

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Anna Paula de Oliveira Tironi

**ANÁLISES TAXOGENÔMICAS E PERFIL DE VIRULÊNCIA DE ESPÉCIES DO
GÊNERO *CANDIDOZYMA* ISOLADAS DE BIOMAS BRASILEIROS**

Belo Horizonte

2025

Anna Paula de Oliveira Tironi

**ANÁLISES TAXOGENÔMICAS E PERFIL DE VIRULÊNCIA DAS ESPÉCIES DO
GÊNERO *CANDIDOZYMA* ISOLADAS DE BIOMAS BRASILEIROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dra. Susana Johann

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa

Belo Horizonte

2025

043

Tironi, Anna Paula de Oliveira.

Análises taxogenômicas e perfil de virulência das espécies do gênero *Candidozyma* isoladas de biomas brasileiros [manuscrito] / Anna Paula de Oliveira Tironi. – 2025.

140 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dra. Susana Johann. Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Candida. 3. Farmacorresistência Fúngica. 4. Aquecimento Global. 5. Leveduras. I. Johann, Susana. II. Rosa, Carlos Augusto. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579

Ficha Catalográfica elaborada pela bibliotecária Fabiane C M Reis CRB 6 2680



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS INSTITUTO
DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE **ANNA PAULA DE OLIVEIRA TIRONI**

Nº REGISTRO: 2023666230

Às 14:00 horas do dia **07 de fevereiro de 2025**, reuniu-se remotamente pela Plataforma Teams, a Comissão Examinadora composta pelas Dras. Nalu Teixeira de Aguiar Peres (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Luana Rossato (Universidade Federal da Grande Dourados), a Profa. Dra. Susana Johann (Orientadora) e o Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa (Coorientador), para julgar o trabalho final **“Análises taxogenômicas e perfil de virulência das espécies do gênero *Candidozyma* isoladas de biomas brasileiros”** da aluna **Anna Paula de Oliveira Tironi** requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidenta da Comissão, Profa. Dra. Susana Johann - Orientadora, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidenta da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidenta encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 07 de fevereiro de 2025

Membros da banca:

Profa. Dra. Nalu Teixeira de Aguiar Peres Profa.

Dra. Luana Rossato

De acordo:

Profa. Dra. Susana Johann (Orientadora)

Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa (Coorientador)

Prof. Dr. Daniel de Assis Santos (Coordenador do Programa de Pós-graduação em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Daniel de Assis Santos, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 14/02/2025, às 08:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nalu Teixeira de Aguiar Peres, Professora do Magistério Superior**, em 14/02/2025, às 09:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Augusto Rosa, Coordenador(a)**, em 14/02/2025, às 11:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luana Rossato, Usuário Externo**, em 14/02/2025, às 17:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Susana Johann, Membro de comissão**, em 17/02/2025, às 09:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3465438** e o código CRC **2EFAAF63**.

Referência: Processo nº 23072.209683/2023-

1

SEI nº 3465438

Dedico este trabalho à minha avó, Maria Cândida
(*in memoriam*), por sua inspiração, amor e legado

AGRADECIMENTOS

A realização dessa dissertação de mestrado contou com importantes apoios e incentivos que tornaram este trabalho realidade, sendo eu eternamente grata.

Agradeço primeiramente aos meus pais, Elcineia e Marcelino, pelo carinho, apoio, confiança, dedicação e, acima de tudo, por serem meu suporte desde o início da minha jornada em Belo Horizonte. Ao meu irmão que sempre me apoiou e confiou em todos os meus sonhos. Essa base extremamente forte fez com que eu pudesse seguir todos os meus sonhos, mesmo nos momentos mais difíceis, que superamos juntos.

Ao Junior por tanto companheirismo, suporte, compreensão e, além de tudo, por ter sido meu braço direito durante esses anos. Acolheu-me em cada momento de tristeza e comemorou comigo cada uma das minhas conquistas. Além de ter sido meu parceiro de experimentos nos finais de semana.

À minha orientadora Susana Johann, pela oportunidade e por ter me recebido no grupo Antifúngicos e também pela confiança, incentivo, cuidado, suporte e compreensão desde o início do meu mestrado. Admiro sua força como mãe, pesquisadora e professora. Sou grata a todos os membros do Laboratório de Antifúngicos, principalmente aos meus alunos de iniciação científica, João e Maria Luiza, obrigada por confiarem em mim, por ter me tirado muitas risadas nesses meses/anos e por terem sido apoio e luz na minha vida. Ao Luiz Felipe, que encontrou uma irmã mais nova no laboratório, sem você eu não teria conseguido, obrigada pelo apoio, confiança e incentivo durante todo o período que trabalhamos juntos.

Agradeço também ao meu coorientador, Carlos Augusto Rosa por toda a paciência, empenho e sentido prático com que sempre me orientou neste trabalho e em todos aqueles que realizei durante o mestrado. Muito obrigada por me ter corrigido quando necessário sem nunca me desmotivar. Agradeço também ao professor Luiz Henrique Rosa por estar sempre pronto a ajudar. E também aos alunos do laboratório, pela amizade, pelas risadas, pelos conhecimentos compartilhados e por todos os dias que passamos juntos.

A Thais (técnica do laboratório), uma pessoa maravilhosa que tive o prazer de conhecer e conviver. Você é incrível, obrigada por tudo e por ser uma mãezona! À Ana Raquel, pelo suporte técnico. Além das boas conversas e risadas.

A todo corpo docente e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG por todo seu esforço, dedicação e competência, e também ao apoio financeiro fornecido pela CAPES e pelo CNPq. Agradeço especialmente a Débora, que foi como uma mãe

em muitos momentos, sempre acalmando meu coração ansioso. E ao Thiago por sempre estar disposto a me ajudar e tirar minhas dúvidas.

Um agradecimento especial à Prof. Glória Franco que abriu as portas do seu laboratório para que eu pudesse aprender bioinformática, genética e bioquímica. Obrigada, Glória por ter contribuído tanto para minha formação, não só como microbiologista, mas como pesquisadora. Agradeço também aos seus alunos, Dani, Iza, Freddy, Dáfne e Thiago, por terem me ajudado nessa caminhada, sem vocês eu não teria conseguido avançar no mundo dos códigos.

À Dra. Katharina Barros, uma querida que virou uma grande amiga, obrigada pela pessoa e profissional que é. Obrigada por sua dedicação, que a fez, por muitas vezes, deixar de lado seus momentos de descanso para me ajudar e orientar. Sou realmente grata a você, me ensinou muito sobre um campo da ciência que eu pouco conhecia.

A Dra. Iara e ao Professor Ary (CTNano), por sua boa vontade em me ensinar e deixar utilizar o variokan. Sempre com paciência e extrema educação.

Ao Prof. Dr. Daniel Assis e Prof. Dra. Nalu Peres, pelo auxílio e por me permitir utilizar os equipamentos do laboratório de Micologia (LabMic). Agradeço também a Dani e ao Gustavo, seus ensinamentos foram muitos e certamente contribuíram positivamente para a minha formação. Obrigada por todo apoio durante o mestrado, sinto como se eu fosse parte deste laboratório também!

Aos meus amigos de Cláudio (MG) que estiveram ao meu lado durante toda essa caminhada. E também aos meus amigos de Belo Horizonte que se tornaram família em especial a Giovana Ávila, Isabel Sabino, Duda, Elisa, Laucelly, Julia, Sara e Livia. Desejo igualmente agradecer a todos os meus colegas do Mestrado em Microbiologia, especialmente a Larissa Mendes, Natsumi Mizogami e Gabriel Noman, cujo apoio e amizade estiveram presentes em todos os momentos.

Gostaria de agradecer a todos os professores do DMIC, especialmente ao Professor Rodrigo (Virologia), Silvinha (Bacteriologia) e Graci (Micologia). Obrigado pelas oportunidades que me foram concedidas durante este momento na universidade, principalmente com a divulgação do PGMICRO e com a Liga Acadêmica de Microbiologia. Agradeço em especial ao Rodrigo, por me incentivar e me mostrar a importância da divulgação científica, e que isso deve ser um papel primordial na formação de pesquisadores.

Muito obrigado pelo carinho, por essa amizade e pela parceria no mestrado, digo em todas as oportunidades que o sucesso deste trabalho deve ser dividido com vocês, sem vocês nada seria possível.

Agradeço aos membros da banca examinadora, pelo interesse e disponibilidade. Agradeço a Deus e Nossa Senhora, pois sonhei a seis anos atrás em estar aqui na UFMG e trabalhar com pesquisa, e foi mais que um sonho realizado! Obrigada, meu Deus, por me abençoar com tantos presentes divinos, me dando além do que eu possa merecer! Obrigada de coração á todos que fizeram parte dessa jornada.

RESUMO

Nos últimos anos, o número de infecções causadas por fungos emergentes tem aumentado significativamente, em parte devido ao aquecimento global, que permite a adaptação desses organismos a temperaturas mais elevadas. Dentro deste contexto, o complexo *Candidozyma haemuli-auris* ganhou destaque devido à sua termotolerância, resistência a antifúngicos e potencial de causar infecções humanas. No entanto, há uma lacuna no conhecimento sobre os isolados ambientais dessas espécies, o que reforça a necessidade de investigações detalhadas sobre suas características ecológicas, susceptibilidade a antifúngicos e fatores de virulência. Este estudo teve como objetivo principal analisar a resistência a antifúngicos e os fatores de virulência de isolados do complexo *Candidozyma haemuli-auris*, provenientes de diversos substratos em biomas brasileiros, a fim de entender como esses fatores podem estar relacionados à sua adaptação ambiental e potencial patogênico. Os isolados foram obtidos da coleção de Fungos e células da UFMG, e estes haviam sido isolados de nichos como flores, solo e madeira em decomposição, representando biomas como Amazônia e Cerrado. A partir destes isolados foram feitos estudos de identificação das espécies, utilizando sequenciamento molecular, testes de susceptibilidade a antifúngicos, testes de virulência, como termotolerância, biofilme, bomba de efluxo, adesão celular, indução a filamentação e análises genômicas. Para verificar a atividade de bombas de efluxo foi utilizada a rodamina 6G. Os resultados mostraram que os isolados trabalhados pertenciam às espécies *Candidozyma haemuli*, *Candidozyma duobushaemuli* e *Candidozyma heveicola*. Dentre as leveduras estudadas foi possível encontrar isolados (Y6065, Y7127, Y6408, Y7469 e Y7575) geneticamente distintos das outras espécies do clado, e desta forma foi possível encontrar cinco novas espécies pertencentes ao gênero, nomeada, no presente trabalho, como *Candidozyma* sp. (1) – (2) – (3) – (4) – (5). Quanto aos estudos de virulência, observamos que todos os isolados foram capazes de crescer a 37°C, e sete isolados, foram capazes de crescer também a 42°C. Além disso, a formação de biofilmes foi observada em onze isolados. Um isolado da Amazônia (Y6408) e seis isolados de Tocantins (Y6065, Y6066, Y7528, Y7529, Y7530 e Y7531) apresentaram resistência ao fluconazol e itraconazol, além de uma dependência de dose para anfotericina B e epoxiconazol. Quanto às espécies novas identificadas no presente trabalho, observamos que estas apresentaram perfil de susceptibilidade aos antifúngicos e virulência bastante parecida com as demais estudadas. Sendo *Candidozyma* sp. (4) com CIM elevado para a classe de azóis e anfotericina B, além da expressão constitutiva da bomba de efluxo na presença e ausência de fluconazol no isolado Y6066. As demais espécies do grupo *Candidozyma* sp. (2), (3) e (5) foram dose-dependentes para estas classes, enquanto para *Candidozyma* sp. (1) foi suscetível para todos os antifúngicos testados. No presente trabalho, também foi possível, a partir do sequenciamento de todo o genoma do isolado UFMG-CM-Y6065, Y6408, Y7127 e Y7469, análises genéticas para encontrar genes relacionados a resistência a antifúngicos como os genes *ERG11*, genes relacionados a formação de biofilme e adesão como os genes *ALSs*, *EFG1*, *SAPs*, *UPC2* e genes relacionados a bomba de efluxo como *TAC1*, *CDR1*, *CDR2*, *CDR3*, *MDR1* e *SNQ2*. Os resultados ressaltam a importância de investigações contínuas sobre a ecologia e a resistência antifúngica de leveduras ambientais, especialmente em um cenário de mudanças climáticas que favorece a adaptação desses organismos e a emergência de novos patógenos. Conclui-se que a interação entre fatores ambientais e pressões seletivas, como o uso de antifúngicos, desempenha um papel crucial na evolução do complexo *Candidozyma haemuli-auris*, destacando a necessidade de uma vigilância ambiental integrada para antecipar e mitigar o surgimento de linhagens resistentes com potencial oportunista.

Palavras-chave: *candidozyma haemuli-auris*; resistência a antifúngicos; aquecimento global;

biodiversidade de leveduras; Fungos emergentes.

ABSTRACT

In recent years, the number of infections caused by emerging fungi has increased significantly, partly due to global warming, which allows these organisms to adapt to higher temperatures. Within this context, the *Candidozyma haemuli-auris* complex has gained prominence due to its thermotolerance, resistance to antifungals, and potential to cause human infections. However, there is a gap in knowledge about environmental isolates of these species, which reinforces the need for detailed investigations of their ecological characteristics, susceptibility to antifungals, and virulence factors. The main objective of this study was to analyze the resistance to antifungals and virulence factors of isolates of the *Candidozyma haemuli-auris* complex, originating from various substrates in Brazilian biomes, in order to understand how these factors may be related to their environmental adaptation and pathogenic potential. The isolates were obtained from the Fungi and Cells Collection of UFMG, and these had been isolated from niches such as flowers, soil, and decaying wood, representing biomes such as the Amazon and Cerrado. From these isolates, species identification studies were performed using molecular sequencing, antifungal susceptibility tests, virulence tests, such as thermotolerance, biofilm, efflux pump, cell adhesion, filamentation induction and genomic analyses. Rhodamine 6G was used to verify the activity of efflux pumps. The results showed that the isolates studied belonged to the species *Candidozyma haemuli*, *Candidozyma duobushaemuli* and *Candidozyma heveicola*. Among the yeasts studied, it was possible to find isolates (Y6065, Y7127, Y6408, Y7469 and Y7575) that were genetically distinct from the other species of the clade, and thus it was possible to find five new species belonging to the genus, named, in the present work, as *Candidozyma* sp. (1) – (2) – (3) – (4) – (5). Regarding virulence studies, we observed that all isolates were able to grow at 37°C, and seven isolates were also able to grow at 42°C. In addition, biofilm formation was observed in eleven isolates. One isolate from the Amazon (Y6408) and six isolates from Tocantins (Y6065, Y6066, Y7528, Y7529, Y7530 and Y7531) showed resistance to fluconazole and itraconazole, in addition to a dose dependence for amphotericin B and epoxiconazole. Regarding the new species identified in the present study, we observed that they presented a susceptibility profile to antifungals and virulence quite similar to the others studied. *Candidozyma* sp. (4) with high MIC for the azole class and amphotericin B, in addition to constitutive expression of the efflux pump in the presence and absence of fluconazole in isolate Y6066. The other species of the *Candidozyma* sp. group (2), (3) and (5) were dose-dependent for these classes, while *Candidozyma* sp. (1) was susceptible to all antifungals tested. In the present study, it was also possible, from the sequencing of the entire genome of the isolate UFMG-CM-Y6065, Y6408, Y7127 and Y7469, to perform genetic analyses to find genes related to antifungal resistance such as the *ERG11* genes, genes related to biofilm formation and adhesion such as the *ALSs*, *EFG1*, *SAPs*, *UPC2* genes and genes related to the efflux pump such as *TAC1*, *CDR1*, *CDR2*, *CDR3*, *MDR1* and *SNQ2*. The results highlight the importance of continued investigations into the ecology and antifungal resistance of environmental yeasts, especially in a climate change scenario that favors the adaptation of these organisms and the emergence of new pathogens. It is concluded that the interaction between environmental factors and selective pressures, such as the use of antifungals, plays a crucial role in the evolution of the *Candidozyma haemuli-auris* complex, highlighting the need for integrated environmental surveillance to anticipate and mitigate the emergence of resistant strains with opportunistic potential.

Keywords: *candidozyma haemuli-auris*; antifungal resistance; global warming; yeast biodiversity; emerging fungi.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Árvore filogenética com isolados do gênero *Candidozyma*. Filogenia de máxima verossimilhança usando 2.226 genes ortólogos principais com base em 1000 réplicas, entre 12 conjuntos de genomas anotados da ordem Saccharomycetales, com *Metschnikowia australis*, como o grupo externo. Em vermelho espécies do clado *Candida auris-haemuli* (CAH).24
- Figura 2-** Atividade da bomba de efluxo com *C. albicans* (SC5314) e *Candidozyma* sp. (4) Y6066 na ausência FLC. 63
- Figura 3-** Atividade da bomba de efluxo com *C. albicans* (SC5314) e *Candidozyma* sp. (4) Y6066 na presença FLC. 63
- Figura 4-** Macroscopia de colônias do gênero *Candidozyma* em ágar Spider. Capturada com a câmera de um smartphone Samsung A54, em resolução de 12 MP/4K.....64
- Figura 5-** Micrografia de células epiteliais bucais (CEB) com leveduras do complexo haemuli-auris aderidas (setas vermelhas). 70
- Figura 6-** Gráfico da absorvância de biomassa dos isolados do complexo auris-haemuli para a análise da formação de biofilme. 71
- Figura 7-** Formação qualitativa de biofilmes visualizados em microscopia de varredura (MEV). 72
- Figura 8-** Foto das colônias dos isolados do Complexo haemuli-auris crescidas em meio CHROmagar a 37°C por 72 horas. 1) *Candidozyma auris* (COL01A). 2) *Candidozyma haemuli* (UFMG-CM-Y7574). 3) *Candidozyma duobushaemuli* (UFMG-CM-Y4453). 4) *Candidozyma heveicola* (UFMG-CM-Y-1478). 5) *Candidozyma* sp. (UFMG-CM-Y7469). 6) *Candidozyma* sp. (UFMG-CM-7127). 7) *Candidozyma* sp. (UFMG-CM-Y6408). 8) *Candidozyma* sp. (UFMG-CM-Y6066). 75
- Figura 9-** Árvore filogenômica dos isolados do gênero *Candidozyma* sp..... 76
- Figura 10-** Heatmap de valores de OrthoANI (Ortho Average Nucleotide Identity)..... 76
- Figura 11-** Heatmap com pontuação percentual (score %) de genes associados a fatores de virulência, resistência a antifúngicos e funções específicas em quatro espécies de leveduras (Y7469, Y7127, Y6408 e Y6065) 77
- Figura 12-** Análise de alinhamento de sequências ERG11 realizado por Clustal no Jalview. 79
- Figura 13-** Árvore filogenética do gene ERG11, incluindo os ortólogos de diferentes isolados de *Candidozyma* e *Candida*. 80
- Figura 14-** Presença de genes de resistência em *Candidozyma* sp. UFMG-CM-Y6065..... 80
- Figura 15-** Alinhamentos múltiplos de sequências de aminoácidos (aa) do gene ERG11 usando

Jalview de isolados clínicos de <i>Candidozyma haemuli</i> , <i>Candidozyma vulturna</i> , <i>Candidozyma auris</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i> e <i>Nakaseomyces glabratus</i> em comparação com a cepa ambiental <i>Candidozyma sp.</i> UFMG-CM-Y6065.	82
Figura 16- Estrutura tridimensional predita para a proteína ERG11 utilizando ColabFold (AlphaFold). Representação tridimensional da proteína ERG11, destacando as características estruturais preditas, como hélices α (em vermelho) E folhas β (em amarelo).	82
Figura 17- Proteínas de <i>C. tropicalis</i> , <i>C. albicans</i> e <i>C. auris</i> depositadas no UniProt. As proteínas relacionadas à espécie <i>Candidozyma sp.</i> UFMG-CM-Y6065 foram obtidas a partir do banco de dados UniProt para fins de comparação.	83
Figura 18- Estrutura tridimensional da proteína ERG11 gerada pelo I-TASSER. A estrutura apresenta o sítio ativo destacado em verde, modelado com base na sequência de aminoácidos da ERG11 do isolado em estudo UFMG-CM-Y6065.	84
Figura 19- Representação detalhada das análises estruturais e filogenômicas do gene MDR1. (A) Sobreposição das estruturas proteicas MDR1 de <i>Candidozyma</i> UFMG-CM-Y6065 (em azul) e <i>Candida albicans</i> (em dourado). (B) Estrutura tridimensional predita da proteína MDR1 gerada pelo software I-TASSER com base na sequência de <i>Candidozyma</i> UFMG-CM-Y6065. (C) Árvore filogenômica dos genes MDR1 das espécies <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , UFMG-CM-Y6065, <i>C. auris</i> , <i>C. haemuli</i> , <i>C. duobushaemuli</i> e <i>C. pseudohaemuli</i>	85
Figura 20- Representação gráfica da sintenia genômica entre os genomas de <i>Candidozyma auris</i> (em verde) e <i>Candidozyma sp.</i> UFMG-CM-Y6065 (em laranja).	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Isolados clínicos pertencentes ao complexo <i>C. haemuli-auris</i> utilizados no presente estudo.....	41
Tabela 2- Diretrizes interpretativas para teste de susceptibilidade <i>in vitro</i> em <i>Candida</i> sp. ...	47
Tabela 3- Diretrizes interpretativas para teste de susceptibilidade <i>in vitro</i> em <i>Candida albicans</i>	47
Tabela 4- Montagem de Genomas de <i>Candidozyma</i>	53
Tabela 5- Genomas utilizados para a montagem da árvore filogenética.	54
Tabela 6- Perfil de termotolerância dos isolados do Complexo <i>haemuli-auris</i>	59
Tabela 7- Perfil de suscetibilidade a antifúngicos dos isolados pertencentes ao complexo <i>haemuli-auris</i>	61
Tabela 8- Perfil de suscetibilidade a equinocandinas dos isolados <i>Candidozyma</i> sp. (4) isolados de <i>Ipomoea</i> sp.	62
Tabela 9- Resultados para as linhagens testadas a 37 °C por 7 e 15 dias cultivadas em ágar Spider.	65
Tabela 10- Adesão de leveduras do complexo <i>haemuli-auris</i> em células epiteliais bucais (CEB).	70
Tabela 11- Assimilação de diferentes fontes de carbono e nitrogênio no clado <i>haemuli-auris</i>	73
Tabela 12- Descrição dos genes analisados no estudo, incluindo suas respectivas funções. Os genes estão relacionados a fatores de virulência, resistência a antifúngicos e funções específicas em leveduras.	78

LISTA DE ABREVIATURAS

‰: Por cento

°C: Graus Celsius

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BLASTn: Nucleotide Basic Locus Alignment Search Tool

BLASTp: Protein Basic Locus Alignment Search Tool

CHA: Complexo haemuli-auris

cm: Centímetros

D1/D2: Região da Subunidade Maior do rRNA

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: Desoxirribonucleotídeo trifosfato

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

g L⁻¹: Grama por litro

g: Grama

GYMP: Glucose-Yeasts Extract- Malt Extract- Potassium phosphate

h: Horas

HCl: Ácido clorídrico

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

ITS: Região transcrita interna do Gene do rRNA

KH₂PO₄: Fosfato monopotássico

L: Litro

M: Molar

mg: Miligrama

MgCl₂: Cloreto de Magnésio

MIC: Concentração mínima inibitória

min: minutos

mL: Mililitro

mm: Milímetros

NaCl: Cloreto de sódio

ng: Nanograma

PCR: Reação em cadeia da polimerase

pH: Potencial Hidrogeniônico

pmol: Picomol

rcf: Força centrífuga relativa

RNA: Ácido Ribonucléico

rpm: Rotações por minuto

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SDS: Dodecil sulfato de sódio

TBE: Tris-borato

TE: Tampão Tris-EDTA

TRIS: 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UFMGCM: Coleção de Micro-organismos e Células da UFMG

YM: Ágar extrato de malte - Extrato de levedura

YNB: Base de nitrogênio de levedura

μ L mL⁻¹: Microlitro por mililitro

μ L: Microlitro

μ mol: Micromol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 Leveduras patogênicas no meio ambiente	21
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 Leveduras oportunistas: Complexo haemuli-auris	23
2.1.1 <i>Candidozyma auris</i>	25
2.1.2 Complexo <i>Candidozyma haemuli</i> (<i>C. haemuli</i> , <i>C. duobushaemuli</i> , <i>C. pseudohaemuli</i> e <i>C. vulturna</i>).....	26
2.1.3 Nova espécie de interesse clínico do gênero <i>Candidozyma</i> – <i>Candidozyma khabbhai</i> ..	28
2.1.4 Isolados Ambientais do gênero <i>Candidozyma</i>	29
2.2 Resistência antifúngica: uma ameaça emergente à saúde	30
2.2.1 Fungicidas agrícolas: resistência cruzada em azóis.....	31
2.2.2 Mecanismo de ação: azóis	33
2.2.3 Mecanismo de ação: polienos.....	34
2.2.4 Mecanismo de ação: equinocandinas	35
2.2.5 Mecanismo de ação: 5-flucitosina	35
2.3 Outros Mecanismos de Resistência	36
3. JUSTIFICATIVA	37
4. OBJETIVOS	39
4.1 Objetivo Geral	39
4.2 Objetivos Específicos.....	39
5. MATERIAL E MÉTODOS	40
5.1 Origem, obtenção e manutenção dos isolados.....	40
5.2 Verificação da pureza e criopreservação das amostras	40
5.3 Identificação molecular	42
5.3.1. Extração de DNA total	42
5.3.2 Amplificação utilizando o iniciador (GTG) ₅	42
5.3.3 Amplificação dos domínios D1/D2 do gene do rRNA.....	43
5.3.4 Amplificação da região ITS (espaçador transcrito interno).....	43
5.3.5 Purificação dos amplicons	44
5.4 Sequenciamento.....	44
5.4.1 Reações de sequenciamento	44

5.4.2 Precipitação da reação de sequenciamento.....	45
5.4.3 Análise computacional das sequências.....	45
5.5 Termotolerância.....	46
5.6 Teste de sensibilidade das leveduras à antifúngicos.....	46
5.7 Pesquisa de fatores de virulência.....	48
5.7.1 Estudo da morfogênese das linhagens	48
5.7.2 Teste de adesão a células epiteliais bucais de leveduras oportunistas.....	48
5.7.3 Ensaio de formação de Biofilme in vitro – quantitativo.....	49
5.7.4 Análise de formação de biofilme qualitativa em microscopia de varredura	50
5.7.5 Bomba de efluxo do tipo ABC	50
5.8 Caracterização fisiológica e avaliação de fenótipos	51
5.8.1 Assimilação de diferentes fontes de carbono e nitrogênio em meio sólido.....	51
5.8.2 Medição das células e formação de pseudohifas	52
5.8.3 Teste de reprodução assexuada.....	52
5.8.4 Diferenciação morfológica de novas espécies do gênero <i>Candidozyma</i> em CHOMAGAR	52
5.9 Sequenciamento e montagem genômica.....	52
5.9.1. Árvore filogenética.....	54
5.9.2 Análise de Similaridade Genômica: Aplicação do OrthoANI para Determinação de Proximidade Filogenômica.....	55
5.9.3 Análise de genes de resistência	55
5.9.4 Análise Proteica de Genes Selecionados	56
5.9.5 Sintenia a nível cromossomal - Y6065.....	57
6. RESULTADOS	57
6.1 Identificação das leveduras.....	57
6.2 Termotolerância.....	58
6.3 Perfil de susceptibilidade a antifúngicos	60
6.4 Pesquisa de fatores de virulência.....	63
6.4.1 Estudo da morfogênese das linhagens	63
6.4.2 Teste de adesão a células epiteliais bucais de leveduras oportunistas.....	65
6.4.3 Ensaio de formação de Biofilme in vitro.....	67
6.5 Caracterização fisiológica e avaliação de fenótipos	68
6.5.1 Assimilação de diferentes fontes de carbono e nitrogênio em meio sólido.....	68

6.5.2 Diferenciação morfológica de novas espécies do gênero <i>Candidozyma</i> em CHROMagar	74
6.6 Análise filogenética	75
6.7 Análise de genes de resistência	77
6.7.1 Análise de similaridade <i>ERG11</i> entre as novas espécies.....	78
6.7.2 Análise de genes de resistência na espécie UFMG-CM-Y6065.....	80
6.7.3 Análise da Proteína <i>ERG11</i>	81
6.7.4 Análise de proteica MDR1	85
6.7.5 Sintenia – <i>C. auris</i> e UFMG-CM-Y6065	86
7. DISCUSSÃO	87
7.1 Identificação de fatores de virulência em isolados ambientais.....	87
7.2 Identificação de novas espécies do clado haemuli-auris - isolados ambientais	91
7.3 Descrição de <i>Candidozyma cisalpinoae</i> sp. nov. - <i>Candidozyma</i> sp. (4) UFMG-CM-Y6065	97
8. CONCLUSÃO.....	98
9. REFERÊNCIAS.....	100

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leveduras patogênicas no meio ambiente

O aumento da atividade humana em ecossistemas e as mudanças climáticas tem intensificado o impacto dos fungos na saúde global, na agricultura e na biodiversidade (Adisasmito *et al.*, 2022). Desse modo, surgiu o conceito "Saúde Única" que está relacionado ao reconhecimento das interações entre organismos e seus habitats naturais, permitindo uma compreensão integrada dos impactos na saúde humana, animal e ambiental.

Esse entendimento é fundamental para promover ações globais e sustentáveis no enfrentamento de patógenos emergentes. Devido ao aumento das doenças causadas por leveduras emergentes, fenômeno que pode estar associado ao aquecimento global e ao aumento da transmissão zoonótica entre diferentes organismos (Woods *et al.*, 2023).

Diante do crescente impacto dos fungos patogênicos na saúde humana, animal e ambiental, destaca-se a relevância de iniciativas globais voltadas ao mapeamento da diversidade fúngica. Muitos fungos patogênicos têm origem ambiental, o que reforça a necessidade de um levantamento abrangente sobre os fungos presentes na natureza, seus habitats e interações. Tais esforços são cruciais para a identificação de espécies capazes de causar doenças em diversos hospedeiros, além de avaliar os impactos em plantações e ecossistemas vulneráveis.

Relatórios, como o da American Academy of Microbiology (2019), ressaltam a importância dos fungos patogênicos no cenário global, evidenciando os desafios emergentes e a necessidade de colaboração interdisciplinar. Esse contexto destaca a urgência de iniciativas integradas que promovam a ampliação do conhecimento sobre fungos ambientais, considerando sua diversidade e os potenciais impactos na saúde e na segurança alimentar.

Um exemplo que ilustra essa preocupação é o surgimento global da resistência a azóis em *Aspergillus fumigatus*, fenômeno diretamente associado ao uso extensivo de fungicidas azólicos, também conhecidos como inibidores de desmetilação (DMIs), na agricultura (Fisher *et al.*, 2018). Essa prática tem contribuído para a resistência cruzada aos antifúngicos clínicos, ampliando os desafios no manejo de infecções fúngicas (Fisher, 2022).

Esse cenário ressalta a importância de compreender como microrganismos, especialmente fungos, evoluem e persistem em ambientes variados, tornando-se potenciais agentes infecciosos. Muitos desses organismos possuem nichos ecológicos amplos e complexos, facilitando sua disseminação e a transferência para novos hospedeiros (Akinbobola *et al.*, 2023).

Entre os fungos de maior relevância clínica, destacam-se as leveduras oportunistas, como a espécie *Candida auris*, frequentemente associadas a infecções humanas e animais. (Yang *et al.*, 2021; Woods *et al.*, 2023). O gênero *Candidozyma*, é encontrado em uma diversidade de habitats, como solo, plantas, rios e em associações com animais.

Apesar dessa ampla distribuição, pouco se sabe sobre os mecanismos que permitem sua persistência e disseminação no ambiente, bem como seu potencial de causar infecções oportunistas (Chakrabarti e Sood 2021; Opulente *et al.*, 2019; Kurtzman *et al.*, 2011).

O estudo da biodiversidade e das adaptações de leveduras patogênicas em diferentes habitats é essencial, considerando sua capacidade de apresentar plasticidade fenotípica e se adaptar a condições extremas, como variações de salinidade, temperatura, oxigenação e pH (Caicedo-Bejarano *et al.*, 2023; Costa *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2022; Maciel *et al.*, 2019; Bastos *et al.*, 2018).

Para sobreviver a múltiplos estresses ambientais, os microrganismos utilizam estratégias adaptativas que incluem a modulação de características como a termotolerância como também a resistência a antifúngicos, tornando desta forma, possível a persistência em diversos nichos ecológicos (Caicedo-Bejarano *et al.*, 2023; Arora *et al.*, 2021).

Entre os fungos emergentes de maior relevância está a espécie *Candidozyma auris*, identificada na década de 2009 como um patógeno multirresistente. Um aspecto surpreendente sobre essa espécie é o aparecimento quase simultâneo, mas independente, de clados geneticamente distintos em diferentes continentes (Chow *et al.*, 2018; Du *et al.*, 2020; Černáková *et al.*, 2021).

O surgimento simultâneo de diferentes clados de *Candidozyma auris* foi hipoteticamente relacionado às mudanças climáticas, sendo sugerido como o primeiro patógeno fúngico a evoluir em resposta direta a esse fenômeno (Casadevall *et al.*, 2019). Essa hipótese propõe que o aumento das temperaturas globais poderia ter selecionado variantes termotolerantes de *C. auris*, facilitando sua emergência como patógeno humano em regiões distintas.

Contudo, a relação causal exata entre as mudanças climáticas e o surgimento dos clados ainda não está totalmente elucidada, necessitando de estudos adicionais. No mesmo clado filogenético de *C. auris* estão as leveduras do complexo *Candida haemuli* (*C. duobushaemuli*, *C. pseudohaemuli* e *C. vulturna*) que compartilham características associadas à patogenicidade, como termotolerância, adesão, formação de biofilme, troca fenotípica e resistência a múltiplos antifúngicos (Arora *et al.*, 2021).

A relevância dessas espécies vai além do contexto clínico. *Candidozyma haemuli* foi

inicialmente isolada em 1962 da água do mar no Oceano Atlântico e dos intestinos do peixe *Haemulon sciurus*, o que sugere uma origem ambiental e explica sua alta tolerância à salinidade (Van e Kolipinski, 1962). Embora sua origem marinha tenha sido descrita inicialmente, o potencial patogênico emergente de *C. haemuli* foi reconhecido em 1984, com o primeiro isolamento clínico no sangue de um paciente com insuficiência renal (Lavarde, 1984).

Desde então, a incidência dessa espécie tem aumentado mundialmente, ressaltando sua crescente importância como patógeno oportunista e multirresistente (Françoiseid *et al.*, 2023; Gomez-Gaviria *et al.*, 2023).

A sobreposição de nichos ecológicos e clínicos destaca a necessidade de compreender como leveduras oportunistas se adaptam a diferentes habitats. Com o aquecimento global, desmatamento e destruição de ecossistemas, cria-se pressões ambientais e seletivas para que fungos continuem a emergir como agentes causadores de doenças (Nnadi e Carter, 2021; Hernandez e Martinez, 2018; Benedict e Park, 2014). Estudos já demonstram que fungos podem se adaptar gradualmente ao aumento da temperatura, levando a um aumento de espécies fúngicas novas, incomuns ou adaptadas (Nnadi e Carter, 2021; Casadevall, 2020; De Crecy *et al.*, 2009).

Portanto, nesta dissertação serão analisadas espécies isoladas de diferentes nichos ecológicos pertencentes ao gênero *Candidozyma*. O objetivo é compreender aspectos relacionados à virulência, resistência a antifúngicos e fatores ecológicos dos isolados estudados. Esse gênero é particularmente relevante devido à resistência intrínseca a múltiplos antifúngicos, como a classe de azóis e polienos, apresentada por alguns isolados das espécies, como *C. auris* e *C. haemuli*.

Assim, investigar as características desses isolados pode ajudar a compreender como pressões ambientais podem afetar a evolução de novas características, incluindo a virulência e a resistência antifúngica em isolados da mesma espécie.

