e, portanto, consistente com a ideia de que o mecanismo de resistência deste isolado ser independente de *CgPDR1*. Noutro estudo também já foi identificado um isolado clínico, ISTB218, que também verificou ser resistente a azóis de forma independente do Pdr1. Assim sendo, alguns dos mecanismos de resistência a azóis para estes isolados poderão ser os mesmos que sugeridos para ISTB218, como a sobre expressão dos genes de proteção aos azóis *CgAUS1*, *CgADH1*, a sobre expressão das bombas de efluxo *CgPhd1*, *CgQdr2* e *CgTpo1p-1* e/ou modificação extensiva do invólucro celular provocada pela modificação na expressão e na sequência de aminoácidos das adesinas, juntamente com a inativação dos genes de suscetibilidade aos azóis (Salazar *et al.*, 2022).

4.4 Determinação dos mecanismos moleculares subjacentes aos fenótipos de resistência a equinocandinas observadas nos isolados resistentes de *C. parapsilosis*

À semelhança do que foi feito acima para os azóis, tentou-se compreender que mecanismo(s) estariam subjacentes ao fenótipo de resistência a equinocandinas observado nos isolados de *C. parapsilosis* ISTD139 e ISTD369. Neste caso, optou-se por sequenciar as regiões *hotspot* do gene *CpFKS1* tendo em conta que este é o mecanismo que se tem observado com maior preponderância em isolados clínicos resistentes (Perlin *et al.*, 2017; Pristov & Ghannoum, 2019). Para tal, esta região, com um tamanho aproximado de 560 bp, foi amplificada por PCR a partir do DNA genómico dos isolados ISTD139 e ISTD369 (Figura 4.5.1) e posteriormente sequenciada.

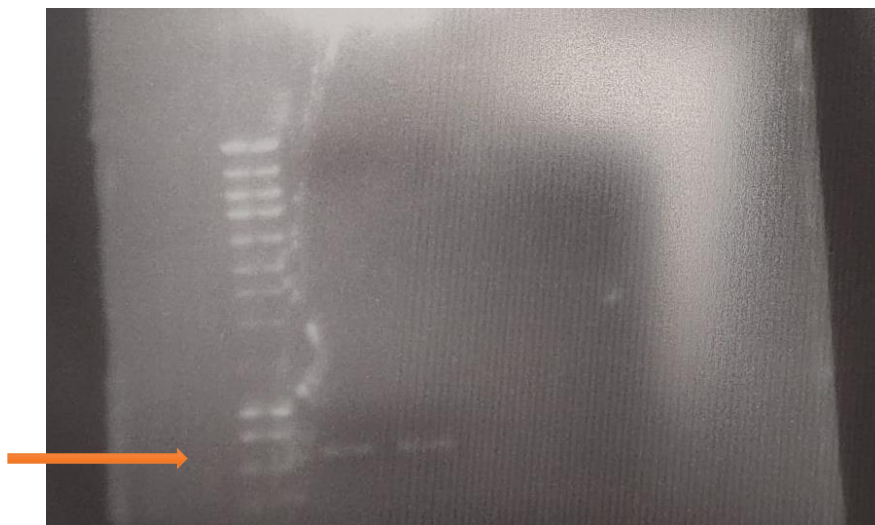


Figura 4.4.1 –Exemplo de resultado obtido após amplificação do gene *CpFKS1*. A primeira faixa corresponde ao DNA 1kb plus ladder. As setas laranjas representam os fragmentos obtidos.

Em ambos os isolados apenas se verificou a substituição P660A que já foi demonstrada ocorrer noutros isolados resistentes a equinocandinas de *C. parapsilosis* (Garcia *et al.*, 2008; Martí-Carrizosa *et al.*, 2015; Perlin *et al.*, 2017). Além disso, já foi também comprovado que isolados com esta mutação possuem níveis mais elevados de quitina na parede celular, sugerindo que esta modificação possa impactar na resistência intrínseca a estes antifúngicos (Perlin *et al.*, 2017).

5. Perspetivas Finais

Neste estudo foi possível verificar que a distribuição do isolamento das espécies de *Candida* no conjunto alargado de isolados aqui examinados segue, em linhas gerais, as mesmas tendências que têm vindo a ser observados noutros estudos do género. Em particular, denota-se a predominância do isolamento de *C. albicans* e, entre as espécies não albicans, de *C. glabrata*. Da análise da suscetibilidade a antifúngicos dos isolados examinados pertencentes a espécies não albicans identificaram-se nove isolados resistentes, seis pertencentes à espécie *C. glabrata*, dois à espécie *C. parapsilosis* e um à espécie *C. tropicalis*. A percentagem de resistência verificada (na ordem dos 5 %) foi reduzida. O resultado obtido para o isolado de *C. tropicalis* foi particularmente interessante visto ter sido obtido uma resistência cruzada, quer a azóis, quer a equinocandinas. Esta é uma espécie com muito poucos estudos relativamente às suas resistências, inclusivé sobre resistências cruzadas. Para a compreensão da resistência aos azóis deverá focar-se os estudos na expressão dos genes *CtERG11* e *CtERG3*, para compreender se ocorre sobre expressão do primeiro e perda de função do segundo (Whaley *et al.*, 2017). Relativamente à resistência observada à caspofungina será necessário o estudo do gene *CtFKS1*, de modo a compreender se existem mutações no *hotspot 1* responsáveis por tais resultados. A posterior dissecação dos mecanismos molecular nos isolados resistentes de *C. glabrata* sugere que apenas um deles poderá ter a sua resistência correlacionada com a codificação de ganho de função no regulador CgPdr1, mecanismo amplamente descrito por promover a resistência da maior parte dos isolados. Nos restantes isolados será necessário mais estudos para verificar qual ou quais os mecanismos alternativos, como análise da expressão génica de outros genes relacionados com a expressão de bombas de efluxo menos estudados. Relativamente aos isolados de *C. parapsilosis*, o único mecanismo verificado foi o polimorfismo natural P660A no *hotspot 1* do gene *CpFKS1*, mecanismo tipicamente descrito nesta espécie como responsável por aumentar a tolerância desta a esta classe de antifúngicos.

Em suma, apenas um dos isolados analisados foi de acordo com o mecanismo estudado, sendo os mecanismos utilizados os comumente identificados nestas espécies com estes tipos de resistências. Para se compreenderem melhor os motivos por trás das resistências nas espécies de *Candida* não *albicans* será necessário um aumento dos estudos relativamente às resistências antifúngicas destas espécies. A presença destas espécies nos isolamentos clínicos, juntamente com o aumento das resistências antifúngicas, falta de compreensão das mesmas e baixa escolha terapêutica são fatores preocupantes para a saúde pública, devendo tê-los os em consideração para o aprofundamento destes estudos e, desta forma, obter maiores opções de combate a estas infeções.

6. Referências Bibliográficas

Arendrup, M. C., Cuenca-Estrella, M., Lass-Flörl, C., Hope, W., & EUCAST-AFST. (2012). EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). *Clinical Microbiology and Infection*, 18(7), E246-E247.

Arendrup, M. C., & Patterson, T. F. (2017). Multidrug-resistant *Candida*: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. *The Journal of infectious diseases*, 216(suppl_3), S445-S451.

Ben-Ami, R., & Kontoyiannis, D. P. (2021). Resistance to antifungal drugs. *Infectious Disease Clinics*, 35(2), 279-311.

Campoy, S., & Adrio, J. L. (2017). Antifungals. *Biochemical pharmacology*, 133, 86-96.

- Carreté, L., Ksiezopolska, E., Gómez-Molero, E., Angoulvant, A., Bader, O., Fairhead, C., & Gabaldón, T. (2019). Genome comparisons of *Candida glabrata* serial clinical isolates reveal patterns of genetic variation in infecting clonal populations. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 112.
- Cortegiani, A., Misseri, G., & Chowdhary, A. (2019). What's new on emerging resistant *Candida* species. *Intensive care medicine*, *45*(4), 512-515.
- Costa-de-Oliveira, S., Pina-Vaz, C., Mendonca, D., & Goncalves Rodrigues, A. (2008). A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *27*(5), 365-374.
- de Oliveira Santos, G. C., Vasconcelos, C. C., Lopes, A. J., de Sousa Cartágenes, M. D. S., Filho, A. K., do Nascimento, F. R., ... & de Andrade Monteiro, C. (2018). *Candida* infections and therapeutic strategies: mechanisms of action for traditional and alternative agents. *Frontiers in microbiology*, *9*, 1351.
- da Rocha, W. R. V., Nunes, L. E., Neves, M. L. R., de Azevedo Ximenes, E. C. P., & de Azevedo Albuquerque, M. C. P. (2021). Gênero *Candida*-Fatores de virulência, Epidemiologia, Candidíase e Mecanismos de resistência. *Research, Society and Development*, *10*(4), e43910414283-e43910414283.
- El-Houssaini, H. H., Elnabawy, O. M., Nasser, H. A., & Elkhatib, W. F. (2019). Correlation between antifungal resistance and virulence factors in *Candida albicans* recovered from vaginal specimens. *Microbial pathogenesis*, *128*, 13-19.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2020). EUCAST Definitive document E. Def 7.3.2. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts.
- Ferrari, S., Ischer, F., Calabrese, D., Posteraro, B., Sanguinetti, M., Fadda, G., ... & Sanglard, D. (2009). Gain of function mutations in *CgPDR1* of *Candida glabrata* not only mediate antifungal resistance but also enhance virulence. *PLoS pathogens*, *5*(1), e1000268.
- Gangneux, J. P., Cornet, M., Bailly, S., Fradin, C., Féger, C., Timsit, J. F., ... & Bougnoux, M. E. (2018). Clinical impact of antifungal susceptibility, biofilm formation and mannoside expression of *Candida* yeasts on the outcome of invasive Candidiasis in ICU: An ancillary study on the prospective AmarCAND2 cohort. *Frontiers in microbiology*, *9*, 2907.
- Garcia-Effron, G., Katiyar, S. K., Park, S., Edlind, T. D., & Perlin, D. S. (2008). A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in Fks1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *52*(7), 2305-2312.
- Gnat, S., Łagowski, D., Nowakiewicz, A., & Dyląg, M. (2021). A global view on fungal infections in humans and animals: opportunistic infections and microsporidiosis. *Journal of Applied Microbiology*, *131*(5), 2095-2113.
- Kainz, K., Bauer, M. A., Madeo, F., & Carmona-Gutierrez, D. (2020). Fungal infections in humans: the silent crisis. *Microbial Cell*, *7*(6), 143.
- Koo, H., Allan, R. N., Howlin, R. P., Stoodley, P., & Hall-Stoodley, L. (2017). Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nature Reviews Microbiology*, *15*(12), 740-755.

