

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

Aline Dias Valério

**ANÁLISE DE ASPECTOS DA VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA A ANTIFÚNGICOS  
DE ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE *CANDIDA ALBICANS***

Belo Horizonte

2021

Aline Dias Valério

**ANÁLISE DE ASPECTOS DA VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA A ANTIFÚNGICOS  
DE ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE *CANDIDA ALBICANS***

Tese de Doutorado apresentado ao  
programa de Pós-graduação em  
Microbiologia do Instituto de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal de  
Minas Gerais

Orientadora: Susana Johann

Belo Horizonte  
2021

- 043 Valério, Aline Dias.  
Análise de aspectos da virulência e resistência a antifúngicos de isolados clínicos e ambientais de *Candida albicans* [manuscrito] / Aline Dias Valério. – 2021.  
229 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Susana Johann.  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.
1. Microbiologia. 2. *Candida albicans*. 3. Virulência. 4. Farmacorresistência Fúngica. I. Johann, Susana. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



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

**ATA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO**

**ATA DA DEFESA DE TESE DE ALINE DIAS VALÉRIO**

Nº REGISTRO: 2017755766

Às 13:30 horas do dia 26 de julho de 2021, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Nalu Teixeira de Aguiar Peres (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Ludmila de Matos Baltazar ((Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Luana Rossato (UFGD), Cleide Viviane Buzanello Martins (Unioeste) e a Prof(a). Susana Johann – Orientadora, para julgar o trabalho final “Análise de aspectos da virulência e resistência à antifúngicos de isolados clínicos e ambientais de *Candida albicans*”, da aluna ALINE DIAS VALÉRIO, requisito final para a obtenção do Grau de DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Susana Johann (Presidente da banca), 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 Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 26 de julho de 2021.

Membros da banca:

Profa. Dra. Nalu Teixeira de Aguiar Peres

Dra. Ludmila de Matos Baltazar

Profa. Dra. Luana Rossato

Profa. Dra. Cleide Viviane Buzanello Martins

De acordo:

Profa Dra. Susana Johann

(orientadora)

Profa. Dra. Danielle da Glória de Souza

(Coordenadora)

Belo Horizonte, 26 de julho de 2021.



Documento assinado eletronicamente por Nalu Teixeira de Aguiar Peres, Professora do Magistério Superior, em 28/07/2021, às 17:57, 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, Coordenador(a) de curso de pós-graduação, em 29/07/2021, às 14:13, 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 02/08/2021, às 14:59, 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 Ludmila de Matos Baltazar, Usuário Externo, em 04/08/2021, às 16:36, 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 Cleide Viviane Buzanello Martins, Usuário Externo, em 09/08/2021, às 19:31, 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 Daniele da Gloria de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação, em 10/08/2021, às 14:05, 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](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 0811089 e o código CRC FC7EC067.

*Dedico este trabalho a minha família, os quais sempre foram os maiores incentivadores dos meus estudos e que me apoiaram em todos os momentos.*

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus, que foi sempre meu refúgio e me iluminou durante todos os momentos, principalmente naqueles difíceis. Agradeço a minha família, tudo que fiz e faço é por vocês, só cheguei aqui por causa do apoio, dedicação e confiança de vocês, sei que muitas vezes vocês abriram mão de coisas para que eu pudesse chegar até aqui, nem se eu viver 100 anos vou ser capaz de retribuir tudo, mas espero poder fazê-lo ao máximo. Vocês são a melhor parte da minha vida, os meus amores! Agradeço meu namorado por todo apoio durante esses anos, por sempre me ouvir e apoiar. Agradeço as minhas amigas, que mesmo a distância se fizeram presentes e me apoiaram em todos os momentos.

Sou muito grata a Susana por ter aceitado minha orientação, por ter me confiado este projeto lindo e por me acalmar em momentos que achei que não iria dar conta. Serei eternamente grata por tudo. Agradeço a professora Viviane que me ajudou a entrar no doutorado aqui na UFMG. Também sou grata aos professores Carlos e Luiz Rosa que sempre estiveram a disposição para sanar dúvidas e emprestar seus equipamentos no laboratório. Agradeço a Ana Raquel e a Thaís que sempre estavam dispostas a me ajudar no que fosse preciso no laboratório. Agradeço a toda a equipe do “Lab Fungos” que me acolheram muito bem e sempre me ajudaram em tudo. Obrigada pelas conversas, pelas ajudas em experimentos, pelas risadas. Vou sempre levá-los em um lugar especial do meu coração.

Agradeço ao professor Carlos Rosa, a professora Cleide e aos seus alunos pelas amostras utilizadas neste trabalho.

Agradeço imensamente a todos os professores que passaram pela minha vida de estudante, cada um deixou à sua maneira uma marca em minha vida, e com certeza me ajudaram a compreender e amar a ciência. Agradeço aos funcionários da UFMG, as pessoas da limpeza, secretários e técnicos, o trabalho de vocês nos ajuda muito.

Agradeço a todos os cientistas, principalmente as mulheres, que em meio a dificuldades financeiras, dupla jornada de trabalho, desvalorização e tantos outros problemas seguem fazendo ciência neste país. Espero que o futuro traga o

reconhecimento merecido a quem segue lutando bravamente pela pesquisa científica brasileira.

Agradeço a Universidade Federal de Minas Gerais, ao programa de pós-graduação em Microbiologia, ao CNPq pela bolsa concedida e pelo financiamento do projeto.

"Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos."

Marie Curie

## Resumo

A incidência de infecções fúngicas tem aumentado nas últimas décadas. As infecções fúngicas atingem principalmente indivíduos imunossuprimidos e as poucas opções terapêuticas disponíveis no mercado dificultam o tratamento, principalmente com a emergência de isolados de *Candida* spp. resistentes a uma ou mais classes de antifúngicos. Além de serem agentes etiológicos de infecções, microrganismos do gênero *Candida* podem ser isolados nos mais diferentes ambientes. *C. albicans* é um exemplo de espécie que pode ser encontrada vivendo como comensal no corpo humano, como agente etiológico de infecções, e na natureza. Conhecer as características dos isolados ambientais desses microrganismos é de extrema relevância, principalmente se os mesmos apresentarem algum sinal de virulência e/ou resistência, colocando-os como potenciais patógenos humanos. Levando em consideração estes temas, o trabalho visa analisar aspectos da virulência e resistência de isolados de *C. albicans* ambientais e clínicas, buscando compreender melhor como essas variáveis são expressas na natureza, e ao final realizar uma comparação com o que é encontrado no ambiente clínico. Termotolerância a diferentes temperaturas, adesão em células epiteliais bucais, produção de enzimas hidrolíticas, formação de biofilme, virulência em modelo invertebrado e susceptibilidade a fluconazol, itraconazol e anfotericina B foram os fatores analisados em isolados clínicos, ambientais antropizados e a sem antropização no presente trabalho. Os isolados ambientais, principalmente os isolados de locais com influência antrópica, apresentaram resultados das variáveis analisadas semelhantes aos obtidos com os isolados clínicos. A maioria dos isolados avaliados apresentaram crescimento até 45°C. Nos testes de morfogêneses os isolados, de forma geral, apresentaram maior filamentação no meio SPIDER. Isolados ambientais e clínicos, em sua maioria, foram produtores da enzima fosfolipase e pouco mais de 50% dos mesmos, foram capazes de produzir a enzima proteinase. Todos os isolados, clínicos e ambientais foram produtores de biofilme. A resistência aos antifúngicos foi variável nos grupos avaliados, sendo que os isolados clínicos e os isolados ambientais com alta influência antrópica apresentaram maior número de isolados resistentes. Os testes de virulência em modelo invertebrado mostraram que a maioria dos isolados, tanto clínicos quanto ambientais, são letais para mais de 50% dos animais. Estes resultados mostram que

os isolados ambientais apresentam características que os qualificam como patógenos oportunistas. Nossos resultados também sustentam que os ambientes em que estes isolados foram obtidos podem ser uma fonte alternativa de contato com estes microrganismos cujo potencial patogênico pode levar a emergência de fatores resistência e virulência com influência direta no tratamento clínico.

**Palavras-chave:** *Candida albicans*; virulência; resistência

## Abstract

The incidence of fungal infections has increased in recent decades. Fungal infections mainly affect immunosuppressed individuals and the few therapeutic options available on the market make treatment difficult, especially with the emergence of *Candida* spp isolates. resistant to one or more classes of antifungals. Besides being etiological agents of infections, microorganisms of the *Candida* genus can be isolated in different environments. *C. albicans* is an example of a species that can be found living as a commensal in the human body, as an etiologic agent of infections, and in nature. Knowing the characteristics of environmental isolates of these microorganisms is extremely important, especially if they show some sign of virulence and/or resistance, placing them as potential human pathogens. Considering these issues, the work aims to analyze aspects of virulence and resistance of environmental and clinical *C. albicans* isolates, seeking to better understand how these variables are expressed in nature, and finally to make a comparison with what is found in the clinical environment. Thermotolerance at different temperatures, adhesion in oral epithelial cells, production of hydrolytic enzymes, biofilm formation, virulence in an invertebrate model and susceptibility to fluconazole, itraconazole and amphotericin B were the factors analyzed in clinical isolates, anthropized and non-anthropogenic environmental in the present work. The environmental isolates, mainly those isolated from places with anthropogenic influence, presented results of the analyzed variables similar to those obtained with the clinical isolates. Most of the evaluated isolates grew up to 45°C. In the morphogenesis tests, the isolates, in general, showed greater filamentation in the SPIDER medium. Most environmental and clinical isolates were producers of the phospholipase enzyme and just over 50% of them were able to produce the proteinase enzyme. All isolates, clinical and environmental, were biofilm producers. Antifungal resistance was variable in the groups evaluated, with clinical isolates and environmental isolates with high anthropogenic influence showing a greater number of resistant isolates. Virulence tests in invertebrate models showed that most isolates, both clinical and environmental, are lethal to more than 50% of the animals. These results show that environmental isolates have characteristics that qualify them as opportunistic pathogens. Our results also support that the environments in which these isolates were obtained may be an alternative source of contact with these

microorganisms whose pathogenic potential can lead to the emergence of resistance and virulence factors with a direct influence on clinical treatment.

**Key words:** *Candida albicans*; virulence; resistance.

# Sumário

1- Introdução .....	16
2- Revisão Bibliográfica.....	19
2.1- Gênero <i>Candida</i> .....	19
2.2- <i>Candida albicans</i> na natureza.....	20
2.3- <i>Candida</i> e microbiota .....	23
2.4- Candidíase .....	25
2.5- Epidemiologia .....	28
2.6- Fatores de Virulência .....	30
2.6.1- Morfogênese.....	31
2.6.2- Adesinas.....	33
2.6.3- Biofilme.....	35
2.6.4- Enzimas hidrolíticas .....	38
2.6.5- Switching fenotípico .....	40
2.7- Resistência.....	41
2.8- Modelos hospedeiros vertebrados para o estudo de <i>Candida spp.</i> .....	46
2.9- Modelos hospedeiros alternativos para o estudo de <i>Candida spp.</i> .....	47
2.9.1- <i>Tenebrio molitor</i> .....	50
3- Relevância e Justificativa.....	53
4- Objetivo geral .....	55
4.1- Objetivos específicos.....	55
5- Material e métodos.....	56
5.1- Origem das leveduras .....	56
5.2- Termotolerância.....	60
5.3- Análise da morfogênese de isolados de <i>C. albicans</i> .....	60
5.4- Determinação da atividade de fosfolipase .....	61
5.5- Determinação da atividade da proteinase .....	62
5.6- Ensaio de formação de biofilme <i>in vitro</i> .....	63
5.7- Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) .....	64
5.8- Susceptibilidade do biofilme formado à antifúngicos.....	65
5.9- Ensaio de indução de resistência em isolados ambientais de <i>C. albicans</i> .....	65
5.9- Ensaio de virulência dos isolados de <i>C. albicans</i> em modelo hospedeiro invertebrado <i>Tenebrio molitor</i> .....	66
5.10 Determinação da densidade de hemócitos .....	68
5.11- Quantificação da melanização.....	69
5.12- Análises estatísticas .....	69

<b>6- Resultados</b> .....	70
<b>6.1- Termotolerância</b> .....	70
<b>6.2- Análise da morfogênese de isolados de <i>C. albicans</i></b> .....	72
<b>6.4- Determinação da atividade da fosfolipase</b> .....	79
<b>6.5- Determinação da atividade da proteinase</b> .....	81
<b>6.6- Ensaio de formação de biofilme</b> .....	83
<b>6.7- Determinação da concentração inibitória mínima</b> .....	86
<b>6.8- Suscetibilidade do biofilme formado à antifúngicos</b> .....	89
<b>6.9- Indução da resistência</b> .....	95
<b>6.10- Ensaio de virulência dos isolados de <i>C. albicans</i> em modelo hospedeiro invertebrado <i>Tenebrio molitor</i></b> .....	96
<b>6.11- Determinação da densidade de hemócitos</b> .....	100
<b>6.12- Melanização</b> .....	103
<b>7- Discussão</b> .....	106
<b>8- Conclusão</b> .....	118
<b>9- Referências Bibliográficas</b> .....	119
<b>9- Anexos</b> .....	150
<b>Tabela 06 - Compilado dos resultados experimentais dos testes realizados com os isolados ambientais e clínicos de <i>C. albicans</i></b> .....	151
<b>9.1- Artigo 01: Fungal diagnostics: the tools available and the challenges in Brazil and in the world</b> .....	154
<b>9.2- Artigo 02: Into the wild: a look at <i>Candida albicans</i> outside clinical setting</b> .....	188
<b>9.3- Artigo 03: Modelos hospedeiros invertebrados: novas ferramentas para avaliação da virulência e patogenicidade fúngica</b> .....	199

## 1- Introdução

As leveduras pertencentes ao gênero *Candida* são distribuídas de maneira ubíqua. Na natureza estes microrganismos podem ser isolados do solo, de plantas, em rios ou vivendo como comensais em animais, porém a complexidade da ecologia deste fungo não é totalmente elucidada (OPULENTE, 2019; KURTZMAN, 2011). Como comensal, *Candida* spp. pode ser isolada da microbiota humana, principalmente nas mucosas oral, intestinal e urogenital (HUFFNAGLE, 2013).

Em situações de equilíbrio os microrganismos do gênero *Candida* não causam prejuízo aos seus hospedeiros. Porém quando este equilíbrio é desfeito, principalmente por um desequilíbrio do sistema imune, estas leveduras se comportam como patógenos oportunistas e são agentes etiológicos de infecções fúngicas, as quais podem se manifestar desde simples micoses cutâneas até infecções invasivas, atingindo a corrente sanguínea e chegando a diversos órgãos (SPELLBERG, 2012).

*C. albicans* é a espécie do gênero *Candida* com maior representatividade tanto na microbiota humana atuando como comensal, como nos casos de infecções. O “sucesso” deste microrganismo se deve a sua plasticidade em se adaptar aos mais variados ambientes, e aos seus fatores de virulência que contribuem para o desenvolvimento do processo infeccioso (POLKE, 2015). No âmbito clínico, trabalhos mostram que pacientes com algum processo patogênico, cujo o agente etiológico é a levedura *C. albicans* apresentam infecção endógena, ou seja, oriunda da própria microbiota do hospedeiro (Neville et al. 2015). Entretanto, mesmo as infecções fúngicas causadas por *C. albicans* apresentarem esta característica endógena, não é descartada a infecção por fontes externas. Por isso, o isolamento de *C. albicans* na natureza pode implicar em um novo nicho de contaminação com estes fungos (OPULENTE, 2019). Trabalhos tem demonstrado a presença de *C. albicans* em ambientes naturais, sendo que alguns destes isolados já apresentam resistência a antifúngicos (SANTIAGO et al., 2015; BENSASSON, 2019; OPULENTE, 2019).

A presença de isolados ambientais de fungos resistentes a antifúngicos usuais tem sido documentada com certa frequência (MEDEIROS et al., 2008; KURTZMAN, 2011; BADER, et al., 2015; HODA et al., 2019, OPULENTE, 2019). Microrganismos do gênero *Aspergillus*, por exemplo, isolados de fontes naturais tem se mostrado resistentes aos azólicos (HODA et al., 2019). Uma das explicações para a emergência de isolados ambientais resistentes ao tratamento por azólicos é o uso de agroquímicos que podem induzir uma resistência cruzada (BADER, et al., 2015; HODA et al., 2019). Uma vez que estes microrganismos já se apresentam resistentes na natureza, os pacientes que por ventura forem infectados com estas cepas podem não responder ao tratamento antifúngico, levando a quadros agudos da doença e aumentando a taxa de mortalidade relacionada a estes fungos (ROCHA et al, 2016, HODA et al., 2019, OPULENTE, 2019). Rocha e colaboradores (2016) mostraram em seu trabalho que a exposição de isolados de *C. parapsilosis* a azóis utilizados na agricultura, podem induzir a resistência aos antifúngicos azólicos utilizados no tratamento clínico. Esta diferente rota de indução da resistência pode trazer sérias implicações tratamento de infecções fúngicas, podendo colaborar com o surgimento de isolados multirresistentes e por consequência acarretar no aumento na mortalidade relacionada a essas infecções.

Poucas classes de antifúngicos estão disponíveis no mercado para o tratamento de infecções fúngicas (ARENDRUP & PATTERSON, 2017; WALL & LOPEZ-RIBOT, 2020). Este quadro se torna mais preocupante quando pesquisas apontam para uma emergência de isolados do gênero *Candida* resistentes a uma ou mais classes de antifúngicos (COWEN et al., 2015). Além dos isolados clínicos, isolados ambientais também já apresentam comportamento de resistência ao tratamento antifúngico (SNELDERS et al., 2012; AZEVEDO et al., 2015; MACIEL et al., 2019).

Devido ao elevado número de infecções causadas por *Candida* spp. nas últimas décadas e a emergência de casos de resistência ao tratamento antifúngico, pesquisas tem sido realizadas para se compreender a complexidade que envolve a ecologia, comensalismo e patogenicidade destes microrganismos. Um aliado a estes estudos é a introdução de modelos hospedeiros alternativos nos estudos de virulência microbiana (FUCHS & MYLONAKIS, 2006; DE SOUZA

et al., 2015; ORTEGA-RIVEROS et al., 2017). *Tenebrio molitor*, por exemplo, é uma larva de besouro que por apresentar sistema imune inato com características conservadas quando comparadas a outras espécies de animais, e assim pode ser empregada como alternativa aos estudos de virulência de *Candida* spp. e de outros microrganismos (GUO et al., 2014; OPPERT et al., 2012; DORLING et al., 2015). Trabalhos já demonstram que este é um modelo eficiente e que pode contribuir para as pesquisas, trazendo os benefícios de resultados rápidos, redução de custos e do uso de animais sencientes (GUO et al., 2014; OPPERT et al., 2012; DORLING et al., 2015; DE SOUZA et al., 2015).

## 2- Revisão Bibliográfica

### 2.1- Gênero *Candida*

O gênero *Candida* é um gênero artificial que agrupa uma ampla variedade de leveduras anamórficas, as quais não apresentam características distintivas que façam com que as mesmas sejam classificadas dentro de um gênero natural (MEYER, 1998; TSUI, 2007). As leveduras do gênero *Candida* apresentam distribuição ubíqua, podendo ser isoladas em habitats naturais como solos, plantas, rios, vivendo como comensais na microbiota humana ou de outros mamíferos, como também em ambientes abióticos, como os biofilmes formados em dispositivos médicos (MARTINS et al., 2005; TSUI, 2007; MCMANUS & COLEMAN, 2014; VALLABHANENI, 2016; OPULENT, 2019).

Aproximadamente 200 espécies já foram descritas dentro do gênero *Candida*, porém poucas delas apresentam a capacidade de colonizar o ser humano (COLOMBO et al., 2013; POLKE, 2015). Dados do Center for Disease Control and Prevention (CDC) apontam que apenas 20 espécies são descritas como causadoras de doenças em humanos (CDC, 2015). Em algumas situações, principalmente quando existe um desequilíbrio no sistema imune do hospedeiro os microrganismos do gênero *Candida* podem emergir como patógenos oportunistas e causar desde simples infecções superficiais a infecções invasivas, as quais em muitos casos podem ser letais (POLKE, 2015; KURTZMAN, 2011). Por sua característica de patógeno oportunista os pacientes com risco para desenvolverem infecções causadas por *Candida* são aqueles que apresentam o sistema imune comprometido de alguma forma. Diabéticos, neonatos, idosos, transplantados, queimados, HIV positivos com baixa contagem de linfócitos T CD4+, integram o grupo de risco para infecções causadas por esses fungos (YAPAR, 2014). Desde os anos 1980 nos EUA e na Europa, infecções sanguíneas nosocomiais tem como um de seus principais agentes etiológicos microrganismos do gênero *Candida* (QUINDÓS, 2018). Atualmente estima-se que estes microrganismos estejam entre os principais causadores de infecções sanguíneas nosocomiais em todo o mundo (PERLROTH, 2007; DA COSTA, 2014; LAMOTH, 2018; QUINDÓS, 2018; CANELA, 2018).

Dentre as espécies deste gênero, *Candida albicans* se destaca devido a sua maior prevalência, tanto na microbiota humana quanto como um dos principais agentes etiológicos de infecções fúngicas (YAPAR, 2014). O sucesso de *C. albicans* tanto durante a colonização do hospedeiro quanto como patógeno pode ser explicado por um conjunto de fatores, dentre eles a sua flexibilidade genética, bioquímica e morfológica as quais favorecem a sua adaptação em diferentes nichos (POLKE, 2015). Mesmo *C. albicans* ainda se destacando como a principal espécie do gênero nos casos de infecção, nos últimos anos tem se registrado um aumento no isolamento de espécies não-*albicans*. Este aumento pode ser explicado por diversos fatores, dentre eles melhoras nas técnicas de identificação de microrganismos, variações no estado clínico de pacientes e as diferentes técnicas com potencial invasivo ao qual os mesmos são submetidos, além do modo com que os antifúngicos são empregados na clínica (SILVA et al., 2012; TAEI et al., 2019). Juntamente com *C. albicans*; *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* são as espécies mais comumente isoladas de pacientes (SILVA et al, 2012; YAPAR, 2014, QUINDÓS et al., 2018). Os microrganismos do gênero *Candida* são responsáveis por cerca de 80% das infecções invasivas causadas por fungos (CANELA, 2018).

## **2.2- *Candida albicans* na natureza**

Leveduras podem ser encontradas em diversos habitats, incluindo vários nichos selvagens como solos, rios, flores, árvores ou vivendo como comensais em insetos e outros animais (OPULENTE, 2019; KURTZMAN, 2011). Os microrganismos do gênero *Candida* também são encontrados de maneira ubíqua, porém, acreditava-se que algumas espécies deste gênero que são consideradas patógenos oportunistas, estavam restritos aos ambientes clínicos e endotérmicos (OPULENTE, 2019). A crença de que os patógenos oportunistas do gênero *Candida* apresentavam habitat restrito apenas a nichos hospitalares e como comensais de certos mamíferos foi sendo desmistificada com trabalhos que mostraram o isolamento destas leveduras em ambientes naturais. Falando mais especificamente da espécie *C. albicans*, são poucos os trabalhos científicos que apresentam dados da presença deste microrganismo em ambientes naturais

(SANTIAGO et al., 2015; BENSASSON, 2019; OPULENTE, 2019). Opulente e colaboradores (2019) analisaram amostras obtidas de variadas fontes naturais nos Estados Unidos e isolaram diversas leveduras incluindo àquelas consideradas patógenos oportunistas. Eles isolaram, por exemplo, *C. albicans* de amostras de solos, frutos e outras matérias vegetais (OPULENTE, 2019).

Bensasson e colaboradores (2019) isolaram *C. albicans* de árvores no Reino Unido. Neste trabalho, eles demonstraram que os isolados ambientais de *C. albicans* se assemelhavam aos clínicos no que diz respeito a predominância de isolados diploides. Foi demonstrado também que alguns isolados se assemelhavam geneticamente mais com os isolados clínicos do que com isolados de *C. albicans* obtidas de diferentes árvores.

Em ambientes aquáticos diversas espécies de leveduras já foram isoladas, dentre elas representantes do gênero *Candida*, como *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* (MEDEIROS et al., 2008). Os isolados foram testados quanto a sensibilidade aos antifúngicos, sendo que muitos deles apresentaram resistência a mais de uma classe de antifúngico (MEDEIROS et al., 2008). Quando encontrada em corpos d'água, *C. albicans* é considerada como um microrganismo contaminante pelos autores. Trabalhos fazem esta relação principalmente por seu isolamento ser obtido principalmente em águas contaminadas e locais com grande circulação de pessoas. Bakhiet e colaboradores (2016) avaliaram amostras de água obtidas no Rio Nilo. Neste trabalho, os autores encontraram *C. albicans* e verificaram que estes isolados apresentavam resistência ao tratamento com cloro, sendo que eram necessárias quantidades elevadas do produto para inviabilizar esta levedura. Kulesza e colaboradores (2018) avaliaram a qualidade da água de um rio na Polônia e verificaram a presença de *C. albicans* principalmente nas amostras de água que foram obtidas de porções do rio próximas a ambientes urbanos. Em ambos os trabalhos citados anteriormente, os autores reiteram a importância em se avaliar a presença de *C. albicans* nestes locais e fazem um alerta sobre o impacto que o contato ou consumo destas águas podem trazer à saúde humana. Um estudo conduzido no Brasil com amostras de água de diversas praias e também encontraram *C. albicans* (MACIEL, et al. 2019). Ao avaliarem alguns fatores de virulência destes isolados os autores verificaram que estes fungos eram

capazes, tanto nos experimentos *in vitro* quanto *in vivo*, de produzirem hifas e formar biofilme (MACIEL, et al. 2019).

Representantes do gênero *Candida* também podem ser isolados do solo. Ribeiro Bastos e colaboradores isolaram amostras de *C. tropicalis* de solo na floresta Amazônica, e verificaram que as mesmas eram capazes de tolerar altas concentrações de fenol e de sal (RIBEIRO BASTOS et al., 2000). Em trabalho mais antigo, *C. albicans* também já foi isolada em solos amazônicos. Mok e colaboradores (1984) avaliaram a presença de leveduras em amostras de solos da região amazônica e relataram a presença de *C. albicans*. Mesmo sendo um trabalho antigo os autores já cogitavam que o solo amazônico pudesse ser habitat natural para esta levedura (MOK et al., 1984). Poucos trabalhos recentes investigaram a presença de *C. albicans* em amostras de solo. Maciel e colaboradores (2019), encontraram *C. albicans* em amostras de areia de praias do litoral brasileiro. Este trabalho mostrou que estes isolados apresentavam alta capacidade de adesão, filamentação e produção de biofilme. Além disso, os autores verificaram também que os isolados de *C. albicans* apresentavam alta taxa de virulência em modelo murino (MACIEL, 2019). Outro trabalho que buscou avaliar a presença de microrganismos nos solos de diferentes regiões dos Estados Unidos também encontrou *C. albicans* entre seus isolados. Os autores destes trabalhos reforçam que o achado de *C. albicans* fora do ambiente clínico é de extrema relevância e deve ser estudado de maneira mais profunda (OPULENTE, 2019).

*Candida* spp. também já foram isolados de ambientes polares. *C. albicans* e *C. parapsilosis* são exemplos de espécies já descritas nos polos (KOCHKINA et al., 2012; SANTIAGO et al., 2015).

Mesmo com trabalhos recentes acerca do isolamento de leveduras patogênicas do ambiente, pouco ainda se sabe sobre sua complexa e diversa ecologia. Porém as recentes descobertas nos levam a crer que estes ambientes podem ser considerados fontes de contado com esses patógenos oportunistas (OPULENTE, 2019).

### 2.3- *Candida* e microbiota

A microbiota humana é complexa e diversa, e está diretamente ligada a processos que vão desde a digestão até o comportamento, por isso seu equilíbrio é considerado fundamental para fisiologia humana (CLEMENTE, 2012; UNDERHILL, 2014; JOHNSON, 2018). O sistema imune é diretamente influenciado e modulado pela microbiota, portanto a homeostase entre ambos é necessária para a manutenção de um estado saudável do corpo humano (UNDERHILL, 2014).

A maioria da microbiota humana é composta pelas bactérias, porém espécies fúngicas também são isoladas vivendo como comensais em diversos sítios (UNDERHILL, 2014). Diversos gêneros fúngicos fazem parte da microbiota humana, como por exemplo, *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Malassezia*, *Cladosporium*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus* dentre outros, e a distribuição destes gêneros é variável de acordo com o sítio que eles ocupam no corpo humano (CUI et al., 2013, LAI et al., 2019). Limitações em métodos de cultura e identificação interferem no real conhecimento sobre a microbiota humana, porém o avanço das técnicas moleculares tem colaborado com esta investigação (CUI et al., 2013; BANDARA et al., 2019). Além dos gêneros citados anteriormente, *Candida* também é encontrado na microbiota humana em diversos sítios como nas mucosas oral, intestinal e geniturinário, e participa dos processos normais da microbiota e algumas espécies deste gênero, dependendo do status imunológico do hospedeiro, podem vir a se comportar como patógeno oportunista (CUI et al., 2013; HUFFNAGLE, 2013; BANDARA et al., 2019, LAI et al., 2019). O estudo dos fungos presentes no microbioma humano (micobioma) é um campo recente da pesquisa científica e visa compreender o papel dos fungos em relações com o sistema imune, comensalismo e patogênese (CUI et al. 2013; ENAUD et al., 2018, NILSSON et al., 2018). Um exemplo de descoberta realizada pelas pesquisas de micobioma é que os fungos presentes em diferentes sítios do hospedeiro podem interagir entre si. Pesquisas mostram que um desequilíbrio na população intestinal de *C. albicans*, por exemplo, pode ser um fator que impacta diretamente na

emergência de doença pulmonar alérgica induzida por *Aspergillus fumigatus* presente no microbioma pulmonar (NOVERR et al., 2005).

As leveduras do gênero *Candida* geralmente são adquiridas pelos seres humanos no momento do nascimento ou em um contato posterior, ainda na primeira infância. Microrganismos do gênero *Candida* são encontrados normalmente na microbiota oral humana (MILLSOP & FAZEL, 2016). Estima-se que cerca de 45-65% das crianças e de 30-55% dos adultos apresentem *Candida* spp. na sua microbiota oral (ARENDORF & WALKER, 1980). *Candida* spp. é isolado da microbiota vaginal de quase todas as mulheres (BEIGI et al., 2004). *Candida* spp. também é isolada da microbiota intestinal, sendo que a espécie *C. albicans* é isolada com maior frequência, sendo encontrada no trato gastrointestinal de mais de 80% das pessoas (ENAUD et al., 2018). Mesmo colonizando diferentes sítios, trabalhos mostram que geralmente as leveduras isoladas pertencem a uma mesma cepa. Também já foi demonstrado que as leveduras isoladas durante um processo infeccioso geralmente são as mesmas encontradas vivendo como comensais, reforçando o caráter de patógenos oportunistas destes microrganismos (ODDS, 1984; HUFFNAGLE, 2013).

A plasticidade de adaptação de *Candida* spp. a diferentes sítios está diretamente ligada ao seu potencial como patógeno oportunista. Adesão, formação de biofilme e morfogênese são características importantes durante o processo de colonização, mas também se caracterizam como fatores de virulência durante o processo infeccioso (MAYER, 2013; HUFFNAGLE, 2013).

Rompimento de barreiras mucosas, queda da imunidade, uso de cateter venoso central e uso de antibióticos de amplo espectro são alguns dos fatores de riscos que podem colaborar para o desequilíbrio de um estado de homeostase, levando ao desenvolvimento de uma infecção por *Candida* spp. (SPELLBERG, 2012).

Além de estar presente na microbiota humana, *C. albicans* também pode ser encontrado na microbiota de diversas espécies animais. Brillhante e colaboradores (2013) encontraram na microbiota de emas saudáveis diversas espécies do gênero *Candida*, inclusive *C. albicans*, a qual se apresentou como a segunda espécie com maior frequência nos isolados atrás apenas de *C.*

*parapsilosis* sensu lato. Neste mesmo trabalho os pesquisadores avaliaram a suscetibilidade dos isolados ao tratamento antifúngico e verificaram que 11 dos 18 isolados de *C. albicans* testados foram resistentes ao tratamento com fluconazol e itraconazol, desta forma os autores demonstram preocupação por estes animais serem carreadores de leveduras resistentes à antifúngicos e com potencial patogênico humano (BRILHANTE et al., 2013). Em outro trabalho, mesmo grupo de pesquisa também avaliou a presença de fungos na microbiota de aves de rapina e dentre as espécies encontradas isolaram *C. albicans* (BRILHANTE et al., 2012). Dois isolados de *C. albicans* obtidos neste estudo foram resistentes ao fluconazol, mesmo estes animais nunca terem sido submetidos a tratamento antifúngico (BRILHANTE et al., 2012). Este achado fez os autores sugerirem a necessidade de monitoramento da microbiota destes animais como forma de avaliação de contaminação ambiental, pois acreditam que a exposição a estes contaminantes pode estar levando ao surgimento de leveduras resistentes (BRILHANTE et al., 2012). Sidrin e colaboradores (2015) isolaram diversas espécies fúngicas nas cavidades oral, nasal, genital e retal de duas espécies de peixe-boi encontradas no Brasil (*Trichechus inunguis* and *Trichechus manatus*). *C. albicans* foi encontrada colonizando estas cavidades nas duas espécies de peixe-boi estudadas (SIDRIN et al., 2015). Os autores acreditam que muitas das leveduras encontradas colonizando estes animais podem ser oriundas de contaminação ambiental (SIDRIN et al., 2015). A presença de *C. albicans* também já foi descrita na microbiota de morcegos, pequenos ruminantes, porcos, entre outros animais (SOUZA & SIQUEIRA, 2003; MELVILLE et al., 2004; CARREGARO et al., 2018; BRILHANTE et al., 2015; BRILHANTE et al., 2016).

#### **2.4- Candidíase**

Candidíase é o termo empregado para designar infecções causadas por leveduras pertencentes ao gênero *Candida*, as quais podem se manifestar nas formas superficiais, atingindo pele e mucosas, ou de modo invasivo, atingindo a corrente sanguínea, chegando aos órgãos (PAPPAS et al, 2018).

O desenvolvimento de quadro de candidíase oral, está ligado a fatores locais e sistêmicos que podem favorecer o crescimento exacerbado desses microrganismos (MILLSOP & FAZEL, 2016). A espécie isolada com mais frequência da cavidade oral é *C. albicans*, tanto em pessoas saudáveis ou apresentando quadro de candidíase oral (FIDEL et al., 1999; MUADCHEINGKA & TANTIVITAYAKUL, 2015; TATI et al., 2016). No entanto, espécies não-*albicans*, como *C. tropicalis* e *C. glabrata*, podem ser isoladas neste sítio (MUADCHEINGKA & TANTIVITAYAKUL, 2015; TATI et al., 2016). Indivíduos imunossuprimidos, diabéticos, usuários de corticosteroides sistêmicos integram o grupo de risco para candidíase oral (ELLEPOLA & SAMARANAYAKE, 2001; RAUTEMAA & RAMAGE, 2011).

O equilíbrio entre a carga fúngica vaginal e as defesas do hospedeiro fazem com que *C. albicans* mantenha sua característica de microrganismos comensal (FERRER, 2000). Entretanto caso esse equilíbrio seja desfeito, *Candida* spp. pode aumentar em número e acarretar o desenvolvimento de candidíase vulvovaginal. Gravidez, imunossupressão, reposição hormonal, uso de contraceptivos orais são fatores que contribuem para o desenvolvimento de candidíase vulvovaginal (BEIGI et al., 2004; GONÇALVES et al., 2016). *C. albicans* é a principal espécie isolada dos casos de candidíase vulvovaginal, porém espécies não-*albicans*, principalmente *C. glabrata* tiveram sua frequência aumentada nos últimos anos (NAKAMURA-VASCONCELOS et al., 2017).

Candidíase invasiva é a doença fúngica que mais afeta pacientes hospitalizados no mundo desenvolvido (KULLBERG & ARENDRUP, 2015). Estima-se que de 40-70% dos pacientes com o quadro de candidíase invasiva cheguem a óbito, mesmo recebendo terapia antifúngica (KULLBERG & ARENDRUP, 2015; PAPPAS et al, 2018). *C. albicans* segue sendo a espécie de maior incidência nos casos de infecções invasivas. Estudos epidemiológicos apontam uma taxa de prevalência dessa espécie que pode variar de 30-70% dos casos de candidíase invasiva (LAMOTH, 2018; QUINDÓS, 2018, PAPPAS et al, 2018).

Dentre as manifestações clínicas da candidíase invasiva a candidemia se destaca, representando cerca de 50% dos casos (MCCARTY & PAPPAS, 2016). Idade, estado clínico, longos períodos de internação, uso de antibióticos

de amplo espectro, epidemiologia local, localização geográfica são algum dos fatores que influenciam a incidência de candidemia no mundo (PAPPAS et al, 2018). Porém, uma das principais causas dessa infecção é o uso de cateter venoso central ou algum outro aparelho intravascular (MCCARTY & PAPPAS, 2016). Um estudo realizado por Arias e colaboradores (2017), mostrou que *C. albicans* é a principal espécie nos casos de infecção em decorrência do uso de cateter venoso central, sendo o agente etiológico em 62% dos casos avaliados no estudo.

A candidíase neonatal é outra importante manifestação clínica de candidíase invasiva. As espécies *C. albicans* e *C. parapsilosis* são os agentes etiológicos responsáveis por aproximadamente 90% de todos os casos de candidíase neonatal (SAIMAN et al., 2001; CHOW et al., 2016). Grande parte dos neonatos acometidos por esta infecção apresentam alto risco de desenvolverem complicações envolvendo o sistema nervoso central (COHEN-WOLKOWIEZ et al., 2007). O diagnóstico é difícil em pacientes neonatos já que os sintomas apresentados muitas vezes são inespecíficos e mais da metade das culturas sanguíneas podem ser negativas em casos de meningites neonatais causadas por *Candida* (COHEN-WOLKOWIEZ et al., 2007; MCCARTY & PAPPAS, 2016).

Pacientes neutropênicos, principalmente os que receberam quimioterapia durante tratamento de malignidades hematológicas são pacientes de risco para desenvolverem candidíase disseminada aguda. Este tipo infecção acomete vários órgãos como pulmões (mais comum), trato gastrointestinal, rins, fígado e baço, e os principais sintomas apresentados são pequenos quadros hemorrágicos e erupções papulares (LEWIS et al., 2013; GUARANA & NUCCI, 2018). *C. albicans* é a principal espécie isolada em casos de infecções em pacientes neutropênicos. Estudos mostram que medicamentos utilizados durante o tratamento de alguns tipos de câncer podem induzir alterações morfológicas e fenotípicas em *C. albicans*, impactando diretamente na virulência destes microrganismos (TEOH & PAVELKA, 2016).

Infecções endovasculares, osteomielite, artrite, endofitrite, candidíase crônica disseminada são outras manifestações clínicas que podem ter como agente etiológico microrganismos pertencentes ao gênero *Candida* (PAPPAS et

al, 2018). Nos casos de endocardite, por exemplo, *C. albicans* é responsável por 24-46% dos casos com uma taxa de letalidade que pode chegar a 50% (YUAN, 2016).

## 2.5- Epidemiologia

Micoses invasivas são infecções negligenciadas que atingem mais de dois milhões de pessoas anualmente no mundo, sendo tão letais quanto tuberculose e malária (SCHMIEDEL & ZIMMERLI, 2016). Dentre as principais micoses invasivas a candidíase se destaca em número de casos. Aproximadamente dois terços dos casos de candidíase invasiva são observados em hospitais, sendo que cerca de 20% de todas as infecções observadas em UTI's tem como agente etiológico microrganismos do gênero *Candida* (LAMOTH, 2018). *C. albicans* permanece como a espécie de maior incidência nos casos de infecções com incidência variando de 30-70% dos casos, dependendo da localidade geográfica (LAMOTH, 2018; QUINDÓS, 2018)

A estimativa da incidência de casos de candidíase invasiva no mundo é imprecisa, principalmente pelos problemas de diagnóstico e categorização desse tipo de infecção (QUINDÓS et al., 2018). Calcula-se que mais de 30% dos casos de candidemia, a mais comum manifestação clínica de candidíase invasiva, não sejam diagnosticados principalmente pela baixa sensibilidade dos testes de cultura sanguíneos (QUINDÓS, 2014).

Até 2003 estudos apontavam um crescimento no número de casos de candidíase invasiva no mundo, porém, acredita-se que atualmente este número apresenta-se estável no ocidente (QUINDÓS et al., 2018). Mesmo a maioria dos estudos apontando para uma estabilidade no número de casos de candidemia em parte do globo, este número permanece variável entre as diversas localidades (QUINDÓS et al., 2018).

Nos Estados Unidos, por exemplo, a incidência de casos de candidemia varia de 9,5-26,2 casos por 100.000 habitantes, já no país vizinho, Canadá, essa taxa é muito menor, cerca de 3 casos por 100.000 habitantes (ST-GERMAIN,

2008; CLEVELAND, 2012; CLEVELAND, 2015). Na Europa, de modo geral, a incidência de candidemia é baixa, com índice de 3,88 casos por 100.000 habitantes (KOEHLER et al., 2019).

Dados populacionais da incidência de candidemia na África, Ásia e América Latina não são reportados e os estudos multicêntricos são escassos (QUINDÓS et al., 2018). Devido a isso os dados dos trabalhos relacionando este tipo de infecção nesses continentes podem não representar a incidência real de candidemia nessas localidades. Kreusch e Karstaedt (2013) realizaram um levantamento dos casos de candidemia em adultos em Soweto, na África do Sul. Nesse trabalho eles verificaram uma taxa de 0,3 casos por 1.000 admissões hospitalares, e que os pacientes com maior pré-disposição em contrair esse tipo de infecção eram àqueles submetidos a cirurgias abdominais (43%) e HIV positivos (19%) (KREUSCH & KARSTAEDT, 2013). Na Argélia, pesquisas apontam uma incidência de candidemia em uma taxa de 5 casos em cada 100.000 admissões hospitalares (GHAZI et al., 2019).

Na Ásia, em um trabalho realizado com amostras oriundas de 25 hospitais da China, Índia, Hong Kong, Singapura, Taiwan e Tailândia, mostraram uma incidência média de 1,22 episódios de candidemia por 1000 admissões hospitalares, sendo *C. albicans* a espécie mais isolada seguida de *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* (TAN et al., 2015). A incidência de candidemia em países do sul asiático gira em torno de 1-12 casos por 1000 admissões hospitalares, um número que se mostra 20-30 vezes maior do que é observado em países desenvolvidos (SINGH & CHAKRABARTI, 2017).

Na América Latina o índice de candidemia é variável, no Chile por exemplo a incidência é de 0.3 casos em 1000 admissões hospitalares, na Argentina e na Colômbia esse número chega a 1,96, e no Peru cerca de 2 episódios dessa infecção são registrados em cada 1000 internações (NUCCI et al, 2013; RODRIGUEZ et al., 2017).

No Brasil estudos sobre candidemia apontam pra uma frequência de 1-2,5 casos em 1000 internações (NUCCI et al, 2013; BRAGA et al., 2018). Doi e colaboradores (2016) realizaram um estudo com amostras provenientes de 16 hospitais das 5 regiões do Brasil, coletadas entre 2007 e 2010. A maioria dos

isolados foram recuperados de pacientes do sexo masculino, com idade média de 56 anos. *C. albicans* foi a espécie de maior prevalência, seguida de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* (DOI et al., 2016). Braga e colaboradores, assim como no trabalho citado anteriormente, encontraram maior incidência de casos de candidemia em homens com idade média de 55 anos. *C. albicans* continua sendo a espécie com maior número de isolados, porém, neste trabalho os isolados de *C. tropicalis* superaram os de *C. parapsilosis*. O período do estudo se estendeu de 1996-2016 e as amostras foram coletadas em centros de terapia intensiva do hospital da Universidade Federal do Rio de Janeiro (BRAGA et al., 2018). Giacomazzi e colaboradores (2015) mostraram em seu trabalho que o gênero *Candida* é o principal agente de infecções fúngicas no Brasil, sendo responsável por cerca de 74% dos casos registrados. Estes números, segundo os autores, podem estar subestimados já que existem falhas na notificação dos casos, no diagnóstico e no tratamento de doenças fúngicas no país (GIACOMAZZI et al., 2015). A taxa média de mortalidade devido a infecções causadas por *Candida* no Brasil é de 52% e *C. albicans* é a principal espécie registrada como agente etiológico dessas infecções, com taxa de incidência de aproximadamente 37% (DALLA LANA et al., 2020).

Portanto, *C. albicans* continua sendo a espécie com maior número de isolados em casos de infecções causadas pelo gênero *Candida*, juntamente com *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* correspondem a cerca de 90% dos isolados obtidos de amostras sanguíneas na maioria dos países do mundo (QUINDÓS et al., 2018). Porém nos últimos anos tem se notado um aumento dos casos de infecções causadas por espécies não-*albicans*, principalmente *C. parapsilosis* e *C. glabrata* em muitos países (QUINDÓS et al., 2018).

## 2.6- Fatores de Virulência

Como microrganismo presente na microbiota humana, *C. albicans* geralmente não causa prejuízos a seu hospedeiro (HUFFNAGLE, 2013). Porém, este cenário é alterado quando um desequilíbrio do sistema imune do hospedeiro

ocorre, levando o desenvolvimento desde infecções superficiais até infecções sistêmicas (YAPAR, 2014; DA SILVA DANTAS et al, 2016). Inúmeros fatores contribuem para a instalação, progressão e agravamento dessas infecções. Conhecidos coletivamente como fatores de virulência, os artifícios usados por *C. albicans* durante o processo patológico despertam interesse nas pesquisas científicas, tanto por uma melhor compreensão do processo infeccioso como um todo, quanto pelo potencial de serem desenvolvidos medicamentos antifúngicos que atuem diretamente nessas vias (VILA et al., 2017; KHAN et al., 2020).

Nos tópicos abaixo serão abordados com mais detalhes os principais fatores de virulência e seu papel no desenvolvimento do processo infeccioso.

### 2.6.1- Morfogênese

*Candida* spp. quando mantida sob condições ótimas de crescimento apresentam suas células em formato oval e crescimento por meio de brotamento (LARONE, 2011). Porém, algumas espécies deste gênero podem apresentar crescimento filamentosos, formando pseudohifas ou hifas verdadeiras (KURTZMAN, 2011; LARONE, 2011).

A diferenciação entre pseudohifas e hifas verdadeiras é realizada pela observação do modo que elas são formadas (SILVA et al., 2012). Pseudohifas ocorrem quando o brotamento de uma célula leveduriforme ou de uma hifa da origem a um prolongamento, o qual permanece aderido à célula mãe apresentando constrições nas junções célula-célula (SILVA et al., 2012). Já as hifas verdadeiras ocorrem a partir da formação de um tubo germinativo, que se alonga, forma ramificações com septos definidos (SILVA et al., 2012).

Dentre as espécies de maior relevância clínica, *C. albicans* e *C. dubliniensis* são consideradas produtoras de hifas verdadeiras por apresentarem a formação do tubo germinativo (CALDERONE, 2002).

A espécie *C. glabrata* é classificada em muitos trabalhos como o único membro do gênero *Candida* a não apresentar crescimento filamentosos, não sendo capaz de produzir hifas e/ou pseudohifas (FIDEL, 1999; SILVA et al., 2012). Trabalhos mais recentes contestam a máxima de que *C. glabrata* não

produz pseudohifa. Pesquisas realizadas por Sasani e colaboradores (2016) e por Csank e Haynes (2000), por exemplo, mostram que sobre certas circunstâncias como exposição ao CO<sub>2</sub> e depleção de nitrogênio, a formação de pseudohifas em *C. glabrata* pode ser induzida (CSANK, 2000; SASSANI et al., 2016).

*C. parapsilosis* não produz hifas verdadeiras, porém é capaz de produzir pseudohifas (DING & BUTLER, 2007; TROFA et al., 2008; SILVA et al., 2012; GASSIEP). *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. tropicalis* também apresentam capacidade de formar pseudohifas (KURTZMAN, 2011; SAVINI et al., 2011; GARCÍA-RODAS et al., 2011, CHEN et al., 2014). Alguns trabalhos sugerem que *C. tropicalis*, assim como *C. albicans* e *C. dubliniensis*, é capaz de produzir hifas verdadeiras. Estudos realizados por Jiang e colaboradores e por Chen e colaboradores mostram a formação de tubo germinativo e hifas em *C. tropicalis*, e apontam uma relação com a virulência nesta espécie (CHEN et al., 2014, JIANG et al., 2016).

As diferentes formas morfológicas descritas nos fungos pertencentes ao gênero *Candida* apresentam papel relevante na infecção (ODDS, 1988). A forma leveduriforme parece estar presente de modo predominante durante a colonização do hospedeiro, e também durante a disseminação destes fungos na corrente sanguínea no decorrer do processo infeccioso (JACOBSEN, 2012). Já a presença de hifas em *Candida* spp. tem papel importante nos processos de adesão, invasão, dano tecidual, disseminação e evasão do sistema imune (KUMAMOTO & VINCES, 2005; JACOBSEN et al., 2012). Estudos mostram que as hifas são capazes de aderir mais firmemente as células dos hospedeiros do que a forma leveduriforme, além disso as hifas são capazes de invadir as células humanas de maneira eficiente através de processos de endocitose e penetração ativa (WÄCHTLER et al., 2012; MAYER et al., 2015; WILSON et al., 2016). A morfogênese também é um processo chave na evasão do sistema imune. Quando fagocitadas, as células de *C. albicans* iniciam o processo de produção de hifas, isto pode levar ao rompimento da membrana do macrófago e a morte desta célula de defesa por lise celular. Desta forma, *C. albicans* consegue evadir do processo de fagocitose e continuar o processo de patogênese (KRYSAN et al., 2014). Além disso, durante o processo de morfogênese, *C. albicans* altera os

componentes presentes em sua parede celular e isto dificulta o reconhecimento deste fungo pelo sistema imune do hospedeiro. Mukaremera e colaboradores (2017), mostraram que hifas de *C. albicans* estimulam em baixos níveis a produção de citocinas por monócitos, em pseudohifas os pesquisadores viram que estes níveis eram intermediários e que a forma leveduriforme induzia altos índices de liberação de citocinas. Com estes resultados os pesquisadores mostraram que a morfogênese vai além de apenas alterar o formato celular, mas que estas alterações interferem diretamente na resposta imune do hospedeiro (MUKAREMERA et al., 2017). Também já foi observado que durante o processo de formação de hifas em *C. albicans* existe a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). O trabalho de Rossi e colaboradores (2017), mostrou que a deleção do gene *Fre8*, responsável pela produção de ROS durante a formação de hifas de *C. albicans*, afeta a capacidade deste fungo de invadir órgãos de modelo murino e isto afeta o curso do processo infeccioso.

Como citado anteriormente o potencial de virulência das hifas não é mediado apenas pela morfologia por si só, mas também pela expressão de genes associados ao processo de morfogênese (THOMPSON et al., 2011; JACOBSEN & HUBE, 2017). Estes genes além de estarem envolvidos no processo de formação de hifas, muitas vezes estão ligados a outros processos de virulência como adesão e secreção de enzimas (LIU, 2001; THOMPSON et al., 2011; JACOBSEN & HUBE, 2017). Esta característica de os genes estarem envolvidos no processo de morfogênese e também em outros processos de virulência, dá indícios de que o processo formação de hifas pode ter evoluído conjuntamente com a virulência destes microrganismos (THOMPSON et al., 2011).

### **2.6.2- Adesinas**

A colonização do hospedeiro por *Candida* spp. representa uma etapa indispensável no processo de infecção (PAPPAS et al., 2018), e a adesão nas células do hospedeiro é um pré-requisito para que a colonização ocorra (YANG, 2003; DE GROOT et al., 2013; RICHARDSON et al., 2018). O processo de

adesão em *Candida* spp. é multifatorial, dinâmico e complexo, envolvendo alterações na hidrofobicidade da parede celular do fungo e no conteúdo proteico da mesma (HAZEN et al., 1990; RICHARDSON et al., 2018).

A parede celular fúngica é rica em proteínas. Muitas dessas proteínas estão localizadas na parte externa da parede e participam dos mecanismos de interação patógeno-hospedeiro (DE GROOT et al., 2013). As adesinas são exemplos dessas proteínas.

A família gênica sequencia aglutinina-like (ALS), a qual codifica algumas adesinas, foi descrita primeiramente em *C. albicans* (HOYER et al., 1995). Esses genes codificam proteínas grandes compostas por um domínio N-terminal de alta complexidade, o qual é mediador de interações de proteínas com diferentes ligantes, e por uma porção C-terminal responsável pela ancoragem do glicosilfosfatidilinositol e outros componentes a parede celular (SUNDSTROM et al., 2002; DE GROOT et al., 2013). A família de genes ALS apresenta similaridade estrutural, apresentando três domínios: um domínio 5', que é idêntico em 55-90% nesta família gênica, um domínio central em tandem, e um domínio 3' que é variável entre os genes desta família (HOYER, 2001). Homólogos do gene ALS já foram descritos em *C. dubliniensis* (HOYER et al., 2001), *C. tropicalis* (HOYER et al., 2001) e *C. parapsilosis* (BERTINI et al., 2016). Jung e colaboradores demonstraram em seu trabalho a importância da proteína codificada por gene da família ALS no processo de adesão de *C. albicans* em cateter venoso central (CVC). Neste trabalho os pesquisadores verificaram a importância do gene Als3 durante o processo de adesão e formação de tubo germinativo de *C. albicans* em CVC, levando posteriormente a produção de hifas e formação de biofilme (JUNG et al., 2020).

Outras famílias gênicas codificadoras de adesinas foram descritas em *Candida* spp. Em *C. glabrata*, por exemplo, o processo de adesão é mediado principalmente por proteínas codificadas por genes da família EPA (HENRIQUES et al., 2006). Embora a família de genes EPA apresente ao menos 17 membros, testes *in vitro* mostraram que apenas a deleção do gene EPA1 reduz a adesão de *C. glabrata* em até 95% (CORMACK, 1999; LÓPEZ-FUENTES et al., 2018).

O gene HWP codifica a proteína presente em maior número na parede celular da hifa de *Candida*, Hwp1 (JOHAL et al., 2016). A ligação com o epitélio mediado por estas adesinas ocorrem devido ao domínio N-terminal que serve de substrato para as transglutaminases epiteliares, favorecendo o desenvolvimento de uma forte ligação covalente entre Hwp e as proteínas do epitélio (JOHAL et al., 2016). Desta forma, os genes da família HWP são essenciais para o crescimento normal de hifas em *Candida* (FAN et al., 2013). A presença de adesinas codificadas por genes da família HWP tem importante papel na virulência de *C. albicans* como demonstrado em trabalho de Tsuchimori e colaboradores (2000), no qual mutantes deletérios do gene HWP foram menos virulentos em modelo murino, além disso foi observada uma maior capacidade do sistema imune do hospedeiro de fagocitar as células fúngicas em um menor período de tempo.

Além da capacidade de aderir em diferentes células do hospedeiro, *Candida* spp. podem aderir a superfícies abióticas, como por exemplo cateteres e outros dispositivos médicos (DE GROOT et al., 2013). Além de seu papel na adesão nas células de hospedeiro, as adesinas estão ligadas ao processo de agregação e formação de biofilme (DRANGINIS et al., 2007).

### **2.6.3- Biofilme**

No seu habitat natural a maioria dos microrganismos não são encontrados em sua forma planquitônica, mas sim formando biofilmes (DOUGLAS, 2003; RAMAGE et al. 2005; NOBILE & JOHNSON, 2015). Biofilmes, são estruturas microbianas aderidas a um substrato (biótico ou abiótico), podendo ser formados de comunidades mono ou polimicrobianas (DOUGLAS, 2003; NOBILE & JOHNSON, 2015).