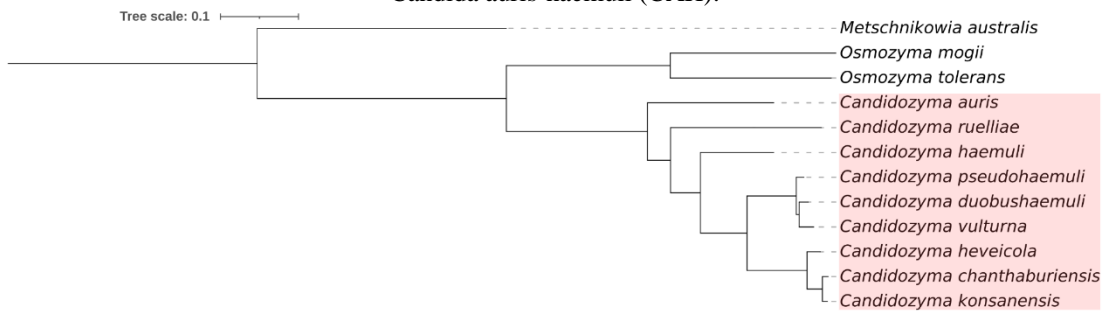
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leveduras oportunistas: Complexo haemuli-auris

O gênero *Candidozyma* foi proposto por Liu *et al.*, (2024) para abrigar as espécies do clado *Candida auris-haemuli* (CAH) em *Metschnikowiaceae*. Esse gênero é membro do clado *Clavispora*, pertencente à família *Metschnikowiaceae* e à ordem *Saccharomycetales* (Figura 1). O clado contém espécies clínicas multirresistentes, como *C. auris*, *C. haemuli*, *C.*

duobushaemuli e *C. vulturna*, também apresenta espécies isoladas de ambientes naturais, como *C. heveicola*, *C. ruelliae*, *C. chanthaburiensis* e *C. konsanensis*. Duas principais características desse gênero é a capacidade de crescer e se desenvolver em altas temperaturas (> 40°C) e a resistência intrínseca a diferentes classes de antifúngicos (Liu *et al.*, 2024).

Figura 1- Árvore filogenética com isolados do gênero *Candidozyma*. Filogenia de máxima verossimilhança usando 2.226 genes ortólogos principais com base em 1000 réplicas, entre 12 conjuntos de genomas anotados da ordem Saccharomycetales, com *Metschnikowia australis*, como o grupo externo. Em vermelho espécies do clado *Candida auris-haemuli* (CAH).



Fonte: Própria (2025).

Desde o primeiro isolamento clínico de *Candidozyma haemuli*, em 1984, a partir do sangue de um paciente (Lavarde *et al.*, 1984), e posteriormente isolamento da *C. auris*, em 2009, do canal auditivo de um paciente no Japão (Sato *et al.*, 2009), essas espécies têm atraído a atenção em todo o mundo, principalmente, devido à sua multirresistência, incluindo antifúngicos azólicos e polienos (Ben-Ami *et al.*, 2017; Hou *et al.*, 2016).

Essas duas espécies possuem características fenotípicas e genotípicas similares (Liu *et al.*, 2024; Chowdhary *et al.*, 2013), tornando necessário o uso de métodos moleculares específicos para a identificação correta, sendo, portanto, um desafio para o diagnóstico e tratamento (Lockhart *et al.*, 2017).

Em um estudo realizado por Francisco *et al.*, (2023) foi observada uma ampla variação geográfica nas taxas de prevalência das espécies do clado *Candidozyma haemuli-auris* no mundo. Assim, de acordo com os levantamentos epidemiológicos e estudos de diversidade fúngica, o Brasil concentra a maior prevalência de isolados de *C. haemuli* entre os países avaliados, destacando-se como um ponto focal na distribuição global desta espécie (Francisco *et al.*, 2023; Lima *et al.*, 2020).

Diante desse contexto, a emergência do complexo CAH, como agentes causadores de doenças oportunistas, tem exposto a necessidade de aumentar nosso conhecimento sobre aspectos relacionados à sua biologia, virulência e patogênese, suscetibilidade antifúngica, interação com o hospedeiro e a correta identificação desses microrganismos (Amorim *et al.*,

2023; Ramos *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2015).

2.1.1 *Candidozyma auris*

Candidozyma auris é uma levedura oportunista com inúmeros fatores de virulência associados a padrões de resistência a diferentes classes de medicamentos antifúngicos, utilizados na clínica para tratar infecções fúngicas (Sikora *et al.*, 2023). A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu as infecções causadas por *C. auris* como um problema crítico de saúde pública, destacando sua inclusão na lista de prioridade global devido à sua resistência a medicamentos e ao impacto associado a altas taxas de mortalidade em pacientes vulneráveis (WHO, 2022).

Seus fatores de virulência estão relacionados à formação de biofilme, secreção de enzimas, aquisição de ferro baseada em sideróforos, formação de agregados multicelulares, invasão de tecidos, sistema de histidina quinase e vias envolvidas na modelagem da parede celular, o que facilita a evasão do sistema imune (Bing *et al.*, 2024; Gómez-Gaviria *et al.*, 2023; Chowdhary *et al.*, 2017).

O nicho ecológico de *C. auris* ainda não foi totalmente elucidado. Arora *et al.*, (2021) propuseram a hipótese de que *C. auris* pode ser originária de ambientes pantanosos, e que fatores como o aquecimento global, aliados à altos níveis de salinidade, podem ter contribuído para seu surgimento como um patógeno humano.

Esse cenário sugere que, antes de ser reconhecida como um patógeno, provavelmente existia como um fungo ambiental (Casadevall *et al.*, 2019; Jackson *et al.*, 2019; Welsh *et al.*, 2017). Nesse contexto, embora existam indícios que apontem para a possibilidade de *C. auris* possuir reservatórios ambientais, zoonóticos ou alimentares, o ambiente clínico e humano permanece como o mais amplamente descrito e compreendido em relação aos seus mecanismos de transporte, transmissão e dispersão (Santana *et al.*, 2024; Arora *et al.*, 2021).

Contudo, em contraste com os ambientes clínicos, o papel de *C. auris* no ambiente natural ainda não foi totalmente explorado. Entender sua capacidade evolutiva é crucial para determinar se essa espécie possui características intrínsecas de resistência e fatores de virulência ou se essas adaptações surgiram ao longo do tempo (Yadav *et al.*, 2023; Escandón *et al.*, 2022; Jackson *et al.*, 2019).

Logo após sua identificação no Japão, *C. auris* foi isolada em diferentes países, e atualmente existem seis clados geográficos distintos da espécie: sul da Ásia, leste da Ásia, sul-africano, sul-americano, Iraniano (Chow *et al.*, 2019) e Singapura (Suphavitai *et al.*, 2024).

Esses clados foram reconhecidos com base em análises de dados de sequenciamento do genoma completo (WGS) e variação de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), as espécies alocadas em cada clado diferenciam entre si pela grande diferença de SNPs (Spruijtenburg *et al.*, 2022).

As diferenças genéticas entre os clados sugerem que *C. auris* surgiu independentemente nas localizações geográficas mencionadas, além de que, esses clados possuem também diferenças fenotípicas como, perfis de suscetibilidade antifúngica, potencial de epidemia e manifestações clínicas (Santana *et al.*, 2024; Chow *et al.*, 2020; Vila *et al.*, 2020; Forgács *et al.*, 2020; Chow *et al.*, 2018; Welsh *et al.*, 2019; Kwon *et al.*, 2019; Szekely *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2020; Haq *et al.*, 2023; Müller *et al.*, 2020; Brandt *et al.*, 2023).

A suscetibilidade antifúngica de leveduras está associada a mutações adquiridas e específicas de genes que codificam alvos de drogas e reguladores de efluxo, como *ERG11*, *MDR1* e *CDR1* (Rybak *et al.*, 2022). Isolados pan-resistentes de *C. auris* têm mostrado a capacidade de se espalhar em ambientes hospitalares e de se disseminar entre indivíduos. Além disso, a resistência pode ser intensificada após a exposição à terapia antifúngica, reduzindo ainda mais as opções de tratamento disponíveis (Santana *et al.*, 2024; Lyman *et al.*, 2021).

2.1.2 Complexo *Candidozyma haemuli* (*C. haemuli*, *C. duobushaemuli*, *C. pseudoheamuli* e *C. vulturna*)

O complexo *C. auris-haemuli* compreende os patógenos humanos oportunistas *C. haemuli sensu stricto*, *C. duobushaemuli* e *C. haemuli var. vulnera*; espécies filogeneticamente relacionadas que frequentemente são incluídas como parte do complexo, como *C. auris*, *C. pseudoheamuli* e *C. vulturna* (Liu *et al.*, 2024), devido à apresentação de características fenotípicas e genotípicas semelhantes (Cendejas-Bueno *et al.*, 2012).

Elas são leveduras ascomicetas, que foram isoladas principalmente de amostras clínicas humanas. Essas espécies estão frequentemente associadas à resistência a diferentes classes de antifúngicos, principalmente azóis, além de apresentarem alta mortalidade em pacientes, relacionada ao atraso no início de um tratamento antifúngico adequado (Pharkjaksu *et al.*, 2021; Garey *et al.*, 2006).

A espécie *C. haemuli* é um patógeno oportunista frequentemente identificado como agente causador de fungemia associado a cateter, infecções nosocomiais, lesões profundas e cutâneas em pacientes com comorbidade. A epidemiologia de *C. haemuli* demonstra uma prevalência global baixa, mas com relatos crescentes de surtos nosocomiais e aumento em certas regiões. De acordo com Francisco *et al.*, (2023) em um estudo de dados do programa

global de vigilância antifúngica (ARTEMIS), indicaram que *C. haemuli* representa menos de 0,01% de *Candida* spp. isoladas de centros médicos ao longo de 10 anos em 41 países.

Além disso, ressalta-se que no Brasil, há uma prevalência desta espécie em centros médicos, passando de 0,9% de isolados presentes em centros médicos (Francisco *et al.*, 2023). Recentemente esta levedura foi descrita também como patógeno causando dermatite uma serpente selvagem *Boa constrictor* no município de Salvador, estado da Bahia, Brasil, próximo a um fragmento de Mata Atlântica (Fonseca *et al.*, 2023; Pharkjaksu *et al.*, 2021).

Esta espécie apresenta resistência intrínseca ao fluconazol e à anfotericina B (Huang *et al.*, 2024; Ramos *et al.*, 2020) e alguns isolados clínicos apresentam resistência terbinafina e equinocandias (Silva *et al.*, 2023; Oberoi *et al.*, 2012). Além disso, foi mostrado que *C. haemuli* possui glicoconjugados contendo glicose e manose que estão presentes em sua superfície celular. Esses componentes contribuem para a virulência da espécie, auxiliando na evasão das respostas imunes do hospedeiro (Ramos *et al.*, 2020; Lima *et al.*, 2020; Mora-Montes *et al.*, 2009).

Candidozyma duobushaemuli foi inicialmente classificada como *Candidozyma haemuli*, devido à sua estreita relação filogenética, características fenotípicas, bem como perfis de MALDI-TOF MS e AFLP, frequentemente dificultavam a distinção entre as duas espécies (Cendejas-Bueno *et al.*, 2012).

No entanto, em 2012, Cendejas-Bueno *et al.*, reclassificaram essa espécie, com base no sequenciamento de regiões conservadas, que revelou níveis de similaridade de 89,04% para ITS, 90,93% para D1/D2, 86,77% para RPB1 e 87,43% para RPB2 em comparação com *C. haemuli*. Como as demais espécies do clado, esta levedura pode apresentar um perfil de multirresistência, que inclui MICs altos para anfotericina B e azóis, como fluconazol e itraconazol (Frías-de-león *et al.*, 2019; Ramos *et al.*, 2018).

Além de causar infecções superficiais e invasivas em humanos (Ramos *et al.*, 2015; Hou *et al.*, 2016; Ramos *et al.*, 2022). A prevalência exata de *C. duobushaemuli* ainda é desconhecida; contudo, sua ocorrência como agente causador de infecções é considerada rara (Francisco *et al.*, 2023; Rodrigues *et al.*, 2021).

Candidozyma pseudohaemuli também é reconhecida como causadora de infecções sistêmicas e pode ser diferenciada das outras espécies do complexo com base em seu padrão de assimilação de carboidratos, incluindo esculina, melezitose, L-ramnose, trealose e glicerol. Essa espécie foi descrita na Tailândia a partir de casos clínicos, isolados de sangue de pacientes e seu nicho ecológico ainda não está definido (Sugita *et al.*, 2006).

Esta espécie é frequentemente relatada como resistentes a anfotericina B e agentes

azólicos, como fluconazol e itraconazol. Poucos relatos de infecção foram descritos em relação a *C. pseudohaemuli* desde sua descrição (Cendejas-Bueno *et al.*, 2012). Outra integrante desse complexo é *Candidozyma vulturna*, inicialmente isolada de flores não identificadas em cinco locais nos arredores da cidade de Cagayan de Oro, Ilha Mindanao, Filipinas. (Sipiczki *et al.*, 2016).

No entanto, essa espécie também foi associada a casos de candidemia (Navarro-Muñoz *et al.*, 2019; Gade *et al.*, 2020; Muthusamy *et al.*, 2022). Embora as infecções causadas por estas espécies sejam raras, elas possuem importância clínica devido à sua capacidade de formar biofilmes e sua resistência aos azóis e à anfotericina B (Oh *et al.*, 2011; Sugita *et al.*, 2006).

As infecções causadas por espécies de leveduras não *C. albicans*, como as integrantes do complexo *Candidozyma haemuli*, têm ganhado relevância clínica devido à sua resistência intrínseca e adquirida a múltiplas classes de antifúngicos, incluindo anfotericina B, azóis e equinocandinas.

A capacidade dessas espécies de formar biofilmes, associada à presença de glicoconjugados específicos na superfície celular, como os de *C. haemuli*, contribui para sua virulência e evasão imunológica. Além disso, as alterações fenotípicas e genotípicas dessas leveduras permitem uma adaptação notável a diferentes ambientes, incluindo o meio hospedeiro, o que reforça sua ameaça como patógenos oportunistas.

Dada sua ampla distribuição em ambientes clínicos e ecológicos, como observado em *C. vulturna* e *C. haemuli*, a identificação precisa e o tratamento adequado dessas espécies são essenciais, especialmente devido à sua resistência relatada a diversas classes de antifúngicos.

2.1.3 Nova espécie de interesse clínico do gênero *Candidozyma* – *Candidozyma khabhai*

De Jong *et al.*, (2023) descreveram uma nova espécie clinicamente relevante dentro do complexo *C. auris-haemuli*, isolada de pacientes idosos no Kuwait e na Malásia. Apesar de serem geograficamente distintas, as linhagens pertencem à mesma espécie.

Os testes de suscetibilidade antifúngica revelaram uma sensibilidade reduzida aos azóis, e à anfotericina B. Além disso, os autores mostraram que sistemas de identificação bioquímica padrão, como MALDI-TOF MS, VITEK 2 e API 20C AUX, identificaram erroneamente essa nova espécie como *Candidozyma pseudohaemulonii*, *Candidozyma duobushaemulonii* e *Candidozyma lusitaniae*, respectivamente.

Enquanto no meio de cultura CHROMagar *Candida* Plus (CCP) observaram-se que *C. auris* e a nova espécie *C. khabhai* apresentam exatamente o mesmo fenótipo, indicando que

infecções futuras por *C. khanbhai* podem ser identificadas erroneamente (de Jong *et al.*, 2023). Diante disso, torna-se essencial a identificação dessas espécies por meio do sequenciamento de regiões conservadas, como ITS e D1/D2, para garantir maior precisão e evitar erros de diagnóstico.

A descoberta de *C. khanbhai* ressalta a necessidade de aprimoramento nas metodologias diagnósticas para espécies emergentes dentro do complexo *C. auris-haemuli*. A identificação incorreta pode levar a tratamentos ineficazes, agravando o quadro clínico dos pacientes, especialmente em grupos vulneráveis, como imunocompetentes.

Além disso, a resistência intrínseca aos azóis e à anfotericina B reforça a urgência de implementar estratégias terapêuticas específicas e medidas de vigilância epidemiológica. A adoção de técnicas baseadas em sequenciamento, como sugerido por de Jong *et al.*, (2023), é crucial para garantir um diagnóstico mais preciso e para diferenciar *C. khanbhai* de outras espécies filogeneticamente próximas, como *C. pseudohaemulonii* e *C. auris*. Essa abordagem não apenas melhora a conduta clínica, mas também contribui para o entendimento da distribuição e do impacto dessas espécies no contexto global.

2.1.4 Isolados Ambientais do gênero *Candidozyma*

Candidozyma ruelliae é uma levedura isolada, em 2008, de flores da espécie *Ruellia*, pertencente à família Acanthaceae, na região de Rawatbhata, Índia. Embora esteja relacionada ao complexo *C. haemuli*, essa espécie apresenta uma divergência de 14% na sequência de nucleotídeos em relação às demais espécies do complexo. *C. ruelliae* é suscetível ao fluconazol, mas resistente a anfotericina B (Saluja *et al.*, 2008).

Já *C. chanthaburiensis* foi isolada da casca submersa de *Rhizophora apiculata* em decomposição, coletada em uma floresta de manguezal na província de Chanthaburi, Tailândia (Limtong *et al.*, 2010). No entanto, até o momento, não foram realizadas pesquisas sobre a susceptibilidade desta espécie a antifúngicos, tampouco avaliações de seus fatores de virulência.

Candidozyma konsanensis, destaca-se por seu alto potencial biotecnológico, especialmente devido à sua elevada eficiência na produção de carboximetilcelulase. Essa espécie foi isolada pela primeira vez de flores de *J. adenophyllum* em Konsan, Tailândia (Sarawan *et al.*, 2013). *Candidozyma heveicola* foi isolada pela primeira vez da seiva de uma seringueira (*Hevea brasiliensis*) na província de Yunnan, no sudoeste da China em 2008, sendo esta, próxima as espécies *C. konsanensis* e *C. chanthaburiensis* (Wang *et al.*, 2008). Apesar das

espécies *C. heveicola* e *C. kansasensis* apresentarem crescimento a 37°C, não foram realizadas avaliações adicionais sobre suas características de resistência e fatores de virulência.

Candidozyma ohialehuae e *Candidozyma metrosideri* foram isoladas pela primeira vez em 2013 no Parque Nacional dos Vulcões do Havaí (HI, EUA), a partir de flores de *Metrosideros polymorpha* (*Myrtaceae*). Devido à sua relação com o clado *haemuli-auris*, os valores de CIMs dessas espécies foram investigados, revelando CIMs elevadas para anfotericina B para ambos isolados (>4 µg/mL).

Apesar da resistência a polienos, essas espécies não apresentaram crescimento a 37 °C nem atividade hemolítica. Contudo, os autores ressaltam o potencial dessas espécies como agentes oportunistas no futuro, considerando que o micro-habitat onde foram isoladas está sujeito a grandes variações ambientais e climáticas. Filogeneticamente, *C. metrosideri* se agrupa com *C. duobushaemuli*, *C. vulturna* e *C. pseudohaemuli*, enquanto *C. ohialehuae* forma um clado irmão bem suportado com *C. kansasensis* (Klaps *et al.*, 2020).

Dado a isso, torna-se fundamental investigar como a variação de substratos e como mudanças ambientais podem influenciar diretamente sua capacidade metabólica e adaptativa. Além disso, essas mudanças podem favorecer o surgimento de fenótipos adaptativos, permitindo que a espécie colonize novos nichos ou responda melhor a pressões ambientais (Opulente *et al.*, 2019).

2.2 Resistência antifúngica: uma ameaça emergente à saúde

Em contraste, é importante salientar que o arsenal terapêutico para infecções fúngicas invasivas é resumido em quatro classes, sendo polienos, azóis, equinocandinas e o análogo de pirimidina 5-flucitosina (Lee *et al.*, 2023; Fisher *et al.*, 2022). Sendo uma preocupação mundial, com espécies emergentes que são resistentes a vários antifúngicos, como por exemplo, *Candidozyma auris*.

Em geral, a resistência antifúngica adquirida é uma resposta evolutiva à pressão seletiva exercida pelo medicamento que afeta a interação entre fármaco e alvo (Fisher *et al.*, 2022; Ben-Ami *et al.*, 2021; Berman *et al.*, 2020). Desse modo, a compreensão da resistência fúngica tem sido objeto de pesquisa nos últimos anos, podendo ser intrínsecas e adquiridas (Ben-Ami *et al.*, 2021).

A resistência intrínseca pode ser denominada como uma característica genética, ou seja, a levedura é naturalmente resistente ao antifúngico, que independe de ter sido exposta anteriormente a alguma classe de fármacos. Como relatado, a espécie *C. ohialehuae* apresenta

resistência intrínseca a anfotericina B, sendo isolada apenas do meio ambiente sem relato de resistência cruzada com agroquímicos (Klaps *et al.*, 2020). Enquanto a resistência adquirida, se desenvolve como a exposição a determinado estresse, seja ele ao medicamento ou à um análogo estrutural (Berman *et al.*, 2020).

Além disso, estudos demonstram o impacto do uso agrícola de azóis na emergência de resistência a antifúngicos clínicos em leveduras, sugerindo uma rota alternativa e ambiental de desenvolvimento de resistência, além da via tradicional associada aos pacientes (Castelo-Branco *et al.*, 2022; Bastos *et al.*, 2021; Bastos *et al.*, 2018; Snelders *et al.*, 2008). É importante destacar que o uso de fungicidas não se limita às plantações, mas também é amplamente empregado nas indústrias hortícola e madeireira (Jorgensen *et al.*, 2021).

Produtos químicos utilizados de forma inadequada, especialmente aqueles com longa meia-vida, podem se acumular no solo e ser transportados para cursos de água e efluentes, dispersando moléculas de fungicidas em diferentes nichos ecológicos. Esse cenário, torna-se preocupante, devido a onipresença dos fungos e sua capacidade de adaptarem a diferentes compostos químicos (Sem *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2015).

Nesse contexto, a resistência a antifúngicos retrata um desafio à saúde pública global, exigindo uma abordagem integrada e multidisciplinar para o seu enfrentamento. A compreensão dos mecanismos genéticos e adaptativos que conferem resistência, tanto intrínseca quanto adquirida, é essencial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

Além disso, é imperativo regulamentar e monitorar o uso de fungicidas em ambientes agrícolas e industriais para mitigar o impacto ambiental e o surgimento de cepas resistentes. O avanço de pesquisas nesse campo, aliado a políticas públicas eficazes, poderá reduzir a disseminação de fungos resistentes e preservar a eficácia dos antifúngicos existentes, assegurando melhores desfechos clínicos e proteção ambiental.

2.2.1 Fungicidas agrícolas: resistência cruzada em azóis

Fungicidas são compostos químicos utilizados na agricultura para controlar e prevenir doenças fúngicas nas colheitas de alimentos, campos de flores e tratamento de madeira. Os azóis são a maior classe licenciada de fungicidas, com mais de 30 compostos liberados para a utilização em diferentes culturas agrícolas (Pimentão *et al.*, 2024). O alvo dessa classe é 14 α -desmetilase, que ao inibir ocorre a depleção de ergosterol necessária para o desenvolvimento fúngico e o acúmulo de esteróis com propriedades desfavoráveis (Robbins *et al.*, 2017).

Como azóis clínicos e agrícolas compartilham o mesmo mecanismo de ação e têm

estruturas semelhantes, podem desencadear resistência cruzada em leveduras (Bastos *et al.*, 2018; Faria-Ramos *et al.*, 2014; Müller *et al.*, 2007).

Aspergillus fumigatus é uma espécie de fungo que foi amplamente estudado em relação à resistência cruzada (Verweij *et al.*, 2013). Com a crescente emergência de infecções causadas por *A. fumigatus* a partir de 2010, pesquisadores sugerem que pelo menos dois terços dos pacientes com infecções resistentes a azóis nunca foram expostos a terapias medicamentosas com esses compostos, reforçando a hipótese de uma via ambiental para a aquisição da resistência nessa espécie (Snelders *et al.*, 2009; Berger *et al.*, 2017; Chowdhary *et al.*, 2013).

A exposição de fungos da família *Aspergillus* a pesticidas azólicos agrícolas é amplamente documentada como uma possível fonte para aquisição dessas mutações no gene CYP51 (Allizond *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2020; Cao *et al.*, 2020). A resistência cruzada aos azóis desenvolve-se rapidamente devido à similaridade em seus mecanismos de ação, independentemente das diferenças em suas estruturas químicas (Gisi *et al.*, 2014).

Além disso, Bastos *et al.*, (2017) avaliaram cepas de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* expostas ao fungicida tebuconazol, concluindo que essa exposição pode induzir resistência cruzada ao fluconazol, itraconazol e ravuconazol. De forma complementar, Drakulovski *et al.*, (2023) demonstraram que a pré-exposição de *Cryptococcus* a pesticidas azólicos favorece o surgimento de colônias resistentes ao fluconazol (FLC), com proporções variando entre 3,3% e 10%, significativamente superiores às observadas em pacientes com cepas resistentes no início do tratamento com FLC. Essa resistência tem sido associada a mutações no gene *ERG11*, que resultam em substituições de aminoácidos, além da supressão de genes que codificam bombas de efluxo, como *MDR1* (Bosco *et al.*, 2016; Chang *et al.*, 2018).

Portanto, diversos estudos demonstram que o uso de azóis na agricultura influenciam em comunidades microbianas e também nas populações de leveduras clinicamente importantes. Uma vez que pesquisas demonstram isolados ambientais resistentes a azóis, possivelmente estão associados ao uso de agroquímicos (Castelo-Branco *et al.*, 2021; Bastos *et al.*, 2020; Bastos *et al.*, 2018; Medeiros *et al.*, 2008).

Ademais, animais que têm contato direto ou indireto com microrganismos resistentes do ambiente podem contribuir para sua replicação e disseminação, principalmente aqueles com hábitos migratórios como vetores biológicos e/ou mecânicos, como por exemplo aves (Glushakova *et al.*, 2024; Talazadeh *et al.*, 2022; Cafarchia *et al.*, 2006). Por isso, torna-se necessário pesquisas sobre o ciclo de resistência a azóis e explorar nichos ecológicos de leveduras emergentes, incluindo cepas do gênero *Candidozyma*.

2.2.2 Mecanismo de ação: azóis

Antifúngicos azólicos são os primeiros fármacos escolhidos para o tratamento de micoses causadas por fungos patogênicos. Como mencionado, o mecanismo de ação dos antifúngicos azóis envolve a inibição da enzima lanosterol 14- α -demetilase codificada pelo gene *ERG11*, atuando no bloqueio da via de síntese do ergosterol (Logan *et al.*, 2022; Chowdhary *et al.*, 2018).

A resistência a essa classe, pode ocorrer por dois tipos de mecanismos principais, sendo, a expressão de bombas de efluxos e por mutações no gene *ERG11* (Ben-Ami *et al.*, 2021; Chatterjee *et al.*, 2015; Kean *et al.*, 2018). Os azóis clinicamente mais utilizados incluem fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol e têm principalmente atividade fungistática contra leveduras, como espécies de *Candida*, *Candidozyma* e *Cryptococcus* (Fisher *et al.*, 2023).

As bombas de efluxo são mecanismos reduzem o acúmulo de fármacos intracelulares, expulsando para fora da célula (Prasad *et al.* 2016). Dessa forma, existem dois tipos principais de bombas de efluxo as bombas transportadoras de cassete de ligação de ATP (ABC), que são expressas e codificadas pelos genes *CDR1* e *CDR2* (Cannon *et al.*, 2009).

O gene que atua na ativação transcricional desses genes é o *TAC1*, desempenhando um papel crucial na regulação da resistência aos antifúngicos ao aumentar a expressão dos transportadores ABC (Holmes *et al.*, 2008). Outra família de bomba de efluxo, é a superfamília de facilitadores principais (*MFS*) codificadas pelos genes *MDR1* e *FLU1* (Pata *et al.*, 2024; Robbins *et al.*, 2017).

As mutações no *ERG11* por meio de substituições de aminoácidos, têm o potencial de produzir uma lanosterol 14 α -desmetilase mutada que tem afinidade de ligação azólica reduzida. Esses mecanismos não ocorrem isoladamente, mas, em vez disso, muitas vezes contribuem coletivamente para a resistência aos fármacos de isolados clínicos (Lee *et al.*, 2023; Logan *et al.*, 2022; Berman *et al.*, 2020).

A alteração na expressão gênica das enzimas envolvidas na síntese de ergosterol, possuem a função de sintetizar esteróis tóxicos que se acumulam na levedura quando ele é exposto a azóis e contribui com à diminuição da afinidade entre o azol e a enzima que atua como alvo farmacológico (Cárdenas Parra *et al.*, 2024; Paul *et al.*, 2018).

Estudos genéticos e funcionais desses genes em leveduras oportunistas e ambientais, como as pertencentes aos gêneros *Candida* e *Candidozyma*, revelam mutações em *ERG11* e a superexpressão de genes como *TAC1*, *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* e *FLU1* contribuem para a

sobrevivência em ambientes com alta pressão seletiva de antifúngicos. Além disso, investigar essas adaptações em isolados ambientais expostos a azóis pode esclarecer a origem e disseminação da resistência clínica, reforçando a necessidade de vigilância molecular e estratégias para mitigar a resistência antifúngica em diferentes nichos ecológicos.

2.2.3 Mecanismo de ação: polienos

Os polienos têm como alvo um componente importante da membrana celular em vez de uma enzima essencial (Karunarathna *et al.*, 2024). Existem cerca de seis antifúngicos poliênicos para terapia antifúngica: Anfotericina B, nistatina, natamicina, candicidina, tricomicina e metil partricina. No entanto, apenas três polienos permanecem em uso terapêutico atualmente, sendo, anfotericina B para micoses sistêmicas e graves, nistatina para infecções de mucosa, como candidíase oral e vaginal e natamicina para infecções oculares (Carolus *et al.*, 2020; Stone *et al.*, 2016).

O mecanismo de ação dos antifúngicos poliênicos envolve a alteração da permeabilidade da membrana celular fúngica, ao se ligarem ao ergosterol e formarem canais iônicos. Essa interação leva à perda de prótons e cátions monovalentes, causando despolarização da membrana e, conseqüentemente, a morte celular devido ao desequilíbrio osmótico e perda de conteúdo intracelular (Logan *et al.*, 2022; Anderson *et al.*, 2014).

Embora a resistência a poliênicos seja rara, ela já foi relatada em *Candida albicans* (Sterling *et al.*, 1998). Os principais mecanismos incluem mutações pontuais em genes como *ERG3* e *ERG2*, que codificam enzimas da via de síntese de esteróis, e a regulação positiva de genes como *ERG5*, *ERG6* e *ERG25*, resultando em alterações na composição de esteróis da membrana que reduzem a afinidade dos poliênicos ao ergosterol (Geber *et al.*, 1995; O'Shaughnessy *et al.*, 2009; Ahmady *et al.*, 2024).

A anfotericina B é o único antifúngico de ação sistêmica e o medicamento mais potente disponível para o tratamento de candidíase invasiva e que a resistência adquirida é raramente conhecida em leveduras (Karunarathna *et al.*, 2024). No entanto, anfotericina B não é a primeira classe de antifúngicos utilizadas na clínica para infecções fúngicas, devido a sua alta toxicidade (Laniado-Laborín e Cabrales-Vargas, 2009). Além disso, é importante salientar que isolados do complexo *C. haemuli* são conhecidos por sua resistência intrínseca a AmB, por possuir um perfil de esterol alterado (Silva *et al.*, 2020; Lima *et al.*, 2020).

2.2.4 Mecanismo de ação: equinocandinas

Micafungina, caspofungina e anidulafungina são representantes da classe equinocandinas, que inibem de forma não competitiva a enzima a 1,3- β -D-glucano sintase, causando uma diminuição na síntese de 1,3- β -D-glucano, um componente essencial na parede celular fúngica, que leva à lise osmótica (Logan *et al.*, 2022).

Além de ser um componente importante da estrutura da parede celular fúngica, o β -(1,3)-d-glucano não é encontrado em células de mamíferos, portanto sua síntese é um bom alvo para antifúngicos, diminuindo efeitos colaterais graves (Szymański *et al.*, 2022). Desse modo, essa classe é utilizada como primeira linha no tratamento para candidíase e aspergilose invasiva, tendo poucos relatos de resistência (Wall e Lopez-Ribot, 2020).

Outro fator de suma relevância, é que esse fármaco pode levar a resistência cruzada a polienos e azóis, uma vez que têm em vista, o ergosterol da membrana e a síntese de esteróis, respectivamente (Hull *et al.*, 2012).

Diante desse contexto, a diminuição da suscetibilidade à equinocandina ocorre com mutações no gene *FKS*, que conferem sensibilidade diminuída a enzima glucana sintase (Ben-Ami *et al.*, 2021).

Assim, mutações que determinam a resistência antifúngica estão localizadas em regiões altamente conservadas dos genes *Fks* da glucana sintase, essas mutações de aminoácidos são pontuais em regiões quentes (HS) e codifica aminoácidos nas posições 641–649 e 1345–1365 (Szymański *et al.*, 2020).

Outro mecanismo de resistência descrito, é a exposição prolongada à equinocandina leva ao estresse da parede celular inibindo a β -glucano sintase, com ativação indireta das vias calcineurina ou *HSP90*, que estão envolvidas na tolerância a medicamentos (Fisher *et al.*, 2023).

2.2.5 Mecanismo de ação: 5-flucitosina

Por fim, o quarto grupo de antifúngicos inclui o análogo de pirimidina flucitosina. Embora eficaz, sua utilização como monoterapia não é recomendada, sendo mais apropriado em combinação com outras classes de antifúngicos, como a anfotericina B (Delma *et al.*, 2021; Vermes *et al.*, 2000).

Isso se deve ao fato de que, quando usados isoladamente no tratamento de candidíase invasiva, há uma alta probabilidade de desenvolvimento de resistência por parte das espécies de *Candida* (Arendrup e Patterson, 2017). O fármaco é absorvido pela célula e convertido em

sua forma ativa 5-fluorouracil (5FU), o qual é metabolizado e convertido em 5-fluorouridina trifosfato. Esse produto é incorporado ao RNA fúngico e substitui o ácido uridílico no RNA fúngico, inibindo assim a síntese de proteínas e lavando a morte celular (Sigera *et al.*, 2023). Ademais, pode ocorrer a conversão de 5-fluorouracil em monofosfato bloqueando a ação da timidilato sintase, inibindo a síntese de DNA fúngico (Vermes *et al.*, 2000).

A resistência à flucitosina, embora rara, já foi associada a mecanismos bem caracterizados. Mutações nos genes que codificam a citosina desaminase (*FCY1*), responsável por converter 5-fluorocitosina (5FC) em 5-fluorouracila (5FU); a purina-citosina permease (*FCY2*), proteína de membrana que regula a entrada do fármaco na célula; e a uracil fosforibosiltransferase, uma enzima codificada pelos genes *FURI* uma imitação da conversão de 5-5FC em 5-fluorouridina monofosfato (5-FUMP) devido à deficiência da enzima uracil fosforibosiltransferase, sendo descritas como os principais fatores de resistência ao fármaco (Sigera *et al.*, 2023).

Desse modo, isolados hospitalares de *Candida duobushaemulonis* na China já foram descritos com concentrações inibitórias mínimas (CIM) elevadas para 5-flucitosina (≥ 64 $\mu\text{g/mL}$), atribuídas a mutações no códon de iniciação (ATG \rightarrow ATA) do gene *FURI* (Chen *et al.*, 2022).

2.3 Outros Mecanismos de Resistência

A resistência a antifúngicos em leveduras tem sido amplamente estudada através do sequenciamento do genoma completo (WGS). Nesse contexto, além dos genes já descritos, o *EFG1* (crescimento filamentosso aprimorado) e *BCR1* (regulador de biofilme e parede celular) destacam-se como um fator de transcrição envolvido em redes regulatórias essenciais para a formação de biofilmes, o que representa uma fonte significativa de infecções associadas a dispositivos médicos (Mancera *et al.*, 2021; Nobile *et al.*, 2012).