- Lee, Y., Puumala, E., Robbins, N., & Cowen, L. E. (2020). Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. *Chemical reviews*, 121(6), 3390-3411.
- Lockhart, S. R., & Guarner, J. (2019, May). Emerging and reemerging fungal infections. In *Seminars in diagnostic pathology* (Vol. 36, No. 3, pp. 177-181). WB Saunders.
- Martí-Carrizosa, M., Sánchez-Reus, F., March, F., Cantón, E., & Coll, P. (2015). Implication of *Candida parapsilosis* FKS1 and FKS2 mutations in reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(6), 3570-3573.
- Moye-Rowley, W. S. (2019). Multiple interfaces control activity of the *Candida glabrata* Pdr1 transcription factor mediating azole drug resistance. *Current genetics*, 65(1), 103-108.
- Papp, C., Kocsis, K., Tóth, R., Bodai, L., Willis, J. R., Ksiezopolska, E., ... & Gácsér, A. (2018). Echinocandin-induced microevolution of *Candida parapsilosis* influences virulence and abiotic stress tolerance. *Msphere*, 3(6), e00547-18.
- Paulo C, Mourão C, Veiga PM, Rocha G, Alves AF, Querol A, *et al.* Retrospective analysis of clinical yeast isolates in a hospital in the centre of Portugal: spectrum and revision of the identification procedures. *Med. Mycol.* 2009, 47(8): 836-44.
- Perlin, D. S., Rautemaa-Richardson, R., & Alastruey-Izquierdo, A. (2017). The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *The Lancet infectious diseases*, 17(12), e383-e392.
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Turnidge, J. D., Castanheira, M., & Jones, R. N. (2019). Twenty years of the SENTRY antifungal surveillance program: results for *Candida* species from 1997–2016. In *Open forum infectious diseases* (Vol. 6, No. Supplement_1, pp. S79-S94). US: Oxford University Press.
- Prasad, R., Shah, A. H., & Rawal, M. K. (2016). Antifungals: mechanism of action and drug resistance. *Yeast Membrane Transport*, 327-349.
- Pristov, K. E., & Ghannoum, M. A. (2019). Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*, 25(7), 792-798.
- Rodríguez-Tudela, J. L., Barchiesi, F., Bille, J., Chryssanthou, E., Cuenca-Estrella, M., Denning, D., ... & Verweij, P. E. (2003). Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. *Clinical microbiology and infection*, 9(8), i-viii.
- Salazar, S. B., Simões, R. S., Pedro, N. A., Pinheiro, M. J., Carvalho, M. F. N., & Mira, N. P. (2020). An overview on conventional and non-conventional therapeutic approaches for the treatment of candidiasis and underlying resistance mechanisms in clinical strains. *Journal of Fungi*, 6(1), 23.
- Salazar, S. B. (2022). Deepening the role of CgHaa1- and CgPdr1 - pathways in stress resilience and pathogenesis of *Candida glabrata* to foster new antifungal treatments. Tese de Doutoramento, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa.
- Salazar, S. B., Pinheiro, M. J. F., Sotti-Novais, D., Soares, A. R., Lopes, M. M., Ferreira, T., ... & Mira, N. P. (2022). Disclosing azole resistance mechanisms in resistant *C. glabrata* strains encoding wild-type or gain-of-function *CgPDR1* alleles through comparative genomics and transcriptomics. *G3 Genes/Genomes Genetics*.
- Sanguinetti, M., Posteraro, B., & Lass-Flörl, C. (2015). Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses*, 58, 2-13.

Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., & Azeredo, J. (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS microbiology reviews*, 36(2), 288-305.

Tantivitayakul, P., Lapidrattanakul, J., Kaypetch, R., & Muadcheingka, T. (2019). Missense mutation in *CgPDR1* regulator associated with azole-resistant *Candida glabrata* recovered from Thai oral candidiasis patients. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 17, 221-226.

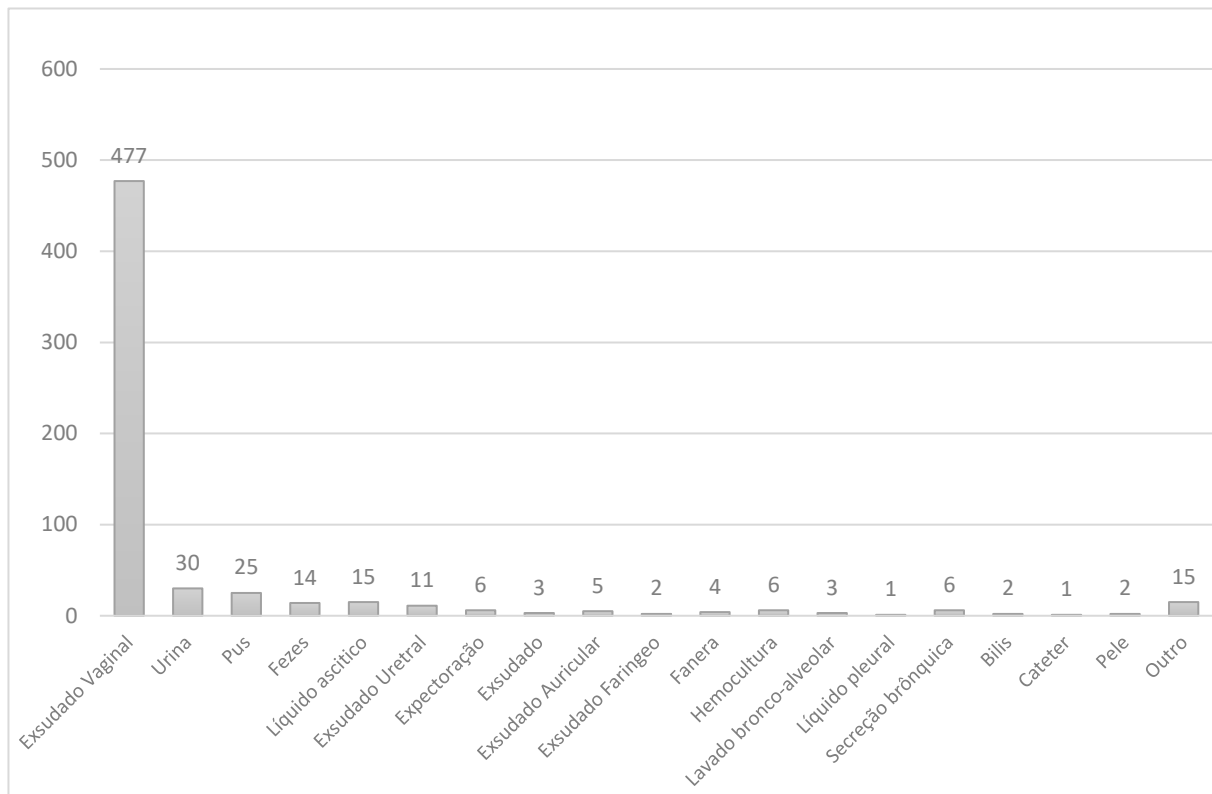
van Rhijn, N., & Bromley, M. (2021). The consequences of our changing environment on life threatening and debilitating fungal diseases in humans. *Journal of Fungi*, 7(5), 367.

Wang, W. Y., Cai, H. Q., Qu, S. Y., Lin, W. H., Liang, C. C., Liu, H., ... & Yuan, Y. J. (2022). Genomic Variation-Mediating Fluconazole Resistance in Yeast. *Biomolecules*, 12(6), 845.