O processo de formação do biofilme é sequencial, e é iniciado quando células planquitônicas se aderem a um substrato e começam a se multiplicar formando microcolônias, as quais posteriormente irão aderir umas nas outras formando a primeira camada do biofilme (NOBILE et al., 2012; DESAI & MITCHELL, 2015). O processo de adesão está relacionado com interações

célula-célula e célula-superfícies e é controlado pela expressão de vários genes (DESAI & MITCHELL, 2015). Os genes da família ALS presentes em *C. albicans*, por exemplo, estão envolvidos no processo de adesão as células do hospedeiro (FILLER, 2006). O gene HWP1 que codifica a proteína de parede da hifa está envolvido no contato do fungo com células epiteliais hospedeiras (ORSI et al., 2014). Outro exemplo de gene relacionado ao processo de adesão durante a formação do biofilme é o EAP 1. Este gene codifica uma proteína de parede que auxilia no processo de adesão célula-célula em *C. albicans* (LI et al., 2007).

Após a adesão e formação da primeira camada do biofilme, uma intensa atividade metabólica se inicia com a formação de hifas e produção da matriz extracelular que envolve o biofilme (DESAI & MITCHELL, 2015; ARAÚJO et al. 2017). Inúmeros genes estão envolvidos nesta fase de maturação do biofilme, dentre eles o gene FKS1 que codifica a glucana sintase, responsável pela produção da glucana que compõe a matriz extracelular do biofilme (FINKEL & MITCHELL, 2011). A matriz extracelular é uma barreira física contra a penetração de antifúngicos no biofilme, o que acaba tornando essas estruturas mais resistentes a ação dessas drogas. Nett e colaboradores (2010) demonstraram em seu trabalho que a superexpressão do gene FKS1 aumenta a resistência dos biofilmes aos antifúngicos e que em uma situação contrária, em que haja uma redução da expressão do gene, o biofilme fica mais susceptível a ação das drogas.

O passo final na produção de biofilme é a dispersão de células ou partes do biofilme, processo que levará a colonização de outros sítios (DESAI & MITCHELL, 2015). NRG1 é um gene ligado a este processo que quando superexpresso aumenta a liberação de células do biofilme, esse gene também regula negativamente a filamentação. Os genes PES1 e UME 6 também regulam a liberação das células fúngicas (FINKEL & MITCHELL, 2011).

No contexto clínico, os biofilmes são extremamente relevantes. Um dos primeiros exemplos de biofilme estudados no âmbito clínico foram as placas presentes na superfície dentária (POTERA, 1999). Atualmente sabe-se que em muitos outros quadros infecciosos os biofilmes apresentam um papel importante (DOUGLAS, 2003; NOBILE & JOHNSON, 2015)

Estudos apontam que a grande maioria das infecções fúngicas causadas por microrganismos do gênero *Candida* apresentam formação de biofilme (RAMAGE et al. 2005; NETT, 2016). A formação de biofilme de *C. albicans* durante um processo infeccioso está ligado ao aumento da taxa de mortalidade do paciente (MATHÉ & VAN DIJCK, 2013). Isto se deve além do aumento da resistência ao tratamento, um aumento no dano tecidual e a persistência no hospedeiro pela dificuldade do sistema imune de acessar esta estrutura fúngica (MAYER, WILSON, HUBE, 2013). Os biofilmes podem ser encontrados colonizando dispositivos médicos, como cateteres, ou diretamente sendo formados nos órgãos e mucosa, como no caso de endocardites e vaginites (DOUGLAS, 2003; RAMAGE et al. 2005; FALCONE et al., 2009; FOXMAN, 2013; KOJIC & DAROUICHE, 2004). O número de tratamentos clínicos que fazem uso de dispositivos abióticos durante seu curso tem aumentado nos últimos anos (KOJIC & DAROUICHE, 2004; MATHÉ & VAN DIJCK, 2013). Esse aumento é acompanhado pelo crescimento nos casos de infecções associadas a presença de biofilmes nesses equipamentos, sendo um fator de risco que muitas vezes contribui para elevação do risco de morte desses pacientes (MATHÉ & VAN DIJCK, 2013).

A formação de biofilmes do gênero *Candida* associados a infecções preocupa principalmente pela dificuldade de tratamento. Biofilmes aumentam a resistência ao tratamento com antifúngicos e também dificultam a ação do sistema imune (RAMAGE et al., 2005). Estima-se que as células presentes em um biofilme podem ser de 20-2000 vezes mais resistentes aos antifúngicos do que as células planquitônicas do mesmo microrganismo (HAWSER & DOUGLAS, 1995; DONLAN & COSTERTON, 2002). Zarnowski e colaboradores mostraram que biofilmes de *C. albicans* produzem vesículas extracelulares. Estas vesículas encontradas no biofilme de *C. albicans* possuem diferenças quando comparadas a vesículas extracelulares de células planquitônicas. A composição de vesículas extracelulares do biofilme de *C. albicans* é similar aos compostos da matriz extracelular desta estrutura fúngica. Além disso, além de apresentar um papel na comunicação celular no biofilme, os autores do estudo sugerem que estas estruturas vesiculares atuem na resistência a antifúngicos. Os autores verificaram que biofilmes de isolados de *C. albicans* defectivos na

produção de vesículas extracelulares apresentavam redução de polissacarídeos na matriz e se tornavam mais permeáveis e sensíveis aos antifúngicos (ZARNOWSKI et al, 2018).

Os mecanismos de resistência do biofilme ao tratamento antifúngico ainda não são completamente elucidados. Pesquisas apontam que este é um processo multifatorial e está ligado a ação de bombas de efluxo, a presença da matriz extracelular e de células persistentes, alterações fenotípicas devido a nutrição, baixa taxa de crescimento e expressão de genes de resistência (MAH & O'TOOLE, 2001; DONLAN & COSTERTON, 2002; NOBILE & JOHNSON, 2015).

#### **2.6.4- Enzimas hidrolíticas**

A produção de enzimas por *Candida* é de suma importância nos processos de invasão e no curso do processo infeccioso (SCHALLER et al., 2005). As enzimas produzidas por *Candida* spp. são em sua maioria secretadas de maneira extracelular, provocando danos teciduais no hospedeiro e garantindo a obtenção de nutriente para o fungo (SCHALLER et al., 2005; RAPALA-KOZIK et al., 2018). Além disso tais enzimas estão ligadas a outras funções celulares, como formação de biofilme, manutenção e remodelamento da parede celular, adesão, desregulação de processos do sistema imunológico do hospedeiro (RAPALA-KOZIK et al., 2018).

Muitas das enzimas extracelulares descritas até o momento para *Candida* pertencem a classe de aspartil proteinases (NAGLIK et al., 2004; RAPALA-KOZIK et al., 2018). Dentro desta classe, as enzimas citadas anteriormente são agrupadas em duas famílias distintas, as proteases aspárticas secretadas (Sap), também conhecidas como candidapepsinas, e as yapsinas proteases (RAWLINGS & SALVESEN, 2013; RAPALA-KOZIK et al., 2018).

A família multigênica SAP é composta de pelo menos 10 membros. Oito proteinases codificadas por esta família gênica (Sap1-8) são secretadas dentro do espaço extracelular, já as Sap 9 e 10 são proteínas ancoradas a membrana do fungo (SCHALLER et al., 2005). A expressão dos genes da família SAP

ocorre de maneira diferencial durante o processo infeccioso, isso indica que as proteínas codificadas por esses genes podem ter papéis específicos durante a progressão da infecção (RAWLINGS & SALVESEN, 2013). Durante a infecção, as SAPs degradam proteínas humanas como albumina, queratina, hemoglobina e esta atividade proteolítica está envolvida no processo de invasão dos tecidos do hospedeiro (HUBE, 1998). Buscando avaliar o papel das SAPs em infecções vulvovaginais, Lima e colaboradores avaliaram isolados vaginais de *C. albicans*. As amostras obtidas de pacientes com sintomas de candidíase vulvovaginal apresentaram alta frequências de genes SAP. Eles também verificaram um aumento da frequência de SAP1 nestas amostras em comparação com isolados de *C. albicans* oriundos de pacientes sem sinais clínicos de candidíase vaginal, sugerindo assim o papel da enzima codificada por este gene no processo infeccioso (LIMA et al., 2018).

Além das Saps, as fosfolipases produzidas por membros do gênero *Candida*, colaboram para a patogênese (TSANG et al., 2007). Sete genes que codificam fosfolipases já foram identificados (PLA, PLB1, PLB2, PLC1, PLC2, PLC3, PLD1) (SAMARANAYAKE et al., 2006). Ainda não são totalmente elucidadas todas as funções das fosfolipases durante a patogênese, porém sabe-se que essas enzimas participam ativamente do processo de invasão das células do hospedeiro (SAMARANAYAKE et al., 2006; ELLEPOLA et al., 2016). Alguns trabalhos mostram que em *C. albicans* fosfolipases são necessárias na infecção em modelo animal e que a virulência desse fungo é reduzida quando genes codificadores são deletados (GHANNOUM, 2000; YING & CHUNYANG, 2012; ZHAO et al, 2020). Fosfolipases também já mostraram ter papel nos processos de adesão, produção de hifas e invasão celular em *C. albicans* (GHANNOUM, 2000; ZHAO et al, 2020). Além disso, trabalho de Ying & Chunyang (2012) diferenças na produção de fosfolipase pode estar ligada com a resistência de *C. albicans* a fluconazol. Os autores verificaram que os isolados de *C. albicans* que eram resistentes ao antifúngico apresentavam alta produção de fosfolipases (YING & CHUNYANG, 2012).

Outra classe de enzimas produzidas por *Candida* spp. são as hemolisinas. Hemolisinas são proteínas que possuem a capacidade de lisar hemácias (NAYAK et al., 2013). Trabalhos sugerem que as hemolisinas induzem

a formação de poros nas células se ligando com vários marcadores celulares (GONZALEZ et al., 2008). A lise dos eritrócitos acarreta na liberação do ferro presente nesse tipo celular, ferro este que é um fator chave no crescimento de microrganismos (BULLEN, 1981). A secreção de hemolisinas, seguida da aquisição de ferro favorecem a invasão da mucosa e de órgãos pelas hifas produzidas por *Candida* (TSANG et al., 2007).

A produção de enzimas por membros do gênero *Candida*, como outros fatores de virulência, podem vir a se tornar um alvo para o controle e prevenção de infecções causadas por estes patógenos através de ferramentas farmacológicas e imunológicas (SCHALLER et al., 2005).

### **2.6.5- Switching fenotípico**

O fenômeno conhecido como switching fenotípico foi descrito pela primeira vez em 1985 (SLUTSKY et al., 1985). Switching fenotípico é definido como um fenômeno reversível com surgimento espontâneo de colônias com morfologias alteradas a uma taxa mais alta que as taxas de mutação somática (SOLL et al., 1992). Este fenômeno já foi descrito em várias espécies microbianas, inclusive em fungos patogênicos como é o caso de algumas espécies do gênero *Candida*, como por exemplo *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. lusitaniae* (JAIN et al., 2008).

O switching fenotípico pode ocorrer a qualquer momento durante o crescimento da colônia fúngica, estando associado a mudanças no microrganismo a nível celular, resultando em fenótipos complexos (JAIN et al., 2008). O switching “white-opaque” é o mais estudado. Este fenômeno é regulado pelo locus mating-type-like (MLT) (JAIN et al., 2008). Na natureza as cepas de *Candida* que realizam switching são homozigotas a/a ou  $\alpha/\alpha$ , as cepas heterozigóticas desse gênero são incapazes de realizar switching white-opaque (LEGRAND et al., 2004).

Estudos mostram que o switching pode ocorrer no hospedeiro, e que este fenômeno está ligado a virulência do microrganismo (BOMMANAVAR et al., 2017). Em *C. albicans* o sistema white-opaque está ligado a regulação da

patogênese e reprodução sexual (ZHENG et al., 2020). Zheng e colaboradores mostram uma ligação da via do fosfato com o switching White-opaque em *C. albicans*. Os pesquisadores observaram que a baixa concentração de fosfato extracelular favorece o fenótipo opaco (ZHENG et al., 2020). Kvall e colaboradores (1999) estudaram sobre o aspecto da virulência o switching white-opaque e demonstraram que as células de *C. albicans* na fase opaca foram mais virulentas em modelos de infecção cutânea enquanto a fase white apresentou maior virulência em modelos de infecção sistêmica (KVAAL et al., 1999). Zhang e colaboradores analisaram o switching white-gray-opaque em *C. tropicalis* e mostraram que a virulência das células que apresentavam o fenótipo gray era intermediário, white mais virulento e opaco apresentando a menor virulência (ZHANG et al., 2016). Tang e colaboradores avaliaram isolados de *Candida* obtidos em infecções vulvovaginais e observaram que aproximadamente 65% dos isolados eram *C. albicans* e destes 91,22% apresentavam switching fenotípico (TANG et al., 2019).

Diferentes aspectos da virulência de *Candida* spp. podem ser afetados pelo switching como adesão, resistência a antifúngicos, secreção de proteinases, podendo influenciar diretamente nos processos infecciosos relacionados a estes microrganismos (KENNEDY et al., 1988; MORROW et al., 1992, VARGAS et al., 2000; HUBE & NAGLIK, 2001).

## 2.7- Resistência

Uma terapia antifúngica eficiente é essencial para o controle do avanço das infecções fúngicas e redução das mortes causadas por elas. Porém, a resistência à antifúngicos que anos atrás era considerada rara, tem aumentado (COWEN et al., 2015). Em fungos a resistência pode ser classificada como intrínseca ou adquirida. Resistência intrínseca é aquela inerente àquele microrganismo, a qual é encontrada na maioria dos representantes daquela espécie (ARENDRUP & PATTERSON, 2017). Já a resistência adquirida surge em resposta a uma pressão seletiva a um antifúngico ou em transmissão

horizontal de cepas resistentes entre pacientes (ARENDRUP & PATTERSON, 2017).

O grau de efetividade de um antifúngico é geralmente mensurado por protocolos de microdiluição e os resultados geralmente são avaliados com comparações inter-laboratoriais. Os protocolos de microdiluição mais difundidos para avaliação da atividade dos antifúngicos são produzidos pelo CLSI e EUCAST. A partir destes protocolos pontos de corte são definidos para as concentrações dos antifúngicos, e assim é possível determinar *in vitro* o grau de susceptibilidade dos microrganismos ao tratamento com as drogas testadas (DELARZE, 2015).

Poucas classes de antifúngicos de uso clínico estão disponíveis, limitando assim as possibilidades para o tratamento das infecções fúngicas. Azóis atuam inibindo a biossíntese do ergosterol da membrana plasmática do fungo, polienos se ligam ao ergosterol e promovem a formação de poros na membrana, flucitosina bloqueia o metabolismo da pirimidina e a síntese de DNA e as equinocandinas inibem a biossíntese de  $\beta$ -1,3 glucana (PERLIN, 2015). Além das poucas classes de antifúngicos licenciados para uso clínico, como citado anteriormente, outros fatores são limitantes para o tratamento antifúngico, como o elevado custo e a desigualdade de distribuição dessas drogas pelo mundo. Kneale e colaboradores (2016) fizeram levantamento da disponibilidade de antifúngicos em 155 países. Os pesquisadores verificaram 78,4% dos países não apresentam disponibilidade de flucitosina para tratamento antifúngico. Em 27% dos países anfotericina B não está disponível. Os medicamentos azólicos são os que apresentam maior distribuição, sendo que o fluconazol está disponível em todos os países avaliados, porém nem sempre este medicamento consegue ser eficaz para o tratamento de infecções fúngicas, como a candidemia por exemplo, já que diversos isolados de *Candida* resistentes tem sido identificados (KNEALE et al., 2016). Alguns mecanismos de resistência à antifúngicos são bem descritos e envolvem desde alteração de bombas de efluxo, alterações de afinidade do alvo de ação do medicamento e formação de biofilme (PERLIN et al., 2015; COWEN, 2015; PERLIN et al., 2017).

A resistência de *C. albicans* aos azóis envolve diversos mecanismos, sendo que os mesmos podem ocorrer de maneira isolada ou em conjunto

(COWEN, 2015; PERLIN et al., 2017). A superexpressão do gene ERG11 que codifica a enzima 14 $\alpha$ -dimetilase pode conferir resistência a azóis. Esta enzima participa da biossíntese de ergosterol e é o alvo de ação dessa classe de antifúngicos (COWEN, 2015; PERLIN et al., 2017; BERKOW & LOCKHART, 2017). A superexpressão de ERG11 contribui para a resistência aos azóis porque aumenta a quantidade do alvo de ação da droga, o que diminui a susceptibilidade a ela (FRANZ et al., 1998; AKINS, 2005). Além da superexpressão do gene ERG11, mutações pontuais no mesmo podem interferir na sensibilidade a azóis (BERKOW & LOCKHART, 2017). Substituições de aminoácidos causadas por essas mutações podem alterar a estrutura proteica, reduzindo a afinidade do fluconazol a mesma (SANGLARD et al., 1998; BERKOW & LOCKHART, 2017). Em *C. albicans*, mutações no gene ERG11 que levam a substituições em aminoácidos é um dos mecanismos já descritos para a resistência deste fungo a antifúngicos azólicos (FLOWERS et al., 2015). A superexpressão de ERG11 causada por mutações no gene do regulador transcricional Upc2 também pode levar a resistência de *C. albicans* a azóis (MACPHERSON et al., 2005; WHALEY, 2017).

O efluxo de antifúngicos através de proteínas transportadoras também contribui para a resistência a antifúngicos azólicos (COWEN et al., 2015; BERKOW & LOCKHART, 2017). A ação deste mecanismo impede o acúmulo intracelular do antifúngico, resultando na menor eficiência do medicamento (BERKOW & LOCKHART, 2017). Em *Candida* spp. as bombas de efluxo são codificadas pelos genes do ATB-binding cassette (ABC) e a superfamília de facilitadores (MFS) (PERLIN et al., 2017). Em *C. albicans* a superexpressão de bombas de efluxo Mdr1p e Cdr1p/Cdr2p também levam a resistência ao fluconazol (COSTE et al., 2004; WHALEY et al., 2017).

Alterações genômicas de grande escala como perda de heterozigose, aumento do número de cópias cromossomais e aneuploidias podem estar relacionadas a resistência a azóis pois podem afetar a expressão de genes que codificam bombas de efluxo e os alvos de ação dessas drogas (PERLIN et al., 2015).

Os fungos apresentam mecanismos que os ajudam a se protegerem contra o estresse celular. A exposição a antifúngicos é uma situação em que as

células fúngicas são colocadas sob estresse. Em alguns casos as respostas celulares ao estresse podem estabilizar as células na presença do antifúngico, e leva-las ao desenvolvimento de resistência (PERLIN et al., 2015). A calcineurina e a chaperona Hsp90 já foram descritos como importantes fatores na resposta ao estresse induzido por azóis (COWEN & STEINBACH, 2008). A Hsp90 mantém estável diversas proteínas e controla as respostas ao estresse estabilizando a calcineurina fosfatase (COWEN, 2005; COWEN & STEINBACH, 2008). A calcineurina influencia a sinalização de várias respostas celulares como homeostase de íons e biossíntese da parede celular (THEWES, 2014).

A resistência a equinocandinas em *C. albicans*. envolve mutações no gene FKS, o qual codifica a subunidade catalítica da glucana sintase. Além disso respostas ao estresse causado pela exposição aos antifúngicos podem levar a tolerância do fungo a droga. Essas adaptações que permitem que as células fúngica se estabilizem durante a exposição a equinocandinas, podem dar tempo para que ocorram mutações estáveis no gene FKS podendo levar a resistência (PERLIN, 2015; PERLIN et al., 2017).

Mecanismos de resistência a polienos estão ligados a redução de ergosterol na membrana celular (PERLIN et al., 2017). Tratamentos prévios com azóis podem levar a redução do conteúdo de ergosterol na membrana podendo levar a uma resistência a polienos (PERLIN et al., 2017).

A resistência a flucitosina pode ser resultado da perda ou mutação de enzimas envolvidas na sua absorção, metabolismo ou incorporação no RNA fúngico (VANDEN BOSSCHE et al., 1996).

Uma das maiores preocupações atuais é a emergência de fungos multirresistentes, principalmente dentro do gênero *Candida* (COWEN et al., 2015). Isolados de *Candida* multirresistentes geralmente envolvem mecanismos de resistência adquirida em espécies que já apresenta resistência intrínseca, como por exemplo *C. glabrata* e *C. krusei* (ALEXANDER et al., 2013; FORASTIERO et al., 2015; ARENDRUP & PATTERSON, 2017). Porém, a resistência a mais de uma classe de antifúngicos também pode ser intrínseca como é caso de *C. auris* (LOCKHART et al., 2017). Além disso, mais raramente, o surgimento de resistência a mais de uma classe de antifúngicos pode ocorrer

em isolados de espécie tradicionalmente susceptíveis a essas drogas (ARENDRUP & PATTERSON, 2017).

Além da seleção de isolados resistentes dentro do ambiente hospitalar, o isolamento de microrganismos ambientais que não respondem ao tratamento com antifúngicos preocupa os pesquisadores (BRILHANTE et al, 2011; CASTELO-BRANCO et al, 2013). Uma das hipóteses para a emergência de isolados do ambiente com algum grau de resistência aos antifúngicos é a resistência cruzada com agroquímicos utilizados na agricultura (ROCHA et al, 2016). O uso de compostos azólicos na agricultura, por exemplo, pode contaminar grandes áreas e atingir o ar, solos e rios, expondo os microrganismos presentes nestes locais a uma pressão seletiva (AZEVEDO et al 2015). Por apresentarem estrutura química semelhante aos azóis utilizados no ambiente hospitalar, a exposição a estes agrotóxicos pode induzir a resistência aos medicamentos utilizados para o tratamento antifúngicos, e isto pode acontecer mesmo que este isolado nunca tenha entrado em contato com os antifúngicos clínicos (SNELDERS et al., 2012). O desequilíbrio nas populações fúngicas ambientais causado pela pressão seletiva ocasionada pelo uso de agroquímicos, pode afetar a ecologia desses microrganismos levando a emergência de isolados de importância médica, aumentando assim os riscos para a saúde humana (AZEVEDO et al., 2015).

Além da resistência uma característica pouco estudada, mas que pode dificultar o tratamento de infecções microbianas é a tolerância. A tolerância pode ser definida como a capacidade de algumas células microbianas crescerem em concentrações acima da concentração inibitória mínima (CIM) preconizada para aquela espécie (FRIDIMAN et al., 2014). Esta característica é bem observada com o tratamento de alguns fungos com azóis e é conhecida como *trailing* (DELARZE, 2015). A tolerância, diferente da resistência que é baseada em alterações genéticas, ocorre por alterações epigenéticas e, portanto, é reversível (DELARZE, 2015). Alguns pesquisadores apontam que estas células tolerantes ao tratamento antifúngico podem ser as responsáveis pela reincidência de infecções fúngicas (LEWIS, 2007).

## 2.8- Modelos hospedeiros vertebrados para o estudo de *Candida* spp.

Com o intuito de estudar a patogênese podem ser usados diversos modelos animais. Para obter sucesso nos experimentos, os cientistas buscam modelos que ao mesmo tempo mimetizem da melhor forma possível o ser humano, e que se enquadrem dentro das limitações laboratoriais. Sendo assim, existem na literatura vários trabalhos que exploram diferentes hospedeiros para estudo da virulência e patogenicidade do gênero *Candida* (revisado por MACCALLUM, 2012).

Pela proximidade filogenética com humanos, o uso de outros mamíferos no estudo de virulência fúngica é bastante difundido. Existem trabalhos que fazem uso de macacos, roedores, coelhos e porcos no estudo de virulência fúngica (revisado por MACCALLUM, 2012). Roedores são os principais modelos hospedeiros para o estudo da virulência de *Candida* spp. A preferência pelo uso desses animais ocorre devido a familiaridade que os pesquisadores já têm com a manutenção e manipulação dos mesmos, além dos mesmos já apresentarem uma gama de exemplares manipulados geneticamente, os quais podem mimetizar condições humanas e auxiliar no estudo da ação de fatores de virulência dos fungos (MACCALLUM, 2012).

Para mimetizar as infecções causadas pelo gênero *Candida* várias metodologias são empregadas nos laboratórios de pesquisa. Capote-Bonato e colaboradores (2018), por exemplo, empregaram a técnica de cistotomia para inserir cateter nos seus modelos murinos e avaliar a candidúria causada pelo biofilme de *C. tropicalis*. Com os resultados experimentais, estes autores verificaram que todos os animais infectados com biofilme pré-formado desenvolveram processo inflamatório na bexiga, e que apenas metade dos animais infectados com células planctônicas desenvolveram a inflamação (CAPOTE-BONATO et al., 2018).

A virulência de *C. albicans*, *C. haemulonii*, *C. glabrata* e *C. auris* foi avaliada em modelo murino por Fakhim e colaboradores (2018). No trabalho os pesquisadores inocularam diferentes inóculos dos fungos através da veia caudal dos murinos e acompanharam a sobrevivência dos mesmos. *C. albicans* foi o

fungo mais virulento entre os analisados e *C. haemulonii* o que apresentou menor virulência (FAKHIM et al., 2018).

Szabo e MacCallum (2011) analisaram os dados presentes na literatura sobre modelos murinos no estudo de infecções sistêmicas provocadas pelo gênero *Candida*. Na revisão, os autores mostram que as principais metodologias empregadas para o estudo de infecções causadas pelo gênero *Candida* concentram-se em duas vias principais para a disseminação da infecção em murinos, a via intravenosa e a via gastrointestinal. Os estudos que fazem uso da infecção realizada pela via intravenosa, avaliam candidemia (SZABO & MACCALLUM, 2011). O modelo de infecção gastrointestinal mimetiza o curso comum da infecção fúngica em grande parte de pacientes humanos, porém, há de se salientar que os resultados da utilização destas metodologias são variáveis dentro das espécies do gênero *Candida*, e que tais variações devem ser consideradas durante o delineamento experimental (KOH et al., 2008; SZABO & MACCALLUM, 2011).

Mesmo com similaridades filogenéticas entre humanos e roedores, existe uma grande variação quanto aos componentes imunológicos dos mesmos. Dessa forma os resultados obtidos nos trabalhos utilizando tais modelos devem ser analisados considerando tais diferenças (revisado por SZABO & MACCALLUM, 2011).

## **2.9- Modelos hospedeiros alternativos para o estudo de *Candida* spp.**

A preocupação com a ética na utilização de animais durante o desenvolvimento de pesquisas científicas é um tema recorrente no meio científico. Durante o século XIX discussões sobre o uso de animais sencientes (àqueles que reconhecem o estímulo da dor e expressam sentimentos) emergiram com mais força, tanto na sociedade civil como no próprio meio científico (RAYMUNDO & GOLDIM, 2002).

Mesmo sendo um tema cada vez mais recorrente, a comunidade científica por muitos anos foi resistente a implantação de metodologias

alternativas por afirmar que a utilização de animais seria indispensável para a obtenção de resultados satisfatórios em suas pesquisas (RENAMA, 2019). Em oposição a essa ideia, iniciativas para a busca de metodologias alternativas que pudessem reduzir o número de animais na pesquisa sem perder a acurácia dos resultados foram surgindo. Um marco que impulsionou as pesquisas em metodologias alternativas foi a publicação em 1959 por Russel & Burch do livro intitulado “The principles of humane experimental technique”, no qual implementaram o princípio dos 3Rs, que serve de base para as pesquisas científicas até os dias atuais. O princípio dos 3Rs se resumem em três conceitos básicos: a substituição, redução e refinamento. Na substituição os autores propõem o uso, quando possível, de uma metodologia que não utilize animais vertebrados vivos. Na redução eles predizem que se estabeleça um equilíbrio no uso de animais nas pesquisas, para que as informações obtidas com a mesma estejam relacionadas com o uso racional desses animais. E no refinamento eles instituem que quando indispensável o uso de animais sencientes, os mesmos passem por cuidados que minimizem sua dor e sofrimento (RUSSELL & BURCH, 1992).

Baseado no princípio dos 3 Rs e buscando iniciativas concretas para a redução do número de animais sencientes utilizados nos laboratórios de pesquisa, a Europa criou em 1991 o The European Centre for the Validation of the Alternative Methods (ECVAM). Esta organização valida métodos alternativos, buscando com isso avaliar o potencial dessas técnicas e eliminar possíveis erros de metodologia. No Brasil a promulgação da Lei Arouca (nº11.794 de 8 de outubro de 2008) marcou a regulamentação da experimentação animal, baseada em princípios éticos e bem-estar animal nas pesquisas científicas e no ensino (BRASIL, 2008). Esta lei também estabeleceu a criação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O CONCEA tem, dentre outras atribuições, a competência de zelar pelo cumprimento das regulamentações ligadas a utilização de animais em experimentação, credenciar e monitorar as instituições para criação e utilização dos animais em pesquisa e ensino, realizar o monitoramento e avaliação de metodologias alternativas ao uso de animais (CONCEA, 2019).

Diversas pesquisas no âmbito da metodologia alternativa têm sido realizadas. Na literatura podemos encontrar artigos que utilizam animais invertebrados, por exemplo, como alternativa ao uso de animais sencientes. *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Acanthamoeba castellanii*, *Dictyostelium discoideum*, *Tenebrio molitor* e *Galleria mellonella* tem se destacado nas pesquisas e demonstrado potencial como modelo alternativo (DE SOUZA et al., 2015; FUCHS & MYLONAKIS, 2006). Estudos de patogenicidade e virulência fúngica tem utilizado invertebrados como modelo hospedeiro alternativo (FUCHS & MYLONAKIS, 2006; DE SOUZA et al., 2015; ORTEGA-RIVEROS et al., 2017).

Bandi e colaboradores, utilizaram *D. melanogaster* como modelo de infecção para avaliar a virulência de cepas de *C. auris*. As moscas foram infectadas com 10 diferentes cepas de *C. auris* e com uma de *C. albicans*. Os pesquisadores mostraram que nesse modelo invertebrado todas as cepas de *C. auris* foram mais virulentas que *C. albicans*. Com os resultados obtidos os pesquisadores esperam padronizar *D. melanogaster* como modelo de infecção eficiente e de baixo custo para testes de virulência e de atividade de antifúngicos contra infecções causadas por *C. auris* (BANDI et al., 2018).

*C. elegans*, um nematódeo de vida livre, é usado nas pesquisas científicas desde a década de 60, e nos últimos anos tem sido utilizado para se avaliar a virulência de microrganismos (BRENNER, 2002). Ortega-Rivera e colaboradores utilizaram *C. elegans* para avaliar a virulências de cepas de *Candida* spp. Dentre as espécies estudadas, *C. albicans* e *C. krusei* foram mais letais para o nematódeo e *C. dubliniensis* provocou menor taxa de mortalidade (ORTEGA-RIVEROS et al., 2017). Além de ser usado para análise de virulência, *C. elegans* pode ser usado como ferramenta de triagem para teste com substâncias antifúngicas (SHU et al., 2016; ORTEGA-RIVEROS et al., 2017).

*G. mellonella*, larva de uma mariposa, também tem sido usada com frequência como modelo invertebrado no estudo de virulência de representantes do gênero *Candida*. Silva e colaboradores, por exemplo, utilizaram este modelo na análise de virulência de *C. haemulonii* em comparação com outras espécies do gênero. Como resultado os pesquisadores descobriram que as larvas respondem de maneira dose dependente aos fungos. *C. tropicalis* e *C. lusitanae*

foram mais virulentas para *G. melonella* que *C. krusei* e *C. haemulonii* (SILVA et al., 2018).

*Tenebrio molitor* é outro exemplo de invertebrado utilizados como hospedeiros para o estudo de virulência fúngica. O uso desse inseto será abordado com mais profundidade no tópico abaixo.

### **2.9.1- *Tenebrio molitor***

Conhecido dos produtores de grãos por ser uma praga em suas lavouras, o besouro *Tenebrio molitor* tem sido uma ferramenta utilizada pela ciência, dentre outros modelos hospedeiros, para o estudo de patogenicidade e virulência de microrganismos. (SCHROECKENSTEIN et al., 1990). A facilidade de aquisição, manutenção e manipulação dessas larvas tornam o *T. molitor* um modelo promissor (DE SOUZA et al., 2015).

*T. molitor* está exposto em seu ambiente a diversos microrganismos, e durante a evolução desenvolveu mecanismos para combatê-los. A imunidade inata tem um papel muito importante na infecção nos insetos, pois ela reconhece, modula e sinaliza mecanismos efetores contra os patógenos (TINDWA et al., 2013; JOHNSTON et al., 2014). Quando os patógenos rompem a barreira cuticular, rapidamente são acionados os mecanismos de defesa incluindo a fenoloxidase, algumas lisozimas e células fagocíticas (JOHNSTON et al., 2014). Um outro fato chave na defesa do *T. molitor*, e de outros insetos, é o corpo gorduroso, pois ele é responsável pela produção de peptídeos antimicrobianos que levam a respostas constitutivas durante a infecção (JOHNSTON et al., 2014).

O uso de *T. molitor* para pesquisas de patogenicidade e virulência fúngica e bacteriana ainda está no início, mas já existem trabalhos publicados que mostram a eficiência desse modelo para estes estudos. Oppert e colaboradores (2012) verificaram o perfil do transcriptoma da resposta pós intoxicação de *T. molitor* por toxina produzida por *Bacillus thuringiensis* (OPPERT et al., 2012). Haine e colaboradores (2008) mostraram que a atividade

antimicrobiana da hemolinfa de *T. molitor* aumenta durante as primeiras horas de infecção e é mantida em altos níveis durante 14 dias, quando submetidos a *Escherichia coli* ou *Bacillus subtilis* (HAINE et al., 2008). Chae e colaboradores (2012) descobriram em seus estudos um novo peptídeo antimicrobiano, o tenecin 4, de *T. molitor* que apresenta atividade contra bactérias Gram-negativas (CHAE et al., 2012). Dorling e colaboradores (2015) mostraram em seus estudos que o *T. molitor* é um modelo útil nos estudos de *Staphylococcus aureus*, pois nesse invertebrado ocorre o reconhecimento, sobrevivência e permanência desse patógeno, e que os ácidos teicóicos da parede desse patógeno, que por muitas vezes passam pelo processo de D-alanização tem um papel muito importante no estabelecimento e manutenção dessa infecção (DORLING et al., 2015).

Pouco fungos já foram estudados utilizando as larvas de *T. molitor*, mas a tendência é que o uso deste modelo cresça visto que os resultados obtidos até o momento são extremamente promissores. Guo e colaboradores (2014) utilizaram *T. molitor* para estudar grãos infectados por diferentes espécies do gênero *Fusarium* (GUO et al., 2014). Eles verificaram que os insetos evitavam se alimentar dos grãos que estavam infectados com *Fusarium avenaceum*, porém não com *Fusarium proliferatum*, *Fusarium poae* ou *Fusarium culmorum*. Observaram também que as larvas que se alimentavam de grãos colonizados com *F. culmorum*, *F. avenaceum* obtiveram altas taxas de mortalidade. Os autores também conseguiram isolar micotoxinas das larvas que se alimentaram dos grãos contaminados, mostrando o potencial deste modelo para o estudo das toxinas produzidas por microrganismos (GUO et al., 2014). De Souza e colaboradores (2015), apresentaram em seu trabalho resultados que indicam que o *T. molitor* é um modelo eficaz para estudo da patogenicidade e virulência fúngica. Esses autores verificaram que o aumento da concentração do inóculo tanto de *C. albicans*, quanto de *Cryptococcus neoformans* aumentava a mortalidade das larvas desse inseto (DE SOUZA et al., 2015). Neste trabalho os autores utilizaram além do controle PBS, um controle inoculado com *C. albicans* e *C. neoformans* inativados pelo calor. As larvas inoculadas com esses controles não morreram durante o período experimental. Também foram realizadas análises histológicas com as larvas de *T. molitor* inoculados com os dois fungos.

Foi observado a filamentação de *C. albicans* no tecido da larva, e a formação de capsula de *C. neoformans*, importantes fatores de virulência desses fungos (DE SOUZA et al., 2015). Tais resultados mostram o potencial do *T. molitor* como modelo para estudo de patogenicidade e virulência fúngica.

Dentre as vantagens em se empregar modelos invertebrados como modelos de infecção estão as poucas restrições éticas, já que estes animais são considerados não-sencientes, baixo custo, facilidade de manipulação e sistema imune inato conservado, apresentando assim similaridades com mamíferos (MYLONAKIS, 2008; DOKE & DHAWALE, 2015; JOHNSTON et al., 2014, DE SOUZA et al., 2015). O sistema imune adaptativo não é conservado nestes animais, por isso estudos nesta área utilizando modelos alternativos são inviáveis. Mesmo com esta limitação, o uso de invertebrados se mostra como uma ferramenta valiosa principalmente em estudos iniciais de virulência e patogenicidade fúngica (DE SOUZA et al., 2015).

### 3- Relevância e Justificativa

As micoses invasivas atingem mais de dois milhões de pessoas anualmente no mundo (SCHMIEDEL & ZIMMERLI, 2016). Dentre os principais agentes etiológicos de micoses invasivas destaca-se o gênero *Candida*. Este gênero é responsável por cerca de 20% de todas as infecções em unidades de tratamento intensivo (LAMOTH et al, 2018). A taxa de letalidade de paciente diagnosticados com candidemia é elevada e pode varia de 40-70% (ASHLEY et al., 2012; KULLBERG & ARENDRUP, 2015; PAPPAS et al., 2018; BORBA et al., 2018).

*C. albicans* é a espécie do gênero com maior incidência tanto indivíduos saudáveis quanto nos quadros de infecções fúngicas, além disso, esta levedura, também pode ser isolada na natureza (MARTINS et al., 2005; MCMANUS & COLEMAN, 2014; VALLABHANENI, 2016). A característica ubíqua dessa espécie se deve aos mecanismos de adaptação que possuem. O arsenal de mecanismos de virulência e o desenvolvimento de mecanismos de resistência a antifúngicos, por exemplo, são ferramentas usadas por esse fungo para se adaptar, se multiplicar e se manter viável frente as defesas de seu hospedeiro (MENDES GIANNIN et al., 2013; DEORUKHKAR & SAINI, 2013; DA SILVA DANTAS et al., 2016; TÓTH et al., 2018). Na natureza esses fungos também estão expostos a condições desfavoráveis e por isso também usam estratégias para conseguir vencer essas barreiras (BUZZINI et al., 2017). O aumento da temperatura global, a alta exposição à radiação solar, poluição e o uso de agroquímicos na agricultura são fatores que podem influenciar estes microrganismos, afetando diretamente nas características relacionadas a patogênese, como também na resistência a antimicrobianos (MORIO, 2020). Existem estudos que já apontam para a presença de espécies fúngicas com potencial patogênico humano em isolados ambientais (MEDEIROS et al., 2008; OPULENTE, 2019). Além disso a resistência a antifúngicos já foi demonstrada em alguns isolados de origem ambiental (YANG et al., 2012). Neste trabalho avaliaremos aspectos de virulência e resistência de isolados ambientais de *C. albicans*. Os mesmos aspectos serão avaliados em isolados clínicos. Entender os mecanismos de virulência e resistência desses microrganismos pode

contribuir para a busca de estratégias que ajudem a mitigar a evolução da resistência e diminuir o número de mortes em decorrência de infecções causadas por esses patógenos oportunistas.

#### 4- Objetivo geral

Avaliar isolados ambientais e clínicos de *Candida albicans* a fim de analisar as variáveis presentes quanto aos perfis de virulência e resistência apresentadas pelos mesmos.

##### 4.1- Objetivos específicos

- Avaliar os isolados clínicos e ambientais quanto aos fatores de virulência: termotolerância, filamentação, produção de biofilme e produção de enzimas hidrolíticas;
- Analisar a susceptibilidade aos antifúngicos de isolados clínicos e ambientais de *C. albicans*;
- Avaliar a susceptibilidade aos antifúngicos de biofilmes formados de isolados clínicos e ambientais de *C. albicans*
- Analisar a virulência dos isolados clínicos e ambientais de *C. albicans* em *T. molitor*;
- Analisar a curva de sobrevivência de *T. molitor* infectado com isolados de *C. albicans*.
- Observar a densidade de hemócitos de *T. molitor* após a infecção com isolados de *C. albicans*;
- Avaliar a capacidade de melanização de *T. molitor* após a infecção com *C. albicans*

## 5- Material e métodos

### 5.1- Origem das leveduras

Os isolados de *Candida albicans* provenientes de ambientes clínicos (CL) e ambientais (com alta (AMI) e baixa influência antrópica (AM)) foram utilizados para a realização dos experimentos do presente trabalho (Quadros 1, 2, 3). Os dezesseis isolados oriundos de ambientes com baixa influência antrópica foram obtidos em parques e reservas ambientais (Quadro 1). Já os dezenove isolados obtidos em ambientes considerados com elevada influência antrópica foram coletados no Rio Cuiabá, no Mato Grosso – Brasil, no Rio Toledo, no Paraná – Brasil, no Rio das Velhas e na Lagoa da Pampulha, Minas Gerais – Brasil (Quadro 2). Por cruzarem cidades com uma elevada taxa populacional estes rios acabam sendo afetados com poluição tanto pela forte atividade agrária de algumas dessas regiões, quanto pelo descarte incorreto de lixo e esgoto (MANFRIN et al., 2018; MARCHETO et al., 2019). Vinte seis isolados clínicos obtidos em hospitais de Belo Horizonte/MG e Toledo/PR foram utilizados nos experimentos. Todos os isolados descritos nos Quadros 1, 2 e 3 estão depositados na Coleção de Cultura e Células da Universidade Federal de Minas Gerais. Para a realização dos procedimentos experimentais do presente trabalho as amostras criopreservadas foram descongeladas e foram realizados repiques sucessivos em ágar Sabouraud Dextrose. As placas foram então incubadas em BOD 37°C por 24hs. A linhagem padrão *C. albicans* SC5314 foi utilizada como controle em todos os experimentos. A linhagem SC5314 tem origem clínica de uma paciente com infecção generalizada nos Estados Unidos, e foi escolhida como controle experimental por ser usada desde a década de 80 como isolado “wild-type” em vários estudos genéticos e de virulência e, portanto, apresenta diversas características descritas (ATCC, 2021).

**Quadro 01** – Isolados ambientais de *C. albicans* de ambientes com pouca influência antrópica.

<b>ISOLADOS</b>	<b>CÓDIGO DA COLEÇÃO</b>	<b>SUBSTRATO DE ISOLAMENTO</b>	<b>ORIGEM</b>
AM1	RC27	Madeira em decomposição	Mucajá/RR
AM2	ABT01	Fitotelmo <i>Bromelia karatas</i>	Aurora do Tocantins/TO
AM3	ABT251	Fitotelmo <i>Bromelia karatas</i>	Aurora do Tocantins/TO
AM4	IC19.2	Madeira em decomposição	Ilhéus/BA
AM5	TPA15.1	Solo	Catas Altas/MG
AM6	IC43.2	Madeira em decomposição	Ilhéus/BA
AM7	R1FL45.3	Flor de Helicônia	Melgaço/PA
AM8	IO43.2	Madeira em decomposição	Camacan/BA
AM9	TPA14.1	Solo	Catas Altas/MG
AM10	TPA 5.2	Solo	Catas Altas/MG
AM11	IB43.1	Madeira em decomposição	Ilhéus/BA
AM12	XO20.1	Madeira em decomposição	Melgaço/PA
AM13	TC41.2	Madeira em decomposição	Taquaruçu/TO
AM14	SAM 48.1	Solo	Manaus/AM
AM15	TSA 48.1	Solo	Manaus/AM
AM16	VSA48.1	Solo	Manaus/AM

\*RR: Roraima, TO: Tocantins, BA: Bahia, PA: Pará, MG: Minas Gerais, AM: Amazonas

**Quadro 02** – Isolados ambientais de *C. albicans* com influência antrópica.

<b>ISOLADOS</b>	<b>CÓDIGO DA COLEÇÃO</b>	<b>SUBSTRATO DE ISOLAMENTO</b>	<b>ORIGEM</b>
AMI1	MCACB 2.2	Água do rio Cuiabá	Cuiabá/ MT
AMI2	MCACB 2.3	Água do rio Cuiabá	Cuiabá/ MT
AMI3	MCACB 2.5	Água do rio Cuiabá	Cuiabá/ MT
AMI4	MCACB 2.7	Água do rio Cuiabá	Cuiabá/ MT
AMI5	MCACB 2.8	Água do rio Cuiabá	Cuiabá/ MT
AMI6	MCACB 2.11	Água do rio Cuiabá	Cuiabá/ MT
AMI7	CHRCB 2.11	Água do rio Cuiabá	Cuiabá/ MT
AMI8	CHRCB 2.12	Água do rio Cuiabá	Cuiabá/ MT
AMI9	CHRCB 2.25	Água do rio Cuiabá	Cuiabá/ MT
AMI10	RVC 4.5	Água do Rio das Velhas	Belo Horizonte/MG
AMI11	RVM 4.5	Água do Rio das Velhas	Belo Horizonte/MG
AMI12	LPM 1.1	Água da Lagoa da Pampulha	Belo Horizonte/MG
AMI13	LPC 1.1	Água da Lagoa da Pampulha	Belo Horizonte/MG
AMI14	AP048	Água do rio Toledo	Toledo/PR
AMI15	AP059	Água do rio Toledo	Toledo/PR
AMI16	AP062	Água do rio Toledo	Toledo/PR
AMI17	AP075	Água do rio Toledo	Toledo/PR
AMI18	AP098	Água do rio Toledo	Toledo/PR
AMI19	AP146	Água do rio Toledo	Toledo/PR

\*MT: Mato Grosso, MG: Minas Gerais, PR: Paraná

**Quadro 03** – Isolados clínicos de *C. albicans*.

<b>ISOLADO</b>	<b>CÓDIGO DA COLEÇÃO</b>	<b>Origem</b>
CL1	RE010	Belo Horizonte/MG
CL2	RE015	Belo Horizonte/MG
CL3	RE017	Belo Horizonte/MG
CL4	RE018	Belo Horizonte/MG
CL5	RE023	Belo Horizonte/MG
CL6	RE027	Belo Horizonte/MG
CL7	RE030	Belo Horizonte/MG
CL8	RE031	Belo Horizonte/MG
CL9	RE036	Belo Horizonte/MG
CL10	RE037	Belo Horizonte/MG
CL11	RE053	Belo Horizonte/MG
CL12	RE070	Belo Horizonte/MG
CL13	RE083	Belo Horizonte/MG
CL14	RE095	Belo Horizonte/MG
CL15	RE111	Belo Horizonte/MG
CL16	RE114	Belo Horizonte/MG
CL17	RE124	Belo Horizonte/MG
CL18	RE125	Belo Horizonte/MG
CL19	RE126	Belo Horizonte/MG
CL20	APC02.1	Toledo/PR
CL21	APC03.1	Toledo/PR
CL22	APC04.1	Toledo/PR
CL23	APC06.1	Toledo/PR
CL24	APC09.1	Toledo/PR
CL25	APC10.1	Toledo/PR
CL26	APC11.1	Toledo/PR

\*MG: Minas Gerais, PR: Paraná

## 5.2- Termotolerância

Os isolados de *C. albicans* avaliados no presente trabalho foram testados quanto a sua capacidade de crescimento em diferentes temperaturas. Para isso, as leveduras foram cultivadas em ágar Sabouraud por 24 horas em temperatura de 37°C. Posteriormente uma colônia foi transferida para um tubo de ensaio contendo solução salina 0,9% e a concentração da suspensão fúngica foi ajustada para  $1 \times 10^6$  células/mL com auxílio de um hemocitômetro. Dez microlitros da suspensão de leveduras foram inoculados em placas de Petri contendo ágar Sabouraud e incubadas nas temperaturas de 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C e 50°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 apresentaram crescimento robusto foram identificadas com ++ nos resultados, as leveduras com crescimento intermediário foram descritas com +, já as leveduras que não apresentaram crescimento foram identificadas com sinal negativo (-) (ZEUTHEN et al., 1989). Três experimentos independentes foram realizados.

## 5.3- Análise da morfogênese de isolados de *C. albicans*

Para a avaliação da capacidade de filamentação as leveduras foram submetidas a diferentes condições de cultivo. A princípio um cultivo prévio dos isolados de *C. albicans* foi realizado em ágar Sabouraud por 24 horas a 37°C. Passado este período uma colônia da cultura foi transferida para tubos de ensaio contendo solução salina 0,9%. Esta suspensão fúngica foi lida em espectrofotômetro 530 nm, e ajustada para 75% de transmitância ( $\sim 0,5-5 \times 10^6$  cél/mL). Dez microlitros desta suspensão fúngica foram inoculados em três diferentes meios de cultura como descrito abaixo em duplicata.

- Ágar Spider (1% de caldo nutriente, 0,2% de  $K_2PO_4$ , 1% de manitol, 1,35% de ágar) (CALERA et al., 2000).

- Ágar Lee (1,25% de glicose, 0,5% (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>, 0,02% de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,25% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, 0,5% de NaCl, 0,05% de alanina, 0,13% de leucina, 0,1% de lisina, 0,01% de metionina, 0,05% de fenilalanina, 0,05% de prolina, 0,05% de treonina, 0,0714% de ornitina, 0,0001% de biotina, 2% de ágar, pH 6.8 (LEE et al., 1975).

- Ágar SLAD (YNB sem aminoácido e sem (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,17% de glicose, 2% de sulfato de amônio 50µM, 2% ágar) (CALERA et al., 2000).

As placas foram mantidas em fluxo laminar até que os 10 µL da suspensão fúngica secassem, posteriormente as placas foram incubadas em estufa BOD a 37°C por 7 dias. Passado o período experimental uma colônia foi fotografada com a câmera Asus Zenfone 3 max (16 megapixels – Asus, Taipei, Taiwan) dentro do fluxo laminar com a placa de Petri aberta. Os resultados foram avaliados de modo visual, os isolados foram comparados de acordo com o grau de filamentação sendo classificados como +++ os isolados que apresentaram alto grau de filamentação, ++ isolados com filamentação intermediária, + isolados com baixa filamentação e com – os isolados que não filamentaram nos meios testados (CALERA et al., 2000; AZADMANESH et al., 2017).

#### **5.4- Determinação da atividade de fosfolipase**

Os isolados de *C. albicans* do presente trabalho foram avaliadas quanto a atividade da enzima extracelular fosfolipase através do tamanho da zona de precipitação formada, após seu crescimento, no meio Egg Yolk ágar. Para a preparação do meio de cultura utilizado nesse teste foram utilizados 20g de glicose, 10g de peptona, 5g de extrato de levedura, 58.5g de cloreto de sódio, 0,55g de cloreto de cálcio e 20g de ágar em 840 mL de água destilada. O meio foi autoclavado, resfriado até 40°C e adicionados 160 mL da emulsão de gema de ovo (50% de gema de ovo e 50% de salina 0,9%). Os isolados de *C. albicans* foram previamente cultivados em ágar Sabouraud a 37°C e, posteriormente, uma colônia de cada isolado foi transferida para um tubo de ensaio contendo solução salina 0,9%. Esta suspensão foi ajustada para 1x10<sup>6</sup> células/mL em espectrofotômetro a 530nm, com transmitância de 75-77%. Em cada placa

contendo o meio Egg Yolk foram adicionados 10  $\mu$ L do inóculo previamente preparado. A placa foi mantida aberta dentro do fluxo laminar até a gota do inóculo secar, posteriormente as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 4 dias. Para avaliar os resultados o diâmetro dos halos (em mm) formados foram medidos, a atividade da fosfolipase (Pz) foi calculada como a razão do diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação, como descrito por Price e colaboradores (1982). As amostras foram consideradas negativas para a produção de fosfolipase quando  $Pz=1$ .  $Pz<1$  a amostra foi considerada positiva, e quando o valor foi menor ou igual a 0,63 ela foi considerada fortemente positiva (PRICE et al., 1982). O experimento foi realizado em triplicata.

### **5.5- Determinação da atividade da proteinase**

A avaliação da produção da proteinase foi realizada em meio de cultura sólido composto de 11,7g de Yeast Carbon Base (1g de extrato de levedura, 2g de albumina de soro bovino em 100mL de água). O pH do meio foi ajustado para 5 e posteriormente mesmo foi esterilizado por filtração. Após este processo foi adicionado solução de ágar previamente esterilizada em autoclave (18g de ágar em 900mL de água destilada). Nas placas de Petri já contendo o meio, foram inoculados 10  $\mu$ L das amostras preparadas da mesma maneira como descrito para o teste de fosfolipase. As placas foram incubas por 7 dias a uma temperatura de 28°C. Para a visualização dos resultados, após o período de incubação foi acrescentado nas placas uma solução de negro de amido (1g de negro de amido, 199mL de ácido acético glacial, 100mL de água destilada). Quando, após a coloração, não for possível observar uma zona mais clara ao redor do local onde previamente foi inoculado a levedura a atividade da enzima foi considerada negativa, a atividade de proteinase foi considerada positiva com clarificação entre 1 e 2 mm ao redor da colônia. Quando a zona clara ao redor da colônia fúngica apresentava tamanho de 3-5 mm a amostra era considerada fortemente positiva (CASSONE et al., 1987; DE BERNARDIS et al., 1999).

## 5.6- Ensaio de formação de biofilme *in vitro*

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 0,9%. Posteriormente a concentração da suspensão de levedura foi determinada em hemocítômetro e ajustada para uma concentração equivalente a  $1 \times 10^7$  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 0,9% estéril. Em seguida, 200 µL de RPMI (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) foram adicionados aos poços e a placa foi incubada novamente sob agitação a 37°C por 48 h, sendo que a cada 24h o meio de cultura foi trocado.

A quantificação do biofilme formado foi avaliada seguindo o método descrito por Pierce e colaboradores (2008). Para avaliar a biomassa do biofilme total foi utilizado o corante cristal violeta, o qual cora células viáveis, não-viáveis e a matriz. 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 mantida por 20 minutos em temperatura ambiente. Após este período o cristal violeta foi retirado das placas, sendo lavadas com água corrente. Posteriormente foram adicionados nos poços 150 µL de ácido acético 33%. Por fim, 100 uL da solução de ácido acético foram transferidos para uma nova microplaca de 96 poços e a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro a 530 nm. O teste foi realizado em duplicata.

### 5.7- Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da susceptibilidade a antifúngicos dos isolados foi realizada utilizando a metodologia de microdiluição em placa. Para isto foram utilizados os seguintes antifúngicos: fluconazol (64-0,125 µg/mL), itraconazol (16-0,03 µg/mL) e anfotericina B (8-0,015 µg/mL) (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). A metodologia foi baseada nas diretrizes prescritas pelo CLSI no protocolo M-27-A3 (CLSI, 2008). Os antifúngicos fluconazol, itraconazol e anfotericina B foram diluídos para preparo da solução estoque em dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). Durante todo o procedimento experimental, a anfotericina B foi protegida da luz devido a sua fotossensibilidade. O RPMI (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) adicionado de ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico (MOPS) (NEON, Suzano, Brasil) 0,165 mol/L foi o meio de cultura utilizado no teste. Os isolados fúngicos utilizados no teste foram inoculados previamente em ágar Sabouraud por 24 horas a 37°C. Posteriormente, uma alçada da levedura foi diluída em salina 0,9% e a transmitância desta suspensão foi determinada em espectrofotômetro a 530nm. Para o experimento o inóculo foi padronizado na transmitância que variou entre 75 e 77%, o que equivale a  $0,5-5 \times 10^6$  ufc/mL. Para o experimento utilizou-se placas de 96 poços que foram preparadas conforme segue: na 1ª coluna foram adicionados 200 µL de RPMI para controle de esterilidade do meio, na 2ª coluna foi adicionado o antifúngico a ser testado no dobro da concentração inicial desejada, e na 3ª a 11ª coluna foram adicionados 100 µL de RPMI e realizada a diluição seriada da droga a partir da segunda coluna. Após a diluição seriada foi adicionado em cada poço (da 2ª a 11ª coluna) 100 µL do inóculo de *C. albicans*, atingindo desta forma a concentração final do inóculo de  $0,5-5 \times 10^3$  ufc/mL. A 12ª coluna da placa foi 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. Foi considerado CIM para os azóis o poço em que foi observado 80% de inibição de crescimento em relação ao controle de crescimento e para a anfotericina B o

poço com 100% de inibição em relação ao controle de crescimento. O experimento foi realizado em duplicata e com três experimentos independentes.