A formação do biofilme envolve várias etapas, que vão desde a adesão inicial das células à superfície, seguida pela adesão irreversível, síntese de matriz extracelular induzida por quorum sensing, maturação, e dispersão, resultando em comunidades altamente complexas e organizadas (Alonso *et al.*, 2023). Sendo um fator primordial para a tolerância a diferentes tipos de estresses, principalmente na ação dos antifúngicos.

Além disso, proteínas de superfície são fundamentais para leveduras se fixarem a células epiteliais, endoteliais e superfícies abióticas, sendo um dos principais fatores de adesão de leveduras oportunistas (Rodríguez-Cerdeira *et al.*, 2020). Assim, a família de proteínas

aglutininas (*ALSs*) codificam glicoproteínas adesivas á superfícies celulares, sendo fundamental para o processo de adesão (Razavi *et al.*, 2020).

Estas adesinas se ligam de forma específica as células ou superfícies do hospedeiro, e exibem funções de adesão e invasão celular (Valotteau *et al.*, 2019). Diante desse contexto, as proteínas *Als* possuem um domínio N-terminal semelhante à Ig, que lhes confere propriedades adesivas durante a fixação em superfícies. Além desse domínio, elas apresentam o domínio T, rico em treonina (Thr), que contém uma sequência formadora de amiloide essencial para desencadear a montagem de estruturas amiloides na parede celular sob condições específicas, favorecendo a formação de biofilmes (Mourer *et al.*, 2021).

Outro fator contribuinte, são as atividades proteolíticas da enzima aspartil proteinases secretadas (*SAPs*) que facilitam a fixação das leveduras, na formação de biofilme, invasão e degradação de células e proteínas do hospedeiro (Kulshrestha *et al.*, 2022; Kadry *et al.*, 2018). As *Saps* em biofilmes desempenham um papel crucial ao modificar as superfícies de células hospedeiras ou fúngicas, expondo proteínas mais propensas à adesão fúngica e atuando como ligantes celulares.

O sítio ativo da enzima, são reconhecidas por integrinas de células epiteliais orais. Esse reconhecimento facilita, por um lado, a adesão ao tecido hospedeiro, desencadeando a etapa inicial da formação do biofilme, e, por outro, a internalização da protease, resultando em apoptose proteolítica das células hospedeiras (Bras *et al.*, 2024; Tumbarello *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2013; Rajendran *et al.*, 2016).

3. JUSTIFICATIVA

Leveduras presentes na natureza estabelecem relações simbióticas com diversas espécies, especialmente plantas e frutos, com o objetivo de promover a homeostase do ecossistema (Peris *et al.*, 2023; Peay *et al.*, 2016). Nesse sentido, as leveduras possuem a capacidade de coexistir em comunidades complexas, compostas por diferentes tipos de células, e também mostram uma rápida capacidade de adaptação em resposta a pressões seletivas. Em ambientes clínicos e agrícolas, essas características podem conferir a elas a habilidade de desenvolver resistência contra agentes antifúngicos.

Infecções associadas ao complexo *haemuli-auris* têm sido reportadas principalmente em pacientes com condições como doenças vasculares, diabetes mellitus, úlceras crônicas e imunossupressão, representando um grave problema de saúde pública devido ao aumento da prevalência e resistência antifúngica (Gomez-Gaviria *et al.*, 2023; Pérez-Lazo *et al.*, 2021;

Reséndiz-Sánchez *et al.*, 2020; Guarana e Nucci, 2018). Apesar disso, a identificação precisa de espécies do gênero *Candidozyma* é dificultada pela ampla similaridade fenotípica, já que isolados da mesma espécie podem apresentar características semelhantes. Embora algumas espécies ambientais, como *Candidozyma heveicola* e *Candidozyma ruelliae*, não tenham sido associadas a infecções oportunistas na literatura, sua presença em ambientes frequentemente explorados por humanos levanta questões sobre o risco potencial de exposição.

Ademais, poucos estudos abordam as linhagens oportunistas provenientes de amostras ambientais, limitando o conhecimento sobre sua virulência. Muitos desses microrganismos são isolados de locais recreativos, onde mantêm contato direto com humanos saudáveis, imunossuprimidos e imunocompetentes, crianças e idosos, o que torna essencial investigar seu potencial patogênico e mecanismos de resistência. Assim, elucidar os fatores bioquímicos e fisiológicos das espécies do complexo *Candidozyma haemuli* isoladas de diferentes substratos é crucial para entender sua virulência e resistência, além de subsidiar o desenvolvimento de terapias eficazes contra esses fungos emergentes.

Diante desse contexto, o presente estudo teve o objetivo de explorar os aspectos moleculares, fatores de virulência e resistência antifúngica de isolados ambientais e clínicos do complexo *auris-haemuli* e espécies novas relacionadas. A compreensão aprofundada desses mecanismos poderá contribuir para estratégias de contenção da resistência e redução da mortalidade associada a infecções causadas por esses patógenos oportunistas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Investigar os aspectos moleculares, fatores de virulência e resistência aos antifúngicos de isolados ambientais e clínicos pertencentes ao complexo de *C. auris-haemuli* e espécies filogeneticamente relacionadas.

4.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar por métodos genéticos, fisiológicos e bioquímicos as espécies utilizadas neste trabalho.
- Avaliar os isolados clínicos e ambientais das espécies selecionadas do gênero *Candidozyma* quanto aos fatores de virulência como termotolerância, filamentação e produção de biofilme.
- Avaliar a susceptibilidade aos antifúngicos comerciais de isolados clínicos e ambientais das espécies selecionadas de *Candidozyma*.
- Estudar os possíveis mecanismos de resistência das leveduras resistentes aos antifúngicos azólicos, como troca de aminoácidos em genes de resistência, a presença de genes de bomba de efluxo e a expressão deste mecanismo.
- Realizar o sequenciamento e montagem genômica dos isolados pertencentes as espécies novas.
- Classificar e analisar a árvore filogenética das novas espécies, além de avaliar a presença de genes de resistência presentes.
- Buscar a identificação de homólogos conservados na espécie *Candidozyma* sp. UFMG-CM-Y6065 com *Candidozyma auris*.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Origem, obtenção e manutenção dos isolados

Para o presente estudo foram selecionadas 25 linhagens de leveduras pertencentes ao gênero *Candidozyma*. Essas leveduras se encontram depositadas na Coleção de Microrganismos, DNA e Células da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os isolados de *Candidozyma* utilizados, foram previamente coletados e isolados de diversos substratos provenientes de diferentes estados brasileiros.

Os isolados que foram utilizados, o local e data da coleta e o tipo de amostra se encontram na Tabela 1. As leveduras encontram-se criopreservadas no caldo GYMP com glicerol puro a -80°C , com o propósito de manter sua viabilidade e características genéticas ao longo do tempo.

5.2 Verificação da pureza e criopreservação das amostras

Para a reativação das leveduras e verificação da pureza, foi utilizado o meio YM (composto por 1% glicose, 0,3% extrato de levedura, 0,3% extrato de malte, 0,5% peptona e 0,01% cloranfenicol) a uma temperatura de 25°C . Após a confirmação da pureza, foi procedida a criação de um banco de amostras em duplicata devidamente identificadas, contendo apenas as espécies a serem utilizadas neste trabalho, seguindo rigorosamente o protocolo de criopreservação.

Após a obtenção das colônias purificadas, os isolados de leveduras foram inoculados em tubos contendo 2 mL de caldo GYMP (1% de extrato de malte, 0,2% de fosfato de potássio dibásico, 2% de glicose e 0,5% de extrato de levedura) e incubados por 48 horas a 15°C . Em seguida, 800 μL desse caldo foram transferidos em duplicatas para criotubos esterilizados contendo 200 μL de glicerol puro, e armazenadas a -80°C .

Tabela 1- Isolados clínicos pertencentes ao complexo *C. haemuli*-auris utilizados no presente estudo.

Código dos isolados	Espécie	Origem	Ano de coleta	Sítio de isolamento
UFMG-CM-Y7579	<i>Candidozyma haemuli</i>	Teófilo Otoni - MG	2009	Requeijão
UFMG-CM-Y4035	<i>Candidozyma haemuli</i>	Matinhos - PR	2010	Areia da praia
UFMG-CM-Y4059	<i>Candidozyma haemuli</i>	Pontal do Paraná - PR	2010	Água do mar
UFMG-CM-Y4157	<i>Candidozyma haemuli</i>	Rio de Janeiro - RJ	2010	Água do mar
UFMG-CM-Y4375	<i>Candidozyma haemuli</i>	Rio de Janeiro - RJ	2010	Água do mar
UFMG-CM-Y7534	<i>Candidozyma haemuli</i>	Belo Horizonte - MG	2014	Amostra clínica
UFMG-CM-Y7572	<i>Candidozyma haemuli</i>	Cauxianã - PA	2016	<i>Marasmiellus volvatus</i> - cogumelo
UFMG-CM-Y7573	<i>Candidozyma haemuli</i>	Cauxianã - PA	2016	<i>Rigidoporus biokoensis</i> - cogumelo
UFMG-CM-Y7574	<i>Candidozyma haemuli</i>	Cauxianã - PA	2016	<i>Polyporus</i> spp. - cogumelo
UFMG-CM-Y7469	<i>Candidozyma</i> sp. 1	Flona de Caxiuanã - PA	2016	<i>Faramea anisocalyx</i>
UFMG-CM-Y7127	<i>Candidozyma</i> sp. 2	Itacoatiara - AM	2016	Solo
UFMG-CM-Y6408	<i>Candidozyma</i> sp. 3	Itacoatiara - AM	2015	Madeira em decomposição
UFMG-CM-Y6065	<i>Candidozyma</i> sp. 4	Tocantins - TO	2007	<i>Ipomoea</i> spp.
UFMG-CM-Y6066	<i>Candidozyma</i> sp. 4	Tocantins - TO	2007	<i>Ipomoea</i> spp.
UFMG-CM-Y7528	<i>Candidozyma</i> sp. 4	Tocantins - TO	2007	<i>Ipomoea</i> spp.
UFMG-CM-Y7529	<i>Candidozyma</i> sp. 4	Tocantins - TO	2007	<i>Ipomoea</i> spp.
UFMG-CM-Y7530	<i>Candidozyma</i> sp. 4	Tocantins - TO	2007	<i>Ipomoea</i> spp.
UFMG-CM-Y7531	<i>Candidozyma</i> sp. 4	Tocantins - TO	2007	<i>Ipomoea</i> spp.
UFMG-CM-Y7575	<i>Candidozyma</i> sp. 5	Flona de Caxiuanã - PA	2013	Casca de árvore
UFMG-CM-Y4453	<i>Candidozyma duobushaemuli</i>	Rio de Janeiro - RJ	2010	Água do mar
UFMG-CM-Y4460	<i>Candidozyma duobushaemuli</i>	Rio de Janeiro - RJ	2010	Água do mar
UFMG-CM-Y756	<i>Candidozyma duobushaemuli</i>	Aurora do Tocantins - TO	2012	<i>B. karatas</i>
UFMG-CM-Y7571	<i>Candidozyma duobushaemuli</i>	Cauxianã - PA	2016	<i>Xylaria</i> sp.
UFMG-CM-Y1478	<i>Candidozyma heveicola</i>	Serra do Cipó - MG	2014	Madeira em decomposição
UFMG-CM-Y5595	<i>Candidozyma heveicola</i>	Pampulha - MG	2013	Nectário de <i>Tabebuia</i> sp.

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

5.3 Identificação molecular

5.3.1. Extração de DNA total

Para a extração do DNA total, as cepas foram cultivadas em meio ágar YM (composição de 1% glicose, 0,3% extrato de levedura, 0,3% extrato de malte, 0,5% peptona bacteriológica, 2% ágar e 0,01% de cloranfenicol) a uma temperatura de 25 °C por um período de 24 horas. Após o crescimento, as colônias foram ressuspensas em 100 µL de tampão de lise e incubadas em banho-maria a 65°C por 30 minutos. Em seguida, é adicionado 200 µL de uma mistura de clorofórmio e álcool isoamílico (proporção 24:1) aos tubos, que são homogeneizados por inversão e centrifugados a 14300 rpm por 10 minutos.

O sobrenadante foi cuidadosamente retirado com o auxílio de uma pipeta e transferido para outro tubo, ao qual é adicionado volume equivalente de isopropanol, permitindo a precipitação do DNA. Os tubos foram deixados em repouso à temperatura ambiente para esse processo ocorrer. Após essa etapa, os tubos são novamente centrifugados a 14300 rpm por 10 minutos. O sobrenadante é descartado por inversão, e ao pellet formado é acrescentado 200 µL de etanol 70 %. As amostras são centrifugadas novamente a 14300 rpm por 10 minutos.

Logo após deve ser retirado todo o excesso do sobrenadante em papel filtro. Os tubos foram incubados à overnight em temperatura ambiente para a completa evaporação do álcool. Após essa etapa, o DNA foi ressuspendido em 100 µL de tampão Tris EDTA 0,1 M (TE) pH 8 e armazenado a -20 °C para posterior utilização.

5.3.2 Amplificação utilizando o iniciador (GTG)₅

Foi utilizado o iniciador (GTG)₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3') para amplificar regiões microssatélites por meio de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), segundo a metodologia descrita por Lieckfeldt et al. (1993). A PCR foi conduzida em microtubos de 0.2 mL, com volume final de 25 µL, contendo: 1 a 5 µL de DNA (dependendo da concentração de DNA, variável de 50-500 ng µL⁻¹); 2 µL do iniciador (GTG)₅ 10 µmol µL⁻¹ (MWG Biotech) 2.5 µL de tampão de PCR 5X (Fermentas); 1.5 µL de MgCl₂ 25 mM; 1 µL de dNTP 10 mM; 0.2 µL de Taq DNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final foi completado com água ultrapura esterilizada.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador PCR Mastercycler (Eppendorf), nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguida por 40 ciclos de

desnaturação a 94 °C por 15 segundos, pareamento a 55 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 90 segundos, e uma extensão final a 72 °C por 6 min. A observação dos produtos da PCR (amplicons) foi feita por eletroforese em gel de agarose 1.5%, em tampão TBE 0.5X (54 g de tris base, 27.5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0.5 M, pH 8), que foram submetidos a 80 V por 1h e 30 min e corados com uma solução de agente intercalante (GelRed). Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados (Vilber Lourmat, França).

5.3.3 Amplificação dos domínios D1/D2 do gene do rRNA

As amostras que apresentaram perfis fisiológicos e moleculares distintos foram enviadas para o sequenciamento Sanger. A reação de PCR seguiu o protocolo de Lachance *et al.*, (1999) e foi conduzida em um volume final de 50 µL. Os componentes da reação consistem em 5 µL de tampão de PCR Fermentans 10 X, 2 µL de MgCL₂ 1,5M, 2 µL de dNTP 0,05 mM, 1 µL de cada iniciador NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG3') e NL4 (5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') a 10 pmol/µL, 1 a 5 µL de DNA, 0,2 µL de Taq DNA Polimerase 1,25 U/µL (Taq DNA Polymerase Fermentans) e água Dpec q.s.p. 50 µL. As amplificações das amostras foram realizadas no termociclador Eppendorf AG6325 (Eppendorf).

O programa de ciclagem consiste em uma desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e uma etapa final de extensão a 72 °C por 10 minutos. Os produtos resultantes da PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5 X (54 g de tris base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0) a uma voltagem de aproximadamente 120 V, durante cerca de 30 minutos. Os amplicons foram corados previamente com solução de GelRed (Biotium), visualizados sob luz ultravioleta e registrados por meio de um sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, France).

5.3.4 Amplificação da região ITS (espaçador transcrito interno)

Os isolados de leveduras que apresentarem mais que três substituições na sequência gênica dos domínios D1/D2 e que representam possíveis espécies novas, ou ainda os que a identificação não foi possível com o sequenciamento dos domínios D1/D2 do gene do RNA ribossomal, foram submetidos ao sequenciamento da região dos espaçadores transcritos internos (ITS1-5.8S-ITS2) do gene do RNAr utilizando os iniciadores ITS1

(TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) conforme descrito por White *et al.*, (1990). A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foi realizada em um volume final de 50 μL contendo de 1,0 a 5,0 μL de DNA (variando de acordo com a concentração do DNA, a qual deve estar entre 50-500ng/ μL , sendo o ideal em torno de 250ng), 1,0 μL de cada iniciador ITS1 e ITS4 10 μmol^{-1} (MWG Biotech), 5,0 μL de tampão de PCR 5X (Sinapse Inc), 2,0 μL de MgCl_2 25mM, 2,0 μL de dNTP 10 mM, 0,2 μL de Taq DNA polimerase 5U (Sinapse Inc) e o volume final completado com água miliQ estéril. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se o termociclador PCR Express (Valpo protect - Eppendorf).

As reações de PCR foram realizadas sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de: desnaturação a 95 °C por 1 minuto, anelamento a 55 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto, seguida por extensão final a 72 °C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Pronadisa, Espanha) 1%, em tampão TBE 0,5X, eluídos durante aproximadamente 30 minutos a 120 V. Os géis foram corados com GelRed (Biotium, USA), visualizados sob luz ultravioleta e fotografados em um sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, France).

5.3.5 Purificação dos amplicons

Os *amplicons* gerados ao final da reação de PCR (volume de 47 μL) foram purificados com a adição de 11.25 μL de EDTA 125 mM e 141 μL de etanol absoluto (Merck). Em seguida, os tubos foram homogeneizados por inversão, deixados à temperatura ambiente por 30 min e centrifugados a 16.000 xg por 30 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi tratado com 120 μL de etanol 70% e, posteriormente, homogeneizado e centrifugado a 16.000 xg por 15 min. O sobrenadante foi descartado novamente e o restante do etanol evaporou a 37 °C por 30 min. Em seguida, o DNA foi ressuscitado em 10 μL de água esterilizada, dosado em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies) e armazenado a -20 °C para ser utilizado nas reações de sequenciamento.

5.4 Sequenciamento

5.4.1 Reações de sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se o Kit BigDye Terminator

v3.1 (Applied Biosystems, EUA) em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado ABI 3730x1 (Applied Biosystems, EUA) da plataforma de sequenciamento do Instituto René Rachou (FIOCRUZ, Minas Gerais). A reação de PCR foi realizada em microplacas de 96 poços (Applied Biosystems, EUA) e preparada para um volume final de 10 μL , contendo: 1 μL do iniciador (5 μmol), 1 μL de tampão (presente no kit de sequenciamento), 1 μL de Big Dye, 1 μL de DNA (contendo entre 10-20 $\text{ng}/\mu\text{L}$) e o volume foi completado com água ultrapura esterilizada. O programa de ciclagem utilizado consistiu de uma desnaturação inicial a 36 °C por 1 min, 36 ciclos de anelamento a 96 °C por 15 s, seguido de extensão a 50 °C por 15 s e 4 min de extensão final a 60 °C.

5.4.2 Precipitação da reação de sequenciamento

Para precipitação das reações de sequenciamento, 1 μL de EDTA a 125 mM, 1 μL de acetato de sódio 3 M e 50 μL de etanol absoluto (Merck) gelado foram adicionados em cada poço da placa de 96 poços. A placa foi submetida à agitação em vórtex e incubada por 15 min à temperatura ambiente. Após a incubação, a placa foi centrifugada por 45 min a 4.000 rpm a 4 °C e o sobrenadante foi descartado por inversão. Em seguida, foram acrescentados 100 μL de etanol 70% (Merck) gelado, a placa foi novamente centrifugada por 15 min a 1.8000 xg a 25 °C e o sobrenadante foi descartado por inversão. Para remoção do excesso de etanol, o selante foi retirado e a placa invertida sobre um papel absorvente e submetida a um spin (pulso até a centrífuga atingir 900 rpm). Após essa etapa, a placa foi mantida em repouso, sem o selante, durante 20 min em temperatura ambiente para evaporação do etanol residual. Em seguida, o DNA das amostras precipitado em cada poço foi ressuscitado em 10 μL de Formamida HI 30 DI (Applied Biosystems, EUA). A placa foi armazenada a 4 °C, protegida da luz, até a injeção das amostras no sistema automatizado ABI 3730 (Applied Biosystems, EUA).

5.4.3 Análise computacional das sequências

As sequências de DNA foram analisadas de acordo com a qualidade no portal Embrapa (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) e comparadas com as sequências de espécies de fungos referências depositadas no *GenBank*, incluindo “*type species*”, pertencentes às coleções de culturas internacionais, utilizando o programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool - versão 2.215 do BLAST 2.0) disponível no portal NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), desenvolvido pelo National Center For

Biotechnology. Leveduras com sequências de valor $E = 0$, cobertura e identidade $\geq 99\%$ quando analisadas com o programa BLASTn foram considerados como pertencentes à mesma espécie. Já leveduras com sequências de valor $E \neq 0$ e cobertura e identidade $\leq 97\%$ foram identificados em nível de gênero ou níveis hierárquicos mais altos. Para alguns táxons o termo ‘cf.’ (latim “for confer” = comparado com) pode ser utilizado para indicar a espécie a qual se assemelha, mas apresenta pequenas diferenças com a espécie referência. Para identificação molecular, foram utilizadas sequências com ≥ 350 pares de bases.

5.5 Termotolerância

Os isolados do complexo *C. haemuli-auris* foram avaliados e testados quanto a capacidade de crescimento em diferentes temperaturas. Para isso, dez microlitros da suspensão de leveduras na concentração de 1×10^6 células/mL foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud (Peptona - 0,5%, Dextrose - 2%, Ágar - 2% e pH 5,6) e incubadas nas temperaturas de 25°C, 30°C, 35°C, 37°C, 40°C, 42°C e 45°C, durante um período de 48h. A avaliação dos resultados foi realizada de modo visual, analisando o grau de crescimento da levedura. Sendo que as leveduras que apresentarem crescimento robusto foram identificadas com ++ nos resultados, as leveduras com crescimento intermediário foram descritas com +, já as leveduras que não apresentarem crescimento foram identificadas com sinal negativo (-) (ZEUTHEN *et al.*, 1989). Para isto, foram realizados três experimentos independentes.

5.6 Teste de sensibilidade das leveduras à antifúngicos

A determinação da susceptibilidade a antifúngicos dos isolados foi realizada utilizando a metodologia de microdiluição em placas de acordo com o CLSI M-27. Para isto, foram utilizados os seguintes antifúngicos: fluconazol, voriconazol, itraconazol, anfotericina B e epoxiconazol (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). Para as espécies ainda não descritas e com MIC elevados para azóis foram realizados também caspofungina, micafungina e anidulafungina. Os antifúngicos foram diluídos para preparo da solução estoque em dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). Os isolados fúngicos utilizados no teste foram cultivados previamente em ágar Sabouraud por 24 horas a 37°C.

Assim, a levedura será diluída em salina 0,85% e a transmitância desta suspensão foi determinada em espectrofotômetro a 530 nm. Para o experimento o inóculo foi padronizado na transmitância entre 75 e 77%, o que equivale a $0,5-5 \times 10^6$ ufc/mL. Para o experimento foi

utilizado placas de 96 poços e realizado a diluição seriada dos fármacos mencionados. As seguintes faixas de concentração dos medicamentos foram usadas: anfotericina B, 0,0313 a 16 µg/mL; itraconazol, 0,0313 a 16 µg/mL; fluconazol, 0,125 a 64 µg/mL; voriconazol, 0,0313 a 16 µg/mL; e anidulafungina, caspofungina e micafungina, 0,015 a 8 µg/mL.

Após a diluição seriada foi adicionado em cada poço (da 2ª a 11ª coluna) 100 µL do inóculo das espécies analisadas, atingindo desta forma a concentração final do inóculo de $0,5 \cdot 10^3$ ufc/mL. A 12ª coluna da placa será reservada para o controle de crescimento do microrganismo, sendo adicionados 100 µL de RPMI, sem adição de antifúngico e 100 µL do inóculo. Finalizada esta etapa, as placas foram incubadas a 37°C e a leitura dos resultados foi realizada de modo visual em 24 e 48 horas (CLSI, 2017) (Tabela 2).

O experimento foi realizado em duplicata. Os pontos de interrupção clínicos dos testes de suscetibilidade antifúngica não estão disponíveis para interpretar ensaios de suscetibilidade realizados com isolados do complexo *auris-haemuli*. Para a interpretação dos resultados foram utilizadas as diretrizes para *Candida albicans* citadas no CLSI, M27 (2008) conforme a tabela 3.

Tabela 2- Diretrizes interpretativas para teste de susceptibilidade in vitro em *Candida sp.*

Agente antifúngicos	Suscetibilidade (S)	Dose dependente (S-DD)	Intermediário (I)	Resistente (R)	Não suscetibilidade (NS)
Anidulafungina	≤ 2	-	-	-	>2
Caspofungina	≤ 2	-	-	-	>2
Micafungina	≤ 2	-	-	-	>2
Fluconazol	≤ 8	16 - 32	-	≥64	-
Itraconazol	≤ 0.125	0.25 - 0.5	-	≥1	-
Voriconazol	≤ 2	2	-	≥4	-
Anfotericina B	≤ 1	-	-	≥ 1	-

Fonte: Adaptado CLSI, M27 (2025).

Tabela 3- Diretrizes interpretativas para teste de susceptibilidade in vitro em *Candida albicans*.

Antifúngico	CIM (µg/mL)
Anfotericina B	≤1
Fluconazol	≤2
Itraconazol	≤0,12
Voriconazol	≤0,12
Caspofungina	≤0,25
Micafungina	≤0,06

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

5.7 Pesquisa de fatores de virulência

5.7.1 Estudo da morfogênese das linhagens

As leveduras foram crescidas overnight em meio YPD (peptona bacteriológica 2%, extrato de levedura 1%, glicose 2,0%, ágar 2%) a 28°C. Posteriormente, foi feita, para cada cultura, uma suspensão de células em tampão PBS cuja densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro a 530 nm de transmitância. As suspensões foram então diluídas para obtenção de colônias isoladas após o plaqueamento. Foi utilizado um meio indutor de filamentação:

- 1) Meio com limitação de nitrogênio - ágar SPIDER (1% de caldo nutriente, 0,2% de K₂PO₄, 1% de manitol, 1,35% de ágar) (CALERA *et al.*, 2000).

As placas foram incubadas a 30°C por 5 dias e uma colônia representativa de cada placa foi fotografada e visualizadas em microscópio óptico. O experimento foi realizado em triplicata.

5.7.2 Teste de adesão a células epiteliais bucais de leveduras oportunistas

As leveduras que apresentaram resistência aos azólicos foram testadas quanto à capacidade de adesão a células epiteliais bucais (CEB) conforme a metodologia proposta por Kimura e Pearsall (1978). As linhagens isoladas foram repicadas em ágar Extrato de Malte-Extrato de Levedura e incubadas a 37°C por 24h.

Com auxílio de espectrofotômetro, foi então preparada uma suspensão de células em caldo Sabouraud a uma concentração final de 10⁶ células/mL. As células epiteliais bucais humanas de adultos jovens saudáveis foram coletadas com o auxílio de dois swabs estéreis e inoculadas em 10 mL de tampão PBS. A suspensão de CEB foi centrifugada e lavada quatro vezes em PBS estéril (3000 xg por 10 min) para a remoção de micro-organismos aderidos.

As CEB foram então suspensas a uma concentração de 10⁵ células/mL, contadas com o auxílio de uma câmara de Neubauer, e foram utilizadas imediatamente para o teste de adesão. Para o teste, foram misturados delicadamente 0,5 mL da suspensão de CEB e 0,5 mL da suspensão de leveduras e incubados sob agitação a 37°C por uma hora. A mistura foi então filtrada em um filtro de policarbonato com poros de 12 µm adicionando-se ainda 100 mL de

PBS para remoção de leveduras não aderidas.

O filtro foi retirado com o auxílio de uma pinça e pressionado contra uma lâmina de vidro. Após 10 segundos, o filtro foi removido delicadamente, deixando as CEB aderidas à lâmina de vidro. A preparação foi seca, fixada pelo calor e corada com cristal violeta. Posteriormente, foram contadas com auxílio de microscopia óptica o número de células com leveduras aderidas dentre 50 CEB visualizadas, bem como o número de leveduras aderidas nestas mesmas 50 CEB.

5.7.3 Ensaio de formação de Biofilme in vitro – quantitativo

Para a realização dos ensaios de formação de biofilme, os isolados das leveduras avaliadas neste estudo foram inoculados em ágar Sabouraud e incubados a 37°C *overnight*. Passado o período citado, as leveduras foram transferidas para tubos contendo solução salina a 0,85%. Posteriormente a concentração da suspensão de levedura foi determinada em hemocítmetro e ajustada para uma concentração equivalente a 1×10^7 células/mL em meio RPMI (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) com tampão MOPS 0,165 mol/L.

A metodologia utilizada no ensaio de formação de biofilme foi baseada nos trabalhos realizados por Serevinatne e colaboradores (2009), com algumas modificações. Para isto, foram adicionados 100 µL da suspensão fúngica descrita acima em RPMI (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) em microplacas de 96 poços. Posteriormente, a placa foi incubada por 90 minutos a 37°C sob agitação a 75 rpm.

Após este período, no qual ocorreu a adesão inicial das células fúngicas, o sobrenadante foi retirado e cada poço foi lavado duas vezes com 200 µL de solução salina 0,85% estéril. Em seguida, 200 µL de RPMI foram adicionados aos poços e a placa foi incubada novamente sob a temperatura de 37°C por 48h, sendo que a cada 24h o meio de cultura será trocado.

Para avaliar a biomassa do biofilme total foi utilizado o corante cristal violeta, o qual cora células viáveis, não-viáveis e a matriz, seguindo a quantificação proposta pelo método de Pierce (2008). Para isso, após o biofilme ser formado, o sobrenadante presente nos poços da placa foi retirado e adicionado 100 µL de metanol 99% por 15 minutos.

Posteriormente, o metanol foi retirado e 100 µL de solução de cristal violeta foi adicionado a cada poço, e mantido por 20 minutos em temperatura ambiente. Após este período o cristal violeta foi retirado das placas, sendo lavadas com água corrente. Posteriormente, foi adicionado nos poços 150 µL de ácido acético 33%. Por fim, 100 µL da solução de ácido acético foram transferidos para uma nova microplaca de 96 poços e a absorbância será mensurada em

espectrofotômetro a 530 nm. O teste foi realizado em duplicata.

5.7.4 Análise de formação de biofilme qualitativa em microscopia de varredura

Para este experimento foram utilizados o isolado de *Candida albicans* (SC5314) e o isolado de flor de Tocantins UFMG-CM-Y6065, ambas foram inoculadas em placas de Petri com 4 mL de meio YPD e incubadas por 24 horas á 30°C. Após 24 horas, as células foram diluídas em meio RPMI em uma concentração de 1×10^7 células/mL e incubadas em uma placa de 24 poços com lamínulas a 37°C em shaker (110 rpm) por 1 hora.

Posteriormente, os poços foram lavados com PBS, para remover células não aderentes, e preenchidos novamente com 3 mL de meio RPMI. As placas foram então incubadas a 37°C por 48 horas sob agitação suave (110 rpm). Posteriormente, as amostras foram fixadas com o fixador Karnovsky modificado, solução contendo 2% de paraformaldeído e 2,5% de glutaraldeído em tampão fosfato 0,1M, por 1 hora.

Após essa etapa, a solução fixadora foi retirada e acrescentado tampão fosfato 0,1 M. Após esta etapa, as amostras devem ser mantidas refrigeradas e levadas ao centro de microscopia da UFMG para a análise em Microscópio Eletrônico de Varredura FEI Quanta 200 FEG. O protocolo para microscopia MEV em biofilme de *C. albicans* foi descrito em (Rai *et al.*, 2019.)

5.7.5 Bomba de efluxo do tipo ABC

Para avaliar a atividade do transportador de fármacos do tipo ABC, determinamos o efluxo de rodamina 6G induzido por glicose conforme descrito por Gbelska *et al.*, (2017). Os isolados *Candidozyma* sp. (4) UFMG-CM-6066 e *Candida albicans* SC5314 foram cultivados até a fase logarítmica em extrato de levedura líquido glicose a 35°C por 24 horas. Posteriormente, as células das leveduras foram coletadas por centrifugação e transferidas (10^7 células) em 20 mL de caldo de GYMP e incubadas a 35°C por mais 2h.

Novamente, as células de levedura foram coletadas por centrifugação, lavadas duas vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e adicionados 10 mL de PBS contendo 20 μ M de rodamina 6G sem glicose aos pellets. As suspensões foram agitadas em vórtice e incubadas a 35°C por 90 min para permitir a captação de rodamina 6G sob condições de depleção da fonte de carbono. As células foram novamente coletadas por centrifugação, lavadas duas vezes em PBS e suspensas em 750 μ L de PBS em tubos de microcentrífuga.

Para iniciar o efluxo de rodamina 6G, adicionamos 250 μL de PBS com 8 mmol/L de glicose. Os tubos de controle foram preparados com PBS sem glicose, removidos após 5, 15 e 25 min de incubação a 35°C e medidos a fluorescência em alíquotas de 200 μL de sobrenadante usando um espectrofotômetro com excitação de 527 nm e emissão de 555 nm (Varioskan, CTNano, UFMG). Além disso, também foi realizado com um grupo tratado com FLC a 8 ($\mu\text{g}/\text{ml}$). Foram realizadas duplicatas deste experimento.

5.8 Caracterização fisiológica e avaliação de fenótipos

5.8.1 Assimilação de diferentes fontes de carbono e nitrogênio em meio sólido

A habilidade dos isolados de leveduras para crescerem aerobicamente utilizando diferentes compostos como única fonte de carbono foi avaliada em meio sólido utilizando a técnica de *réplica-plate*, conforme descrito por Kurtzman *et al.*, (2011). As placas contendo 0,5% da fonte de carbono em teste (como glicose, galactose, l-sorbose, maltose, sacarose, celobiose, trealose, lactose, melibiose, melizitose, inulina, amido solúvel, d-xilose, l-arabinose, d-arabinose, d-ribose, l-raminose, glicerol, eritritol, adonitol, sorbitol, d-manitol, salicina, dl-lactato, succinato, citrato de sódio, m-inositol, metanol, hexadecano, glucosamina, xilitol, gluconato, n-acetilglucosamina, etanol, acetona, acetato de etila e isopropanol; e 1% de rafinose) foram preparadas em um meio basal (YNB 0,67%, ágar 2%) e inoculadas com um replicador multiponto.

Nos testes de assimilação de nitrogênio, foi utilizado um meio basal (YCB 1,17%, ágar 2%) suplementado com nitrito (nitrito de sódio 0,026%), nitrato (nitrato de potássio 0,078%) ou lisina (0,056%). O crescimento sob alta pressão osmótica foi verificado em um meio contendo glicose (50% de glicose, 0,1% de extrato de levedura, 2% de ágar) e cloreto de sódio (10% de NaCl, 5% de glicose, 0,67% de YNB).

A produção de ácido foi analisada pela solubilização de carbonato de cálcio em meio sólido (5% de glicose, 0,5% de CaCO_3 , 0,5% de extrato de levedura, 2% de ágar), evidenciada pela formação de um halo claro ao redor das colônias. A resistência à cicloheximida foi avaliada em meio sólido (0,67% de YNB, 0,5% de glicose, 2% de ágar) acrescido de 0,01% de cicloheximida. A tolerância ao ácido acético foi testada em meio sólido (10% de glicose, 1% de peptona, 1% de extrato de levedura, 2% de ágar) com 1% de ácido acético.

Para todos os testes, as suspensões de células jovens de levedura (24 horas de crescimento) foram inoculadas em água destilada esterilizada usando um replicador multiponto.

Os resultados foram observados após 7, 14 e 21 dias de incubação e comparados com os controles, compostos por placas contendo apenas o meio basal sem fontes de carbono ou nitrogênio.

5.8.2 Medição das células e formação de pseudohifas

Após crescimento em meio YM incubado a 25°C por três dias, as células de leveduras foram fotografadas e mediadas com o auxílio de microscópio Leica DM750 e software Leica Application Suite. A formação de hifas e/ou pseudo-hifas foi avaliada pelo crescimento das células em meio *cornmeal* (infusão filtrada de fubá a 4,5%, ágar 1,5%) e 5% de malte (extrato de malte 5%, ágar 2%) e visualização em microscópio.