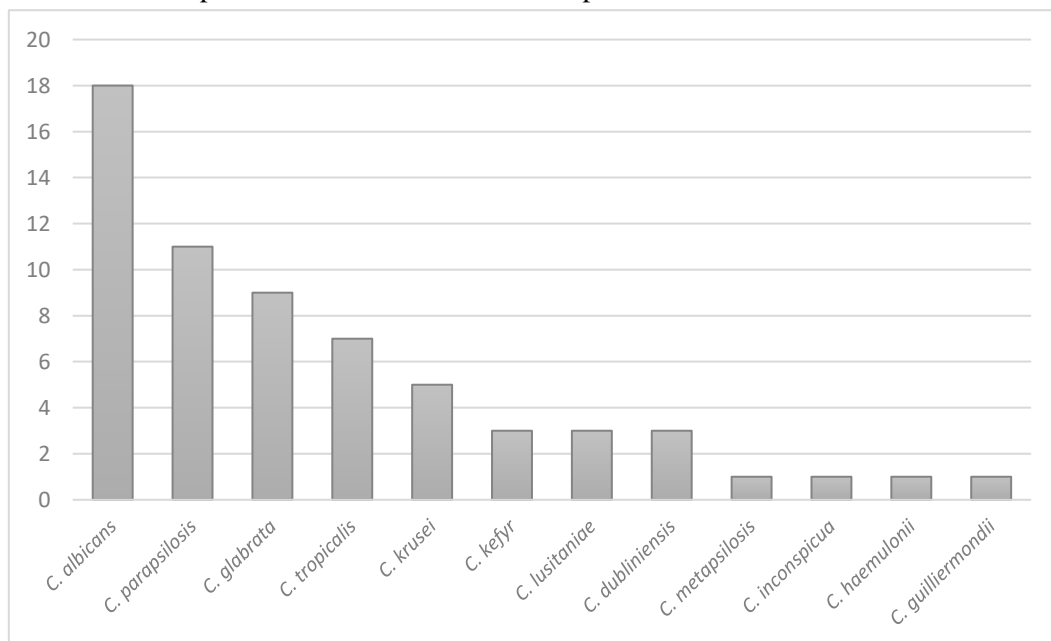
Whaley, S. G., Berkow, E. L., Rybak, J. M., Nishimoto, A. T., Barker, K. S., & Rogers, P. D. (2017). Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans* *Candida* species. *Frontiers in microbiology*, 7, 2173.

Anexos

Anexo 1 - Distribuição dos produtos a partir dos quais se obtiveram os isolados em estudo.



Anexo 2 – Número de produtos diferentes onde cada espécie foi recolhida.



Anexo 3 - Distribuição detalhada de isolados extraídos de produtos não estéreis.

	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. inconspicua</i>	<i>C. kefyr</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. lusitanae</i>	<i>C. metapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. haemulonii</i>	<i>C. guilliermondii</i>
Exsudado Vaginal	348	2	51	1	5	23	10	2	26	8	1	
Urina	15		9			1	1		2	2		
Pus	11		4			4			3	2		1
Fezes	8		6									
Exsudado Uretral	9	1							1			
Expectoração	3									3		
Exsudado	2		1									
Exsudado Auricular	1								4			
Exsudado Faringeo	1								1			
Fanera	1								3			
Lavado bronco-alveolar	2	1										
Secreção brônquica	4		1							1		
Pele						1			1			

Anexo 4 - Distribuição detalhada de isolados extraídos de produtos estéreis.

	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. inconspicua</i>	<i>C. kefyr</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. lusitanae</i>	<i>C. metapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. haemulonii</i>	<i>C. guilliermondii</i>
Líquido ascítico	6		1		2	1	1		3	1		
Hemocultura	3		1						1	1		
Líquido pleural	1											
Bilis	2											
Cateter	1											

Anexo 5 - Tabela detalhada dos resultados dos testes de avaliação de suscetibilidade a antifúngicos para *C. glabrata*. (R – resistente; S – suscetível).

Isolado	Local do Isolamento	Resistência aos antifúngicos (mg/L)			
		Fluconazol	Voriconazol	Anfotericina B	Caspofungina
ISTD19	Exsudado Vaginal	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTD20	Urina	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTD21	Exsudado Vaginal	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTD80	Exsudado Vaginal	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTD81	Exsudado Vaginal	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTD82	Exsudado vaginal	S (4)	S (0,06)	< 1	< 0,5
ISTD83	Sec. Brônquicas	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTD125	Urina	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTD126	Exsudado Vaginal	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTD127	Urina	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTD128	Exsudado Vaginal	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTD129	Exsudado Vaginal	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTD130	Exsudado Vaginal	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTD178	Exsudado Vaginal	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTD179	Fezes	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTD180	Fezes	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTD181	Exsudado Vaginal	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTD182	Exsudado Vaginal	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTD219	Não definido	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTD220	Não definido	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTD221	Pus	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTD222	Exsudado Vaginal	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTD223	Exsudado Vaginal	S (8)	S (0,25)	< 1	< 0,5
ISTD224	Pus	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTD225	Pus	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTD246	Exsudado Vaginal	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTD247	Exsudado Vaginal	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTD289	Exsudado Vaginal	R (32)	S (1)	< 1	< 0,5
ISTD291	Exsudado Vaginal	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTD292	Exsudado Vaginal	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTD293	Exsudado Vaginal	S (4)	S (0,125)	< 1	< 0,5
ISTD323	Exsudado Vaginal	S (4)	S (0,125)	< 1	< 0,5
ISTD324	Exsudado Vaginal	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTD363	Exsudado Vaginal	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTD364	Exsudado Vaginal	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTD365	Exsudado Vaginal	S (2)	S (0,06)	< 1	< 0,5
ISTD366	Não definido	S (8)	S (0,5)	< 1	< 0,5
ISTD367	Fezes	S (4)	S (0,125)	< 1	< 0,5
ISTD408	Exsudado Vaginal	R (\geq 64)	R (4)	< 1	< 0,5
ISTD409	Exsudado Vaginal	S (8)	S (0,5)	< 1	< 0,5
ISTD410	Exsudado Vaginal	S (8)	S (0,125)	< 1	< 0,5
ISTD411	Exsudado Vaginal	S (4)	S (0,125)	< 1	< 0,5

Isolado	Local do Isolamento	Resistência aos antifúngicos (mg/L)			
		Fluconazol	Voriconazol	Anfotericina B	Caspofungina
ISTE33	Exsudado Vaginal	S (4)	S (0,125)	< 1	< 0,5
ISTE34	Exsudado Vaginal	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTE35	Não definido	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTE36	Não definido	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTE37	Exsudado Vaginal	S (8)	S (0,25)	< 1	< 0,5
ISTE38	Exsudado Vaginal	S (16)	S (0,5)	< 1	< 0,5
ISTE39	Urina	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTE40	Fezes	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTE41	Fezes	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTE42	Exsudado Vaginal	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTE43	Urina	S (4)	S (0,125)	< 1	< 0,5
ISTE44	Urina	S (2)	S (0,06)	< 1	< 0,5
ISTE107	Exsudado Vaginal	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTE108	Exsudado Vaginal	S (2)	S (0,125)	< 1	< 0,5
ISTE109	Exsudado Vaginal	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTE110	Exsudado Vaginal	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTE177	Hemocultura	S (4)	S (0,125)	< 1	< 0,5
ISTE178	Não definido	R (32)	S (1)	< 1	< 0,5
ISTE179	Urina	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTE180	Fezes	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTE181	Exsudado Vaginal	S (4)	S (0,25)	< 1	< 0,5
ISTE182	Exsudado Vaginal	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTE183	Urina	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTE184	Exsudado Vaginal	S (8)	S (0,125)	< 1	< 0,5
ISTE185	Exsudado Vaginal	S (2)	S (0,125)	< 1	< 0,5
ISTE186	Líquido Ascítico	< 16	< 2	< 1	< 0,5
ISTE187	Exsudado Vaginal	S (8)	S (0,25)	< 1	< 0,5
ISTE188	Exsudado Vaginal	R (\geq 64)	R (4)	< 1	< 0,5
ISTE189	Pus	R (32)	S (1)	< 1	< 0,5
ISTE190	Exsudado Vaginal	R (\geq 64)	S (0,5)	< 1	< 0,5
ISTE191	Urina	S (2)	S (0,25)	< 1	< 0,5
ISTE192	Exsudado Vaginal	S (2)	S (0,125)	< 1	< 0,5
ISTE193	Exsudado Vaginal	S (8)	S (0,5)	< 1	< 0,5
ISTE194	Exsudado Vaginal	S (2)	S (0,125)	< 1	< 0,5
ISTE195	Exsudado Vaginal	S (4)	S (0,25)	< 1	< 0,5
ISTE196	Exsudado Vaginal	S (4)	S (0,25)	< 1	< 0,5

Anexo 6 - Tabela detalhada dos resultados dos testes de avaliação de suscetibilidade a antifúngicos para *C. parapsilosis*. (R – resistente; S – suscetível; T – tolerância aumentada).