### **5.8- Susceptibilidade do biofilme formado à antifúngicos**

Com o intuito de avaliar a susceptibilidade à antifúngicos do biofilme formado pelos isolados de *C. albicans*, foram seguidos os procedimentos de formação de biofilme descritos no tópico 5.6. Após as 48 horas de formação do biofilme, o meio de cultura foi aspirado dos poços e em seguida adicionou-se 100 µL de RPMI com diferentes concentrações dos antifúngicos a serem testados. Neste experimento nós testamos a ação antifúngica do fluconazol (64-0,125 µg/mL), itraconazol (16-0,03 µg/mL) e anfotericina B (8-0,015 µg/mL). Posteriormente, as placas foram incubadas por mais 24 horas. Passado este período, o líquido dos poços foi gentilmente aspirado e o mesmo foi lavado com 200 µL de PBS. Para avaliar a viabilidade das células presentes no biofilme após o tratamento com os antifúngicos, foi utilizado o MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (Merck, Darmstadt, Alemanha) conforme metodologia descrita por Weerasekera e colaboradores (2016). Brevemente, foram adicionados aos poços 50 µL da solução 1mg/mL de MTT em salina 0,9% e então as placas foram cobertas com papel alumínio com o intuito de inibir o contato com a luz e armazenadas em uma estufa na temperatura de 37°C por 4 horas. Passado este período, a solução de MTT foi aspirada e foram adicionados 100 µL de dimetilsulfoxido, com o intuito de dissolver os cristais de formazan produzidos pela reação de MTT nas células viáveis. Após a dissolução, as placas foram lidas em espectrofotômetro a 570nm. O experimento foi realizado em duplicata técnica com três experimentos independentes.

### **5.9- Ensaio de indução de resistência em isolados ambientais de *C. albicans***

Após a determinação do CIM conforme citado no item 5.7, quatro isolados ambientais de baixa influência antrópica sensíveis ao fluconazol foram

selecionados para os testes de indução da resistência. A metodologia deste teste foi baseada no artigo publicado por Rocha e colaboradores (2016), com modificações. Desta forma foram selecionados os isolados AM1, AM4, AM12 e AM13 e os mesmos foram crescidos em ágar Sabouraud por 24 horas. Passado este período, uma colônia de cada fungo foi transferida para microtubos contendo meio RPMI com tampão MOPS 0,165 mol/L suplementado com 0,125 µg/mL de epoxiconazol (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). Os fungos foram mantidos nestas condições em shaker a 75 rpm, na temperatura de 37°C por uma semana. Durante período descrito anteriormente, o meio com epoxiconazol foi renovado duas vezes. Para isto os microtubos foram centrifugados, removido o sobrenadante e novo meio RPMI com epoxiconazol na mesma concentração foi adicionado. Semanalmente a concentração do antifúngico adicionado ao microtubo era aumentada, sendo o dobro do valor utilizado na semana anterior. Passado o período de uma semana, uma alíquota de 10µL da suspensão fúngica foi retirada do microtubo e foi plaqueada em ágar Sabouraud. Este procedimento foi repetido até ser atingida a concentração de 64 µg/mL. Cada alíquota dos fungos obtidas semanalmente foi congelada em freezer -80°C e posteriormente foram submetidas a testes de microdiluição em caldo, seguindo as normativas do CLSI documento M-27-A3 para o teste de sensibilidade ao fluconazol (CLSI, 2008) como descrito anteriormente.

#### **5.9- Ensaio de virulência dos isolados de *C. albicans* em modelo hospedeiro invertebrado *Tenebrio molitor***

As larvas de *T. molitor* utilizadas no experimento foram obtidas comercialmente em loja de produtos para pesca e mantidas no Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos. As larvas de *T. molitor* foram mantidas em caixas plásticas com ração a base de farelo de trigo, em temperatura de 25-30°C.

As larvas utilizadas no experimento foram selecionadas para que apresentassem peso de 0,1-0,2 g. As mesmas foram selecionadas para que não apresentassem nenhum sinal de contaminação, ou seja, as larvas utilizadas no

ensaio apresentavam coloração uniforme e clara, a cutícula intacta e sem sinal de mancha ou outro indício de melanização. Os grupos experimentais do ensaio com *T. molitor* eram compostos por 10 larvas.

As larvas de *T. molitor* foram previamente limpas com álcool 70% com o auxílio de um swab umedecido afim de eliminar possíveis contaminantes externos, além de retirar os resíduos da ração que poderiam vir a atrapalhar a inoculação. Em larvas de *T. molitor* a aplicação do inóculo foi realizada no segundo anel posterior as patas, tal processo foi realizado com o auxílio de uma seringa Hamilton (701N, calibre 26) (DE SOUZA et al., 2015).

Para o inóculo os isolados de *C. albicans* foram cultivados em ágar Sabouraud a 37°C overnight. Larvas inoculadas com *C. albicans* SC5314 foram utilizadas como controle positivo. Após esse período, as células foram ressuspensas em tampão fosfato salina (PBS- 137 mMNaCl, 2.7 mMKCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.76mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4). A fim de estabelecermos o valor do inóculo utilizado no experimento realizamos um pré-ensaio com o controle *C. albicans* SC5314. As larvas de *T. molitor* foram inoculadas com inóculos que variaram de  $1 \times 10^4$  –  $1 \times 10^7$  cel/5µL. Ao final deste ensaio teste verificamos que a concentração de  $1 \times 10^5$  cel/5µL nos possibilitaria uma melhor observação dos resultados no período de 10 dias e por isto foi o inóculo escolhido para a sequência dos testes. A densidade celular foi aferida utilizando um hemocitômetro e o inóculo foi ajustado para  $1 \times 10^5$  cel/5µL e inoculado nas larvas. O controle experimental foi realizado com a inoculação de 5 µL de PBS. Após a inoculação, as larvas foram armazenadas em placas de Petri de 90 mm, em estufa a 37°C, durante 10 dias. A cada 24 horas o experimento foi monitorado e as larvas foram consideradas mortas quando não responderam ao toque. Os testes foram realizados em triplicata (DE SOUZA et al., 2015).

### 5.10 Determinação da densidade de hemócitos

A partir dos dados gerados nos testes de sobrevivência, seis isolados de cada grupo experimental foram escolhidos para os testes subsequentes com o modelo invertebrado *T. molitor*. O critério de escolha para os isolados de cada grupo foi determinado a partir do grau de virulência que os mesmos apresentaram nos testes prévios de sobrevivência com *T. molitor*. Desta forma, foram escolhidos 3 isolados com baixa virulência e 3 isolados com elevada virulência em cada grupo experimental.

Para avaliação da alteração na densidade de hemócitos circulantes na hemolinfa de larvas de *T. molitor*, nós inoculamos as larvas com  $1 \times 10^5$  cel/5 $\mu$ L dos inóculos fúngicos seguindo os mesmos procedimentos de preparo descritos no tópico anterior. Após a inoculação, as larvas foram incubadas em estufa 37°C em placas de Petri de 90mm. Duas horas após a inoculação um total de 10  $\mu$ L hemolinfa das larvas foi coletada com auxílio de uma micropipeta e adicionada a microtubos contendo IPS com anticoagulante gelado (150mM de cloreto de sódio, 5mM de cloreto de potássio, 10mM de Tris HCL, 10mM de EDTA, 30mM de citrato de sódio, 10mM de N-ethylmaleimide). Para a coleta da hemolinfa, as larvas foram posicionadas ventralmente e com o auxílio de uma agulha foi realizado um furo no segundo anel posterior as patas. Após a realização do furo houve extravasamento da hemolinfa, a qual foi coletada com o auxílio da micropipeta. Foram coletados 2  $\mu$ L de hemolinfa de cada larva. O mesmo procedimento foi realizado após 24 horas experimentais. A densidade de hemócitos circulantes foi avaliada com auxílio de hemocitômetro em microscópio óptico na objetiva de 40X. Os hemócitos presentes nos 4 campos com 16 quadrantes do hemocitômetro foram contados. A média dos 4 quadrantes foi calculada e o valor obtido foi adicionado a uma fórmula contendo o valor de diluição da suspensão inicial dos hemócitos (1:10) e do fator de calibração do hemocitômetro ( $10^4$ ), para assim obter-se o valor real de hemócitos na suspensão. Como controle positivo experimental foi avaliada a hemolinfa das larvas inoculadas com o isolado de *C. albicans* SC5314. Dois controles negativos foram empregados no experimento, um referente a larvas que não passaram por nenhum processo de inoculação e o outro grupo formado por larvas inoculadas

com PBS. Este último tinha como objetivo de avaliar se o trauma causado pelo processo de injeção poderia interferir na densidade de hemócitos circulantes (PERINI et al., 2019). Os grupos experimentais foram compostos de 20 larvas (este N experimental contempla as larvas utilizadas para a coleta de hemolinfa em dois tempos experimentais e também larvas extras para repor perdas durante o processo de coleta da hemolinfa).

### **5.11- Quantificação da melanização**

Para avaliação do processo de melanização da hemolinfa de *T. molitor* selecionamos os mesmos isolados utilizados para a quantificação de hemócitos (AM3, AM4, AM8, AM12, AM13, AM15, AMI3, AMI4, AMI8, AMI11, AMI16, AMI17, CL2, CL3, CL7, CL13, CL15 e CL21). Vinte larvas de *T. molitor* foram infectadas com os isolados de *C. albicans* citados anteriormente. A coleta da hemolinfa foi realizada 2 e 24 horas após a infecção das larvas de *T. molitor* com os isolados de *C. albicans* seguindo metodologia descrita no tópico anterior. A hemolinfa coletada foi adicionada em microtubos contendo solução de IPS suplementada com anticoagulante, na proporção de 1:10. Cem microlitros da suspensão foram adicionados a placa de 96 poços e realizada a leitura dos resultados em espectrofotômetro a 405nm (PERINI et al., 2019). Esta avaliação foi realizada em dois tempos experimentais (2-24 horas).

### **5.12- Análises estatísticas**

Os dados gerados pelos experimentos foram analisados com o auxílio do programa GraphPad Prism 5. O teste de biofilme foi analisado estatisticamente pelo teste One-way ANOVA, com a posteriori de Tukey, sendo que os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . As curvas de sobrevivência dos testes com *T. molitor* foram construídas e analisadas através do método de Keplén Meier e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste de Log Rank. O resultado foi considerado significativo quando  $p < 0,05$ .

## 6- Resultados

Os resultados obtidos após a realização dos testes de virulência e resistência com os isolados clínicos e ambientais de *C. albicans* estão descritos nos tópicos abaixo.

### 6.1- Termotolerância

Os isolados clínicos e ambientais de *C. albicans* foram submetidos a diferentes temperaturas com o objetivo de avaliar sua capacidade de crescimento. Passado o período experimental, foi possível observar que a maioria dos isolados clínicos testados (73%) apresentaram crescimento (++) até 45°C. Cem por cento dos isolados ambientais com baixa influência antrópica, apresentaram crescimento similar aos isolados clínicos até a faixa de temperatura de 40°C (++) . No entanto, quando testados na temperatura de 45°C, 75% dos isolados ambientais apresentaram crescimento inferior (+) ao apresentado pelos isolados clínicos. Quatro isolados ambientais com baixa influência antrópica não apresentaram crescimento na temperatura de 45°C (-). Assim como os isolados ambientais com baixa influência antrópica, 100% dos isolados que foram obtidos em áreas com elevada pressão antrópica apresentaram bom crescimento até a temperatura de 40°C (++) . A partir dos 19 isolados ambientais classificados como oriundos de ambientes com elevada influência antrópica, 42% não apresentaram nenhum grau de crescimento a 45°C. Quando incubados na temperatura de 50°C nenhum dos isolados testados no presente trabalho apresentaram crescimento (Tabela 01).

**Tabela 01** – Termotolerância de isolados ambientais e clínicos de *C. albicans*

<b>Isolados ambientais com baixa influência antrópica</b>						
	<b>25°C</b>	<b>30°C</b>	<b>35°C</b>	<b>40°C</b>	<b>45°C</b>	<b>50°C</b>
AM1	++	++	++	++	+	-
AM2	++	++	++	++	+	-
AM3	++	++	++	++	+	-
AM4	++	++	++	++	+	-
AM5	++	++	++	++	+	-
AM6	++	++	++	++	+	-
AM7	++	++	++	++	+	-
AM8	++	++	++	++	+	-
AM9	++	++	++	++	+	-
AM10	++	++	++	++	+	-
AM11	++	++	++	++	+	-
AM12	++	++	++	++	+	-
AM13	++	++	++	++	-	-
AM14	++	++	++	++	-	-
AM15	++	++	++	++	-	-
AM16	++	++	++	++	-	-
<b>Isolados ambientais com elevada influência antrópica</b>						
AMI1	++	++	++	++	+	-
AMI2	++	++	++	++	+	-
AMI3	++	++	++	++	+	-
AMI4	++	++	++	++	+	-
AMI5	++	++	++	++	+	-
AMI6	++	++	++	++	+	-
AMI7	++	++	++	++	+	-
AMI8	++	++	++	++	+	-
AMI9	++	++	++	++	+	-
AMI10	++	++	++	++	+	-
AMI11	++	++	++	++	+	-
AMI12	++	++	++	++	-	-
AMI13	++	++	++	++	-	-
AMI14	++	++	++	++	-	-
AMI15	++	++	++	++	-	-
AMI16	++	++	++	++	-	-
AMI17	++	++	++	++	-	-
AMI18	++	++	++	++	-	-
AMI19	++	++	++	++	-	-
<b>Isolados clínicos</b>						
CL1	++	++	++	++	++	-
CL2	++	++	++	++	++	-
CL3	++	++	++	++	++	-
CL4	++	++	++	++	++	-
CL5	++	++	++	++	++	-
CL6	++	++	++	++	++	-
CL7	++	++	++	++	++	-
CL8	++	++	++	++	++	-
CL9	++	++	++	++	++	-
CL10	++	++	++	++	++	-
CL11	++	++	++	++	++	-
CL12	++	++	++	++	++	-

CL13	++	++	++	++	++	-
CL14	++	++	++	++	++	-
CL15	++	++	++	++	++	-
CL16	++	++	++	++	++	-
CL17	++	++	++	++	++	-
CL18	++	++	++	++	++	-
CL19	++	++	++	++	++	-
CL20	++	++	++	++	-	-
CL21	++	++	++	++	-	-
CL22	++	++	++	++	-	-
CL23	++	++	++	++	-	-
CL24	++	++	++	++	-	-
CL25	++	++	++	++	-	-
CL26	++	++	++	++	-	-

### Controle

SC5314	++	++	++	++	++	-
--------	----	----	----	----	----	---

\* resultado avaliado de modo visual após 24 horas experimentais. (++) representa crescimento robusto dos isolados no período experimental, (+) indica crescimento intermediário e (-) indica ausência de crescimento dos isolados avaliados.

## 6.2- Análise da morfogênese de isolados de *C. albicans*

Para avaliar a capacidade de filamentação dos isolados clínicos e ambientais de *C. albicans* foram utilizados três diferentes meios de cultura (SPIDER, SLAD e LEE). Os isolados clínicos CL1, CL3, CL4, CL5, CL7, CL8, CL10, CL11, CL13, CL15, CL16, CL17, CL18, CL19, CL20, CL21, CL22, CL23, CL24 e CL25 (77%) apresentaram robusta filamentação ao redor da colônia, com longos prolongamentos a partir da borda da colônia em meio SPIDER (Figura 03). O isolado CL6 apresentou colônia rugosa, diferente de todos os outros isolados avaliados no estudo, os quais apresentaram colônias lisas (Figura 03). Este mesmo isolado (CL6) apresentou menor filamentação do que os isolados citados anteriormente no meio SPIDER. Os isolados CL2, CL9 e CL14 (11%) apresentaram mínima filamentação localizada em alguns pontos ao redor da colônia. Os isolados CL12 e CL 26 (8%) foram os únicos isolados clínicos que não apresentaram filamentação ao redor da colônia no meio SPIDER. No meio SLAD a maioria dos isolados clínicos estudados apresentaram características semelhantes as observadas nos isolados ambientais, com algumas exceções que seguem: os isolados CL1, CL6, CL17 e CL19 apresentaram colônias com menor crescimento e com algumas áreas de filamentação ao redor da colônia.

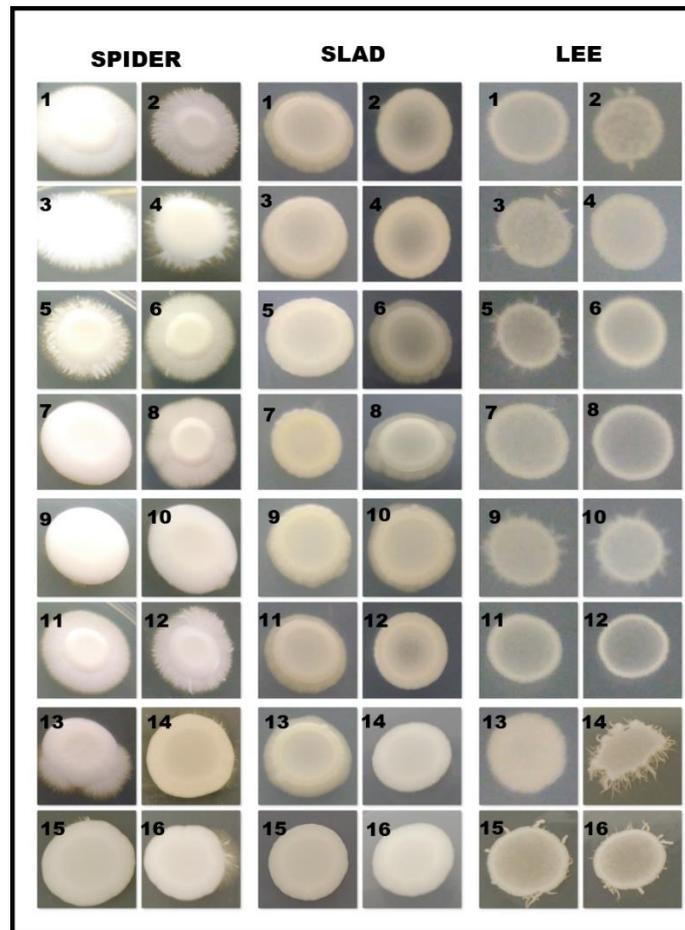
O isolado CL13 apresentou filimentação irregular ao redor da colônia em meio SLAD (Figura 03). Os isolados clínicos quando cultivados em ágar LEE apresentaram menor crescimento e processo de filimentação menos robustos do que o observado nos outros meios. Os isolados CL1, CL2, CL3, CL9 e CL12 não apresentaram nenhum indício de filimentação ao redor da colônia neste meio de cultura (Figura 03). Os isolados ambientais com pouca influência antrópica AM1, AM2, AM3, AM6, AM8 e AM11 (37%) apresentaram colônias lisas e filimentações robustas ao redor das mesmas quando crescidos em ágar SPIDER (Figura 01). Os isolados AM4, AM5, AM12 e AM13 (25%) também apresentaram colônias lisas com filimentação ao redor, porém menos robustas do que quando comparados aos isolados citados anteriormente (Figura 01). Os isolados AM14, AM15 e AM16 (19%) apresentaram mínima filimentação (Figura 01). Já os isolados AM7, AM9 e AM10 (19%) não apresentaram filimentação ao redor das colônias neste meio (Figura 01). No meio SLAD, todos os isolados apresentaram menor crescimento evidenciado no centro da colônia. Os isolados AM1, AM6, AM8, AM10, AM11 e AM13 (37%) apresentaram ao redor da colônia leve sombreado com pequenas hifas no meio SLAD, porém muito menores do que foi observado no meio SPIDER (Figura 01). No ágar LEE, foi observado um menor crescimento das colônias do que quando comparados aos dois meios citados anteriormente. Os isolados AM2, AM3, AM5, AM9, AM10, AM14, AM15, AM16 (50%) apresentaram em poucos pontos ao redor da colônia pequenos filamentos em ágar LEE (Figura 01).

A maioria dos isolados ambientais com alta influência antrópica apresentaram certo nível de filimentação no meio SPIDER como descrito a seguir: os isolados AMI1, AMI4, AMI6, AMI7, AMI9, AMI10, AMI11, AMI12 e AMI14 (47%) apresentaram filimentação robusta ao redor da colônia no meio SPIDER (Figura 02). Os isolados AMI3, AMI5, AMI8, AMI13 e AMI19 (26%) apresentaram filimentação intermediária no meio SPIDER e os isolados AMI2, AMI15, AMI16 e AMI17 (21%) apresentaram baixa filimentação ao redor da colônia (Figura 02). O isolado AMI18 não filamentou em meio SPIDER (Figura 02). Vale salientar que no meio SPIDER os isolados AMI14, AMI15, AMI17 e AMI18 apresentaram colônias rugosas (Figura 02). Da mesma forma que os isolados ambientais obtidos em ambientes com baixa influência antrópica, estes

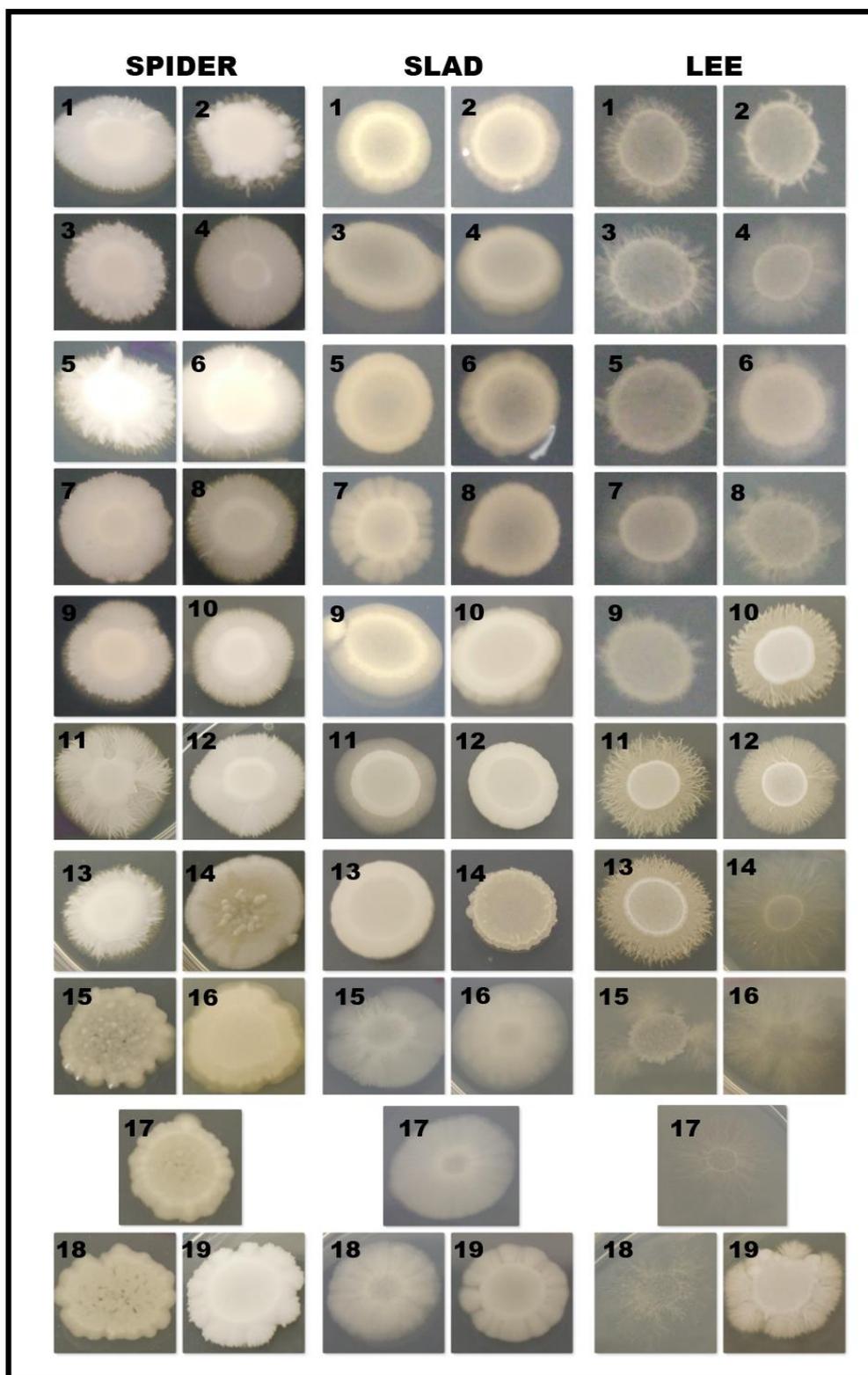
isolados provenientes de ambientes de alta pressão antrópica apresentaram filimentação menos robusta ao redor das colônias no meio SLAD (74%). As exceções a esta afirmação são os isolados AMI7, AMI15, AMI16, AMI17 e AMI18 que apresentaram uma maior taxa de filimentação neste meio (Figura 02). Todos os isolados ambientais com alta influência antrópica apresentaram filamentos ao redor das colônias em meio LEE. Mesmo com a observação do processo de morfogênese neste meio, foi possível verificar um menor crescimento das colônias quando comparados aos outros meios de cultura avaliados (Figura 02). O isolado de *C. albicans* controle (SC5314) apresentou baixa filimentação nos três meios testados, sendo que no meio LEE este isolado apresentou menor crescimento e filimentação (Figura 03).

De maneira geral o meio de cultura SPIDER foi o que apresentou maior capacidade de induzir a filimentação nos isolados testados no presente trabalho (tabela 02 e figuras 01, 02 e 03).

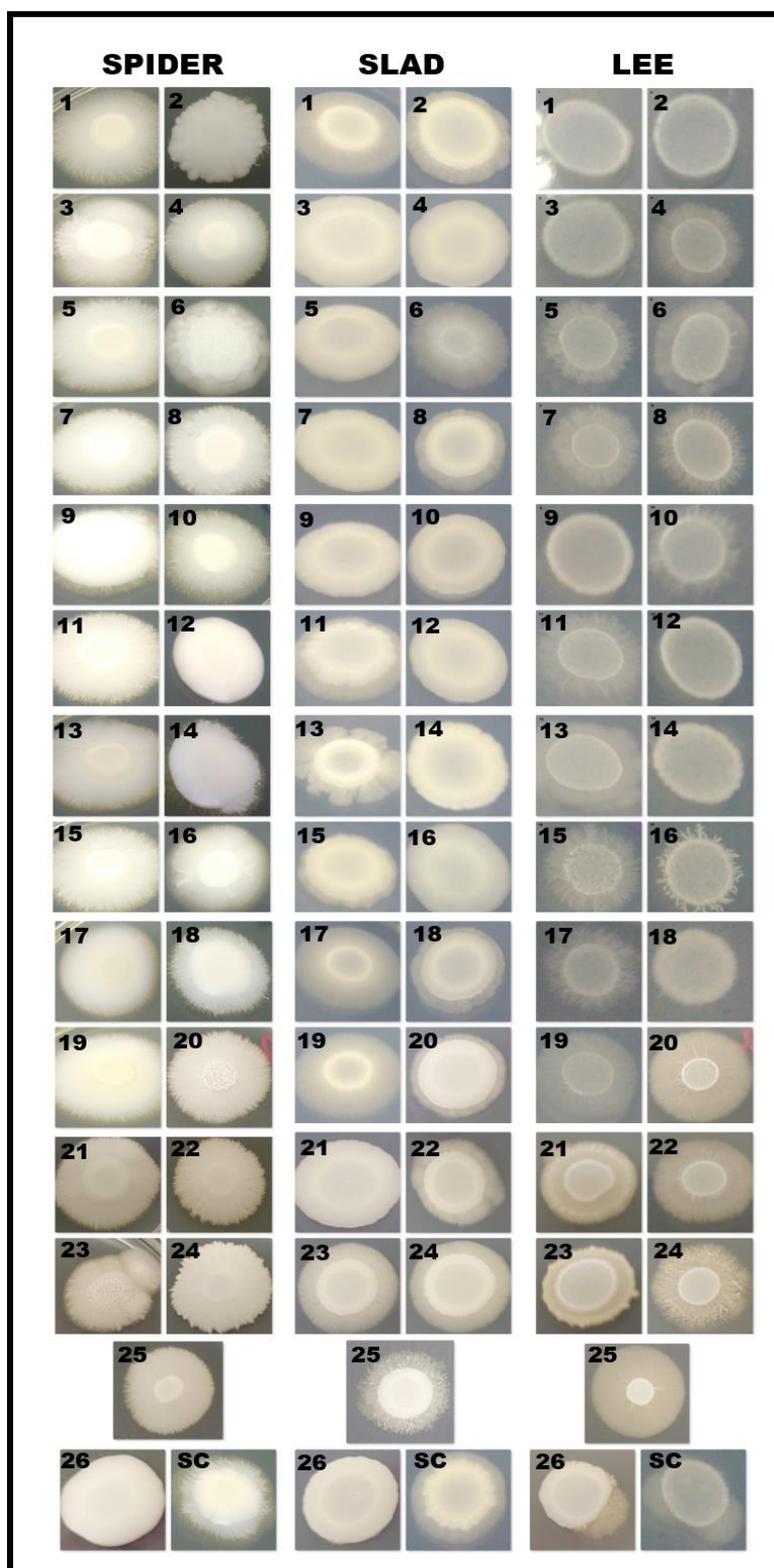
**Figura 01.** Isolados ambientais com baixa influência antrópica submetidos a diferentes meios de cultura indutores de filamentação



**Figura 02.** Isolados ambientais com influência antrópica submetidos a diferentes meios de cultura indutores de filamentação



**Figura 03.** Isolados clínicos submetidos a diferentes meios de cultura indutores de filamentação



**Tabela 02.** Grau de filamentação de isolados ambientais e clínicos de *C. albicans* submetidos aos meios de cultura SPIDER, SLAD e LEE

<b>Isolados ambientais com baixa influência antrópica</b>			
	<b>SPIDER</b>	<b>SLAD</b>	<b>LEE</b>
AM1	+++	+	-
AM2	+++	-	+
AM3	+++	-	+
AM4	++	-	-
AM5	++	-	+
AM6	+++	+	-
AM7	-	-	-
AM8	+++	+	-
AM9	-	-	+
AM10	-	+	+
AM11	+++	+	-
AM12	++	+	-
AM13	++	-	-
AM14	+	-	+
AM15	+	-	+
AM16	+	-	+
<b>Isolados ambientais com elevada influência antrópica</b>			
AMI1	+++	+	+
AMI2	+	+	+
AMI3	++	-	+
AMI4	+++	+	+
AMI5	++	+	+
AMI6	+++	+	+
AMI7	+++	++	+
AMI8	++	+	+
AMI9	+++	+	+
AMI10	+++	+	++
AMI11	+++	+	++
AMI12	+++	-	++
AMI13	++	-	++
AMI14	+++	-	++
AMI15	+	++	+
AMI16	+	++	+
AMI17	+	++	+
AMI18	-	++	+
AMI19	++	++	++
<b>Isolados clínicos</b>			
CL1	+++	++	-
CL2	+	+	-
CL3	+++	+	-
CL4	+++	+	+
CL5	+++	+	+
CL6	++	++	+

CL7	+++	+	+
CL8	+++	+	+
CL9	+	+	-
CL10	+++	+	+
CL11	+++	+	+
CL12	-	+	-
CL13	+++	+	+
CL14	+	+	+
CL15	+++	+	+
CL16	+++	+	+
CL17	+++	++	+
CL18	++	+	+
CL19	+++	++	+
CL20	+++	+	++
CL21	+++	-	++
CL22	+++	+	++
CL23	+++	+	+
CL24	+++	+	++
CL25	+++	++	++
CL26	-	-	+

#### Controle

SC5314	++	+	+
--------	----	---	---

\* resultado avaliado após 7 dias experimentais incubado em estufa 37°C. (+++) representa processo de filamentação robusto dos isolados no período experimental, (++) indica filamentação intermediária (+) indica baixa filamentação e (-) indica ausência de filamentação dos isolados avaliados.

#### 6.4- Determinação da atividade da fosfolipase

A avaliação da atividade da enzima fosfolipase mostrou que a maioria dos isolados clínicos (65%) e ambientais (81% AM e 63% AMI) foram capazes de produzir a enzima fosfolipase. Dentre os produtores, 19% dos os isolados AM (AM9, AM10, AM12), 16% dos isolados AMI (AMI3, AMI4, AMI6) e 23% dos isolados CL (CL3, CL5, CL9, CL13, CL16 e CL17) foram fortemente produtores (++) desta enzima (Tabela 03). Já os isolados AM7, AM8, AM13, AMI10, AMI12, AMI13, AMI14, AMI15, AMI16, AMI18, CL2, CL6, CL11, CL12, CL20, CL21, CL23, CL24, CL26 não produziram a enzima (Tabela 03) nas condições utilizadas no presente trabalho. O isolado SC5314 foi positivo (+) para a produção da enzima fosfolipase (Tabela 03).

**Tabela 03.** Produção da enzima fosfolipase em isolados ambientais e clínicos de *C. albicans*

Isolados ambientais com baixa influência antrópica	
	Fosfolipase
AM1	+
AM2	+
AM3	+
AM4	+
AM5	+
AM6	+
AM7	-
AM8	-
AM9	++
AM10	++
AM11	+
AM12	++
AM13	-
AM14	+
AM15	+
AM16	+
Isolados ambientais com elevada influência antrópica	
AMI1	+
AMI2	+
AMI3	++
AMI4	++
AMI5	+
AMI6	++
AMI7	+
AMI8	+
AMI9	+
AMI10	-
AMI11	+
AMI12	-
AMI13	-
AMI14	-
AMI15	-
AMI16	-
AMI17	+
AMI18	-
AMI19	+
Isolados Clínicos	
CL1	+
CL2	-
CL3	++
CL4	+
CL5	++
CL6	-

CL7	+
CL8	+
CL9	++
CL10	+
CL11	-
CL12	-
CL13	++
CL14	+
CL15	+
CL16	++
CL17	++
CL18	+
CL19	+
CL20	-
CL21	-
CL22	+
CL23	-
CL24	-
CL25	+
CL26	-

#### Controle

SC5314	+
--------	---

\* os resultados foram avaliados a partir da medida do halo formado ao redor das colônias e cálculo da atividade da fosfolipase (Pz) após 4 dias de incubação em estufa 37°C. (++) indica isolado fortemente positivo para produção de fosfolipase com  $Pz \leq 0,63$ ; (+) indica isolados positivos para produção de fosfolipase com  $Pz < 1$ , (-) indica isolados negativos para produção de fosfolipase com  $Pz = 1$ .

### 6.5- Determinação da atividade da proteinase

O número de isolados produtores de proteinase no presente trabalho foi menor do que dos produtores da enzima fosfolipase, conforme descrito no item anterior. Pode-se observar que 57% dos isolados clínicos, 62% dos isolados ambientais com pouca influência antrópica e 36% dos isolados com elevada influência antrópica, apresentaram atividade da enzima proteinase (Tabela 04). Apenas o controle SC5314 e os isolados AMI12, CL1, CL16, CL20, CL21, CL22, CL25 e CL26 foram fortemente produtores (2+) da enzima proteinase (Tabela 04).

**Tabela 04.** Produção da enzima proteinase em isolados ambientais e clínicos de *C. albicans*

<b>Isolados ambientais com baixa influência antrópica</b>	
	<b>Proteinase</b>
AM1	1+
AM2	-
AM3	1+
AM4	-
AM5	1+
AM6	-
AM7	1+
AM8	-
AM9	1+
AM10	1+
AM11	-
AM12	1+
AM13	-
AM14	1+
AM15	1+
AM16	1+
<b>Isolados ambientais com elevada influência antrópica</b>	
AMI1	-
AMI2	1+
AMI3	-
AMI4	1+
AMI5	1+
AMI6	1+
AMI7	-
AMI8	1+
AMI9	-
AMI10	-
AMI11	-
AMI12	2+
AMI13	1+
AMI14	-
AMI15	-
AMI16	-
AMI17	-
AMI18	-
AMI19	-
<b>Isolados Clínicos</b>	
CL1	2+
CL2	1+
CL3	1+
CL4	-
CL5	-
CL6	-

CL7	1+
CL8	1+
CL9	1+
CL10	-
CL11	-
CL12	1+
CL13	-
CL14	1+
CL15	1+
CL16	2+
CL17	-
CL18	-
CL19	-
CL20	2+
CL21	2+
CL22	2+
CL23	-
CL24	-
CL25	2+
CL26	2+

#### Controle

SC5314	2+
--------	----

\* os resultados foram avaliados a partir da medida do halo formado ao redor das colônias após 7 dias de incubação em estufa 28°C. (2+) indica elevada proteólise ao redor da colônia (3-5 mm); (1+) indica proteólise intermediária (1-2 mm), (-) indica proteólise negativa.

### 6.6- Ensaio de formação de biofilme

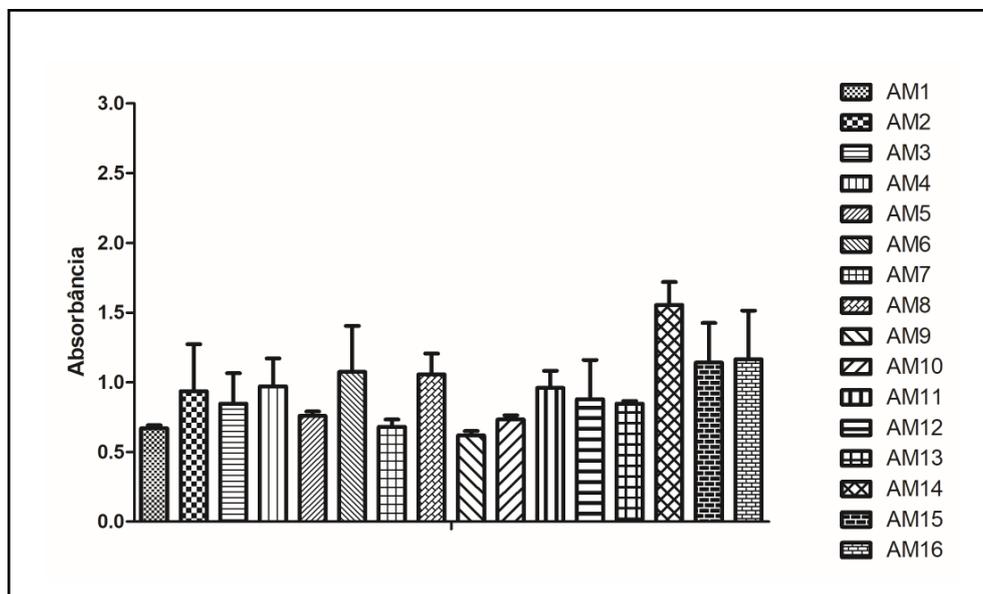
O ensaio de formação de biofilme foi realizado seguindo metodologia que avalia a formação do biofilme total. Pode-se observar no presente trabalho que 54% dos isolados clínicos testados para produção de biofilme apresentaram densidade óptica superior a 1. Sendo que, o isolado CL6 foi o que apresentou maior formação de biofilme apresentando diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com a maioria dos isolados clínicos (exceto CL20, CL22, CL23, CL24, CL25 e CL 26) e com todos os isolados ambientais. O isolado CL20 apresentou, de maneira significativa, maior produção de biofilme quando comparado aos isolados CL12 e CL13. Os isolados CL22, CL24 e CL25 também foram significativamente maiores produtores de biofilme do que o isolado CL13. O isolado CL13 apresentou menor formação de biofilme quando comparado aos outros isolados testados, com DO de aproximadamente 0,5 (Figura 06). Os

isolados CL6, CL20, CL22, CL23, CL24, CL25 e CL26 apresentaram diferença significativa na produção do biofilme quando comparados ao controle SC5314.

Os isolados ambientais com pouca influência antrópica apresentaram, de maneira geral, baixa formação de biofilme sendo que apenas 31% deles tiveram DO superior a 1 (isolados AM6, AM8, AM14, AM15, AM16) como apresentado na figura 04. Também não houve diferença estatística na comparação da produção de biofilme dos isolados AM em relação ao controle SC5314.

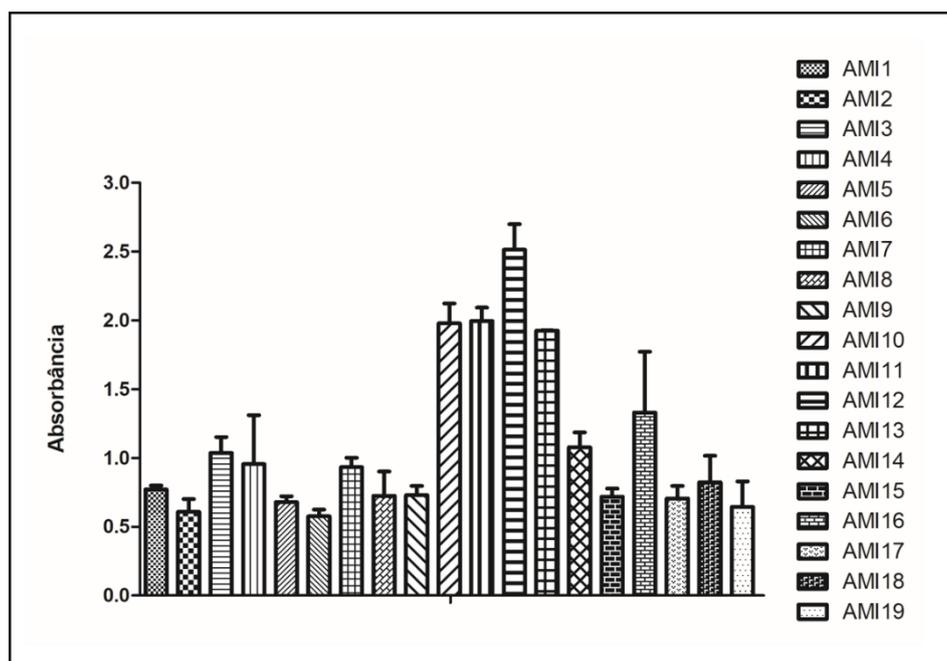
Os isolados ambientais obtidos de fontes expostas a forte influência antrópica apresentaram, de maneira geral, produção de biofilme similar aos isolados ambientais de baixa influência e inferior quando comparados aos isolados clínicos, sendo que apenas 37% dos isolados deste grupo experimental apresentaram DO superior a 1 (Figura 05). Os isolados AMI10, AMI11, AMI12 e AMI13 apresentaram significativa produção de biofilme quando comparados aos isolados AMI1, AMI2, AMI3, AMI4, AMI5, AMI6, AMI7, AMI8, AMI9, AMI15, AMI17, AMI18 e AMI19. Além dos isolados mencionados anteriormente, AMI12 também apresentou produção de biofilme superior aos isolados AMI14 e AMI16 (Figura 01). Apenas os isolados AMI10, AMI11, AMI12 e AMI13 apresentaram diferença significativa na formação de biofilme quando comparados ao controle SC5314. Quando foi realizada a comparação entre grupos, foram observadas diferenças significativa pontuais entre diversos isolados. Vale destacar os isolados AMI12, CL6, CL20, CL22, CL23, CL24, CL25 e CL26 que por terem sido os maiores produtores de biofilme, quando comparados aos isolados de outros grupos experimentais, apresentavam, por muitas vezes, diferenças estatísticas significativas nos valores de absorvância.

**Figura 04.** Produção de biofilme em isolados ambientais com baixa influência antrópica de *C. albicans*.



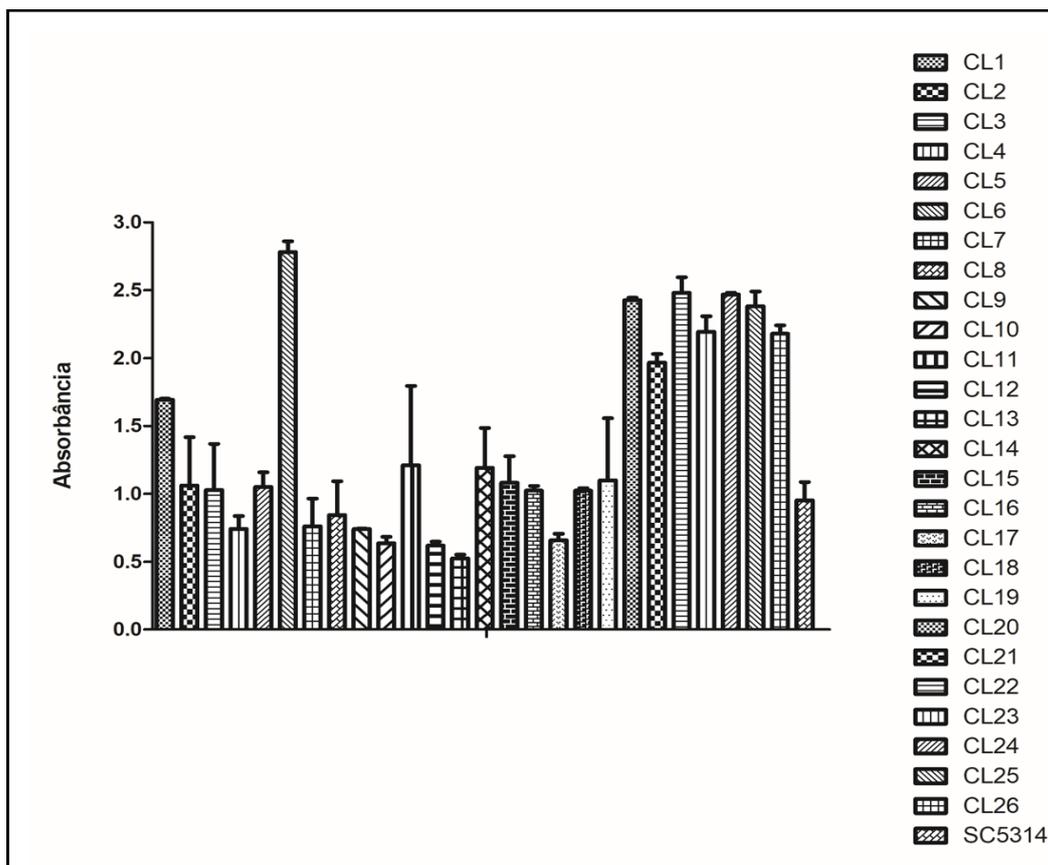
\*Leitura realizada a 530nm. Não houve diferença significativa entre os isolados

**Figura 05.** Produção de biofilme em isolados ambientais com alta influência antrópica de *C. albicans*.



\*Leitura realizada a 530nm. Houve diferença estatística entre alguns isolados

**Figura 06.** Produção de biofilme em isolados clínicos de *C. albicans*.



\*Leitura realizada a 530nm. Houve diferença estatística entre alguns isolados

### 6.7- Determinação da concentração inibitória mínima

A concentração inibitória mínima dos antifúngicos foi determinada a partir do teste de microdiluição. Os isolados clínicos apresentaram diferentes resultados nesta análise de susceptibilidade: 11 isolados foram resistentes ao fluconazol (42%) e 16 ao itraconazol (61%), sendo que 10 deles apresentaram resistência as duas drogas azólicas (CL1, CL4, CL5, CL10, CL12, CL14, CL18, CL23, CL24, CL26) conforme pode ser observado na tabela 5. Os isolados clínicos testados que não apresentaram resistência aos azóis também apresentaram o fenômeno *trailing*. Nenhum dos isolados clínicos testados apresentou resistência a anfotericina B (Tabela 05). Os resultados obtidos mostram que a maioria dos isolados ambientais com baixa influência antrópica

(AM) foram sensíveis aos três antifúngicos testados. Porém, durante a leitura dos resultados observamos o fenômeno *trailing* nos testes com fluconazol e itraconazol, sendo possível observar células persistentes em todas as concentrações testadas dos antifúngicos (Tabela 05). Interessantemente, apenas os três isolados provenientes da Amazônia, pertencentes ao grupo de isolados ambientais com baixa influência antrópica, foram resistentes ao fluconazol e ao itraconazol (19%). Sessenta e oito por cento dos isolados ambientais coletados em ambiente de forte pressão antrópica apresentaram resistência ao fluconazol, com CIM maior que 64 µg/mL, 26% apresentaram susceptibilidade dose dependente a este antifúngico (CIM 4 µg/mL) e apenas um isolado foi sensível (Tabela 05). A maioria destes isolados oriundos de ambientes antropizados também apresentaram resistência ao itraconazol (84% dos isolados) (CIM $\geq$ 1) e 16% apresentaram susceptibilidade dose dependente (CIM 0,25-0,5). Além disto, 4 isolados ambientais coletados em ambiente com alta influência antrópica apresentaram resistência a anfotericina B (21%) (AMI15, AMI16, AMI17, AMI18). Quanto a susceptibilidade ao epoxiconazol a grande maioria dos isolados testados apresentou CIM com valores superiores a 4 µg/mL em todos os grupos experimentais. A maior parte dos isolados clínicos (65%) apresentou CIM para epoxiconazol de 32 µg/mL, 31% apresentou CIM de 0,125 µg/mL e 4% de 16 µg/mL. Assim como os isolados clínicos, os isolados ambientais com baixa influência antrópica apresentaram a maior parte de seus isolados com CIM de 32 µg/mL (56%), 38% tiveram CIM de 0,125 µg/mL e 6% CIM de 8 µg/mL para epoxiconazol. Os isolados ambientais com alta influência antrópica apresentaram os seguintes valores de CIM: 32 µg/mL (33%), 0,125 µg/mL (37%), 16 µg/mL (10%), 4 µg/mL (10%) e 2 µg/mL (10%). É importante salientar que todos os isolados avaliados, mesmo àqueles com valores baixos de CIM para epoxiconazol, apresentavam em algum grau o fenômeno *trailing*. Não existe na literatura pontos de corte para as concentrações de epoxiconazol, já que este antifúngico é empregado na agricultura.

**Tabela 05.** Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos antifúngicos fluconazol, itraconazol, anfotericina B e epoxiconazol em isolados ambientais e clínicos de *C. albicans*.

<b>Isolados ambientais com baixa influência antrópica</b>				
	<b>Fluconazol</b>	<b>Itraconazol</b>	<b>Anfotericina B</b>	<b>Epoxiconazol</b>
<b>AM1</b>	0,25	0,125	0,25	32
<b>AM2</b>	0,25	0,125	0,25	32
<b>AM3</b>	0,25	0,125	0,25	32
<b>AM4</b>	0,25	0,03	0,25	0,125
<b>AM5</b>	0,25	0,06	0,25	32
<b>AM6</b>	0,25	0,03	0,25	0,125
<b>AM7</b>	0,25	0,03	0,25	32
<b>AM8</b>	0,25	0,06	0,25	0,125
<b>AM9</b>	0,25	0,06	0,25	0,125
<b>AM10</b>	0,25	0,06	0,25	8
<b>AM11</b>	0,125	0,125	0,25	0,125
<b>AM12</b>	0,125	0,06	0,25	32
<b>AM13</b>	1	0,06	0,25	0,125
<b>AM14</b>	$\geq 64$	$\geq 16$	0,5	32
<b>AM15</b>	$\geq 64$	$\geq 16$	1	32
<b>AM16</b>	$\geq 64$	$\geq 16$	1	32
<b>Isolados ambientais com elevada influência antrópica</b>				
<b>AMI1</b>	$\geq 64$	$\geq 16$	0,5	0,125
<b>AMI2</b>	$\geq 64$	$\geq 16$	1	0,125
<b>AMI3</b>	$\geq 64$	$\geq 16$	0,5	0,125
<b>AMI4</b>	$\geq 64$	$\geq 16$	0,5	0,125
<b>AMI5</b>	$\geq 64$	$\geq 16$	0,5	32
<b>AMI6</b>	$\geq 64$	$\geq 16$	0,5	32
<b>AMI7</b>	$\geq 64$	$\geq 16$	1	16
<b>AMI8</b>	$\geq 64$	$\geq 16$	0,5	32
<b>AMI9</b>	$\geq 64$	$\geq 16$	0,5	0,125
<b>AMI10</b>	32	$\geq 16$	0,5	16
<b>AMI11</b>	32	$\geq 16$	0,5	32
<b>AMI12</b>	32	$\geq 16$	0,5	32
<b>AMI13</b>	$\geq 64$	$\geq 16$	0,5	32
<b>AMI14</b>	4	1	1	0,125
<b>AMI15</b>	4	0,25	2	4
<b>AMI16</b>	4	$\geq 16$	2	2
<b>AMI17</b>	4	2	2	2
<b>AMI18</b>	4	0,5	2	4
<b>AMI19</b>	2	0,5	1	0,125
<b>Isolados Clínicos</b>				
<b>CL1</b>	$\geq 64$	$\geq 16$	0,5	32
<b>CL2</b>	0,5	$\geq 16$	0,5	0,125
<b>CL3</b>	0,5	$\geq 16$	0,5	16
<b>CL4</b>	$\geq 64$	$\geq 16$	0,5	32

CL5	≥64	≥16	0,5	32
CL6	1	0,25	1	32
CL7	0,5	0,25	0,5	0,125
CL8	2	≥16	0,5	32
CL9	0,5	0,125	0,25	0,125
CL10	≥64	≥16	0,25	32
CL11	0,5	0,125	0,25	0,125
CL12	≥64	≥16	0,5	32
CL13	2	0,25	0,25	0,125
CL14	≥64	≥16	0,25	32
CL15	1	0,25	0,25	0,125
CL16	1	0,25	0,5	32
CL17	1	≥16	0,25	32
CL18	16	≥16	0,25	32
CL19	0,5	0,125	0,25	0,125
CL20	1	≥16	0,25	32
CL21	2	≥16	0,5	32
CL22	8	0,06	1	32
CL23	≥64	≥16	0,25	32
CL24	32	≥16	0,25	32
CL25	0,25	0,06	0,5	0,125
CL26	≥64	≥16	0,5	32

#### Controle

SC5314	0,25	0,125	0,25	32
--------	------	-------	------	----

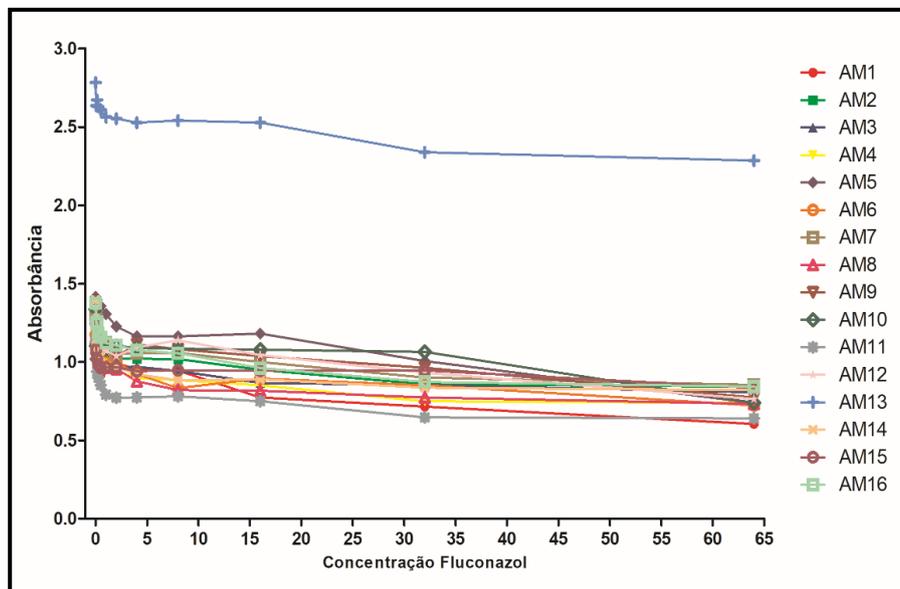
\* os resultados foram avaliados de modo visual e considerado CIM para azóis o poço que apresentava 90% de inibição e para anfotericina B 100% de inibição. Isolados que apresentaram valores de CIM iguais ou inferiores a 2µg/mL são considerados sensíveis (S) ao tratamento com fluconazol, valores de 4 µg/mL são considerados com susceptibilidade dose dependente (SDD) e valores iguais ou acima de 8 µg/mL são considerados resistentes para este antifúngico (CLSI, 2020). Para itraconazol: S: ≤0,12 µg/mL, SDD: 0,25-0,5; R: ≥1 (CLSI, 2008). Para anfotericina B – S: ≤1 µg/mL; R: ≥2 µg/mL (CLSI, 2018). \*\* Não existem valores de corte para avaliação do grau de sensibilidade ao Epoxiconazol, já que este azólico é de uso agrícola

### 6.8- Susceptibilidade do biofilme formado à antifúngicos

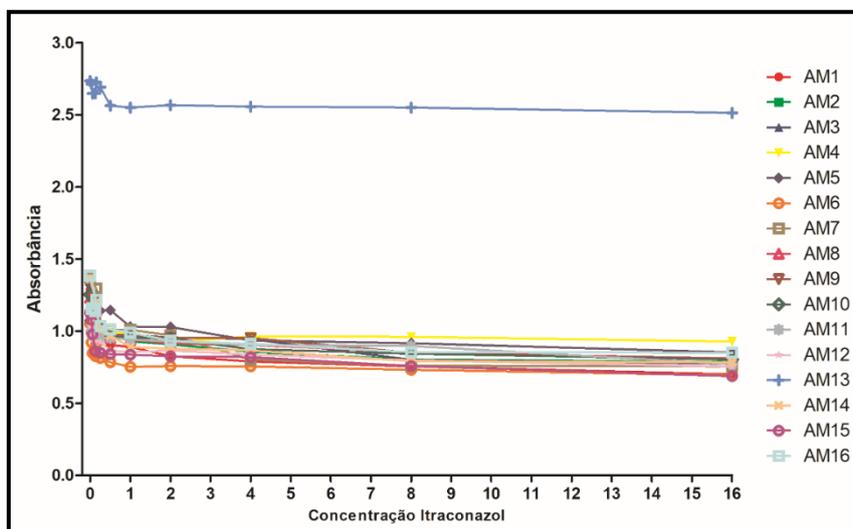
O experimento de avaliação da susceptibilidade à antifúngicos em biofilmes de isolados de *C. albicans* mostrou que esta estrutura fúngica é menos sensível aos antifúngicos do que as células planquitônicas. No gráfico gerado com os valores do experimento podemos observar na concentração 0 a DO do biofilme sem nenhum tratamento antifúngico, o que representa o controle experimental negativo. Os isolados CL6, AM13, AMI16 e SC5314 foram os isolados que apresentaram maior DO no controle negativo (Figuras 7-15). A produção de biofilme nos isolados clínicos apresentou DO superior a 1 no controle negativo em 96% dos isolados (Figuras 13-15). As leveduras com baixa influência antrópica apresentaram DO superior a 1 em 56% dos isolados (Figuras 7-9). Já as leveduras isoladas de ambientes com alta influência antrópica

apresentaram DO superior a 1 em 84% dos casos antes de serem expostas aos antifúngicos (Figuras 10-12). Foi possível observar, de maneira geral, que não houve grandes variações na absorvância dos biofilmes conforme a concentração dos antifúngicos aumentava. Porém, alguns isolados, diferente do que foi afirmado anteriormente, apresentaram uma redução considerável no biofilme conforme o aumento na concentração do antifúngico. No grupo AM, o isolado 13 quando exposto a anfotericina B mostrou uma expressiva redução no seu biofilme, principalmente a partir da concentração de 0,125 µg/mL do antifúngico (figura 09). A maior concentração de anfotericina B (8 µg/mL), reduziu pela metade a absorvância do isolado AM13 passando de aproximadamente 2,5 (controle negativo) para 1,08. No grupo AMI os isolados AMI16, AMI17 e AMI18 foram os que apresentaram maior redução na leitura da absorvância após aumento na concentração de fluconazol (Figura 10). O isolado AMI18 também mostrou uma redução considerável no biofilme com o aumento das concentrações de itraconazol e anfotericina B. Vale destacar que as reduções observadas em AMI18 já se mostram acentuadas nas concentrações mais baixas dos antifúngicos (figura 11 e 12). Os isolados clínicos CL6, CL24 e CL26 foram os que apresentaram acentuadas reduções no biofilme após tratamento com anfotericina B (figura 15). O isolado CL6 também apresentou este comportamento quando submetido a crescentes concentrações de fluconazol (figura 13). Outro ponto importante observado com este experimento é o efeito similar na redução do biofilme dos grupos experimentais quando expostos ao fluconazol e ao itraconazol (figuras 07, 08, 10, 11, 13 e 14). É visível também que o antifúngico anfotericina B apresentou, em todos os grupos experimentais, uma capacidade maior de redução do biofilme do que quando comparado aos outros antifúngicos utilizados (figuras 09, 12 e 15).