5.8.3 Teste de reprodução assexuada

Para as possíveis espécies novas de levedura, a indução da reprodução sexuada foi realizada em meios de cultura descritos por Kurtzman *et al.*, (2011).

5.8.4 Diferenciação morfológica de novas espécies do gênero *Candidozyma* em CHOMAGAR

As amostras de isolados de leveduras foram caracterizadas morfológicamente utilizando o meio Chromagar™ *Candida* (Merck, Darmstadt, Alemanha), que facilita a identificação visual e preliminar das espécies. Para a inoculação, foram preparadas placas de Petri contendo o meio Chromagar™ *Candida* e cada amostra foi inoculada com auxílio de uma alça estéril. As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas.

Durante o período de incubação, foram observadas e anotadas as características morfológicas das colônias, incluindo cor, textura e bordas. Essas observações permitiram uma análise preliminar das semelhanças entre as espécies do gênero *Candidozyma*, facilitando a identificação inicial antes de realizar testes adicionais. Este meio de identificação, contém substratos cromogênicos que reagem com enzimas específicas de diferentes espécies de leveduras, resultando em colônias de cores distintas.

5.9 Sequenciamento e montagem genômica

O DNA das espécies UFMG-CM-Y6065, UFMG-CM-Y6408, UFMG-CM-Y7127 e

UFMG-CM-Y7469 foram extraídos utilizando liticase e o kit Yeast DNA preparation (Cellco Biotec, São Carlos, São Paulo, Brasil.) e enviado para construção de bibliotecas e sequenciamento no Laboratório de Genômica Funcional da ESALQ/USP. Foram construídas bibliotecas a partir de fragmentos com tamanho médio em torno de 550 pb com o kit TruSeq da Illumina seguindo as recomendações do fabricante.

O sequenciamento foi realizado em equipamento NextSeq 2000 gerando leituras do tipo paired-end de 301 pb (2x301). O genoma foi montado com o software SPADES utilizando os parâmetros “--isolate” e “--cov-cutoff 80”. Avaliamos as métricas de montagem com o QUAST e avaliamos a completude com BUSCO (Tabela 4). As regiões repetitivas foram identificadas com o software RepeatModeler e mascaradas no genoma utilizando o RepeatMasker.

Os genes codificadores de proteína foram preditos com o software Maker2 utilizando os preditores SNAP e Augustus previamente treinados. As CDS e as proteínas foram anotadas a partir da similaridade com as sequências proteicas depositadas nos bancos de dados Swissprot e Trembl, além do Interproscan. Os tRNAs foram identificados com o tRNAScan-SE (Tabela 4).

Tabela 4- Montagem de Genomas de *Candidozyma*.

	Y6065	Y6408	Y7469	Y7127
Amostra	<i>Candidozyma</i> sp.	<i>Candidozyma</i> sp.	<i>Candidozyma</i> sp.	<i>Candidozyma</i> sp.
Bases sequenciadas	2.938.893.570	6.283.644.312	4.168.526.677	3.233.989.919
# reads	4.888.558	22.977.784	15.626.298	11.961.868
Genoma montado (pb)	14.680.035	14.438.407	14.579.683	14.580.613
Cobertura estimada	115,3	409	118	95
Contigs	146	189	98	85
N50	1.178.541	212.197	632.637	858.299
L50	5	19	9	5
BUSCO (genoma)	99.00%	97.70%	97.40%	97.10%
Predição gênica	5.683	5.901	5.52	5.538
BUSCO (proteins)	93,70%	97,70%	92,90%	93,00%

Repetições	1,31%	1,47%	1,67%	1,05%
-------------------	-------	-------	-------	-------

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

A tabela apresenta os resultados de sequenciamento e montagem de genomas para diferentes linhagens de *Candidozyma*. Os dados incluem informações sobre bases sequenciadas, número de reads, genoma montado, cobertura estimada, contigs, N50, L50, percentual de BUSCO para genoma e proteínas, bem como a proporção de repetições identificadas. Essas métricas fornecem uma visão detalhada da qualidade e eficiência das montagens genômicas realizadas para cada amostra.

5.9.1. Árvore filogenética

Os genomas utilizados (Tabela 5) para a análise filogenômica foram obtidos de bancos de dados públicos e processados conforme o protocolo descrito em [protocols.io](https://www.protocols.io/view/an-lise-filogen-mica-q26g71mb1gwz/v1) (disponível em <https://www.protocols.io/view/an-lise-filogen-mica-q26g71mb1gwz/v1>). Os arquivos genômicos estavam no formato FASTA e foram avaliados quanto à completude utilizando o software BUSCO (Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs), versão 5.

A partir dos genomas processados, as proteínas ortólogas de cópia única foram identificadas por meio do BUSCO, utilizando o conjunto de genes ortólogos do banco de dados *saccharomycetes*. As proteínas ortólogas identificadas foram alinhadas individualmente utilizando o software MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform), com configurações padrão. Posteriormente, os alinhamentos foram concatenados em uma supermatriz.

A inferência filogenética foi realizada no software IQ-TREE 2. O modelo evolutivo foi selecionado automaticamente pelo programa, e análises de suporte de bootstrap foram conduzidas com 1000 replicações. O arquivo de entrada utilizado foi o SUPERMATRIX.phylip, e o resultado principal gerado foi um arquivo no formato Newick (treefile). A árvore filogenética resultante foi visualizada e editada utilizando a plataforma iTOL (Interactive Tree of Life).

Tabela 5- Genomas utilizados para a montagem da árvore filogenética.

Espécies	Acesso Genbank
<i>Candidozyma auris</i> CBS 10913	GCA_030581515.1
<i>Candidozyma ruelliae</i> NRRL Y-48703	GCA_030582895.1
<i>Candidozyma haemuli</i> NRRL Y-6693	GCA_030569475.1
<i>Candidozyma pseudohaemuli</i> NRRL Y-48733	GCA_030573385.1
<i>Candidozyma duobushaemuli</i> NRRL Y-17802	GCA_030575055.1
<i>Candidozyma vulturna</i> CBS 14366	GCA_026585945.1
<i>Candidozyma heveicola</i> NRRL Y-48716	GCA_003708405.2
<i>Candidozyma chanthaburiensis</i> CBS 10926	GCA_030579055.1
<i>Candidozyma konsanensis</i> NRRL Y-63889	GCA_030563505.1
<i>Osmozyma tolerans</i> NRRL Y-48705	GCA_030582955.1
<i>Osmozyma mogii</i> NRRL Y-17032	GCA_030573315.1
<i>Metschnikowia australis</i> CBS 5847	GCA_002073855.1

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

5.9.2 Análise de Similaridade Genômica: Aplicação do OrthoANI para Determinação de Proximidade Filogenômica

Para avaliar a similaridade genômica entre os isolados, foi utilizado o cálculo da Identidade Média de Nucleotídeos (ANI, Average Nucleotide Identity) por meio da ferramenta OrthoANI Tool, disponível na plataforma EzBioCloud. O método OrthoANI foi selecionado devido à sua elevada precisão, que se baseia no alinhamento de sequências de genes ortólogos, minimizando a influência de regiões genômicas não ortólogas ou altamente divergentes.

Os arquivos FASTA contendo os genomas dos isolados foram carregados no EzBioCloud ANI Calculator, onde a ferramenta realizou alinhamentos pareados para identificar regiões conservadas entre as sequências. A métrica OrthoANI foi aplicada utilizando o algoritmo BLASTN, que compara nucleotídeos em regiões ortólogas previamente identificadas. Para classificação taxonômica, foi adotado um limiar de ANI $\geq 95\%$, considerado o padrão para identificação de espécies.

5.9.3 Análise de genes de resistência

Para a análise dos genes de resistência, foi elaborado um banco de dados contendo sequências em formatos FASTA e FNA depositadas no NCBI (National Center for Biotechnology Information), amplamente referenciadas na literatura, relacionadas a mecanismos de resistência, adesão, formação de biofilmes e bombas de efluxo.

Em seguida, foi realizada uma busca BLASTp utilizando o proteoma da levedura UFMG-CM-Y6065, UFMG-CM-Y6408, UFMG-CM-Y7127 e UFMG-CM-Y7469, os resultados obtidos foram analisados com base em uma identidade superior a 70%. As substituições pontuais foram examinadas com o auxílio do software Jalview.

Além disso, a análise da resistência a antifúngicos foi conduzida utilizando o software *ResFungi* (<https://github.com/deCarvalho90/ResFungi/blob/ResFungi/ResFungi.hmm>), uma ferramenta desenvolvida para a interpretação de dados fenotípicos e genotípicos de resistência em fungos patogênicos. O *ResFungi* foi utilizado para identificar potenciais marcadores genéticos de resistência presentes nos isolados.

5.9.4 Análise Proteica de Genes Selecionados

Foi utilizado ColabFold é uma ferramenta baseada em colab que permite a predição tridimensional de estruturas proteicas utilizando o modelo AlphaFold2. Para a realização da predição, a sequência de aminoácidos da proteína de interesse foi inserida no ColabFold, que processou a estrutura usando o modelo AlphaFold2. O modelo gerado foi avaliado com base no C-score, RMSD e outros parâmetros estruturais para garantir a qualidade e precisão da estrutura predita.

Para modelos que não tiveram boas predições no ColabFold, foi utilizado o I-TASSER (Iterative Threading ASSEmblY Refinement) foi utilizado para a predição tridimensional da estrutura da proteína. A sequência de aminoácidos é submetida ao I-TASSER, que gera modelos tridimensionais baseados em homologia com estruturas previamente conhecidas. A estrutura final é selecionada com base em pontuações de confiança, como o C-score, RMSD e outros parâmetros de avaliação da qualidade estrutural.

O software *Chimera* foi utilizado para comparar a estrutura tridimensional de proteínas selecionadas com suas respectivas referências no banco de dados UniProt. Por meio do *Chimera*, foi possível realizar análises de similaridade estrutural, alinhamentos tridimensionais, cálculo de RMSD e visualização das regiões de interseção e diferenças entre as conformações proteicas. A ferramenta permitiu a identificação detalhada das variações estruturais e suas implicações funcionais, além de fornecer uma base para estudos comparativos entre as

diferentes proteínas analisadas.

5.9.5 Sintenia a nível cromossomal - Y6065

A análise de sintenia foi realizada para identificar e comparar regiões genômicas conservadas entre *Candidozyma* sp. Y6065 e *Candidozyma auris*. O pipeline foi implementado utilizando o software NGenomeSyn (Disponível em: <https://github.com/hewm2008/NGenomeSyn>).

Este pipeline é baseado na detecção de pares de ortólogos e no agrupamento de regiões colineares, permitindo a visualização dos padrões de sintenia entre genomas.

Os pares de ortólogos entre os genomas foram identificados utilizando ferramentas baseadas em similaridade, como BLAST+, e os resultados foram filtrados para pares de alta similaridade com base nos parâmetros de identidade (% de identidade $\geq X$, valor e $\leq Y$). Com isso, a ferramenta do NGenomeSyn foi utilizada para identificar e agrupar os ortólogos em blocos sintênicos. Estes genes, foram considerados pares de genes consecutivos e conservados com base em um limite de distância.

Os blocos sintênicos e os padrões de colinearidade foram analisados para avaliar a conservação genômica, identificando eventos de duplicação, translocação, inversão, ou perda de genes. A visualização gerada permitiu destacar as diferenças evolutivas entre os genomas analisados.

6. RESULTADOS

6.1 Identificação das leveduras

A partir do sequenciamento da região ITS e dos domínios D1-D2 dos 25 isolados fúngicos selecionados para este trabalho, foram identificados 9 isolados pertencentes a espécie *Candidozyma haemuli*, 4 de *C. duobushaemuli*, 2 de *C. heveicola* e 10 de *Candidozyma* spp., que não foi possível identificar a espécie (Tabela 2).

Os isolados - UFMG-CM-Y6065, UFMG-CM-Y6066, UFMG-CM-Y7528, UFMG-CM-Y7529, UFMG-CM-Y7530 e UFMG-CM-Y7531 são isolados da mesma espécie e foram nomeados como: *Candidozyma* sp. 4. A análise de sequência das regiões D1/D2 mostrou que esta nova espécie está filogeneticamente próxima a um subclado contendo *C. ruelliae* e *C. haemuli*. A nova espécie difere do holótipo de *C. ruelliae* por 46 substituições de nucleotídeos

e 22 indels (475 pb comparados), e do holótipo de *C. haemuli* por 70 substituições de nucleotídeos e sete indels (467 pb comparados) nas sequências D1/D2.

A espécie *Candidozyma* sp. 4 difere de *Candidozyma* sp. 2 UFMG-CM-Y7127 por 45 substituições de nucleotídeos e nove indels (463 pb comparados). Em relação às sequências da região ITS, a espécie *Candidozyma* sp. 4 difere do holótipo de *C. ruelliae* por 24 substituições de nucleotídeos e oito indels, e do holótipo de *C. haemuli* por 35 substituições e 11 indels (366 pb comparados).

O isolado UFMG-CM-Y7469 – *Candidozyma* sp. 1 apresentou diferenças significativas em relação ao holótipo de *C. ruelliae*, espécie filogeneticamente mais próxima, com 18 substituições de nucleotídeos e 17 indels identificados em uma região de 453 pb nas sequências D1/D2. Em comparação com o holótipo de *C. haemuli*, foram detectadas 47 substituições de nucleotídeos e 22 indels em 544 pb das mesmas sequências.

Na região ITS, o isolado UFMG-CM-Y7469 diferiu do holótipo de *C. ruelliae* por 40 substituições de nucleotídeos e 10 indels em 354 pb analisados. Quanto à espécie UFMG-CM-Y6408 *Candidozyma* sp. 3, o alinhamento com o holótipo de *C. haemuli* revelou 50 substituições de nucleotídeos e 12 indels em uma região de 426 pb das sequências D1/D2. Em relação à região ITS, foram comparados 302 pb com o holótipo de *C. ruelliae*, observando-se 33 substituições de nucleotídeos e 9 indels.

A nova espécie UFMG-CM-Y7127 *Candidozyma* sp. 2, quando comparada à região D1/D2, apresentou 76 substituições e 19 indels em 544 pb em relação ao holótipo de *C. haemuli*, enquanto em relação ao holótipo de *C. ruelliae*, observou-se 75 substituições e 22 indels. Na região ITS, a comparação com o holótipo de *C. ruelliae* revelou 30 substituições e 5 indels em 287 pb, enquanto para *C. ohialehuae* (261 pb comparados), foram observadas 24 substituições e 5 indels. Estes resultados mostram a ocorrência de diferentes espécies novas de *Candidozyma* dentre os isolados analisados.

A nova espécie UFMG-CM-Y7575 (*Candidozyma* sp. 5), quando comparada à região D1/D2, apresentou 9 substituições de nucleotídeos e 6 indels em 501 pb comparados em relação ao holótipo de *C. pseudohaemuli* (CBS 10004, MK394152.1), correspondendo a 97% de identidade nucleotídica. Na região ITS, a comparação com o holótipo de *Candida quercitrusa* (LN871036.1) revelou 9 substituições de nucleotídeos e 9 indels em 306 pb, também apresentando 97% de identidade nucleotídica.

6.2 Termotolerância

Para a análise de termotolerância os resultados foram avaliados a exposição em diferentes temperaturas, principalmente, à 37°C, 40°C e 42°C. Todos os isolados do clado *auris-haemuli* (CAH) testados, cresceram (++) na temperatura de 37°C por um período de 48 horas. No entanto, apenas um único isolado, UFMG-CM-Y7469, demorou 72 horas para crescer a 37°C (SPOT) (Tabela 6). A partir de 40°C, o crescimento dos isolados foi mais difícil sendo nulo a 45°C.

No entanto, alguns isolados, como UFMG-CM-Y6065, UFMG-CM-Y6066, UFMG-CM-Y7528, UFMG-CM-Y7529, UFMG-CM-Y7530 e UFMG-CM-Y7531, mostram capacidade de crescer até 42°C (Tabela 6). Esses isolados, juntamente com o isolado de *Candidozyma auris* COL1AB e *Candida albicans* SC53142 testado. A habilidade de crescer a 42°C, destaca um atributo fisiológico importante das leveduras estudadas no presente trabalho.

Tabela 6- Perfil de termotolerância dos isolados do Complexo *haemuli-auris*.

Espécies	Código	25°C	30°C	35°C	37°C	40°C	42°C	45°C
<i>Candidozyma haemuli</i>	UFMG-CM-Y7579	++	++	++	++	+	-	-
<i>Candidozyma haemuli</i>	UFMG-CM-Y4035	++	++	++	++	-	-	-
<i>Candidozyma haemuli</i>	UFMG-CM-Y4059	++	++	++	++	-	-	-
<i>Candidozyma haemuli</i>	UFMG-CM-Y4157	++	++	++	++	-	-	-
<i>Candidozyma haemuli</i>	UFMG-CM-Y4375	++	++	++	++	-	-	-
<i>Candidozyma haemuli</i>	UFMG-CM-Y7534	++	++	++	++	+	-	-
<i>Candidozyma haemuli</i>	UFMG-CM-Y7572	++	++	++	++	-	-	-
<i>Candidozyma haemuli</i>	UFMG-CM-Y7573	++	++	++	++	-	-	-
<i>Candidozyma haemuli</i>	UFMG-CM-Y7574	++	++	++	++	-	-	-
<i>Candidozyma</i> sp.	UFMG-CM-Y7469	++	++	++	SPOT	-	-	-
<i>Candidozyma</i> sp.	UFMG-CM-Y7127	++	++	++	++	+	-	-
<i>Candidozyma</i> sp.	UFMG-CM-Y6408	++	++	++	++	+	-	-
<i>Candidozyma</i> sp.	UFMG-CM-Y6065	++	++	++	++	++	+	-
<i>Candidozyma</i> sp.	UFMG-CM-Y6066	++	++	++	++	++	+	-
<i>Candidozyma</i> sp.	UFMG-CM-Y7528	++	++	++	++	++	+	-
<i>Candidozyma</i> sp.	UFMG-CM-Y7529	++	++	++	++	++	+	-
<i>Candidozyma</i> sp.	UFMG-CM-Y7530	++	++	++	++	++	+	-
<i>Candidozyma</i> sp.	UFMG-CM-Y7531	++	++	++	++	++	+	-
<i>Candidozyma</i> sp.	UFMG-CM-Y7575	++	++	++	++	+	-	-

<i>Candidozyma duobushaemuli</i>	UFMG-CM-Y4453	++	++	++	++	-	-	-
<i>Candidozyma duobushaemuli</i>	UFMG-CM-Y4460	++	++	++	++	-	-	-
<i>Candidozyma duobushaemuli</i>	UFMG-CM-Y756	++	++	++	++	+	-	-
<i>Candidozyma duobushaemuli</i>	UFMG-CM-Y7571	++	++	++	++	-	-	-
<i>Candidozyma heveicola</i>	UFMG-CM-Y1478	++	++	++	++	-	-	-
<i>Candidozyma heveicola</i>	UFMG-CM-Y5595	++	++	++	++	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	SC5314	++	++	++	++	++	++	-
<i>Candidozyma auris</i>	COL01A	++	++	++	++	++	+	-

Fonte: elaborado pela autora (2025)

6.3 Perfil de susceptibilidade a antifúngicos

O isolado *Candidozyma* sp. 1 UFMG-CM-Y6066 mostrou-se resistente a fluconazol (32,0 ug/mL), voriconazol (2,0 ug/mL), itraconazol (4,0 ug/mL) e á anfotericina B (2,0 ug/mL). Dos isolados de *Candidozyma haemuli*, quatro (44,4%) foram dose-dependente para fluconazol (8,0 – 4,0 ug/mL), três isolados (33,3%) foram resistentes para itraconazol (4,0 – 1,0 ug/mL) e três isolados resistentes (33,33%) para anfotericina B (2,0 ug/mL). No entanto, todos os isolados foram sensíveis à voriconazol (1,0 - 0,03 ug/mL) e epoxiconazol (8,0 – 0,25 ug/mL) (utilizando o ponto de corte e dosagem de FLC).

Para o grupo *Candidozyma* sp. quatro isolados foram dose-dependente (40%) para fluconazol (16,0 ug/mL) e um isolado UFMG-CM-Y6066 resistente (32,0 ug/mL). Sete isolados resistentes a itraconazol (70%) (4,0 - 2,0 ug/mL) e um dose-dependente (10%) (1,0 ug/mL). Cinco isolados dose-dependente para voriconazol (50%) (2,0 – 1,0 ug/mL). Seis resistentes para anfotericina B (60%) (2,0 ug/mL). Todos os isolados foram sensíveis para epoxiconazol.

Para os isolados de *Candidozyma duobushaemuli* teve-se somente um isolado UFMG-CM-Y4460 resistente para itraconazol (25%) com CIM de 1,0 ug/mL e dois isolados dose-dependentes (50%) para anfotericina B (1,0 ug/mL). No entanto todos os isolados de *C. duobushaemuli* testados foram sensíveis para voriconazol e epoxiconazol. Para os isolados de *Candidozyma heveicola* testados, observou-se um isolado UFMG-CM-Y5595 dose-dependente para fluconazol (8,0 ug/mL), enquanto o isolado UFMG-CM-Y1478 foi dose-dependente para

anfotericina B (50%) (1,0 ug/mL). Para os antifúngicos, voriconazol, epoxiconazol e itraconazol todos os isolados de *C. heveicola* testados foram sensíveis (Tabela 7).

Posteriormente, os isolados do grupo *Candidozyma* sp. (4), pertencentes à mesma espécie, foram testados quanto à susceptibilidade às equinocandinas. Após o teste foi observado que todos os isolados desta espécie foram sensíveis a micafungina (0,25 - 0,125 ug/mL), caspofungina (0,25 - 0,5 ug/mL) e anidulafungina (0,25 - 0,5 ug/mL) (Tabela 8).

Tabela 7- Perfil de suscetibilidade a antifúngicos dos isolados pertencentes ao complexo *haemuli-auris*

<i>Candidozyma haemuli</i>	CIM (mg/L)				
	FLC	ITR	VOR	AMB	EPOXI
UFMG-CM-Y7579	0,25	0,125	0,03	0,125	0,5
UFMG-CM-Y4035	4,0	4,0	1,0	0,03	2,0
UFMG-CM-Y4059	0,06	0,06	0,015	0,5	0,25
UFMG-CM-Y4157	0,25	0,125	0,125	0,03	0,5
UFMG-CM-Y4375	1,0	0,25	0,06	1,0	0,5
UFMG-CM-Y7534	8,0	4,0	1,0	0,25	4,0
UFMG-CM-Y7572	8,0	1,0	1,0	2,0	4,0
UFMG-CM-Y7573	16,0	0,5	1,0	2,0	8,0
UFMG-CM-Y7574	4,0	0,5	0,5	2,0	4,0
<i>Candidozyma sp.</i>					
UFMG-CM-Y7469 (1)	0,125	0,015	0,015	0,06	0,25
UFMG-CM-Y7127 (2)	4,0	0,5	0,125	0,5	2,0
UFMG-CM-Y6408 (3)	8,0	1,0	2,0	0,25	4,0
UFMG-CM-Y6065 (4)	16,0	4,0	2,0	2,0	4,0
UFMG-CM-Y6066 (4)	32,0	4,0	2,0	2,0	8,0
UFMG-CM-Y7528 (4)	8,0	4,0	1,0	2,0	4,0
UFMG-CM-Y7529 (4)	16,0	2,0	2,0	2,0	8,0
UFMG-CM-Y7530 (4)	16,0	2,0	1,0	2,0	4,0
UFMG-CM-Y7531 (4)	16,0	4,0	1,0	2,0	4,0
UFMG-CM-Y7575 (5)	4,0	4,0	0,5	0,06	2,0
<i>Candidozyma duobushaemuli</i>					
UFMG-CM-Y4453	1,0	0,125	0,125	0,5	1,0
UFMG-CM-Y4460	4,0	1,0	0,25	1,0	1,0
UFMG-CM-Y756	4,0	0,25	0,06	0,125	0,25
UFMG-CM-Y7571	4,0	0,25	0,25	1,0	2,0
<i>Candidozyma heveicola</i>					
UFMG-CM-Y1478	0,5	0,5	0,06	1,0	1,0
UFMG-CM-Y5595	8,0	2,0	1,0	0,06	8,0

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Tabela 8- Perfil de suscetibilidade a equinocandinas dos isolados *Candidozyma sp.* (4) isolados de *Ipomoea sp.*

<i>Candidozyma sp.</i> (4)	CAS	MCF	AND		
UFMG-CM-Y6065	0,25	0,125	0,5		
UFMG-CM-Y6066	0,25	0,25	0,25		
UFMG-CM-Y7529	0,25	0,125	0,25		
UFMG-CM-Y7530	0,5	0,25	0,25		
UFMG-CM-Y7528	0,5	0,25	0,25		
UFMG-CM-Y7531	0,5	0,25	0,25		
<i>Candida albicans</i>					
SC5314	0,125	0,06	0,06		
<i>Candidozyma auris</i>					
COL10A	1,0	2,0	1,0		
<i>Candida albicans</i>					
SC5314	≥ 2,0	0,25	0,25	≥ 1,0	2,0
<i>Candidozyma auris</i>					
COL01A	≥ 64,0	8,0	4,0	2,0	8,0

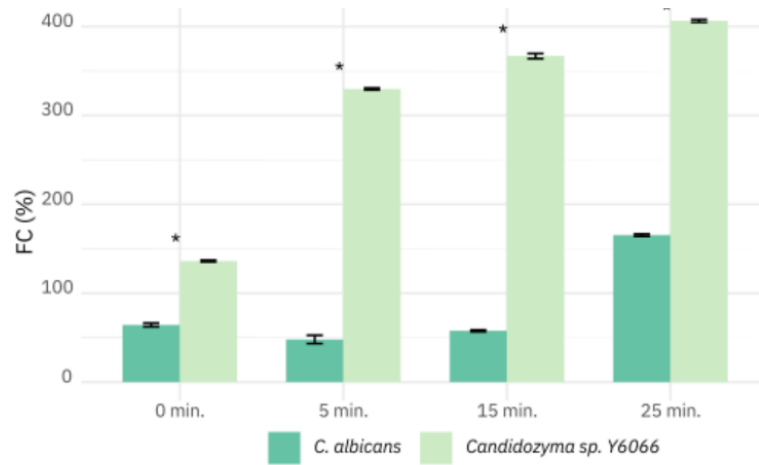
Fonte: Elaborado pela autora (2025)

6.3.1 Bomba de efluxo do tipo ABC: mecanismo de resistência a azóis

Para este teste foi utilizado o isolado de *Candidozyma sp.* (4) (UFMG-CM-Y 6066), um isolado ambiental resistente ao fluconazol (CIM 32 µg/mL). Pode-se observar que o isolado a UFMG-CM- Y6066 exibiu um efluxo de R6G significativamente ($p < 0,05$, teste não paramétrico de Wilcoxon) maior que o controle utilizado (*Candida albicans* – SC5314).

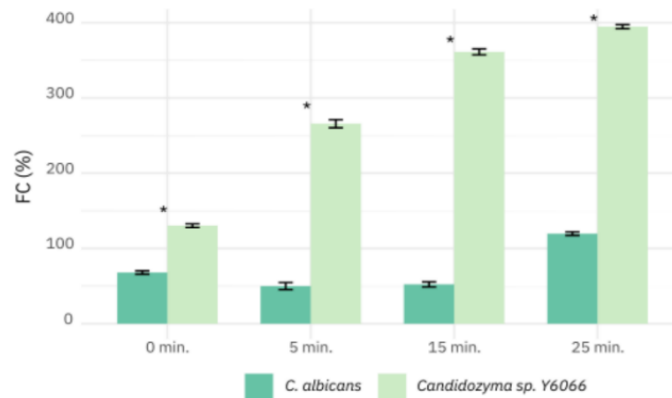
Quando foi feita a observação em diferentes tempos, podemos observar que o isolado de *Candidozyma* testado, com valores 5, 7 e 2 vezes maior em 5, 15 e 25 minutos, respectivamente, em relação a *Candida albicans* (Figura 2). Quando ambos os isolados foram testados na presença de fluconazol, não foi observada diferença significativa na presença ou ausência deste antifúngico, indicando que a presença de fluconazol não influenciou de maneira relevante o comportamento do efluxo de Rodamina 6G em *Candidozyma sp.* Y6066 e em *Candida albicans* (Figura 3).

Figura 2- Atividade da bomba de efluxo com *C. albicans* (SC5314) e *Candidozyma sp.* (4) Y6066 na ausência FLC.



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Figura 3- Atividade da bomba de efluxo com *C. albicans* (SC5314) e *Candidozyma sp.* (4) Y6066 na presença FLC.



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

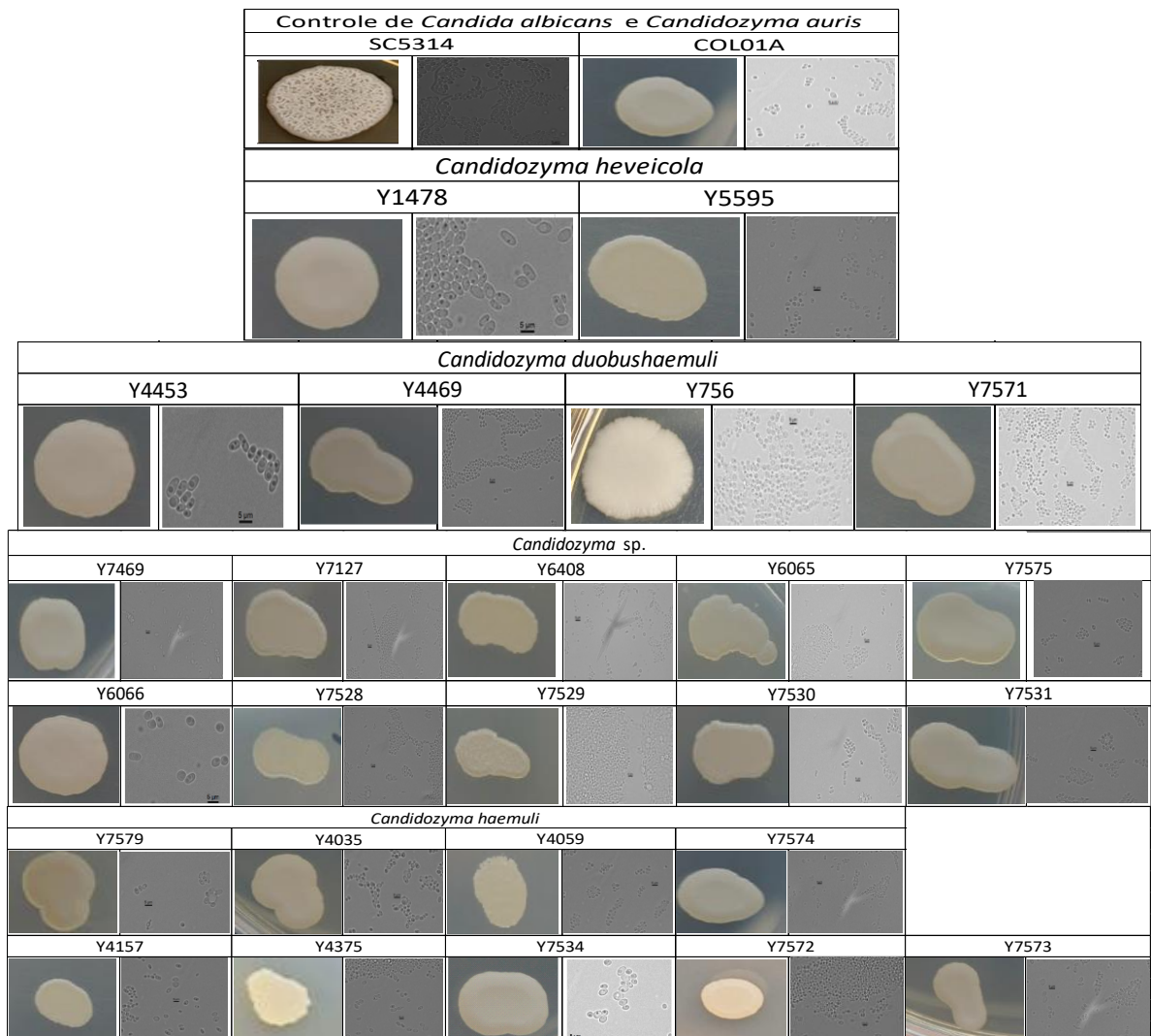
Indicam diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos, Barras verde-escuro representam o efluxo de *C. albicans*. Barras verde-claro representam o efluxo *Candidozyma sp. Y6066*.

6.4 Pesquisa de fatores de virulência

6.4.1 Estudo da morfogênese das linhagens

No presente trabalho, as leveduras selecionadas foram desafiadas com relação a fatores indutores de filamentação com altas temperaturas (37°C) com limitação de nitrogênio, em ágar Spider. Para isto, a espécie *Candida albicans* (SC5314) e *Candidozyma auris* (COL01A) foram utilizadas como controle. Neste teste, o isolado de *C. albicans* SC5314 apresentou aparência filamentososa e quando as células foram visualizadas em microscópio óptico, observou-se a prevalência de hifas e pseudo-hifas (Figura 4). Enquanto, o isolado de *C. auris* testado, apresentou morfologia lisa no meio Spider e células leveduriformes quando visualizadas em microscópio óptico (Figura 4). Em relação às leveduras do clado *auris-haemuli*, nenhuma apresentou um perfil de filamentação como o isolado SC5314 de *C. albicans* em meio Spider (Tabela 9). Quando visualizadas em microscópio óptico, foi possível perceber a presença de células individuais, sem a formação de hifas ou pseudo-hifas (Figura 4).

Figura 4- Macroscopia de colônias do gênero *Candidozyma* em ágar Spider. Capturada com a câmera de um smartphone Samsung A54, em resolução de 12 MP/4K.



Fonte: Arquivo pessoal (2025)

Tabela 9- Resultados para as linhagens testas a 37 °C por 7 e 15 dias cultivadas em ágar Spider.

Espécies	7 dias	15 dias
<i>Candidozyma haemuli</i>		
UFMG-CM-Y7579	-	-
UFMG-CM-Y4035	-	-
UFMG-CM-Y4059	-	-
UFMG-CM-Y4157	-	-
UFMG-CM-Y4375	-	-
UFMG-CM-Y7534	-	-
UFMG-CM-Y7572	-	-
UFMG-CM-Y7573	-	-
UFMG-CM-Y7574	-	-
<i>Candidozyma sp.</i>		
UFMG-CM-Y7469 (1)	-	-
UFMG-CM-Y7127 (2)	-	-
UFMG-CM-Y6408 (3)	-	-
UFMG-CM-Y6065 (4)	-	-
UFMG-CM-Y6066 (4)	-	-
UFMG-CM-Y7528 (4)	-	-
UFMG-CM-Y7529 (4)	-	-
UFMG-CM-Y7530 (4)	-	-
UFMG-CM-Y7531 (4)	-	-
UFMG-CM-Y7575 (5)	-	-
<i>Candidozyma duobushaemuli</i>		
UFMG-CM-Y4453	-	-
UFMG-CM-Y4460	-	-
UFMG-CM-Y756	-	-
UFMG-CM-Y7571	-	-
<i>Candidozyma heveicola</i>		
UFMG-CM-Y1478	-	-
UFMG-CM-Y5595	-	-
<i>Candida albicans</i>		
SC5314	+	+
<i>Candidozyma auris</i>		
COL01A	-	-

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

6.4.2 Teste de adesão a células epiteliais bucais de leveduras oportunistas

Para o teste de adesão foram selecionados dois representantes do grupo *Candidozyma haemuli*, sendo um isolado clínico UFMG-CM-Y7534 e um isolado ambiental isolado de basidiomiceto *Rigidoporus biokoensis* UFMG-CM-Y7573. Para o grupo *Candidozyma* sp. todos os isolados foram selecionados. Para *Candidozyma duobushaemuli*, foi selecionado o isolado UFMG-CM-Y4460 proveniente de água do mar (Rio de Janeiro) e para *Candidozyma heveicola* UFMG-CM-Y5595, isolado de Nectário de *Tabebuia* sp. em Belo Horizonte. A escolha foi baseada de acordo com os resultados de suscetibilidade a antifúngicos, sendo representantes de cada grupo que apresentaram valores de CIM mais altos.