Isolado	Local do Isolamento	Resistência aos antifúngicos (mg/L)			
		Fluconazol	Voriconazol	Anfotericina B	Caspofungina
ISTD23	Exsudado Vaginal	<4	<0,25	<1	S (0,125)
ISTD24	Exsudado Vaginal	<4	<0,25	<1	<1
ISTD25	Exsudado Vaginal	<4	<0,25	<1	<1
ISTD76	Urina	<4	<0,25	<1	<1
ISTD77	Exsudado Uretal	<4	<0,25	<1	S (0,5)
ISTD78	Exsudado Vaginal	<4	<0,25	<1	S (0,5)
ISTD79	Exsudado Vaginal	<4	<0,25	<1	<1
ISTD135	Exsudado Auricular	<4	<0,25	<1	S (0,125)
ISTD136	Exsudado Vaginal	<4	<0,25	<1	<1
ISTD137	Exsudado Auricular	<4	<0,25	<1	S (0,125)
ISTD138	Hemocultura	<4	<0,25	<1	<1
ISTD139	Exsudado Vaginal	<4	<0,25	<1	T (1)
ISTD230	Pus	<4	<0,25	<1	<1
ISTD231	Exsudado Faringeo	<4	<0,25	<1	<1
ISTD248	Unhas	<4	<0,25	<1	<1
ISTD249	Exsudado Vaginal	<4	<0,25	<1	S (0,5)
ISTD250	Exsudado Vaginal	<4	<0,25	<1	<1
ISTD251	Exsudado Vaginal	<4	<0,25	<1	<1
ISTD295	Exsudado Vaginal	<4	<0,25	<1	<1
ISTD327	Exsudado Auricular	<4	<0,25	<1	S (0,125)
ISTD369	Exsudado Vaginal	<4	<0,25	<1	T (1)
ISTD370	Exsudado Vaginal	<4	<0,25	<1	S (0,125)
ISTD412	Urina	<4	<0,25	<1	<1
ISTE45	Exsudado Vaginal	S (0,5)	S (<0,016)	<1	S (0,125)
ISTE46	Líquido Ascítico	<4	<0,25	<1	<1
ISTE47	Líquido Ascítico	<4	<0,25	<1	<1
ISTE48	Exsudado Vaginal	S (1)	S (0,016)	<1	S (0,125)
ISTE49	Pus	S (0,5)	S (0,016)	<1	S (0,125)
ISTE50	Exsudado Vaginal	S (0,5)	S (0,03)	<1	S (0,06)
ISTE51	Exsudado Vaginal	<4	<0,25	<1	S (0,125)
ISTE52	Líquido Ascítico	<4	<0,25	<1	<1
ISTE53	Pus	<4	<0,25	<1	S (0,125)
ISTE54	Exsudado Vaginal	<4	<0,25	<1	S (0,25)
ISTE119	Exsudado Vaginal	<4	<0,25	<1	<1
ISTE120	Exsudado Auricular	<4	<0,25	<1	<1
ISTE121	Fanera	S (0,5)	S (0,016)	<1	S (0,125)
ISTE122	Fanera	S (2)	S (0,06)	<1	S (0,25)

Anexo 7 - Tabela detalhada dos resultados dos testes de avaliação de suscetibilidade a antifúngicos para *C. tropicalis*. (R – resistente; S – suscetível; T – tolerância aumentada).

Isolado	Local do Isolamento	Resistência aos antifúngicos (mg/L)			
		Fluconazol	Voriconazol	Anfotericina B	Caspofungina
ISTD90	Pus	<4	<0,25	<1	<1
ISTD91	Exsudado Vaginal	<4	<0,25	<1	<1
ISTD140	Exsudado Vaginal	<4	S (0,06)	<1	S (<0,016)
ISTD141	Hemocultura	<4	<0,25	<1	S (<0,016)
ISTD228	Expectoração	<4	<0,25	<1	<1
ISTD326	Pus	<4	<0,25	<1	S (<0,016)
ISTD368	Urina	<4	S (0,03)	<1	<1
ISTD413	Líquido ascítico	<4	<0,25	<1	S (<0,016)
ISTD414	Exsudado Vaginal	<4	<0,25	<1	S (0,016)
ISTE55	Sec. Brônquicas	<4	<0,25	<1	<1
ISTE56	Exsudado Vaginal	<4	<0,25	<1	S (<0,016)
ISTE57	Expectoração	<4	R (≥8)	<1	T (≥8)
ISTE116	Exsudado Vaginal	<4	S (<0,016)	<1	S (0,016)
ISTE117	Exsudado Vaginal	<4	<0,25	<1	<1

Anexo 8 - Tabela detalhada dos resultados dos testes de avaliação de suscetibilidade a antifúngicos para *C. kefyr*. (R – resistente; S – suscetível).

Isolado	Local do Isolamento	Resistência aos antifúngicos (mg/L)			
		Fluconazol	Voriconazol	Anfotericina B	Caspofungina
ISTC163	Exsudado Vaginal	S (< 0,06)	S (< 0,015)	< 1	< 0,5
ISTC164	Urina Asséptica	S (0,125)	S (< 0,015)	< 1	< 0,5
ISTC485	Exsudado Vaginal	S (0,125)	S (< 0,015)	< 1	< 0,5
ISTC486	Exsudado Vaginal	< 4	< 0,25	< 1	< 0,5
ISTD22	Exsudado Vaginal	S (0,25)	S (< 0,015)	< 1	< 0,5
ISTD373	Líquido ascítico	S (0,125)	S (< 0,015)	< 1	< 0,5
ISTD374	Líquido ascítico	S (0,25)	S (< 0,015)	< 1	< 0,5
ISTD415	Exsudado Vaginal	S (0,125)	S (< 0,015)	< 1	< 0,5
ISTD416	Exsudado Vaginal	S (0,125)	S (< 0,015)	< 1	< 0,5
ISTE210	Exsudado Vaginal	< 4	< 0,25	< 1	< 0,5
ISTE211	Exsudado Vaginal	< 4	< 0,25	< 1	< 0,5
ISTE212	Exsudado Vaginal	< 4	< 0,25	< 1	< 0,5

Anexo 9 - Tabela detalhada dos resultados dos testes de avaliação de suscetibilidade a antifúngicos para *C. lusitaniae*. (R – resistente; S – suscetível).

Isolado	Local do Isolamento	Resistência aos antifúngicos (mg/L)			
		Fluconazol	Voriconazol	Anfotericina B	Caspofungina
ISTC1	Exsudado Vaginal	S (0,125)	< 0,25	< 1	S (0,06)
ISTC4	Exsudado Vaginal	S (0,125)	< 0,25	< 1	S (0,06)
ISTC487	Exsudado Vaginal	S (0,125)	< 0,25	< 1	S (0,06)
ISTC641	Não definido	S (0,25)	< 0,25	< 1	S (0,03)
ISTC642	Pus	S (0,25)	< 0,25	< 1	S (0,06)
ISTD26	Exsudado Vaginal	S (< 0,125)	< 0,25	< 1	S (0,015)
ISTD27	Urina	< 4	< 0,25	< 1	< 0,5
ISTD89	Exsudado Vaginal	< 4	< 0,25	< 1	< 0,5
ISTD226	Exsudado Vaginal	< 4	< 0,25	< 1	< 0,5
ISTD227	Urina	S (< 0,125)	< 0,25	< 1	S (0,125)
ISTD254	Exsudado Vaginal	S (0,125)	< 0,25	< 1	S (0,125)
ISTD372	Exsudado Vaginal	< 4	< 0,25	< 1	< 0,5
ISTE59	Exsudado Vaginal	< 4	< 0,25	< 1	< 0,5
ISTE170	Exsudado Vaginal	< 4	< 0,25	< 1	< 0,5
ISTE171	Exsudado Vaginal	< 4	< 0,25	< 1	< 0,5
ISTE213	Exsudado Vaginal	< 4	< 0,25	< 1	< 0,5
ISTE214	Exsudado Vaginal	< 4	< 0,25	< 1	< 0,5

Anexo 10 – Alinhamentos das sequências obtidas pelos *primers* NL1 (A) e NL4 (B) de acordo com a base de dados presente na NCBI.

```

11  CTTAGTAGCGGCAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTAGAGTC 70
    |||
43  CTTAGTAGCGGCAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTAGAGTC 102
    |||
71  CGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGTCTGGCTCTGTCTATGTTTCTTGAACA 130
    |||
103 CGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGTCTGGCTCTGTCTATGTTTCTTGAACA 162
    |||
131 GAACGTCACAGAGGTTGAGAATCCCCTGCGATGAGATGATCCAGGCTATGTAAGTTCC 190
    |||
163 GAACGTCACAGAGGTTGAGAATCCCCTGCGATGAGATGATCCAGGCTATGTAAGTTCC 222
    |||
191 TTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGAGCTCTAAGTGGTGGTAAATTCATCTAAG 250
    |||
223 TTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGAGCTCTAAGTGGTGGTAAATTCATCTAAG 282
    |||
251 CTAATATTGGCGAGAGACCAGTAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGAACT 310
    |||
283 CTAATATTGGCGAGAGACCAGTAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGAACT 342
    |||
311 TTGAAAAGAGAGTGAAGAAGTACGTGAAATTTGTAAGGGGAAAGGCTTGAGATCAGACT 370
    |||
343 TTGAAAAGAGAGTGAAGAAGTACGTGAAATTTGTAAGGGGAAAGGCTTGAGATCAGACT 402
    |||
371 TGGTATTTGTATGTTACTTCTCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTATCGGGCCAGCATCAG 430
    |||
403 TGGTATTTGTATGTTACTTCTCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTATCGGGCCAGCATCAG 462
    |||
431 TTTGGGCGGTGAGAGAATTCGTTGGAATGTGGCACGGCTCGGTTGTGTATTAGCCT 490
    |||
463 TTTGGGCGGTGAGAGAATTCGTTGGAATGTGGCACGGCTCGGTTGTGTATTAGCCT 522
    |||
491 TCGTCGATACTGCCAGCCTAGACTGAGGACTGCGGTTTATACCTAGGATGTTGGCATAAT 550
    |||
523 TCGTCGATACTGCCAGCCTAGACTGAGGACTGCGGTTTATACCTAGGATGTTGGCATAAT 582
    |||
551 GATCTTAAGTCGCCCGTCTTGACCAACGGACCA 583
    |||
583 GATCTTAAGTCGCCCGTCTTGACCAACGGACCA 615

2  TGCCATATCCAAATAGCGGAGGAAAAAAGAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAGCGGCAGTG 61
    |||
1  TGCCATATCCAAATAGCGGAGGAAAAAAGAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAGCGGCAGTG 60
    |||
62  AAGCGGC AAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGAAG 121
    |||
61  AAGCGGC AAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGAAG 120
    |||
122 AAGGTATCTTTGGGTCTGGCTCTGTCTATGTTTCTTGAACAGAACGTCACAGAGGGTG 181
    |||
121 AAGGTATCTTTGGGTCTGGCTCTGTCTATGTTTCTTGAACAGAACGTCACAGAGGGTG 180
    |||
182 AGAATCCCGTGCATGAGATGATCCAGGCTATGTAAGTTCCTCGAAGAGTCGAGTTG 241
    |||
181 AGAATCCCGTGCATGAGATGATCCAGGCTATGTAAGTTCCTCGAAGAGTCGAGTTG 240
    |||
242 TTTGGGAATGCACTCTAAGTGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATTTGGCGAGAG 301
    |||
241 TTTGGGAATGCACTCTAAGTGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATTTGGCGAGAG 300
    |||
302 ACCGATAGCGAACAAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAA 361
    |||
301 ACCGATAGCGAACAAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAA 360
    |||
362 AAGTACGTGAAATTTGTAAGGGGAAAGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTGTATGTTA 421
    |||
361 AAGTACGTGAAATTTGTAAGGGGAAAGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTGTATGTTA 420
    |||
422 CTTCTCGGGGGTGGCTCTACAGTTTATCGGGCCAGCATCAGTTTGGGCGGTAGGAGAA 481
    |||
421 CTTCTCGGGGGTGGCTCTACAGTTTATCGGGCCAGCATCAGTTTGGGCGGTAGGAGAA 480
    |||
482 TTGCGTTGGAATGTGGCACGGCTTCGGTTGTGTATTAGCCTTCGTGATACTGCCAGC 541
    |||
481 TTGCGTTGGAATGTGGCACGGCTTCGGTTGTGTATTAGCCTTCGTGATACTGCCAGC 540
    |||
542 CTAGACTGAGGACTGCGGTTTATACCTAGGATGT 575
    |||
541 CTAGACTGAGGACTGCGGTTTATACCTAGGATGT 574
    |||