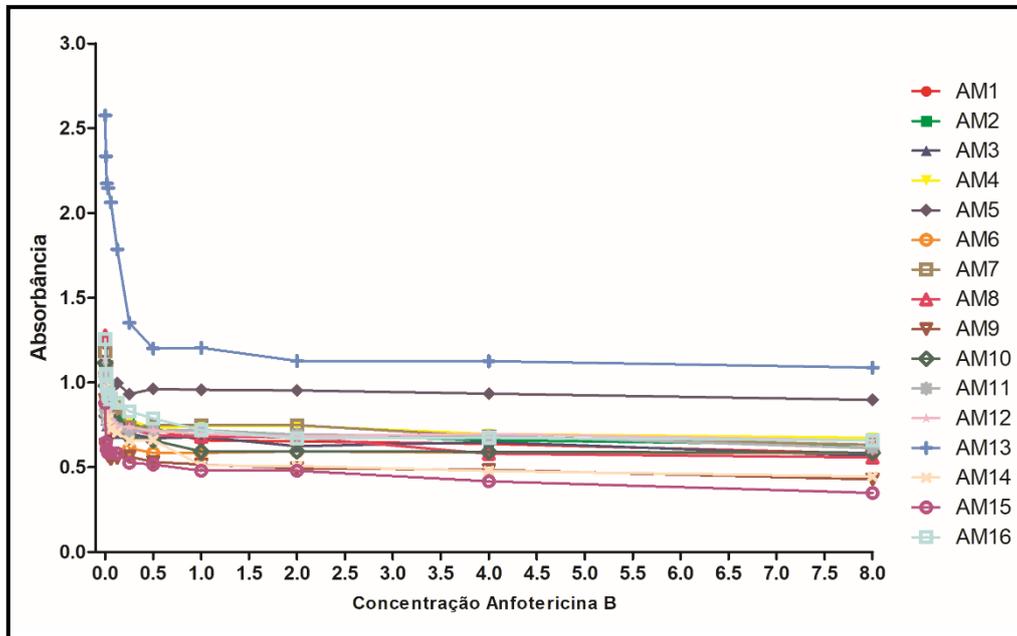
**Figura 07.** Susceptibilidade do biofilme formado de isolados ambientais com baixa influência antrópica ao fluconazol



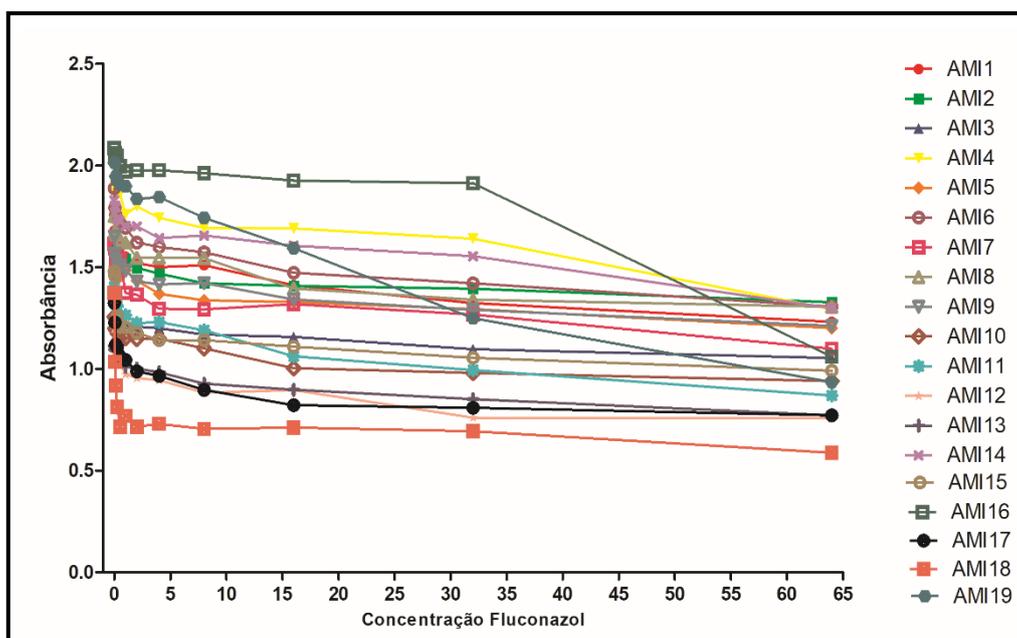
**Figura 08.** Susceptibilidade do biofilme formado de isolados ambientais com baixa influência antrópica ao itraconazol



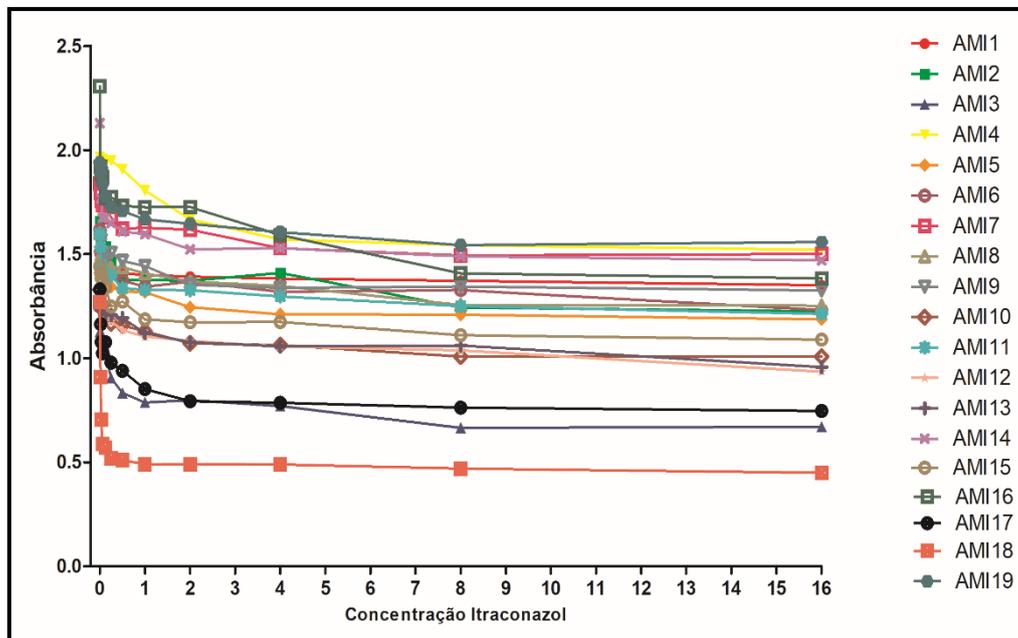
**Figura 09.** Susceptibilidade do biofilme formado de isolados ambientais com baixa influência antrópica a anfotericina B



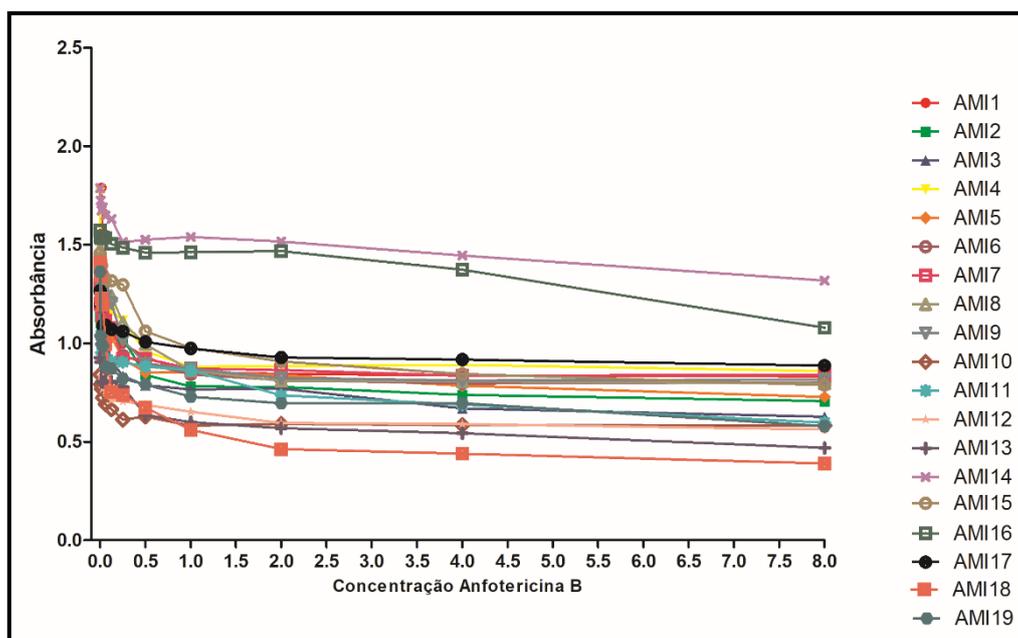
**Figura 10.** Susceptibilidade do biofilme formado de isolados ambientais com alta influência antrópica ao fluconazol



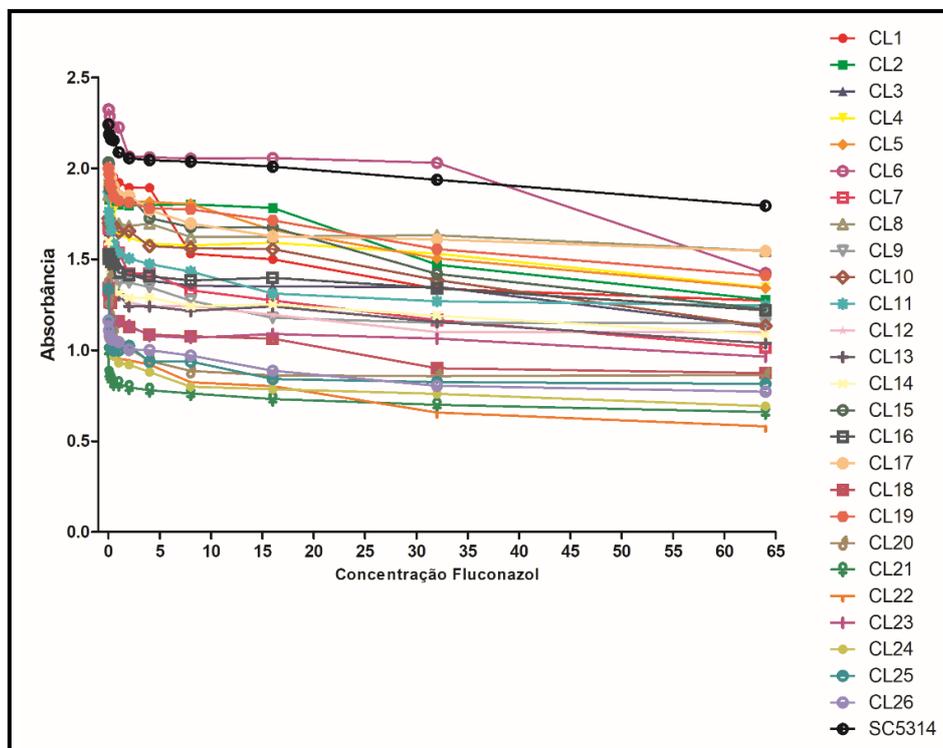
**Figura 11.** Susceptibilidade do biofilme formado de isolados ambientais com alta influência antrópica ao itraconazol



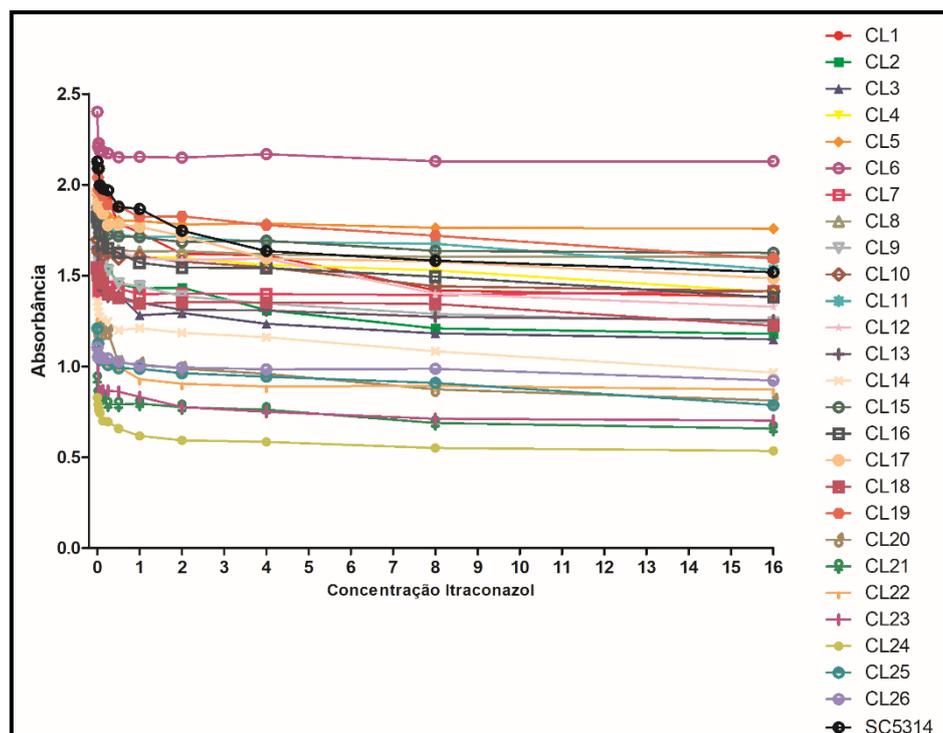
**Figura 12.** Susceptibilidade do biofilme formado de isolados ambientais com alta influência antrópica a anfotericina B



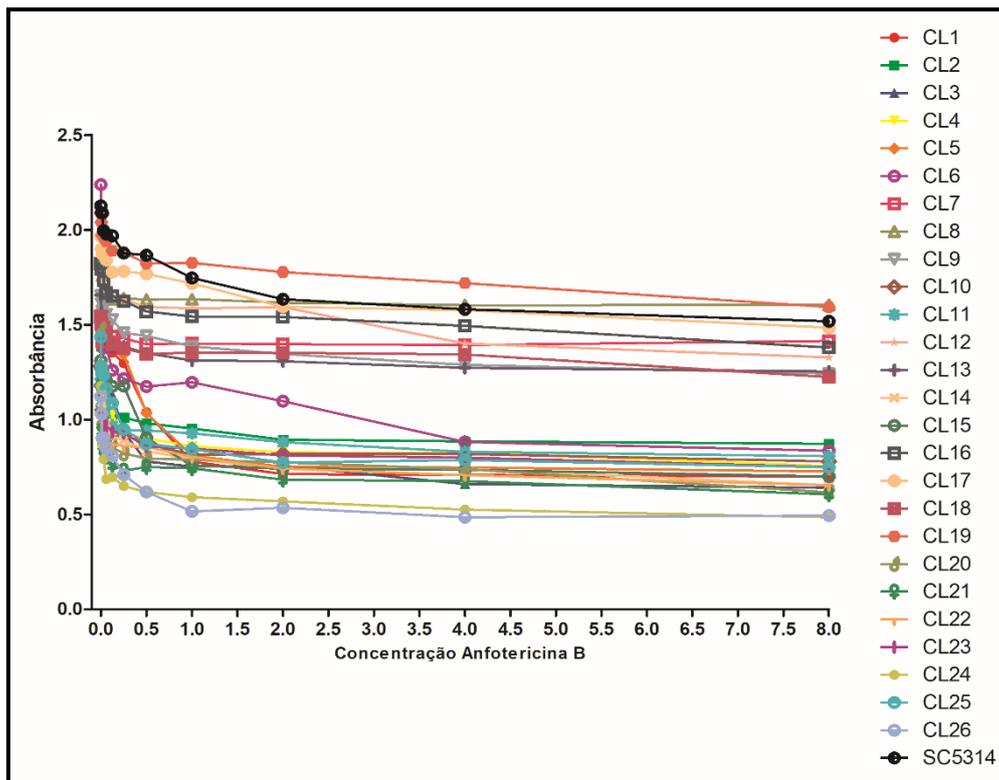
**Figura 13.** Susceptibilidade do biofilme formado de isolados clínicos ao fluconazol



**Figura 14.** Susceptibilidade do biofilme formado de isolados clínicos ao itraconazol



**Figura 15.** Susceptibilidade do biofilme formado de isolados clínicos a anfotericina B

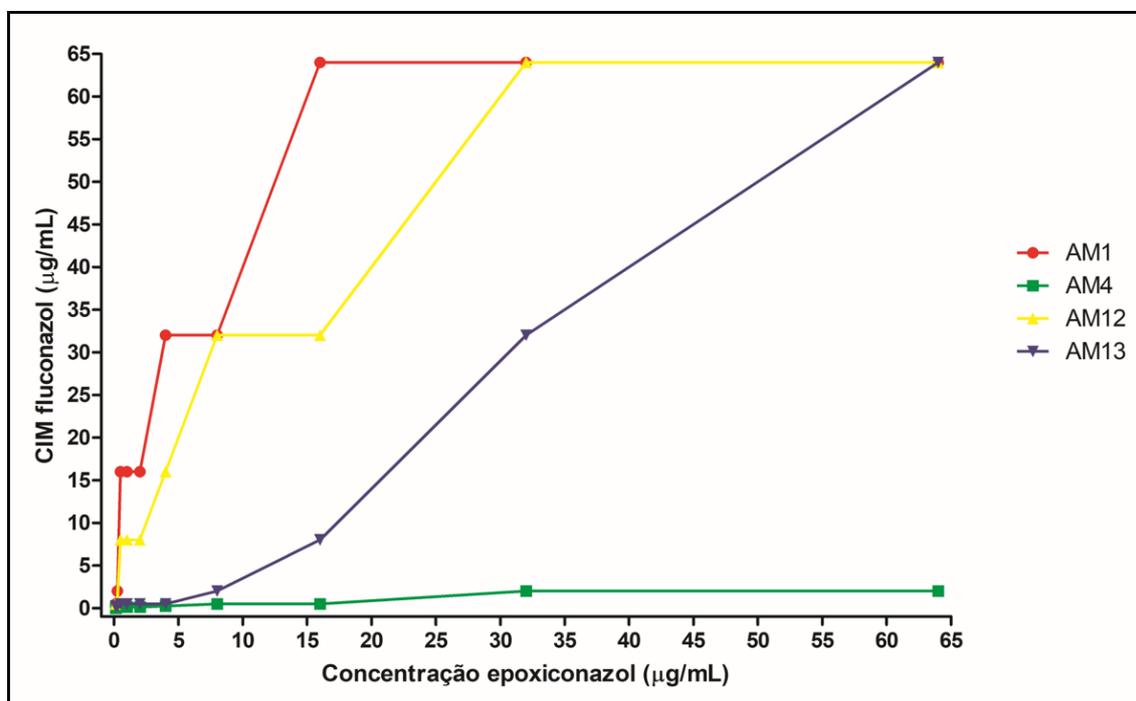


### 6.9- Indução da resistência

O uso de antifúngicos na agricultura levanta a questão da possibilidade da emergência de resistência cruzada em leveduras presentes nestes ambientes. Por isso, nosso trabalho avaliou a capacidade do antifúngico agrícola epoxiconazol induzir a resistência ao fluconazol em isolados ambientais de *C. albicans*. Todos os quatro isolados testados no experimento de indução da resistência apresentaram tendência de aumento da CIM ao fluconazol conforme a concentração de epoxiconazol a qual eram expostos aumentava. O isolado AM4 apresentou um aumento nos valores do CIM para fluconazol após a exposição a 8  $\mu\text{g/mL}$  de epoxiconazol (Figura 16). Já os isolados AM1, AM12 e AM13 apresentaram aumento do CIM para fluconazol após exposição a baixas concentrações de epoxiconazol (Figura 16). O isolado AM1 quando exposto a concentrações de 0,25  $\mu\text{g/mL}$  de epoxiconazol teve um aumento no CIM para fluconazol de 0,5  $\mu\text{g/mL}$  para 2  $\mu\text{g/mL}$ . O isolados AM12 teve aumento do CIM para fluconazol de 1  $\mu\text{g/mL}$  para 8  $\mu\text{g/mL}$  quando exposto a concentração de 0,5

$\mu\text{g/mL}$ . O isolado AM13 dobrou seu CIM para fluconazol, passando de 0,25  $\mu\text{g/mL}$  para 0,5  $\mu\text{g/mL}$ , quando exposto a 0,5  $\mu\text{g/mL}$  de epoxiconazol. Ao final do experimento os isolados AM1, AM12 e AM13 apresentaram CIM para fluconazol  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ , ou seja, a exposição ao epoxiconazol fez com que estes isolados ficassem resistentes ao tratamento com o antifúngico utilizado para tratamento clínico. O isolado AM4 também apresentou aumento nos valores do CIM para fluconazol conforme aumentava-se a exposição ao epoxiconazol, porém este isolado apresentou um valor de CIM considerado ainda sensível ao fluconazol (2  $\mu\text{g/mL}$ ).

**Figura 16.** Indução da resistência de isolados ambientais de *C. albicans*



#### 6.10- Ensaio de virulência dos isolados de *C. albicans* em modelo hospedeiro invertebrado *Tenebrio molitor*

Os isolados de *C. albicans* do presente estudo foram submetidos a ensaio de virulência em modelo invertebrado de *T. molitor*. Ao inocularmos as larvas de *T. molitor* com diferentes concentrações de *C. albicans* SC5314, vimos que a concentração de  $1 \times 10^5$  cel/ $5 \mu\text{L}$  foi a que possibilitou observarmos a

letalidade dentro do período experimental pré-estabelecido, portanto esta foi a concentração escolhida para a sequência dos experimentos com os outros isolados. Como é possível observar nas figuras 17, 18 e 19, a taxa de letalidade entre os grupos foi diferente nas primeiras 24 horas experimentais. Quando calculamos a média entre os isolados de cada grupo e comparamos estatisticamente, notamos que os isolados ambientais com baixa influência antrópica foram significativamente mais letais nas primeiras 24 horas experimentais ( $p=0,0336$ ) que os demais grupos de isolados testados. Esta diferença não se manteve no decorrer do período experimental. No entanto, não houve diferença estatística quando comparamos os isolados clínicos com os ambientais com alta influência antrópica nas primeiras 24 horas experimentais.

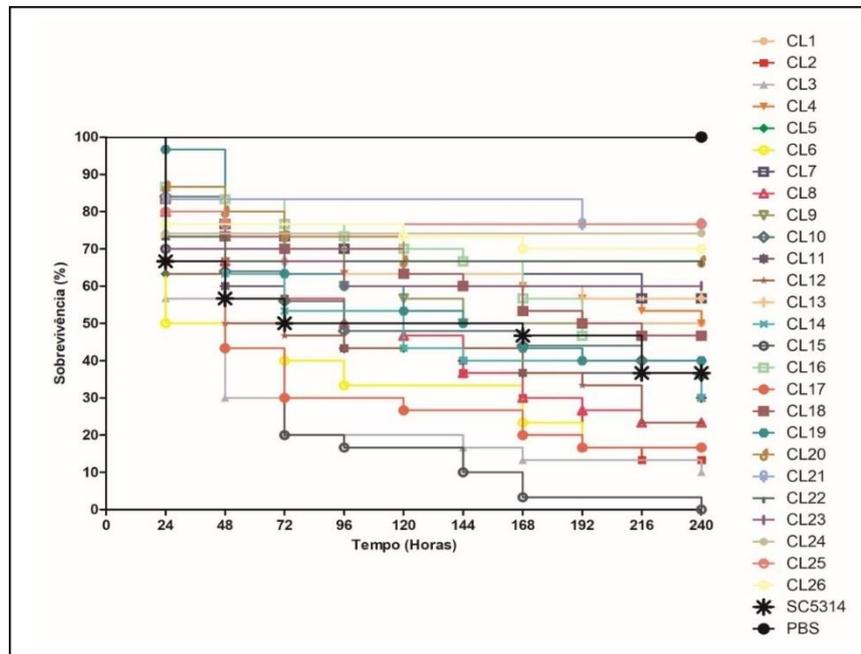
Analisando as figuras é possível observar que 65% dos isolados clínicos apresentaram virulência superior a 50% até o final do experimento, sendo que 24% destes foram letais para mais de 80% das larvas. Os isolados CL3 e CL15 apresentaram as maiores porcentagens de letalidade, 90 e 100% respectivamente, apresentando diferenças significativas ( $p=0,01$  e  $p=0,001$  respectivamente) na sua sobrevivência quando comparados com o controle positivo de *C. albicans* SC5314. A taxa de morte de *T. molitor* infectados com os isolados clínicos nas primeiras 24 horas experimentais oscilou entre 3-50% e ao final do experimento a letalidade variou entre 45-100%. CL3 foi letal para aproximadamente 45% das larvas nas primeiras 24 horas experimentais e CL15 matou cerca de 30% no mesmo período. Após 72 horas os isolados CL3 e CL15 já tinham matado cerca de 80% das larvas. Por todo o restante do período experimental o isolado CL15 se destacou em letalidade e acabou matando todas as larvas ao final dos 10 dias. Os isolados CL7, CL13, CL20, CL21, CL22, CL23, CL24, CL25 e CL26 mataram menos de 50% dos isolados ao final do período experimental, já os isolados CL3, CL6, CL8, CL12, CL15 e CL17 foram letais para mais de 75% das larvas (figura 16).

Quanto aos isolados ambientais de baixa influencia antrópica, observou-se que, com exceção dos isolados amazônicos, todos os outros isolados foram letais para mais de 50% das larvas de *T. molitor* até o final do tempo experimental. O isolado AM3 foi letal pra aproximadamente 80% das larvas e apresentou diferença significativa de letalidade quando comparado ao controle

*C. albicans* SC5314, o qual teve letalidade de 63%. Os isolados AM15 e AM16, que são isolados obtidos na Amazônia, foram os que demonstraram menor letalidade do grupo de isolados ambientais com baixa influência antrópica, sendo letais para aproximadamente 30% das larvas ao final do período experimental.

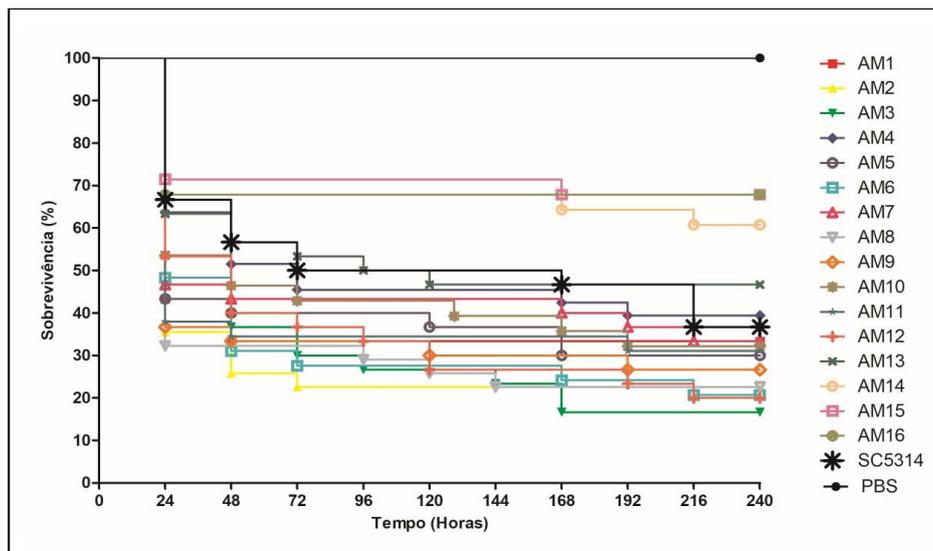
Os isolados ambientais com alta influência antrópica, de modo geral, apresentaram baixa letalidade nas primeiras 24 horas experimentais, variando de 6-53% quando comparados com os isolados de baixa influencia antrópica. Porém ao curso do período experimental notamos um aumento expressivo da letalidade de alguns isolados quando comparada com as primeiras 24 horas experimentais, com destaque para AMI8 e AMI4 que foram letais para 75 e 90% das larvas ao final do período experimental, respectivamente. Destes, o isolado AMI4 se destacou, pois foi significativamente ( $p= 0,0474$ ) mais letal que o controle positivo SC5314. O isolado AMI4 foi letal para aproximadamente 20% das larvas durante as primeiras 24 horas experimentais, porém no decorrer do período experimental este isolado se mostrou mais virulento que os outros, e ao final levou a morte de cerca de 90% das larvas infectadas. Os isolados AMI11, AMI17 e AMI19 apresentaram menor letalidade entre os isolados ambientais com elevada influência antrópica, sendo responsáveis respectivamente pela morte de 27%, 23% e 30% das larvas infectadas. Todos os isolados apresentaram diferença significativa quando comparados com o controle negativo (PBS) ( $p<0,05$ ) (figura 18).

**Figura 17.** Curva de sobrevivência de *T. molitor* submetidos a infecção por isolados clínicos de *C. albicans*



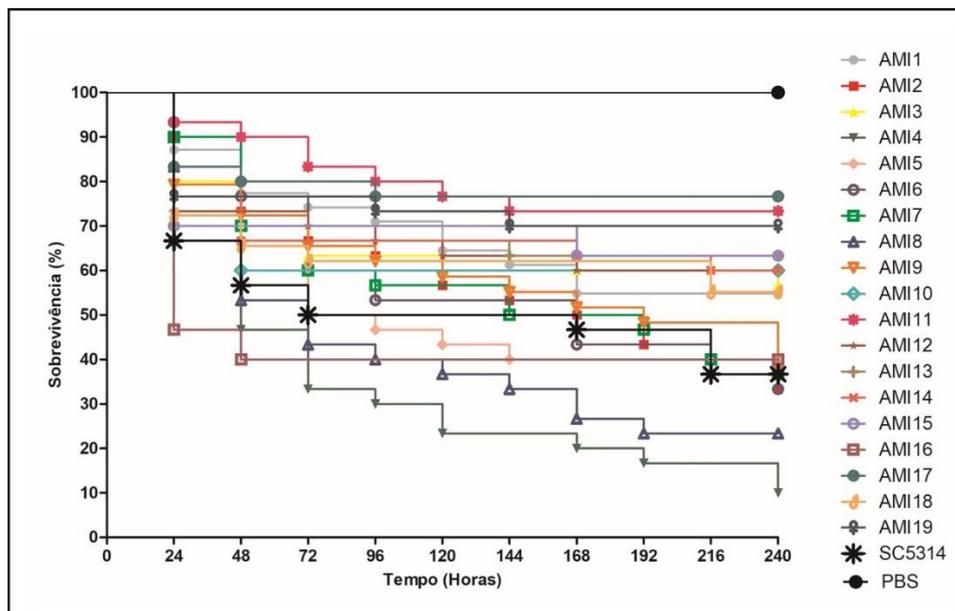
\*Larvas foram injetadas com  $1 \times 10^5$  células dos isolados clínicos de *C. albicans*. Todos os isolados apresentaram letalidade significativa quando comparados ao controle negativo PBS ( $p < 0,05$ ). O isolado CL3 e o CL15 foram significativamente mais letais que o controle positivo *C. albicans* SC5314 ( $p = 0,0010$  e  $p = 0,0119$  respectivamente)

**Figura 18.** Curva de sobrevivência de *T. molitor* submetidos a infecção por isolados de *C. albicans* provenientes de ambientes com baixa influência antrópica.



\*Larvas foram injetadas com  $1 \times 10^5$  células dos isolados de *C. albicans*. Todos os isolados apresentaram letalidade significativa quando comparados ao controle negativo PBS ( $p < 0,05$ ). O isolado 3 foi significativamente mais letal que o controle positivo *C. albicans* SC5314 ( $p = 0,0434$ )

**Figura 19.** Curva de sobrevivência de *T. molitor* submetidos a infecção por isolados de *C. albicans* provenientes de ambientes com alta influência antrópica.



\*Larvas foram injetadas com  $1 \times 10^5$  células dos isolados de *C. albicans*. Todos os isolados apresentaram letalidade significativa quando comparados ao controle negativo PBS ( $p < 0,05$ ). O isolado 4 foi significativamente mais letal que o controle positivo *C. albicans* SC5314 ( $p = 0,0,474$ )

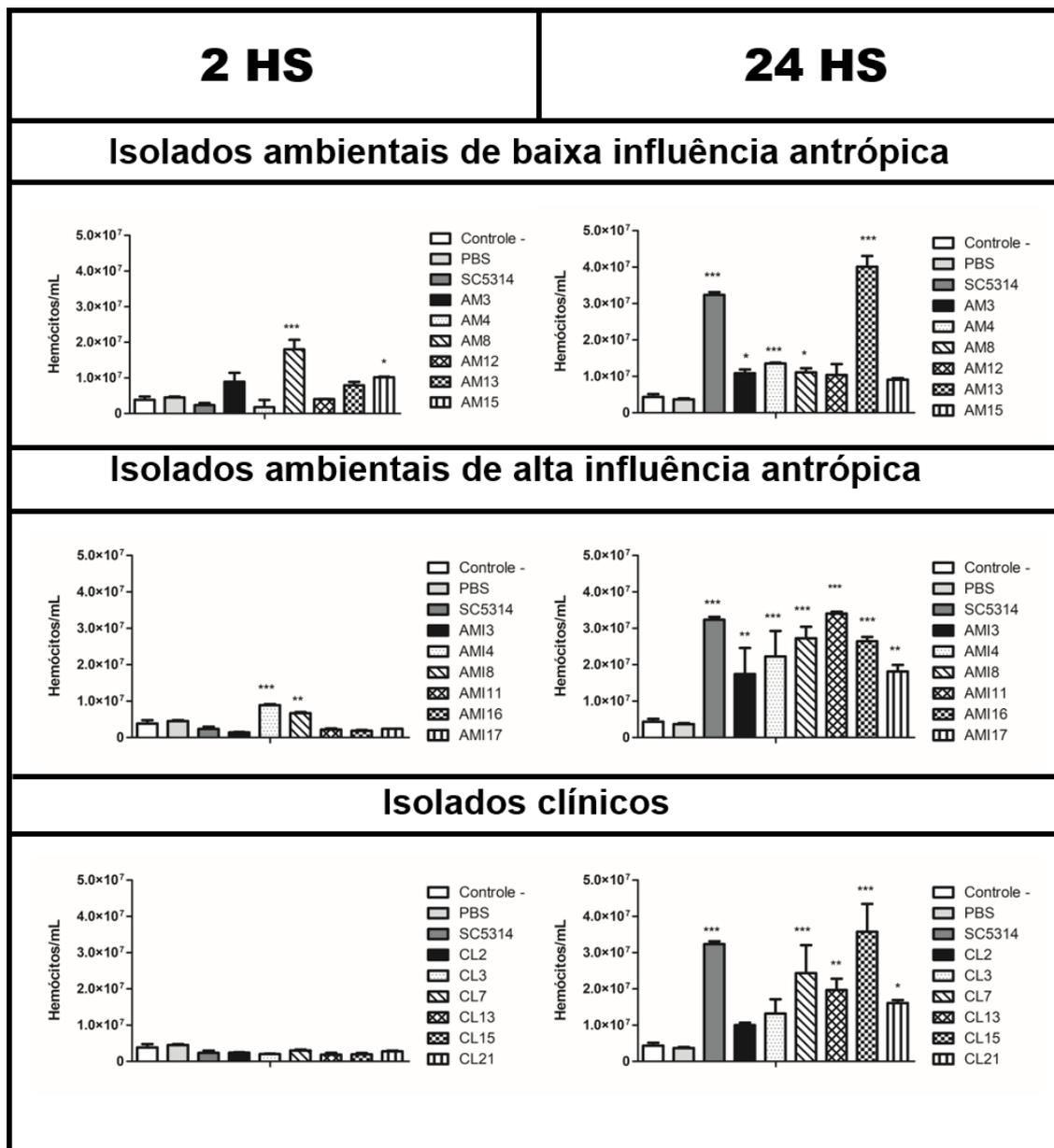
### 6.11- Determinação da densidade de hemócitos

A densidade dos hemócitos circulantes na hemolifa de *T. molitor* foi avaliada após infecção com os isolados de *C. albicans*. Já nas duas primeiras horas após a infecção podemos observar que alguns isolados apresentaram significativo aumento nos hemócitos circulantes em relação ao controle negativo, são eles: AM8 ( $p \leq 0,001$ ) e AM15 ( $p \leq 0,05$ ); AMI4 ( $p \leq 0,001$ ), AMI8 ( $p \leq 0,01$ ). As larvas inoculadas com os isolados clínicos não apresentaram aumento significativo nos hemócitos nas primeiras duas horas experimentais em relação ao controle negativo. Quando analisamos os resultados obtidos em 24 horas, podemos afirmar que houve um aumento significativo nos hemócitos circulantes nas larvas inoculadas com isolados ambientais de baixa influência antrópica quando comparadas com o controle negativo (AM3 e AM8  $p \leq 0,05$ ; AM4 e AM13  $p \leq 0,001$ ). As exceções foram as larvas inoculadas com os isolados AM12 e AM15 que em 24 horas não apresentaram diferença significativa em relação ao controle negativo. Quando comparamos estes mesmos isolados com o controle PBS verificamos que apenas as larvas infectadas com o isolado AM15 não

apresentaram aumento na circulação de hemócitos em 24 horas experimentais (AM3 e AM12  $p \leq 0,05$ ; AM4 e AM13  $p \leq 0,001$  e AM8  $p \leq 0,01$ ). Quando realizamos a comparação com o controle positivo (*C. albicans* SC5314) todas as larvas inoculadas com isolados ambientais com baixa influência antrópica apresentaram de maneira significativa menor quantidade de hemócitos circulantes após 24 horas de infecção ( $p \leq 0,001$ ). Todas as larvas infectadas com os isolados ambientais de alta influência antrópica apresentaram significativamente, em 24 horas, mais hemócitos circulantes em sua hemolinfa do que as larvas do grupo controle negativo e PBS (AMI 3 e AMI17  $p \leq 0,01$ ; AMI4, AMI8, AMI11 e AMI16  $p \leq 0,001$ ). Quando comparamos o controle positivo *C. albicans* SC5314 com as larvas infectadas com os isolados ambientais com alta influência antrópica verificamos que AMI3 e AMI17 foram significativamente menos capazes de causar recrutamento de hemócitos ( $p \leq 0,01$ ) após 24 horas experimentais. As larvas infectadas com os isolados CL7 ( $p \leq 0,001$ ), CL13 ( $p \leq 0,01$ ), CL15 ( $p \leq 0,001$ ) e CL21 ( $p \leq 0,05$ ) apresentaram significativamente mais hemócitos circulantes do que as larvas pertencentes aos grupos de controle negativo e PBS em 24 horas experimentais. Já em relação ao controle positivo, as larvas inoculadas com os isolados CL2, CL3, CL13 e CL21 apresentaram significativamente menor quantidade de hemócitos após 24 horas experimentais (CL2 e CL3  $p \leq 0,001$ ; CL13  $p \leq 0,05$ ; CL15  $p \leq 0,01$ ) (Figura 19). Além de verificarmos diferenças na quantidade de hemócitos entre as larvas dos grupos controle experimentais e as infectadas com os isolados clínicos e ambientais de *C. albicans*, vimos também que houve diferenças comparando os tempos de 2 e 24 horas pós infecção como descrito a seguir. Com exceção das larvas inoculadas com os isolados AM8 e AM15, todos os outros insetos inoculados com as leveduras dos 3 grupos experimentais apresentaram aumento na quantidade de hemócitos circulantes na hemolinfa em 24 horas experimentais em comparação com o período de duas horas. No grupo das larvas que foram inoculadas com isolados ambientais obtidos em ambientes de baixa influência antrópica, observamos o seguinte cenário: as larvas inoculadas com os isolados AM4, AM12 e AM13 apresentaram uma alteração no número de hemócitos circulantes, a qual foi estatisticamente superior no período de 24 horas experimentais (AM4 e AM13:  $p \leq 0,001$ ; AM12:  $p \leq 0,05$ ) em comparação com o período de 2h (Figura 19). Em larvas inoculadas com o isolado AM3, embora se

observe uma leve elevação no número de hemócitos em 24 horas, este valor não foi estatisticamente significativo quando comparados ao período de 2 horas pós infecção. A hemolinfa das larvas inoculadas com o isolado AM15 apresentou numericamente uma leve redução na quantidade de hemócitos em 24 horas, porém esta redução não foi estatisticamente significativa em comparação com a amostra obtida 2 horas após a inoculação. A infecção das larvas de *T. molitor* com o isolado AM8 elevou a quantidade de hemócitos circulantes nas primeiras 2 horas experimentais e este valor foi significativamente maior do que quando comparado ao valor obtido em 24 horas experimentais ( $p \leq 0,05$ ). Todas as larvas inoculadas com isolados ambientais obtidos em ambiente com alta influência antrópica apresentaram contagem de hemócitos em 24 horas superior ao período de 2 horas experimentais ( $p \leq 0,001$ ). No grupo inoculado com isolados clínicos de *C. albicans* observamos que os isolados CL7, CL13, CL15 e CL21 apresentaram em sua hemolinfa, após 24 horas de inoculação, um número expressivamente maior de hemócitos do que o encontrado nas amostras obtidas com 2 horas experimentais (CL7, CL13, CL15:  $p \leq 0,001$ ; CL21:  $p \leq 0,05$ ) (Figura 19).

**Figura 20.** Densidade de hemócitos na hemolinfa de larvas de *T. molitor* após a infecção com diversos isolados de *C. albicans*



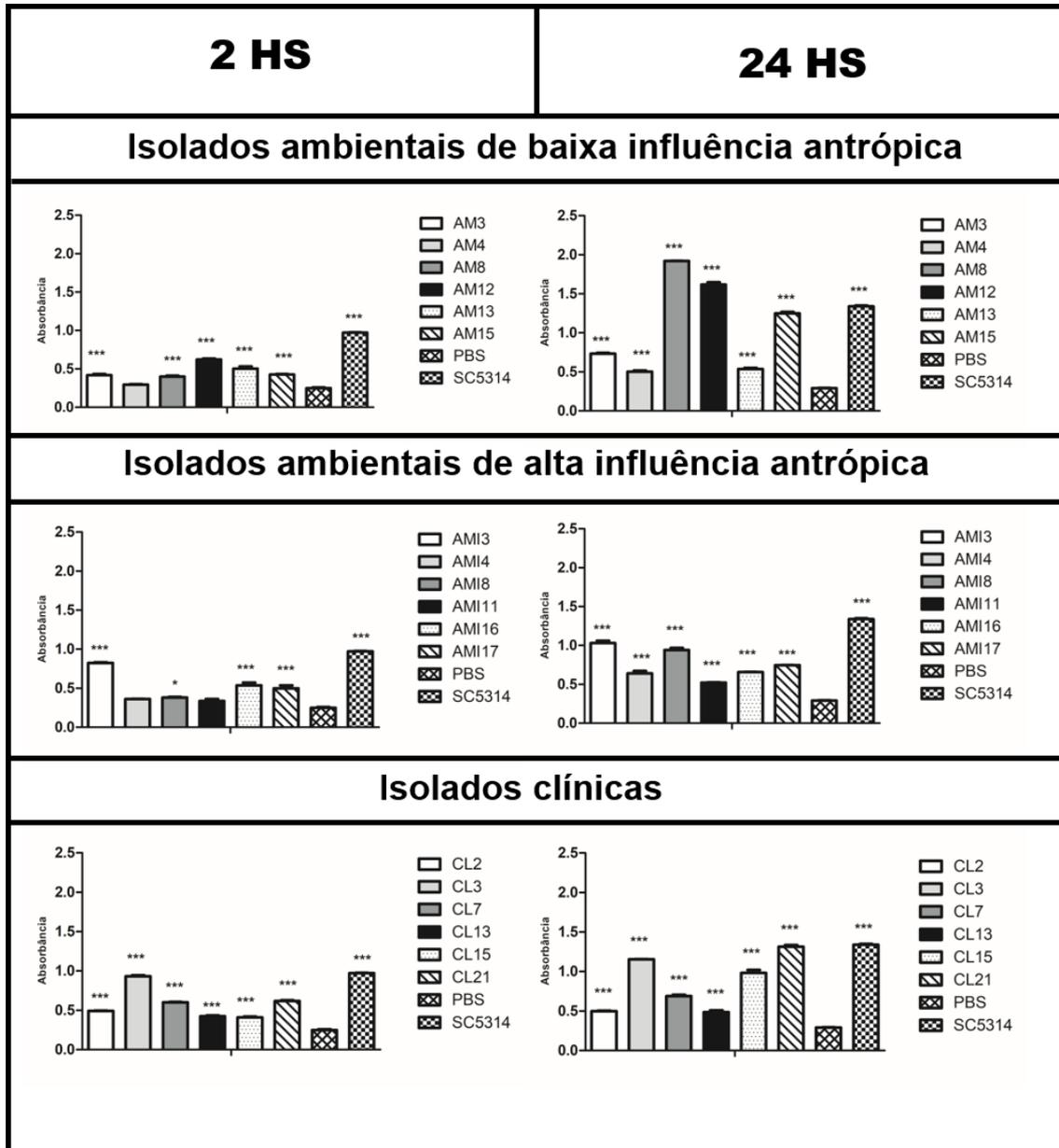
\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  em relação ao controle negativo

## 6.12- Melanização

O processo de melanização das larvas de *T. molitor*, também foi avaliado nas primeiras horas pós-infecção com os isolados de *C. albicans*. No nosso trabalho verificamos que após duas horas experimentais já era possível observar o processo de melanização. A maioria das larvas infectadas com isolados ambientais com baixa influência antrópica, exceto o isolado AM4, apresentaram

melanização significativamente maior em relação ao controle PBS em 2 horas pós-infecção ( $p \leq 0,001$ ). As larvas inoculadas com isolados ambientais de alta influência antrópica, também em sua maioria, apresentaram aumento na melanização em relação ao controle PBS ( $p \leq 0,001$ ), exceto os isolados AMI4 e AMI11 os quais não apresentaram diferença significativa nas primeiras horas experimentais. Todas as larvas infectadas com os isolados pertencentes ao grupo clínico tiveram significante aumento na melanização quando comparado ao controle PBS nas duas primeiras horas após a infecção ( $p \leq 0,001$ ). As larvas inoculadas com o controle positivo *C. albicans* SC5314 apresentaram significativo processo de melanização em comparação com a maioria dos isolados ambientais (alta e baixa influência antrópica) e clínicos testados, nos dois tempos experimentais ( $p \leq 0,001$ ). As exceções para a afirmação anterior foram: AM8 e AM12 ( $p \leq 0,001$ ) que produziram mais melanina que o controle positivo após 24 horas experimentais; CL3 (2hs) e CL21 (24hs) que não apresentaram diferença significativa em comparação com *C. albicans* SC5314. Ao compararmos os dois períodos experimentais verificamos que, com exceção das larvas infectadas com o isolado AM13, que não apresentaram um aumento estatisticamente significativo em 24 horas experimentais, todos os outros isolados do grupo AM apresentaram um crescimento expressivo na melanização [AM3, AM4, AM8, AM12, AM15 ( $p \leq 0,001$ )] em comparação com o período de 2 horas. No grupo de larvas infectadas com isolados do grupo AMI observamos acréscimo significativo no processo de melanização em 24 horas experimentais nos isolados AMI3 ( $p \leq 0,001$ ), AMI4 ( $p \leq 0,001$ ), AMI8 ( $p \leq 0,001$ ), AMI11 ( $p \leq 0,001$ ), AMI 16 ( $p \leq 0,05$ ), AMI17 ( $p \leq 0,001$ ) em comparação com 2 horas experimentais. Também foi possível observar um aumento significativo da melanização em 24 horas nas larvas inoculadas com os isolados clínicos CL3 ( $p \leq 0,001$ ), CL7 ( $p \leq 0,05$ ), CL15 ( $p \leq 0,001$ ) e CL21 ( $p \leq 0,001$ ) em comparação com 2 horas pós-infecção (figura 20).

**Figura 21.** Comparação da melanização de larvas de *T. molitor* nos tempos de 2 e 24 horas após a infecção com isolados de *C. albicans*



\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  em relação ao PBS

## 7- Discussão

A levedura *C. albicans* pode ser isolada vivendo como comensal na microbiota humana e também em ambientes naturais. No entanto, em condições em que o sistema imune do hospedeiro se encontra em desequilíbrio, essas leveduras podem agir como patógenos (POLKE, 2015; KURTZMAN, 2011). Nosso trabalho buscou avaliar os aspectos de virulência e resistência a antifúngicos de isolados de *C. albicans* obtidos de fontes ambientais, com baixa e com alta pressão antrópica, e compará-los com isolados obtidos em ambiente clínico. Um dos primeiros aspectos avaliados foi a capacidade dos isolados crescerem em diferentes temperaturas. A capacidade de sobreviver a temperaturas elevadas é de extrema importância para os microrganismos patogênicos, considerando que o aumento da temperatura corporal do hospedeiro é uma das estratégias do sistema imune para frear o processo infeccioso (LEACH et al, 2016). Em nosso trabalho, observamos que alguns dos isolados avaliados apresentaram capacidade de crescerem em temperaturas de até 45°C. Setenta e três por cento dos isolados clínicos apresentaram crescimento robusto a 45°C, alguns isolados ambientais, de baixa (75%) e alta influência antrópica (58%), também cresceram nesta temperatura, porém de forma inferior quando comparados aos isolados clínicos. A capacidade de detectar e se adaptar as mudanças de temperatura tem influência direta no processo evolutivo dos microrganismos (LEACH et al, 2016). Dados de pesquisas científicas mostram que os microrganismos estão se adaptando as temperaturas cada vez mais altas registradas na Terra (ALTIZER et al, 2013; RAFFEL et al, 2013; MAYNARD et al, 2015; CAVICCHIOLI et al, 2019). Essa adaptação influencia diretamente o equilíbrio dos ecossistemas, além de apresentar influência na interação patógeno-hospedeiro, na dispersão de doenças pelo mundo e na resposta a antimicrobianos (CAVICCHIOLI et al, 2019). A relação entre os fatores de transcrição que induzem a expressão gênica de genes ligados a proteínas de Heat Shock e a indução do programa transcricional ligado aos fatores de virulência de *C. albicans* tem sido observada, e isso pode impactar diretamente no aumento de virulência destes microrganismos e na relação dos mesmos com o desenvolvimento de uma

patogênese (LEACH et al, 2016). Como citado anteriormente, nós observamos a capacidade dos alguns de nossos isolados, independente da fonte de origem, de crescerem em temperaturas elevadas. Esta capacidade adaptativa pode estar influenciando diversas vias, inclusive aquelas ligadas a mecanismos de virulência em *C. albicans*.

A ação de duas enzimas hidrolíticas, proteinase e fosfolipase, foram também avaliadas no presente trabalho. As enzimas apresentam papel essencial na patogênese de *C. albicans*, provocando danos teciduais no hospedeiro e propiciando a obtenção de nutriente para o fungo (SCHALLER et al., 2005; RAPALA-KOZIK et al., 2018). Os resultados obtidos em nosso trabalho mostram que os isolados ambientais, tanto os de baixa como os de elevada influência antrópica, apresentam produção das enzimas de maneira similar aos isolados clínicos. Este é mais um indicativo que reforça o possível potencial patogênico dos isolados ambientais.