Os isolados que apresentaram menos adesão às CEBs foram UFMG-CM-Y5595, UFMG-CM-Y7127, UFMG-CM-Y7530, UFMG-CM-Y7469 e UFMG-CM-Y7575 com médias de 1 e 3 leveduras aderidas a cada 50 CEBs. Já as espécies que apresentaram maiores índices de adesão foram UFMG-CM-Y7573 e UFMG-CM-Y6066 (Tabela 10). O controle positivo utilizado no experimento foi a cepa padrão de *Candida albicans* SC5314. A SC5314 apresentou uma média de 198 leveduras aderidas por 50 CEBs, com 84% das CEBs colonizadas.

Os isolados de *Candidozyma haemuli* testados foram UFMG-CM-Y7534 e UFMG-CM-Y7573, ambos demonstrando alta adesão às CEBs. O isolado UFMG-CM-Y7573 apresentou 140 leveduras aderidas por 50 CEBs e 88% das CEBs colonizadas, sendo um dos índices mais altos entre todos os isolados analisados. Já o isolado UFMG-CM-Y7534 mostrou 135 leveduras aderidas e 85% de adesão, valores também elevados.

Do grupo *Candidozyma* sp. tivemos variações nos resultados de CEBs. O único isolado classificado como *Candidozyma* sp. (1) foi o UFMG-CM-Y7469, que apresentou uma adesão intermediária, com 107 leveduras aderidas e 82% das CEBs colonizadas. Enquanto, o isolado UFMG-CM-Y7127, classificado como *Candidozyma* sp. (2), foi um dos que apresentaram os menores índices de adesão, com 102 leveduras aderidas por 50 CEBs e apenas 68% das CEBs colonizadas. O isolado UFMG-CM-Y6408, classificado como *Candidozyma* sp. (3), apresentou uma adesão moderada, com 115 leveduras aderidas e 77% das CEBs colonizadas.

Já os isolados classificados como *Candidozyma* sp. (4) apresentaram grande variação nos índices de adesão. Sendo UFMG-CM-Y6066 e UFMG-CM-Y7529 os isolados com maior capacidade de leveduras aderidas dentro deste grupo, sendo 141 células aderidas e 76% de adesão, 122 leveduras aderidas e 94% de adesão, respectivamente. Enquanto, UFMG-CM-Y7530 com 107 leveduras aderidas e 82% de adesão, sendo o isolado desta espécie com menor capacidade de adesão.

O isolado UFMG-CM-Y7575, classificado como *Candidozyma* sp. (5), apresentou um dos menores índices de adesão geral, com 107 leveduras aderidas e 82% das CEBs colonizadas. Já as demais espécies, como o isolado UFMG-CM-Y4460, classificado como *Candidozyma duobushaemuli*, apresentou uma adesão intermediária, com 115 leveduras aderidas e 77% das CEBs colonizadas. E o isolado UFMG-CM-Y5595, classificado como *Candidozyma heveicola*, teve o pior desempenho entre todos os isolados analisados, com 102 leveduras aderidas e apenas 68% das CEBs colonizadas.

6.4.3 Ensaio de formação de Biofilme in vitro

Para o ensaio de formação de biofilme foram utilizados os mesmos isolados do experimento de adesão celular citado acima (Figura 6). Os valores de absorvância medidos estão diretamente relacionados à quantidade de biomassa formada, onde maiores valores refletem uma matriz de biofilme mais densa. Pode-se observar, após o teste, que todos os isolados testados foram capazes de produzir biofilme após 48 h de incubação a 37 °C. O controle *Candida albicans* (SC5314) teve absorvância média de 0.334 (Figura 6).

O grupo *Candidozyma haemuli* composto por UFMG-CM-Y7534 e UFMG-CM-Y7573 apresentou valores de absorvância próximos à média do controle SC5314, sendo, 0.310 e 0.212, respectivamente. Ambos os isolados produziram biofilmes, mas com menor densidade em comparação ao controle. O grupo *Candidozyma* sp. composto pelas espécies agrupadas em 1,2,3,4 e 5, foi o grupo mais diversificado em termos de valores de absorvância. Os isolados do grupo *Candidozyma* sp. (4), como UFMG-CM-Y6065 e UFMG-CM-Y6066, apresentaram médias similares ao controle, com valores de absorvância de 0.393 e 0.301, respectivamente. Enquanto, UFMG-CM-Y7528 e UFMG-CM-Y7531, destacaram-se com médias inferiores, sugerindo menor capacidade de formação de biofilme, 0.302 e 0.288.

Os isolado UFMG-CM-Y7469 *Candidozyma* sp. (1) e UFMG-CM-Y7469 *Candidozyma* sp. (2) apresentaram valores intermediários de absorvância, sugerindo formação de biofilmes menos robustos do que o isolado controle, sendo, os valores de absorvância de 0.189 e 0.324, respectivamente.

O isolado representante do grupo *Candidozyma duobushaemuli* UFMG-CM-Y4460 apresentou valor de absorvância superior ao controle SC5314, indicando uma capacidade de formação de biofilme moderada, mas significativa em comparação ao controle, com valor de absorvância 0.410. Enquanto o isolado UFMG-CM-Y5595 representante do grupo *Candidozyma heveicola*, apresentou média menor (0.219) de absorvância que *Candida*

albicans. No entanto, este isolado teve a maior barra de erro. Isso indica que houve grande variabilidade entre as réplicas do ensaio, sugerindo que a capacidade de formação de biofilme deste isolado pode ser inconsistente ou sensível a fatores experimentais.

Apesar das variações observadas entre os grupos e o controle, a análise estatística pelo teste t indicou que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados ($p > 0,05$). Isso pode estar relacionado à similaridade dos valores médios entre os isolados (Figura 6).

Além disso, realizou-se microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes formados pelos isolados *Candidozyma* sp. (4) UFMG-CM-Y6065 e *Candida albicans* SC5314. Após a análise da MEV observou-se que o biofilme formado por *Candidozyma* UFMG-CM-Y6065 apresentou uma estrutura tridimensional mais profunda, com a presença de inúmeros blastoconídeos agrupados, porém não foi possível observar a presença de hifas ou pseudo-hifas. Enquanto o biofilme formado pela *Candida albicans* SC5314 se caracteriza por uma organização mais linear, porém com a presença de inúmeras hifas, algumas pseudo-hifas e poucos blastoconídeos. No entanto, com a metodologia utilizada no presente trabalho, para a MEV, não foi possível observar a presença da matriz do biofilme em ambas as leveduras estudadas (Figura 7).

6.5 Caracterização fisiológica e avaliação de fenótipos

6.5.1 Assimilação de diferentes fontes de carbono e nitrogênio em meio sólido

A avaliação da assimilação de diferentes fontes de carbono e nitrogênio incluiu espécies previamente descritas e utilizadas no trabalho (*Candidozyma haemuli*, *C. duobushaemuli* e *C. heveicola*) e novas linhagens do gênero *Candidozyma* (sp. 1 a sp. 5). Para simplificação, foi selecionado um representante de cada espécie na Tabela 11, já que isolados da mesma espécie apresentaram resultados idênticos.

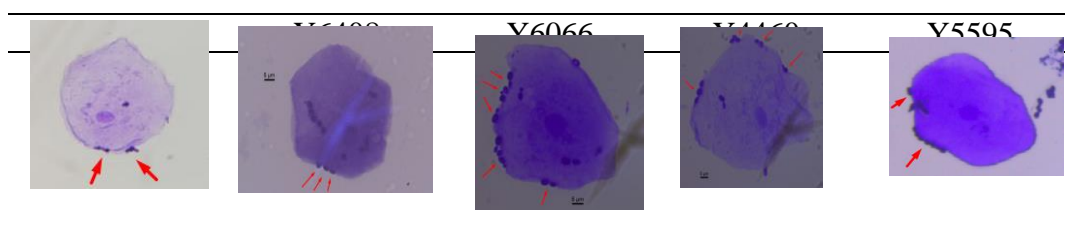
A Tabela 11 destaca diferenças no perfil de assimilação de carbono entre as espécies. *C. haemuli* e *C. duobushaemuli* apresentaram assimilação fraca (w) de trealose, enquanto *C. heveicola* e *Candidozyma* sp. (1 a 5) mostraram assimilação positiva (+). Todas as linhagens testadas assimilaram etanol e L-sorbose, variando entre fraco (w) e positivo (+). Nenhuma espécie assimilou D-xilose, L-arabinose, eritritol, glicerol, ribitol, DL-lactato, succinato, citrato de sódio, hexadecano, glucosamina, xilitol ou amido solúvel; apenas uma assimilação fraca foi observada em relação ao amido solúvel.

Quanto à tolerância a cicloheximida (0,01%), *Candidozyma* sp. (1, 2, 3 e 5) (UFMG-CM-Y7575, UFMG-CM-Y7469, UFMG-CM-Y7127, UFMG-CM-Y6408) assimilaram positivamente. *C. haemuli* (UFMG-CM-Y4375) e *Candidozyma* sp. 4 (UFMG-CM-Y6066) apresentaram assimilação fraca. E *C. duobushaemuli* (UFMG-CM-Y4453) e *C. heveicola* (UFMG-CM-Y1478) não assimilaram. A presença de 10% de NaCl foi assimilada por *C. haemuli* (UFMG-CM-Y4375), *C. duobushaemuli* (UFMG-CM-Y4453), *C. heveicola* (UFMG-CM-Y1478), *Candidozyma* sp. 4 (UFMG-CM-Y6066) e *Candidozyma* sp. 1 (UFMG-CM-Y7469), enquanto *Candidozyma* sp. 5 (UFMG-CM-Y7575) demonstrou assimilação fraca. *Candidozyma* sp. 2 e 3 (UFMG-CM-Y7127 e UFMG-CM-Y6408) não assimilaram.

Tabela 10- Adesão de leveduras do complexo *haemuli-auris* em células epiteliais bucais (CEB).

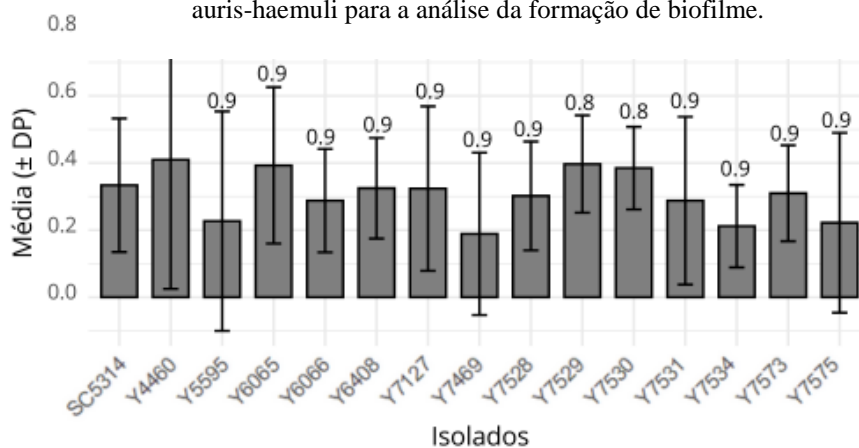
Espécie	Isolado	Total de leveduras aderidas em 50 CEB	Porcentagem de CEB com leveduras
<i>Candidozyma haemuli</i>	Y7534	135	85%
<i>Candidozyma haemuli</i>	Y7573	140	88%
<i>Candidozyma sp.</i> (1)	Y7469	107	82%
<i>Candidozyma sp.</i> (2)	Y7127	102	68%
<i>Candidozyma sp.</i> (3)	Y6408	115	77%
<i>Candidozyma sp.</i> (4)	Y6065	139	80%
<i>Candidozyma sp.</i> (4)	Y6066	141	76%
<i>Candidozyma sp.</i> (4)	Y7528	117	79%
<i>Candidozyma sp.</i> (4)	Y7529	122	94%
<i>Candidozyma sp.</i> (4)	Y7530	107	82%
<i>Candidozyma sp.</i> (4)	Y7531	117	79%
<i>Candidozyma sp.</i> (5)	Y7575	107	82%
<i>Candidozyma duobushaemuli</i>	Y4460	115	77%
<i>Candidozyma heveicola</i>	Y5595	102	68%
<i>Candida albicans</i>	SC5314	198	84%

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Figura 5- Micrografia de células epiteliais bucais (CEB) com leveduras do complexo *haemuli-auris* aderidas (setas vermelhas).

Fonte: Arquivo pessoal (2025)

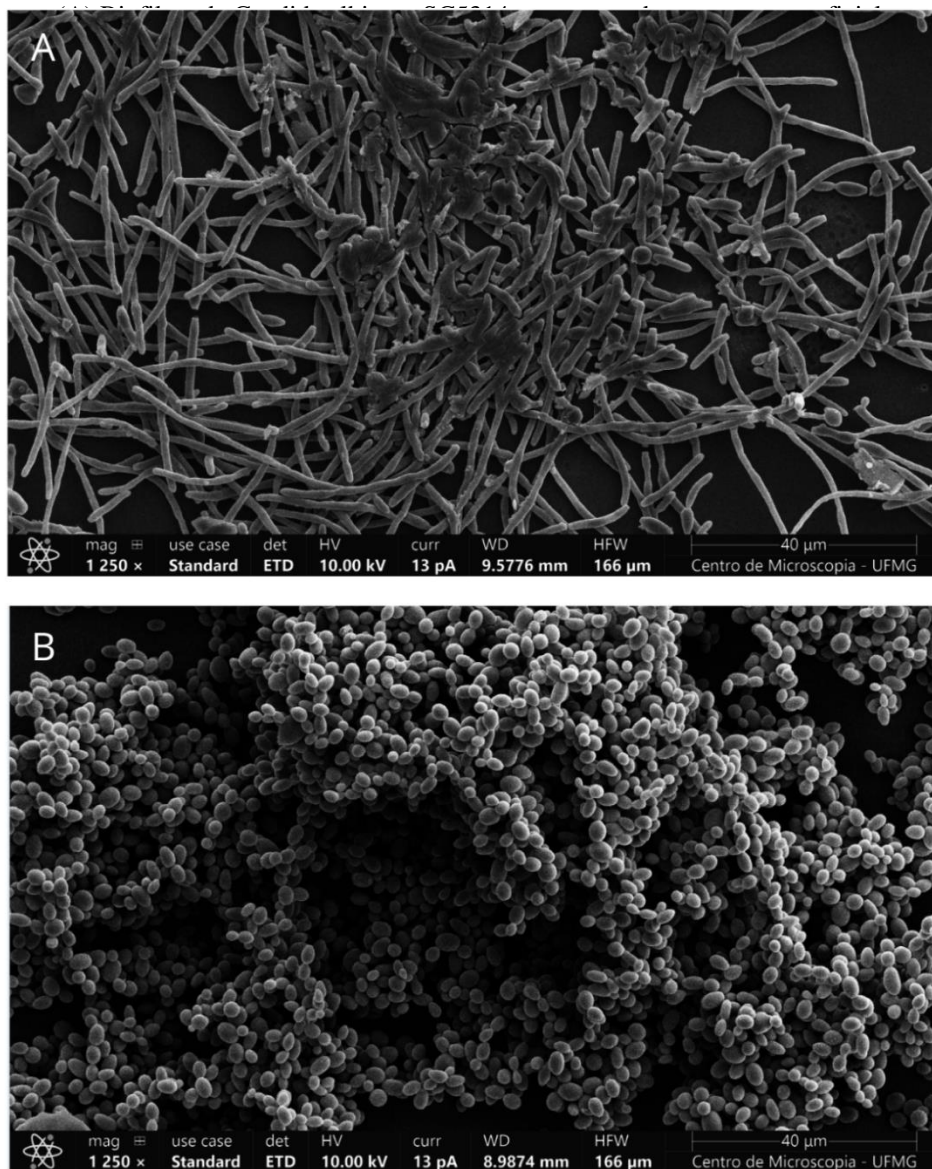
Figura 6- Gráfico da absorvância de biomassa dos isolados do complexo auris-haemuli para a análise da formação de biofilme.



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

As barras representam a média de formação de biofilme. As linhas de erro correspondem ao desvio padrão (\pm DP) da média. E os valores de p (acima das barras) mostram a significância estatística das diferenças em comparação com o isolado de *Candida albicans* SC5314.

Figura 7- Formação qualitativa de biofilmes visualizados em microscopia de varredura (MEV).



Fonte: Arquivo pessoal (2025)

Tabela 11- Assimilação de diferentes fontes de carbono e nitrogênio no clado *haemuli-auris*.

Meio sólidos	<i>Candidozyma haemuli</i>	<i>Candidozyma duobushaemuli</i>	<i>Candidozyma a heveicola</i>	<i>Candidozyma sp.</i>				
	UFMG-CM-Y4375	UFMG-CM-Y4453	UFMG-CM-Y1478	UFMG-CM-Y6065	UFMG-CM-Y7575	UFMG-CM-Y7469	UFMG-CM-Y7127	UFMG-CM-Y6408
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+
L-sorbose	+	w	w	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	w	w	+	+	+	+	+
Trealose	w	w	w	+	-	+	+	+
Lactose	w	-	-	w	-	-	-	-
Melibiose	-	w	-	-	w	-	-	-
Rafinose	+	+	+	-	+	-	+	+
Melizitose	w	w	w	+	-	+	+	+
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido solúvel	w	+	w	w	w	-	-	+
D-xilose	w	w	w	-	+	+	+	+
L-arabinose	-	-	-	w	-	+	+	-
D-arabinose	-	w	-	-	-	-	-	-
D-ribose	+	w	w	-	w	-	-	-
L-raminose	w	+	-	+	-	-	+	-
Etanol	+	+	+	w	+	+	w	w
Glicerol	-	-	-	w	-	+	+	+
Eritritol	-	-	-	-	+	-	-	-
Ribitol (adonitol)	+	w	+	-	+	-	+	+
Galactitol (dulcitol)	+	+	+	+	+	-	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+	-	+	+
D-glucitol (sorbitol)	+	-	-	+	+	+	+	+
Salicina	-	-	-	-	-	+	-	-
DL-Lactato	+	w	w	-	+	-	w	w
Succinato	w	+	w	-	+	+	+	+
Citrato de Sódio	-	-	-	w	-	-	w	w
M-inositol	-	-	-	-	-	-	+	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-	-
Hexadecano	-	w	w	+	-	-	w	w
Glucosamina	w	w	w	-	w	+	+	-
Xilitol	w	w	w	w	-	-	+	+

Acetona	-	-	-	-	-	-	-	-
Etilacetato	-	+	+	-	+	-	-	-
Isopropanol	-	-	-	w	+	-	-	-
Gluconato	-	+	+	-	+	-	-	-
N-acetilglucosamina	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrato	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrito	-	-	-	-	-	-	-	-
Lisina	+	+	+	+	+	-	+	+
YNB s/ aa	+	+	+	+	+	+	+	+
10% NaCl	+	+	+	+	+	w	+	w
Ácido acético	-	-	-	-	-	-	-	-
50% Glicose	-	w	-	-	w	w	-	-
Carbonato	w	-	-	-	+	+	-	-
0,01%Cicloheximida	w	+	-	w	-	+	+	+

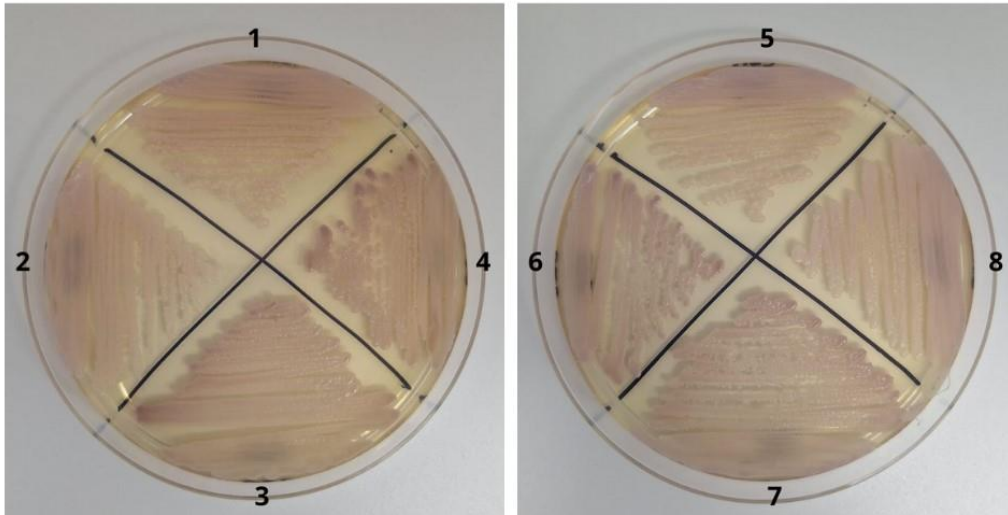
Fonte: Elaborado pela autora (2025)

O experimento foi realizado com todas as amostras, no entanto, como as espécies apresentaram comportamentos idênticos, foi selecionado um representante de cada para inclusão.

6.5.2 Diferenciação morfológica de novas espécies do gênero *Candidozyma* em CHROMagar

Após o cultivo dos isolados no meio CHROMagar Candida, observou-se que as colônias apresentaram coloração lilás-rosa claro, semelhante à observada para *Candidozyma auris* (Figura 8-1). Entre os isolados testados, os de *Candidozyma duobushaemuli* (UFMG-CM-Y4453), *Candidozyma heveicola* (UFMG-CM-Y-1478), *Candidozyma* sp. (2) (UFMG-CM-7127) e *Candidozyma* sp. (3) (UFMG-CM-Y6408) (representados na Figura 8 pelos números 3, 4, 6 e 7) exibiram uma tonalidade ligeiramente mais escura, em comparação aos isolados de *Candidozyma haemuli* (UFMG-CM-Y7574), *Candidozyma* sp. (1) (UFMG-CM-Y7469) e *Candidozyma* sp. (4) (UFMG-CM-Y6066) (Figura 8-2, 5 e 8). O experimento foi conduzido com todas as amostras, mas devido à similaridade nos comportamentos das espécies, foi selecionado um representante de cada grupo para inclusão na imagem.

Figura 8- Foto das colônias dos isolados do Complexo haemuli-auris crescidas em meio CHROmagar a 37°C por 72 horas. 1) *Candidozyma auris* (COL01A). 2) *Candidozyma haemuli* (UFMG-CM-Y7574). 3) *Candidozyma duobushaemuli* (UFMG-CM-Y4453). 4) *Candidozyma heveicola* (UFMG-CM-Y-1478). 5) *Candidozyma* sp. (UFMG-CM-Y7469). 6) *Candidozyma* sp. (UFMG-CM-7127). 7) *Candidozyma* sp. (UFMG-CM-Y6408). 8) *Candidozyma* sp.



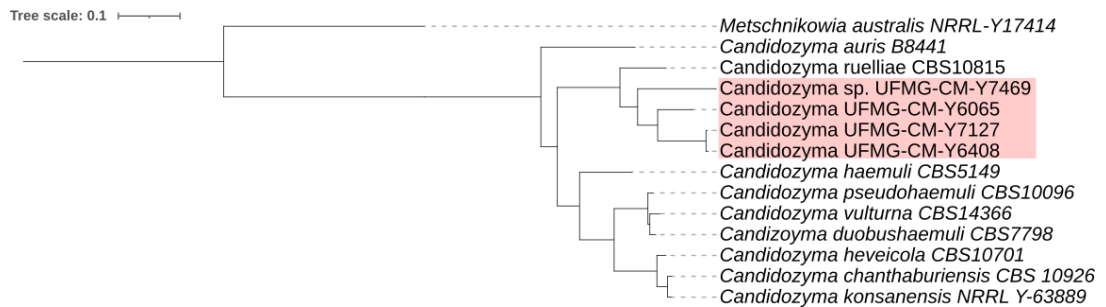
Fonte: Arquivo pessoal (2025)

6.6 Análise filogenética

Com os genomas completos, as espécies foram inseridas dentro do gênero *Candidozyma*. Desse modo, uma árvore filogenômica de máxima verossimilhança (ML) foi reconstruída com base nos 2.226 ortólogos de cópia única identificados pelo BUSCO versão 5.5.0 (Manni et al., 2020) que estavam presentes em todos os membros com genomas completos disponíveis. *Metschnikowia australis* foi usada como grupo externo. Inferimos uma filogenia ML usando iq-tree versão 2.0.7 (Minh et al., 2020), com 1000 réplicas bootstrap ultrarrápidas, um esquema de particionamento e modelos de substituição.

As novas espécies foram filogeneticamente próximas, sendo próximas de *C. Ruelliae* (Figura 9). Os valores de identidade média de nucleotídeos (ANI) foram calculados usando orthoANI (Ortho Average Nucleotide Identity) (Lee et al., 2016). Os valores de OrthoANI acima de 95% geralmente indicam que os isolados pertencem à mesma espécie ou são espécies altamente relacionadas. No gráfico, os isolados *Candidozyma* sp. Y6065, *Candidozyma* sp. Y7127 e *Candidozyma* sp. Y6408 exibem valores elevados de OrthoANI entre si, com destaque para 99,02% entre Y7127 e Y6408, sugerindo que são isolados muito próximos geneticamente. Já o valor de OrthoANI entre *Candidozyma* sp. Y6065 e os outros dois isolados (Y7127 e Y6408) foi menor, 79,52% e 79,37%, respectivamente (Figura 10).

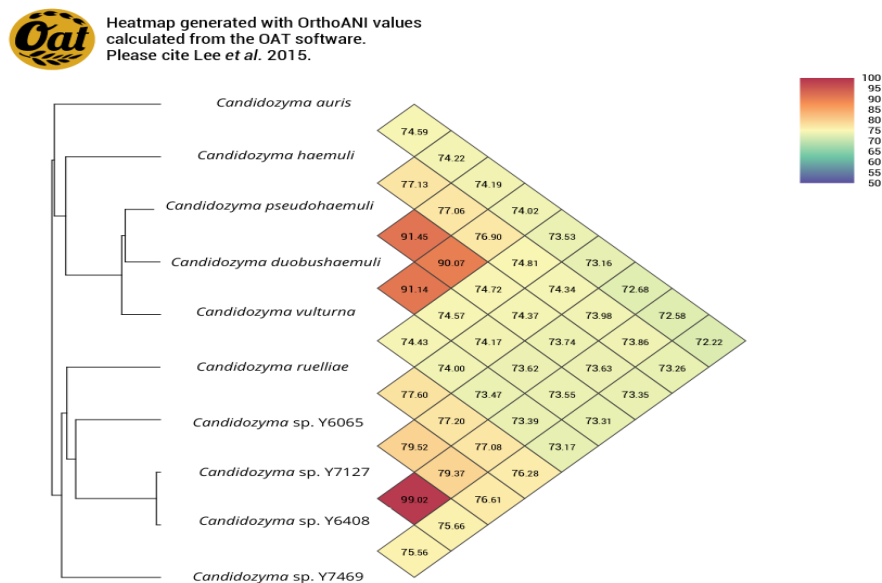
Figura 9- Árvore filogenômica dos isolados do gênero *Candidozyma* sp.



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

A árvore filogenética foi construída com base em dados de genes ortólogos de cópia única, identificados por meio da ferramenta BUSCO (Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs). Foi utilizada uma análise bootstrap com 1000 repetições para avaliar a robustez dos agrupamentos filogenéticos.

Figura 10- Heatmap de valores de OrthoANI (Ortho Average Nucleotide Identity).



Fonte: Arquivo pessoal (2025)

O heatmap exibe os valores de identidade nucleotídica média (OrthoANI) entre os genomas analisados, indicando graus de similaridade genômica. Valores acima de 95% (representados em vermelho) sugerem que os isolados pertencem à mesma espécie ou espécies

intimamente relacionadas, enquanto valores entre 75% e 95% (tons de laranja e amarelo) indicam proximidade genômica entre espécies ou linhagens relacionadas. Valores inferiores a 75% (em verde) apontam para relações mais distantes, caracterizando diferenças interespecies.

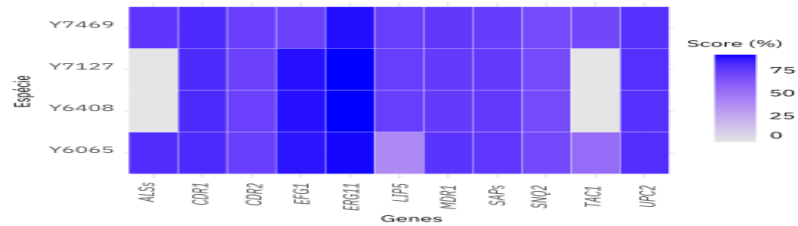
6.7 Análise de genes de resistência

Foram investigadas sequências de genes previamente descritos na espécie *Candidozyma* sp. UFMG-CM-Y7469 (1), UFMG-CM-Y7127 (2), UFMG-CM-Y6408 (3) e UFMG-CM-Y6065 (4), com base em análises BLASTp e BLASTx realizadas com as seguintes espécies, *C. Auris*, *C. Haemuli*, *C. Albicans*, *C. Tropicalis* e *Nakaseomyces glabratus*. Foram selecionadas as sequências de genes que apresentaram uma similaridade superior a 70%.

O gráfico apresentado ilustra a pontuação percentual (score %) de genes associados a fatores de virulência, resistência a antifúngicos e funções específicas em diferentes espécies de leveduras do grupo *Candidozyma* sp. (1), (2), (3) e (4) (UFMG-CM-Y7469, UFMG-CM-Y7127, UFMG-CM-Y6408 e Y6065) (Figura 11). Os genes avaliados incluem *ALSs*, *CDR1*, *CDR2*, *EFG1*, *ERG11*, *LIP5*, *MDR1*, *SAPs*, *SNQ2*, *TAC1* e *UPC2* (Tabela 12). O gene *ERG11* está consistentemente presente em todas as espécies, destacando sua importância central na biossíntese de ergosterol. Por outro lado, o gene *TAC1* e *ALSs* não aparecem nas espécies UFMG-CM-Y7127 e UFMG-CM-Y6498. Já os genes *CDR1*, *ER11* e *UPC2* aparecem com score de mais de 75% em todas as espécies analisadas.

Os genes *CDR2*, *MDR1* e *SNQ2*, relacionados às bombas de efluxo, estão presentes em todas as espécies analisadas, com um score de 75%. O gene *EFG1*, que codifica um fator de transcrição essencial para o controle da morfogênese, apresenta um score superior a 75% nas espécies UFMG-CM-Y7127, UFMG-CM-Y6408 e UFMG-CM-Y6065, enquanto a espécie UFMG-CM-Y7469 exibe um score igual ou inferior a 75%. A família de genes *SAPs*, responsável por codificar proteases aspárticas secretadas, está presente em todas as espécies avaliadas, com um score de 70%.

Figura 11- Heatmap com pontuação percentual (score %) de genes associados a fatores de virulência, resistência a antifúngicos e funções específicas em quatro espécies de leveduras (Y7469, Y7127, Y6408 e Y6065)



Fonte: Arquivo pessoal (2025)

Tabela 12- Descrição dos genes analisados no estudo, incluindo suas respectivas funções. Os genes estão relacionados a fatores de virulência, resistência a antifúngicos e funções específicas em leveduras.

Gene	Função
ERG11	Codifica a enzima 14 α -desmetilase, alvo de antifúngicos azólicos como o fluconazol.
ALSs	Codifica proteínas da família de aglutinina; envolvidas na adesão celular.
SAPs	Codifica aspartil proteases secretadas; associadas à virulência e invasão de tecidos.
CDRs	Codifica transportadores de efluxo ABC, conferindo resistência a medicamentos.
MDR1	Codifica uma bomba de efluxo MFS, associada à resistência antifúngica.
EFG1	Um regulador transcricional essencial para a transição de levedura para hifa e virulência.
TAC1	Um regulador transcricional que controla a superexpressão dos genes CDR1 e CDR2.
SNQ2	Transportador de efluxo ABC; pode conferir resistência a compostos tóxicos.
UPC2	Um regulador transcricional envolvido na biossíntese de esteróis e na resistência antifúngica.

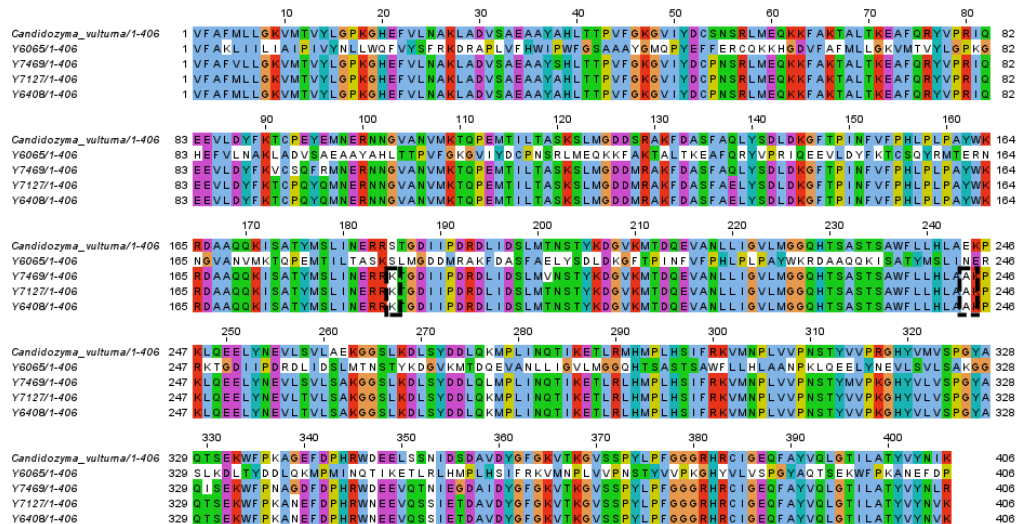
Fonte: Elaborado pela autora (2025)

6.7.1 Análise de similaridade *ERG11* entre as novas espécies

Todas as espécies analisadas demonstraram alta similaridade com o gene *ERG11* de *Candidozyma vulturna* (txid2093215), uma espécie já isolada de flores e de infecções humanas (Du et al., 2023; de Macedo et al., 2024). Os isolados apresentaram os seguintes percentuais de identidade: UFMG-CM-Y6065 com 93,8%, UFMG-CM-Y7469 com 92,6%, UFMG-CM-Y7127 com 94,8% e UFMG-CM-Y6408 com 94,8%.

Curiosamente, as espécies UFMG-CM-Y7127, UFMG-CM-Y6408 e UFMG-CM-Y7469 apresentam regiões conservadas nas posições 185 e 244, com os aminoácidos lisina (K) e Alanina (A), respectivamente (Figura 12). Embora as leveduras UFMG-CM-Y7127 e UFMG-CM-Y6408 tenham sido isoladas na mesma região, porém de substratos diferentes, possuem sequências 100% similares neste gene.

Figura 12- Análise de alinhamento de sequências ERG11 realizado por Clustal no Jalview.

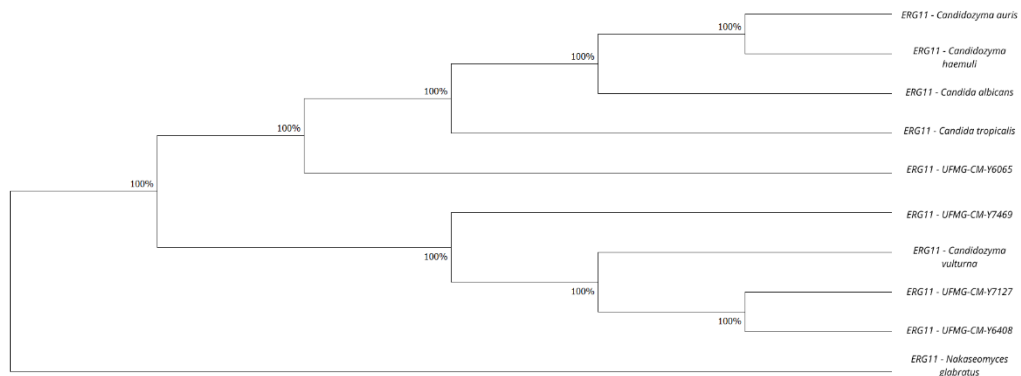


Fonte: Arquivo pessoal (2025)

O alinhamento foi realizado pelo software Clustal no Jalview. As cores indicam diferentes níveis de conservação e mudanças nas sequências: Vermelho/laranja/roxo - Regiões altamente conservadas com poucas variações. Azul/verde - Regiões menos conservadas com maior variação. Marcadores destacam regiões dentro dos quadrados pretos, indicando áreas extremamente conservadas entre as três espécies novas analisadas.