```

Anexo 11 – Alinhamento obtido pela ClustalW da sequenciação do gene *CgPDR1* do isolado ISTD289.

PDR1	MQTLETTSKSNPGEVKAQKPSTRRTKVGKACDSCRRRKIKCNGLKPCPSCTIYGCECTYT	60
ISTD289	MQTLETTSKSNPGEVKAQKPSTRRTKVGKACDSCRRRKIKCNGLKPCPSCTIYGCECTYT	60

PDR1	DAKSTKNLKSNDAGKSKPTGRVSKNKETTRVDKDIRKLEQQYVFINANIHVGRFPSENI	120
ISTD289	DAKSTKNLKSNDAGKPKPTGRVSKNKETTRIDKDIRKSEQQYVFINANIHVGRFPSENI	120
*****;*****		
PDR1	LNGYPQCGAPQNNVVGPNLAVNTQCHRGLETPMSSTFKESNLRDDRLQSSDTPDDMRNG	180
ISTD289	LNGYPQCGAPQNNVVGPNLAVNPQCHRGLETPMSSTFKESNLRDDRLQSSDTPDDMRNG	180

PDR1	DSEERDLKGSSENVKSKDNKSDPLIIYKDDTHIESTVKNLTQAVNELKSLQNAAPSSIKS	240
ISTD289	DSEERDLKGSSENVKSKDNKSDPLIIYKDDTHIESTVKNLTQAVNELKSLQNAAPSSIKS	240

PDR1	SIDAIELQLRNILDNWKPEVDFEKAKINESATTKSLETNLLRNKYTNHVHLTRFRIWIDY	300
ISTD289	SIDAIELQLRNILDNWKPEVDFEKAKINESATTKSLETNLLRNKYTNHVHLTRFRIWIDY	300

PDR1	KNANKNNHFMGECGFLAESFFASNQPLVDELFGLYSQVEAFSLQGLGVCVHLYEPYMKT	360
ISTD289	KNANKNNHFMGECGFLAESFFASNQPLVDELFGLYSQVDAFSLQGLGVCVHLYEPYMKT	360
*****;		
PDR1	EEAIKLMKETLYIILRFIDICVHHINEESISIANPLETYLRKKHLMFMTPTPRSSYGSPO	420
ISTD289	EEAIKLMKETLYIILRFIDICVHHINEESISIANPLETYLRKKHLMFMTPTPRSSYGSPO	420

PDR1	SASTKSLVSKI IERIPQPFIESVTNVSSLQLDLRDESKMFGTLLNMCKSIIRKFDVSM	480
ISTD289	SASTKSLVSKI IERIPQPFIESVTNVSSLQLDLRDESKMFGTLLNMCKSIIRKFDVSM	480

PDR1	SDYDSIVTEKSEGEQNDGKVTVAEFTSLCEAEEMLLALCNYNYNLTYLFFFGTNI EYM	540
ISTD289	SDYDSIVTEKSEGEQNDGKVTVAEFTSLCEAEEMLLALCNYNYNLTYLFFFGTNI EYM	540

PDR1	EHLLEELLEEQLALDEYYGFEKVLNVAVANAKKMGFHRWEFYVGYEESTAEKRLLWKKLY	600
ISTD289	EHLLEELLEEQLALDEYYGFEKVLNVAVANAKKMGFHRWEFYVGYEESTAEKRLLWKKLY	600

PDR1	NYEKASTMKKGFVSVIIDDATVNCLLPKIFRNFYGLDRVEFLENIQKPMDSLVSFSDVPI SV	660
ISTD289	NYEKASTMKKGFVSVIIDDATVNCLLPKIFRNFYGLDRVEFLENIQKPMDSLVSFSDVPI SV	660

PDR1	LCKYGELALTIVTSEFHEKFLYADRYTSIRNSAKPPTLKNQLIKEIVDGIAYTETS YEAI	720
ISTD289	LCKYGELALTIVTSEFHEKFLYADRYTSIRNSAKPPTLKNQLIKEIVDGIAYTETS YEAI	720

PDR1	RKQTAKLWDIALGKVTKDKINKEDTAAASKFTLSYEHFRFLINMADNLIARLMVKPKSD	780
ISTD289	RKQTAKLWDIALGKVTKDKINKEDTAAASKFTLSYEHFRFLINMADNLIARLMVKPKSD	780

PDR1	WLSV MKGHLNRLYEHKVMNEI ILSMDNDYSIATTFEYAPSCCLATQTFLIVRNMEM	840
ISTD289	WLSV MKGHLNRLYEHKVMNEI ILSMDNDYSIATTFEYAPSCCLATQTFLIVRNMEM	840

PDR1	DDVKMMVAVYKRFNLGMFLQSAKVCSLADSHTRDFRSRFSFITIIISRLMIEFMQIKE	900
ISTD289	DDVKMMVAVYKRFNLGMFLQSAKVCSLADSHTRDFRSRFSFITIIISRLMIEFMQIKE	900

PDR1	LTKVEFIEKFSEVCPDLADLPMLLDPNCLYFSLQIQKSGFTLSFKKILEDARMMDF	960
ISTD289	LTKVEFIEKFSEVCPDLADLPMLLDPNCLYFSLQIQKSGFTLSFKKILEDARMMDF	960

PDR1	NYDRNLDSEAIKKNCEGFSKMPSCCTNVSDTTTAVSDNSAKKKASMG SARVNSTDTLTAS	1020
ISTD289	NYDRNLDSEAIKKNCEGFSKMPSCCTNVSDTTTAVSDNSAKKKASMG SARVNSTDTLTAS	1020

PDR1	PLSGLRNQTLQDSKDSVPSLEAYTPIDSVSDVPTGEINVFPFPVYNQNGLDQQTTYNLGT	1080
ISTD289	PLSGLRNQTLQDSKDSVPSLEAYTPIDSVSDVPTGEINVFPFPVYNQNGLDQQTTYNLGT	1080

PDR1	LDEFVNKGDNLNELYNSLWGDLSFSDVYL* 1107	
ISTD289	LDEFVNKGDNLNELYNSLWGDLSFSDVYL- 1107	

Anexo 12 - Alinhamento obtido pela ClustalW da sequenciação do gene *CgPDR1* do isolado ISTD408.

PDR1	MQTLETTSKSNPGEVKAQKPSTRRTKVGKACDSCRRRKIKCNGLKPCPSCTIYGCECTYT	60
ISTD408	MQTLETTSKSNPGEVKAQKPSTRRTKVGKACDSCRRRKIKCNGLKPCPSCTIYGCECTYT	60

PDR1	DAKSTKNLKSNDAGKSKPTGRVSKNKETTRVDKDIRKLEQQYVFINANIHVGRFRPSENI	120
ISTD408	DAKSTKNLKSNDAGKSKPTGRVSKNKETTRIDKDIRKLEQQYVFINANIHVGRFRPSENI	120
*****;*****		
PDR1	LNGYPQCGAPQNNVGNPLAVNTQCHRGLETPMSSTFKESNLRDDRLQSSDTPDDMRNG	180
ISTD408	LNGYPQCGAPQNNVGNPLAVNTQCHRGLETPMSSTFKESNLRDDRLQSSDTPDDMRNG	180

PDR1	DSEERDLKGSDEENVKSKDNKSDPLIIYKDDTHIESTVKNLTQAVNELKSLQNAAPSSIKS	240
ISTD408	DSEERDLKGSDEENVKSKDNKSDPLIIYKDDTHIESTVKNLTQAVNELKSLQNAAPSSIKS	240

PDR1	SIDAIELQLRNILDNWKPEVDFEKAKINESATTKSLETNLLRNKYTNHVHLTRFRIWIDY	300
ISTD408	SINAIELQLRNILDNWKPEVDFEKAKINESATTKSLETNLLRNKYTNHVHLTRFRIWIDY	300
;***		
PDR1	KNANKNNHFMGECGFLAESFFASNQPLVDELFGLYSQVEAFSLQGLGVCVHLYEPYMKT	360
ISTD408	KNANKNNHFMGECGFLAESFFASNQPLVDELFGLYSQVEAFSLQGLGVCVHLYEPYMKT	360