Um outro fator avaliado foi a capacidade de filamentação dos isolados de *C. albicans*. A capacidade de filamentação de *C. albicans* está diretamente ligada a processos de adesão, invasão, dano tecidual, disseminação e evasão do sistema imune, ou seja, contribui diretamente para a virulência deste microrganismo (KUMAMOTO & VINCES, 2005; JACOBSEN et al., 2012). A morfogênese em microrganismos do gênero *Candida* é multifatorial e pode ser induzida por inúmeros fatores como temperatura, disposição de nutrientes, alterações do pH, presença de CO<sub>2</sub> (AZADMANESH et al, 2017). Alguns autores acreditam que a indução da filamentação está ligada a adaptabilidade deste fungo as condições dos ambientes em que ele está inserido (AZADMANESH et al, 2017). No trabalho utilizamos três diferentes meios de cultura, sendo que disposição de carbono, nitrogênio e aminoácidos foram os fatores limitantes avaliados. Nós observamos que a grande maioria dos isolados testados filamentaram no meio SPIDER (meio com limitação de fontes de carbono) e filamentaram com menor intensidade ou não filamentaram nos meios SLAD (meio limitante de nitrogênio) e LEE (meio com aminoácidos). A restrição nutricional é um dos fatores indutores do processo de morfogênese (AZADMANESH et al, 2017; VILA et al., 2017). Sabe-se até o momento que a via do AMPc é ativada em *Candida* quando cultivada no meio SPIDER e que

genes como TOR1 e CYR1 são expressos durante a morfogênese (BASTIDAS et al., 2009; VILA et al., 2017). O gene TOR1 codifica uma proteína quinase conservada desde leveduras até humanos, que em *C. albicans* age como via sinalizadora da resposta celular a nutrientes e atua regulando genes expressos nas hifas deste fungo (BASTIDAS et al., 2009). O gene CYR1 codifica uma adenilil ciclase a qual responde a sinais externos e está ligado a indução da via do AMPc e conseqüentemente na produção de hifas em *C. albicans* (ROCHA et al., 2001; SUDBERY, 2011; PARRINO et al., 2016, AZADMANESH et al, 2017). Podemos inferir, com os resultados obtidos no presente trabalho, que nos isolados AM9, AM10, AMI18, CL12 e CL26 a via do AMPc e os genes ligados a ela não estão atuando no processo de morfogênese, já que estas leveduras não filamentaram no meio SPIDER (AZADMANESH et al, 2017; VILLA et al., 2017). Os isolados AM9 e CL26 não filamentaram tanto no meio SPIDER quanto no meio SLAD, porém no meio LEE estes isolados apresentaram uma pequena filimentação ao redor de suas colônias. Com estes dados acreditamos que, como o meio LEE induz o processo de morfogênese através das vias Cph2 e Tec1, estas vias estejam ativas e atuando na filimentação destes isolados (BERMAN & SUDBERY, 2002; VILLA et al., 2017). O isolado CL12 que também não apresentou filimentação no meio SPIDER, apresentou leve filimentação no meio SLAD. Alonso-Monge e colaboradores (1999) mostraram em seu trabalho que o gene HOG1 de *C. albicans* está ligado ao processo de morfogênese em meio SLAD. A maioria das leveduras avaliadas em nosso trabalho apresentaram algum nível de filimentação em mais de um meio de cultura, tal achado reforça o caráter multifatorial do processo de morfogênese em *C. albicans* mostrando que diferentes vias podem estar ativas durante este processo (AZADMANESH et al, 2017; VILLA et al., 2017). Esta diversidade de mecanismos ligados ao processo de morfogênese em *C. albicans* pode estar relacionado com a plasticidade de funções que as hifas apresentam como busca por nutrientes, invasão de novos sítios, fuga do sistema imune e adesão a superfícies (AZADMANESH et al, 2017). Os resultados obtidos em nosso trabalho reforçam os achados da literatura mostrando que este processo não deve ser avaliado apenas por um fator, já que diversas vias podem ser ativadas e induzirem a morfogênese. Por este motivo não podemos descartar a capacidade de morfogênese do isolado AM7, que não filamentou em nenhum meio testado no

experimento, pois outras outras vias indutoras de filamentação, as quais não foram avaliadas neste trabalho, podem ser ativadas em outras condições de cultivo. *In vitro* é possível estudar de maneira isolada cada fator, mas sabemos que durante a colonização e durante o processo de patogênese o microrganismo estará exposto a diversos estímulos que podem influenciar diretamente o processo de morfogênese. Um fator interessante a ser discutido a partir dos nossos resultados é que os isolados ambientais avaliados, principalmente os que foram isolados de ambientes com pressão antrópica, apresentaram processo de filamentação semelhante aos isolados clínicos no meio SPIDER. No presente trabalho observamos que os isolados de ambientes com baixa pressão antrópica apresentaram menor filamentação nos meios testados em relação aos isolados dos demais grupo. Como a filamentação é um fator importante para o processo de patogênese e foi observada nos isolados ambientais podemos inferir que este é mais um indicativo de que estes isolados podem atuar como potenciais patógenos, e desta forma os locais dos quais eles foram isolados podem ser considerados possíveis fontes de contaminação para o ser humano.

A formação de biofilme é um outro importante fator de virulência de *C. albicans*. A adesão e a morfogênese são fatores que contribuem para a formação de biofilme (DRANGINIS et al., 2007; DESAI & MITCHELL, 2015). No nosso trabalho, vimos que todos os isolados testados no presente trabalho foram produtores de biofilme sendo que o isolado clínico CL6 se destacou dos demais, apresentando uma robusta formação de biofilme. Já foi descrito na literatura que os microrganismos, de um modo geral, são encontrados no ambiente organizados em comunidades mono ou polimicrobianas, formando os biofilmes (DOUGLAS, 2003; NOBILE & JOHNSON, 2015). No âmbito clínico a formação de biofilme tem papel de extrema importância. *C. albicans* forma biofilmes nas mucosas e órgãos durante o processo de patogênese e também podem ser formados em superfície abiótica, como dispositivos médicos (DE GROOT et al., 2013; RAMAGE et al. 2005; NETT, 2016). Dados apontam que os biofilmes são responsáveis por cerca de 80% das infecções por *C. albicans* nos EUA (TSUI et al., 2016). Em nosso trabalho não foi possível estabelecer uma correlação direta entre os resultados individuais de filamentação e formação de biofilme. Como dito anteriormente a filamentação é um processo que faz parte da formação do

biofilme, porém estes fatores são regulados por diversas vias, e isto dificulta uma avaliação completa da complexidade deste processo (HAZEN et al., 1990; AZADMANESH et al, 2017; RICHARDSON et al., 2018). Mesmo com estas limitações experimentais, nossos resultados trazem dados que sustentam a capacidade dos isolados ambientais apresentarem fatores de virulência similares aos resultados obtidos com os isolados clínicos.

Como já citado, a formação de biofilmes de *C. albicans* durante o processo infeccioso tem uma grande importância clínica. A principal problemática envolvida na presença de biofilmes durante a infecção é que esta estrutura fúngica dificulta a ação do sistema imune e também de antifúngicos (RAMAGE et al., 2005). Em nosso trabalho foi possível observar que, de maneira geral, quando biofilmes de isolados clínicos e ambientais de *C. albicans* foram submetidos a concentrações crescentes de antifúngicos não houve uma diminuição significativa desta estrutura fúngica, principalmente ao serem expostos aos azóis. Diversos trabalhos trazem dados que sustentam a afirmação de que a estrutura do biofilme fúngico é significativamente mais resistente ao tratamento fúngico do que a forma planquitônica destes microrganismos (HAWSER & DOUGLAS, 1995; DONLAN & COSTERTON, 2002; NOBILE & JOHNSON, 2015). Vários mecanismos já foram descritos como peças que contribuem para este aumento da resistência do biofilme como a ação de bombas de efluxo, a presença da matriz extracelular e de células persistentes, alterações fenotípicas devido a nutrição, baixa taxa de crescimento e expressão de genes de resistência (MAH & O'TOOLE, 2001; DONLAN & COSTERTON, 2002; NOBILE & JOHNSON, 2015).

A resistência ao tratamento antifúngico é uma das principais preocupações da comunidade científica na atualidade. Aproximadamente metade dos isolados clínicos avaliados no nosso estudo apresentaram resistência a azóis. Os compostos azólicos são a primeira linha de tratamento para as infecções fúngicas principalmente pela sua baixa toxicidade e fácil administração via oral (WHALEY et al., 2017). A seleção de isolados pela pressão de uso de antifúngicos é uma das principais formas de desenvolvimento de resistência nos fungos (ARENDRUP & PATTERSON, 2017). Além da resistência em isolados clínicos, estudos apontam para a existência de isolados

ambientais resistentes. No trabalho observamos que diversos isolados ambientais de ambientes impactados apresentaram resistência aos azóis testados. Levando em consideração que os isolados de *C. albicans* de ambientes impactados, do presente trabalho, foram isolados de locais no Brasil que possuem muitas práticas agrícolas, como plantio de cana de açúcar, soja, algodão, milho e portanto ocorre grande uso de agroquímicos, podemos discutir sobre a provável existência de um mecanismo de resistência cruzada. O avanço das áreas agrícolas, o desmatamento e o aumento no uso de agrotóxicos contribuem para a expansão da dispersão destes compostos químicos. Alguns trabalhos na literatura mostram que compostos de estrutura azólica podem induzir a resistência aos azóis utilizados no tratamento clínico. Rocha e colaboradores (2016) viram que os isolados de *Candida* que eram expostos a um agroquímico tetraconazol, o qual possui estrutura azólica, posteriormente quando expostos ao fluconazol apresentaram valores de CIM mais elevados, principalmente pelo aumento da ação de bombas de efluxo. De forma similar ao exposto no trabalho de Rocha e colaboradores (2016) nosso trabalho mostrou que a exposição de isolados de *C. albicans*, anteriormente sensíveis ao tratamento com fluconazol, a concentrações crescentes do agroquímico epoxiconazol apresentavam aumento nos valores de CIM para o fluconazol. O epoxiconazol é um agroquímico de estrutura azólica que age inibindo a enzima lanosterol 14 $\alpha$ -desmetilase e também inibindo a ação de outros citocromos como o citocromo p450 (HAMDI et al., 2019). O epoxiconazol é amplamente estudado pelo seu mecanismo de ação em fungos de importância agrônômica e também pela sua toxicidade em células humanas (STAMMLER et al., 2012; CHAMBERS et al., 2014; LIU et al., 2020; LAUSCHKE et al., 2021). A literatura é escassa no que diz respeito ao papel deste agrotóxico em leveduras de importância médica. Um dos poucos trabalhos encontrados mostra dados de CIM de epoxiconazol em isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus* (DRUMMOND et al., 2007). Os autores deste trabalho mostraram que a média do CIM de epoxiconazol de isolados ambientais é superior ao encontrado em isolados clínicos (DRUMMOND et al., 2007). Com isso os autores sugerem que exposições frequentes a epoxiconazol pode levar os isolados de *Cryptococcus* a resistência, porém o estudo não trás dados que endossem esta afirmação (DRUMMOND et al., 2007). Potocki e colaboradores (2020) buscaram avaliar o impacto que a

exposição a pesticidas pode trazer a diversas espécies de *Candida*. Neste trabalho os pesquisadores mostraram que a exposição a agroquímicos, incluindo o epoxiconazol, pode levar a acúmulo de espécies reativas de oxigênio, mudanças na composição de ácidos graxos e danos no DNA. Estas alterações a nível molecular podem levar ao envelhecimento celular. Os autores sugerem que os mecanismos afetados pela exposição constante a estes pesticidas levam a heterogeneidade celular e isto pode ter um papel importante na resistência a antifúngicos (POTOCKI et al., 2020). Ao final dos experimentos realizados em nosso trabalho vimos que o epoxiconazol foi capaz de aumentar os valores de CIM de fluconazol dos 4 isolados testados, sendo que 3 destes apresentaram valores considerados de resistência ao antifúngico clínico testado. Desta forma, mostramos neste experimento *in vitro* o processo de resistência cruzada entre antifúngicos com estrutura química similar. Este achado é preocupante pois o uso descontrolado de antifúngicos na agricultura pode contaminar solos, águas e induzir uma pressão seletiva resultando na emergência de isolados resistentes na natureza (SNELDERS et al., 2012). Este desequilíbrio na ecologia dos microrganismos pode levar a emergência de isolados de importância médica, sendo um fator de risco que pode influenciar diretamente na clínica (AZEVEDO et al., 2015).

A maior parte dos isolados ambientais obtidos em ambientes com pouca influência antrópica foram sensíveis aos antifúngicos testados, porém em todos esses isolados foi observado a presença do fenômeno *trailing*. A presença de células persistentes, independentemente da concentração antifúngica, não é considerada por alguns autores como fator que influencia o tratamento ou prevalência da *Candida in vivo* (RUEDA et al., 2016). Porém, pesquisas recentes mostram que estas células podem ser a fonte de infecções recalcitrantes (ROSEMBERG et al., 2018). Experimento realizado por Rosenberg e colaboradores (2018) mostrou que isolados de pacientes com infecções recorrentes por *Candida* apresentam alta tolerância, ou seja, uma alta prevalência de células persistentes, sendo então um indicativo da importância dessas células na reincidência dessa doença. Então, mesmo que a maioria dos isolados ambientais obtidos em fontes com pouca influência antrópica foram sensíveis ao tratamento antifúngicos, a presença do fenômeno *trailing* pode ser

um fator que pode implicar na clínica, visto que essas células persistentes podem ser fontes de infecções recorrentes.

A virulência de isolados de *C. albicans* foi um outro fator avaliado em nosso trabalho. Para tal recorremos a modelos hospedeiros alternativos, cujo uso vem se difundindo na comunidade científica (JACOBSEN et al., 2014; DE SOUZA et al., 2015; BINDER et al., 2016; MARCOS-ZAMBRANO et al., 2020). As vantagens éticas e logísticas, e os resultados promissores de trabalhos prévios sustentam esta metodologia como uma ferramenta na avaliação de virulência de *C. albicans* (DE SOUZA et al., 2015). Trabalhos utilizando larvas de *T. molitor* e de outros insetos como ferramenta de análise da virulência trazem dados que mostram que estes insetos respondem a diferenças de virulência dos isolados microbianos. e esta resposta ocorre de maneira dose dependente ao inóculo (DE SOUZA et al., 2015). Além disso, estes insetos podem ser mantidos a temperatura de até 37°C, o que é importante para mimetizar a temperatura corpórea humana (DE SOUZA et al., 2015). Nossos resultados mostraram que os isolados ambientais obtidos em fontes de baixa influência antrópica de modo geral apresentaram virulência em *T. molitor* variável de 30 a 80%, dados semelhantes ao encontrado na maioria dos isolados clínicos testados. No entanto, estes mesmos isolados (baixa influencia antrópica) apresentaram letalidade significativamente maior que os isolados clínicos e ambientais com elevada influência antrópica nas primeiras 24 horas experimentais. De forma semelhante, alguns pesquisadores fizeram uso de modelos hospedeiros invertebrados para o estudo comparativo da virulência de isolados fúngicos obtidos em fontes naturais e clínicas. Coleman e colaboradores (2011), por exemplo utilizaram larvas da mariposa *Galleria mellonella* para avaliar a virulência de isolados clínicos e ambientais de *Fusarium*, e verificaram que a virulência deste fungo era similar independente da origem do isolado. Isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus* também já foram avaliados de maneira comparativa em estudos usando como modelo de infecção os invertebrados *G. mellonella* e *Caenorhabditis elegans* (ZHU et al., 2010, VÉLEZ et al., 2018). Porém, não existem trabalhos que realizaram a comparação de virulência entre isolados clínicos e ambientais de *C. albicans*. Nosso trabalho é pioneiro ao utilizar larvas de *T. molitor* como modelo de infecção para avaliar, de maneira

comparativa, a virulência de isolados de *C. albicans* obtidos em diferentes fontes. Além de avaliar a taxa de letalidade de larvas de *T. molitor* infectadas com os isolados de *C. albicans*, buscamos explorar com maior profundidade alguns mecanismos do sistema imune deste inseto durante o processo infeccioso. Nós verificamos um aumento do recrutamento de hemócitos na hemolinfa de *T. molitor* após a infecção com *C. albicans* e esta elevação foi acentuada passadas 24 horas experimentais. Os hemócitos de *C. albicans* são importantes componentes do sistema imune celular de *T. molitor* e atuam principalmente na fagocitose de patógenos invasores (DE SOUZA et al., 2018). A observação do aumento no recrutamento de hemócitos pós infecção mostra que *C. albicans* é reconhecida pelo sistema de defesa de *T. molitor* e que este inseto pode ser uma ferramenta importante nos estudos de imunidade frente a infecção por este microrganismo. Ao observarmos separadamente os grupos experimentais, verificamos que os isolados ambientais de baixa influência antrópica apresentaram, de modo geral, a menor contagem de hemócitos em comparação aos outros grupos experimentais em um período de 24 horas pós-infecção. Estudo com *Galleria mellonella*, outro modelo invertebrado, mostra que após infecção com *C. albicans* ocorre uma variação nos níveis de hemócitos nessas larvas (SHEEHAN & KAVANAGH, 2018). Os pesquisadores viram que nas duas primeiras horas pós-infecção, pode ocorrer uma leve queda na densidade de hemócitos, este número permanece estável nas 6 primeiras horas e posteriormente começa a aumentar. Passadas 12 horas pós infecção o número de hemócitos começa, lentamente, a diminuir, porém a contagem de hemócitos segue muito maior do que o observado nas primeiras horas experimentais (SHEEHAN & KAVANAGH, 2018). Em nosso trabalho avaliamos os intervalos de 2 e 24 horas experimentais e vimos que neste intervalo, como citado anteriormente, o recrutamento de hemócitos em larvas infectadas com isolados de *C. albicans* obtidos em ambientes de baixa influência antrópica foi menor do que comparado aos outros grupos experimentais. Nos testes de virulência já citados, vimos que os isolados ambientais de baixa influência antrópica apresentam elevada letalidade nas primeiras horas experimentais. Esses dados nos levam a inferir que a alta letalidade nas primeiras horas experimentais neste grupo possa estar ligada a menor densidade de hemócitos observadas neste

período, visto que estas células têm papel crucial na defesa contra patógenos (VIGNERON et al., 2019).

A via da profenoloxidase que culmina na produção de melanina também é um fator importante na defesa contra patógenos em insetos (NAKHLEH, EL MOUSSAWI e OSTA, 2017; DE SOUZA et al., 2018; VIGNERON et al., 2019). A produção de melanina em larvas de *T. molitor* é uma resposta do sistema imune humoral destes insetos contra infecções por microrganismos (NAKHLEH, EL MOUSSAWI e OSTA, 2017). A melanina é tóxica para os microrganismos, além disso alguns estudos apontarem que a ativação da via da profenoloxidase está ligada a ativação de outros mecanismos do sistema imune deste inseto que, coordenadamente, atuam na luta contra o patógeno invasor (NAKHLEH, EL MOUSSAWI e OSTA, 2017). Em nosso trabalho, assim como o observado na análise de hemócitos, houve um aumento na melanização em larvas de *T. molitor* infectadas com isolados de *C. albicans* de todos os grupos experimentais estudados, principalmente após as 24 horas experimentais. Este resultado mostra que mecanismos do sistema imune deste inseto foram ativados pela presença desta levedura. Com os resultados que obtivemos e com dados prévios da literatura reiteramos a importância do *T. molitor* como ferramenta de avaliação de virulência de microrganismos, podendo ser usado como método de avaliação preliminar e *screening*.

Como já citamos, a virulência de *C. albicans* é multifatorial e depende tanto dos fatores de virulência apresentados pelo fungo quanto pelo status imunológico do hospedeiro (POLKE, 2015; VILA et al., 2017; KHAN et al., 2020). Ao realizarmos uma análise comparativa dos resultados obtidos no presente trabalho encontramos uma ampla diversidade de resultados tanto na comparação entre os grupos quanto dentro dos próprios grupos experimentais, reforçando assim a ideia do caráter multifatorial da virulência e patogenicidade deste fungo (tabela 06 - anexo). Mesmo com esta ampla gama de resultados ainda foi possível encontrar alguns pontos convergentes a cerca da virulência dos diferentes isolados de *C. albicans* avaliados no estudo. Vimos, por exemplo, que 85% dos isolados que causaram a morte de 70% ou mais das larvas de *T. molitor* apresentavam ao menos a expressão de uma enzima hidrolítica, cresciam a 45°C e apresentavam algum nível de filamentação nos meios de

cultura testados. Este achado reforça a importância dos fatores de virulência durante o processo infeccioso e como os mesmos influenciam no grau de virulência dos isolados de *C. albicans*. Em contrapartida, vimos que os isolados que foram pouco virulentos em *T. molitor*, com letalidade inferior a 40%, não apresentaram crescimento a 45°C (tabela 06). Este resultado reforça o que já foi citado anteriormente sobre a possível ligação da adaptação dos microrganismos a elevadas temperaturas e como isto pode estar relacionado ao aumento da virulência, principalmente porque já existem trabalhos que mostram que durante a síntese de proteínas do heat-shock também podem ser transcritos genes relacionados a virulência (LEACH et al, 2016). Este achado traz um alerta sobre o aumento das temperaturas na Terra e como isto pode influenciar na capacidade de virulência dos microrganismos, mostrando assim a extrema necessidade no aumento das pesquisas voltadas a avaliar estes fatores.

Existem alguns trabalhos que buscaram avaliar as diferenças no perfil de virulência entre isolados clínicos e ambientais de alguns microrganismos como *Aspergillus*, *Sporothrix*, *Cryptococcus*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* (DIXON et al., 1992; WOLFGANG et al., 2003; HEUZENROEDER et al., 1999; NGAMSKULRUNGROJ et al., 2011; PUÉRTOLAS-BALINT et al., 2019). Também é encontrado na literatura um trabalho que avaliou o perfil de virulência de *C. albicans*, porém os autores apenas avaliaram a produção de tubo germinativo, produção de fosfolipase e biofilme nestes isolados (ZAHRA ABD AL-KARREM, 2014). Nosso trabalho buscou avaliar de modo mais profundo os fatores de virulência presentes nos isolados clínicos e ambientais estudados, permitindo além de estudos *in vitro*, o uso de um modelo invertebrado para avaliação do perfil de virulência *in vivo*. Nós também avaliamos o perfil de resistência destes isolados, de forma a trazer um estudo mais completo quanto as características destas leveduras.

Os fatores analisados em nosso trabalho demonstram que os isolados de fontes ambientais apresentam complexidade e diversidade quanto aos fatores de virulência analisados, isto nos leva a crer que estes microrganismos podem ser uma fonte alternativa de patógenos oportunistas, tendo implicações diretas na saúde humana e no quadro epidemiológico das infecções causadas por *C. albicans*.



## 8- Conclusão

Nosso trabalho mostrou que isolados de *C. albicans* obtidos de fontes naturais podem apresentar fatores de virulência e resistência que os capacitam para serem possíveis patógenos oportunistas. Foi possível observar através dos nossos resultados que os isolados ambientais de locais com elevada influência antrópica se assemelham aos isolados clínicos nos diversos fatores de virulência e resistência estudados. Mesmo que os isolados ambientais de baixa influência antrópica apresentaram resultados um pouco diferentes em comparação ao observado em isolados clínicos e ambientais de alta influencia antrópica, verificamos a presença de diversos caracteres de virulência, como produção de enzimas e biofilme. Observamos também que alguns destes isolados podem apresentar resistência aos azóis e que mesmo em isolados sensíveis, existe a presença do fenômeno *trailing* com células tolerantes ao tratamento antifúngico. Além disso verificamos que estes isolados podem ter sua resistência induzida através da exposição a antifúngico utilizado na agricultura. Todos os dados gerados neste trabalho nos levam a crer que os ambientes nos quais estes microrganismos são isolados podem ser considerados um nicho alternativo de contato com estes fungos oportunistas com potencial patogênico, podendo implicar diretamente na saúde humana.

## 9- Referências Bibliográficas

AHMAD KHAN, M. S. et al. Virulence and biofilms as promising targets in developing antipathogenic drugs against candidiasis. *Future Science OA*, v. 6, n. 2, p. FSO440, 1 fev. 2020.

AKINS, R. A. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Medical Mycology*, v. 43, n. 4, p. 285–318, jan. 2005.

ALEXANDER, B. D. et al. Increasing Echinocandin Resistance in *Candida glabrata*: Clinical Failure Correlates With Presence of FKS Mutations and Elevated Minimum Inhibitory Concentrations. *Clinical Infectious Diseases*, v. 56, n. 12, p. 1724–1732, 15 jun. 2013.

ALONSO-MONGE, R. et al. Role of the Mitogen-Activated Protein Kinase Hog1p in Morphogenesis and Virulence of *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology*, v. 181, n. 10, p. 3058–3068, 15 maio 1999.

ALTIZER, S. et al. Climate Change and Infectious Diseases: From Evidence to a Predictive Framework. *Science*, v. 341, n. 6145, p. 514–519, 2 ago. 2013.

ARAÚJO, D.; HENRIQUES, M.; SILVA, S. Portrait of *Candida* Species Biofilm Regulatory Network Genes. *Trends in Microbiology*, v. 25, n. 1, p. 62–75, jan. 2017.

ARENDORF, T. M.; WALKER, D. M. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. *Archives of Oral Biology*, v. 25, n. 1, p. 1–10, 1980

ARENDRUP, M. C.; PATTERSON, T. F. Multidrug-Resistant *Candida*: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 216, n. suppl\_3, p. S445–S451, 15 ago. 2017.

ARIAS, S. et al. Epidemiology and mortality of candidemia both related and unrelated to the central venous catheter: a retrospective cohort study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 36, n. 3, p. 501–507, mar. 2017.

ASHLEY, E. D. et al. Cost of Invasive Fungal Infections in the Era of New Diagnostics and Expanded Treatment Options. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, v. 32, n. 10, p. 890–901, out. 2012.

AZEVEDO, M.-M. et al. Genesis of Azole Antifungal Resistance from Agriculture to Clinical Settings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 63, n. 34, p. 7463–7468, 2 set. 2015.

AZADMANESH, J. et al. Filamentation Involves Two Overlapping, but Distinct, Programs of Filamentation in the Pathogenic Fungus *Candida albicans*. *Genes|Genomes|Genetics*, v. 7, n. 11, p. 3797–3808, nov. 2017.

BADER, O. et al. Environmental Isolates of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* in Germany. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 59, n. 7, p. 4356–4359, jul. 2015.

BAKHJET, S.; AHMED, W.; MOHAMMED, W. Significance of Fungal Species Isolated from Blue Nile River and Tuti Island on Drinking Water Quality. *Journal of Applied Life Sciences International*, v. 7, n. 4, p. 1–6, 10 jan. 2016.

BANDARA, H. M. H. N.; PANDUWAWALA, C. P.; SAMARANAYAKE, L. P. Biodiversity of the human oral mycobiome in health and disease. *Oral Diseases*, v. 25, n. 2, p. 363–371, mar. 2019.

BANDI, A. et al. 380. *Drosophila melanogaster* as a Facile Model for Large-Scale Studies of Virulence Mechanisms and Antifungal Drug Efficacy in *Candida auris* Candidiasis. *Open Forum Infectious Diseases*, v. 5, n. suppl\_1, p. S147–S148, 26 nov. 2018.

BARCHIESI, F. et al. Experimental Induction of Fluconazole Resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 44, n. 6, p. 1578–1584, 1 jun. 2000.

BASTIDAS, R. J.; HEITMAN, J.; CARDENAS, M. E. The Protein Kinase Tor1 Regulates Adhesin Gene Expression in *Candida albicans*. *PLoS Pathogens*, v. 5, n. 2, p. e1000294, 6 fev. 2009.

BEIGI, R. H. et al. Vaginal Yeast Colonization in Nonpregnant Women: A Longitudinal Study: *Obstetrics & Gynecology*, v. 104, n. 5, Part 1, p. 926–930, nov. 2004.

BENSASSON, D. et al. Diverse Lineages of *Candida albicans* Live on Old Oaks. *Genetics*, v. 211, n. 1, p. 277–288, jan. 2019.

BERKOW, E.; LOCKHART, S. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. *Infection and Drug Resistance*, v. Volume 10, p. 237–245, jul. 2017.

BERMAN, J.; SUDBERY, P. E. *Candida albicans*: A molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nature Reviews Genetics*, v. 3, n. 12, p. 918–931, dez. 2002.

BERTINI, A. et al. Targeted gene disruption in *Candida parapsilosis* demonstrates a role for CPAR2\_404800 in adhesion to a biotic surface and in a murine model of ascending urinary tract infection. *Virulence*, v. 7, n. 2, p. 85–97, 17 fev. 2016.

BIASOLI, M. S.; TOSELLO, M. E.; MAGARÓ, H. M. Adherence of *Candida* strains isolated from the human gastrointestinal tract. *Mycoses*, v. 45, n. 11–12, p. 465–469, 2002.

BINDER, U.; MAURER, E.; LASS-FLÖRL, C. *Galleria mellonella*: An invertebrate model to study pathogenicity in correctly defined fungal species. *Fungal Biology*, v. 120, n. 2, p. 288–295, fev. 2016.

BOMMANAVAR, S.; GUGWAD, S.; MALIK, N. Phenotypic switch: The enigmatic white-gray-opaque transition system of *Candida albicans*. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, v. 21, n. 1, p. 82, 2017.

BORBA, H. H. L. et al. Cost-effectiveness of amphotericin B formulations in the treatment of systemic fungal infections. *Mycoses*, v. 61, n. 10, p. 754–763, out. 2018.

BRAGA, P. R. et al. Secular trends of candidemia at a Brazilian tertiary care teaching hospital. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 22, n. 4, p. 273–277, jul. 2018.

BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (Lei Arouca). Regulamenta o inciso 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais, revoga a Lei, nº 6. 638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências.

BRENNER, S. The worm's turn. *Current Biology*, v. 12, n. 21, p. R713, out. 2002.

BRILHANTE, R. S. N. et al. Yeasts from *Macrobrachium amazonicum*: a focus on antifungal susceptibility and virulence factors of *Candida* spp.: Yeasts from wild and captive *M. amazonicum*. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 76, n. 2, p. 268–277, maio 2011.

BRILHANTE, R. S. N. et al. Yeast microbiota of raptors: a possible tool for environmental monitoring: Use of *Candida* spp. for environmental monitoring. *Environmental Microbiology Reports*, v. 4, n. 2, p. 189–193, abr. 2012.

BRILHANTE, R. S. N. et al. Detection of *Candida* species resistant to azoles in the microbiota of rheas (*Rhea americana*): possible implications for human and animal health. *Journal of Medical Microbiology*, v. 62, n. 6, p. 889–895, 1 jun. 2013.

BRILHANTE, R. S. N. et al. Emergence of azole-resistant *Candida albicans* in small ruminants. *Mycopathologia*, v. 180, n. 3–4, p. 277–280, out. 2015.

BRILHANTE, R. S. N. et al. Yeasts from the microbiota of bats: a focus on the identification and antimicrobial susceptibility of cryptic species of *Candida*. *Journal of Medical Microbiology*, v. 65, n. 10, p. 1225–1228, 18 out. 2016.

BROWN JR, D. H. et al. Filamentous growth of *Candida albicans* in response to physical environmental cues and its regulation by the unique CZF1 gene. *Molecular Microbiology*, v. 34, n. 4, p. 651–662, nov. 1999.

BROWN, G. D. et al. Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Science Translational Medicine*, v. 4, n. 165, p. 165rv13-165rv13, 19 dez. 2012.

BULLEN, J. J. The Significance of Iron in Infection. *Clinical Infectious Diseases*, v. 3, n. 6, p. 1127–1138, 1 nov. 1981.

BUZZINI, P.; LACHANCE, M.-A.; YURKOV, A. (Org.). *Yeasts in Natural Ecosystems: Diversity*. Cham: Springer International Publishing, 2017.

Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-62683-3>>. Acesso em: 13 fev. 2019.

CALDERONE, R. A. Introduction and historical perspectives. *Candida* and Candidiasis (Calderone R., ed). ASM Press, 2002.

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, 1 fev. 2000.

CANELA, H. M. S. et al. Prevalence, virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from bloodstream infections in a tertiary care hospital in Brazil. *Mycoses*, v. 61, n. 1, p. 11–21, jan. 2018.

CANNON, R. D. et al. *Candida albicans* drug resistance another way to cope with stress. *Microbiology*, v. 153, n. 10, p. 3211–3217, 1 out. 2007.

CAPOTE-BONATO, F. et al. Murine model for the evaluation of candiduria caused by *Candida tropicalis* from biofilm. *Microbial Pathogenesis*, v. 117, p. 170–174, abr. 2018.

CARREGARO, F. B. et al. Fungal microbiota isolated from healthy pig skin. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 38, n. 2, p. 147, 27 jun. 2018.

CASSONE, A. et al. Evidence for a Correlation Between Proteinase Secretion and Vulvovaginal Candidosis. *Journal of Infectious Diseases*, v. 156, n. 5, p. 777–783, 1 nov. 1987.

CASTELO-BRANCO, D. S. C. M. et al. Azole-resistant *Candida albicans* from a wild Brazilian porcupine (*Coendou prehensilis*): a sign of an environmental imbalance? *Medical Mycology*, v. 51, n. 5, p. 555–560, jul. 2013.

CAVICCHIOLI, R. et al. Scientists' warning to humanity: microorganisms and climate change. *Nature Reviews Microbiology*, v. 17, n. 9, p. 569–586, set. 2019.

CDC - CANDIDIASIS. Disponível em: <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/index.html>. Acesso em 20 de jan. 2019.

CHAE, J.-H. et al. Purification and characterization of tenecin 4, a new anti-Gram-negative bacterial peptide, from the beetle *Tenebrio molitor*. *Developmental & Comparative Immunology*, v. 36, n. 3, p. 540–546, mar. 2012.

CHAMBERS, J. E. et al. Human and ecological risk assessment of a crop protection chemical: a case study with the azole fungicide epoxiconazole. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 44, n. 2, p. 176–210, fev. 2014.

CHEN, Y.-L. et al. Calcineurin Controls Hyphal Growth, Virulence, and Drug Tolerance of *Candida tropicalis*. *Eukaryotic Cell*, v. 13, n. 7, p. 844–854, jul. 2014.

CHOW, B. D.; LINDEN, J. R.; BLISS, J. M. *Candida parapsilosis* and the neonate: epidemiology, virulence and host defense in a unique patient setting. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, v. 10, n. 8, p. 935–946, ago. 2012.

CLEMENTE, J. C. et al. The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View. *Cell*, v. 148, n. 6, p. 1258–1270, mar. 2012.

CLEVELAND, A. A. et al. Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: results from population-based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008-2011. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 55, n. 10, p. 1352–1361, 15 nov. 2012.

CLEVELAND, A. A. et al. Declining incidence of candidemia and the shifting epidemiology of *Candida* resistance in two US metropolitan areas, 2008-2013: results from population-based surveillance. *PloS One*, v. 10, n. 3, p. e0120452, 2015.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility test for yeasts. Approved Standard, Third Edition. CLSI document M27-A3, v. 28, n. 14, 25p., 2008.

CLSI. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 2nd ed. CLSI supplement M59. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.

CLSI. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 2nd ed. CLSI supplement M60. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.

COHEN-WOLKOWIEZ, M. et al. Neonatal *Candida* meningitis: significance of cerebrospinal fluid parameters and blood cultures. *Journal of Perinatology*, v. 27, n. 2, p. 97–100, fev. 2007.

COLOMBO, A. L. et al. Brazilian guidelines for the management of candidiasis – a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 17, n. 3, p. 283–312, maio 2013.

CONCEA. Disponível em: [https://www.sbcal.org.br/conteudo/view?ID\\_CONTEUDO=41](https://www.sbcal.org.br/conteudo/view?ID_CONTEUDO=41). Acesso em 20 fev. 2019.

CORMACK, B. P. An Adhesin of the Yeast Pathogen *Candida glabrata* Mediating Adherence to Human Epithelial Cells. *Science*, v. 285, n. 5427, p. 578–582, 23 jul. 1999.

COSTA, A. C. B. P. et al. Methods for obtaining reliable and reproducible results in studies of *Candida* biofilms formed in vitro. *Mycoses*, v. 56, n. 6, p. 614–622, nov. 2013.

COSTE, A. T. et al. TAC1 Transcriptional Activator of CDR Genes, Is a New Transcription Factor Involved in the Regulation of *Candida albicans* ABC Transporters CDR1 and CDR2. *Eukaryotic Cell*, v. 3, n. 6, p. 1639–1652, dez. 2004.

COWEN, L. E. et al. Mechanisms of Antifungal Drug Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 5, n. 7, p. a019752, jul. 2015.

COWEN, L. E. Hsp90 Potentiates the Rapid Evolution of New Traits: Drug Resistance in Diverse Fungi. *Science*, v. 309, n. 5744, p. 2185–2189, 30 set. 2005.

COWEN, L. E.; STEINBACH, W. J. Stress, Drugs, and Evolution: the Role of Cellular Signaling in Fungal Drug Resistance. *Eukaryotic Cell*, v. 7, n. 5, p. 747–764, maio 2008.

CSANK, C. *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. FEMS Microbiology Letters, v. 189, n. 1, p. 115–120, 1 ago. 2000.

CUI, L.; MORRIS, A.; GHEDIN, E. The human mycobiome in health and disease. Genome Medicine, v. 5, n. 7, p. 63, 2013.

DA COSTA, V. G. et al. Nosocomial Bloodstream *Candida* Infections in a Tertiary-Care Hospital in South Brazil: A 4-Year Survey. Mycopathologia, v. 178, n. 3–4, p. 243–250, out. 2014.

DA SILVA DANTAS, A. et al. Cell biology of *Candida albicans* –host interactions. Current Opinion in Microbiology, v. 34, p. 111–118, dez. 2016.

DALLA LANA, D. F. et al. Candidaemia Mortality Has not Changed Over the Last 2 Decades in Brazil. Mycopathologia, v. 185, n. 4, p. 685–690, 1 ago. 2020.

DE BERNARDIS, F. et al. Evidence that Members of the Secretory Aspartyl Proteinase Gene Family, in Particular SAP2, Are Virulence Factors for *Candida* Vaginitis. The Journal of Infectious Diseases, v. 179, n. 1, p. 201–208, jan. 1999.

DE GROOT, P. W. J. et al. Adhesins in Human Fungal Pathogens: Glue with Plenty of Stick. Eukaryotic Cell, v. 12, n. 4, p. 470–481, abr. 2013.

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, nov. 2015.

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, p. 125, dez. 2018.

DELARZE, E.; SANGLARD, D. Defining the frontiers between antifungal resistance, tolerance and the concept of persistence. Drug Resistance Updates, v. 23, p. 12–19, nov. 2015.

DEORUKHKAR, S.; SAINI, S. Non-*albicans* *Candida* species: its isolation pattern, species distribution, virulence factors and antifungal susceptibility profile. International Journal of Medical Science and Public Health, v. 2, n. 3, p. 533, 2013.

DESAI, J. V.; MITCHELL, A. P. *Candida albicans* Biofilm Development and Its Genetic Control. *Microbiology Spectrum*, v. 3, n. 3, 25 jun. 2015.

DING, C.; BUTLER, G. Development of a Gene Knockout System in *Candida parapsilosis* Reveals a Conserved Role for BCR1 in Biofilm Formation. *Eukaryotic Cell*, v. 6, n. 8, p. 1310–1319, ago. 2007.

DIXON, D. M.; DUNCAN, R. A.; HURD, N. J. Use of a mouse model to evaluate clinical and environmental isolates of *Sporothrix* spp. from the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, n. 4, p. 951–954, abr. 1992.

DOI, A. M. et al. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. *PLOS ONE*, v. 11, n. 1, p. e0146909, 25 jan. 2016.

DOKE, S. K.; DHAWALE, S. C. Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 23, n. 3, p. 223–229, jul. 2015.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 15, n. 2, p. 167–193, abr. 2002.

DORLING, J.; MORAES, C.; ROLFF, J. Recognition, survival and persistence of *Staphylococcus aureus* in the model host *Tenebrio molitor*. *Developmental & Comparative Immunology*, v. 48, n. 2, p. 284–290, fev. 2015.

DOUGLAS, L. J. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology*, v. 11, n. 1, p. 30–36, jan. 2003.

DRANGINIS, A. M. et al. A Biochemical Guide to Yeast Adhesins: Glycoproteins for Social and Antisocial Occasions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 71, n. 2, p. 282–294, 1 jun. 2007.

DRUMMOND, E. D. et al. Comportamento de amostras ambientais e clínicas de *Cryptococcus neoformans* frente a fungicidas de uso agrônômico e ao fluconazol. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, n. 2, p. 209–211, abr. 2007.

ELLEPOLA, A.; SAMARANAYAKE, L. Inhalational and topical steroids, and oral candidosis: a mini review. *Oral Diseases*, v. 7, n. 4, p. 211–216, jul. 2001.

ELLEPOLA, N. B. et al. Extracellular phospholipase production of oral *Candida albicans* isolates from smokers, diabetics, asthmatics, denture wearers and healthy individuals following brief exposure to polyene, echinocandin and azole antimycotics. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 47, n. 4, p. 911-916, 2016.

ERICSSON, J. et al. Candidaemia in Sweden: a nationwide prospective observational survey. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 19, n. 4, p. E218–E221, 2013.

FAKHIM, H. et al. Comparative virulence of *Candida auris* with *Candida haemulonii*, *Candida glabrata* and *Candida albicans* in a murine model. *Mycoses*, v. 61, n. 6, p. 377–382, jun. 2018.

FALCONE, M. et al. *Candida* Infective Endocarditis: Report of 15 Cases From a Prospective Multicenter Study. *Medicine*, v. 88, n. 3, p. 160–168, maio 2009.

FAN, Y. et al. Hyphae-Specific Genes HGC1, ALS3, HWP1, and ECE1 and Relevant Signaling Pathways in *Candida albicans*. *Mycopathologia*, v. 176, n. 5–6, p. 329–335, dez. 2013.

FERRER, J. Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, v. 71, p. 21–27, dez. 2000.

FIDEL, P. L.; VAZQUEZ, J. A.; SOBEL, J. D. *Candida glabrata* : Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C. albicans*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, n. 1, p. 80–96, 1 jan. 1999.

FILLER, S. G. *Candida*–host cell receptor–ligand interactions. *Current Opinion in Microbiology*, v. 9, n. 4, p. 333–339, ago. 2006.

FINKEL, J. S.; MITCHELL, A. P. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nature Reviews Microbiology*, v. 9, n. 2, p. 109–118, fev. 2011.

FLOWERS, S. A. et al. Gain-of-Function Mutations in UPC2 Are a Frequent Cause of ERG11 Upregulation in Azole-Resistant Clinical Isolates of *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, v. 11, n. 10, p. 1289–1299, out. 2012.

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, jan. 2015.

FORASTIERO, A. et al. Rapid Development of *Candida krusei* Echinocandin Resistance during Caspofungin Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 59, n. 11, p. 6975–6982, nov. 2015.

FOXMAN, B. et al. Prevalence of Recurrent Vulvovaginal Candidiasis in 5 European Countries and the United States: Results From an Internet Panel Survey. *Journal of Lower Genital Tract Disease*, v. 17, n. 3, p. 340–345, jul. 2013.

FRANZ, R. et al. Multiple Molecular Mechanisms Contribute to a Stepwise Development of Fluconazole Resistance in Clinical *Candida albicans* Strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 42, n. 12, p. 3065–3072, 1 dez. 1998.

FRIDMAN, O. et al. Optimization of lag time underlies antibiotic tolerance in evolved bacterial populations. *Nature*, v. 513, n. 7518, p. 418–421, set. 2014.

FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. *Current Opinion in Microbiology*, v. 9, n. 4, p. 346–351, ago. 2006.

GARCÍA-RODAS, R. et al. The Interaction between *Candida krusei* and Murine Macrophages Results in Multiple Outcomes, Including Intracellular Survival and Escape from Killing. *Infection and Immunity*, v. 79, n. 6, p. 2136–2144, jun. 2011.

GASSIEP, I.; DOUGLAS, J.; PLAYFORD, E. G. First report of monomicrobial *Candida parapsilosis* necrotizing fasciitis. *Transplant Infectious Disease*, v. 18, n. 5, p. 752–755, out. 2016.

GHANNOUM, M. A. Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 13, n. 1, p. 122–143, 1 jan. 2000.

GHAZI, S. et al. The epidemiology of *Candida* species in the Middle East and North Africa. *Journal de Mycologie Médicale*, v. 29, n. 3, p. 245–252, set. 2019.

GIACOMAZZI, J. et al. The burden of serious human fungal infections in Brazil. *Mycoses*, v. 59, n. 3, p. 145–150, mar. 2016.

GONÇALVES, B. et al. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 42, n. 6, p. 905–927, nov. 2016.

GONZALEZ, M. R. et al. Bacterial pore-forming toxins: The (w)hole story? *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 65, n. 3, p. 493–507, fev. 2008.

GUARANA, M.; NUCCI, M. Acute disseminated candidiasis with skin lesions: a systematic review. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 24, n. 3, p. 246–250, mar. 2018.

GUO, Z. et al. Effect of Fungal Colonization of Wheat Grains with *Fusarium* spp. on Food Choice, Weight Gain and Mortality of Meal Beetle Larvae (*Tenebrio molitor*). *PLOS ONE*, v. 9, n. 6, p. e100112, 16 jun. 2014.

HAGLER, A. N.; AHEARN, D. G. Ecology of aquatic yeasts. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (Eds.), *The Yeasts: Biology of Yeasts*, second ed. Academic Press, London, pp. 181–205, 1987.

HAGLER, A. N.; AHEARN, D. G. Ecology of aquatic yeasts. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (Eds.), *The Yeasts: Biology of Yeasts*, second ed. Academic Press, London, pp. 181–205, 1987.

HAINÉ, E. R. et al. Temporal patterns in immune responses to a range of microbial insults (*Tenebrio molitor*). *Journal of Insect Physiology*, v. 54, n. 6, p. 1090–1097, jun. 2008.

HAMDI, H.; ABID-ESSEFI, S.; EYER, J. Cytotoxic and genotoxic effects of epoxiconazole on F98 glioma cells. *Chemosphere*, v. 229, p. 314–323, ago. 2019.

HAWSER, S. P.; DOUGLAS, L. J. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 39, n. 9, p. 2128–2131, set. 1995.

HAZEN, K. C. et al. Partial biochemical characterization of cell surface hydrophobicity and hydrophilicity of *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, v. 58, n. 11, p. 3469–3476, nov. 1990.

HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. *Candida* Species Adhesion to Oral Epithelium: Factors Involved and Experimental Methodology Used. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 32, n. 4, p. 217–226, jan. 2006.

HEUZENROEDER, M. W.; WONG, C. Y. F.; FLOWER, R. L. P. Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.: correlation with virulence in a suckling mouse model. *FEMS Microbiology Letters*, v. 174, n. 1, p. 131–136, maio 1999.

HODA, S. et al. Antifungal Resistance Analysis of Environmental Isolates of *Aspergillus* in North India. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, v. 13, n. 1, p. 385–392, 31 mar. 2019.

HOYER, L. L. et al. *Candida albicans* ALS1: domains related to a *Saccharomyces cerevisiae* sexual agglutinin separated by a repeating motif. *Molecular Microbiology*, v. 15, n. 1, p. 39–54, jan. 1995.

HOYER, L. L. et al. Characterization of agglutinin-like sequence genes from non-*albicans Candida* and phylogenetic analysis of the ALS family. *Genetics*, v. 157, n. 4, p. 1555–1567, abr. 2001.

HOYER, L. L. The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, v. 9, n. 4, p. 176–180, abr. 2001.

HUANG, G. et al. CO<sub>2</sub> Regulates White-to-Opaque Switching in *Candida albicans*. *Current Biology*, v. 19, n. 4, p. 330–334, fev. 2009.

HUBE, B. et al. Functional aspects of secreted *Candida* proteinases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 436, p. 339–344, 1998.

HUBE, B.; NAGLIK, J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology*, v. 147, n. 8, p. 1997–2005, 1 ago. 2001.

HUFFNAGLE, G. B.; NOVERR, M. C. The emerging world of the fungal microbiome. *Trends in Microbiology*, v. 21, n. 7, p. 334–341, jul. 2013.

JACOBSEN, I. D.; HUBE, B. *Candida albicans* morphology: still in focus. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, v. 15, n. 4, p. 327–330, 3 abr. 2017.

JACOBSEN, I. D. et al. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, v. 10, n. 1, p. 85–93, jan. 2012.

JACOBSEN, I. D. *Galleria mellonella* as a model host to study virulence of *Candida*. *Virulence*, v. 5, n. 2, p. 237–239, 15 fev. 2014.

JAIN, N.; HASAN, F.; FRIES, B. C. Phenotypic switching in fungi. *Current Fungal Infection Reports*, v. 2, n. 3, p. 180–188, set. 2008.

JIANG, C. et al. Significance of hyphae formation in virulence of *Candida tropicalis* and transcriptomic analysis of hyphal cells. *Microbiological Research*, v. 192, p. 65–72, nov. 2016.

JOHAL, H. S. et al. Advanced topical drug delivery system for the management of vaginal candidiasis. *Drug Delivery*, v. 23, n. 2, p. 550–563, 12 fev. 2016.

JOHNSON, K. V.-A.; FOSTER, K. R. Why does the microbiome affect behaviour? *Nature Reviews Microbiology*, v. 16, n. 10, p. 647–655, out. 2018.

JOHNSTON, P. R.; MAKAROVA, O.; ROLFF, J. Inducible Defenses Stay Up Late: Temporal Patterns of Immune Gene Expression in *Tenebrio molitor*. *Genes|Genomes|Genetics*, v. 4, n. 6, p. 947–955, jun. 2014.

JUNG, P. et al. *Candida albicans* adhesion to central venous catheters: Impact of blood plasma-driven germ tube formation and pathogen-derived adhesins. *Virulence*, v. 11, n. 1, p. 1453–1465, 1 jan. 2020.

KENNEDY, M. J. et al. Variation in adhesion and cell surface hydrophobicity in *Candida albicans* white and opaque phenotypes. *Mycopathologia*, v. 102, n. 3, p. 149–156, jun. 1988.

KIMURA, L. H.; PEARSALL, N. N. Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. *Infection and Immunity*, v. 21, n. 1, p. 64–68, jul. 1978.

KNEALE, M. et al. Global access to antifungal therapy and its variable cost. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 71, n. 12, p. 3599–3606, dez. 2016.

KOEHLER, P. et al. Morbidity and mortality of candidaemia in Europe: an epidemiologic meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 25, n. 10, p. 1200–1212, out. 2019.

KOCHKINA, G. et al. Ancient fungi in Antarctic permafrost environments. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 82, n. 2, p. 501–509, nov. 2012.

KOH, A. Y. et al. Mucosal Damage and Neutropenia Are Required for *Candida albicans* Dissemination. *PLoS Pathogens*, v. 4, n. 2, p. e35, 2008.

KOJIC, E. M.; DAROUICHE, R. O. *Candida* Infections of Medical Devices. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 17, n. 2, p. 255–267, 1 abr. 2004.

KREUSCH, A.; KARSTAEDT, A. S. Candidemia among adults in Soweto, South Africa, 1990-2007. *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*, v. 17, n. 8, p. e621-623, ago. 2013

KRYSAN, D. J.; SUTTERWALA, F. S.; WELLINGTON, M. Catching Fire: *Candida albicans*, Macrophages, and Pyroptosis. *PLoS Pathogens*, v. 10, n. 6, p. e1004139, 26 jun. 2014.

KULESZA, K. et al. Potentially pathogenic fungi of the *Candida* genus isolated from the Łyna River – a 20-year study. *Annals of Parasitology*, v. 64, n. 3, p. 217–223, 2018.

KULLBERG, B. J.; ARENDRUP, M. C. Invasive Candidiasis. *New England Journal of Medicine*, v. 373, n. 15, p. 1445–1456, 8 out. 2015.

KUMAMOTO, C. A.; VINCES, M. D. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence: *Candida albicans* morphogenesis and virulence. *Cellular Microbiology*, v. 7, n. 11, p. 1546–1554, 6 set. 2005.

KURTZMAN C., FELL J.W., BOEKHOUT T. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. London, United Kingdom: Elsevier, 2011.

KVAAL, C. et al. Misexpression of the opaque-phase-specific gene PEP1 (SAP1) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse

model of cutaneous infection. *Infection and Immunity*, v. 67, n. 12, p. 6652–6662, dez. 1999.

LAI, G. C.; TAN, T. G.; PAVELKA, N. The mammalian mycobiome: A complex system in a dynamic relationship with the host. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, v. 11, n. 1, p. e1438, jan. 2019.

LAMOTH, F. et al. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 73, n. suppl\_1, p. i4–i13, 01 2018.

LARONE, D. H. *Medically Important Fungi: A Guide to Identification*, Fifth Edition. [S.l.]: American Society of Microbiology, 2011.

LAUSCHKE, K. et al. Transcriptomic changes upon epoxiconazole exposure in a human stem cell-based model of developmental toxicity. *Chemosphere*, v. 284, p. 131225, dez. 2021.

LEE, K. L.; BUCKLEY, H. R.; CAMPBELL, C. C. An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycellal and yeast forms of *Candida albicans*. *Medical Mycology*, v. 13, n. 2, p. 148–153, jan. 1975.

LEGRAND, M. et al. Homozygosity at the MTL locus in clinical strains of *Candida albicans*: karyotypic rearrangements and tetraploid formation. *Molecular Microbiology*, v. 52, n. 5, p. 1451–1462, jun. 2004.

LEWIS, K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature Reviews Microbiology*, v. 5, n. 1, p. 48–56, jan. 2007.

LEWIS, R. E. et al. Epidemiology and sites of involvement of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies: a 20-year autopsy study. *Mycoses*, v. 56, n. 6, p. 638–645, nov. 2013.

LI, F. et al. Eap1p, an Adhesin That Mediates *Candida albicans* Biofilm Formation In Vitro and In Vivo. *Eukaryotic Cell*, v. 6, n. 6, p. 931–939, jun. 2007.

LIU, S. et al. Baseline sensitivity and control efficacy of epoxiconazole against *Fusarium graminearum* in Henan Province, China. *European Journal of Plant Pathology*, v. 157, n. 4, p. 825–833, ago. 2020.

LIU, H. Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*. *Current Opinion in Microbiology*, v. 4, n. 6, p. 728–735, 1 dez. 2001.

LOCKHART, S. R. et al. Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris* on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. *Clinical Infectious Diseases*, v. 64, n. 2, p. 134–140, 15 jan. 2017.

LÓPEZ-FUENTES, E. et al. Chromatin Loop Formation Induced by a Subtelomeric Protosilencer Represses EPA Genes in *Candida glabrata*. *Genetics*, p. genetics.301202.2018, 12 jul. 2018.

LUO, G.; SAMARANAYAKE, L. P.; YAU, J. Y. Y. *Candida* Species Exhibit Differential In Vitro Hemolytic Activities. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n. 8, p. 2971–2974, 1 ago. 2001.

MACCALLUM, D. M. Hosting Infection: Experimental Models to Assay *Candida* Virulence. *International Journal of Microbiology*, v. 2012, p. 1–12, 2012.

MACIEL, N. O. et al. Occurrence, antifungal susceptibility, and virulence factors of opportunistic yeasts isolated from Brazilian beaches. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 114, p. e180566, 2019.

MACPHERSON, S. et al. *Candida albicans* Zinc Cluster Protein Upc2p Confers Resistance to Antifungal Drugs and Is an Activator of Ergosterol Biosynthetic Genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, n. 5, p. 1745–1752, maio 2005.

MAH, T.-F. C.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, v. 9, n. 1, p. 34–39, jan. 2001.

MANFRIN, J. et al. Contamination by lead in sediments at Toledo River, hydrographic basin of PARANÁ III. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 190, n. 4, p. 243, 23 mar. 2018.

MARCHETTO, M.; NOQUELLI, L. H.; ALVES, M. F. Qualidade e enquadramento dos recursos hídricos na bacia do rio Cuiabá na região metropolitana de Cuiabá. *E&S Engineering and Science*, v. 8, n. 3, p. 2–20, 29 nov. 2019.

MARCOS-ZAMBRANO, L. J. et al. *Candida* isolates causing candidemia show different degrees of virulence in *Galleria mellonella*. *Medical Mycology*, v. 58, n. 1, p. 83–92, 1 jan. 2020.

MARTINS, J. E. C.; MELO, N. T.; HEINS-VACCARI, E. M. *Atlas de Micologia Médica*. Barueri, SP: Manole, 2005, p. 50-57.

MATHÉ, L.; VAN DIJCK, P. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Current Genetics*, v. 59, n. 4, p. 251–264, nov. 2013.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, v. 4, n. 2, p. 119–128, 15 fev. 2013.

MAYNARD, J. et al. Projections of climate conditions that increase coral disease susceptibility and pathogen abundance and virulence. *Nature Climate Change*, v. 5, n. 7, p. 688–694, jul. 2015.

MCCARTY, T. P.; PAPPAS, P. G. Invasive Candidiasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 30, n. 1, p. 103–124, mar. 2016.

MCMANUS, B. A.; COLEMAN, D. C. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Candida albicans*. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 21, p. 166–178, jan. 2014.

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, ago. 2008.

MELVILLE, P. A. et al. Determinação da microbiota presente na cloaca e orofaringe de avestruzes (*Struthio camelus*) clinicamente sadios. *Ciência Rural*, v. 34, n. 6, p. 1871–1876, dez. 2004.

MENDES GIANNINI, M. J. S. et al. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*, v. 62, n. 1, p. 10–24, 1 jan. 2013.