A análise filogenética do gene *ERG11* revelou padrões distintos de similaridade entre os isolados de leveduras estudados, indicando possíveis implicações ecológicas e clínicas. Observa-se que os isolados UFMG-CM-Y7469, UFMG-CM-Y6408 e UFMG-CM-Y7127 apresentaram alta similaridade com o gene *ERG11* de *Candidozyma vulturna*, sugerindo uma proximidade filogenética e, possivelmente, funcional com esta espécie. O gene *ERG11* do isolado UFMG-CM-Y6065 apresentou uma relação filogenética estreita com os genes de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candidozyma haemuli* e *Candidozyma auris* (Figura 13).

Figura 13- Árvore filogenética do gene *ERG11*, incluindo os ortólogos de diferentes isolados de *Candidozyma* e *Candida*.

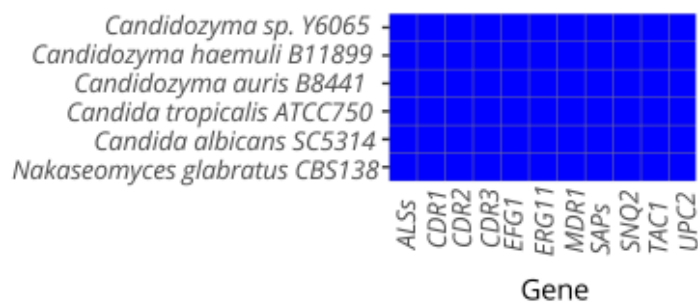


Fonte: Elaborado pela autora (2025)

6.7.2 Análise de genes de resistência na espécie UFMG-CM-Y6065

O genoma anotado de *Candidozyma* sp. UFMG-CM-Y6065 contém uma única cópia do gene *ERG11* e do fator de transcrição *UPC2*, responsável por regular a biossíntese de ergosterol (Figura 14). Além disso, foram identificados genes de proteínas de efluxo MDR1, SNQ2 e CDRs pertencentes à classe dos transportadores ABC (cassete de ligação de ATP) e da superfamília dos transportadores facilitadores principais (MFS), ambos associados à resistência fúngica em patógenos (Figura 14).

Figura 14- Presença de genes de resistência em *Candidozyma* sp. UFMG-CM-Y6065.



Fonte: Arquivo pessoal (2025)

Representação da presença (em azul) de genes associados à resistência antifúngica em diferentes espécies do gênero *Candidozyma*.

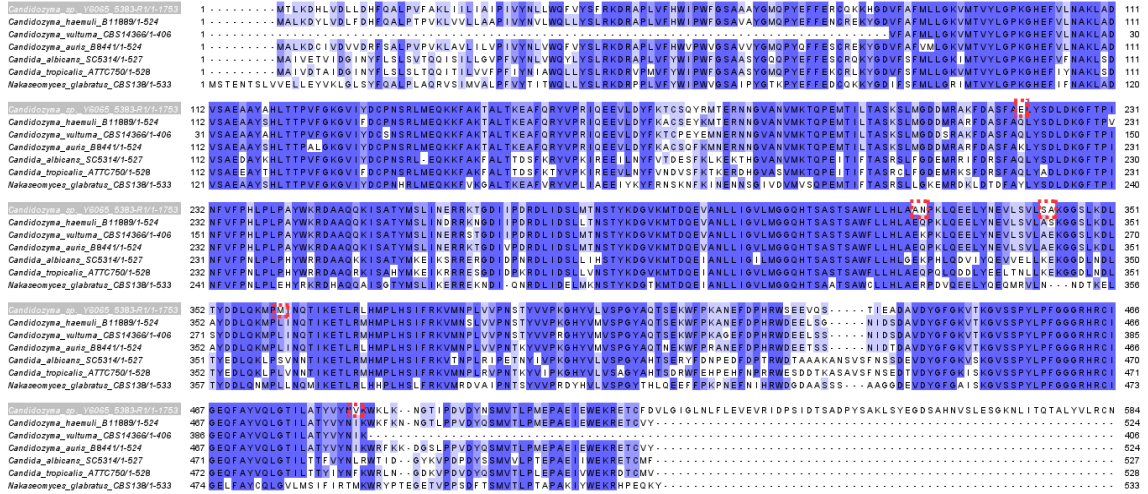
6.7.3 Análise da Proteína *ERG11*

Para compreender o mecanismo de resistência aos azóis, investigou-se a presença de mutações pontuais no gene *ERG11* da espécie *Candidozyma sp.* UFMG-CM-Y6065, previamente descritas em outras espécies, para fins comparativos. No entanto, não foram encontradas mutações semelhantes às já relatadas nas espécies analisadas neste trabalho, como *C. haemuli*, *C. vulturna*, *C. auris*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *Nakaseomyces glabratus*. Por outro lado, foram identificadas substituições em regiões conservadas na espécie *Candidozyma sp.* (4) UFMG-CM-Y6065.

Entre essas substituições, destaca-se a troca por ácido glutâmico (E) na posição 218, sendo que, em *Candidozyma auris*, ocorre lisina (K), em *Nakaseomyces glabratus*, tirosina (T), e, nas demais espécies analisadas, glutamina (Q). Nas posições 224 e 225, observou-se a presença de alanina (A) e asparagina (N) em UFMG-CM-Y6065, enquanto nas espécies comparadas, a posição 224 apresenta ácido glutâmico (E). Já na posição 225, *C. auris*, *C. haemuli* e *C. tropicalis* apresentam glutamina (Q), enquanto *C. vulturna* e *C. albicans* possuem lisina (K), e *N. glabratus*, arginina (R).

Nas posições 241 e 242, a espécie UFMG-CM-Y6065 apresenta serina (S) e alanina (A), respectivamente. Em contrapartida, nas espécies do clado CAH (*C. haemuli*, *C. vulturna* e *C. auris*), a posição 241 é ocupada por alanina (A), enquanto na posição 242 observa-se alanina (A) em *C. haemuli* e ácido glutâmico (E) em *C. auris*, *C. vulturna*, *C. albicans* e *C. tropicalis*. Na posição 364, identificou-se metionina (M) em UFMG-CM-Y6065, enquanto *C. albicans* apresenta serina (S) e as demais espécies, valina (V). Por fim, na posição 493, as espécies do clado CAH apresentam isoleucina (I), enquanto UFMG-CM-Y6065 exibe uma substituição por valina (V) (Figura 15).

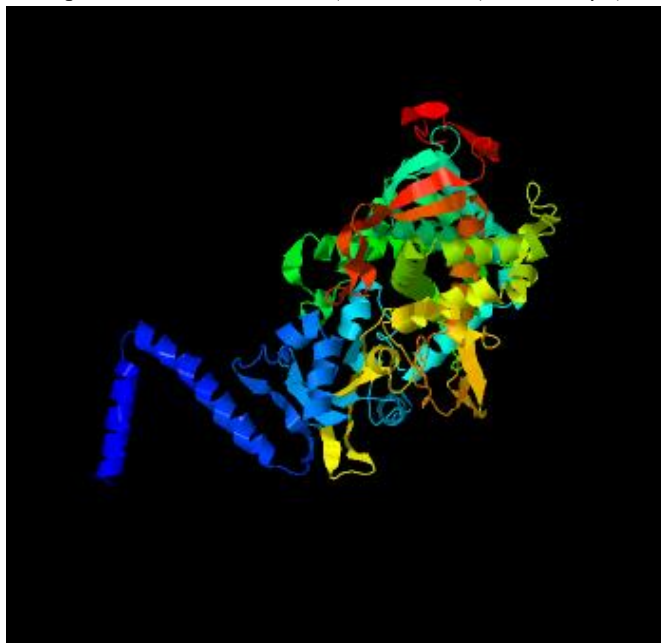
Figura 15- Alinhamentos múltiplos de seqüências de aminoácidos (aa) do gene ERG11 usando Jalview de isolados clínicos de *Candidozyma haemuli*, *Candidozyma vulturna*, *Candidozyma auris*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Nakaseomyces glabratus* em comparação com a cepa ambiental *Candidozyma sp.* UFMG-CM-Y6065.

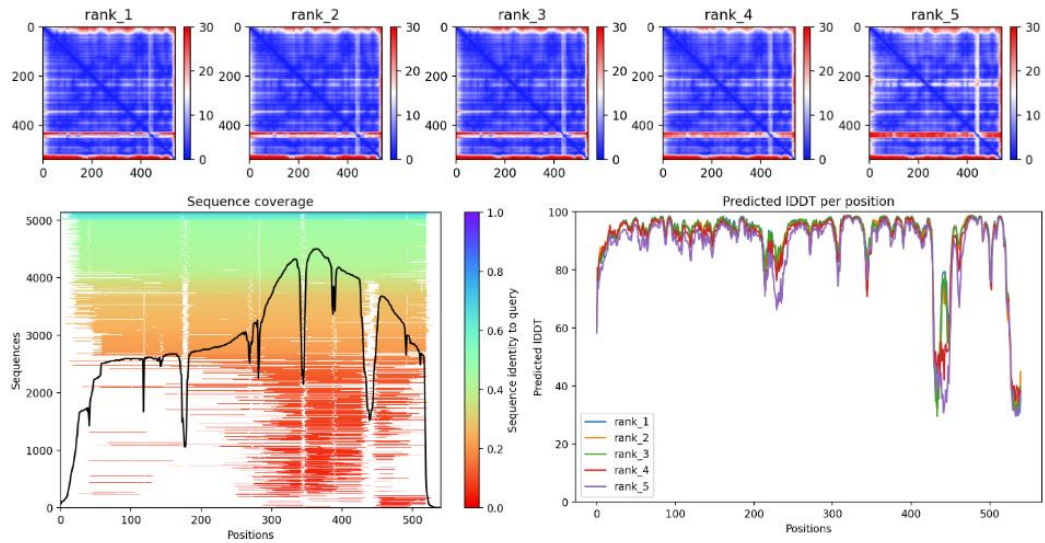


Fonte: Arquivo pessoal (2025)

Ao analisar a estrutura tridimensional da proteína codificada pelo gene *ERG11* da levedura UFMG-CM-Y6065, é possível explorar de forma mais detalhada o impacto potencial das diferenças na seqüência de aminoácidos sobre a função, estabilidade e interações moleculares. Os resultados desta análise mostraram que, apesar das diferenças observadas na seqüência de aminoácidos, a conformação geral da proteína *ERG11* foi mantida em relação às proteínas de espécies relacionadas (Figura 16) e (Figura 17).

Figura 16- Estrutura tridimensional predita para a proteína ERG11 utilizando ColabFold (AlphaFold). Representação tridimensional da proteína ERG11, destacando as características estruturais preditas, como hélices α (em vermelho) E folhas β (em amarelo).

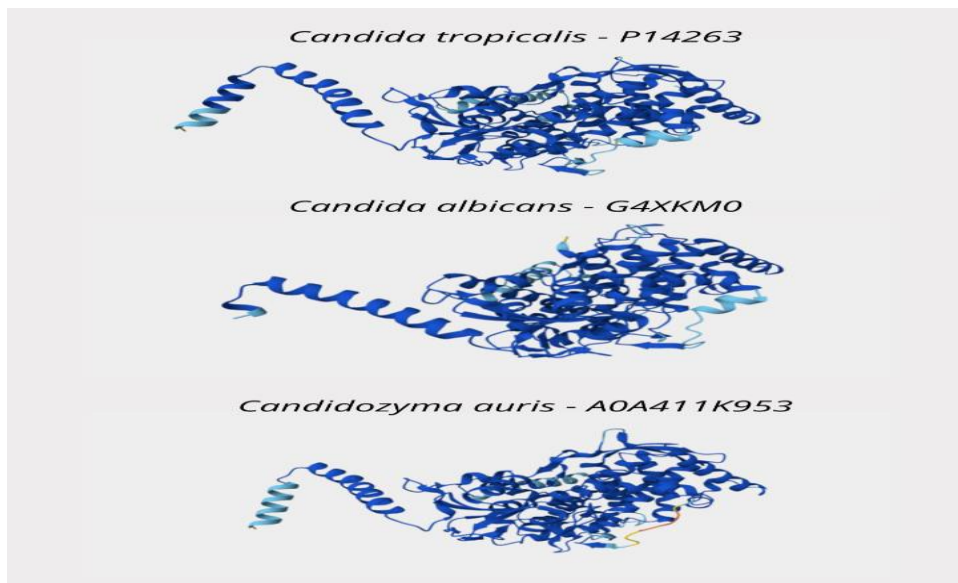




Fonte: Arquivo pessoal (2025)

A análise foi realizada com o ColabFold, baseado no modelo AlphaFold, proporcionando uma visualização detalhada da arquitetura da proteína.

Figura 17- Proteínas de *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. auris* depositadas no UniProt. As proteínas relacionadas à espécie *Candidozyma* sp. UFMG-CM-Y6065 foram obtidas a partir do banco de dados UniProt para fins de comparação.



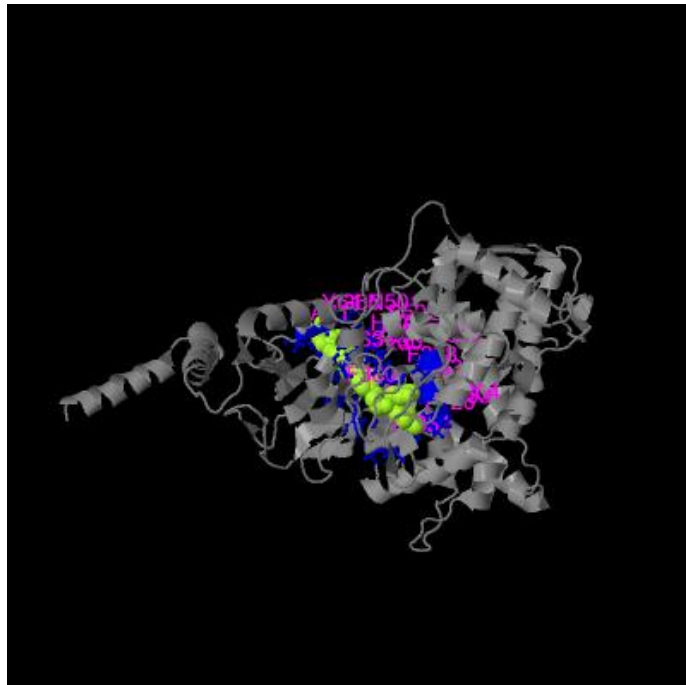
Fonte: Arquivo pessoal (2025)

No entanto, até o momento, as proteínas das demais espécies analisadas, como, *C. haemuli* e *C. vulturna* ainda não estão depositadas neste banco de dados.

Com base na análise estrutural tridimensional, o sítio ativo da proteína *ERG11* foi avaliado utilizando o software *I-TASSER*. O valor de C-score = 0.11, obtido para a previsão do sítio ativo da proteína *ERG11* em comparação à sequência de referência no UniProt (A6ZSR0), representa um nível moderado de confiança na modelagem estrutural realizada pelo I-TASSER. O C-score reflete a confiança do modelo gerado pelo algoritmo de predição, baseado em alinhamentos de sequência e compatibilidade estrutural. O valor de 0.11, embora baixo em comparação a um C-score ideal (próximo a 1), ainda indica que a estrutura modelada é plausível, principalmente em regiões altamente conservadas, como o sítio ativo.

Este resultado pode estar relacionado às variações nas sequências primárias da proteína *ERG11* entre a espécie analisada e a referência no UniProt. Diferenças nas sequências de aminoácidos fora do sítio ativo podem alterar a conformação global da proteína, influenciando na modelagem. No entanto, a conservação funcional do sítio ativo sugere que pressões seletivas preservaram a funcionalidade catalítica essencial, apesar das variações nas outras regiões (Figura 18).

Figura 18- Estrutura tridimensional da proteína ERG11 gerada pelo I-TASSER. A estrutura apresenta o sítio ativo destacado em verde, modelado com base na sequência de aminoácidos da ERG11 do isolado em estudo UFMG-CM-Y6065.



Fonte: Arquivo pessoal (2025)

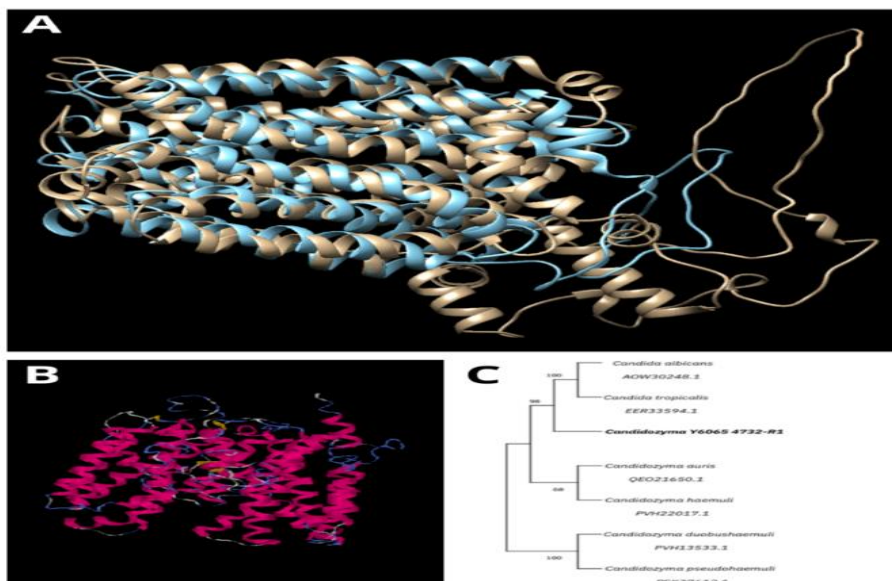
C-score de 0.11, associado à similaridade estrutural com a sequência de referência (UniProt A6ZSR0), reflete uma confiança moderada na previsão.

6.7.4 Análise de proteica MDR1

Um aspecto de grande relevância identificado neste estudo foi o mecanismo de efluxo mediado pela proteína *MDR1* presente no genoma da espécie em análise. Essa proteína apresentou 81,4% de similaridade com a *MDR1* de *C. albicans*. Para a análise estrutural detalhada, utilizou-se o software UCSF *Chimera*, uma ferramenta amplamente empregada para visualização e comparação de estruturas moleculares. Além disso, utilizou-se o software I-TASSER para realizar a predição estrutural da sequência proteica analisada no *Chimera* (Fig. 19 – B). Neste caso, foi obtido um RMSD de 0.755, indicando uma alta similaridade estrutural entre as proteínas *MDR1* da espécie UFMG-CM-Y6065 e de *C. albicans*, o que sugere conservação funcional entre espécies diferentes (Fig. 19 – A).

Complementando a análise estrutural, foi construída uma árvore filogenética baseada no alinhamento das sequências de aminoácidos do gene *MDR1*, utilizando o software *Clustal*. Os resultados mostraram que a proteína da espécie UFMG-CM-Y6065 é filogeneticamente próxima da *MDR1* de *C. albicans* e *C. tropicalis*. (Fig. 19 – C).

Figura 19- Representação detalhada das análises estruturais e filogenômicas do gene MDR1. (A) Sobreposição das estruturas proteicas MDR1 de *Candidozyma* UFMG-CM-Y6065 (em azul) e *Candida albicans* (em dourado). (B) Estrutura tridimensional predita da proteína MDR1 gerada pelo software I-TASSER com base na sequência de *Candidozyma* UFMG-CM-Y6065. (C) Árvore filogenômica dos genes MDR1 das espécies *C. albicans*, *C. tropicalis*, UFMG-CM-Y6065, *C. auris*, *C. haemuli*, *C. duobushaemuli* e *C. pseudoaemuli*.



Fonte: Arquivo pessoal (2025).

6.7.5 Sintenia – *C. auris* e UFMG-CM-Y6065

Para revelar a base genética das diferenças biológicas entre *C. auris* e a espécie nova *Candidozyma* sp. UFMG-CM-Y6065, mapas de ligação genética foram gerados. A sintenia é a ordem preservada de genes em cromossomos de espécies relacionadas que resulta da descendência de um ancestral comum (Fan *et al.*, 2021). A análise de sintenia entre o genoma de *C. auris* (representado em verde, com sete cromossomos) e o da nova espécie de levedura UFMG-CM-Y6065 (representada em laranja) revelou padrões distintos de conservação genômica (Figura 20).

Pode-se observar regiões altamente sintênicas entre os dois genomas analisados, evidenciadas pelas faixas contínuas conectando os cromossomos ou scaffolds correspondentes. No gráfico, as conexões azuis, verdes e vermelhas indicam áreas de conservação genômica, onde grandes blocos de genes mantêm a ordem e orientação em ambas as espécies (Figura 20).

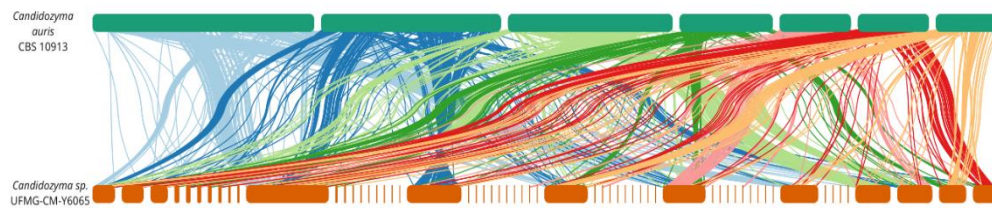
Quebras de sintenia, observadas como faixas descontínuas ou ausentes, indicam a ocorrência de eventos de rearranjo genômico, como translocações e inversões, que provavelmente aconteceram durante o processo de especiação. Esses rearranjos podem ter levado à reorganização dos segmentos de DNA entre diferentes regiões do genoma, alterando a ordem dos genes e, conseqüentemente, suas funções.

Além disso, há áreas no genoma onde as *ribbons* (faixas representando os segmentos de DNA) cruzam entre diferentes scaffolds ou cromossomos, o que sugere que rearranjos mais amplos, envolvendo a troca de material genético entre diferentes cromossomos ou regiões genômicas, também ocorreram durante a evolução das espécies. Pode-se observar, no presente trabalho, uma divergência genômica entre as duas espécies analisadas, evidenciada pelos rearranjos estruturais e alterações na organização dos blocos sintênicos.

Os primeiros blocos da espécie UFMG-CM-Y6065 estão alinhados com os últimos blocos de *Candidozyma auris*, sendo indicativo de um rearranjo genômico, como uma translocação, onde partes do genoma foram deslocadas de um local para outro, possivelmente trocando sua posição entre diferentes cromossomos ou regiões, como resultado de eventos evolutivos. Esses rearranjos podem explicar diferenças no comportamento, na adaptação ou na evolução das linhagens, além de fornecer insights sobre os mecanismos de reestruturação genômica que as tornam mais distintas.

Figura 20- Representação gráfica da sintenia genômica entre os genomas de *Candidozyma auris* (em verde) e

Candidozyma sp. UFMG-CM-Y6065 (em laranja).



Fonte: Arquivo pessoal (2025)

Cada bloco retangular representa um cromossomo ou scaffold genômico. As faixas conectando os blocos indicam regiões sintênicas, correspondendo a genes ou blocos de genes conservados entre os genomas. A densidade e continuidade das faixas sugerem alta conservação genômica em determinadas regiões, enquanto cruzamentos ou dispersões refletem rearranjos estruturais, como inversões, translocações ou duplicações.

7. DISCUSSÃO

7.1 Identificação de fatores de virulência em isolados ambientais

No presente estudo, foram identificados 25 isolados a nível de espécie, provenientes de diferentes nichos ecológicos e biomas brasileiros. Entre eles, foram identificadas nove amostras de *Candidozyma haemuli*, sendo uma isolada de amostra hospitalar; dez isolados ambientais de *Candidozyma* spp. Sendo destas cinco; quatro isolados de *Candidozyma duobushaemuli*; e dois isolados de *Candidozyma heveicola*. Todos os isolados foram identificados por meio do sequenciamento da região D1/D2 do gene 26S do RNA ribossomal (Kurtzman e Robnett, 1998).

O clado *Candizoyma auris-haemuli* (CAH) contém espécies clinicamente relevantes multirresistentes, como, *C. auris*, *C. haemuli* e *C. duobushaemuli*, mas também espécies isoladas de ambientes naturais, como, *C. heveicola* (Liu et al. 2024). Informações sobre os atributos associados a resistência e virulência ainda são escassos, principalmente de isolados ambientais. Diante disso, torna-se evidente a importância de estudar e analisar o impacto de isolados ambientais em diferentes habitats e climas, bem como a capacidade desses nichos ecológicos modularem respostas ao desenvolvimento de resistência e virulência.

Candidozyma auris é uma espécie amplamente descrita por sua capacidade de crescer

em altas temperaturas, essa habilidade tem sido associada a fatores ambientais, como mudanças climáticas, que pode criar condições favoráveis para a emergência e disseminação de espécies termotolerantes (Casadevall *et al.*, 2019). O crescimento em altas temperaturas é um indicativo de adaptação do microrganismo, permitindo-lhe superar a barreira da temperatura corporal e causar infecção em mamíferos (Zajc *et al.*, 2019). No presente estudo, observamos que todos os isolados estudados cresceram a 37 °C em 48 horas. Mostrando, dessa maneira, que as leveduras utilizadas no presente estudo, provenientes de diferentes locais do Brasil, mostraram capacidade de adaptação a variadas temperaturas.

Além disso, é importante destacar que um grupo de isolados *Candidozyma* sp. (4) cresceu também a 42 °C, evidenciando características específicas da espécie *C. auris* (Casadevall *et al.*, 2019). Interessantemente, os isolados pertencentes a espécie *Candidozyma* sp. (4) foram obtidos de amostras de flores de *Ipomoea* sp. do estado de Tocantins (TO), sob o domínio do clima tropical semiúmido, o que pode ter contribuído para a adaptação térmica destas leveduras. As temperaturas médias anuais no estado variam entre 23 °C e 33 °C, com períodos mais quentes frequentemente atingindo extremos térmicos acima de 40 °C. O que pode ter favorecido a adaptação térmica dessas leveduras, permitindo que tolerem temperaturas elevadas, como observado.

Após a emergência de *Candidozyma auris*, o complexo *C. haemuli-auris* tem atraído a atenção de pesquisadores em todo o mundo devido à sua resistência intrínseca a diferentes classes de antifúngicos (Gómez-Gaviria, 2023; Françoise *et al.*, 2023). No entanto, ainda há uma escassez de estudos sobre isolados ambientais desse complexo.

Portanto, no presente trabalho, avaliamos sensibilidade dos isolados a diversos antifúngicos clínicos, bem como ao agroquímico epoxiconazol. Podemos perceber que no grupo *Candidozyma haemuli*, a maioria dos isolados mostrou-se sensível aos fármacos estudados. No entanto, 4 dos isolados estudados (UFMG-CM-Y7572, UFMG-CM-Y7573, UFMG-CM-Y7574 e UFMG-CM-Y7534) apresentaram uma dependência da dose e/ou resistência para o fluconazol e itraconazol.

Interessantemente, estes mesmos isolados apresentaram resultados que seriam de dose-dependência para o epoxiconazol, se fosse considerado os valores de CIM como os de fluconazol (CLSI, M27A 2008). Epoxiconazol é um fungicida agrícola que se liga ao sítio ativo da enzima *CYP51*, bloqueando sua função e, conseqüentemente, interferindo na formação de ergosterol essa ação é semelhante à dos antifúngicos clínicos da mesma classe (Huang *et al.*, 2020). Já foram relatados em outros estudos cepas de *Cryptococcus* apresentando maior tolerância a essas drogas tiabendazol, procloraz e metaxil, possivelmente devido a uma

resistência cruzada com antifúngicos clínicos (Bastos *et al.*, 2018).

Os isolados de *Candidozyma duobushaemuli* estudados apresentaram dose dependência para fluconazol, com apenas um isolado mostrando sensibilidade a este antifúngico. Para os demais fármacos, todas as linhagens de foram sensíveis. Um isolado de *Candidozyma heveicola* (UFMG-CM-Y5595) apresentou dose dependência tanto para fluconazol quanto para epoxiconazol (considerando os valores de CIM para o fluconazol, segundo CLSI M27A 2008) foi sensível aos demais antifúngicos. Este isolado foi obtido do nectário de *Tabebuia* sp. localizado na Pampulha, Belo Horizonte. Leveduras oportunistas isoladas de ambientes naturais têm demonstrado resistência crescente a agentes antifúngicos, como fluconazol e anfotericina B (Brandão *et al.*, 2010; Caicedo-Bejarano *et al.*, 2023). Essa resistência tem sido associada a diversos mecanismos, incluindo a presença de bombas de efluxo, alterações nos locais-alvo dos medicamentos e a exposição recorrente a antifúngicos no ambiente, que contribuem para a seleção e adaptação dessas linhagens (Akinbobola *et al.*, 2023; Bastos *et al.*, 2021).

Entre esses isolados do grupo *Candidozyma* sp. (4), as cepas UFMG-CM-Y6065, UFMG-CM-Y6066, UFMG-CM-Y7528, UFMG-CM-Y7529, UFMG-CM-Y7530 e UFMG-CM-Y7531 foram identificadas como pertencentes à mesma espécie com base no sequenciamento das regiões ITS (Internal Transcribed Spacer) e D1/D2 do gene rRNA.

Além disso, essas cepas foram consideradas espécies novas quando comparadas com as linhagens tipo de leveduras já descritas, devido a uma divergência de sequências superior a 2-3% nas regiões genéticas analisadas. Esse grupo apresentou resistência a fluconazol e itraconazol e dose dependência para anfotericina B. Em função desses resultados, foi realizado um teste de suscetibilidade para a classe das equinocandinas, e todos os isolados foram sensíveis.

A resistência aos azóis tem sido frequentemente descrita e analisada também em espécies do gênero *Candidozyma*, como em *C. auris* e *C. haemuli* (Silva *et al.*, 2020). No entanto, a resistência às equinocandinas foi observada em alguns isolados de *C. auris* (MIC \geq 4 mg/L) (Chowdhary *et al.*, 2018; Kordalewska *et al.*, 2018). Em contrapartida, até o momento, não há relatos de resistência à classe das equinocandinas em *C. haemuli*.

Aqui, fornecem-se evidências primárias sobre a importância de compreender os mecanismos pelos quais leveduras ambientais se adaptam e desenvolvem resistência a diferentes fármacos, bem como o crescimento e o desenvolvimento em altas temperaturas. As demais cepas do gênero *Candidozyma* sp. mostraram ser distintas entre si e apresentaram sensibilidade aos fármacos testados.

Para avaliar os possíveis mecanismos de resistência do grupo *Candidozyma* sp. (4), que

foram menos sensíveis ao fluconazol, especificamente o isolado UFMG-CM-Y6066, foi realizado o experimento de bomba de efluxo. As bombas de efluxo são proteínas localizadas na membrana plasmática que, quando superexpressas, podem expulsar fármacos para fora da célula, reduzindo a concentração intracelular e constituindo um dos principais mecanismos de resistência aos azóis (Fátima *et al.*, 2023). Os resultados mostraram que o isolado UFMG-CM-Y6066 apresentou um efluxo de rodamina 6G significativamente maior quando comparado ao controle de *C. albicans* (Gráfico 1).

Silva *et al.* (2020) também observaram o mesmo em isolados de *C. haemuli*, indicando, assim, que essa resistência pode ser observada de forma constitutiva, uma vez que o tratamento com fluconazol não modulou a resposta. Portanto, nosso isolado também pode estar apresentando uma resistência constitutiva ao fluconazol. A espécie UFMG-CM-Y6066 pode ser naturalmente resistente a certos antifúngicos porque possui uma bomba de efluxo ativa que expulsa o fármaco antes que ele possa agir de forma eficaz, sem precisar ser exposta ao agente repetidamente para desenvolver essa resistência.

No presente trabalho, estudamos diversos fatores de virulência entre eles adesão celular, filamentação e formação de biofilme (Cavalheiro e Teixeira, 2018; Leslie *et al.*, 2011; Czechowicz *et al.*, 2022). O papel da adesão fúngicas na infecção e colonização do hospedeiro foi estabelecido por vários pesquisadores (Kumari *et al.*, 2021; Blango *et al.*, 2019) sendo um fator primordial para a adesão a células hospedeiras e formação de biofilmes em superfícies abióticas e bióticas.

Uma vez que, a adesão de leveduras oportunistas ao tecido hospedeiro é a etapa primária da infecção e é crucial para a persistência do patógeno. Para avaliar se os isolados estudados no presente trabalho apresentavam a capacidade de aderir a células epiteliais bucais, realizamos o teste de adesão. Embora nenhuma cepa tenha apresentado uma adesão superior à de *Candida albicans* (SC5314), os isolados testados mostraram capacidade de aderência, com destaque para o isolado *Candidozyma* sp. UFMG-CM-Y7529.

Além disso, no presente trabalho verificou-se se os isolados utilizados eram capazes de formar hifas e pseudo-hifas em meio de cultura específico, para conseguir aderir melhor as células e superfícies. No entanto, nenhum dos isolados apresentou essas características, tanto em nível macroscópico quanto microscópico, no meio de cultura utilizado. Contudo, existem outros meios de cultura nos quais esse fator pode ser evidenciado. Portanto, não podemos afirmar neste estudo que essas leveduras não apresentam filamentação em outros ambientes.

Diante desse contexto, os biofilmes são considerados fatores importantes de virulência, pois formam comunidades complexas que envolvem diferentes espécies, permitindo-lhes

sobreviver a condições adversas e a vários tipos de estresse, como térmico, químico e osmótico. Essa capacidade facilita a colonização dos tecidos dos hospedeiros (Satala *et al.*, 2022).

Nos testes de formação de biofilme *in vitro*, as leveduras estudadas apresentaram capacidade de formação de biofilme similar em comparação com a linhagem de referência *C. albicans* SC5314 (Figura 5). Essa formação pode estar relacionada à presença de adesinas e enzimas celulares, como *ALSs* e *SAPs*, presentes nessas espécies, que favorecem a formação de biofilme (Deng *et al.*, 2021). É importante destacar que isolados ambientais também podem estar frequentemente associados a biofilmes no ambiente, demonstrando essa habilidade (Nunes *et al.*, 2013).

Com o intuito de se observar a morfologia do biofilme formado foi estudada, em microscopia de varredura, o biofilme do isolado *Candidozyma* sp. (4) UFMG-CM-Y6065. No biofilme deste isolado não foi observada a presença de hifas ou pseudo-hifas. No entanto, pode-se observar que o biofilme estudado apresentou conformação tridimensional, com relevos acentuados e significativa adesão entre as células formando agregados.

Em contraste, para a cepa controle *C. albicans* (SC5314), foi observada a presença de hifas e pseudo-hifas, além de um biofilme mais linear, sem apresentar profundidade. Dessa forma, podemos perceber que o isolado estudado apresenta alta capacidade agregativa, o que pode conferir vantagens as células, incluindo morfologias de colônia, habilidades de formação de biofilme, suscetibilidades a antifúngicos, suscetibilidades a células imunes e virulência, conforme descrito anteriormente em estudos com *Candidozyma auris* (Bing *et al.*, 2024).

Espécies do clado *Candidozyma* são consideradas raras causadoras de infecções, porém apresentam um perfil de multirresistência preocupante, o que destaca a importância de estudos mais aprofundados sobre seu potencial patogênico (Coles *et al.*, 2020; Chengjun *et al.*, 2023). Com os dados apresentados no presente trabalho, é possível inferir que os isolados se adaptam ao ambiente, e essa adaptação pode promover a seleção de cepas resistentes ou virulentas. Dessa forma, o presente trabalho vem colaborar com estudos dentro do contexto de "One Health", que envolvam a vigilância integrada nos âmbitos ambiental, animal e humano, visando o combate a microrganismos resistentes e o monitoramento da evolução de cepas ambientais.