PDR1	EEAIKLMKETLYIILRFIDICVHHINEESISIANPLETYLRKKHLMFMTPTPRSSYGSPO	420
ISTD408	EEAIKLMKETLYIILRFIDICVHHINEESISIANPLETYLRKKHLMFMTPTPRSSYGSPO	420

PDR1	SASTKSLVSKI IERIPQPFIESVTNVSSLQLDLRDESKMFGTLNLMCKSIRKFDVSM	480
ISTD408	SASTKSLVSKI IERIPQPFIESVTNVSSLQLDLRDESKMFGTLNLMCKSIRKFDVSM	480

PDR1	SDYDSIVTEKSEGEQNDGKVTVAEFTSLCEAEMLLALCNYNYNLTYLFFFGTNI EYM	540
ISTD408	SDYDSIVTEKSEGEQNDGKVTVAEFTSLCEAEMLLALCNYNYNLTYLFFFGTNI EYM	540

PDR1	EHLLEELQALDEYYGFEKVLNVAVANAKKMGFHRWEFYVGYEESTAEKRLLWKKLY	600
ISTD408	EHLLEELQALDEYYGFEKVLNVAVANAKKMGFHRWEFYVGYEESTAEKRLLWKKLY	600

PDR1	NYEKASTMKKGFVSVIIDDATVNCLLPKIFRNFYGLDRVEFLENIQKPMDSLVSFSDVPI SV	660
ISTD408	NYEKASTMKKGFVSVIIDDATVNCLLPKIFRNFYGLDRVEFLENIQKPMDSLVSFSDVPI SV	660

PDR1	LCKYGELALTIIVTSEFHEKFLYADRYTSIRNSAKPPTLKNQLIKEIVDGIAYTETS YEAI	720
ISTD408	LCKYGELALTIIVTSEFHEKFLYADRYTSIRNSAKPPTLKNQLIKEIVDGIAYTETS YEAI	720

PDR1	RKQTAKLWDIALGKVTKDKINKEDTAAASKFTLSYEHFRFLINMADNLIARLMVKPKSD	780
ISTD408	RKQTAKLWDIALGKVTKDKINKEDTAAASKFTLSYEHFRFLINMADNLIARLMVKPKSD	780

PDR1	WLSV MKGHLNRLYEHKVMNEIILSMDNDYSIATTFEYAPSCCLATQTFILVRNMEM	840
ISTD408	WLSV MKGHLNRLYEHKVMNEIILSMDNDYSIATTFEYAPSCCLATQTFILVRNMEM	840

PDR1	DDVMMVAVYKRFNLGMFLQSAKVCSLADSHTRDFRSRFSFITIIISRLMIEFMQIKE	900
ISTD408	DDVMMVAVYKRFNLGMFLQSAKVCSLADSHTRDFRSRFSFITIIISRLMIEFMQIKE	900

PDR1	LTKVEFIEKFSEVCPDLADLPMLLDPNCLYFSLQIQKSGFTLSFKKILEDARMMDF	960
ISTD408	LTKVEFIEKFSEVCPDLADLPMLLDPNCLYFSLQIQKSGFTLSFKKILEDARMMDF	960

PDR1	NYDRNLDSEAIKKNCEGFSKMPSCCTNVSDTTTAVSDNSAKKKASMG SARVNSTDTLTAS	1020
ISTD408	NYDRNLDSEAIKKNCEGFSKMPSCCTNVSDTTTAVSDNSAKKKASMG SARVNSTDTLTAS	1020

PDR1	PLSGLRNQTQLDSKDSVPSLEAYTPIDSVSDVPTGEINVFPVYQNGLDQQTYYNLGT	1080
ISTD408	PLSGLRNQTQLDSKDSVPSLEAYTPIDSVSDVPTGEINVFPVYQNGLDQQTYYNLGT	1080

PDR1	LDEFVNKGDNLNELYNSLWGDLSFSDVYL* 1107	
ISTD408	LDEFVNKGDNLNELYNSLWGDLSFSDVYL- 1107	

Anexo 13 - Alinhamento obtido pela ClustalW da sequenciação do gene *CgPDR1* do isolado ISTE178.

PDR1	MQTLETTSKSNPGEVKAQKPSTRRTKVGKACDSCRRRKIKCNGLKPCPSCTIYGCECTYT	60
ISTE178	MQTLETTSKSNPGEVKAQKPSTRRTKVGKACDSCRRRKIKCNGLKPCPSCTIYGCECTYT *****	60
PDR1	DAKSTKNLKSNDAGKSKPTGRVSKNKETTRVDKDIRKLEQQYVFINANIHVGRPRFPSENI	120
ISTE178	DAKSTKNLKSNDAGKPKPTGRVSKNKETTRIDKDIRKSEQQYVFINANIHVGRPRFPSENI *****	120
PDR1	LNGYPQCGAPQNNVGNPLAVNTQCHRGLSETPMSSTFKESNLRDDRLQSSDTRDDMRNG	180
ISTE178	LNGYPQCGAPQNNVGNPLAVNPQCHRGLSETPMSSTFKESNLRDDRLQSSDTRDDMRNG *****	180
PDR1	DSEERDLKGSDSENVKSKDNKSDPLI IYKDDTHIESTVNKLTQAVNELKSLQNAPSSIKS	240
ISTE178	DSEERDLKGSDSENVKSKDNKSDPLI IYKDDTHIESTVNKLTQAVNELKSLQNAPSSIKS *****	240
PDR1	SIDAIELQLRNILDNWKPEVDFEKAKINESATTKSLETNLLRNKYTNHVHLTRFRWIWIDY	300
ISTE178	SIDAIELQLRNILDNWKPEVDFEKAKINESATTKSLETNLLRNKYTNHVHLTRFRWIWIDY *****	300
PDR1	KNANKNNHFMEGCGFSLAESFFASNQPLVDELFGLYSQVEAFSLQGLGYCVHLYEPMYKT	360
ISTE178	KNANKNNHFMEGCGFSLAESFFASNQPLVDELFGLYSQVDAFSLQGLGYCVHLYEPMYKT *****	360
PDR1	EEAIKLMKETLYIILRFIDICVHHINEESISIANPLETYLRKKHLMFMTPTPRSSYGSPO	420
ISTE178	EEAIKLMKETLYIILRFIDICVHHINEESISIANPLETYLRKKHLMFMTPTPRSSYGSPO *****	420
PDR1	SASTKSLVSKI IERIPQPFIESVTNVSSLQLLDRDDESKMFGTLLNMCKSIRRKFD SVM	480
ISTE178	SASTKSLVSKI IERIPQPFIESVTNVSSLQLLDRDDESKMFGTLLNMCKSIRRKFD SVM *****	480
PDR1	SDYDSIVTEKSEGEQNDGKVTVAEFTSLCEAEEMLLALCYNYNLTLYSFFFGTNI EYM	540
ISTE178	SDYDSIVTEKSEGEQNDGKVTVAEFTSLCEAEEMLLALCYNYNLTLYSFFFGTNI EYM *****	540
PDR1	EHLLEEEQALALDEYYGFEKVLNVAVANAKKMGFHRWEFYVGYEESTAEKRRLW WKLY	600
ISTE178	EHLLEEEQALALDEYYGFEKVLNVAVANAKKMGFHRWEFYVGYEESTAEKRRLW WKLY *****	600
PDR1	NYEKASTMKKGFVSVIDDATVNCLLPKIFRNFYGLDRVEFLENIQKPMDSLVSFSDVPI SV	660
ISTE178	NYEKASTMKKGFVSVIDDATVNCLLPKIFRNFYGLDRVEFLENIQKPMDSLVSFSDVPI SV *****	660
PDR1	LCKYGEALTIIVTSEFHEKFLYADRYTSIRNSAKPPTLKNQLIKEIVDGIAYTETS YEAI	720
ISTE178	LCKYGEALTIIVTSEFHEKFLYADRYTSIRNSAKPPTLKNQLIKEIVDGIAYTETS YEAI *****	720
PDR1	RKQTAKLWDIALGKVTKDKINKEDTAAASKFTLSYEHFRFLINMADNLIARLMV KPKSD	780
ISTE178	RKQTAKLWDIALGKVTKDKINKEDTAAASKFTLSYEHFRFLINMADNLIARLMV KPKSD *****	780
PDR1	WLISVMKGHNLNRYEHHWKVMNEIILSMDNDYSIATTFEYYPSCCLLATQTF LIVRNMEM	840
ISTE178	WLISVMKGHNLNRYEHHWKVMNEIILSMDNDYSIATTFEYYPSCCLLATQTF LIVRNMEM *****	840
PDR1	DDVKMMVAVYKRFNLGMFLQSAKVCSLADSHTRDFRSFSFITIIISRLMI IEFMQIKE	900
ISTE178	DDVKMMVAVYKRFNLGMFLQSAKVCSLADSHTRDFRSFSFITIIISRLMI IEFMQIKE *****	900
PDR1	LTKVEFIEKFSEVCPDLADLPPMLLDPNCLYFSLQI KKS GFTLSFKKILEDARMMDF	960
ISTE178	LTKVEFIEKFSEVCPDLADLPPMLLDPNCLYFSLQI KKS GFTLSFKKILEDARMMDF *****	960
PDR1	NYDRNLDSEAIKKNGEFSKSPSCNTNVS DTTTAVSDNSAKKASMG SARVNSTD TL TAS	1020
ISTE178	NYDRNLDSEAIKKNGEFSKSPSCNTNVS DTTTAVSDNSAKKASMG SARVNSTD TL TAS *****	1020
PDR1	PLSGLRNQTLQDSKDSVPSLEAYTPIDSVSDVPTGEINVFPFPVYNQNGLDQQTT YNLGT	1080
ISTE178	PLSGLRNQTLQDSKDSVPSLEAYTPIDSVSDVPTGEINVFPFPVYNQNGLDQQTT YNLGT *****	1080
PDR1	LDEFVNKGDNLNELYNSLWGD LFS DVYL* 1107	
ISTE178	LDEFVNKGDNLNELYNSLWGD LFS DVYL- 1107 *****	

Anexo 14 - Alinhamento obtido pela ClustalW da sequenciação do gene *CgPDR1* do isolado ISTE188.