MEYER S., PAYNE R.W. & YARROW D. (1998) *Candida* Berkhout. *The Yeasts: ATaxonomic Study*, 4th edn (Kurtzman CP & Fell JW, eds), pp. 454–573. Elsevier., Amsterdam, the Netherlands.

MILLSOP, J. W.; FAZEL, N. Oral candidiasis. *Clinics in Dermatology*, v. 34, n. 4, p. 487–494, jul. 2016.

MOK, W. Y. et al. Ecology of pathogenic yeasts in Amazonian soil. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 47, n. 2, p. 390–394, 1984.

MORIO, F. Dear medical mycologists, it is time to look outside the box. *FEMS Yeast Research*, v. 20, n. 1, p. foz080, 1 fev. 2020.

MORROW, B.; SRIKANTHA, T.; SOLL, D. R. Transcription of the gene for a pepsinogen, PEP1, is regulated by white-opaque switching in *Candida albicans*. *Molecular and Cellular Biology*, v. 12, n. 7, p. 2997–3005, jul. 1992.

MUADCHEINGKA, T.; TANTIVITAYAKUL, P. Distribution of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species in oral candidiasis patients: Correlation between cell surface hydrophobicity and biofilm forming activities. *Archives of Oral Biology*, v. 60, n. 6, p. 894–901, jun. 2015.

MUKAREMERA, L. et al. *Candida albicans* Yeast, Pseudohyphal, and Hyphal Morphogenesis Differentially Affects Immune Recognition. *Frontiers in Immunology*, v. 8, p. 629, 7 jun. 2017.

MYLONAKIS, E.; ABALLAY, A. Worms and Flies as Genetically Tractable Animal Models To Study Host-Pathogen Interactions. *Infection and Immunity*, v. 73, n. 7, p. 3833–3841, 1 jul. 2005.

NAGLIK, J. et al. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cellular Microbiology*, v. 6, n. 10, p. 915–926, out. 2004.

NAKAMURA-VASCONCELOS, S. S. et al. Emergence of *Candida glabrata* in vulvovaginal candidiasis should be attributed to selective pressure or virulence ability? *Archives of Gynecology and Obstetrics*, v. 296, n. 3, p. 519–526, set. 2017.

NAKHLEH, J.; EL MOUSSAWI, L.; OSTA, M. A. The Melanization Response in Insect Immunity. *Advances in Insect Physiology*. [S.I.]: Elsevier, 2017. v. 52. p. 83–109.

NASH, E. E. et al. A Murine Model of *Candida glabrata* Vaginitis Shows No Evidence of an Inflammatory Immunopathogenic Response. PLOS ONE, v. 11, n. 1, p. e0147969, 25 jan. 2016.

NAYAK, A. P.; GREEN, B. J.; BEEZHOLD, D. H. Fungal hemolysins. Medical Mycology, v. 51, n. 1, p. 1–16, 1 jan. 2013.

NETT, J. E. et al. Role of Fks1p and Matrix Glucan in *Candida albicans* Biofilm Resistance to an Echinocandin, Pyrimidine, and Polyene. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 54, n. 8, p. 3505–3508, 1 ago. 2010.

NETT, J. The Host's Reply to *Candida* Biofilm. Pathogens, v. 5, n. 1, p. 33, 18 mar. 2016.

NEVILLE, B. A.; D'ENFERT, C.; BOUGNOUX, M.-E. *Candida albicans* commensalism in the gastrointestinal tract. FEMS Yeast Research, v. 15, n. 7, 1 nov. 2015.

NGAMSKULRUNGROJ, P. et al. Global VGIIa isolates are of comparable virulence to the major fatal *Cryptococcus gattii* Vancouver Island outbreak genotype. Clinical Microbiology and Infection, v. 17, n. 2, p. 251–258, fev. 2011.

NILSSON, R. H. et al. Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi. Nature Reviews Microbiology, v. 17, n. 2, p. 95–109, fev. 2019.

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, jan. 2012.

NOBILE, C. J.; JOHNSON, A. D. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. Annual Review of Microbiology, v. 69, n. 1, p. 71–92, 15 out. 2015.

NOVERR, M. C. et al. Development of Allergic Airway Disease in Mice following Antibiotic Therapy and Fungal Microbiota Increase: Role of Host Genetics, Antigen, and Interleukin-13. Infection and Immunity, v. 73, n. 1, p. 30–38, 1 jan. 2005.

NUCCI, M. et al. Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. PLoS ONE, v. 8, n. 3, p. e59373, 19 mar. 2013.

ODDS, F. C. Ecology and Epidemiology of *Candida* Species. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. Abt. Originale. A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie, v. 257, n. 2, p. 207–212, jul. 1984.

OPPERT, B. et al. Transcriptome Profiling of the Intoxication Response of *Tenebrio molitor* Larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa Protoxin. PLoS ONE, v. 7, n. 4, p. e34624, 25 abr. 2012.

OPULENTE, D. A. et al. Pathogenic budding yeasts isolated outside of clinical settings. FEMS Yeast Research, v. 19, n. 3, p. foz032, 1 maio 2019.

ORTEGA-RIVEROS, M. et al. Usefulness of the Non-conventional *Caenorhabditis elegans* Model to Assess *Candida* Virulence. Mycopathologia, v. 182, n. 9–10, p. 785–795, out. 2017.

PAPPAS, P. G. et al. Invasive candidiasis. Nature Reviews Disease Primers, v. 4, p. 18026, 11 maio 2018.

PERLIN, D. S. Mechanisms of echinocandin antifungal drug resistance: Mechanism of echinocandin drug resistance. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 1354, n. 1, p. 1–11, set. 2015.

PERLIN, D. S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. The Lancet Infectious Diseases, v. 17, n. 12, p. e383–e392, dez. 2017.

PERLIN, D. S.; SHOR, E.; ZHAO, Y. Update on Antifungal Drug Resistance. Current Clinical Microbiology Reports, v. 2, n. 2, p. 84–95, jun. 2015.

PERLROTH, J.; CHOI, B.; SPELLBERG, B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. Medical Mycology, v. 45, n. 4, p. 321–346, jan. 2007.

PARRINO, S. M. et al. cAMP-independent signal pathways stimulate hyphal morphogenesis in *Candida albicans*: Hyphal induction pathways. Molecular Microbiology, v. 103, n. 5, p. 764–779, mar. 2017.

PIERCE, C. G. et al. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nature Protocols*, v. 3, n. 9, p. 1494–1500, ago. 2008.

POIKONEN, E. et al. Secular trend in candidemia and the use of fluconazole in Finland, 2004-2007. *BMC infectious diseases*, v. 10, p. 312, 28 out. 2010.

POLKE, M.; HUBE, B.; JACOBSEN, I. D. *Candida* Survival Strategies. *Advances in Applied Microbiology*. [S.l.]: Elsevier, 2015. v. 91. p. 139–235. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065216414000537>>. Acesso em: 25 set. 2019.

POTERA, C. MICROBIOLOGY: Forging a Link Between Biofilms and Disease. *Science*, v. 283, n. 5409, p. 1837–1839, 19 mar. 1999.

POTOCKI, L. et al. Synthetic Pesticides Used in Agricultural Production Promote Genetic Instability and Metabolic Variability in *Candida* spp. *Genes*, v. 11, n. 8, p. 848, 24 jul. 2020.

PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Medical Mycology*, v. 20, n. 1, p. 7–14, jan. 1982.

PUÉRTOLAS-BALINT, F. et al. Revealing the Virulence Potential of Clinical and Environmental *Aspergillus fumigatus* Isolates Using Whole-Genome Sequencing. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, p. 1970, 4 set. 2019.

QUINDÓS, G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Revista Iberoamericana De Micologia*, v. 31, n. 1, p. 42–48, mar. 2014.

QUINDÓS, G. et al. The continuous changes in the aetiology and epidemiology of invasive candidiasis: from familiar *Candida albicans* to multiresistant *Candida auris*. *International Microbiology*, v. 21, n. 3, p. 107–119, 1 set. 2018.

RAFFEL, T. R. et al. Disease and thermal acclimation in a more variable and unpredictable climate. *Nature Climate Change*, v. 3, n. 2, p. 146–151, fev. 2013.

RAMAGE, G. et al. *Candida* Biofilms: an Update: FIG. 1. *Eukaryotic Cell*, v. 4, n. 4, p. 633–638, abr. 2005.

RAPALA-KOZIK, M. et al. Extracellular proteinases of *Candida* species pathogenic yeasts. *Molecular Oral Microbiology*, v. 33, n. 2, p. 113–124, abr. 2018.

RAUTEMAA, R.; RAMAGE, G. Oral candidosis – Clinical challenges of a biofilm disease. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 37, n. 4, p. 328–336, nov. 2011.

RAWLINGS, N. D.; SALVESEN, G. (Org.). *Handbook of proteolytic enzymes*. Third edition ed. Amsterdam: Elsevier/AP, 2013.

RAYMUNDO, M. M.; GOLDIM, J. R. Ética da pesquisa em modelos animais. *Bioética*, v. 10, n. 1, 2002.

RENAMA- REDE NACIONAL DE MÉTODOS ALTERNATIVOS. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/ciencia/SEPED/Saude/renama/renama.html>. Acesso em 20 fev. 2019.

RIBEIRO BASTOS, A. E. et al. Salt-tolerant phenol-degrading microorganisms isolated from Amazonian soil samples. *Archives of Microbiology*, v. 174, n. 5, p. 346–352, 20 nov. 2000.

RICHARDSON; JEMIMA HO; JULIAN NAGLIK. *Candida*–Epithelial Interactions. *Journal of Fungi*, v. 4, n. 1, p. 22, 8 fev. 2018.

ŘIČICOVÁ, M. et al. *Candida albicans* biofilm formation in a new in vivo rat model. *Microbiology*, v. 156, n. 3, p. 909–919, 1 mar. 2010.

ROCHA, C. R. C. et al. Signaling through Adenylyl Cyclase Is Essential for Hyphal Growth and Virulence in the Pathogenic Fungus *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell*, v. 12, n. 11, p. 3631–3643, nov. 2001.

ROCHA, M. F. G. et al. Cross-resistance to fluconazole induced by exposure to the agricultural azole tetraconazole: an environmental resistance school? *Mycoses*, v. 59, n. 5, p. 281–290, maio 2016.

RODRIGUEZ, L. et al. A multi-centric Study of *Candida* bloodstream infection in Lima-Callao, Peru: Species distribution, antifungal resistance and clinical outcomes. *PLOS ONE*, v. 12, n. 4, p. e0175172, 18 abr. 2017.

ROSSI, D. C. P. et al. *Candida albicans* FRE8 encodes a member of the NADPH oxidase family that produces a burst of ROS during fungal morphogenesis. *PLOS Pathogens*, v. 13, n. 12, p. e1006763, 1 dez. 2017.

RUEDA, C. et al. Evaluation of the possible influence of trailing and paradoxical effects on the clinical outcome of patients with candidemia. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 23, n. 1, p. 49.e1-49.e8, jan. 2017.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. The principles of humane experimental technique. Special ed ed. Potters Bar: UFAW, 1992.

SAIMAN, L. et al. Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients: *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 20, n. 12, p. 1119–1124, dez. 2001.

SAMARANAYAKE, Y. H. et al. Differential phospholipase gene expression by *Candida albicans* in artificial media and cultured human oral epithelium. *APMIS*, v. 114, n. 12, p. 857–866, dez. 2006.

SANGLARD, D. et al. Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 42, n. 2, p. 241–253, fev. 1998.

SANTIAGO, I. F. et al. Lichensphere: a protected natural microhabitat of the non-lichenised fungal communities living in extreme environments of Antarctica. *Extremophiles*, v. 19, n. 6, p. 1087–1097, nov. 2015.

SASSANI, E. et al. Pseudohyphae formation in *Candida glabrata* due to CO<sub>2</sub> exposure. *Current Medical Mycology*, v. 2, n. 4, p. 49–53, 1 dez. 2016.

SAVINI, V. et al. What do we know about *Candida guilliermondii*? A voyage throughout past and current literature about this emerging yeast: What do we know about *Candida guilliermondii*? *Mycoses*, v. 54, n. 5, p. 434–441, set. 2011.

SCHALLER, M. et al. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*, v. 48, n. 6, p. 365–377, nov. 2005.

SCHMIEDEL, Y.; ZIMMERLI, S. Common invasive fungal diseases: an overview of invasive candidiasis, aspergillosis, cryptococcosis, and *Pneumocystis pneumonia*. *Swiss Medical Weekly*, 22 fev. 2016.

SCHROECKENSTEIN, D.; MEIERDAVIS, S.; BUSH, R. Occupational sensitivity to *Tenebrio molitor* linnaeus (yellow mealworm). *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 86, n. 2, p. 182–188, ago. 1990.

SCHULZ, B. et al. Difference in virulence between fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant *Candida albicans* in a mouse model: Difference in virulence of *C. albicans* isolates. *Mycoses*, v. 54, n. 5, p. e522–e530, set. 2011.

SENEVIRATNE, C. J. et al. Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Archives of Oral Biology*, v. 54, n. 11, p. 1052–1060, nov. 2009.

SHEEHAN, G.; KAVANAGH, K. Analysis of the early cellular and humoral responses of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. *Virulence*, v. 9, n. 1, p. 163–172, 31 dez. 2018.

SHIN, J. H. et al. Biofilm Production by Isolates of *Candida* Species Recovered from Nonneutropenic Patients: Comparison of Bloodstream Isolates with Isolates from Other Sources. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 4, p. 1244–1248, 1 abr. 2002.

SHU, C.; SUN, L.; ZHANG, W. Thymol has antifungal activity against *Candida albicans* during infection and maintains the innate immune response required for function of the p38 MAPK signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Immunologic Research*, v. 64, n. 4, p. 1013–1024, 1 ago. 2016.

SIDRIM, J. J. C. et al. Yeast microbiota of natural cavities of manatees (*Trichechus inunguis* and *Trichechus manatus*) in Brazil and its relevance for animal health and management in captivity. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 61, n. 10, p. 763–769, out. 2015.

SILVA, L. N. et al. Virulence of *Candida haemulonii* complex in *Galleria mellonella* and efficacy of classical antifungal drugs: a comparative study with other clinically

relevant non-albicans *Candida* species. *FEMS Yeast Research*, v. 18, n. 7, 1 nov. 2018.

SILVA, S. et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 36, n. 2, p. 288–305, mar. 2012.

SILVA, S. et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 36, n. 2, p. 288–305, mar. 2012.

SINGH, R.; CHAKRABARTI, A. Invasive Candidiasis in the Southeast-Asian Region. In: PRASAD, R. (Org.). *Candida albicans: Cellular and Molecular Biology*. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 25–40.

SLUTSKY, B.; BUFFO, J.; SOLL, D. High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. *Science*, v. 230, n. 4726, p. 666–669, 8 nov. 1985.

SNELDERS, E. et al. Triazole Fungicides Can Induce Cross-Resistance to Medical Triazoles in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS ONE*, v. 7, n. 3, p. e31801, 1 mar. 2012.

SOLL, D. R. High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 5, n. 2, p. 183–203, abr. 1992.

SOUZA, W. A.; SIQUEIRA, A. M. Ocorrência de *Candida albicans* em intestinos de bovinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 55, n. 3, p. 262–265, jun. 2003.

SPELLBERG B., MARR K., FILLER S.G. *Candida*: What Should Clinicians and Scientists Be Talking About? In: Calderone RA, Clancy, C.J., ed. *Candida and Candidiasis*: ASM Press, Washington, DC, pp. 225-242., 2012.

SPENCER, L. T.; BANCROFT, J. D. Tissue processing in: *Theory and Practice of Histological Techniques*. Gamble M, Bancroft JD (ed.) (2008).

STAMMLER, G. et al. Sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* isolates from Tunisia to epoxiconazole and pyraclostrobin. *Crop Protection*, v. 34, p. 32–36, abr. 2012.

ST-GERMAIN, G. et al. Epidemiology and antifungal susceptibility of bloodstream *Candida* isolates in Quebec: Report on 453 cases between 2003 and 2005. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology = Journal Canadien Des Maladies Infectieuses Et De La Microbiologie Medicale*, v. 19, n. 1, p. 55–62, jan. 2008.

SUDBERY, P. E. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nature Reviews Microbiology*, v. 9, n. 10, p. 737–748, out. 2011.

SUNDSTROM, P. Adhesion in *Candida* spp. *Cellular Microbiology*, v. 4, n. 8, p. 461–469, ago. 2002.

SZABO, E. K.; MACCALLUM, D. M. The contribution of mouse models to our understanding of systemic candidiasis: Modelling systemic *Candida* infection in mice. *FEMS Microbiology Letters*, v. 320, n. 1, p. 1–8, jul. 2011.

TAEI, M.; CHADEGANIPOUR, M.; MOHAMMADI, R. An alarming rise of non-albicans *Candida* species and uncommon yeasts in the clinical samples; a combination of various molecular techniques for identification of etiologic agents. *BMC Research Notes*, v. 12, n. 1, p. 779, dez. 2019.

TAN, B. H. et al. Incidence and species distribution of candidaemia in Asia: a laboratory-based surveillance study. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 21, n. 10, p. 946–953, out. 2015.

TANG, Y. et al. The changes of antifungal susceptibilities caused by the phenotypic switching of *Candida* species in 229 patients with vulvovaginal candidiasis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, v. 33, n. 1, p. e22644, jan. 2019.

TATI, S. et al. *Candida glabrata* Binding to *Candida albicans* Hyphae Enables Its Development in Oropharyngeal Candidiasis. *PLOS Pathogens*, v. 12, n. 3, p. e1005522, 30 mar. 2016.

TEOH, F.; PAVELKA, N. How Chemotherapy Increases the Risk of Systemic Candidiasis in Cancer Patients: Current Paradigm and Future Directions. *Pathogens*, v. 5, n. 1, p. 6, 15 jan. 2016.

- THEWES, S. Calcineurin-Crz1 Signaling in Lower Eukaryotes. *Eukaryotic Cell*, v. 13, n. 6, p. 694–705, jun. 2014.
- THOMPSON, D. S.; CARLISLE, P. L.; KADOSH, D. Coevolution of Morphology and Virulence in *Candida* Species. *Eukaryotic Cell*, v. 10, n. 9, p. 1173–1182, set. 2011.
- TINDWA, H. et al. Cloning, Characterization and Effect of TmPGRP-LE Gene Silencing on Survival of *Tenebrio molitor* against *Listeria monocytogenes* Infection. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 14, n. 11, p. 22462–22482, 14 nov. 2013.
- TÓTH, R. et al. Investigation of *Candida parapsilosis* virulence regulatory factors during host-pathogen interaction. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, dez. 2018.
- TROFA, D.; GACSER, A.; NOSANCHUK, J. D. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 21, n. 4, p. 606–625, 1 out. 2008.
- TSANG, C. S. P. et al. Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Medical Microbiology*, v. 56, n. 10, p. 1393–1398, 1 out. 2007.
- TSUCHIMORI, N. et al. Reduced Virulence of HWP1-Deficient Mutants of *Candida albicans* and Their Interactions with Host Cells. *Infection and Immunity*, v. 68, n. 4, p. 1997–2002, 1 abr. 2000.
- TSUI, C. K. M. et al. Re-examining the phylogeny of clinically relevant *Candida* species and allied genera based on multigene analyses: Multigene phylogeny of clinical *Candida* species. *FEMS Yeast Research*, v. 8, n. 4, p. 651–659, 30 jan. 2008.
- TSUI, C.; KONG, E. F.; JABRA-RIZK, M. A. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathogens and Disease*, v. 74, n. 4, p. ftw018, jun. 2016.
- UNDERHILL, D. M.; ILIEV, I. D. The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nature Reviews Immunology*, v. 14, n. 6, p. 405–416, jun. 2014.

VALLABHANENI, S. et al. The Global Burden of Fungal Diseases. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 30, n. 1, p. 1–11, mar. 2016.

VANDEN BOSSCHE, H.; MARICHAL, P.; ODDS, F. C. Molecular mechanisms of drug resistance in fungi. *Trends in Microbiology*, v. 2, n. 10, p. 393–400, out. 1994.

VARGAS, K. et al. Elevated phenotypic switching and drug resistance of *Candida albicans* from human immunodeficiency virus-positive individuals prior to first thrush episode. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 10, p. 3595–3607, out. 2000.

VIGNERON, A. et al. Immune Defenses of a Beneficial Pest: The Mealworm Beetle, *Tenebrio molitor*. *Frontiers in Physiology*, v. 10, p. 138, 12 mar. 2019.

VILA, T. et al. Targeting *Candida albicans* filamentation for antifungal drug development. *Virulence*, v. 8, n. 2, p. 150–158, 17 fev. 2017.

WÄCHTLER, B. et al. *Candida albicans*-Epithelial Interactions: Dissecting the Roles of Active Penetration, Induced Endocytosis and Host Factors on the Infection Process. *PLoS ONE*, v. 7, n. 5, p. e36952, 14 maio 2012.

WALL, G.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Current Antimycotics, New Prospects, and Future Approaches to Antifungal Therapy. *Antibiotics*, v. 9, n. 8, p. 445, 25 jul. 2020.

WHALEY, S. G. et al. Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans Candida* Species. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, 12 jan. 2017.

WILSON, D.; NAGLIK, J. R.; HUBE, B. The Missing Link between *Candida albicans* Hyphal Morphogenesis and Host Cell Damage. *PLOS Pathogens*, v. 12, n. 10, p. e1005867, 20 out. 2016.

WOLFGANG, M. C. et al. Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas*

*aeruginosa*. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 100, n. 14, p. 8484–8489, 8 jul. 2003.

YANG, Y.-L. et al. Comparison of Human and Soil *Candida tropicalis* Isolates with Reduced Susceptibility to Fluconazole. PLoS ONE, v. 7, n. 4, p. e34609, 5 abr. 2012.

YANG, Y.-L. Virulence factors of *Candida* species. Journal of Microbiology, Immunology, and Infection, v. 36, n. 4, p. 223–228, dez. 2003.

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. Therapeutics and Clinical Risk Management, p. 95, fev. 2014.

YING, S.; CHUNYANG, L. Correlation between phospholipase of *Candida albicans* and resistance to fluconazole. Mycoses, v. 55, n. 1, p. 50–55, jan. 2012.

YUAN, S.-M. Fungal Endocarditis. Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery, 2016. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/1678-9741.20160026>>. Acesso em: 5 fev. 2020.

ZADMANESH, J. et al. Filamentation Involves Two Overlapping, but Distinct, Programs of Filamentation in the Pathogenic Fungus *Candida albicans*. Genes|Genomes|Genetics, v. 7, n. 11, p. 3797–3808, nov. 2017.

ZAHRA ABD AL-KARREM, Z. K. I. Virulence Compartment between Clinical and Environmental *Candida albicans* Isolates. International Journal of Medical Science and Clinical invention, v. 1, n. 10, 18 Dec. 2014.

ZARNOWSKI, R. et al. *Candida albicans* biofilm–induced vesicles confer drug resistance through matrix biogenesis. PLOS Biology, v. 16, n. 10, p. e2006872, 8 out. 2018.

ZEUTHEN, M. L.; HOWARD, D. H. Thermotolerance and the Heat-shock Response in *Candida albicans*. Microbiology, v. 135, n. 9, p. 2509–2518, 1 set. 1989.

ZHANG, Y. et al. The gray phenotype and tristable phenotypic transitions in the human fungal pathogen *Candida tropicalis*. Fungal Genetics and Biology, v. 93, p. 10–16, ago. 2016.

ZHAO, Z. et al. Expression, purification, and characterization of phospholipase B1 from *Candida albicans* in *Escherichia coli*. 3 Biotech, v. 10, n. 12, p. 538, dez. 2020.

ZHENG, Q. et al. The PHO pathway regulates white–opaque switching and sexual mating in the human fungal pathogen *Candida albicans*. Current Genetics, v. 66, n. 6, p. 1155–1162, dez. 2020.

## 9- Anexos

Nesta seção será apresentada uma tabela com o compilado dos resultados obtidos na tese e também serão apresentados os artigos produzidos durante o período do doutorado. O primeiro artigo refere-se a uma revisão sobre diagnóstico fúngico. O objetivo deste artigo foi sumarizar as principais técnicas diagnósticas e trazer luz para as lacunas existentes neste campo diagnóstico que trás consequências graves no tratamento e na sobrevida dos pacientes afetados. Este artigo será enviado a revista Brazilian Journal of Microbiology. O segundo artigo apresentado se refere a um mini review acerca da presença de *C. albicans* no ambiente. O artigo busca apresentar um compilado dos principais artigos que mostram a presença de *C. albicans* na natureza. Este artigo está em fase de correções finais e uma revista científica apropriada está sendo avaliada para submissão. O terceiro artigo, também uma revisão da literatura, busca trazer dados sobre o uso de modelos alternativos invertebrados no estudo de infecções fúngicas e como estes animais podem ser ferramentas importantes para o avanço dos estudos de virulência e patogenicidade fúngica. Assim como o artigo citado anteriormente, o artigo sobre modelos invertebrados alternativos está na fase de correções finais e escolha da revista científica para publicação.

**Tabela 06** - Compilado dos resultados experimentais dos testes realizados com os isolados ambientais e clínicos de *C. albicans*

Isolado	Termotolerância						Filamentação			Fosfolipase	Proteinase	MIC				Tenebrio
	25°C	30°C	35°C	40°C	45°C	50°C	SP	SL	LEE		Flu	Itra	AnfB	Epoxi	% L	
<b>CONTROLE</b>																
<b>SC5314</b>	++	++	++	++	++	-	++	+	+	+	2+	0,25	0,125	0,25	32	63
<b>Isolados ambientais baixa influência antrópica</b>																
<b>AM1</b>	++	++	++	++	+	-	+++	+	-	+	1+	0,25	0,125	0,25	32	67
<b>AM2</b>	++	++	++	++	+	-	+++	-	+	+	-	0,25	0,125	0,25	32	77
<b>AM3</b>	++	++	++	++	+	-	+++	-	+	+	1+	0,25	0,125	0,25	32	83
<b>AM4</b>	++	++	++	++	+	-	++	-	-	+	-	0,25	0,03	0,25	0,125	57
<b>AM5</b>	++	++	++	++	+	-	++	-	+	+	1+	0,25	0,06	0,25	32	70
<b>AM6</b>	++	++	++	++	+	-	+++	+	-	+	-	0,25	0,03	0,25	0,125	80
<b>AM7</b>	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	1+	0,25	0,03	0,25	32	67
<b>AM8</b>	++	++	++	++	+	-	+++	+	-	-	-	0,25	0,06	0,25	0,125	77
<b>AM9</b>	++	++	++	++	+	-	-	-	+	++	1+	0,25	0,06	0,25	0,125	74
<b>AM10</b>	++	++	++	++	+	-	-	+	+	++	1+	0,25	0,06	0,25	8	70
<b>AM11</b>	++	++	++	++	+	-	+++	+	-	+	-	0,125	0,125	0,25	0,125	70
<b>AM12</b>	++	++	++	++	+	-	++	+	-	++	1+	0,125	0,06	0,25	32	80
<b>AM13</b>	++	++	++	++	-	-	++	-	-	-	-	1	0,06	0,25	0,125	53
<b>AM14</b>	++	++	++	++	-	-	+	-	+	+	1+	≥64	≥16	0,5	32	43
<b>AM15</b>	++	++	++	++	-	-	+	-	+	+	1+	≥64	≥16	1	32	37
<b>AM16</b>	++	++	++	++	-	-	+	-	+	+	1+	≥64	≥16	1	32	37
<b>Isolados ambientais alta influência antrópica</b>																
<b>AMI1</b>	++	++	++	++	+	-	+++	+	+	+	-	≥64	≥16	0,5	0,125	43
<b>AMI2</b>	++	++	++	++	+	-	+	+	+	+	1+	≥64	≥16	1	0,125	67
<b>AMI3</b>	++	++	++	++	+	-	++	-	+	++	-	≥64	≥16	0,5	0,125	43

<b>AMI4</b>	++	++	++	++	+	-	+++	+	+	++	1+	≥64	≥16	0,5	0,125	90
<b>AMI5</b>	++	++	++	++	+	-	++	+	+	+	1+	≥64	≥16	0,5	32	60
<b>AMI6</b>	++	++	++	++	+	-	+++	+	+	++	1+	≥64	≥16	0,5	32	67
<b>AMI7</b>	++	++	++	++	+	-	+++	++	+	+	-	≥64	≥16	1	16	63
<b>AMI8</b>	++	++	++	++	+	-	++	+	+	+	1+	≥64	≥16	0,5	32	77
<b>AMI9</b>	++	++	++	++	+	-	+++	+	+	+	-	≥64	≥16	0,5	0,125	63
<b>AMI10</b>	++	++	++	++	+	-	+++	+	++	-	-	32	≥16	0,5	16	40
<b>AMI11</b>	++	++	++	++	+	-	+++	+	++	+	-	32	≥16	0,5	32	27
<b>AMI12</b>	++	++	++	++	-	-	+++	-	++	-	2+	32	≥16	0,5	32	40
<b>AMI13</b>	++	++	++	++	-	-	++	-	++	-	1+	≥64	≥16	0,5	32	37
<b>AMI14</b>	++	++	++	++	-	-	+++	-	++	-	-	4	1	1	0,125	40
<b>AMI15</b>	++	++	++	++	-	-	+	++	+	-	-	4	0,25	2	4	37
<b>AMI16</b>	++	++	++	++	-	-	+	++	+	-	-	4	≥16	2	2	60
<b>AMI17</b>	++	++	++	++	-	-	+	++	+	+	-	4	2	2	2	23
<b>AMI18</b>	++	++	++	++	-	-	-	++	+	-	-	4	0,5	2	4	47
<b>AMI19</b>	++	++	++	++	-	-	++	++	++	+	-	2	0,5	1	0,125	30

---

**Isolados Clínicos**


---

<b>CL1</b>	++	++	++	++	++	-	+++	++	-	+	2+	≥64	≥16	0,5	32	50
<b>CL2</b>	++	++	++	++	++	-	+	+	-	-	1+	0,5	≥16	0,5	0,125	87
<b>CL3</b>	++	++	++	++	++	-	+++	+	-	++	1+	0,5	≥16	0,5	16	90
<b>CL4</b>	++	++	++	++	++	-	+++	+	+	+	-	≥64	≥16	0,5	32	50
<b>CL5</b>	++	++	++	++	++	-	+++	+	+	++	-	≥64	≥16	0,5	32	60
<b>CL6</b>	++	++	++	++	++	-	++	++	+	-	-	1	0,25	1	32	83
<b>CL7</b>	++	++	++	++	++	-	+++	+	+	+	1+	0,5	0,25	0,5	0,125	43
<b>CL8</b>	++	++	++	++	++	-	+++	+	+	+	1+	2	≥16	0,5	32	77
<b>CL9</b>	++	++	++	++	++	-	+	+	-	++	1+	0,5	0,125	0,25	0,125	53
<b>CL10</b>	++	++	++	++	++	-	+++	+	+	+	-	≥64	≥16	0,25	32	70

---

<b>CL11</b>	++	++	++	++	++	-	+++	+	+	-	-	0,5	0,125	0,25	0,125	70
<b>CL12</b>	++	++	++	++	++	-	-	+	-	-	1+	≥64	≥16	0,5	32	77
<b>CL13</b>	++	++	++	++	++	-	+++	+	+	++	-	2	0,25	0,25	0,125	43
<b>CL14</b>	++	++	++	++	++	-	+	+	+	+	1+	≥64	≥16	0,25	32	70
<b>CL15</b>	++	++	++	++	++	-	+++	+	+	+	1+	1	0,25	0,25	0,125	100
<b>CL16</b>	++	++	++	++	++	-	+++	+	+	++	2+	1	0,25	0,5	32	53
<b>CL17</b>	++	++	++	++	++	-	+++	++	+	++	-	1	≥16	0,25	32	83
<b>CL18</b>	++	++	++	++	++	-	++	+	+	+	-	16	≥16	0,25	32	53
<b>CL19</b>	++	++	++	++	++	-	+++	++	+	+	-	0,5	0,125	0,25	0,125	60
<b>CL20</b>	++	++	++	++	-	-	+++	+	++	-	2+	1	≥16	0,25	32	33
<b>CL21</b>	++	++	++	++	-	-	+++	-	++	-	2+	2	≥16	0,5	32	23
<b>CL22</b>	++	++	++	++	-	-	+++	+	++	+	2+	8	0,06	1	32	33
<b>CL23</b>	++	++	++	++	-	-	+++	+	+	-	-	≥64	≥16	0,25	32	40
<b>CL24</b>	++	++	++	++	-	-	+++	+	++	-	-	32	≥16	0,25	32	23
<b>CL25</b>	++	++	++	++	-	-	+++	++	++	+	2+	0,25	0,06	0,5	0,125	23
<b>CL26</b>	++	++	++	++	-	-	-	-	+	-	2+	≥64	≥16	0,5	32	30

\*SP= meio SPIDER; SL= meio SLAD; LEE= meio LEE. Flu= fluconazol; itra= itraconazol; AnfB= anfotericina B; Epoxi= epoxiconazol. %L= porcentagem de letalidade.

**9.1- Artigo 01:** Fungal diagnostics: the tools available and the challenges in Brazil and in the world

**Article type:** Review Article

**Title:** Fungal diagnostics: the tools available and the challenges in Brazil and in the world

**Authors:** Aline Dias Valério<sup>1</sup>; Ludmila Baltazar<sup>1</sup>; Danielle Letícia da Silva<sup>1</sup>; Susana Johann<sup>1</sup>

**Affiliations:** <sup>1</sup> Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

**Corresponding author:** Susana Johann – e-mail: sjohann@icb.ufmg.br

**Acknowledgments:** This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant number 2017/146477)

### **Abstract**

Fungal infections affect approximately 1 billion people worldwide, thousands of whom are affected by invasive infections that often become fatal. The high lethality rate of fungal infections is linked, among other issues, to the lack of access to tools that enable a fast and accurate diagnosis. Mycology is neglected in most clinical analysis laboratories worldwide, especially in underdeveloped countries. It can be observed that, in many cases, in addition to the low investment in professional qualifications, the methodologies employed for the diagnosis of fungal infections do not present high sensitivity and specificity. These methodologies range from the simplest (for example, direct microscopy and culture) to the most modern and accurate tests (such as those based on molecular biology and mass spectrometry), which are inaccessible to most laboratories. Thus, lack of access to high quality tools for mycological diagnosis directly affects the patient's treatment and prognosis. Therefore, it is essential to use more accurate methodologies and techniques for diagnosis of fungal infections and provide better training to healthcare professionals to make the right diagnosis. This can have a direct impact on reducing the mortality rates caused by fungal diseases as well as the costs related to treatment.

**Keywords:** fungi, diagnosis, diagnostic tools, fungal infections, mycology

**Declarations:**

**Funding:** This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant number 2017/146477)

**Conflict of Interest:** The authors declare no conflict of interest

**Ethics Approval:** Not applicable

**Consent to participate:** Not applicable

**Consent for publication:** Not applicable

**Availability of data and material:** Not applicable

**Code availability:** Not applicable

**Author Contributions:** A. D. V.: literature search, manuscript writing, manuscript formatting; S. J.: writing, manuscript revision and figure design; L. B and D. L. S.: manuscript revision and figure design.

## **Introduction**

The prevalence of fungal infections poses a serious problem that affects approximately 1 billion people worldwide [1]. It is important to note that some of these infections have high lethality rates, but most are still associated with treatments that incur high costs for both the patient and the hospital. For example, among patients with invasive candidiasis, the lethality rate can vary from 40% to 70% [2, 3, 4, 5]. Factors that contribute to the high lethality of fungal diseases and cause difficulties in treatment include increased use of antibiotics, increased number of invasive surgeries and immunosuppressed patients, use of corticosteroids, and the emergence of isolates resistant to treatment [1]. In addition, most fungal diseases are neglected without proper notice to the patients, which makes it difficult to design public policies for the prevention, diagnosis, and treatment of these diseases. However, under-reporting such infections and diseases makes it difficult to seek funding for research in the field of medical mycology, thereby impacting the training of health professionals, many of whom

have precarious knowledge about the main morphological, physiological, and pathogenic aspects of medically important fungi. This makes it difficult to effectively diagnose and treat fungal diseases [6, 7].

With regard to diagnosis, the world panorama shows a reduced presence of mycologists within diagnostic centers, which impairs the correct identification of infectious etiological agents [8]. Mycological diagnosis is even worse in underdeveloped countries, where the lack of equipment, supplies, and trained professionals can increase the mortality rates of fungal infections and hinder the treatment of infected patients [1, 9]. Erroneous or late diagnosis can be a limiting factor that will determine the patient's survival or progression to death.

Therefore, this review provides a summary of the most commonly used mycological diagnostic techniques in the laboratory. In addition, we will survey the current picture of diagnosis of fungal infections in Brazil and the rest of the world to analyze the impact of these techniques on patients with fungal infections.

## **Methods**

In this review we used articles dated 1949 - 2021 to show the methodologies applied in fungal diagnosis, their evolution over the years and the availability of techniques around the world. We also seek to show the impact that the fungal diagnosis has on the patient's prognosis and on the costs involved in the treatment. For this, we use several keywords in searches on PubMed and Google Scholar such as: fungal diagnosis, fungal infections, diagnostic tools. In addition, by reading several other review articles on the topic, we have compiled relevant information and summarized it in this article. The summary of the main diagnostic techniques presented in the article is represented in figure 4.

## **Techniques for the diagnosis of fungal infections and diseases**

### **Direct microscopy**

Direct microscopy is one of the simplest and most widely used methods for the diagnosis of fungal infections in clinical samples [10, 11, 12]. As it only requires

a few materials for execution, this method can be used in almost all clinical analysis laboratories. However, it has low sensitivity and generally does not respond to the genus or species of the fungus present in the sample [11, 12]. The main objective of direct examination is to detect the presence of fungus in clinical samples. In addition, it is important to observe the fungal morphology, including blastoconidia, filaments, and pseudohyphae, in the sample and correlate it with the results found in the culture [12]. The main materials analyzed by direct microscopic techniques include body fluids, vaginal secretions, hair, nails, and skin. Potassium hydroxide (KOH) in 10% to 40% concentration can be used to degrade the patient's cells, facilitating fungal visualization [11]. Dyes such as calcofluor white (CW) and toluidine blue can also be used. CW binds to chitin present in the fungal cell wall, enhancing the fungal cell when viewed under a fluorescence microscope [11, 12] (Fig. 1). Toluidine blue, on the other hand, facilitates microscopic visualization of the components present in the analyzed sample, as it gives the fungal cells a bluish color when observed under an optical microscope [12]. Some variables can influence the quality and interpretation of the direct examination results. The sterility of the anatomical site from which the sample is taken is also relevant to the diagnosis [11, 13]. Considering the low sensitivity of this technique, negative direct examination results cannot be entirely excluded for fungal infections, especially if the patient shows clinical signs of the disease [11]. A positive result from a sterile sample of the body is a strong indication of infection [11]. Correct sample preparation also affects the quality of the results. The presence of interference, such as cotton fibers, can disturb the less experienced technician during sample reading, leading to misinterpretation of the results [14]. In addition, the lack of trained mycologists in clinical analysis centers can directly interfere with the quality of the results [13]. Therefore, it is necessary that the professional is trained to recognize and differentiate fungal structures through direct examination analysis.

## **Culture**

Diagnosis of fungal infections based on culture methodologies is widely used in clinical laboratories [13]. Several culture media can be used in this diagnostic

methodology, such as Sabouraud dextrose agar (SDA), brain heart infusion (BHI), and malt extract agar [15, 16, 17]. Antibiotics such as chloramphenicol can be added to the media to prevent the growth of bacteria [18]. Furthermore, Mycosel agar contains cycloheximide, which inhibits the growth of contaminating fungi and even fungi of medical importance, such as *Cryptococcus spp.* and *Candida parapsilosis* [18]. Chromogenic media are also used in laboratory routines for a simple and fast diagnosis. An example is the chromogenic medium for *Candida*, whose composition allows the presumptive identification of some species of the genus *Candida* based on the color displayed by the fungal colony after growth [17]. Nadeem et al. (2010) [19] reported that the chromogenic medium CHROMagar™ *Candida* (CHROMagar, Paris/France) was efficient for the correct identification of three species of *Candida*: *Candida albicans*, *C. tropicalis*, and *C. krusei* (Fig. 2). Therefore, it is suggested that chromogenic media should be used mainly in diagnostic laboratories with few resources, where they could assist in fungal identification and in directing treatment [19]. However, the use of these media for diagnosis is controversial, as it can lead to misidentification of fungi. Odds and contributors (2000) [20] showed that isolates from different species of *Candida* can show variations in colony color according to the incubation conditions. CHROMagar™ *Candida* is not sensitive for the detection of *C. glabrata* because other yeast species tend to have pink colonies in this chromogenic medium. This medium can also lead to the misdiagnosis of *C. albicans* and *C. dubliniensis* as colonies of both species turn green in this medium. However, *C. dubliniensis* colonies show a darker color when incubated for 48 to 72 h, which assists in distinguishing them from *C. albicans* colonies [20, 21]. Identification of the multi-resistant species *C. auris* is not feasible using this medium, since its fungal colonies may show color with different shades of pink depending on the isolate, which may lead to it being confused with other yeast species [22] (fig. 2). However, a new chromogenic agar, CHROMagar™ *Candida* Plus (CHROMagar, Paris/France), can assist in the rapid identification of *C. auris*. In this medium, *C. auris* colonies appear to be cream colored with a blue halo; hence, CHROMagar™ *Candida* Plus can be used as an alternative to screen *C. auris* in clinical samples [23].

Fungal cultivation provides data that goes beyond the presence or absence of microorganisms in the sample. The growth time and morphological aspects of the colony, for example, can provide indications about the genus or species of the fungus [13]. In addition to the type of culture medium used for fungal cultivation, sequential planting of the sample in different culture media can be carried out to increase the chances of isolation and identification of the causative agent of mycosis. The use of a “second” culture in case of media with few nutrients can boost the formation of important structures for fungal identification, such as conidia present in filamentous fungi cells, in addition to inducing the production of pigments that can diffuse in the culture medium. These are the characteristics that can contribute to the diagnosis of fungal diseases [12]. In addition, cultivation at different temperatures can also be used as a tool to differentiate fungal genera or species, especially for those pathogens that exhibit dimorphism [12].

In addition to standard cultivation in Petri dishes, the microculture technique can be used as an additional tool for fungal diagnosis. This technique was developed in the 1940s and involves growing the fungus in smaller portions of the culture medium while keeping it in direct contact with a microscope slide [24]. In this way, the fungus grows and produces differential structures, which on simple staining, can be directly observed on the slide used under an optical microscope. The structures produced by fungi during their growth in microculture can assist in the diagnosis and differentiation of different fungal species. *Sporothrix*, *Fonsecaea*, *Microsporum*, *Trichophyton*, and *Epidermophyton* are some examples of fungi that can be identified using the microculture technique [25, 26, 27].

Although they are widely used for fungal diagnosis, culture techniques have some limitations. Similar to direct microscopic examination, culture techniques have low sensitivity [12]. In addition, the time of fungal growth can be delayed, extending for weeks, which slows down the diagnostic process and makes treatment difficult for the patient [13]. The cultivation of certain fungal species can also pose a danger to professionals if certain biosafety standards are not properly met [12, 13]. Other limiting factors that can directly influence the test quality include the culture media used, the site from which the sample was collected, the sample quality and storage, and the technical capacity of the professional who will carry out the analysis [11, 12].

The correct interpretation of data from the sample culture is crucial for accurate diagnosis. A positive culture for fungus does not always indicate that the etiologic agent of the infection has been identified. Samples from non-sterile body sites can be positive for microorganisms from the patient's own microbiota, which does not necessarily mean that the identified fungus is responsible for any clinical symptoms manifested by the individual [12]. However, when samples from sterile sites of the body show a positive culture, it indicates the presence of an infection [28]. Conversely, a negative culture cannot always be considered a definitive response that excludes the diagnosis of infection, especially if the patient shows symptoms. This statement is corroborated by studies demonstrating that approximately 50% of blood cultures from patients with active invasive fungal infections show negative results [29, 30, 31].

### **Biochemical methods**

The ability of fungi to assimilate different sugar types, grow in the presence of certain nutrients or produce enzymes can be used in the diagnosis and distinction of some genera and species [32]. In the past, tests such as auxanogram (assimilation of carbon and nitrogen), zymogram (fermentation of carbohydrates), and enzymatic tests were performed manually to identify the fungi present in clinical samples [33, 34, 35]. However, the use of a battery with different culture media is not feasible for routine diagnostic laboratories; therefore, several companies have started to work on the industrialization of biochemical tests for fungal identification. API 20C (bioMérieux VITEK, Inc., Hazelwood, Mo/USA) was one of the first industrialized panels used in the laboratory routines for fungal identification, being made available on the market at the end of the 1970s [36]. The test objective was to evaluate the fermentation and assimilation capacities of different carbohydrates and to discriminate the genus or species of the yeast present in the sample based on the results [37, 38]. As research progressed, several improvements were made to the API system, such as the addition of colorimetric tests, enzymatic tests, an increase in the number of sugars tested, and the inclusion of computer programs to assist in the interpretation of results [36, 37, 38, 39].

Candifast® (ELITech Group, Puteaux, France) is another industrialized panel that aims to identify some species of pathogenic yeasts through biochemical tests, such as different carbohydrate fermentation, sensitivity to actidione, and presence of the enzyme urease [40, 41]. In addition to biochemical tests, the panel is also made up of tests for sensitivity to some antifungals [40, 41]. The results of this methodology are simple and consist of assessing the color change within the wells of the Candifast® chart. In some studies, this methodology is considered satisfactory for the detection of pathogenic yeasts because it achieves an efficiency of approximately 82% [40, 41].

The modernization of biochemical tests has continued for a long time in the industry, and one breakthrough was the introduction of automated biochemical panels. In this methodology, the sample is inoculated into a card containing different biochemical tests which are incubated in the device, which, in turn, is coupled to a computer that assists in reading the results obtained, making a comparison with a database. MicroScan (Beckman Coulter, Pasadena/USA), VITEK (bioMérieux, Inc., Hazelwood, Mo/USA), and Phoenix (BD Diagnostics, Franklin Lakes/USA) are examples of automated biochemical panels for fungal identification [32, 38, 42, 43].

Increases in the number of tests and databases of these devices have further increased diagnostic sensitivity. In addition, newer versions have also included antifungal susceptibility tests for these automated panels. However, some studies show that biochemical analyses have limitations, presenting difficulties in identifying, for example, less common fungi in the laboratory routines [38, 44]. Zhao et al. (2018) [38] evaluated the efficiency of the API 20C AUX (bioMérieux, USA) and VITEK YST ID card systems (bioMérieux VITEK, Inc., USA) in identifying yeasts of clinical interest. The researchers found that the efficiency of yeast identification by these two systems ranges from 70% to 80% [38]. Efficiency rates of these methodologies are higher for yeasts that are more common in the clinical environment, such as *C. albicans*, *C. krusei*, and *Cryptococcus neoformans* than for those with lower incidence rates, such as *C. guilliermondii* [38]. These limitations can affect the clinical diagnosis. An important factor that must be observed when using automated methods for yeast identification is the certainty that the isolate being identified is pure.

The identification of emerging yeasts can also be compromised in biochemical systems. Jeffery-Smith et al. (2017) [44] summarized in their review the main diagnostic errors in the identification of *C. auris* by biochemical systems. In systems such as API, VITEK, MicroScan, and Phoenix, *C. auris* can be mistakenly identified as another species of the genus *Candida*, or even within another genus of fungi [38]. To correct such inconsistencies, updates to the systems and device databases must be carried out frequently. Even with the inclusion of *C. auris* in the automated panels, correct identification can be hindered by genetic variation between the clades of this species. Ambaraghassi et al. (2019) [45] showed that even after the inclusion of *C. auris* in the panel of VITEK 2 YST ID version 8.01, the system still does not correctly identify all isolates of *C. auris*. The authors showed that 100% of the *C. auris* isolates belonging to the South American clade were correctly identified, but this number dropped dramatically when isolates belonging to the African and East Asian clades were assessed with 7% and 0% identification, respectively [45].

Despite these limitations, the use of automated identification systems is widespread in diagnostic laboratories. In a survey carried out in the Caribbean and Latin American laboratories, it was found that automated systems such as VITEK are present in more than 70% of the analysis laboratories and are used in the routine fungal diagnosis of clinical samples [8].

## **Histopathology**

Histopathology is a methodology used to detect fungi directly from patient tissues and organs. This methodology employs histological techniques for preservation, sample preparation, cutting of tissues into small sections, and coloring. The objective is to highlight the changes that indicate the presence of fungi in the material [46]. This methodology is used for the identification of fungi that cause subcutaneous and systemic mycoses which reach solid organs, such as the lungs. Therefore, if there is tissue invasion during the infectious process, histopathological analyses become a tool of satisfactory sensitivity for the detection of fungi in biological materials [47].

Several staining techniques can be used during sample preparation to indicate the presence of fungi. Staining with hematoxylin and eosin (H&E) dyes, for example, highlights the cells present in the sample and helps in the evaluation of the inflammatory profile associated with the presence of fungi in patient's tissues, allowing the detection of necrotic tissue or multinucleated giant cells [48]. Although H&E can stain the fungi present in the sample, the sensitivity of this stain is not as high as that of other cellular elements present in the material [49].

Gomori methenamine silver (GMS) is an example of a dye that is associated with specific portions of the fungal wall [48]. This dye can be used in combination with the H&E stain to better visualize the fungal structures in the sample [48]. In addition to GSM, periodic acid-Schiff (PAS) is another dye used in the histopathological routine that binds to components of the fungal cell wall [46]. In addition, dyes are known to bind to mucopolysaccharides present in the capsule that surrounds the fungal cells of the genus *Cryptococcus*, showing the fungal structure and facilitating its detection in clinical samples. The dye can also be used with Alcian blue stain for the detection of mucopolysaccharides in fungal cells [48]. Many fungi produce melanin and Fontana-Masson silver (FMS) stain binds to it, facilitating the visualization of melanin-producing fungi in histological sections [48].

Although it is an effective technique, histopathology has some limitations, the main one being the use of invasive procedures for the collection of materials [12]. In addition to the collection, correct preparation and processing of the material directly influence the diagnostic quality of the technique [12].

## **Serology**

Serology is a culture-independent method that looks for antibodies or antigens in patient samples and is another diagnostic tool that can be used to detect fungal infections [11]. It is a minimally invasive technique that can assist in a fast diagnosis when the results of direct microscopy or culture are not conclusive. In addition, this technique can avoid the need to cultivate fungi whose handling requires a high level of biosafety, such as those belonging to the genera *Coccidioides* and *Histoplasma* [13]. In addition to the detection of antibodies

produced by the patient's immune system after contact with microorganisms, serological tests are used to detect polysaccharides and specific portions of the fungal cell wall [11, 12].

Serological tests are based on different methodologies for detecting antigens and antibodies present in biological samples, including enzyme immunoassays, immunoblotting, immunodiffusion, and agglutination tests. The ELISA test, for example, involves a methodology whose principle is based on an enzyme immunoassay that can be used for the diagnosis of fungal infections, as it detects fungal antigens in samples, such as the blood plasma (direct ELISA) or antibodies produced by the patient against fungal infections (indirect ELISA) [50]. Commercial ELISA kits are also available for detecting different genera of fungi, including *Candida*, *Aspergillus*, *Coccidioides*, *Blastomyces*, and *Histoplasma* [50].

Immunoblotting techniques, such as western blotting (WB), can also be used for the diagnosis of fungal infections. Almeida et al. (2016) [51] showed that western blotting can be a useful tool in the diagnosis of *H. capsulatum* after evaluating 118 suspicious samples and revealed that the technique showed greater than 94% sensitivity and specificity in the identification of this species. These results show that WB can be a useful tool for the diagnosis of histoplasmosis, with greater sensitivity than that observed in serological techniques used in diagnostic routines [51].

Immunodiffusion is one of the methodologies based on the serological principles most commonly used in the diagnosis of fungal infections. This technique is based on the detection of antibodies precipitated in the serum, and its sensitivity can vary from 80% to 90%. Kits for immunodiffusion detection of various genera, such as *Paracoccidioides*, *Candida*, *Aspergillus*, *Coccidioides*, *Blastomyces*, and *Histoplasma* are already available in the market [50, 52]. The agglutination test involves a methodology based on the detection of circulating antigens in a sample [50]. The main advantage of this test is the speed with which one can obtain the results. In contrast, such tests have a high rate of false-positive results due to cross-reactions with other components present in the serum [50]. Microorganisms of the genera *Candida*, *Cryptococcus*, and *Pythium*, for example, can be diagnosed using commercial agglutination kits [50, 53, 54].

Polysaccharides present in the fungal cell wall can be identified using serological techniques. Fungal polysaccharide detection can be correlated with the fungal load during infection and can be used to diagnose and monitor the disease evolution [55]. Diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis (IPA) is an example in which the polysaccharide detection technique can be used for the identification of galactomannans in the patient's fluids, such as in the bronchoalveolar lavage technique [56, 57]. In addition to aspergillosis diagnosis, detection of other cell wall polysaccharides can help to identify infections caused by microorganisms of other fungal genera, such as *Candida* and *Cryptococcus* [55].

In general, serological techniques have low sensitivity and specificity in their results when compared to other diagnostic techniques [11, 13]. False-positive and negative results can occur in serological tests, in which case the diagnostic quality is influenced, for example, by the time, degree, and type of the infectious agent present in the patient [13]. Another problem that may influence the use of techniques based on serological results is that the immunosuppressed patients may not produce certain types of antibodies; thus, infection detection may not be efficient using these methodologies in such patients [11].

### **Molecular methods**

Knowledge in molecular biology has advanced rapidly in recent years with different methodologies being developed for diagnosis in the field of laboratory analysis [58]. Molecular techniques show high sensitivity and specificity in the results and, thus, contribute to more accurate diagnoses of the etiologic agent [12]. In the diagnosis of fungi, molecular tools are extremely valuable, especially in the diagnosis of microorganisms that show slow growth in culture, since several methodologies have already been described for extraction of DNA directly from samples without prior cultivation [11, 13]. Thus, using molecular techniques, the diagnostic time can be reduced. One of the limitations of molecular techniques, which also applies to other diagnostic techniques, is the inability to assess whether the microorganism found in samples from non-sterile sites is the real infection etiologic agent or whether it is a part of the native microbiota of the patient [12].

PCR is the key technique for molecular diagnosis. Several molecular methodologies are based on PCR to identify the microorganisms present in the samples. The PCR technique is not approved as a methodology for diagnosis by regulatory agencies, such as the FDA, due to the non-specific nature of the technique. The primers used in the PCR reaction generally correspond to conserved regions of DNA and therefore bind to a variety of microbial species. Therefore, a positive result in a PCR test only indicates the presence of microorganisms in the sample, without any additional information [13]. Non-specific primers are used to perform the PCR technique; however, with the advancement in scientific research and greater knowledge about fungal genomes, it is now possible to develop specific primers for certain genera or fungi [50, 59]. The use of these primers makes the PCR technique more sensitive and allows for a more accurate diagnosis [50, 59]. Specific primers for pathogenic species of the genus *Candida*, for example, have already been described and can be combinedly used in the diagnosis of invasive candidiasis [60] (Fig. 3). A study developed by Ruiz-Gaitán et al. (2018) [61] showed the efficiency of a species-specific primer of the glycosylphosphatidylinositol (GPI) protein-coding sequence in the identification of *C. auris* isolates. All isolates used in the study were correctly identified using this primer, including those that could not be identified by the matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) technique [61]. Studies using species-specific primers have also validated the efficiency of this methodology in identifying fungi of the genus *Aspergillus*, showing the potential of this technique for fast and accurate identification of IPA [62].

Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) is a variation in the PCR technique used in mycological diagnosis. This technique is based on the use of restriction enzymes after DNA amplification, which generates fragments of different sizes that are then visualized by electrophoresis [50]. The advantages of this technique are its greater specificity and faster results when compared to conventional PCR techniques. Onychomycosis, dermatophytosis, histoplasmosis, and cryptococcosis are fungal infections that can be diagnosed using this molecular technique [63, 64, 65].