7.2 Identificação de novas espécies do clado haemuli-auris - isolados ambientais

As cinco novas espécies do gênero *Candidozyma*, encontradas no presente estudo, foram isoladas de flores, plantas, madeira em decomposição e solo. Assim, compreender os ambientes em que habitam, bem como identificar a presença de fatores de virulência e resistência, é

essencial para entender o nicho ecológico desses possíveis patógenos oportunistas e como essas leveduras podem evoluir para se tornarem patogênicas. Para isso, foram realizados testes experimentais de virulência, resistência e análises bioinformáticas do genoma de 4 espécies do grupo *Candidozyma* sp. (1) UFMG-CM-Y7469, *Candidozyma* sp. (2) UFMG-CM-Y7127, *Candidozyma* sp. (3) UFMG-CM-Y6408 e *Candidozyma* sp. (4) UFMG-CM-Y6065 com o objetivo de avaliar se essas cepas ambientais possuem potencial para se tornarem oportunistas no futuro.

Os novos isolados apresentaram características semelhantes às espécies já descritas, especialmente no meio de cultura de diagnóstico CHROMagar *Candida*. As colônias exibiram uma coloração rosa-lilás claro e eram cremosas, características previamente descritas para isolados de *Candidozyma auris* neste meio de cultura. No entanto, fica evidente a importância do uso de técnicas de biologia molecular para uma identificação mais precisa das espécies deste gênero, considerando que os isolados apresentam características fenotípicas semelhantes. Como já mostrado por outros pesquisadores, a espécie *C. auris* é identificada, frequentemente, como *C. haemuli*, o que ressalta a importância do uso de técnicas de sequenciamento molecular para uma identificação precisa (Kathuria *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2024). No presente trabalho, mostramos que as novas espécies, aqui descritas podem ser também erroneamente identificadas como *C. haemuli* ou *C. auris*.

Na assimilação de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, as espécies mostraram tolerância de 10% NaCl, evidenciando halotolerância, assim como as espécies previamente descritas *C. auris*, *C. haemuli* e *C. duobushaemuli* (Sato *et al.*, 2009; Uden e Kolip, 1962; Cend.-Bueno *et al.*, 2012). Além disso, todos os isolados estudados deste gênero assimilaram glicose, galactose, L-sorbose, maltose, sacarose, celobiose, trealose, N-acetilglucosamina, etanol e YNB sem aminoácido. No entanto, algumas características são únicas de cada espécie. A espécie *Candidozyma* sp. (1) UFMG-CM-Y7469 se destaca por assimilar salicinina, uma fonte de carboidrato que não é assimilada pelas demais espécies analisadas. Além disso, essa espécie não assimila dulcitol, D-manitol e lisina, ao contrário das demais, que demonstram capacidade de utilizá-los.

A espécie *Candidozyma* sp. (2) UFMG-CM-Y7127 apresenta características específicas, como a capacidade de crescer em meio contendo M-inositol e de tolerar 0,01% de cicloheximida. Por sua vez, a espécie *Candidozyma* sp. (3) UFMG-CM-Y6408 se diferencia por assimilar amido e xilitol, características ausentes nas demais espécies analisadas neste estudo. Já *Candidozyma* sp. (4) UFMG-CM-Y6065 destaca-se pela capacidade de assimilar hexadecano e pela ausência de assimilação de D-xilose, succinato e glucosamina. Essas

características são fundamentais para a diferenciação dessas espécies dentro do gênero *Candidozyma*. Essas diferenças podem estar relacionadas ao nicho ecológico, de onde foram isoladas, ou pode refletir uma característica intrínseca desses novos isolados.

Os agrupamentos no heatmap de OrthoANI, do presente estudo, corroboram também com os dados apresentados na árvore filogenética. Os valores elevados de similaridade genômica (99,02%) entre *Candidozyma* sp. (2) UFMG-CM-Y7127 e *Candidozyma* sp. (3) UFMG-CM-Y6408 reforçam a proximidade filogenética desses isolados, possivelmente são as mesmas espécies. Essa maior similaridade observada entre os isolados *Candidozyma* sp. (superiores a 95%) mostram que estes formam um grupo coeso dentro do clado, refletindo uma relação intraespecífica, distinta de outras espécies próximas no mesmo ramo filogenético. Já as espécies *Candidozyma* sp. (4) UFMG-CM-Y6065 e *Candidozyma* sp. (1) UFMG-CM-Y7127 apresentam valores intermediários (75%-95%) indicam relações de espécies próximas que estão representadas por ramos adjacentes na árvore. Os isolados compartilham ramos próximos na árvore, estes possuem um grau elevado de similaridade em suas sequências genômicas, indicando uma relação evolutiva estreita.

Na árvore filogenética descrita no presente trabalho, os isolados de *Candidozyma* sp. se agrupam de forma consistente em um clado próximo a *C. haemuli* e *C. pseudohaemuli*, sugerindo que as espécies do presente trabalho compartilham um ancestral comum recente com as espécies citadas. Essa proximidade filogenética aponta para uma possível relação de espécies ou integrantes de um mesmo grupo funcional, com potenciais similaridades ecológicas ou adaptativas. Esses dados filogenéticos indicam uma forte correlação entre os isolados e *C. haemuli*, mas com divergências suficientes para justificar sua classificação como espécies distintas. No heatmap de OrthoANI, os valores moderados de similaridade genômica entre os isolados *Candidozyma* sp. e *Candidozyma haemuli* (variando de 77% a 78%) reforçam essa relação de proximidade. Esses valores indicam que, embora compartilhem regiões genômicas conservadas, há diferenças significativas no conteúdo genético que sustentam a classificação de *Candidozyma haemuli* como uma espécie distinta.

Diante desse cenário, foi avaliado presença de genes de virulência e resistência nos isolados *Candidozyma* sp. (1) UFMG-CM-Y7469, *Candidozyma* sp. (2) UFMG-CM-Y7127, *Candidozyma* sp. (3) UFMG-CM-Y6408 e *Candidozyma* sp. (4) UFMG-CM-Y6065 para determinar a ocorrência de mutações nesses isolados e identificar genes de resistência e virulência em leveduras oportunistas. Embora esses genes resistência e virulência tenham sido encontrados, como *ERG11*, *MDR1*, *CDRs*, *SAPs*, *ALSs*, *SNQ2*, *EFG1* e *TAC1*, são necessários estudos adicionais para compreender como essas leveduras expressam esses genes e qual é o

impacto das substituições de aminoácidos identificadas no gene *ERG11*. As mutações encontradas ainda não estão descritas na literatura, e por si só, não justificam a resistência aos azóis testados neste trabalho.

As análises realizadas indicaram que os isolados UFMG-CM-Y6408 e UFMG-CM-Y7127 não apresentaram similaridade com os genes *ALSs* e *TAC1*, tanto no banco de dados criado a partir de diferentes genes de espécies fúngicas oportunistas quanto no banco Resfungi. Os genes *ALSs* (Agglutinin-Like Sequences) são uma família de adesinas importantes para a adesão às células do hospedeiro e formação de biofilmes, enquanto o gene *TAC1* (Transcriptional Activator of *CDR* Genes) é um regulador de transcrição associado à resistência a antifúngicos azólicos, desempenhando um papel crucial na patogenicidade de espécies como *Candida albicans* (Mahdizade et al. 2024).

Embora as análises não tenham identificado sequências similares a esses genes, a ausência de evidências não implica necessariamente que os genes *ALSs* e *TAC1* estejam completamente ausentes no genoma de UFMG-CM-Y6408 e UFMG-CM-Y7127. É possível que a espécie destes isolados possuam variantes de sequência significativamente divergentes. Interessantemente, UFMG-CM-Y6408 e UFMG-CM-Y7127 compartilham uma alta similaridade genômica e foram isoladas do mesmo local, reforçando a hipótese de que fatores ecológicos podem desempenhar um papel na modulação diferencial desses genes (Sánchez-Rangel et al., 2018; Wang et al., 2018).

O nicho ecológico, ao influenciar pressões seletivas específicas, pode moldar a evolução genômica e resultar na perda ou modificação funcional de genes não essenciais em determinadas condições ambientais (Sánchez-Rangel et al., 2018). Estudos futuros são necessários para explorar essa hipótese por meio de experimentos funcionais, como inserção desses genes e comparações detalhadas dos padrões de expressão gênica em diferentes condições ambientais. Assim, a ausência de similaridade observada não deve ser interpretada como definitiva, mas como um ponto de partida para investigações futuras sobre a diversidade genômica e adaptabilidade dos isolados UFMG-CM-Y6408 e UFMG-CM-Y7127 ao seu ambiente natural.

Os resultados obtidos mostraram que, embora a maioria dos genes investigados estivesse presente nas espécies analisadas, as espécies *Candidozyma* sp. (1) UFMG-CM-Y7469, *Candidozyma* sp. (2) UFMG-CM-Y7127 e *Candidozyma* sp. (3) UFMG-CM-Y6408 não apresentaram resistência aos fármacos testados nem desempenho significativo nos experimentos de adesão, filamentação ou formação de biofilmes, realizados no presente trabalho.

Esses achados sugerem que, apesar da presença de genes potencialmente relacionados a resistência e virulência, a expressão ou funcionalidade desses genes pode ser modulada por fatores contextuais ou regulatórios específicos, o que limita a manifestação fenotípica das características associadas à patogenicidade. Essa observação levanta questões sobre o potencial dessas espécies para se tornarem oportunistas e adquirirem características patogênicas ao longo do tempo (Padder *et al.*, 2021).

O gene *ERG11* das espécies *Candidozyma* sp. (1) UFMG-CM-Y7469, *Candidozyma* sp. (2) UFMG-CM-Y7127 e *Candidozyma* sp. (3) UFMG-CM-Y6408 apresentam alta similaridade com o gene *ERG11* de *Candidozyma vulturna*, espécie reconhecida por sua relevância médica e capacidade de causar infecções oportunistas, especialmente em pacientes imunocomprometidos. É importante salientar que os isolados foram obtidos de substratos diferentes, sendo, UFMG-CM-Y7127 de solo na região de Itacoatiara, Amazonas; UFMG-CM-Y6408 também de Itacoatiara, AM, porém proveniente de madeira em decomposição; e UFMG-CM-Y7469 de *Faramea anisocalyx* na FLONA de Caxiuanã, Pará.

Desse modo, estudos futuros são necessários para explorar se essas espécies possuem a capacidade de se adaptar às condições do hospedeiro humano por meio de experimentos de infecção em modelos murinos, avaliando sua sobrevivência, colonização e interação com o sistema imunológico. Além disso, torna-se primordial investigar se a exposição contínua ao fluconazol ou outros antifúngicos poderia induzir resistência adaptativa nessas espécies, como já observado em outros patógenos fúngicos oportunistas.

Por outro lado, a espécie *Candidozyma* sp. (4) UFMG-CM-Y6065 destacou-se não apenas por seu perfil de resistência a múltiplos fármacos e crescimento a 42 °C, mas também por apresentar modificações em aminoácidos no gene *ERG11*, que codifica a enzima alvo dos antifúngicos azólicos. Essas modificações, ainda não descritas na literatura, representam uma área promissora para investigações futuras, a fim de avaliar se essas alterações impactam na resistência a azóis e anfotericina B. Esse achado é importante, considerando que, mutações em *ERG11*, estão frequentemente associadas à resistência antifúngica em espécies patogênicas (Flowers *et al.*, 2014; Ming-Jie *et al.*, 2013).

Além disso, essas mutações podem ter sido impulsionadas por pressão seletiva ambiental, que são selecionadas positivamente e transmitidas para as próximas gerações. Variações na conformação global da proteína podem afetar a dinâmica da interação com inibidores, como os azóis, alterando a eficácia terapêutica. No entanto, é necessário estudos adicionais, como modelagem refinada e validação experimental, poderiam confirmar se essas alterações conformacionais têm implicações clínicas diretas, como maior tolerância aos

antifúngicos.

Além disso, foi observado que o gene *MDR1*, envolvido no transporte de efluxo de drogas, apresentou forte relação com o alto efluxo de Rodamina 6G, indicando que a resistência pode ser expressa de forma constitutiva no isolado UFMG-CM-Y6065 da espécie *Candidozyma* sp. (4). Interessantemente, a resposta de efluxo não foi modulada pelo tratamento com fluconazol, sugerindo uma regulação basal independente de estímulos farmacológicos. Adicionalmente, análises filogenéticas do gene *MDR1* revelaram uma proximidade inesperada com genes homólogos de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, em vez de espécies do gênero *Candidozyma*. Essa descoberta sugere uma possível transferência horizontal de genes ou uma divergência funcional adaptativa no gene *MDR1* em UFMG-CM-Y6065, que poderia contribuir para seu perfil de resistência único. A estrutura da proteína *MDR1* foi construída em 3D (Figura 11 – B) no I-tasser, utilizando o software *Chimera*, que calcula a distância média entre os átomos correspondentes nas duas estruturas, considerando todas as moléculas, a sobreposição com o molde de *Candida albicans* indicou um RMSD (Root Mean Square Deviation) de 0.755, o que sugere uma alta similaridade estrutural (Figura 11 - A) entre as duas proteínas.

Devido à proximidade observada entre as espécies UFMG-CM-Y6065 da espécie *Candidozyma* sp. (4). com a espécie *C. auris*, foi realizado a sintenia entre os dois genomas. A sintenia é fundamental na biologia evolutiva, pois sugere que esses genes são conservados ao longo do tempo, refletindo relações filogenéticas e preservação funcional em isolados da mesma espécie ou espécie diferentes pertencentes ao mesmo gênero (Guénola Drillon *et al.*, 2020).

Diante disso, os resultados de sintenia entre *Candidozyma* sp. (4) UFMG-CM-Y6065 e *C. auris* revelam a presença de regiões genômicas organizadas de maneira semelhante, refletindo uma conservação significativa ao longo da evolução. Desse modo, blocos conservados sugerem uma relação evolutiva próxima, refletindo uma herança genômica compartilhada, possivelmente oriunda de um ancestral comum. A identificação de sintenia entre esses dois organismos sugere a preservação de conjuntos de genes que podem estar associados a funções essenciais para a sobrevivência e adaptação (Guerrero *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2018).

Essa conservação sugere que essas regiões genômicas contêm genes fundamentais para processos biológicos importantes, como metabolismo, genes estruturais, genes de virulência e resposta a estresses ambientais. As regiões não sintênicas, por outro lado, provavelmente sofreram maior nível de mudanças genéticas ao longo do tempo, resultando em diferenças funcionais entre as espécies, o que é esperado devido à diversidade genética entre elas. Além disso, a ausência de sintenia pode indicar processos como duplicação gênica, mutações

específicas ou eventos de rearranjo genômico, que contribuiriam para a diversificação genética e funcional entre as espécies. Isso pode levar a uma maior variabilidade funcional e novas estratégias adaptativas.

Diante desse contexto, é esperado que haja regiões não sintênicas, considerando que se trata de uma espécie nova dentro do gênero *Candidozyma*, diferenciando-se de *Candidozyma auris*. Essa diferença reflete a evolução adaptativa e a diversidade genômica característica de espécies novas. Pode-se observar também na Figura 19, áreas com muitos ribbons densos indicam blocos sintênicos altamente conservados, o que é esperado para espécies dentro do gênero *Candidozyma*, como no caso de uma nova espécie em comparação com *Candidozyma auris*. Essas regiões conservadas destacam a diversidade genômica e os rearranjos estruturais que marcam a diferenciação adaptativa dessas linhagens. Para análises mais detalhadas, seria necessário o sequenciamento de outro isolado da espécie *Candidozyma* sp. (4) UFMG-CM-Y6065 para ajudar a rastrear eventos de rearranjo genômico.

7.3 Descrição de *Candidozyma cisalpinoae* sp. nov. - *Candidozyma* sp. (4) UFMG-CM-Y6065

A. P. O. Tironi, K. O. Barros, L. F. A. Santana, T. M. Batista, A. R. O. Santos, G. R. Ávila, D. L. Souza - G. R. Franco, S. Johann, Lachance & Rosa sp. nov.

Candidozyma cisalpinoae (ci.sal.pi'no.a.e. N. L. gen. n. *cisalpinoae* de Cisalpino, em homenagem à Profa. Patrícia Silva Cisalpino, em reconhecimento às suas contribuições ao estudo de fungos patogênicos no Brasil).

As células são ovoides a elipsoidais ($3-5 \times 2-3,3 \mu\text{m}$) e se reproduzem por brotamento multilateral (Fig. 3B). Colônias em ágar YM após 72 h a 25 °C são esbranquiçadas, lisas, brilhantes, macias e têm uma margem inteira. Pseudo-hifas e hifas verdadeiras não são formadas em ágar Spider ou ágar de fubá após 15 dias de incubação. Ascósporos não são observados em ágar de fubá, GY, acetato, YM ou extrato de malte após 12 semanas de incubação a 18 °C ou 25 °C.

Gotículas lipídicas estão presentes após 7 dias em ágar de acetato. Em CHROMagar Candida™, as colônias são creme claro a lilás. Em extrato de levedura (0,5%) - caldo de glicose (2%), o sedimento se forma após 1 mês, com uma película e um anel. O brotamento é monopolar e a conjugação está ausente. A fermentação da glicose é positiva, com fermentação tardia da maltose. Assimilação de compostos de carbono: Positivo para glicose, galactose, maltose, sacarose, trealose, D-manitol, D-glucitol, glicerol, celobiose, melezitose, L-sorbose e L-

ramnose.

Crescimento fraco ocorre com citrato, L-arabinose, etanol, xilitol, lactose e carbonato. Negativo para inulina, rafinose, melibiose, D-xilose, D-arabinose, D-ribose, metanol, eritritol, ribitol, M-inositol, DL-lactato, amido solúvel, salicina, D-gluconato, D-glucosamina, hexadecano, acetato de etila, isopropanol, acetona e ácido acético. Assimilação de compostos de nitrogênio: Negativo para nitrato e nitrito. Positivo para lisina. O crescimento ocorre em meio livre de aminoácidos. O crescimento em ágar YM com 10% de NaCl e em 50% de extrato de glicose-levadura (0,5%) é negativo. Compostos semelhantes ao amido não são produzidos. O crescimento é fracamente positivo com 100 µg de cicloheximida ml⁻¹. As reações de azul de diazônio B e urease são negativas.

A temperatura máxima para crescimento é de 42 °C. Foram observadas MICs elevadas para fluconazol e anfotericina B, distribuídas de acordo com a diluição em microcaldo CLSI. Cepa tipo: UFMG-CM-Y6065, isolada de flores de *Ipomoea* coletadas no cerrado de Mirante do Espírito Santo, Jalapão, Tocantins, Brasil. A cepa está depositada na Coleção de Microrganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Número de acesso: SUB14487691. Dados do genoma completo: PRJNA1180885.

8. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo indicam que o complexo *Candidozyma auris-haemuli* apresenta uma diversidade significativa de isolados, muitos dos quais possuem resistência a antifúngicos e fatores de virulência que podem contribuir para sua potencial patogenicidade. O crescimento em temperaturas elevadas, a formação de biofilmes e a capacidade de aderência sugerem que esses isolados podem, sob condições específicas, evoluir para patógenos oportunistas. Dentre os antifúngicos testados, as equinocandinas foram os mais eficazes, enquanto fluconazol foi o antifúngico com menor eficácia e maior porcentagem de resistência entre os isolados. Os dados apresentados de bomba de efluxo também fornecem evidências significativas do efluxo de drogas na mediação da resistência ao azóis. A detecção de resistência cruzada entre antifúngicos clínicos e ambientais destaca a importância de monitorar leveduras ambientais para antecipar a evolução de patógenos resistentes.

Adicionalmente, a identificação de novos isolados do gênero *Candidozyma* em ambientes naturais brasileiros reforça a necessidade de mais pesquisas sobre a ecologia e os fatores de virulência dessas leveduras. A capacidade de adaptação a ambientes extremos, como

aqueles com alta temperatura e baixa disponibilidade de nutrientes, pode favorecer a evolução de cepas que eventualmente colonizem novos hospedeiros, incluindo humanos. Esses achados sugerem que a interação entre fatores ambientais e a pressão seletiva imposta por antifúngicos pode ser um motor importante na emergência de novos patógenos.

A análise filogenômica realizada no presente estudo forneceram informações sobre a diversidade genética e a evolução de novas espécies do complexo *Candidozyma auris-haemuli*. A identificação de ortólogos de cópia única e a análise filogenômica permitiram compreender as relações evolutivas entre os isolados, destacando a presença de linhagens com potencial patogénico e adaptativo em diferentes nichos ecológicos. Além disso, a detecção de genes relacionados à resistência antifúngica e fatores de virulência sugere que, esses isolados estão em constante evolução, sob pressão seletiva imposta tanto por fatores ambientais quanto por tratamentos clínicos, podem sofrer mutações. Esses achados ressaltam a importância de monitorar a diversidade genética e as interações ambientais para prever e gerenciar a emergência de patógenos resistentes, contribuindo para uma abordagem mais precisa no manejo de infecções fúngicas.

Portanto, este estudo destaca a importância de uma abordagem integrada para monitorar a resistência antifúngica e a evolução de patógenos em diferentes ecossistemas. A vigilância ativa em ambientes naturais, animais e humanos é essencial para antecipar e mitigar o surgimento de novos patógenos resistentes. A continuidade das pesquisas sobre a biodiversidade e os mecanismos de resistência do complexo *Candidozyma auris-haemuli* pode fornecer informações valiosas para o desenvolvimento de estratégias eficazes de controle e tratamento de infecções fúngicas.

9. REFERÊNCIAS

ADISASMITO, W. B. et al. One Health: A new definition for a sustainable and healthy future. **PLoS Pathogens**, v. 18, n. 6, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010537>.

AHMADY, L.; GOTHWAL, M.; MUKKOLI, M. M.; BARI, V. K. Antifungal drug resistance in *Candida*: a special emphasis on amphotericin B. **APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 132, n. 5, p. 291–316, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/APM.13389>.

AKINBOBOLA, A. B. et al. **Environmental reservoirs of the drug-resistant pathogenic yeast *Candida auris***. *PLoS Pathogens*, 2023.

ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; MARTÍN-GALIANO, A. J. The challenges of the genome-based identification of antifungal resistance in the clinical routine. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1134755>.

ALLIZOND, V. et al. Exposure to the agricultural fungicide tebuconazole promotes *Aspergillus fumigatus* cross-resistance to clinical azoles. **New Microbiologica**, v. 44, p. 234–240, 2021.

ALONSO, V. P. P.; LEMOS, J. G.; NASCIMENTO, M. DA S. DO. Yeast biofilms on abiotic surfaces: Adhesion factors and control methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 400, p. 110265, 2023.

AMORIM, C. F. et al. **Photodynamic inactivation of different *Candida* species and inhibition of biofilm formation induced by water-soluble porphyrins**. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2023.

ANDERSON, T. et al. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. **Nature Chemical Biology**, v. 10, p. 400–406, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nchembio.1496>.

ARENDRUP, M. C.; PATTERSON, T. F. Multidrug-resistant *Candida*: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. **Journal of Infectious Diseases**, p. S445–S451, 2017. doi:10.1093/infdis/jix131.

ARORA, P. et al. Environmental isolation of *Candida auris* from the coastal wetlands of Andaman Islands, India. **mBio**, v. 12, n. 2, p. 1–9, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mBio.03181-20>.

AZADMANESH, J. et al. **Filamentation involves two overlapping, but distinct, programs of filamentation in the pathogenic fungus *Candida albicans***. *G3: Genes|Genomes|Genetics*, 2017.

BASTOS, R. W. et al. Environmental triazole induces cross-resistance to clinical drugs and affects morphophysiology and virulence of *Cryptococcus gattii* and *C. neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 1, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.01179-17>.

- BASTOS, R. W.; ROSSATO, L.; GOLDMAN, G. H.; SANTOS, D. A. Fungicide effects on human fungal pathogens: Cross-resistance to medical drugs and beyond. **PLoS Pathogens**, v. 17, n. 12, 2021.
- BEN-AMI, R. et al. Fitness and virulence costs of *Candida albicans* FKS1 hotspot mutations associated with echinocandin resistance. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, p. 626–635, 2011.
- BEN-AMI, R.; KONTOYIANNIS, D. P. Resistance to antifungal drugs. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 35, n. 2, p. 279–311, 2021. W.B. Saunders. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idc.2021.03.003>.
- BEN-AMI, R. et al. **Multidrug resistant *Candida haemulonii* and *C. auris***, Tel Aviv, Israel. *Emerging Infectious Diseases*, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid2304.161370>.
- BENEDICT, K.; PARK, B. J. Invasive fungal infections after natural disasters. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, p. 349–355, 2014. doi: 10.3201/eid2003.131230.
- BERGER, S. et al. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a consequence of antifungal use in agriculture? **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 7463–6, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.01024.
- BERMAN, J.; KRYSAN, D. J. Drug resistance and tolerance in fungi. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 319–331, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0322-2>.
- BHATTACHARYA, S.; SAE-TIA, S.; FRIES, B. C. Candidiasis and mechanisms of resistance to antifungals. **Antibiotics (Basel)**, v. 9, n. 6, p. 312, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060312>.
- BING, J. et al. Rapid evolution of an adaptive multicellular morphology of *Candida auris* during systemic infection. **Nature Communications**, v. 15, n. 1, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-46786-8>.
- BLANGO, M. G.; KNIEMEYER, O.; BRAUN, A. A. Conidial surface proteins at the interface of fungal infections. **PLoS Pathogens**, v. 15, n. 9, e1007939, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007939>.
- BOSCO-BORGEAT, M. E. et al. Amino acid substitution in *Cryptococcus neoformans* lanosterol 14- α -demethylase involved in fluconazole resistance in clinical isolates. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 48, p. 137–142, 2016.
- BRAGA-SILVA, L. A. et al. Trailing end-point phenotype antibiotic-sensitive strains of *Candida albicans* produce different amounts of aspartyl peptidases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 8, p. 765–770, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2009005000022>.
- BRANDAO, L. R. et al. Diversity and antifungal susceptibility of yeasts isolated by multiple

tube fermentation from three freshwater lakes in Brazil. **Journal of Water and Health**, v. 8, p. 279–289, 2010. doi: 10.2166/wh.2009.170.

BRANDQUIST, N. D. et al. Significant variation of filamentation phenotypes in clinical *Candida albicans* strains. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, 1207083, 2023.

BRANDT, P. et al. High-throughput profiling of *Candida auris* isolates reveals clade-specific metabolic differences. **Microbiology Spectrum**, 2023. e0049823. PMID: 37097196.

BRAS, G. et al. Secreted Aspartic Proteinases: Key Factors in *Candida* Infections and Host-Pathogen Interactions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 9, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms25094775>.

BRAVO RUIZ, G. et al. Rapid and extensive karyotype diversification in haploid clinical isolates of *Candida auris*. **Current Genetics**, v. 65, p. 1217–1228, 2019. doi: 10.1007/s00294-019-00976-w.

CAFARCHIA, C. et al. Occurrence of yeasts in cloacae of migratory birds. **Mycopathologia**, v. 161, n. 4, p. 229–234, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S11046-005-0194-Z>.

CAICEDO-BEJARANO, L. D. et al. Water quality, heavy metals, and antifungal susceptibility to fluconazole of yeasts from water systems. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 20, n. 4, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijerph20043428>.

CALERA, J. A.; ZHAO, X.-J.; CALDERONE, R. Defective hyphal development and avirulence caused by a deletion of the *SSK1* response regulator gene in *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 518–525, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.68.2.518-525.2000>.

CAN, U.; KARPINSKI, M. C. *Torulopsis haemulonii* nova. spec., a yeast from the Atlantic Ocean. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 28, p. 78–80, 1962.

CANÇÃO, J.; LIU, X.; LI, R. Sphingolipids: regulators of azole drug resistance and fungal pathogenicity. **Molecular Microbiology**, v. 114, n. 6, p. 891–905, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mmi.14496>.

CANNON, R. D. et al. Efflux-mediated antifungal drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 2, p. 291–321, 2009. doi: 10.1128/CMR.00051-08.

CAO, D. et al. Triazole resistance in *Aspergillus fumigatus* in crop plant soil after tebuconazole applications. **Environmental Pollution**, v. 266 Pt 1, 115124, 2020.

CÁRDENAS PARRA, L. Y. et al. Molecular evaluation of the mRNA expression of the *ERG11*, *ERG3*, *CgCDR1*, and *CgSNQ2* genes linked to fluconazole resistance in *Candida glabrata* in a Colombian population. **Journal of Fungi**, v. 10, n. 7, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof10070509>.

CAROLUS, H.; PIERSON, S.; LAGROU, K.; VAN DIJCK, P. Amphotericin B and other

polyenes—discovery, clinical use, mode of action and drug resistance. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 1–20, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof6040321>.

CASADEVALL, A.; KONTOYIANNIS, D. P.; ROBERT, V. On the emergence of *Candida auris*: climate change, azoles, swamps, and birds. **mBio**, v. 10, n. 4, e01397-19, 2019. doi: 10.1128/mBio.01397-19.

CASADEVALL, A. Climate change brings the specter of new infectious diseases. **Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 2, p. 553–555, 2020.

CASADEVALL, A. Immunity to invasive fungal diseases. **Annual Review of Immunology**, v. 40, p. 121–141, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-041021-060903>.

CASADEVALL, A.; KONTOYIANNIS, D. P.; ROBERT, V. Environmental *Candida auris* and the global warming emergence hypothesis. **mBio**, v. 12, n. 2, p. 1–3, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/MBIO.00360-21>.

CASADEVALL, A. et al. **One Health**: Fungal pathogens of humans, animals, and plants. Governors AAM Colloquium Steering Committee Colloquium Participants Global Action Fund for Fungal Infections, 2019.

CASANOVA, A.; KONTOYIANNIS, D. P.; ROBERT, V. Environmental *Candida auris* and the global warming emergence hypothesis. **American Society for Microbiology**, v. 12, n. 2, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/ASM.00001-21>.

CASTELO-BRANCO, D. de S. C. M. et al. Yeast microbiota of free-ranging amphibians and reptiles from caatinga biome in Ceará state, northeast Brazil: high pathogenic potential of *Candida famata*. **Ciência Rural**, v. 51, n. 7, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200742>.

CASTELO-BRANCO, D. et al. Collateral consequences of agricultural fungicides on pathogenic yeasts: a One Health perspective to tackle azole resistance. **Mycoses**, v. 65, n. 3, p. 303–311, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/myc.13404>.

CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M. C. *Candida* biofilms: threats, challenges, and promising strategies. **Frontiers in Medicine**, v. 5, fev. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00028>.

CENDEJAS-BUENO, E. et al. Reclassification of the *Candida haemulonii* complex: *Candida haemulonii* (group I), *C. duobushaemulonii* sp. nov. (group II), and *C. haemulonii* var. *vulnera* var. nov. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 11, p. 3641–3651, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.02248-12>.

ČERNÁKOVÁ, L. et al. *Candida auris*: a quick review on identification, current treatments, and challenges. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, 4470, 2021. doi: 10.3390/ijms22094470.

CHAKRABARTI, A.; SOOD, P. On the emergence, spread and resistance of *Candida auris*: host, pathogen and environmental tipping points. **Journal of Medical Microbiology**, 2021.

Disponível em: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001332>.

CHANG, M. et al. Roles of three *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* efflux pump-coding genes in response to drug treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, e01751-17, 2018.

CHATTERJEE, S. et al. Draft genome of a commonly misdiagnosed multidrug-resistant pathogen *Candida auris*. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, 686, 2015.

CHEN, Z. F.; YING, G. G. Occurrence, fate and ecological risk of five typical azole fungicides as therapeutic and personal care products in the environment: a review. **Environment International**, v. 84, p. 142–153, 2015. doi: 10.1016/j.envint.2015.07.022.

CHEN, X. F. et al. Antifungal susceptibility profiles and drug resistance mechanisms of clinical *Candida duobushaemulonii* isolates from China. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1001845>.

CHEN, X. et al. **Clonal dissemination of antifungal-resistant *Candida haemulonii***, China. *Emerging Infectious Diseases*, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid2903.220712>.

CAO, C. et al. *Candida haemulonii* species complex: emerging fungal pathogens of the Metschnikowiaceae clade. **Zoonoses**, v. 3, n. 1, 2023. DOI: 10.15212/ZOONOSES-2023-0021.

CHOW, N. A. et al. Potential fifth clade of *Candida auris*, Iran, 2018. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 9, p. 1780–1781, 2019. doi: 10.3201/eid2509.190686.

CHOW, N. A.; DE GROOT, T.; BADALI, H.; ABASTABAR, M.; CHILLER, T. M.; MEIS, J. F. Potential fifth clade of *Candida auris*, Iran, 2018. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, p. 1780–1781, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid2509.190686>.

CHOW, N. A. et al. Tracing the evolutionary history and global expansion of *Candida auris* using population genomic analyses. **mBio**, v. 11, e03364–19, 2020. PMID: 32345637.

CHOWDHARY, A.; KATHURIA, S.; XU, J.; MEIS, J. F. Emergence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains due to agricultural azole use creates an increasing threat to human health. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, e1003633, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003633>.

CHOWDHARY, A. et al. A multicentre study of antifungal susceptibility patterns among 350 *Candida auris* isolates (2009–17) in India: role of the ERG11 and FKS1 genes in azole and echinocandin resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 4, p. 891–899, 2018. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx480>.

CHOWDHARY, A.; SHARMA, C.; MEIS, J. F. *Candida auris*: uma causa emergente rápida de infecções fúngicas multirresistentes adquiridas em hospitais em todo o mundo. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 5, e1006290, maio 2017.

CHOWDHARY, A. et al. New clonal strain of *Candida auris*, Delhi, India. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 10, p. 1670–1673, 2013.

<https://doi.org/10.3201/eid1910.130217>.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antifungal susceptibility testing of yeasts**. 1st ed. CLSI supplement M60. Wayne, PA: CLSI, 2017.

COLES, M.; COX, K.; CHAO, A. *Candida haemulonii*: an emerging opportunistic pathogen in the United States? **IDCases**, v. 21, e00900, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.idcr.2020.e00900>.

COSTA, G. L. da et al. *Candida palmioleophila*: a new emerging threat in Brazil? **Journal of Fungi**, v. 9, n. 7, 2023. <https://doi.org/10.3390/jof9070770>.

CZECHOWICZ, P.; NOWICKA, J.; GOŚCINIAK, G. Virulence factors of *Candida* spp. and host immune response important in the pathogenesis of vulvovaginal candidiasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, 5895, 2022.
<https://doi.org/10.3390/ijms23115895>.

DA SILVA, T. H. et al. Does maritime Antarctic permafrost harbor environmental fungi with pathogenic potential? **Fungal Biology**, v. 126, n. 8, p. 488–497, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2022.04.003>.

DE ALMEIDA, J. N. et al. *Candida haemulonii* complex species, Brazil, January 2010–March 2015. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 6, 2016.
<https://doi.org/10.3201/eid2206.151739>.

DE CRECY, E. et al. Directed evolution of a filamentous fungus toward thermotolerance. **BMC Biotechnology**, v. 9, n. 1, 2009. PMID: 19709419.

DE JONG, A. W. et al. *Candida khanbhai* sp. nov., a new clinically relevant yeast within the *Candida haemulonii* species complex. **Medical Mycology**, v. 61, n. 2, 2023.
<https://doi.org/10.1093/mmy/myad009>.

DE MACEDO, A. T. et al. Clonal outbreak of *Candida vulturna* in a paediatric oncology ward in Maranhão, Brazil. **Journal of Infection**, v. 89, n. 6, 2024.
<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2024.106349>.

DE SOUZA, P. C. et al. *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. **Journal of Microbiological Methods**, v. 118, p. 182–186, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.08.016>.

DE SOUZA, P. C. et al. An invertebrate host to study fungal infections, mycotoxins and antifungal drugs: *Tenebrio molitor*. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 4, 125, 2018.
<https://doi.org/10.3390/jof4040125>.

DEKKEROVÁ, J. et al. Farnesol enhances the antifungal effect of fluconazole and modulates resistance in *Candida auris* through regulation of the CDR1 and ERG11 genes. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 8, 783, 2022. <https://doi.org/10.3390/jof8080783>.

DELMA, F. Z. et al. Molecular mechanisms of 5-fluorocytosine resistance in yeasts and filamentous fungi. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 11, 909, 2021.

<https://doi.org/10.3390/jof7110909>.