PDR1	MQTLETTSKSNPGEVKAQKPFSTRRTKVGKACDSCRRRKIKCNGLKPCPSCTIYGCECTYT	60
ISTE188	MQTLETTSKSNPGEVKAQKPFSTRRTKVGKACDSCRRRKIKCNGLKPCPSCTIYGCECTYT *****	60
PDR1	DAKSTKNLKSNDAGKSKPTGRVSKNKETTRVDKDIRKLEQQYVPIANIHVGRFRFSENI	120
ISTE188	DAKSTKNLKSNDAGKPKPTGRVSKNKETTRIDKDIRKSEQQYVPIANIHVGRFRFSENI *****	120
PDR1	LNGYPQCGAPQNNVGNPLAVNTQCHRGLSETPMSSTFKESNLRDRLQLSSDTRDDMRNG	180
ISTE188	LNGYPQCGAPQNNVGNPLAVNPQCHRGLSETPMSSTFKESNLRDRLQLSSDTRDDMRNG *****	180
PDR1	DSEERDLKGSDSENVKSKDNKSDPLI IYKDDTHIESTVNKLTQAVNELKSLQNA PSSIKS	240
ISTE188	DSEERDLKGSDSENVKSKDNKSDPLI IYKDDTHIESTVNKLTQAVNELKSLQNA PSSIKS *****	240
PDR1	SIDAIELQLRNILDNWKPEVDFEKAKINESATTKSLETNLLRNKYTNHVHLTRFRWIWIDY	300
ISTE188	SIDAIELQLRNILDNWKPEVDFEKAKINESATTKSLETNLLRNKYTNHVHLTRFRWIWIDY *****	300
PDR1	KNANKNNHFMGECGFLAESFFASNQPLVDELFGLYSQVEAFSLQGLGYCVHLYEPMYKT	360
ISTE188	KNANKNNHFMGECGFLAESFFASNQPLVDEFFGLYSQVEAFSLQGLGYCVHLYEPMYKT *****	360
PDR1	EEAIKLMKETLYIILRFIDICVHHINEESISIANPLETYLRKKHLMFMTPTPRSSYGSPO	420
ISTE188	EEAIKLMKETLYIILRFIDICVHHINEESISIANPLETYLRKKHLMFMTPTPRSSYGSPO *****	420
PDR1	SASTKSLVSKI IERIPQPFIESVTNVSSLQLLDRDDESKMFGTLLNMCKSIRRKFD SVM	480
ISTE188	SASTKSLVSKI IERIPQPFIESVTNVSSLQLLDRDDESKMFGTLLNMCKSIRRKFD SVM *****	480
PDR1	SDYDSIVTEKSEGEQNDGKVTVAEFTSLCEAEEMLLALCYNYNLTLYSFFFEFGTNI EYM	540
ISTE188	SDYDSIVTEKSEGEQNDGKVTVAEFTSLCEAEEMLLALCYNYNLTLYSFFFEFGTNI EYM *****	540
PDR1	EHLLEELQALDEYYGFEKVLNVAVANAKKMGFHRWEFYVGYEESTAEKRRLWVKLY	600
ISTE188	EHLLEELQALDEYYGFEKVLNVAVANAKKMGFHRWEFYVGYEESTAEKRRLWVKLY *****	600
PDR1	NYEKASTMKKGFVSVIDDATVNCLLPKIFRNFYGLDRVEFLENIQKPMDSLVSFSDVPI SV	660
ISTE188	NYEKASTMKKGFVSVIDDATVNCLLPKIFRNFYGLDRVEFLENIQKPMDSLVSFSDVPI SV *****	660
PDR1	LCKYGEALTIIVTSEFHEKFLYADRYTSIRNSAKPPTLKNQLIKEIVDGIAYTETS YEAI	720
ISTE188	LCKYGEALTIIVTSEFHEKFLYADRYTSIRNSAKPPTLKNQLIKEIVDGIAYTETS YEAI *****	720
PDR1	RKQTAKLWDIALGKVTKDKINKEDTAAASKFTLSYEHFRFLINMADNLIARLMVKPKSD	780
ISTE188	RKQTAKLWDIALGKVTKDKINKEDTAAASKFTLSYEHFRFLINMADNLIARLMVKPKSD *****	780
PDR1	WLISVMKGHLNRLYEHKVMNEIILSMDNDYSIATTFEYYPASCCLATQTF LIVRNMEM	840
ISTE188	WLISVMKGHLNRLYEHKVMNEIILSMDNDYSIATTFEYYPASCCLATQTF LIVRNMEM *****	840
PDR1	DDVKMMVAVYKRFNLGMFLQSAKVCSLADSHTRDFRSFSFITIISRMIIEFMQIKE	900
ISTE188	DDVKMMVAVYKRFNLGMFLQSAKVCSLADSHTRDFRSFSFITIISRMIIEFMQIKE *****	900
PDR1	LTKVEFIEKFSEVCPDLADLPPMLLDPNCLYFSLQI KKS GFTLSFKKILEDARMMDF	960
ISTE188	LTKVEFIEKFSEVCPDLADLPPMLLDPNCLYFSLQI KKS GFTLSFKKILEDARMMDF *****	960
PDR1	NYDRNL DSEAIKKNGEFKSKMPSC TNVSDTTAVSDNSAKKASMG SARVNSTDTLTAS	1020
ISTE188	NYDRNL DSEAIKKNGEFKSKMPSC TNVSDTTAVSDNSAKKASMG SARVNSTDTLTAS *****	1020
PDR1	PLSGLRNQTLQDSKDSVPSLEAYTPIDSVSDVPTGEINVFPFPVYNQNGLDQQTTYNLGT	1080
ISTE188	PLSGLRNQTLQDSKDSVPSLEAYTPIDSVSDVPTGEINVFPFPVYNQNGLDQQTTYNLGT *****	1080
PDR1	LDEFVNKGDLNELYNSLWGD LFS DVYL* 1107	
ISTE188	LDEFVNKGDLNELYNSLWGD LFS DVYL- 1107 *****	

Anexo 15 - Alinhamento obtido pela ClustalW da sequenciação do gene *CgPDR1* do isolado ISTE189.