Another technique used for microbial diagnosis that is based on the PCR methodology is the multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). In summary, this technique employs different primers in the same sample to amplify multiple gene sequences [66]. The main advantage of this technique is the increase in the ability to differentiate between species, resulting in more accurate results [67]. Multiplex RT-PCR has been used for the diagnosis of invasive fungal infections. Commercial kits for technique development are available on the market for detecting fungal specimens directly from the blood samples of patients [68]. The multiplex RT-PCR methodology is well established and standardized in the diagnosis of invasive infections caused by *Candida* and *Aspergillus*, two of the main fungal genera causing invasive infections [68, 69, 70]. Studies have also shown that this technique can be used effectively for other genera with clinical importance, such as *Cryptococcus*, *Sporothrix*, *Trichophyton*, *Histoplasma*, and *Pneumocystis* [67, 71, 72].

In addition to these, molecular techniques based on hybridization, such as Southern blotting, PCR-enzyme immune assay, and DNA microarray, are also examples of methodologies that can be used in the diagnosis of fungi [50]. Finally, gene sequencing is one of the most efficient molecular technologies for identifying the microbial genus or species present in the analyzed samples and has been used for some years in the diagnosis of fungi. This methodology is based on the sequence detection of nitrogenous bases present in the genetic material extracted from the sample. Several genera, including *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Mucor*, *Blastomyces*, and *Scedosporium* can be diagnosed by sequencing [73]. However, although it is an efficient technique with high sensitivity and specificity, gene sequencing has some limitations. Sample manipulation, from collection to genetic material extraction by a qualified technical team, can directly influence the sequencing results [74]. Another crucial point is the existence of the nucleotide sequences of the microbe in international databases with which the results obtained in the gene sequencing will be compared [13].

Molecular techniques have undoubtedly revolutionized the diagnostic market because of their high sensitivity and specificity [75]. In addition, molecular techniques, in general, reduce the diagnostic time; thus, providing tools for the

clinical staff to outline strategies that can streamline and optimize patient treatment [75]. However, even with their high efficiency, molecular techniques are not widely used around the world, mainly because of the high cost involved. Research carried out in laboratories in Europe, Latin America, and the Caribbean indicates little availability of molecular tests, and in Latin America and the Caribbean, only 18% of the laboratories are equipped to perform the diagnosis of fungi using molecular techniques [8]. In the United Kingdom in 2017, it was found that only 21% of the laboratories were qualified to carry out molecular tests [10]. These studies show the necessity to expand access to molecular technologies, which can further contribute to high-quality microbial diagnosis.

### **Mass spectrometry**

Mass spectrometry is a technique that assesses the spatial distribution of molecules such as proteins, peptides, and lipids in different samples [76]. This technology is used in several areas, including the microbial diagnosis of medically important fungi. Mass spectrometry has demonstrated high efficiency in the identification and differentiation between species of fungi belonging to different genera, such as *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* [77, 78, 79, 80]. In addition to detecting fungi from pure cultures, some studies have shown that MALDI-TOF can be efficient in identifying microorganisms directly from biological samples [78, 81, 82]. In this way, the diagnostic time can be reduced as the cultivation steps would not be required. In addition, the direct identification of biological samples could assist in the diagnosis of invasive infections that are often not detected using traditional techniques [78, 82].

Despite being a technique that has shown satisfactory results in the identification of fungi, the use of mass spectrometry for laboratory diagnosis has some limitations such as high cost and the lack of a broad database that includes a large number of microbial species [81, 83]. In addition to the use of mass spectrometry to identify fungi, researchers have shown that this technology can be used to evaluate the susceptibility profile of antifungals [84]. The studies published so far show a high correlation of susceptibility tests performed using mass spectrometry with the microdilution technique standardized by the Clinical

and Laboratory Standards Institute (CLSI) [85, 86, 87, 88]. In addition, there is also a reduction in the execution time of the methodology and the ambiguities that may occur during the visual reading of conventional microdilution tests [84, 87].

The use of mass spectrometry for the susceptibility diagnosis and assessment of antifungals can bring greater accuracy and speed to the results and improve the treatment and prognosis of patients with fungal infections.

### **Susceptibility to antifungals**

The antifungal susceptibility test is an auxiliary diagnostic tool that provides information that can contribute to the treatment of patients with fungal infections [89]. This tool has acquired increasing importance, mainly with the emergence of fungal resistance to one or more antifungal drug classes, as in the case with *C. auris* [90, 91, 92]. Two major institutions, CLSI and the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), periodically provide antifungal susceptibility cut-off points for the main fungal genera [93, 94]. The methodologies used by these two institutions are based mainly on broth microdilution tests to assess fungal susceptibility to different antifungals. In addition to CLSI and EUCAST, some countries have sought to build their own methodologies for assessing cut-off points for antimicrobial drugs, with which health authorities try to standardize the diagnostic techniques. In 2018, for example, Brazil created the Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST) and through an ordinance from the Health Ministry, made its use mandatory by the public and private laboratories to interpret the antimicrobial susceptibility test results [95]. This document, based mainly on the EUCAST guidelines, is freely accessible and seeks to standardize the performance and interpretation of antifungal susceptibility tests in the country [95].

In addition to the basic broth microdilution techniques described in the CLSI and EUCAST protocols, there are commercial tests that use chromatographic techniques to improve the reading of results [96, 97]. Automated antifungal susceptibility tests are also available [93, 98, 99]. Such technologies seek mainly to optimize the performance and analysis of results, which are interesting options mainly for hospitals and large laboratories that process a high number of samples

per day. Solid antifungal susceptibility tests are available in the market. Among them is ETEST, a tape impregnated with different antifungal concentrations in its extension, which is placed on an agar medium previously plated with the fungus of interest. The test results are evaluated according to the halo formed around the tape [93].

The main advantage of carrying out susceptibility tests together with tests to identify the infectious etiologic agent during the diagnostic process is that the patient will be able to receive targeted treatment, which can contribute to a better evolution of the clinical condition [100, 101]. The “personalized” treatment of patients with invasive fungal infections can reduce the costs related to the incorrect and indiscriminate use of antifungals and also shorten the time spent in the hospital [100, 101]. Among the technical limitations are the expertise of the professional to perform the test, correct interpretation of the test, and availability of inputs [102, 103]. The increase in the number of fungal isolates resistant to antifungals exposes the lack of availability of diagnostic and treatment resources worldwide [8, 104]. This situation needs to be reversed, and one way to do this is to increase the availability of antifungal susceptibility tests, which in addition to helping in the development of a correct treatment plan can also assist in monitoring the distribution of resistant isolates.

### **Global overview of laboratory mycological diagnosis**

Fungal diseases are often neglected and only gained greater visibility since the 1980s because of the increase in the number of invasive fungal infections related to the human immunodeficiency virus (HIV) epidemic [105, 106]. Currently, fungal infections associated with patients hospitalized with the coronavirus disease 2019 (COVID-19) are a concern in the clinical environment. Reports from doctors around the world show that a significant percentage of patients admitted with COVID-19 develop some fungal diseases. IPA is a secondary infection in several patients admitted to intensive care units for the treatment of COVID-19 [107, 108]. In a report, doctors at a hospital in Netherlands found that in a period of 3 weeks, 19% of the patients admitted to intensive care units with COVID-19 also had IPA [109]. *C. auris* infections in patients hospitalized with COVID-19 have also been

assessed as highly worrying by health authorities. The Pan American Health Organization (PAHO) issued an early warning of the risk of *C. auris* outbreaks in treatment centers for patients with COVID-19 in early 2021 [110]. Countries such as Brazil, Guatemala, Peru, Panama, Colombia, and the United States have already reported cases of *C. auris* in patients with COVID-19 [110, 111, 112, 113]. The possibility of co-infection with COVID-19 and *C. auris* is a major concern, among other factors, due to the multidrug-resistance history of the fungus and the high capacity for dissemination in the hospital environment. In addition, difficulties in diagnosing *C. auris* infections can also aggravate the situation, which is why PAHO also recommends that countries be trained with sensitive diagnostic techniques to detect possible infections by this fungus. Even with increased concern about fungal infections, there is still a gap in their diagnosis, and this picture can directly affect the mortality rates of fungal diseases worldwide. It is estimated that approximately one billion people worldwide have some form of fungal infection and that approximately 1.5 million die each year as a result of complications from these infections [1]. Despite the high rate of incidence and lethality, fungal infections are still neglected. There are several data that prove the neglect related to fungal infections, one of which is the amount of money invested in the research of fungal infections compared to that invested for other infectious diseases with similar mortality rates. US\$ 1315.00 and US\$ 334.00 are currently invested to investigate each death caused by malaria and tuberculosis, respectively [6]. When it comes to investing in fungal diseases, this value is much lower, not exceeding US\$ 31.00 per death caused by cryptococcosis [6]. Another fact that reinforces the neglected character of these fungal infections is the access to appropriate treatments. Kneale et al. (2016) [104] demonstrated that access to antifungals is not universal. In this study, researchers showed that amphotericin B is not available in 42 countries, representing 481 million people without access to this drug. To provide the patient with adequate treatment to reduce the lethality rate of fungal infections, an accurate diagnosis is essential. However, the world scenario shows that we are far from the ideal condition needed for diagnosing fungal infections. The roots of problems related to the precariousness of diagnosis of fungal diseases are very complex. They start with a lack of investment, as mentioned earlier. The financial resources invested in the research on fungal diseases are minimal when

compared to what is spent on other infectious diseases [6]. The lack of resources makes it difficult to develop and improve diagnostic techniques. There is lack of professional training required for accurate fungal diagnosis. To try to solve this problem, African researchers created the Nigerian Society of Mycological Medicine. The objective of this Society is to properly prepare professionals to deal with fungal infections, and thus reduce the high number of deaths caused by them in the country [7].

Another problem is the scope of the diagnostic techniques. Many laboratories are not properly equipped to perform the correct mycological diagnosis. In addition to the lack of materials and equipment, the lack of professionals with expertise in mycological diagnosis also affects most clinical analysis laboratories. A survey conducted with laboratories in Latin America and the Caribbean showed that only a few have all the requirements to meet international definitions of quality in mycological analysis [8]. The work showed that only 9% of the evaluated laboratories had the minimum requirements recommended by the European Confederation of Medical Mycology for mycological diagnosis [8]. In the United Kingdom, it was possible to verify the inability of laboratories to carry out susceptibility tests to antifungals for filamentous fungi [102]. While 78% of the laboratories evaluated in this study were able to carry out susceptibility tests for yeast antifungals, only 17% were able to carry out these tests for *Aspergillus sp.* [102]. Wang et al. (2020) [103] presented data regarding the capacity of hospitals in China to perform mycological analysis. In this study, it was found that most laboratories do not have exclusive rooms or equipment for fungal analysis. Less than 13% of the evaluated laboratories are capable of carrying out susceptibility tests with filamentous fungi. Regarding specialized technical teams, only 27.9% of the laboratories have professional specialists in mycology [103].

A survey conducted in China reinforces the importance of diagnosis in determining the treatment costs. In this study, the researchers evaluated two groups of patients with invasive fungal infections: (1) a group represented by patients who received empirical treatment before the diagnostic test results and (2) another group formed by patients who were treated based on the results obtained in the diagnostic analyses. There was a reduction in treatment-related costs in the group of patients who received treatment after the results of

laboratory tests compared to the group that received empirical treatment. The patient survival rate, however, was similar in both groups [100]. In a similar study conducted in the United Kingdom, the researchers also demonstrated a reduction in the treatment costs of patients with invasive fungal infection who were treated after the results of laboratory diagnosis [101].

The quality of diagnosis of fungal diseases has a direct impact on the clinical evolution of the patient as well as the cost and effectiveness of treatment, which is why improvements in this sector are urgently needed worldwide [100, 105, 114, 115].

### **Mycological diagnosis in Brazil**

As in other countries, fungal diseases have been neglected in Brazil. Failure to detect the real panorama of fungal incidence in Brazil, high treatment costs, low investment in research, and diagnostic failures are some of the problems that contribute to this neglect. Recent surveys point to 3.8 million Brazilians who have a serious case of fungal infections [116]. However, official government data do not reflect the reality of fungal infection incidence in the country, since not all are mandatory to report. In addition, the cost of treatment is high. A study carried out by the Federal University of Paraná showed that the costs of treating a patient with invasive fungal infection can exceed US\$ 150,000.00 [4].

As discussed earlier, an accurate mycological diagnosis directly influences the treatment and prognosis of the patient. However, as in other parts of the world, the diagnosis of fungal diseases has major flaws in Brazil. A recently published survey showed that Brazil is the country in Latin America that has the least capacity to make a mycological diagnosis at the species level, even though it is the country with the largest number of clinical analysis laboratories [8]. The data obtained in this study shows that only 16% of the diagnostic centers in Brazil have MALDI-TOF and that only 15% are qualified to perform fungal DNA sequencing [8]. Brazil is also the country with the fewest laboratories trained in providing susceptibility tests to antifungals compared to other Latin American and Caribbean countries [8].

The data presented show the urgent need to expand the laboratory capacity to enable the correct diagnosis of fungal diseases in Brazil. An improvement in the current diagnostic scenario in the country could reflect a reduction in the treatment costs and lethality rates.

## **Conclusion**

The current scenario worldwide for the control, treatment, and diagnosis of fungal diseases is far from ideal. This situation reinforces the lethal character of invasive fungal infections and deprives the patients of access to appropriate treatments, especially those among the populations in poor countries. One of the points that need urgent improvement worldwide is the capacity to diagnose fungal diseases. The lack of resources, trained professionals, and materials needed to carry out advanced diagnostic techniques has a direct impact on the treatment costs and prognosis of patients with severe fungal infections. In order to reverse this situation, it is necessary that fungal diseases are no longer neglected by the government and that the research on these diseases starts receiving necessary investments to improve the diagnostic techniques and increase the access to accurate diagnostic procedures, which will certainly lead to a reduction in the mortality rates of invasive fungal infections around the world.

## References

1. Bongomin F, Gago S, Oladele R, Denning D (2017) Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. *JoF* 3(4):57. doi:10.3390/jof3040057
2. Kullberg BJ, Arendrup MC (2015) Invasive candidiasis. Campion EW, ed. *N Engl J Med* 373(15):1445-1456. doi:10.1056/NEJMra1315399
3. Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ (2018) Invasive candidiasis. *Nat Rev Dis Primers* 4(1):18026. doi:10.1038/nrdp.2018.26
4. Borba HHL, Steimbach LM, Riveros BS, et al (2018). Cost-effectiveness of amphotericin B formulations in the treatment of systemic fungal infections. *Mycoses* 61(10):754-763. doi:10.1111/myc.12801
5. Ashley ED, Drew R, Johnson M, et al (2012) Cost of invasive fungal infections in the era of new diagnostics and expanded treatment options. *Pharmacotherapy* 32(10):890-901. doi:10.1002/j.1875-9114.2012.01124
6. Rodrigues ML, Albuquerque PC (2018) Searching for a change: The need for increased support for public health and research on fungal diseases. Reynolds TB, ed. *PLoS Negl Trop Dis* 12(6):e0006479. doi:10.1371/journal.pntd.0006479
7. Oladele RO, Osaigbovo II, Ayanlowo OO, et al (2019) The role of medical mycology societies in combating invasive fungal infections in low- and middle-income countries: A Nigerian model. *Mycoses* 62(1):16-21. doi:10.1111/myc.12845
8. Falci DR, Pasqualotto AC (2019) Clinical mycology in Latin America and the Caribbean: A snapshot of diagnostic and therapeutic capabilities. *Mycoses* 62(4):368-373. doi:10.1111/myc.12890
9. Hay R, Denning DW, Bonifaz A, et al (2019) The diagnosis of fungal neglected tropical diseases (Fungal ntds) and the role of investigation and laboratory tests: an expert consensus report. *TropicalMed* 4(4):122. doi:10.3390/tropicalmed4040122

10. Schelenz S, Barnes RA, Barton RC, et al (2015) British Society for Medical Mycology best practice recommendations for the diagnosis of serious fungal diseases. *Lancet Infect Dis* 15(4):461-474. doi:10.1016/S1473-3099(15)70006-X
11. Lass-Flörl C (2017) Current Challenges in the Diagnosis of Fungal Infections. In Lion T (ed) *Human Fungal Pathogen Identification*. New York, NY: Springer New York, v. 1508. p. 3–15.
12. Dufresne SF, Marr KA, Shoham S (2019) Diagnosis of Systemic Fungal Diseases. In Safdar A (ed) *Principles and Practice of Transplant Infectious Diseases*. New York, NY: Springer New York, p. 819–840.
13. Kozel TR, Wickes B (2014) Fungal diagnostics. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4(4):a019299-a019299. doi:10.1101/cshperspect.a019299
14. A Lakshminarayana S, Vishwajith, Ravishankar A, Sangeetha S (2019) A comparison of direct microscopy and culture with periodic acid schiff staining in the diagnosis of onychomycosis. *IJMR* 6(3):253-257. doi:10.18231/j.ijmr.2019.055
15. Hong G, Miller HB, Allgood S, Lee R, Lechtzin N, Zhang SX (2017) Use of selective fungal culture media increases rates of detection of fungi in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. Warnock DW, ed. *J Clin Microbiol* 55(4):1122-1130. doi:10.1128/JCM.02182-16
16. Feuilhade de Chauvin M (2005) New diagnostic techniques. *J Eur Acad Dermatol Venerol* 19(s1):20-24. doi:10.1111/j.1468-3083.2005.01287.x
17. Scharmann U, Kirchhoff L, Chapot V le S, et al (2020) Comparison of four commercially available chromogenic media to identify *Candida albicans* and other medically relevant *Candida* species. *Mycoses* 63(8):823-831. doi:10.1111/myc.13119
18. Elewski BE (1996) Diagnostic techniques for confirming onychomycosis. *J Am Acad Dermatol* 35(3):S6-S9. doi:10.1016/S0190-9622(96)90062-6
19. Nadeem SG, Hakim ST, Kazmi SU (2010) Use of CHROMagar *Candida* for the presumptive identification of *Candida* species directly from clinical specimens in resource-limited settings. *Libyan J Med* 5(1):2144. doi:10.3402/ljm.v5i0.2144

20. Odds FC, Davidson A (2000) "Room temperature" use of CHROMagar *Candida*™. *Diagn Microbiol Infect Dis* 38(3):147-150. doi:10.1016/S0732-8893(00)00197-8
21. Mahelová M, Růžička F (2017) Methods of *Candida dubliniensis* identification and its occurrence in human clinical material. *Folia Microbiol* 62(5):401-408. doi:10.1007/s12223-017-0510-2
22. Pathirana RU, Friedman J, Norris HL, et al (2017) Fluconazole-resistant *Candida auris* is susceptible to salivary histatin 5 killing and to intrinsic host defenses. *Antimicrob Agents Chemother* 62(2):e01872-17. doi:10.1128/AAC.01872-17
23. Borman AM, Fraser M, Johnson EM (2021) CHROMagar™ *Candida* Plus: A novel chromogenic agar that permits the rapid identification of *Candida auris*. *Medical Mycology* 59(3):253-258. doi:10.1093/mmy/myaa049
24. Johnson EA (1946) An improved slide culture technique for the study and identification of pathogenic fungi 1. *J Bacteriol* 51(6):689-694. doi:10.1128/JB.51.6.689-694.1946
25. Aboul-Ella H, Hamed R, Abo-Elyazeed H (2020) Recent trends in rapid diagnostic techniques for dermatophytosis. *Int J Vet Sci Med* 8(1):115-123. doi:10.1080/23144599.2020.1850204
26. do Monte Alves M, Pipolo Milan E, da Silva-Rocha WP, et al (2020) Fatal pulmonary sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* in Northeast Brazil. *Samy AM, ed. PLoS Negl Trop Dis* 14(5):e0008141. doi:10.1371/journal.pntd.0008141
27. Brito AC de, Bittencourt M de JS (2018) Chromoblastomycosis: an etiological, epidemiological, clinical, diagnostic, and treatment update. *An Bras Dermatol* 93(4):495-506. doi:10.1590/abd1806-4841.20187321
28. Gonzalez-Lara MF, Ostrosky-Zeichner L (2019) Update on the diagnosis of candidemia and invasive candidiasis. *Curr Fungal Infect Rep* 13(4):301-307. doi:10.1007/s12281-019-00367-1

29. Clancy CJ, Nguyen MH (2018) Diagnosing invasive candidiasis. Kraft CS, ed. *J Clin Microbiol* 56(5):e01909-17. doi:10.1128/JCM.01909-17
30. Clancy CJ, Nguyen MH (2013) Finding the “missing 50%” of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clin Infect Dis* 56(9):1284-1292. doi:10.1093/cid/cit006
31. Pemán J, Zaragoza R (2010) Current diagnostic approaches to invasive candidiasis in critical care settings: Diagnostic approaches to invasive candidiasis in ICU. *Mycoses* 53(5):424-433. doi:10.1111/j.1439-0507.2009.01732.x
32. Sangeetha J, Thangadurai D (2013) Staining Techniques and Biochemical Methods for the Identification of Fungi. In Gupta VK, Tuohy MG, Ayyachamy M, Turner KM, O'Donovan A (eds.) *Laboratory Protocols in Fungal Biology*. New York, NY: Springer New York, p. 237–257.
33. Wickerham LJ, Burton KA (1948) Carbon assimilation tests for the classification of yeasts. *J Bacteriol* 56(3):363-371. doi:10.1128/JB.56.3.363-371.1948
34. Kreger-Van Rij NJW, Staib F (1963) The utilization of creatine and creatinine by some *Debaryomyces* species. *Archiv Mikrobiol* 45(2):115-118. doi:10.1007/BF00408432
35. Martin MV, Schneidau JD (1970) A simple and reliable assimilation test for the identification of *Candida* species. *Am J Clin Pathol* 53(6):875-879. doi:10.1093/ajcp/53.6.875
36. Land GA, Harrison BA, Hulme KL, Cooper BH, Byrd JC (1979) Evaluation of the new API 20C strip for yeast identification against a conventional method. *J Clin Microbiol* 10(3):357-364. doi:10.1128/JCM.10.3.357-364.1979
37. Posteraro B, Efremov L, Leoncini E, et al (2015) Are the conventional commercial yeast identification methods still helpful in the era of new clinical microbiology diagnostics? A meta-analysis of their accuracy. Warnock DW, ed. *J Clin Microbiol* 53(8):2439-2450. doi:10.1128/JCM.00802-15

38. Zhao Y, Tsang C-C, Xiao M, et al (2018) Yeast identification by sequencing, biochemical kits, MALDI–TOF MS and rep-PCR DNA fingerprinting. *Med Mycol* 56(7):816-827. doi:10.1093/mmy/myx118
39. Pincus DH, Orenca S, Chatellier S (2007) Yeast identification – past, present, and future methods. *Med Mycol* 45(2):97-121. doi:10.1080/13693780601059936
40. Gündeş SG, Gulenc S, Bingol R (2001) Comparative performance of Fungichrom I, Candifast and API 20C Aux systems in the identification of clinically significant yeasts *J Med Microbiol* 50(12):1105-1110. doi:10.1099/0022-1317-50-12-1105
41. Sasikala G, Udayasri B (2018) Speciation and antifungal susceptibility profiles of *Candida* isolates from vaginitis patients attending STD Clinic at a Tertiary Care Hospital. *J NTR Univ Health Sci.* 7(2):94. doi:10.4103/JDRNTRUHS.JDRNTRUHS\_33\_17
42. Grant ML, Parajuli S, Deleon-Gonsalves R, Potula R, Truant AL (2016) Comparative evaluation of the BD Phoenix yeast id panel and remel rapid yeast plus system for yeast identification. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2016:1-4. doi:10.1155/2016/4094932
43. Ceballos-Garzón A, Cortes G, Morio F, et al (2019) Comparison between MALDI-TOF MS and MicroScan in the identification of emerging and multidrug resistant yeasts in a fourth-level hospital in Bogotá, Colombia. *BMC Microbiol* 19(1):106. doi:10.1186/s12866-019-1482-y
44. Jeffery-Smith A, Taori SK, Schelenz S, et al (2017) *Candida auris*: a review of the literature. *Clin Microbiol Reviews* 31(1):e00029-17, /cmr/31/1/e00029-17.atom. doi:10.1128/CMR.00029-17
45. Ambaraghassi G, Dufresne PJ, Dufresne SF, et al (2019) Identification of *Candida auris* by use of the updated vitek 2 yeast identification system, version 8. 01: a multilaboratory evaluation study. Land GA, ed. *J Clin Microbiol* 57(11):e00884-19, /jcm/57/11/JCM.00884-19.atom. doi:10.1128/JCM.00884-19
46. Roden AC, Schuetz AN (2017) Histopathology of fungal diseases of the lung. *Sem Diagn Pathol* 34(6):530-549. doi:10.1053/j.semmp.2017.06.002

47. Kung VL, Chernock RD, Burnham C-AD (2018) Diagnostic accuracy of fungal identification in histopathology and cytopathology specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 37(1):157-165. doi:10.1007/s10096-017-3116-3
48. Guarner J, Brandt ME (2011) Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century. *Clin Microbiol Rev* (2):247-280. doi:10.1128/CMR.00053-10
49. the Infectious Disease Clinical Research Program Trauma Infectious Disease Outcomes Study Group, Heaton SM, Weintrob AC, et al (2016) Histopathological techniques for the diagnosis of combat-related invasive fungal wound infections. *BMC Clin Pathol* 16(1):11. doi:10.1186/s12907-016-0033-9
50. Lau A, Chen S, Sleiman S, Sorrell T (2009) Current status and future perspectives on molecular and serological methods in diagnostic mycology. *Fut Microbiol* 4(9):1185-1222. doi:10.2217/fmb.09.70
51. Almeida M de A, Pizzini CV, Damasceno LS, et al (2016) Validation of western blot for *Histoplasma capsulatum* antibody detection assay. *BMC Infect Dis* 16(1):87. doi:10.1186/s12879-016-1427-0
52. Rocha-Silva F, Guimarães CF, de Oliveira Júnior ER, de Figueiredo SM, Caligorne RB. Disseminated paracoccidiodomycosis prediagnosed as neoplasm: An important challenge in diagnosis using rt-PCR. *Med Mycol Case Reports* 19:1-5. doi:10.1016/j.mmcr.2017.09.003
53. Richardson M, Page I (2018) Role of serological tests in the diagnosis of mold infections. *Curr Fungal Infect Rep* 12(3):127-136. doi:10.1007/s12281-018-0321-1
54. Lackner M, Lass-Flörl C (2017) Commercial Molecular Tests for Fungal Diagnosis from a Practical Point of View. In Lion T (ed) *Human Fungal Pathogen Identification*. New York, NY: Springer New York, v. 1508. p. 85–105.
55. Osibe DA, Lei S, Wang B, Jin C, Fang W (2020) Cell wall polysaccharides from pathogenic fungi for diagnosis of fungal infectious disease. *Mycoses* 63(7):644-652. doi:10.1111/myc.13101

56. Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N (2006) Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 42(10):1417-1727. doi:10.1086/503427
57. Avcu G, Karapinar DY, Akinci AB, et al (2017) Utility of the serum galactomannan assay for the diagnosis of invasive aspergillosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Int J Infect Dis* 54:8-12. doi:10.1016/j.ijid.2016.10.027
58. Wickes BL, Wiederhold NP (2018) Molecular diagnostics in medical mycology. *Nat Commun* 9(1):5135. doi:10.1038/s41467-018-07556-5
59. Springer J, Löffler J (2017) Genus- and Species-Specific PCR Detection Methods. In Lion T (ed) *Human Fungal Pathogen Identification*. New York, NY: Springer New York, v. 1508. p. 267–279.
60. Vermitsky J-P, Self MJ, Chadwick SG, et al (2008) Survey of vaginal-flora candida species isolates from women of different age groups by use of species-specific PCR detection. *J Clin Microbiol* 46(4):1501-1503. doi:10.1128/JCM.02485-07
61. Ruiz-Gaitán AC, Fernández-Pereira J, Valentin E, et al (2018) Molecular identification of *Candida auris* by PCR amplification of species-specific GPI protein-encoding genes. *Int J Med Microbiol* 308(7):812-818. doi:10.1016/j.ijmm.2018.06.014
62. Walsh TJ, Wissel MC, Grantham KJ, et al (2011) Molecular detection and species-specific identification of medically important aspergillus species by real-time PCR in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol* 49(12):4150-4157. doi:10.1128/JCM.00570-11
63. Lubis NZ, Muis K, Nasution LH (2018) Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism as a confirmatory test for onychomycosis. *Open Access Maced J Med Sci* 6(2):280-283. doi:10.3889/oamjms.2018.098
64. Didehdar M, Shokohi T, Khansarinejad B, et al (2016) Characterization of clinically important dermatophytes in North of Iran using PCR-RFLP on ITS region. *J Mycol Méd* 26(4):345-350. doi:10.1016/j.mycmed.2016.06.006

65. Sousa DRT de, Santos CS da S, Wanke B, et al (2015) PCR-RFLP as a useful tool for diagnosis of invasive mycoses in a healthcare facility in the North of Brazil. *Electron J Biotechnol* 18(3):231-235. doi:10.1016/j.ejbt.2015.03.012
66. Mou X-B, Ali Z, Li B, et al (2016) Multiple genotyping based on multiplex PCR and microarray. *Chin Chem Lett* 27(11):1661-1665. doi:10.1016/j.ccllet.2016.04.005
67. Sherman S, Goshen M, Treigerman O, et al (2018) Evaluation of multiplex real-time PCR for identifying dermatophytes in clinical samples-A multicentre study. *Mycoses* 61(2):119-126. doi:10.1111/myc.12713
68. Elges S, Arnold R, Liesenfeld O, et al (2017) Prospective evaluation of the SeptiFAST multiplex real-time PCR assay for surveillance and diagnosis of infections in haematological patients after allogeneic stem cell transplantation compared to routine microbiological assays and an in-house real-time P. *Mycoses* 60(12):781-788. doi:10.1111/myc.12662
69. Fortun J, Meije Y, Buitrago MJ, et al (2014) Clinical validation of a multiplex real-time PCR assay for detection of invasive candidiasis in intensive care unit patients. *J Antimicrob Chemother* 69(11):3134-3141. doi:10.1093/jac/dku225
70. Kim W-B, Park C, Cho S-Y, Chun H-S, Lee D-G (2020) Development of multiplex real-time PCR for rapid identification and quantitative analysis of *Aspergillus* species. Kalendar R, ed. *PLoS ONE* 15(3):e0229561. doi:10.1371/journal.pone.0229561
71. Gago S, Esteban C, Valero C, Zaragoza O, Puig de la Bellacasa J, Buitrago MJ (2014) A multiplex real-time PCR assay for identification of *Pneumocystis jirovecii*, *Histoplasma capsulatum*, and *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* in samples from aids patients with opportunistic pneumonia. *J Clin Microbiol* 52(4):1168-1176. doi:10.1128/JCM.02895-13
72. Zhang M, Li F, Li R, Gong J, Zhao F (2019) Fast diagnosis of sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa*, *Sporothrix schenckii*, and *Sporothrix brasiliensis* based on multiplex real-time PCR. Reynolds TB, ed. *PLoS Negl Trop Dis* 13(2):e0007219. doi:10.1371/journal.pntd.0007219

73. Prakash PY, Irinyi L, Halliday C, Chen S, Robert V, Meyer W (2017) Online databases for taxonomy and identification of pathogenic fungi and proposal for a cloud-based dynamic data network platform. Kraft CS, ed. *J Clin Microbiol* 55(4):1011-1024. doi:10.1128/JCM.02084-16
74. El-Kamand S, Papanicolaou A, Morton CO (2019) The use of whole genome and next-generation sequencing in the diagnosis of invasive fungal disease. *Curr Fungal Infect Rep* 13(4):284-291. doi:10.1007/s12281-019-00363-5
75. OPATHY Consortium, Arastehfar A, Boekhout T, et al (2019) Recent trends in molecular diagnostics of yeast infections: from PCR to NGS. *FEMS Microbiol Rev* fuz015. doi:10.1093/femsre/fuz015
76. Buchberger AR, DeLaney K, Johnson J, Li L (2018) Mass spectrometry imaging: a review of emerging advancements and future insights. *Anal Chem* 90(1):240-265. doi:10.1021/acs.analchem.7b04733
77. Vatanshenassan M, Boekhout T, Meis JF, et al (2019) *Candida auris* identification and rapid antifungal susceptibility testing against echinocandins by maldi-tof ms. *Front Cell Infect Microbiol* 9:20. doi:10.3389/fcimb.2019.00020
78. Mery A, Sendid B, François N, et al (2016) Application of mass spectrometry technology to early diagnosis of invasive fungal infections. Diekema DJ, ed. *J Clin Microbiol* 54(11):2786-2797. doi:10.1128/JCM.01655-16
79. Posteraro B, Vella A, Cogliati M, et al (2012) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based method for discrimination between molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *J Clin Microbiol* 50(7):2472-2476. doi:10.1128/JCM.00737-12
80. Sanguinetti M, Posteraro B (2017) Identification of molds by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. Kraft CS, ed. *J Clin Microbiol* 55(2):369-379. doi:10.1128/JCM.01640-16
81. Rizzato C, Lombardi L, Zoppo M, Lupetti A, Tavanti A (2015) Pushing the limits of MALDI-TOF mass spectrometry: beyond fungal species identification. *JoF* 1(3):367-383. doi:10.3390/jof1030367

82. Sendid B, Poissy J, François N, et al (2015) Preliminary evidence for a serum disaccharide signature of invasive *Candida albicans* infection detected by MALDI Mass Spectrometry. Clin Microbiol Infect 21(1):88.e1-88.e6. doi:10.1016/j.cmi.2014.08.010
83. Florio W, Tavanti A, Barnini S, Ghelardi E, Lupetti A (2018) Recent advances and ongoing challenges in the diagnosis of microbial infections by MALDI-TOF mass spectrometry. Front Microbiol 9:1097. doi:10.3389/fmicb.2018.01097
84. Sanguinetti M, Posteraro B. New approaches for antifungal susceptibility testing. Clin Microbiol Infect 23(12):931-934. doi:10.1016/j.cmi.2017.03.025
85. De Carolis E, Vella A, Florio AR, et al. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for caspofungin susceptibility testing of *Candida* and *Aspergillus* species. J Clin Microbiol 50(7):2479-2483. doi:10.1128/JCM.00224-12
86. Vella A, De Carolis E, Mello E, et al (2017) Potential use of MALDI-TOF mass spectrometry for rapid detection of antifungal resistance in the human pathogen *Candida glabrata*. Sci Rep 7(1):9099. doi:10.1038/s41598-017-09329-4
87. Vella A, De Carolis E, Vaccaro L, et al (2013) Rapid antifungal susceptibility testing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis. J Clin Microbiol 51(9):2964-2969. doi:10.1128/JCM.00903-13
88. Saracli MA, Fothergill AW, Sutton DA, Wiederhold NP (2015) Detection of triazole resistance among *Candida* species by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Med Mycol 53(7):736-742. doi:10.1093/mmy/myv046
89. Sanguinetti M, Posteraro B (2018) Susceptibility testing of fungi to antifungal drugs. JoF 4(3):110. doi:10.3390/jof4030110
90. Spivak ES, Hanson KE (2017) *Candida auris*: an emerging fungal pathogen. Kraft CS, ed. J Clin Microbiol 56(2):e01588-17. doi:10.1128/JCM.01588-17

91. Forsberg K, Woodworth K, Walters M, et al (2019) *Candida auris*: the recent emergence of a multidrug-resistant fungal pathogen. *Med Mycol* 57(1):1-12. doi:10.1093/mmy/myy054
92. Berman J, Krysan DJ (2020) Drug resistance and tolerance in fungi. *Nat Rev Microbiol* 18(6):319-331. doi:10.1038/s41579-019-0322-2
93. Albataineh MT, Sutton DA, Fothergill AW, Wiederhold NP (2016) Update from the Laboratory. *Infect Dis Clin North America* 30(1):13-35. doi:10.1016/j.idc.2015.10.014
94. Ribas e Ribas AD, Spolti P, Del Ponte EM, Donato KZ, Schrekker H, Fuentefria AM (2016) Is the emergence of fungal resistance to medical triazoles related to their use in the agroecosystems? A mini review. *Braz J Microbiol* 47(4):793-799. doi:10.1016/j.bjm.2016.06.006
95. BRASIL (2018) Portaria n°64, de 11 de Dezembro de 2018. [https://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/55217765/do1-2018-12-14-portaria-n-64-de-11-de-dezembro-de-2018-55217696](https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/55217765/do1-2018-12-14-portaria-n-64-de-11-de-dezembro-de-2018-55217696). Accessed January 15 2021.
96. Leong C, Buttafuoco A, Glatz M, Bosshard PP (2017) Antifungal susceptibility testing of *Malassezia* spp. With an optimized colorimetric broth microdilution method. Warnock DW, ed. *J Clin Microbiol* 55(6):1883-1893. doi:10.1128/JCM.00338-17
97. Meletiadiis J, Siopi M, Kanioura L, et al (2020) A multicentre study to optimize echinocandin susceptibility testing of *Aspergillus* species with the EUCAST methodology and a broth microdilution colorimetric method. *J Antimicrob Chemother* 75(7):1799-1806. doi:10.1093/jac/dkaa102
98. Cansizoglu MF, Tamer YT, Farid M, Koh AY, Toprak E (2019) Rapid ultrasensitive detection platform for antimicrobial susceptibility testing. Read AF, ed. *PLoS Biol* 17(5):e3000291. doi:10.1371/journal.pbio.3000291
99. Kothalawala M, Jayaweera JAAS, Arunan S, Jayathilake A (2019) The emergence of non-*albicans* candidemia and evaluation of HiChrome *Candida* differential agar and VITEK2 YST® platform for differentiation of *Candida*

bloodstream isolates in teaching hospital Kandy, Sri Lanka. *BMC Microbiol* 19(1):136. doi:10.1186/s12866-019-1518-3

100. Leshner B, Mao N, Liu Q, et al (2016) Economic analysis of empiric versus diagnostic-driven strategies for immunocompromised patients with suspected fungal infections in the People's Republic of China. *CEOR* 275. doi:10.2147/CEOR.S101015

101. Barnes R, Earnshaw S, Herbrecht R, et al (2015) Economic comparison of an empirical versus diagnostic-driven strategy for treating invasive fungal disease in immunocompromised patients. *Clin Therap* 37(6):1317-1328.e2. doi:10.1016/j.clinthera.2015.03.021

102. Schelenz S, Owens K, Guy R, et al (2019) National mycology laboratory diagnostic capacity for invasive fungal diseases in 2017: Evidence of sub-optimal practice. *J Infect* 79(2):167-173. doi:10.1016/j.jinf.2019.06.009

103. Wang H, Wang Y, Yang Q-W, et al (2020) A national survey on fungal infection diagnostic capacity in the clinical mycology laboratories of tertiary care hospitals in China. *J Microbiol Immun Infect* 53(6):845-853. doi:10.1016/j.jmii.2020.03.016

104. Kneale M, Bartholomew JS, Davies E, Denning DW (2016) Global access to antifungal therapy and its variable cost. *J Antimicrob Chemother* 71(12):3599-3606. doi:10.1093/jac/dkw325

105. Rodrigues ML, Nosanchuk JD (2020) Fungal diseases as neglected pathogens: A wake-up call to public health officials. Reynolds TB, ed. *PLoS Negl Trop Dis* 14(2):e0007964. doi:10.1371/journal.pntd.0007964

106. Cole DC, Govender NP, Chakrabarti A, Sacarlal J, Denning DW (2017) Improvement of fungal disease identification and management: combined health systems and public health approaches. *Lancet Infect Dis* 17(12):e412-e419. doi:10.1016/S1473-3099(17)30308-0

107. Alanio A, Dellièrre S, Fodil S, Bretagne S, Mégarbane B (2020) Prevalence of putative invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients with COVID-19. *Lancet Resp Med* 8(6):e48-e49. doi:10.1016/S2213-2600(20)30237-X

108. Koehler P, Cornely OA, Böttiger BW, et al (2020) COVID-19 associated pulmonary aspergillosis. *Mycoses* 63(6):528-534. doi:10.1111/myc.13096
109. van Arkel ALE, Rijpstra TA, Belderbos HNA, van Wijngaarden P, Verweij PE, Bentvelsen RG (2020) COVID-19–associated Pulmonary Aspergillosis. *Am J Respir Crit Care Med* 202(1):132-135. doi:10.1164/rccm.202004-1038LE
110. PAHO (2021) Epidemiological alert: *Candida auris* outbreaks in health care services in the context of the COVID-19 pandemic. <https://www.paho.org/en/documents/epidemiological-alert-candida-auris-outbreaks-health-care-services-context-covid-19>. Accessed: March 3, 2021.
111. Rodriguez JY, Le Pape P, Lopez O, Esquea K, Labiosa AL, Alvarez-Moreno C (2020) *Candida auris*: a latent threat to critically ill patients with coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis* ciaa1595. doi:10.1093/cid/ciaa1595
112. ANVISA (2020) Alerta de Risco GVIMS/GGTES/Anvisa No. 01/2020. Assunto: Identificação de possível caso de *Candida auris* no Brasil. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2020/identificacao-de-possivel-caso-de-candida-auris-no-brasil#:~:text=No%20Brasil%2C%20n%C3%A3o%20havia%20relato,GGTES%2FAnvisa%2001%2F2020>. Accessed December 20 2020.
113. Prestel C, Anderson E, Forsberg K, et al (2021) *Candida auris* outbreak in a covid-19 specialty care unit — Florida, july–august 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 70(2):56-57. doi:10.15585/mmwr.mm7002e3
114. Lamoth F, Calandra T (2017) Early diagnosis of invasive mould infections and disease. *J Antimicrob Chemother* 72(suppl\_1):i19-i28. doi:10.1093/jac/dkx030
115. Barnes RA (2008) Early diagnosis of fungal infection in immunocompromised patients. *J Antimicrob Chemother* 61(Supplement 1):i3-i6. doi:10.1093/jac/dkm424
116. Giacomazzi J, Baethgen L, Carneiro LC, et al (2016) The burden of serious human fungal infections in Brazil. *Mycoses* 59(3):145-150. doi:10.1111/myc.12427

## 9.2- Artigo 02: Into the wild: a look at *Candida albicans* outside clinical setting

### Mini Review

#### Into the wild: a look at *Candida albicans* outside clinical setting

Aline Dias Valério<sup>1</sup>, Carlos Augusto Rosa<sup>1</sup>, Susana Johann<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

#Corresponding author:

Susana Johann, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, PO Box 486, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil. Tel.: +55 3349 7700; Fax: +55 31 3295 3115; Email: sjohann@icb.ufmg.br

### Abstract

*Candida albicans* is a fungus widely studied for its importance in human microbiota and as an important opportunistic pathogen. However, even with a considerable database on this fungus, little is known about its ecology. Authors long considered that this strain could only be isolated in endothermic environmental, but subsequent work showed that *C. albicans* can also be isolated from environmental samples such as rivers, soils and plant matter. In this mini review we seek to present works that isolated *C. albicans* in natural environments and discuss the importance of expanding studies to have a better understanding of the ecology of this yeast.

**Keywords:** *Candida albicans*, natural environment, virulence.

### Introduction

*Candida albicans* is a fungal species described primarily in 1839 by Langenbeck (GOW & YADAV, 2017). It belongs to the phylum Ascomycota, subphylum

Saccharomycotina, class Saccharomycetes, subclass Saccharomycetidae, order Saccharomycetales, family Metschnikowiaceae, genus *Candida* (GOW & YADAV, 2017). Since its first isolation, *C. albicans* has been widely studied in the scientific community. The large amount of research related to this fungus is mainly due to its role in the human microbiota and as an opportunistic pathogen. As an etiological agent of infections, this microorganism, together with other opportunistic species of the genus *Candida*, is responsible for about 20% of invasive infections in the world, but this number can be much higher since the diagnosis and notification of fungal infections are generally neglected (LAMOTH et al., 2018). Due to the great clinical impact related to *C. albicans*, the focus of scientific research is restricted mainly to its role in the microbiota and as a pathogen. This aspect of research for a long time made the researchers believe that this fungus was found only in clinical and endothermic environments (OPULENT et al., 2019). The researchers did not believe that isolation of this species from environmental samples was possible, and when they found *C. albicans* in samples collected in nature, they suggested that they came from contamination during the collection process. However, subsequent research proved the opposite, and found the yeast *C. albicans* in several natural environments outside the clinical setting. Some studies have shown that *C. albicans* can be isolated in a variety of environments, such as forest soils, rivers, swamps, beaches and Antarctic permafrosts (KOCHKINA et al., 2012; OPULENTE et al., 2019; MACIEL et al., 2019 ; STONE et al., 2012; BENSASSON et al., 2019). Even though there are some authors who have described the presence of *C. albicans* in nature, most studies are still restricted to the role of this fungus in the microbiota and as an opportunistic pathogen, therefore, little is known which phenotypic characteristics expressed in natural environments. Furthermore, it is unclear how these environmental isolates would behave in the clinical environment and whether the isolation sites of these microorganisms in nature would be a source of contamination for humans. Given the relevance of the subject and the lack of studies about the presence of *C. albicans* in environmental samples, this work aims to gather existing data in the literature and expand knowledge about the ecology of this microorganism.

### ***C. albicans* in soil**

Since the 1950s, some studies have already shown the isolation of *C. albicans* in the soil. However, the researchers were not sure whether the isolation of these fungi corresponded to a saprophytic habit or if they came from human contamination during the collection process. Ajello (1956), reported the presence of different pathogenic fungi in the soil collected in different points of North America, Central America, South America and Africa. Among the species found, the author reported the isolation of the fungus *C. albicans*. Rogers & Beneke also isolated *C. albicans* from soil samples. These authors collected soil samples from different points in Brazil and observed the presence of *C. albicans* in soils covered with plants, beach sand and caves (ROGERS & BENEKE, 1964). However, these authors consider that the collection sites may suffer anthropogenic and zoonotic influence, and that these characteristics may have influenced the isolation of this human pathogen (ROGERS & BENEKE, 1964). MOK and collaborators investigated the presence of yeasts in Amazonian soils. Of the isolated species, these authors found nine previously described in the literature as being fungi with pathogenic potential, *C. albicans* being one of them. The authors state that the Amazon rainforest soil can be a natural habitat for these yeasts and an external source for the contamination of humans with these fungi (MOK et al, 1984). Here it is worth noting that the identification of *C. albicans* in the works mentioned above is based on phenotypic and biochemical identification techniques, which were the methodologies available and disseminated at the time of the tests. In the few recently published works, *C. albicans* was found in samples of sand from Brazilian beaches and also in the soil of several regions in the United States. Maciel et al. (2019) investigated the presence of yeasts in samples of sand from Brazilian beaches. In the work, the researchers found, among other yeasts with pathogenic potential, the fungus *C. albicans*. Virulence tests performed with these isolates showed the pathogenic potential of this fungus, and they showed morphogenesis capacity, high adhesion rate in oral epithelial cells, ability to form biofilm and high virulence in a murine model. With these results, the authors suggest the potential risk of contamination with *C. albicans* by users of these beaches (MACIEL et al., 2019). The isolation site in which Maciel et al performed the work collections were environments with circulation of people and, therefore,

cannot discard the anthropic factor in the presence of these *C. albicans* in the samples. Opulent and collaborators (2019) isolated *C. albicans* from soil samples collected in several regions of the United States. The authors suggest that the isolation of pathogenic yeasts outside the clinical environment demonstrates that the ecology of these fungi is more complex than imagined and that it should be further explored (OPULENTE et al., 2019).

### ***C. albicans* in plants**

Some studies show that *C. albicans* can also be isolated from plant sources in nature. Van Uden and colleagues (1956) isolated *C. albicans* from flowers of *Ulex* sp. (Fabaceae) and *Myrtus communis*. The researchers found that the *C. albicans* isolates obtained at work were virulent in in vivo tests with rabbits. Even with the isolation in plants, the authors ponder on the saprophytic characteristic of these yeasts. They state that it is not possible to prove that this is a natural habitat for these fungi, but that the work demonstrates that *C. albicans* can survive outside the endothermic host (VAN UNDEN et al., 1956). Khan and colleagues (2007) isolated several fungi from a medicinal plant widely used in India, *Calotropis procera*. Among the isolated species is the yeast *C. albicans*, however the authors do not discuss the importance of finding this opportunistic pathogen in this habitat (KHAN et al., 2007). In the work already quoted from Opulent and colleagues (2019) the researchers also found *C. albicans* in fruits and other plant materials collected from different regions of the United States. Bensasson and colleagues (2019) isolated *C. albicans* from oak trees in an old forest in the United Kingdom and compared the genome of these isolates with yeasts obtained in the clinical environment. In the work, the researchers found that oak isolates are similar to clinical isolates because they are predominantly diploid. However, they found that oak isolates have a higher level of heterozygosity in the entire genome than clinical isolates. This high genetic variation found in *C. albicans* isolated from these trees suggests, according to the authors, that these yeasts live in this habitat for a long period of time (BENSASSON et al., 2019). The same research group had previously isolated *C. albicans* in several plants in different locations in Europe (ROBINSON et al., 2016). In this work, the researchers recall that *C. albicans* is rarely isolated

outside mammals, and that the finding of wild populations of this yeast in regions subjected to low temperatures for most of the year, may be an explanation for the presence of aquaporin genes in the genome. of this yeast species, which gives resistance to freezing (TANGHE et al., 2005; ROBINSON et a., 2016).

### ***C. albicans* in freshwater and sea**

Isolation of *C. albicans* in water bodies is considered by many researchers a evidence that a contamination site. Bakhiet et al. (2016) isolated *C. albicans* from samples obtained from the Nile River and found that a significant amount of chlorine was needed to make this fungus unfeasible. As the water from this river is used for human consumption, the researchers are concerned with the impact that this would bring to the clinic, mainly in relation to the consumption of this water by immunosuppressed people (BAKHIEET et al., 2016).

Kulesza et al. (2018) conducted a 20-year study on the water quality of the Lyne River in Poland. During all these years of collection, *C. albicans* was one of the microorganisms that were constantly isolated. The authors found that the presence of this opportunistic pathogen occurs with greater intensity in places where the river flows close to cities, indicating an anthropogenic pressure. The authors emphasize that these findings are an important epidemiological factor and that the presence of *C. albicans* in this river can be harmful to people and other animals that come into contact with this water.

Pinto and collaborators (2012) evaluated the presence of microorganisms in the water of beaches on the south coast of São Paulo, Brazil. In this work, the researchers found in the collected samples the fungus *C. albicans* at low frequency. Even though *C. albicans* is a pathogen related to various infections, the authors of this work claim that the low frequency of the presence of this fungus is not so worrying in these environments, however no further study on virulence and pathogenicity of the samples collected by the authors has been carried out, only quantification (PINTO et al., 2012). Maciel and collaborators also isolated *C. albicans* in low concentration in samples of sea water on the beaches in Brazil. In the study, these authors evaluated some virulence factors expressed by these isolates. All isolates of *C. albicans* evaluated in the study showed capacity for

morphogenesis and biofilm formation, both in in vitro and in vivo experiments (MACIEL et al., 2019).

In addition to running water environments, swampy environments can be a reserve site for *C. albicans*. Swampy environments are characterized by having a low amount of available oxygen, but even with this limitation, studies show that the yeast *C. albicans* can persist in the area. Stone and colleagues collected water samples from a swampy river in South Africa. This river had sewage contamination, so the findings have an anthropic influence. The collections were carried out at different depths of the river and the samples analyzed by molecular methods for the detection of microorganisms. At the end, the authors found that even in samples from regions with low amounts of available oxygen it was possible to detect the presence of *C. albicans*. The authors reiterate the epidemiological importance of identifying these reservoirs of opportunistic pathogens outside the hospital environment as a tool in disease control (STONE et al., 2012).

### **Clinical importance of the isolation of *C. albicans* in natural environments**

It is indisputable that the study of environmental yeasts, including *C. albicans*, can add a lot of knowledge in the fields of ecology, taxonomy and biotechnology. However, when we speak specifically of the study of environmental isolates of *C. albicans*, it is impossible not to ask questions about the possible impact that the isolation of these yeasts in natural environments would bring to the clinic. As opportunistic pathogens, the isolation of this species in natural environments raises many doubts among researchers, and these doubts can only be resolved with detailed studies about the presence of these fungi in non-clinical environments. Some works in the literature show, for example, that the study of environmental isolates can contribute to a better understanding of the events that led to the evolution of fungal virulence. Studies by STEENBERGEN et al (2004), CASADEVALL et al (2019) and LEMOS TAVARES et al (2020), show that the interaction of amoebae found in the soil with different fungal species may have contributed to the evolution of virulence factors currently expressed in these fungi, such as, for example, the filamentation that would have been developed to hinder

the predation of fungi by amoebae and which today is shown to be an important factor in the evasion of the human immune system and in the invasion of tissues. In addition to being a possible tool that would assist in the study of the evolution of virulence factors in fungi, research focused on environmental isolates of opportunistic pathogens can be useful to assess the behavior of these microorganisms in the face of climate change. Some studies on the subject show that climate change can influence the host pathogen interaction, the dispersion of diseases, resistance to antimicrobials and the virulence of these microorganisms (ALTIZER et al, 2013; RAFFEL et al, 2013; MAYNARD et al, 2015; LEACH et al, 2016; CAVICCHIOLI et al, 2019). Leach et al. (2016) found in their work a relationship between the transcription factors that induce the gene expression of genes linked to Heat Shock proteins and the induction of the transcriptional program linked to the virulence factors of *C. albicans*. This work reinforces the idea that exposure to a stress condition, such as temperature rise, can influence the expression of genes linked to virulence factors in this fungus (LEACH et al, 2016). Resistance to antifungal treatment may be another factor that can be assessed in environmental isolates. Some studies show that yeasts of the genus *Candida* obtained in nature may be resistant to treatment with antifungals, even without previous contact with these drugs (MEDEIROS et al., 2008; BRANDÃO et al., 2010; BRILHANTE et al., 2012; CASTELO-BRANCO et al., 2013; BRILHANTE et al., 2015; MACIEL et al., 2019; ROCHA et al., 2016). Understanding the mechanisms involved in this characteristic can help researchers to anticipate the emergence of multidrug-resistant isolates and the development of new antifungals.

## **Conclusion**

There is a gap regarding the knowledge of the ecology of opportunistic pathogens such as *C. albicans*. The search for knowledge in the clinical field leaves aside the importance of knowing the characteristics that these microorganisms present in environments outside endothermic hosts. It is not clear how the isolation of *C. albicans* in wild environments can impact the epidemiology of infections caused by opportunistic pathogens. Little data exists on how these microorganisms express their virulence factors in the wild. It is not known how the characteristics

of these microorganisms can be selected in these environments. It is not known whether these sites can be secondary sources of contact that can lead to contamination and the development of infections by humans. In other words, practically nothing is known about *C. albicans* outside the clinical environment. Thus, we understand that investments in research in this area of knowledge is an urgent and necessary demand to bring data about its complex and unknown ecology that may be related to its clinical pathogenicity.

## References

- AJELLO, L. Soil as Natural Reservoir for Human Pathogenic Fungi. *Science*, v. 123, n. 3203, p. 876–879, 18 maio 1956.
- ALTIZER, S. et al. Climate Change and Infectious Diseases: From Evidence to a Predictive Framework. *Science*, v. 341, n. 6145, p. 514–519, 2 ago. 2013.
- BAKHJET, S.; AHMED, W.; MOHAMMED, W. Significance of Fungal Species Isolated from Blue Nile River and Tuti Island on Drinking Water Quality. *Journal of Applied Life Sciences International*, v. 7, n. 4, p. 1–6, 10 jan. 2016.
- BENSASSON, D. et al. Diverse Lineages of *Candida albicans* Live on Old Oaks. *Genetics*, v. 211, n. 1, p. 277–288, jan. 2019.
- BRANDÃO, 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, n. 2, p. 279–289, 1 jun. 2010.
- BRILHANTE, R. S. N. et al. Surveillance of Azole Resistance Among *Candida* spp. as a Strategy for the Indirect Monitoring of Freshwater Environments. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 226, n. 3, p. 52, mar. 2015.
- BRILHANTE, R. S. N. et al. Yeast microbiota of raptors: a possible tool for environmental monitoring: Use of *Candida* spp. for environmental monitoring. *Environmental Microbiology Reports*, v. 4, n. 2, p. 189–193, abr. 2012.
- CASADEVALL, A. et al. The ‘Amoeboid Predator-Fungal Animal Virulence’ Hypothesis. *Journal of Fungi*, v. 5, n. 1, p. 10, 21 jan. 2019.
- CASTELO-BRANCO, D. S. C. M. et al. Azole-resistant *Candida albicans* from a wild Brazilian porcupine (*Coendou prehensilis*): a sign of an environmental imbalance? *Medical Mycology*, v. 51, n. 5, p. 555–560, jul. 2013.
- CAVICCHIOLI, R. et al. Scientists’ warning to humanity: microorganisms and climate change. *Nature Reviews Microbiology*, v. 17, n. 9, p. 569–586, set. 2019.
- GOW, N. A. R.; YADAV, B. Microbe Profile: *Candida albicans*: a shape-changing, opportunistic pathogenic fungus of humans. *Microbiology*, v. 163, n. 8, p. 1145–1147, 1 ago. 2017.