DENG, Y. et al. Phenotypic switching and filamentation in *Candida haemulonii*, an emerging opportunistic pathogen of humans. **Microbiology Spectrum**, v. 9, n. 3, 2021. <https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.00779-2>.

DENNING, D. W. Global incidence and mortality of severe fungal disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 24, n. 7, p. e428–e438, 2024. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00692-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00692-8).

DOS SANTOS, M. M.; ISHIDA, K. We need to talk about *Candida tropicalis*: virulence factors and survival mechanisms. **Medical Mycology**, v. 61, n. 8, 2023. <https://doi.org/10.1093/MMY/MYAD075>.

DRAKULOVSKI, P. et al. Exposure of *Cryptococcus neoformans* to seven commonly used agricultural azole fungicides induces resistance to fluconazole as well as cross-resistance to voriconazole, posaconazole, itraconazole and isavuconazole. **Pathogens**, v. 12, n. 5, 2023. <https://doi.org/10.3390/pathogens12050662>.

DU, H. et al. *Candida auris*: epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 10, e1008921, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008921>.

DU, H. et al. *Candida vulturna* outbreak caused by cluster of multidrug-resistant strains, China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 29, n. 7, p. 1425–1428, 2023. <https://doi.org/10.3201/eid2907.230254>.

ESCANDÓN, P. Novel environmental niches for *Candida auris*: isolation from a coastal habitat in Colombia. **Journal of Fungi**, v. 8, 2022. <https://doi.org/10.3390/jof8070748>.

ESCANDÓN, P. et al. Molecular epidemiology of *Candida auris* in Colombia reveals a highly related, countrywide colonization with regional patterns in amphotericin B resistance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 68, n. 1, p. 15–21, 2019. <https://doi.org/10.1093/CID/CIY411>.

FAN, S. et al. A biological and genomic comparison of a drug-resistant and a drug-susceptible strain of *Candida auris* isolated from Beijing, China. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 1388–1399, 2021. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1928410>.

FARIA-RAMOS, I. et al. Environmental azole fungicide, prochloraz, can induce cross-resistance to medical triazoles in *Candida glabrata*. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 7, p. 1119–1123, 2014. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12193>.

FARID, N. et al. Repurposing Amphotericin B: anti-microbial, molecular docking and molecular dynamics simulation studies suggest inhibition potential of Amphotericin B against MRSA. **BMC Chemistry**, v. 17, n. 1, 2023. <https://doi.org/10.1186/s13065-023-00980-9>.

FATIMA, T.; FATIMA, Z.; HAMEED, S. Abrogation of efflux pump activity, biofilm formation, and immune escape by candidacidal geraniol in emerging superbug, *Candida auris*. **International Microbiology**, v. 26, n. 4, p. 881–891, 2023. <https://doi.org/10.1007/S10123-023-00343-3>.

FISHER, M. C. et al. Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 9, p. 557–571, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00720-1>.

FISHER, M. C.; HAWKINS, N. J.; SANGLARD, D.; GURR, S. J. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. **Science**, v. 360, n. 6390, p. 739–742, 2018. <https://doi.org/10.1126/science.aap7999>.

FLOWERS, S. A. et al. Contribution of clinically derived mutations in ERG11 to azole resistance in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 1, p. 450–460, 2015. <https://doi.org/10.1128/AAC.03470-14>.

FONSECA, M. S. et al. First description of *Candida haemulonii* infecting a snake *Boa constrictor*: molecular, pathological and antifungal sensitivity characteristics. **Microbial Pathogenesis**, v. 180, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106164>.

FORGÁCS, L. et al. Comparison of in vivo pathogenicity of four *Candida auris* clades in a neutropenic bloodstream infection murine model. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, p. 1160–1169, 2020. PMID: 32486923.

FRANCISCO, E. C.; DE JONG, A. W.; COLOMBO, A. L. *Candida haemulonii* species complex: a mini-review. **Mycopathologia**, v. 188, n. 6, p. 909–917, 2023. <https://doi.org/10.1007/s11046-023-00748-8>.

FRANÇOISE, U. et al. *Candida haemulonii* complex, an emerging threat from tropical regions? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 17, n. 7, p. e0011453, 2023. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011453>.

FRÍAS-DE-LEÓN, M. G. et al. **Superficial candidosis by *Candida duobushaemulonii*: an emerging microorganism**. *Infection, Genetics and Evolution*, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103960>.

FRÍAS-DE-LEÓN, M. G. et al. Antifungal resistance in *Candida auris*: molecular determinants. **Antibiotics**, v. 9, n. 9, p. 1–16, 2020. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090568>.

GADE, L. et al. Understanding the emergence of multidrug-resistant *Candida*: using whole-genome sequencing to describe the population structure of *Candida haemulonii* species complex. **Frontiers in Genetics**, v. 11, p. 554, 2020. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00554>.

GAREY, K. W. et al. Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. 25–31, 2006.

GEBER, A. et al. Deletion of the *Candida glabrata* ERG3 and ERG11 genes: effect on cell viability, cell growth, sterol composition, and antifungal susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 12, p. 2708–2717, 1995. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.12.270>.

GISI, U. Avaliação do risco de seleção e resistência para fungicidas inibidores de desmetilação em *Aspergillus fumigatus* na agricultura e medicina: uma revisão crítica. **Pest Management Science**, v. 70, p. 352–364, 2014. <https://doi.org/10.1002/ps.3664>.

GLAZIER, V. E. et al. Genetic analysis of the *Candida albicans* biofilm transcription factor network using simple and complex haploinsufficiency. **PLoS Genetics**, v. 13, n. 8, e1006948, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006948>.

GLUSHAKOVA, A.; KACHALKIN, A. Wild and partially synanthropic bird yeast diversity, in vitro virulence, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* strains isolated from feces. **International Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 883–897, 2024. <https://doi.org/10.1007/s10123-023-00437-y>.

GÓMEZ-GAVIRIA, M. et al. *Candida haemulonii* complex and *Candida auris*: biology, virulence factors, immune response, and multidrug resistance. **Infection and Drug Resistance**, v. 16, p. 1455–1470, 2023. <https://doi.org/10.2147/IDR.S402754>.

GUARANA, M.; NUCCI, M. Acute disseminated candidiasis with skin lesions: a systematic review. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 9, p. 940–948, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.03.009>.

GUELFAND, L.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L. Transient fungemia caused by an amphotericin B-resistant isolate of *Candida haemulonii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, 2002.

DRILLON, G. et al. Phylogenetic reconstruction based on synteny block and gene adjacencies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 37, n. 9, p. 2747–2762, 2020. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa114>.

GUERRERO, G. et al. Evolutionary, structural and functional relationships revealed by comparative analysis of syntenic genes in Rhizobiales. **BMC Evolutionary Biology**, v. 5, p. 55, 2005. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-5-55>.

GUPTA, A. K.; VENKATARAMAN, M. Antifungal resistance in superficial mycoses. **The Journal of Dermatological Treatment**, v. 33, n. 4, p. 1888–1895, 2022. <https://doi.org/10.1080/09546634.2021.1970954>.

HAQ, M. F. et al. Efficacy of 23 commonly used liquid disinfectants against *Candida auris* isolates from the 4 major clades. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, 2023, p. 1–5. <https://doi.org/10.1017/ice.2023.132>.

HERNANDEZ, H.; MARTINEZ, L. R. Relationship of environmental disturbances and the infectious potential of fungi. **Microbiology**, v. 164, n. 3, p. 233–241, 2018. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000620>.

HOLMES, A. R. et al. The ABC transporter Cdr1p contributes more than Cdr2p to fluconazole efflux in fluconazole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 11, p. 3851–3862, 2008. <https://doi.org/10.1128/AAC.00463-08>.

HORTON, M. V.; NETT, J. E. **Candida auris infection and biofilm formation: going beyond the surface.** Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40588-020-00143-7>.

HOU, X. et al. Identification and antifungal susceptibility profiles of *Candida haemulonii* species complex clinical isolates from a multicenter study in China. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 2676–2680, 2016. <https://doi.org/10.1128/jcm.01492-16>.

HOU, X. et al. Identification and antifungal susceptibility profiles of complex clinical isolates of *Candida haemulonii* species from a multicenter study in China. **Journal of Clinical Microbiology**, 2016. <https://doi.org/10.1128/JCM.01563-16>.

HUANG, X. et al. Murine model of colonization with fungal pathogen *Candida auris* to explore skin tropism, host risk factors and therapeutic strategies. **Cell Host & Microbe**, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.06.001>.

HUANG, W. et al. Synergistic antifungal activity of green synthesized silver nanoparticles and epoxiconazole against *Setosphaeria turcica*. **Journal of Nanomaterials**, 2020, p. 1–7, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/1234567>.

HUANG, Y. et al. Insight into virulence and mechanisms of amphotericin B resistance in the *Candida haemulonii* complex. **Journal of Fungi**, v. 10, n. 9, p. 615, 2024. <https://doi.org/10.3390/jof10090615>.

HULL, C. M. et al. Facultative sterol uptake in an ergosterol-deficient clinical isolate of *Candida glabrata* harboring a nonsense mutation in *ERG11* and exhibiting cross-resistance to azoles and amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 4223–4232, 2012. <https://doi.org/10.1128/AAC.00512-12>.

INGLIS, D. O.; SHERLOCK, G. Ras signaling gets fine-tuned: regulation of multiple pathogenic traits of *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, v. 12, p. 1316–1325, 2013. <https://doi.org/10.1128/EC.00094-13>.

IRINYI, L. et al. In silico environmental sampling of emerging fungal pathogens via big data analysis. **Fungal Ecology**, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2023.101831>.

JACKSON, B. R. et al. On the origins of a species: what can explain the rise of *Candida auris*? **Journal of Fungi (Basel)**, v. 5, p. 58, 2019. <https://doi.org/10.3390/jof5040058>.

JØRGENSEN, L. N.; HEICK, T. M. Azole use in agriculture, horticulture, and wood preservation – is it indispensable? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 730297, 2021. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.730297>.

KADRY, A. A.; EL-GANINY, A. M.; EL-BAZ, A. M. Relationship between Sap prevalence and biofilm formation among resistant clinical isolates of *Candida albicans*. **African Health Sciences**, v. 18, p. 1166–1174, 2018. <https://doi.org/10.4314/ahs.v18i4.37>.

KARUNARATHNA, I. et al. **Amphotericin B: A comprehensive overview of its clinical applications and toxicity management.** 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.13727.57761>.

- KATHURIA, S. et al. Multidrug-resistant *Candida auris* misidentified as *Candida haemulonii*: characterization by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry and DNA sequencing and its antifungal susceptibility profile variability by Vitek 2, CLSI broth microdilution, and Etest method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, 2015. <https://doi.org/10.1128/jcm.00367-15>.
- KATZ, M. E.; COOPER, S. Extreme diversity in the regulation of Ndt80-like transcription factors in fungi. **G3 (Bethesda)**, v. 5, p. 2783–2792, 2015.
- KEAN, R. et al. The comparative efficacy of antiseptics against *Candida auris* biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 52, n. 5, p. 673–677, nov. 2018.
- KHAN, Z. U. et al. Outbreak of fungemia among neonates caused by *Candida haemulonii* resistant to amphotericin B. **American Journal of Infection Control**, v. 35, n. 2, p. 133–135, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.05.011>.
- KHARI, A.; BISWAS, B.; GANGWAR, G.; THAKUR, A.; PURIA, R. *Candida auris* biofilm: a review on model to mechanism conservation. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 21, n. 3, p. 295–308, 2023.
- KLAPS, J. et al. *Candida metrosideri* pro tempore sp. nov. and *Candida ohialehuae* pro tempore sp. nov., two antifungal-resistant yeasts associated with *Metrosideros* polymorpha flowers in Hawaii. **PLoS ONE**, v. 15, n. 10, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240093>.
- KORDALEWSKA, M. et al. Understanding echinocandin resistance in the emerging pathogen *Candida auris*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, 2018. <https://doi.org/10.1128/aac.00238-18>.
- KULSHRESTHA, A.; GUPTA, P. Secreted aspartyl proteases family: a perspective review on the regulation of fungal pathogenesis. **Future Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 295–309, 2023. <https://doi.org/10.2217/fmb-2022-0143>.
- KUMAR, A.; VERMA, V. K. Role of *Candida auris* in human infections: a review. **Fungal Genetics and Biology**, v. 159, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2022.103573>.
- KUMARI, A. et al. Adhesins in the virulence of opportunistic fungal pathogens of human. **Mycology**, v. 12, n. 4, p. 296–324, 2021.
- KWON, Y. J. et al. *Candida auris* clinical isolates from South Korea: identification, antifungal susceptibility, and genotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, 2019. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30728190/>.
- LACHANCE, M. A. et al. *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian Hibiscus flowers. **Canadian Journal of Microbiology**, 1999.
- LANIADO-LABORÍN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 4, p. 223–227, 2009.

LAVARDE, V. Peritonite micósica em *Torulopsis haemulonii*. **Bulletin de la Société Française de Mycologie Médicale**, v. 13, p. 173–176, 1984.

LEE, Y.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Molecular mechanisms governing antifungal drug resistance. **Npj Antimicrobials and Resistance**, v. 1, n. 1, 2023. <https://doi.org/10.1038/s44259-023-00007-2>.

LAFORÊT, L. et al. Pga26 mediates filamentation and biofilm formation and is required for virulence in *Candida albicans*. **FEMS Yeast Research**, v. 11, n. 5, p. 389–397, ago. 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00727.x>.

LI, J. et al. Novel ERG11 and TAC1b mutations associated with azole resistance in *Candida auris*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2021. Disponível em: <https://journals.asm.org/journal/aac>.

LIMA, S. L. et al. Increasing prevalence of multidrug-resistant *Candida haemulonii* species complex among all yeast cultures collected by a reference laboratory over the past 11 years. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 3, p. 110, 2020. <https://doi.org/10.3390/jof6030110>.

LIMTONG, S.; YONGMANITCHAI, W. ***Candida chanthaburiensis* sp. nov., *Candida kungkrabaensis* sp. nov. and *Candida suratensis* sp. nov., three novel yeast species from decaying plant materials submerged in water of mangrove forests**. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 98, n. 3, p. 379–388, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9451-3>.

LIU, D.; HUNT, M.; TSAI, I. J. Inferring synteny between genome assemblies: a systematic evaluation. **BMC Bioinformatics**, v. 19, p. 26, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2026-4>.

LIU, F. et al. **Phylogenomic analysis of the *Candida auris*-*Candida haemuli* clade and related taxa in the Metschnikowiaceae, and proposal of thirteen new genera, fifty-five new combinations and nine new species**. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 2024. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2024.52.02>.

LIU, Y. et al. The impact of *Candida auris* on *Candida* species resistance profiles and the mechanisms of fluconazole resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 67, n. 6, 2023. <https://doi.org/10.1128/AAC.02375-22>.

LOCKHART, S. R.; CHOWDHARY, A.; GOLD, J. A. W. The rapid emergence of antifungal-resistant human-pathogenic fungi. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 12, p. 818–832, 2023. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00960-9>.

LOGAN, A.; WOLFE, A.; WILLIAMSON, J. C. Antifungal resistance and the role of new therapeutic agents. **Current Infectious Disease Reports**, v. 24, n. 9, p. 105, 2022. <https://doi.org/10.1007/S11908-022-00782-5>.

LYMAN, M. et al. Notes from the field: transmission of pan-resistant and echinocandin-resistant *Candida auris* in health care facilities—Texas and the District of Columbia, January–April 2021. **MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 70, p. 1022–1023, 2021. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7029a2>.

MACIEL, N. O. P. et al. **Occurrence, antifungal susceptibility, and virulence factors of opportunistic yeasts isolated from Brazilian beaches.** [S.l.], 2019.

MAHDIZADE, A. H. et al. The TAC1 gene in *Candida albicans*: structure, function, and role in azole resistance: a mini-review. **Microbial Drug Resistance**, v. 30, n. 7, p. 288–296, jul. 2024. <https://doi.org/10.1089/mdr.2023.0334>.

MANCERA, E. et al. Evolution of the complex transcription network controlling biofilm formation in *Candida* species. **ELife**, v. 10, 2021. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.64682>.

MARTINS, M. et al. Addition of DNase improves the in vitro activity of antifungal drugs against *Candida albicans* biofilms. **Mycoses**, v. 55, p. 80–85, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2011.02047.x>.

MEDEIROS, A. O. et al. Diversity and antifungal susceptibility of yeasts from tropical freshwater environments in Southeastern Brazil. **Water Research**, v. 42, n. 14, p. 3921–3929, 2008. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2008.05.026>.

MEYER, W. et al. A multi-locus sequence typing scheme for *Candida auris* and other members of the *Candida haemulonii* complex. **Fungal Genetics and Biology**, v. 129, p. 10–19, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.03.001>.

MIN, K.; BIERMANN, A.; HOGAN, D. A.; KONOPKA, J. B. **Genetic analysis of NDT80 family transcription factors in *Candida albicans* using new CRISPR-Cas9 approaches.** mSphere, 2018. <https://doi.org/10.1128/mSphere>.

MOGAVERO, S.; HUBE, B. *Candida albicans* interaction with oral epithelial cells: adhesion, invasion, and damage assays. **Methods in Molecular Biology**, v. 2260, p. 133–143, 2021. DOI: 10.1007/978-1-0716-1182-1_9.

MORA-MONTES, H. M. et al. **Protein glycosylation in *Candida*.** Future Microbiology, p. 1167–1183, 2009. DOI: 10.2217/fmb.09.88.

MOURER, T.; EL GHALID, M.; D'ENFERT, C.; BACHELLIER-BASSI, S. Involvement of amyloid proteins in the formation of biofilms in the pathogenic yeast *Candida albicans*. **Research in Microbiology**, v. 172, n. 3, 2021. DOI: 10.1016/j.resmic.2021.103813.

MÜLLER, P. et al. Investigation of the susceptibility of *Candida auris* and *Candida albicans* to chemical disinfectants using European Standards EN 13624 and EN 16615. **Journal of Hospital Infection**, v. 105, p. 648–656, 2020.

MÜLLER, F. M. C. et al. Cross-resistance to medical and agricultural azole drugs in yeasts from the oropharynx of human immunodeficiency virus patients and from environmental Bavarian vine grapes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 8, p. 3014–3016, 2007. DOI: 10.1128/AAC.00459-07.

MUTHUSAMY, A.; RAO, M.; CHAKRABARTI, A.; VELAYUTHAN, R. D. Case report: catheter related blood stream infection caused by *Candida vulturna*. **Medical Mycology Case Reports**, p. 27–30, 2022. DOI: 10.1016/j.mmcr.2022.04.001.

NARAYANAN, A. et al. **Functional and comparative analysis of centromeres reveals clade-specific genome rearrangements in *Candida auris* and a chromosome number change in related species.** 2021. DOI: 10.1128/mBio.00905-21.

NAVARRO-MUÑOZ, J. C. et al. The high-quality complete genome sequence of the opportunistic fungal pathogen *Candida vulturna* CBS 14366(T). **Mycopathologia**, p. 731–734, 2019. DOI: 10.1007/s11046-019-00404-0.

NIELSEN, K. et al. Yeast: the misunderstood component of fungal virulence. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 12, p. 1123–1131, 2017. DOI: 10.1016/j.tim.2017.09.006.

NNADI, N. E.; CARTER, D. A. Climate change and the emergence of fungal pathogens. **PLOS Pathogens**, v. 17, n. 4, 2021. DOI: 10.1371/journal.ppat.1009503.

NOBILE, C. J. et al. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. **Cell**, v. 148, n. 1–2, p. 126–138, 2012. DOI: 10.1016/j.cell.2011.10.048.

NUNES, J. M.; BIZERRA, F. C.; FERREIRA, R. C. E.; COLOMBO, A. L. Molecular identification, antifungal susceptibility profile, and biofilm formation of clinical and environmental *Rhodotorula* species isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, 2013.

O'SHAUGHNESSY, E. M.; LYMAN, C. A.; WALSH, T. J. **Amphotericin B**: polyene resistance mechanisms. In: *Antimicrobial Drug Resistance*, 2009, p. 295–305. DOI: 10.1007/978-1-59745-180-2_25.

Oberoi, J. K. et al. Non-*albicans* *Candida* species in bloodstream infections in a tertiary care hospital at New Delhi, India. **Indian Journal of Medical Research**, v. 136, n. 6, p. 997–1003, dez. 2012.

OH, B. J. et al. Biofilm formation and genotyping of *Candida haemulonii*, *Candida pseudohaemulonii*, and a proposed new species (*Candida auris*) isolates from Korea. **Medical Mycology**, p. 98–102, 2011. DOI: 10.3109/13693786.2010.493563.

OPULENTE, D. A. et al. Pathogenic budding yeasts isolated outside clinical settings. **FEMS Yeast Research**, v. 19, n. 3, 2019. DOI: 10.1093/femsyr/foz032.

PADDER, S. A. et al. Metabolic flexibility and extensive adaptability governing multiple drug resistance and enhanced virulence in *Candida albicans*. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 1–20, 2021. DOI: 10.1080/1040841X.2021.1935447.

PAPPAS, P. G. et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 4, p. e1–e50, 2018. DOI: 10.1093/cid/cix166.

PATA, J. et al. Purification and characterization of Cdr1, the drug-efflux pump conferring azole resistance in *Candida* species. **Biochimie**, v. 220, p. 167–178, 2024.

PAUL, S. et al. Dinâmica do desenvolvimento in vitro de resistência a azol em *Candida*

tropicalis. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 22, p. 553–561, 2020. DOI: 10.1016/j.jgar.2020.04.018.

PELTROCHE-LLACSAHUANGA, H.; SALAZAR, M.; VALENZUELA, P. Candida auris in the environment: a review of environmental sampling, biofilm formation, and persistence. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 9, p. 956, 2022. DOI: 10.3390/jof8090956.

PHARKJAKSU, S.; BOONMEE, N.; MITRPANT, C.; NGAMSKULRUNGROJ, P. Immunopathogenesis of emerging Candida auris and Candida haemulonii strains. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 9, 2021. DOI: 10.3390/jof7090725.

PIMENTÃO, A. R. et al. Current trends and mismatches on fungicide use and assessment of the ecological effects in freshwater ecosystems. In: **Environmental Pollution**, v. 347, 2024. DOI: 10.1016/j.envpol.2024.123678.

PRASAD, R.; SHAH, A. H.; RAWAL, M. K. Antifúngicos: mecanismo de ação e resistência a medicamentos. In: **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 892, p. 327–349, 2016. DOI: 10.1007/978-3-319-25304-6_14.

RAI, L. S. et al. The Candida albicans biofilm gene circuit modulated at the chromatin level by a recent molecular histone innovation. **PLoS Biology**, v. 17, 2019. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000422.

RAJENDRAN, R. et al. Integrating Candida albicans metabolism with biofilm heterogeneity by transcriptome mapping. **Scientific Reports**, v. 6, 35436, 2016.

RAMOS, L. S. et al. Candida haemulonii complex: species identification and antifungal susceptibility profiles of clinical isolates from Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 111–115, 2015. DOI: 10.1093/jac/dku321.

RAMOS, L. S. et al. The threat called Candida haemulonii species complex in Rio de Janeiro State, Brazil: focus on antifungal resistance and virulence attributes. **Journal of Fungi**, v. 8, 574, 2022. DOI: 10.3390/jof8060574.

RAMOS, L. S. et al. Surface, adhesiveness and virulence aspects of Candida haemulonii species complex. **Medical Mycology**, p. 973–986, 2020. DOI: 10.1093/mmy/myz139.

RAMOS, R. et al. **Emerging multidrug-resistant Candida duobushaemulonii infections in Panama hospitals**: importance of laboratory surveillance and accurate identification. 2018.

RAZAVI, T. et al. Investigating the expression of ALS2 and ALS9 genes along with allele frequency of ALS9 in patients with vulvovaginal candidiasis. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 82, p. 104253, 2020.

REDDY, K. et al. Candida auris: a review of emerging fungal pathogen and antifungal resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 60, n. 6, p. 106810, 2022. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2022.106810.

ROBBINS, N.; CAPLAN, T.; COWEN, L. E. **Molecular evolution of antifungal drug resistance**. 2017. DOI: 10.1146/annurev-micro-030117.

RODRIGUES, D. K. B. et al. Antifungal susceptibility profile of *Candida* clinical isolates from 22 hospitals of São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 54, n. 9, 2021. DOI: 10.1590/1414-431X2020E10928.

RODRIGUES, M. L.; NOSANCHUK, J. D. Recognition of fungal priority pathogens: what next? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 17, n. 3, 2023. DOI: 10.1371/journal.pntd.0011136.

RODRÍGUEZ-CERDEIRA, C. et al. Pathogenesis and clinical relevance of *Candida* biofilms in vulvovaginal candidiasis. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.544480.

RYBAK, J. M.; CUOMO, C. A.; ROGERS, P. D. The molecular and genetic basis of antifungal resistance in the emerging fungal pathogen *Candida auris*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 70, 2022. DOI: 10.1016/j.mib.2022.102208.

SALUJA, P.; PRASAD, G. S. *Candida ruelliae* sp. nov., a novel yeast species isolated from flowers of *Ruellia* sp. (Acanthaceae). **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 4, p. 660–666, 2008. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2008.00372.x.

SÁNCHEZ-RANGEL, D. et al. Environmental pH modulates transcriptomic responses in the fungus *Fusarium* sp. associated with *KSHB Euwallacea* sp. near *forficatus*. **BMC Genomics**, v. 19, p. 721, 2018. DOI: 10.1186/s12864-018-5083-1.

SANTANA, D. J.; ZHAO, G.; O'MEARA, T. R. The many faces of *Candida auris*: phenotypic and strain variation in an emerging pathogen. **PLoS Pathogens**, v. 20, n. 3, 2024. DOI: 10.1371/journal.ppat.1012011.

SATALA, D. et al. The role of *Candida albicans* virulence factors in the formation of multispecies biofilms with bacterial periodontal pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 2022. DOI: 10.3389/fcimb.2021.765942.

SATOH, K. et al. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. **Microbiology and Immunology**, v. 53, n. 1, p. 41–44, 2009. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2008.00083.x.

SCHIKORA-TAMARIT, M. À.; GABALDÓN, T. Recent gene selection and drug resistance underscore clinical adaptation across *Candida* species. **Nature Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 284–307, 2024. DOI: 10.1038/s41564-023-01547-z.

SEN, P. et al. Understanding the environmental drivers of clinical azole resistance in *Aspergillus* species. **Drug Target Insights**, v. 16, n. 1, p. 25–35, 2022. DOI: 10.33393/dti.2022.2476.

SHARMA, C. et al. *Candida auris*: a review of the clinical experience and potential treatment options. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 6, 2020. DOI: 10.1128/AAC.02356-19.

SHIN, J. H. et al. Detection of amphotericin B resistance in *Candida haemulonii* and closely related species by use of the Etest, Vitek-2 yeast susceptibility system, and CLSI and

EUCAST broth microdilution methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, 2012. DOI: 10.1128/jcm.06440-11.

SHUKLA, A.; SOBEL, J. D. Vulvovaginitis caused by *Candida* species following antibiotic exposure. **Current Infectious Disease Reports**, v. 21, p. 44, 2019. DOI: 10.1007/s11908-019-0700-y.

SIGERA, L. S. M.; DENNING, D. W. Flucytosine and its clinical use. **Therapeutic Advances in Infectious Diseases**, v. 10, 2023. DOI: 10.1177/20499361231161387.

SIKORA, A.; HASHMI, M. F.; ZAHRA, F. **Candida auris**. [Updated 2023 Aug 28]. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563297/>.

SILVA, L. N. et al. Insights into the multi-azole resistance profile in *Candida haemulonii* species complex. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 1–16, 2020.

SILVA, L. N. et al. Development of echinocandin resistance in *Candida haemulonii*: an emergent, widespread, and opportunistic fungal pathogen. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 8, 2023. DOI: 10.3390/jof9080859.

SILVA, L. N. et al. Unmasking mechanisms of amphotericin B resistance in the *Candida haemulonii* species complex. **ACS Infectious Diseases**, v. 6, p. 1273–1282, 2020.

SIPICZKI, M.; TAP, R. M. *Candida vulturna* pro tempore sp. nov., a dimorphic yeast species related to the *Candida haemulonii* species complex isolated from flowers and clinical sample. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, p. 4009–4015, 2016.

SMOLARZ, M. et al. Extracellular nucleic acids present in the *Candida albicans* biofilm trigger the release of neutrophil extracellular traps. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 2021. DOI: 10.3389/fcimb.2021.681030.

SNELDERS, E. et al. Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 12, p. 4053–4057, 2009. DOI: 10.1128/AEM.00231-09.

SNELDERS, E. et al. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. **PLoS Medicine**, v. 5, 2008. DOI: 10.1371/journal.pmed.0050219.

SPRUJTENBURG, B. et al. Confirmation of fifth *Candida auris* clade by whole genome sequencing. **Emerging Microbes and Infections**, v. 11, n. 1, p. 2405–2411, 2022. DOI: 10.1080/22221751.2022.2125349.

STERLING, T. R.; MERZ, W. G. Resistance to amphotericin B: emerging clinical and microbiological patterns. **Drug Resistance Updates**, v. 1, n. 3, p. 161–165, 1998. DOI: 10.1016/S1368-7646(98)80034-4.

STONE, N. R.; BICANIC, T.; SALIM, R.; HOPE, W. Liposomal amphotericin B

(AmBisome®): a review of the pharmacokinetics, pharmacodynamics, clinical experience and future directions. **Drugs**, v. 76, p. 485–500, 2016.

SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; POONWAN, N.; MEKHA, N. *Candida pseudohaemulonii* sp. nov., an amphotericin B- and azole-resistant yeast species, isolated from the blood of a patient from Thailand. **Microbiology and Immunology**, p. 469–473, 2006. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2006.tb03816.x.

SUPHAVILAI, C. et al. Detection and characterisation of a sixth *Candida auris* clade in Singapore: a genomic and phenotypic study. **The Lancet Microbe**, v. 5, n. 9, 2024. DOI: 10.1016/S2666-5247(24)00101-0.

SZEKELY, A.; BORMAN, A. M.; JOHNSON, E. M. *Candida auris* isolates of the Southern Asian and South African lineages exhibit different phenotypic and antifungal susceptibility profiles in vitro. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, 2019. PMID: 30867237.

SZYMAŃSKI, M.; CHMIELEWSKA, S.; CZYŻEWSKA, U.; MALINOWSKA, M.; TYLICKI, A. Echinocandins - structure, mechanism of action and use in antifungal therapy. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 37, n. 1, p. 876–894, 2022. DOI: 10.1080/14756366.2022.2050224.

TAKAHASHI, J. P. F. et al. Could fungicides lead to azole drug resistance in a cross-resistance manner among environmental *Cryptococcus* strains? **Current Fungal Infection Reports**, v. 14, n. 1, p. 9–14, 2020. DOI: 10.1007/s12281-020-00373-8.

TALAZADEH, F.; GHORBANPOOR, M.; SHAHRIYARI, A. Candidiasis in birds (Galliformes, Anseriformes, Psittaciformes, Passeriformes, and Columbiformes): a focus on antifungal susceptibility pattern of *Candida albicans* and non-*albicans* isolates in avian clinical specimens. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 46, p. 100598, 2022. DOI: 10.1016/J.TCAM.2021.100598.

TUMBARELLO, M. et al. Risk factors and outcomes of candidemia caused by biofilm-forming isolates in a tertiary care hospital. **PLoS ONE**, v. 7, p. e33705, 2012.

VALOTTEAU, C.; PRYSTOPIUK, V.; CORMACK, B. P.; DUFRÊNE, Y. F.; MITCHELL, A. P. Atomic force microscopy demonstrates that *Candida glabrata* uses three Epa proteins to mediate adhesion to abiotic surfaces. **mSphere**, v. 4, e00277-19, 2019. DOI: 10.1128/mSphere.00277-19.

VERMES, A.; GUCHELAAR, H. J.; DANKERT, J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity, and drug interactions. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, p. 171–179, 2000.

VERWEIJ, P. E.; KEMA, G. H.; ZWAAN, B.; MELCHERS, W. J. Triazole fungicides and the selection of resistance to medical triazoles in the opportunistic fungus *Aspergillus fumigatus*. **Pest Management Science**, v. 69, p. 165–170, 2013. DOI: 10.1002/ps.3390.

VILA, T. et al. Comparative evaluations of the pathogenesis of *Candida auris* phenotypes and *Candida albicans* using clinically relevant murine models of infections. **mSphere**, v. 5, 2020. PMID: 32759340.

- WÄCHTLER, B.; WILSON, D.; HAEDICKE, K.; DALLE, F.; HUBE, B. From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. **PLOS ONE**, v. 6, n. 2, e17046, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0017046.
- WALL, G.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Current antimycotics, new perspectives and future approaches for antifungal therapy. **Antibiotics**, v. 9, p. 445, 2020.
- WANG, Z. et al. Light sensing by opsins and fungal ecology: NOP-1 modulates entry into sexual reproduction in response to environmental cues. **Molecular Ecology**, v. 27, n. 1, p. 216–232, 2018. DOI: 10.1111/mec.14425.
- WANG, F. et al. Increased triazole-resistance and *cyp51A* mutations in *Aspergillus fumigatus* after selection with a combination of the triazole fungicides difenoconazole and propiconazole. **Journal of Hazardous Materials**, v. 400, 123200, 2020.
- WANG, S. A.; JIA, J. H.; BAI, F. Y. *Candida alocasiicola* sp. nov., *Candida hainanensis* sp. nov., *Candida heveicola* sp. nov. and *Candida musiphila* sp. nov., novel anamorphic, ascomycetous yeast species isolated from plants. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 94, n. 2, p. 257–265, 2008. DOI: 10.1007/s10482-008-9238-y.
- WELSH, R. M. et al. Survival, persistence, and isolation of the emerging multidrug-resistant yeast pathogen *Candida auris* on a healthcare plastic surface. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, p. 2996–3005, 2017. DOI: 10.1128/JCM.00921-17.
- WELSH, R. M.; SEXTON, D. J.; FORSBERG, K.; VALLABHANENI, S.; LITVINTSEVA, A. Insights into the unique nature of the East Asian clade of the emerging pathogenic yeast *Candida auris*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, 2019. PMID: 30760535.
- WHO. **fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action**. Geneva: WHO, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241>.
- WINN, R. E.; BOWER, J. H.; RICHARDS, J. F. Acute toxic delirium: neurotoxicity of intrathecal amphotericin B. **Archives of Internal Medicine**, v. 139, n. 6, p. 706–707, 1979.
- WOODS, M.; MCALISTER, J. A.; GEDDES-MCALISTER, J. A One Health approach to overcoming fungal disease and antifungal resistance. **WIREs Mechanisms of Disease**, v. 15, n. 4, 2023. DOI: 10.1002/wsbm.1610.
- WU, H. et al. *Candida albicans* secreted aspartic proteases 4-6 induce apoptosis of epithelial cells by a novel Trojan horse mechanism. **FASEB Journal**, v. 27, p. 2132–2144, 2013.
- XIANG, M.-J. et al. *Erg11* mutations associated with azole resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. **FEMS Yeast Research**, v. 13, n. 4, p. 386–393, 2013. DOI: 10.1111/1567-1364.12042.
- YADAV, A. et al. *Candida auris* in dog ears. **Journal of Fungi**, v. 9, 2023. DOI: 10.3390/jof9070720.

ZAJC, J.; GOSTINČAR, C.; ČERNOŠA, A.; GUNDE-CIMERMAN, N. Stress-tolerant yeasts: opportunistic pathogenicity versus biocontrol potential. **Genes**, v. 10, n. 1, p. 42, 2019. DOI: 10.3390/genes10010042.

ZHANG, Q. et al. Regulation of filamentation in the human fungal pathogen *Candida tropicalis*. **Molecular Microbiology**, v. 99, n. 3, p. 528–545, 2016. DOI: 10.1111/MMI.13247.

ZHU, H.; LIU, M.; BOEKHOUT, T.; WANG, Q. Improvement of a MALDI-TOF database for the reliable identification of *Candidozyma auris* (formally *Candida auris*) and related species. **Microbiology Spectrum**, 2024. DOI: 10.1128/spectrum.01444-24.