PDR1	MQTLETTSKSNPGEVKAQKPFSTRRTKVGKACDSCRRRKIKCNGLKPCPSCTIYGCECTYT	60
ISTE189	MQTLETTSKSNPGEVKAQKPFSTRRTKVGKACDSCRRRKIKCNGLKPCPSCTIYGCECTYT *****	60
PDR1	DAKSTKNLKSNDAGKSKPTGRVSKNKETTRVDKDIRKLEQQYVFINANIHVGRFRPFSENI	120
ISTE189	DAKSTKNLKSNDAGKPKPTGRVSKNKETTRIDKDIRKSEQQYVFINANIHVGRFRPFSENI *****	120
PDR1	LNGYPQCGAPQNNVGNPLAVNTQCHRGLSETPMSSTFKESNLRDRLQLSSDTRDDMRNG	180
ISTE189	LNGYPQCGAPQNNVGNPLAVNPQCHRGLSETPMSSTFKESNLRDRLQLSSDTRDDMRNG *****	180
PDR1	DSEERDLKGSDSENVKSKDNKSDPLI IYKDDTHIESTVNKLTQAVNELKSLQNAPSSIKS	240
ISTE189	DSEERDLKGSDSENVKSKDNKSDPLI IYKDDTHIESTVNKLTQAVNELKSLQNAPSSIKS *****	240
PDR1	SIDAIELQLRNILDNWKPEVDFEKAKINESATTKSLETNLLRNKYTNHVHLTRFRWIWIDY	300
ISTE189	SIDAIELQLRNILDNWKPEVDFEKAKINESATTKSLETNLLRNKYTNHVHLTRFRWIWIDY *****	300
PDR1	KNANKNNHFMEGCGFSLAESFFASNQPLVDELFGLYSQVEAFSLQGLGYCVHLYEPMYKT	360
ISTE189	KNANKNNHFMEGCGFSLAESFFASNQPLVDELFGLYSQVEAFSLQGLGYCVHLYEPMYKT *****	360
PDR1	EEAIKLMKETLYIILRFIDICVHHINEESISIANPLETYLRKKHLMFMTPTPRSSYGSPO	420
ISTE189	EEAIKLMKETLYIILRFIDICVHHINEESISIANPLETYLRKKHLMFMTPTPRSSYGSPO *****	420
PDR1	SASTKSLVSKI IERIPQPFIESVTNVSSLQLLDRDDESKMFGTLLNMCKSIRRKFD SVM	480
ISTE189	SASTKSLVSKI IERIPQPFIESVTNVSSLQLLDRDDESKMFGTLLNMCKSIRRKFD SVM *****	480
PDR1	SDYDSIVTEKSEGEQNDGKVTVAEFTSLCEAEEMLLALCYNYNLTLYSFFFGTNI EYM	540
ISTE189	SDYDSIVTEKSEGEQNDGKVTVAEFTSLCEAEEMLLALCYNYNLTLYSFFFGTNI EYM *****	540
PDR1	EHLLEELQALDEYYGFEKVLNVAVANAKKMGFHRWEFYVGYEESTAEKRLLWVKLY	600
ISTE189	EHLLEELQALDEYYGFEKVLNVAVANAKKMGFHRWEFYVGYEESTAEKRLLWVKLY *****	600
PDR1	NYEKASTMKKGFVSVIDDATVNCLLPKIFRNFYGLDRVEFLENIQKPMDSLVSFSDVPI SV	660
ISTE189	NYEKASTMKKGFVSVIDDATVNCLLPKIFRNFYGLDRVEFLENIQKPMDSLVSFSDVPI SV *****	660
PDR1	LCKYGEALTIIVTSEFHEKFLYADRYTSIRNSAKPPTLKNQLIKEIVDGIAYTETS YEAI	720
ISTE189	LCKYGEALTIIVTSEFHEKFLYADRYTSIRNSAKPPTLKNQLIKEIVDGIAYTETS YEAI *****	720
PDR1	RKQTAKLWDIALGKVTKDKINKEDTAAASKFTLSYEHFRFLINMADNLIARLMVKPKSD	780
ISTE189	RKQTAKLWDIALGKVTKDKINKEDTAAASKFTLSYEHFRFLINMADNLIARLMVKPKSD *****	780
PDR1	WLISVMKGHNLNRYEHWKVMNEIILSMDNDYSIATTFEYYPSPCLCLATQTF LIVRNMEM	840
ISTE189	WLISVMKGHNLNRYEHWKVMNEIILSMDNDYSIATTFEYYPSPCLCLATQTF LIVRNMEM *****	840
PDR1	DDVKMMVAVYKRFNLGMFLQSAKVCSLADSHTRDFRSFSFITIISRMIIEFMQIKE	900
ISTE189	DDVKMMVAVYKRFNLGMFLQSAKVCSLADSHTRDFRSFSFITIISRMIIEFMQIKE *****	900
PDR1	LTKVEFIEKFSEVCPDLADLPPMLLDPNCLYFSLQIQQKSGFTLSFKKILEDARMMDF	960
ISTE189	LTKVEFIEKFSEVCPDLADLPPMLLDPNCLYFSLQIQQKSGFTLSFKKILEDARMMDF *****	960
PDR1	NYDRNLDSEAIKKNGEFSKSMPSCTNVSDTTAVSDNSAKKASMG SARVNSTDTLTAS	1020
ISTE189	NYDRNLDSEAIKKNGEFSKSMPSCTNVSDTTAVSDNSAKKASMG SARVNSTDTLTAS *****	1020
PDR1	PLSGLRNQTQLDSKDSVPSLEAYTPIDSVSDVPTGEINVFPFPVYNQGLDQQT TYNLGT	1080
ISTE189	PLSGLRNQTQLDSKDSVPSLEAYTPIDSVSDVPTGEINVFPFPVYNQGLDQQT TYNLGT *****	1080
PDR1	LDEFVNKGDNLNELYNLWGLFSDVYL* 1107	
ISTE189	LDEFVNKGDNLNELYNLWGLFSDVYL- 1107 *****	

Anexo 16 - Alinhamento obtido pela ClustalW da sequenciação do gene *CgPDR1* do isolado ISTE190.

PDR1	MQTLETTSKSNPGEVKAQKPSTRRTKVGKACDSCRRRKIKCNGLKPCPSCTIYGCECTYT	60
ISTE190	MQTLETTSKSNPGEVKAQKPSTRRTKVGKACDSCRRRKIKCNGLKPCPSCTIYGCECTYT	60

PDR1	DAKSTKNLKSNDAGKSKPTGRVSKNKETTRVDKDIRKLEQQYVFINANIHVGRFRPSENI	120
ISTE190	DAKSTKNLKSNDAGKSKPTGRVSKNKETTRIDKDIRKSEQQYVFINANIHVGRFRPSENI	120
*****;*****		
PDR1	LNGYPQCGAPQNNVVGPNLAVNTQCHRGLSETPMSSTFKESNLRDDRLQSSDTPDDMRNG	180
ISTE190	LNGYPQCGAPQNNVVGPNLAVNTQCHRGLSETPMSSTFKESNLRDDRLQSSDTPDDMRNG	180

PDR1	DSEERDLKGSDEENVKSKDNKSDPLIIYKDDTHIESTVKNLTQAVNELKSLQNAAPSSIKS	240
ISTE190	DSEERDLKGSDEENVKSKDNKSDPLIIYKDDTHIESTVKNLTQAVNELKSLQNAAPSSIKS	240

PDR1	SIDAIELQLRNILDNWKPEVDFEKAKINESATTKSLETNLLRNKYTNHVHLTRFRIWIDY	300
ISTE190	SINAIELQLRNILDNWKPEVDFEKAKINESATTKSLETNLLRNKYTNHVHLTRFRIWIDY	300
;***		
PDR1	KNANKNNHFMGECGFLAESFFASNQPLVDELFGLYSQVEAFSLQGLGVCVHLYEPYMKT	360
ISTE190	KNANKNNHFMGECGFLAESFFASNQPLVDELFGLYSQVEAFSLQGLGVCVHLYEPYMKT	360

PDR1	EEAIKLMKETLYIILRFIDICVHHINEESISIANPLETYLRKKHLMFMTPTPRSSYGSPO	420
ISTE190	EEAIKLMKETLYIILRFIDICVHHINEESISIANPLETYLRKKHLMFMTPTPRSSYGSPO	420

PDR1	SASTKSLVSKI IERIPQPFIESVTNVSSLQLDLRDESKMFGTLLNMCKSIRKFDVSM	480
ISTE190	SASTKSLVSKI IERIPQPFIESVTNVSSLQLDLRDESKMFGTLLNMCKSIRKFDVSM	480

PDR1	SDYDSIVTEKSEGEQNDGKVTVAEFTSLCEAEEMLLALCNYNYNLTLYSFFFGTNI EYM	540
ISTE190	SDYDSIVTEKSEGEQNDGKVTVAEFTSLCEAEEMLLALCNYNYNLTLYSFFFGTNI EYM	540

PDR1	EHLLEELLEEQLALDEYYGFEKVLNVAVANAKKMGFHRWEFYVGYEESTAEKRLLWVKLY	600
ISTE190	EHLLEELLEEQLALDEYYGFEKVLNVAVANAKKMGFHRWEFYVGYEESTAEKRLLWVKLY	600

PDR1	NYEKASTMKKGFVSVI DDTVNCCLPKIFRNFYGLDRVEFLENIQKPMDSLVSFSDVPI SV	660
ISTE190	NYEKASTMKKGFVSVI DDTVNCCLPKIFRNFYGLDRVEFLENIQKPMDSLVSFSDVPI SV	660

PDR1	LCKYGELALTIVTSEFHEKFLYADRYTSIRNSAKPPTLKNQLIKEIVDGIAYTETS YEAI	720
ISTE190	LCKYGELALTIVTSEFHEKFLYADRYTSIRNSAKPPTLKNQLIKEIVDGIAYTETS YEAI	720

PDR1	RKQTAKLWDIALGKVTKDKINKEDTAAASKFTLSYEHFRFLINMADNLIARLMVKPKSD	780
ISTE190	RKQTAKLWDIALGKVTKDKINKEDTAAASKFTLSYEHFRFLINMADNLIARLMVKPKSD	780

PDR1	WLSV MKGHLNRLYEHKVMNEI ILSMDNDYSIATTFEY YAPSCCLATQTF L IVRNMEM	840
ISTE190	WLSV MKGHLNRLYEHKVMNEI ILSMDNDYSIATTFEY YAPSCCLATQTF L IVRNMEM	840

PDR1	DDVKMMVAVYKRFNLGMFLQSAKVCSLADSHTRDFRSRFSFITIIISRLMIEFMQIKE	900
ISTE190	DDVKMMVAVYKRFNLGMFLQSAKVCSLADSHTRDFRSRFSFITIIISRLMIEFMQIKE	900

PDR1	LTKVEFIEKFSEVCPDLADLPMLLDPNCLYFSLQIQKSGFTLSFKKILEDARMMDF	960
ISTE190	LTKVEFIEKFSEVCPDLADLPMLLDPNCLYFSLQIQKSGFTLSFKKILEDARMMDF	960

PDR1	NYDRNLDSEAIKKNCEGFSKMPSC TNVSDTTTAVSDNSAKKKASMG SARVNSTDTLTAS	1020
ISTE190	NYDRNLDSEAIKKNCEGFSKMPSC TNVSDTTTAVSDNSAKKKASMG SARVNSTDTLTAS	1020

PDR1	PLSGLRNQTQLD SKDSVPSLEAYTPIDSVSDVPTGEINVFPFPPVYNQNGLDQQT TYNLGT	1080
ISTE190	PLSGLRNQTQLD SKDSVPSLEAYTPIDSVSDVPTGEINVFPFPPVYNQNGLDQQT TYNLGT	1080

PDR1	LDEFVNKGDLNELYNSLWGD LFS DVYL* 1107	
ISTE190	LDEFVNKGDLNELYNSLWGD LFS DVYL- 1107	