KHAN, R. et al. Biodiversity of the endophytic fungi isolated from *Calotropis procera* (AIT.) R. BR. Pak. J. Bot, v. 39, n. 6, p. 2233–2239, 2007.

KOCHKINA, G. et al. Ancient fungi in Antarctic permafrost environments. FEMS Microbiology Ecology, v. 82, n. 2, p. 501–509, nov. 2012.

KULESZA, K. et al. Potentially pathogenic fungi of the *Candida* genus isolated from the Łyna River – a 20-year study. Annals of Parasitology, v. 64, n. 3, p. 217–223, 2018.

LAMOTH, F. et al. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 73, n. suppl\_1, p. i4–i13, 1 jan. 2018.

LEACH, M. D. et al. Hsf1 and Hsp90 orchestrate temperature-dependent global transcriptional remodelling and chromatin architecture in *Candida albicans*. Nature Communications, v. 7, n. 1, p. 11704, set. 2016.

LEMOS TAVARES, P. et al. The interaction between *Sporothrix schenckii* sensu stricto and *Sporothrix brasiliensis* with *Acanthamoeba castellanii*. Mycoses, v. 63, n. 3, p. 302–307, mar. 2020.

MACIEL, N. O. et al. Occurrence, antifungal susceptibility, and virulence factors of opportunistic yeasts isolated from Brazilian beaches. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 114, p. e180566, 2019.

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, ago. 2008.

MAYNARD, J. et al. Projections of climate conditions that increase coral disease susceptibility and pathogen abundance and virulence. Nature Climate Change, v. 5, n. 7, p. 688–694, jul. 2015.

MOK, W. Y. et al. Ecology of pathogenic yeasts in Amazonian soil. Applied and Environmental Microbiology, v. 47, n. 2, p. 390–394, 1984.

OPULENTE, D. A. et al. Pathogenic budding yeasts isolated outside of clinical settings. FEMS Yeast Research, v. 19, n. 3, p. foz032, 1 maio 2019.

PINTO, K. C. et al. Microbiological quality assessment of sand and water from three selected beaches of South Coast, São Paulo State, Brazil. *Water Science and Technology*, v. 66, n. 11, p. 2475–2482, 1 dez. 2012.

RAFFEL, T. R. et al. Disease and thermal acclimation in a more variable and unpredictable climate. *Nature Climate Change*, v. 3, n. 2, p. 146–151, fev. 2013.

ROBINSON, H. A.; PINHARANDA, A.; BENSASSON, D. Summer temperature can predict the distribution of wild yeast populations. *Ecology and Evolution*, v. 6, n. 4, p. 1236–1250, fev. 2016.

ROCHA, M. F. G. et al. Cross-resistance to fluconazole induced by exposure to the agricultural azole tetraconazole: an environmental resistance school? *Mycoses*, v. 59, n. 5, p. 281–290, maio 2016.

ROGERS, A. L.; BENEKE, E. S. Human pathogenic fungi recovered from Brazilian soil. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, v. 22, n. 1, p. 15–20, jan. 1964.

STEENBERGEN, J. N. et al. Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. *Infection and Immunity*, v. 72, n. 6, p. 3478–3488, 1 jun. 2004.

STONE, W. et al. External Ecological Niche for *Candida albicans* within Reducing, Oxygen-Limited Zones of Wetlands. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n. 7, p. 2443–2445, 1 abr. 2012.

TANGHE, A. et al. Aquaporin Expression and Freeze Tolerance in *Candida albicans*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 10, p. 6434–6437, out. 2005.

VAN UDEN, N.; DE MATOS FAIA, M.; ASSIS-LOPES, L. Isolation of *Candida albicans* from Vegetable Sources. *Journal of General Microbiology*, v. 15, n. 1, p. 151–153, 1 ago. 1956.

### **9.3- Artigo 03:** Modelos hospedeiros invertebrados: novas ferramentas para avaliação da virulência e patogenicidade fúngica

#### **Review**

### **Modelos hospedeiros invertebrados: novas ferramentas para avaliação da virulência e patogenicidade fúngica**

**Aline Dias Valério<sup>1</sup> e Susana Johann<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

#Corresponding author:

Susana Johann, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, PO Box 486, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil. Tel.: +55 3349 7700; Fax: +55 31 3295 3115; Email: sjohann@icb.ufmg.br

#### **Introdução**

A incidência de infecções fúngicas sofreu um aumento nas últimas décadas e ganhou destaque no âmbito clínico principalmente a partir da segunda metade do século 20 (SCHMIEDEL & ZIMMERLI, 2016; CASADEVALL, 2018; QUINDÓS et al., 2018). Este período foi marcado pelo avanço no número de casos de pessoas infectadas com o vírus HIV e pelas inovações na medicina, o que contribuiu para um aumento no número de pessoas com algum nível de imunossupressão, fator de risco para o desenvolvimento de doenças fúngicas (CASADEVALL, 2018; BAJPAI et al., 2019; RHODES, 2019). Estima-se que mais de um bilhão de pessoas apresentem algum quadro de infecção fúngica no mundo, e que destes cerca de 1,5 milhões morram em decorrência de infecções fúngicas invasivas (BONGOMIN et al. 2017; BAJPAI et al., 2019). O número de mortes por infecções fúngicas já ultrapassa o de malária e de tuberculose no mundo, e mesmo com este quadro alarmante as doenças fúngicas ainda são negligenciadas em vários aspectos, como investimento em pesquisa e

tratamento, diagnóstico e estudos epidemiológicos (BROWN et al., 2012; SCHMIEDEL & ZIMMERLI, 2016; ALMEIDA et al., 2019).

Mesmo com este quadro desfavorável, pesquisadores do mundo todo buscam entender melhor a complexidade das infecções fúngicas, desde o processo de colonização, fatores de virulência envolvidos na patogênese, interação patógeno-hospedeiro, mecanismos de resistência e dispersão, dentre outros processos. Com esta amplitude de variáveis a serem avaliadas pelos pesquisadores, diversas são também as técnicas experimentais empregadas nos estudos. Modelos de pesquisa *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* e *in silico* são utilizadas para o estudo das infecções fúngicas, mas sem dúvidas as técnicas *in vivo* empregando o uso de modelos vertebrados são consideradas padrão ouro e por este motivo são as técnicas mais difundidas (CAIRNS et al., 2016; KRAPPMANN et al., 2017; ALSHEHRI et al., 2016; CORZO-LEÓN et al., 2019, ROSOWSKI et al 2018, BANFALVI et al., 2018, ASTVAD et al., 2018).

Mesmo datando do século 6 A.C o uso de animais em pesquisas é muito criticado principalmente pelas questões éticas envolvidas (FRANCO, 2013). Mesmo sendo um tema cada vez mais recorrente, a comunidade científica por muitos anos foi resistente a implantação de metodologias alternativas por afirmar que a utilização de animais seria indispensável para a obtenção de resultados satisfatórios em suas pesquisas (RENAMA, 2019). Porém pesquisas recentes mostram que o emprego de técnicas alternativas pode reduzir, e em alguns casos substituir o uso de vertebrados na pesquisa científica. Falando especificamente das pesquisas voltadas para o estudo de infecções causadas por fungos, trabalhos atuais vêm demonstrando resultados animadores com o uso de modelos invertebrados, principalmente para a avaliação da virulência desses microrganismos (FUCHS & MYLONAKIS, 2006; DE SOUZA et al., 2015; ORTEGA-RIVEROS et al., 2017).

Os invertebrados, diferentemente dos animais vertebrados são considerados por alguns autores como seres não sencientes, ou seja, não apresentam capacidade de responderem conscientemente acerca do que ocorre a seu redor (SMITH, 1991; DOKE DHAWALE, 2015). Esta característica minimizaria as questões éticas envolvidas no uso de animais vertebrados na pesquisa.

Uma outra característica importante do uso invertebrados é que eles apresentam características do sistema imune inato conservadas com outras espécies mais complexas, inclusive com os seres humanos, então seriam uma ferramenta útil no estudo das primeiras reações do hospedeiro diante de um processo infeccioso (IGBOIN et al., 2012; ARVANITIS et al., 2013; MAGUIRE et al., 2017; SINGULANI et al., 2018).

Nos tópicos abaixo nós iremos abordar com mais detalhes os modelos invertebrados que tem sido utilizados nas pesquisas científicas, focando no seu uso como ferramenta para o estudo acerca das infecções fúngicas.

### ***Drosophila melanogaster***

A mosca de fruta *D. melanogaster* é um modelo muito explorado nos estudos genéticos, mas seu uso como modelo hospedeiro para estudos de infecções fúngicas se difundiu a partir do estudo realizado pelo ganhador do Nobel Jules A. Hoffmann (LEMAITRE et al., 1996; DIONNE & SCHNEIDER, 2008). Este pesquisador descobriu como o sistema imune inato é ativado frente a uma infecção à partir da descoberta de receptores tipo Toll nas moscas de fruta. Hoffmann demonstrou que moscas deficientes para os receptores do tipo Toll morriam diante de uma infecção fúngica, e deste modo provou a importância destes receptores no processo de resposta imune (LEMAITRE et al., 1996).

*D. melanogaster* não possui um sistema imune adaptativo, porém, seu sistema imune inato apresenta diversas características que são conservadas nos mamíferos e por este motivo serve de ferramenta para o estudo, de forma isolada, das interações dos patógenos com o sistema imune inato dos hospedeiros (IGBOIN et al., 2012). O sistema imune de *D. melanogaster* atua com diversos mecanismos para combater uma infecção fúngica. A camada epitelial é uma barreira física contra os fungos, que quando rompida pode promover o recrutamento de peptídeos antimicrobianos para o local a fim de combater o avanço da infecção (DIONNE & SCHNEIDER, 2008). Estes peptídeos antimicrobianos são produzidos pelo corpo gorduroso, estrutura

análoga ao fígado humano, e atuam juntamente com a via Toll durante a resposta imune humoral a infecção fúngica (TZOU, 2002; DIONNE & SCHNEIDER, 2008; IGBOIN et al., 2012; AL-MALIKI et al., 2017). Além disso, espécies reativas de oxigênio podem auxiliar ao combate de microrganismos invasores juntamente com a via da fenoloxidase, a qual é responsável pela produção de melanina (DIONNE & SCHNEIDER, 2008). *D. melanogaster* também possui componentes celulares na sua resposta imune. Na hemolinfa destes insetos, os hemócitos circulantes apresentam funções nos processos de fagocitose, melanização, encapsulação, coagulação para tentar conter o avanço do patógeno (IGBOIN et al., 2012).

A partir dos estudos imunológicos que demonstraram similaridades da defesa imune inata de *D. melanogaster* com mamíferos, pesquisadores passaram a testar em seus trabalhos o uso deste inseto como modelo hospedeiro alternativo. Chamilos e colaboradores (2006) utilizaram *D. melanogaster* mutantes para o gene Toll como modelo de infecção para leveduras do gênero *Candida*, e puderam observar, que assim como ocorre em humanos, *Candida parapsilosis* se mostra menos virulenta que *C. albicans*. Wurster e colaboradores (2019) também utilizaram o modelo de *D. melanogaster* para avaliar a virulência de microrganismos do gênero *Candida*. Neste trabalho os pesquisadores buscaram avaliar a virulência de diferentes isolados da espécie multi-droga resistente *Candida auris*. O estudo comparou a virulência de *C. auris* com *C. albicans* e mostrou ao final que os isolados de *C. auris* apresentavam maior virulência. Os pesquisadores, por meio de réplicas dos experimentos também puderam demonstrar que ensaios utilizando este modelo invertebrados apresentam alta reprodutibilidade.

*D. melanogaster* também pode ser um modelo de infecção útil nos estudos sobre os mecanismos de virulência de fungos do gênero *Malassezia*, como mostra trabalho de Merkel e colaboradores (2018). Moscas toll-deficientes inoculadas com diferentes concentrações de *M. pachydermatis* apresentaram letalidade dose dependente frente a infecção. Este perfil dose-dependente foi corroborado pelos resultados obtidos pelas análises histopatológicas e de carga fúngica realizadas após a morte das larvas (MERKEL et al., 2018).

As moscas de fruta também podem ser uma importante ferramenta para avaliar diferenças no perfil de virulência entre isolados. Isto é o que foi mostrado no estudo de Thompson e colaboradores (2014). Estes pesquisadores avaliaram o perfil de virulência de diferentes tipos moleculares de *Cryptococcus* utilizando *D. melanogaster* como modelo hospedeiro. Eles verificaram que existe uma diferença no perfil de virulência de *Cryptococcus* e que o tipo molecular VGIII é o mais virulento para as moscas (THOMPSON et al., 2014).

Ramirez-Camejo também utilizaram as moscas como modelo hospedeiro para análise do perfil de virulência de diferentes isolados fúngicos. O fungo analisado foi *Aspergillus flavus*, e isolados clínicos, ambientais e diferentes tipos moleculares foram testados. Neste trabalho eles utilizaram as moscas selvagens, sem a deleção do gene do Toll receptores, pois os pesquisadores notaram que *A. flavus* consegue infectar de maneira satisfatória as moscas selvagens. Ao final do experimento os pesquisadores verificaram que todos os isolados apresentaram algum nível de virulência, mas que havia diferença de virulência entre eles. Desta forma os pesquisadores mostraram que *D. melanogaster* pode ser uma ferramenta valiosa na pesquisa sobre a mecanismos envolvidos na virulência deste fungo (RAMIREZ-CAMEJO et al., 2014).

Além de excelente papel como modelo hospedeiro alternativo na avaliação da virulência fúngica, moscas de fruta podem ser utilizadas como ferramenta para a pesquisa de novas substâncias com potencial antifúngico. Wuyep e colaboradores (2018) avaliaram atividade antifúngica do extrato alcóolico da planta *Alchornea cordifolia* frente a isolados de *Aspergillus fumigatus* e *A. terreus*. O composto mostrou-se ativo, reduzindo a morte das moscas em até 50% comparado ao controle não tratado (WUYEP et al., 2018). Sampaio e colaboradores testaram outro composto obtido de plantas, o ácido elágico, com atividade in vitro comprovada contra *Candida* utilizando o modelo invertebrado *D. melanogaster*. Eles utilizaram a mosca para avaliar a toxicidade do composto e a atividade do mesmo contra a infecção por *Candida*. Ao final do experimento verificaram a eficácia na redução da letalidade das moscas infectadas por *Candida* e tratadas com o composto. Os pesquisadores atestaram a capacidade do modelo invertebrado *D. melanogaster* ser utilizado como metodologia de

screening para testes de toxicidade e atividade antifúngica de novos compostos (SAMPAIO et al., 2018).

A facilidade logística, atrelada a menores custos de manutenção juntamente com ferramentas genéticas que tornam disponíveis vários mutantes de *D. melanogaster*, tornam este invertebrado uma ferramenta extremamente útil para estudos em larga escala sobre virulência, patogenicidade fúngica e busca por novos compostos com potencial antifúngico.

### ***Acanthamoeba castellanii***

*A. castellanii* é uma ameba de vida livre, com distribuição ubíqua, que se alimenta de partículas orgânicas e de microrganismos (SINGULANI et al, 2018; CASADEVALL, 2011). A interação que *A. castellanii* tem com os microrganismos na natureza despertou o interesse de pesquisadores. O mecanismo de alimentação por fagocitose utilizado pelas amebas se assemelha ao que é observado pelos macrófagos durante um combate contra uma invasão microbiana, e tais similaridades tem feito deste organismo uma alternativa nos estudos sobre interação do hospedeiro com patógeno (CASADEVALL, 2011; THEWES et al., 2019).

Um dos primeiros trabalhos realizados no qual se avaliou a interação desta ameba com um fungo foi realizado por Castellani na década de 50. Neste trabalho o autor mostrou que *A. castellanii* apresentou a capacidade de fagocitar e matar o fungo *Cryptococcus neoformans* (CASTELLANI, 1955). A partir de então, diversos trabalhos se aprofundaram na avaliação do processo de interação desta ameba com *Cryptococcus*, e assim conseguiram observações valiosas sobre o processo de fagocitose, tornando este modelo uma ferramenta que pode ajudar a uma melhor compreensão do processo que ocorre durante a ação de macrófagos contra um patógeno invasor em mamíferos.

Chrisman e colaboradores (2010) mostraram a importância da cápsula de *C. neoformans* na evasão da fagocitose por *A. castellanii*. No trabalho os pesquisadores notaram que a fagocitose de isolados de *C. neoformans* com

capsula é dificultada, diferente do que é observado em mutantes para a produção da mesma. Também observaram a capacidade de o fungo conseguir sair da ameba horas depois da fagocitose, processo semelhante ao que já foi observado em macrófagos. Com este resultado eles fizeram um paralelo do que ocorre durante o processo infeccioso e de como é a interação dos macrófagos, e mostram que *A. castellanii* pode ser uma ferramenta útil no estudo desses fatores que afetam diretamente o processo de patogênese (CHRISMAN et al., 2010).

*A. castellanii* é um modelo útil nas pesquisas relacionadas a melhor compreensão do processo de evolução da virulência de *Cryptococcus*. Pesquisadores tem como uma das principais hipóteses para explicar a emergência da virulência em *Cryptococcus* a pressão seletiva que este fungo sofreu diante da predação por protozoários na natureza. Pesquisas de Derengowski e colaboradores (2013), Rizzo e colaboradores (2017), Gonçalves e colaboradores (2019), Vij e colaboradores (2019), dentre outras, tem trazido detalhes sobre os componentes gênicos e estruturais envolvidos no processo de interação de *Cryptococcus* e *A. castellanii*, e de como este processo está relacionado com a evolução da virulência deste fungo em mamíferos.

Steenbergen e colaboradores também trouxeram com seu trabalho mais indícios que corroboram com uma possível evolução da virulência fúngica atrelada a interação desses microrganismos com protozoários na natureza. No trabalho eles fizeram uso do modelo de *A. castellanii*, e o co-cultivou com os fungos *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii* e *Histoplasma capsulatum*. Os pesquisadores observaram um aumento da filamentação dos fungos durante a exposição a ameba trazendo mais um indício para sustentar a hipótese da evolução da virulência fúngica atrelada a protozoários (STEENBERGEN et al., 2004). Lemos Tavares e colaboradores tiveram resultados semelhantes ao de Steenbergen. Eles co-cultivaram *A. castellanii* com *S. schenckii* e *S. brasiliensis* e notaram um aumento na produção de conídios e hifas pelos fungos, fatores estes ligados a virulência em mamíferos. Estes mesmos pesquisadores ainda alertam que a presença de *A. castellanii* em sítios de infecção pode influenciar no estabelecimento do fungo e contribuir para o processo de infecção (LEMOS TAVARES et al., 2020).

O uso de *A. castellanii* como um modelo alternativo de baixa complexidade, custo e de fácil manipulação tem trazido contribuições importantes para a busca de uma melhor compreensão da evolução da virulência fúngica e da interação destes fungos com o sistema imune.

### *Bombyx mori*

*Bombyx mori* é o único inseto domesticado, o qual é utilizado na produção de seda a mais de 5000 anos (PANTHEE et al., 2017; KAITO et al., 2012). Além da sua importância industrial, as larvas de *B. mori* passaram a chamar a atenção dos pesquisadores e foram sendo inseridas nos trabalhos científicos como modelos alternativos. Estes estudos se iniciaram principalmente com o intuito de se entender os mecanismos de defesa desde inseto frente as infecções microbianas, com o objetivo de criar mecanismos contra infecções que possam por ventura afetar a produção deste Lepidoptera de elevada importância econômica (KAUSAR et al., 2019). A partir desses estudos os pesquisadores também viram o potencial de se inserir este animal como modelo hospedeiro alternativo nos estudos de virulência e patogenicidade microbiana.

*B. mori* compartilha com outros modelos invertebrados as vantagens éticas, de baixo custo de manutenção e sistema imune inato conservado com mamíferos, além disso possui larvas com um tamanho considerável o que facilita sua manipulação e permite, por exemplo, inocular uma quantidade pré-definida de inóculo durante os procedimentos experimentais (PANTHEE et al., 2017; MAGUIRE et al., 2017; MATSUMOTO & SEKIMIZU, 2019).

Matsumoto e colaboradores mostraram que *B. mori* é um modelo eficiente na avaliação da virulência de *C. albicans*. Neste trabalho os pesquisadores analisaram a influência da morfogênese na virulência do fungo *C. albicans*. Eles notaram que leveduras que foram cultivadas previamente em um meio indutor de filamentação se mostravam mais virulentas que as que não foram cultivadas no mesmo meio. Eles também mostraram que o fungo filamentava no interior das larvas de *B. mori* durante a infecção. *B. mori* se mostra uma ferramenta para

o estudo de fatores de virulência e de como os mesmos podem influenciar a no processo de patogenicidade (MATSUMOTO et al., 2013).

Matsumoto e colaboradores avaliaram a influência da temperatura na patogenicidade de *C. neoformans*, utilizando *B. mori* como modelo de infecção. Os autores demonstraram que após a infecção, as larvas de *B. mori* morriam mais quando expostas a temperatura de 37°C (MATSUMOTO et al., 2012). Em outro trabalho o autor avaliou a capacidade deste modelo invertebrado ser utilizado para avaliar a eficácia de compostos com ação antifúngica. Os pesquisadores verificaram que antifúngicos comerciais apresentam efeito terapêutico e reduzem a morte de *B. mori* infectados com *C. neoformans*. Desta forma os autores afirmam que *B. mori* pode ser uma ferramenta nos estudos sobre a eficácia de substâncias com potencial antifúngico (MATSUMOTO et al., 2017).

*B. mori* se mostrou eficiente como modelo de infecção para fungos dermatófitos. Ishii e colaboradores mostraram que dermatófitos são capazes de provocar a morte das larvas. Os pesquisadores também verificaram que quando as larvas de *B. mori* eram tratadas com itraconazol e terbinafina, medicamentos comumente utilizados para o tratamento de dermatofitoses, os mesmos apresentavam uma redução das mortes (ISHII et al., 2017).

Além do seu papel importante na indústria, *B. mori* se mostra uma ferramenta valiosa na pesquisa. Sua eficiência como modelo para o estudo de fatores de virulência, patogenicidade e para a busca de substâncias com potencial antimicrobiano vem sendo demonstrados em diversos trabalhos, e fazem deste invertebrado mais um modelo de infecção como alternativa ao uso de animais sencientes na pesquisa.

### ***Caenorhabditis elegans***

*C. elegans* é um nematódeo de vida livre que começou a ser utilizado nas pesquisas científicas na década de 60. Brenner utilizou este invertebrado para pesquisas nos campos da neurobiologia e genética (BRENNER, 2002; FÉLIX;

BRAENDLE, 2010; STERKEN et al, 2015; SIFRI et al, 2005). Anos mais tarde, tal modelo passou a ser utilizado para estudo de patogenicidade e virulência microbiana, e também foi empregado nos testes de substâncias com potencial antimicrobiano.

Este nematódeo apresenta características que contribuem para as pesquisas científicas nas quais ele é empregado como hospedeiro alternativo. Podemos citar a cutícula transparente, o rápido ciclo de vida, genoma sequenciado e com isso possibilidade de construção de inúmeros mutantes, e a produção de prole geneticamente idêntica como as principais vantagens desse modelo (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015; MADENDE et al., 2020).

Os nematódeos *C. elegans* apresentam vários mecanismos que são utilizados na defesa contra patógenos. A cutícula espessa de quitina e colágeno é a principal barreira física contra a entrada de patógenos (PUJOL et al, 2008). A faringe desses animais também age como barreira, destruindo alguns patógenos antes dos mesmos atingirem o intestino (MYLONAKIS & ABALLAY, 2005). Mecanismos de resposta imune inata também estão presentes neste invertebrado. Padrões moleculares de reconhecimento de patógenos, receptores do tipo Toll, cascatas de sinalização que levam a produção de moléculas efetoras de destruição de patógenos, peptídeos antimicrobianos, espécies reativas de oxigênio dentre outras vias, são ativadas por *C. elegans* durante o combate a uma infecção (ERMOLAEVA & SCHUMACHER, 2014; BRANDT & RINGSTAD, 2015; EWBANK & PUJOL, 2016; ENGELMANN & PUJOL, 2010; DIERKING, YANG & SCHULENBURG, 2016).

A virulência e patogenicidade de diversos fungos já foram avaliadas utilizando como modelo hospedeiro o nematódeo *C. elegans*. A infecção destes animais se dá pela troca da alimentação convencional (*Escherichia coli* OP50), pelo microrganismo a ser estudado (ELKABTI, ISSI, & RAO, 2018).

Ortega-Riveros utilizou *C. elegans* para avaliar diferenças na virulência entre diferentes espécies do gênero *Candida* (*C. albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida metapsilosis*, *Candida orthopsilosis* e *Candida parapsilosis*). *C. albicans* e *C. krusei* foram as espécies que apresentaram maior virulência no modelo de *C. elegans*, e *C. dubliniensis* foi a

espécie menos virulenta. Os resultados obtidos por estes pesquisadores mostram que *C. elegans* pode ser uma alternativa na avaliação da patogenicidade do gênero *Candida* (ORTEGA-RIVEROS et al., 2017). Pukkila-Worley e colaboradores também utilizaram *C. elegans* para avaliar a virulência de *Candida*. Porém estes pesquisadores avaliaram a influência da produção de hifas na virulência. Eles verificaram que mutantes de *C. albicans* deficientes em genes ligados ao processo de filamentação eram menos virulentos. *C. elegans* pode ser uma metodologia empregada no screening de fatores ligados a virulência expressos pelos fungos (PUKKILA-WORLEY et al., 2009).

*C. elegans* pode ser um modelo extremamente útil para uma melhor compreensão do papel do sistema imune inato durante o processo de infecção pelo fungo *Histoplasma capsulatum*. Johnson e colaboradores viram que mais de 90% dos *C. elegans* infectados com *H. capsulatum* morriam em até 72 horas experimentais. Eles também verificaram que quando os nematódeos eram infectados com fungos mortos pelo calor eles viviam cerca de 10-14 dias. Esta viabilidade dos nematódeos alimentados com *H. capsulatum* mortos pelo calor é menor do que do grupo controle (cerca de 20 dias), alimentado com *E. coli* OP50. Isto sugere que mesmo após a morte do fungo algum composto produzido pelo mesmo ainda pode afetar a viabilidade de *C. elegans* (JOHNSON et al., 2009).

*C. neoformans* apresenta elevada virulência no modelo de *C. elegans*, além disso genes envolvidos na virulência em mamíferos também são expressos durante a infecção no nematódeo. Isto foi demonstrado no trabalho de Mylonakis e colaboradores, no qual verificaram que genes associados a vias de transdução de sinais, produção de lacase e  $\alpha$  mating type estão envolvidos na virulência em mamíferos também apresentam importante papel na morte do modelo nematódeo (MYLONAKIS et al., 2002).

Os fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium* também apresentam virulência em *C. elegans*. Trabalhos mostram que 80-90% dos nematódeos infectados com estes fungos morrem em até 120 horas (MUHAMMED et al., 2012. OKOLI & BIGNELL, 2015). *C. elegans* pode ajudar os pesquisadores a estudar genes envolvidos na virulência destes fungos, auxiliar no estudo de diferença de virulência destes isolados e na compreensão

do papel da resposta imune inata durante o processo infeccioso (MADENDE et al., 2020).

*C. elegans* é um modelo alternativo que pode ser empregado de maneira eficiente para o estudo da virulência de diversos fungos como demonstrado pelos artigos citados anteriormente, porém ele não é um modelo viável para o estudo de todos os microrganismos. Scorzoni e colaboradores, por exemplo, demonstraram em seu trabalho que *C. elegans* não é viável para a avaliação da virulência de fungos do gênero *Paracoccidioides*. Os pesquisadores verificaram que os vermes não conseguiam ingerir o fungo, impossibilitando a avaliação da infecção. Porém, mesmo não obtendo sucesso com a infecção os pesquisadores viram que apenas a exposição dos vermes ao fungo fazia com que *C. elegans* expressasse genes envolvidos na produção de peptídeos antimicrobianos, e que esta expressão variava de acordo com a espécie de *Paracoccidioides* utilizada no experimento (SCORZONI et al., 2018).

Além de seu papel no estudo de virulência fúngica, *C. elegans* pode ser uma ferramenta útil no screening de novas substâncias com potencial antimicrobiano (LIU et al., 2016; KIM et al., 2017). Trabalhos de Breger et al., Tampakakis et al., Zehrbach et al, Chen et al dentre outros mostram que *C. elegans* é eficiente na avaliação da toxicidade de novos compostos com potencial ação antifúngica, e também na avaliação do grau de efetividade dos mesmos diante de uma infecção fúngica (BREGER et al., 2007; TAMPAKAKIS et al., 2008; ZEHRBACH et al., 2017; CHEN et al., 2017).

### ***Tenebrio molitor***

O besouro *Tenebrio molitor* é um inseto com ampla distribuição mundial. Este coleóptero causa muitos prejuízos nas culturas de grãos ao redor do mundo, porém nos últimos anos pesquisadores tem apostado nas larvas deste inseto como um novo modelo hospedeiro para estudos de virulência e patogenicidade microbiana (SCHROECKENSTEIN et al., 1990).

*T. molitor* está exposto a diversos microrganismos no ambiente, porém mecanismos da imunidade inata auxiliam no combate a infecção reconhecendo, modulando e ativando respostas humorais e celulares contra o patógeno invasor (TINDWA et al., 2013; JOHNSTON et al., 2014). A cutícula quitinosa é a primeira barreira que tenta impedir a invasão dos patógenos, porém quando os microrganismos conseguem romper esta barreira, imediatamente o sistema imune de *T. molitor* aciona diferentes vias como via da fenoloxidase, lisozimas, produção de peptídeos antimicrobianos e células fagocíticas para combater a infecção (JOHNSTON et al., 2014).

*T. molitor* é um modelo hospedeiro invertebrado em ascensão, por isso ainda são poucos os trabalhos que fazem uso dele como ferramenta para estudos de virulência e patogenicidade fúngica, porém, os resultados obtidos até o momento são promissores. De Souza e colaboradores foram pioneiros na avaliação da virulência de *C. albicans* e *C. neoformans* utilizando *T. molitor* como modelo de infecção. No trabalho estes pesquisadores mostraram que o invertebrado responde de modo dose dependente a infecção e que é possível avaliar a presença dos fungos nos tecidos da larva através de análise histológica de *T. molitor* (DE SOUZA et al., 2015).

Fungos pertencentes ao gênero *Fonseca*, responsável pela cromoblastomicose, também já foram avaliados no modelo de *T. molitor*. Fornari e colaboradores analisaram a virulência de várias espécies deste gênero em *T. molitor*, e observaram que *F. erecta* foi a espécie mais virulente. Na análise histológica os pesquisadores também puderam observar que larvas infectadas com *F. pedrosoi* apresentavam células ovoides semelhantes a células muriformes, as quais são encontradas no tecido de mamíferos infectados com este fungo (FORNARI et al., 2018).

*T. molitor* também pode ser um aliado no estudo de micotoxinas. O impacto de fungos produtores de micotoxinas no desenvolvimento de larvas de *T. molitor* foi avaliado por Reiss. No trabalho verificou-se que larvas alimentadas com grãos contaminados com espécies fúngicas produtoras de micotoxinas apresentavam problemas de desenvolvimento (REISS, 1973). Guo e colaboradores (2014) utilizaram *T. molitor* para avaliar o gênero *Fusarium*, conhecidamente grande produtor de micotoxinas (GUO et al., 2014). No estudo foi oferecido como

alimento para *T. molitor* grãos infectados com diferentes espécies de *Fusarium*. Os pesquisadores observaram que as larvas que se alimentavam de grãos colonizados com *F. culmorum*, *F. avenaceum* obtiveram altas taxas de mortalidade. Os autores também conseguiram isolar micotoxinas das larvas que se alimentaram dos grãos contaminados, mostrando o potencial deste modelo para o estudo das toxinas produzidas por microrganismos (GUO et al., 2014).

Larvas de *T. molitor* também apresentam potencial como modelo para avaliação de compostos com possível potencial antifúngico. Isto foi demonstrado no trabalho de Morey e colaboradores no qual extrato da planta *Stryphnodendron adstringens* apresentou a capacidade de aumentar a sobrevivência de larvas infectados com *Candida tropicalis* (MOREY et al., 2016).

Os trabalhos científicos realizados até o momento apresentam o potencial de *T. molitor* como mais uma opção de modelo alternativo nos estudos de patogenicidade e virulência fúngica.

### ***Galleria mellonella***

A mariposa *Galleria mellonella* é um inseto encontrado principalmente em colmeias de abelhas. Nestes locais elas se alimentam principalmente de cera e pólen, e podem causar prejuízos nas produções de apicultores no mundo todo (WODJA, 2017).

Na pesquisa científica *G. mellonella* se mostrou muito eficiente como modelo para estudos de fungos entomopatogênicos (BEAUVAIS et al., 1989; MOLLIER et al., 1994; VILCINSKAS et al., 1997; GRIESCH & VILCINSKAS, 1998). E posteriormente, trabalhos mostraram que este invertebrado poderia ser uma ferramenta útil para o estudo de fungos patógenos humanos. O primeiro trabalho que demonstrou isto foi realizado por Cotter e colaboradores, no qual larvas de *G. mellonella* se mostraram susceptíveis a infecção pelo fungo *C. albicans*, porém a infecção por outro fungo, o *Saccharomyces cerevisiae*, não apresentou letalidade para este modelo invertebrado (COTTER et al., 2000).

A partir do estudo de Cotter, difundiu-se o uso de *G. mellonella* em trabalhos sobre virulência e patogenicidade fúngica, e hoje este inseto é um dos principais modelos invertebrados utilizados pelos pesquisadores. *G. mellonella*, assim como outros modelos invertebrados, apresenta vantagens éticas, logísticas e de custo quando comparadas com os modelos mamíferos (MYLONAKIS, 2008). Além disso, assim como *B. mori* e *T. molitor*, larvas de *G. mellonella* apresentam a vantagem de apresentar um tamanho considerável, o que facilita a aplicação e quantificação do inóculo utilizado (MYLONAKIS, 2008).

*G. mellonella*, como outros invertebrados, responde as infecções ativando respostas do seu sistema imune inato, e estas respostas compreendem vias humorais e celulares. O corpo gorduroso, gânglios linfáticos e hemócitos são os principais componentes do sistema imune de *G. mellonella* (TREVIJANO-CONTADOR & ZARAGOZA, 2018). O primeiro mecanismo de defesa contra patógenos de *G. mellonella* são as barreiras anatômicas (cobertura corpórea, estrutura traqueal, parede intestinal) e fisiológicas (baixa umidade, restrição de nutrientes, componentes bioquímicos intestinais) (WODJA, 2017). Quando um patógeno consegue atravessar estas barreiras e chegar na hemocele, respostas celulares e humorais são acionadas. Fagocitose, encapsulação, coagulação, nodulação, produção de melanina, síntese de espécies reativas de oxigênio e peptídeos antimicrobianos são algumas das respostas do sistema imunológico de *G. mellonella* para tentar barrar o processo infeccioso e eliminar o patógeno invasor (WODJA, 2017).

A comunidade científica tem explorado este modelo invertebrado em diversos estudos de patogenicidade e virulência fúngica, e os resultados obtidos até o momento são promissores. Brennan e colaboradores analisaram a virulência de *C. albicans* em larvas de *G. mellonella* e ratos e encontraram uma boa correlação da resposta dos dois modelos a infecção. Além disso estes mesmos autores mostraram a importância da filamentação durante o processo infeccioso, pois demonstraram que larvas de *G. mellonella* infectadas com *C. albicans* mutantes para vias relacionadas a formação de hifas morriam menos do que as larvas infectadas com a cepa controle (BRENNAN et al., 2002). Marcos-Zambrano e colaboradores avaliaram a virulência de diversos isolados do gênero *Candida* no modelo invertebrado de *G. mellonella*. Os pesquisadores puderam observar uma

diferença de virulência entre os intra e inter-específica. Viram também que *C. albicans* foi a espécie mais virulenta para as larvas de *G. mellonella* e que *C. krusei* apresentou menor virulência (MARCOS-ZAMBRANO et al, 2020).

*Cryptococcus* é outro gênero fúngico que já foi estudado utilizando o modelo invertebrado *G. mellonella*. Mylonakis e colaboradores mostraram em seu trabalho que *G. mellonella* responde de modo dose-dependente a infecção por *C. neoformans*, além disso os pesquisadores viram que é possível avaliar diferenças de virulência entre os isolados de *Cryptococcus* usando este modelo invertebrado. No mesmo trabalho, os pesquisadores ainda descobriram que genes expressos pelo fungo durante o processo infeccioso em mamíferos também são expressos na infecção em *G. mellonella* (MYLONAKIS et al., 2005). Benaducci e colaboradores utilizaram *G. mellonella* para avaliar se existe diferença de virulência entre células planctônicas e células presentes no biofilme formado por *Cryptococcus*. As larvas de *G. mellonella* se mostraram mais sensíveis a infecção quando inoculadas pelas células isoladas do biofilme fúngico (BENADUCCI et al., 2016). Este trabalho demonstra que *G. mellonella* pode ser uma ferramenta na avaliação da influência de fatores de virulência no processo infeccioso fúngico.

*G. mellonella* tem sido usada extensivamente para estudos de virulência e patogenicidade de fungos do gênero *Aspergillus*. Slater e colaboradores utilizaram *G. mellonella* para avaliar a virulência de diversos mutantes de *A. fumigatus*. Os pesquisadores avaliaram a variação de virulência entre estes isolados e também, através de uma revisão bibliográfica, verificaram que a virulência destes isolados mutantes em *G. mellonella* é similar com o que é encontrado em experimentos utilizando modelos murinos (SLATER et al., 2011). Renwick e colaboradores, também fizeram uso de *G. mellonella* como modelo hospedeiro para o estudo de fungos do gênero *Aspergillus*. Neste trabalho eles mostram que o estado de germinação do conídio fúngico influenciam na virulência de *Aspergillus fumigatus* (RENWICK et al., 2006). Fallon e colaboradores viram que uma toxina produzida por *A. fumigatus* afeta a resposta imune celular de *G. mellonella* durante o processo infeccioso (FALLON et al., 2011). Estes e outros trabalhos mostram que *G. mellonella* pode ser um modelo válido no estudo dos estágios iniciais de infecções causadas por microrganismos

do gênero *Aspergillus*, contribuindo assim com um melhor entendimento de como este processo ocorre em mamíferos.

Fungos dos gêneros *Fusarium*, *Paracoccidioides*, *Fonsecaea*, *Sporothrix*, dentre outros, também estão sendo avaliados no modelo invertebrado de *G. mellonella* (SINGULANI et al., 2016; HUANG et al., 2018; CLAVIJO-GIRALDO et al., 2016; COLEMAN et al., 2011). Além da análise de virulência e patogenicidade fúngica, *G. mellonella* também tem se mostrado eficiente na busca de novas substâncias com ação antifúngica. Estes trabalhos apontam *G. mellonella*, principalmente, como uma metodologia de screening destas substâncias (BROWN et al., 2008; AMES et al., 2017; LI et al., 2013; JEMEL et al., 2020

Os resultados dos trabalhos citados anteriormente, reforçam a utilidade deste modelo invertebrado como uma metodologia eficiente, barata, eticamente aceita, que pode contribuir com os estudos de patogenicidade e virulência fúngica e também na busca de novos compostos antifúngicos.

### **What's next?**

Cada vez mais os modelos hospedeiros invertebrados ganham espaço na pesquisa científica. Os trabalhos citados anteriormente mostram os principais invertebrados utilizados nos estudos de patogenicidade, virulência fúngica e descoberta de novos compostos antifúngicos, mas além destes existem outros modelos que já são implementados para este fim ou que apresentam potencial para serem testados como modelos hospedeiros alternativos. Um exemplo disso é o protozoário *Dictyostelium discoideum*, que assim como o já citado *A. castellanii*, se comporta como um “fagocito profissional”. Desta forma este invertebrado pode ser útil para o melhor entendimento da fagocitose de patógenos por células do sistema imune e das vias de sinalização envolvidas neste processo (ANNESLEY & FISHER, 2009; KOLLER et al., 2016). Fungos do gênero *Cryptococcus* e *Aspergillus* já foram estudados neste modelo (MATTERN et al., 2015; STEENBERGEN et al., 2003).

O Lepidoptera *Manduca sexta*, inseto conhecido por ser praga de plantações de tabaco, também tem potencial para ser usado no estudo de fungos patogênicos humanos. Testes utilizando este modelo no estudo de fungos entomopatogênicos tem apresentado bons resultados (ST et al., 1996; CHENG et al., 2018). A transposição do uso de modelos invertebrados de testes com fungos entomopatogênicos para testes com fungos patógenos humanos tem sido relatada com sucesso. *B. mori* e *G. mellonella* são exemplos de insetos que primariamente eram utilizados para avaliação de fungos entomopatogênicos, mas que posteriormente foram implementados, com sucesso, no estudo de virulência e patogenicidade de patógenos humanos (HOU et al., 2014; LI et al., 2012; NAMARA, et al., 2017; MUKHERJEE & VILCINSKAS, 2018).

O nematódeo *Pristionchus pacificus*, na natureza geralmente encontrado associado a besouros em decomposição, tem sido muito utilizado como estudo como modelo de estudo de evolução biológica (SOMMER, 2009; RAE et al., 2012; MORENO et al., 2016). Além disso alguns pesquisadores têm feito uso deste nematódeo como modelo para o estudo de microrganismos. O cultivo, ciclo de vida e tempo de geração desse nematódeo se assemelha muito a *C. elegans* (GILARTE et al., 2015). Outra vantagem deste modelo é a possibilidade de construção de linhagens mutantes para diversas vias de sinalização (DIETERICH et al., 2008; NAKAYAMA et al., 2020). Os trabalhos envolvendo o estudo de microrganismos utilizando *P. pacificus* como modelo basicamente se restringe a bacteriologia (AKDUMAN et al., 2018; RAE et al., 2012, IATSENKO et al., 2014, RAE et al., 2010). Mas, estudos futuros podem avaliar se este nematódeo, assim como *C. elegans*, pode ser mais uma ferramenta no estudo de infecções fúngicas.

Grilos foram utilizados com sucesso em estudo para avaliar a eficácia como modelo para estudos de infecções fúngicas. No trabalho os pesquisadores utilizaram as ninfas desses insetos e os inocularam com *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. neoformans*. Os resultados obtidos mostram que os grilos respondem de maneira dose dependente a infecção e também que testes a 37°C com esses insetos são viáveis (KOCHI et al., 2017). Deste modo, grilos podem se tornar mais uma ferramenta aliada ao estudo de infecções fúngicas.

## **Conclusão**

O uso de modelos invertebrados tem se tornado um grande aliado no estudo sobre infecções fúngicas, principalmente em um momento em que a comunidade científica clama por metodologias mais éticas e baratas, visto que o investimento financeiro em pesquisa tem diminuído em muitos países. O uso de invertebrados abrange essas necessidades, porém é claro apresenta desvantagens como qualquer outro modelo hospedeiro. Ainda que o uso de modelos invertebrados não contemple a análise de toda a complexidade do processo de infecção fúngica, ele nos auxilia no entendimento de processos cruciais, como por exemplo, do papel da imunidade inata do hospedeiro durante a infecção. Desta forma, o emprego de modelos alternativos invertebrados no estudo de infecções fúngicas pode ajudar na busca por uma melhor compreensão dos processos de patogenicidade e virulência destes microrganismos.

## Referências

AKDUMAN, N.; RÖDELSPERGER, C.; SOMMER, R. J. Culture-based analysis of Pristionchus-associated microbiota from beetles and figs for studying nematode-bacterial interactions. *PLOS ONE*, v. 13, n. 6, p. e0198018, 4 jun. 2018.

AL-MALIKI, H. S. et al. *Drosophila melanogaster* as a Model for Studying *Aspergillus fumigatus*. *Mycobiology*, v. 45, n. 4, p. 233–239, dez. 2017.

ALMEIDA, F.; RODRIGUES, M. L.; COELHO, C. The Still Underestimated Problem of Fungal Diseases Worldwide. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, p. 214, 12 fev. 2019.

ALSHEHRI, J. M. et al. Evaluation of Corneal Cross-Linking for Treatment of Fungal Keratitis: Using Confocal Laser Scanning Microscopy on an Ex Vivo Human Corneal Model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 57, n. 14, p. 6367, 29 nov. 2016.

AMES, L. et al. *Galleria mellonella* as a host model to study *Candida glabrata* virulence and antifungal efficacy. *Virulence*, v. 8, n. 8, p. 1909–1917, 17 nov. 2017.

ANNESLEY, S. J.; FISHER, P. R. *Dictyostelium discoideum*—a model for many reasons. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 329, n. 1–2, p. 73–91, set. 2009.

ARVANITIS, M.; GLAVIS-BLOOM, J.; MYLONAKIS, E. Invertebrate models of fungal infection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, v. 1832, n. 9, p. 1378–1383, set. 2013.

ASTVAD, K. M. T. et al. Implications of the EUCAST Trailing Phenomenon in *Candida tropicalis* for the In Vivo Susceptibility in Invertebrate and Murine Models. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 62, n. 12, p. e01624-18, /aac/62/12/e01624- 18.atom, 17 set. 2018.

BAJPAI, V. K. et al. Invasive Fungal Infections and Their Epidemiology: Measures in the Clinical Scenario. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 24, n. 3, p. 436–444, jun. 2019.

BANFALVI, G. Improved and adopted murine models to combat pulmonary aspergillosis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 102, n. 16, p. 6865–6875, ago. 2018.

BEAUVAIS, A. et al. The Role of Surface Components of the Entomopathogenic Fungus *Entomophaga aulicae* in the Cellular Immune Response of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *Microbiology*, v. 135, n. 3, p. 489–498, 1 mar. 1989.

BENADUCCI, T. et al. Virulence of *Cryptococcus* sp. Biofilms In Vitro and In Vivo using *Galleria mellonella* as an Alternative Model. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, 9 mar. 2016.

BONGOMIN, F. et al. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. *Journal of Fungi*, v. 3, n. 4, p. 57, 18 out. 2017.

BRANDT, J. P.; RINGSTAD, N. Toll-like Receptor Signaling Promotes Development and Function of Sensory Neurons Required for a *C. elegans* Pathogen-Avoidance Behavior. *Current Biology*, v. 25, n. 17, p. 2228–2237, ago. 2015.

BREGER, J. et al. Antifungal Chemical Compounds Identified Using a *C. elegans* Pathogenicity Assay. *PLoS Pathogens*, v. 3, n. 2, p. e18, 2007.

BRENNAN, M. et al. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, v. 34, n. 2, p. 153–157, out. 2002.

BRENNER, S. The worm's turn. *Current Biology*, v. 12, n. 21, R713, 2002.

BROWN, G. D. et al. Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Science Translational Medicine*, v. 4, n. 165, p. 165rv13-165rv13, 19 dez. 2012.

BROWN, S. E. et al. The discovery and analysis of a diverged family of novel antifungal moricin-like peptides in the wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 38, n. 2, p. 201–212, fev. 2008.

CAIRNS, T. C. et al. New and Improved Techniques for the Study of Pathogenic Fungi. *Trends in Microbiology*, v. 24, n. 1, p. 35–50, jan. 2016.

CASADEVALL, A. (2011). Amoeba Provide Insight into the Origin of Virulence in Pathogenic Fungi. *Recent Advances on Model Hosts*, 1–10. doi:10.1007/978-1-4419-5638-5\_1

CASADEVALL, A. Fungal Diseases in the 21st Century: The Near and Far Horizons. *Pathogens and Immunity*, v. 3, n. 2, p. 183, 25 set. 2018.

CASTELLANI, A. [Phagocytic and destructive action of *Hartmannella castellanii* (*Amoeba castellanii*) on pathogenic encapsulated yeast-like fungi *Torulopsis neoformans* (*Cryptococcus neoformans*)]. *Annales De l'Institut Pasteur*, v. 89, n. 1, p. 1–7, jul. 1955.

CHEN, H.-J. et al. New triazole derivatives containing substituted 1,2,3-triazole side chains: Design, synthesis and antifungal activity. *Chinese Chemical Letters*, v. 28, n. 4, p. 913–918, abr. 2017.

CHENG, Y. et al. CTL14, a recognition receptor induced in late stage larvae, modulates anti-fungal immunity in cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. *Developmental & Comparative Immunology*, v. 84, p. 142–152, jul. 2018.

CHRISMAN, C. J.; ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A. Phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* by, and Nonlytic Exocytosis from, *Acanthamoeba castellanii*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 18, p. 6056–6062, 15 set. 2010.

CLAVIJO-GIRALDO, D. M. et al. Analysis of *Sporothrix schenckii* sensu stricto and *Sporothrix brasiliensis* virulence in *Galleria mellonella*. *Journal of Microbiological Methods*, v. 122, p. 73–77, mar. 2016.

COLEMAN, J. J. et al. *Fusarium* pathogenesis investigated using *Galleria mellonella* as a heterologous host. *Fungal Biology*, v. 115, n. 12, p. 1279–1289, dez. 2011.

CORSI A. K.; WIGHTMAN, B.; CHALFIE, M. A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, v. 200, p. 387-407, 2015.

CORZO-LEÓN, D. E.; MUNRO, C. A.; MACCALLUM, D. M. An ex vivo Human Skin Model to Study Superficial Fungal Infections. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, p. 1172, 5 jun. 2019.

COTTER, G.; DOYLE, S.; KAVANAGH, K. Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, v. 27, n. 2, p. 163–169, fev. 2000.

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, nov. 2015.

DERENGOWSKI, L. DA S. et al. The Transcriptional Response of *Cryptococcus neoformans* to Ingestion by *Acanthamoeba castellanii* and Macrophages Provides Insights into the Evolutionary Adaptation to the Mammalian Host. *Eukaryotic Cell*, v. 12, n. 5, p. 761–774, maio 2013.

DIERKING, K.; YANG, W.; SCHULENBURG, H. Antimicrobial effectors in the nematode *Caenorhabditis elegans* : an outgroup to the Arthropoda. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 371, n. 1695, p. 20150299, 26 maio 2016.

DIETERICH, C. et al. The *Pristionchus pacificus* genome provides a unique perspective on nematode lifestyle and parasitism. *Nature Genetics*, v. 40, n. 10, p. 1193–1198, out. 2008.

DIONNE, M. S.; SCHNEIDER, D. S. Models of infectious diseases in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Disease Models and Mechanisms*, v. 1, n. 1, p. 43–49, 1 jul. 2008.

DIONNE, M. S.; SCHNEIDER, D. S. Models of infectious diseases in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Disease Models and Mechanisms*, v. 1, n. 1, p. 43–49, 1 jul. 2008.

DOKE, S. K.; DHAWALE, S. C. Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 23, n. 3, p. 223–229, jul. 2015.

ELKABTI, A.; ISSI, L.; RAO, R. *Caenorhabditis elegans* as a Model Host to Monitor the *Candida* Infection Processes. *Journal of Fungi*, v. 4, n. 4, p. 123, 7 nov. 2018.

ENGELMANN, I.; PUJOL, N. Innate Immunity in *C. elegans*. In: SÖDERHÄLL, K. (Org.). . Invertebrate Immunity. Boston, MA: Springer US, 2010. v. 708. p. 105–121.

ERMOLAEVA, M. A.; SCHUMACHER, B. Insights from the worm: The *C. elegans* model for innate immunity. *Seminars in Immunology*, v. 26, n. 4, p. 303–309, ago. 2014.

EWBANK, J. J.; PUJOL, N. Local and long-range activation of innate immunity by infection and damage in *C. elegans*. *Current Opinion in Immunology*, v. 38, p. 1–7, fev. 2016.

FALLON, J. P.; REEVES, E. P.; KAVANAGH, K. The *Aspergillus fumigatus* toxin fumagillin suppresses the immune response of *Galleria mellonella* larvae by inhibiting the action of haemocytes. *Microbiology*, v. 157, n. 5, p. 1481–1488, 1 maio 2011.

FELIX, M. A; BRAENDLE C. The natural history of *Caenorhabditis elegans*. **Current Biology**, v. 20, p. 965-969, 2010.

FORNARI, G. et al. A Model for Trans-Kingdom Pathogenicity in *Fonsecaea* Agents of Human Chromoblastomycosis. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 2211, 9 out. 2018.

GILARTE, P. et al. Life-History Traits of the Model Organism *Pristionchus pacificus* Recorded Using the Hanging Drop Method: Comparison with *Caenorhabditis elegans*. *PLOS ONE*, v. 10, n. 8, p. e0134105, 6 ago. 2015.

GONÇALVES, D. DE S. et al. Unravelling the interactions of the environmental host *Acanthamoeba castellanii* with fungi through the recognition by mannose-binding proteins. *Cellular Microbiology*, v. 21, n. 10, out. 2019.

GRIESCH, J.; VILCINSKAS, A. Proteases Released by Entomopathogenic Fungi Impair Phagocytic Activity, Attachment and Spreading of Plasmatocytes Isolated from Haemolymph of the Greater Wax Moth *Galleria mellonella*. *Biocontrol Science and Technology*, v. 8, n. 4, p. 517–531, dez. 1998.

GUO, Z. et al. Effect of Fungal Colonization of Wheat Grains with *Fusarium* spp. on Food Choice, Weight Gain and Mortality of Meal Beetle Larvae (*Tenebrio molitor*). PLOS ONE, v. 9, n. 6, p. e100112, 16 jun. 2014.

HOU, C. et al. Transcriptome Analysis of Silkworm, *Bombyx mori*, during Early Response to *Beauveria bassiana* Challenges. PLoS ONE, v. 9, n. 3, p. e91189, 11 mar. 2014.

HUANG, X. et al. *Galleria mellonella* as a model invertebrate host for the study of muriform cells of dematiaceous fungi. Future Microbiology, v. 13, n. 9, p. 1021–1028, jul. 2018.

IATSENKO, I.; NIKOLOV, A.; SOMMER, R. Identification of Distinct *Bacillus thuringiensis* 4A4 Nematicidal Factors Using the Model Nematodes *Pristionchus pacificus* and *Caenorhabditis elegans*. Toxins, v. 6, n. 7, p. 2050–2063, 14 jul. 2014.

ISHII, M. et al. An invertebrate infection model for evaluating anti-fungal agents against dermatophytosis. Scientific Reports, v. 7, n. 1, p. 12289, dez. 2017.

JEMEL, S. et al. *Galleria mellonella* for the Evaluation of Antifungal Efficacy against Medically Important Fungi, a Narrative Review. Microorganisms, v. 8, n. 3, p. 390, 11 mar. 2020.

JOHNSON, C. et al. *Histoplasma capsulatum* and *Caenorhabditis elegans*: a simple nematode model for an innate immune response to fungal infection. Medical Mycology, p. 1–6, 2009.

JOHNSTON, P. R.; MAKAROVA, O.; ROLFF, J. Inducible Defenses Stay Up Late: Temporal Patterns of Immune Gene Expression in *Tenebrio molitor*. Genes|Genomes|Genetics, v. 4, n. 6, p. 947–955, jun. 2014.

KAITO, C.; YOSHIKAI, H.; SEKIMIZU, K. Utilization of a silkworm model for understanding host-pathogen interactions. v. 9, n. 2, p. 163–168, 2012.

KAUSAR, S. et al. Immune strategies of silkworm, *Bombyx mori* against microbial infections. p. 130–140, 2019.

KIM, W. et al. An update on the use of *C. elegans* for preclinical drug discovery: screening and identifying anti-infective drugs. *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 12, n. 6, p. 625–633, 3 jun. 2017.

KOCHI, Y. et al. Two-spotted cricket as an animal infection model of human pathogenic fungi. v. 11, n. 5, p. 259–266, 2017.

KOLLER, B. et al. *Dictyostelium discoideum* as a Novel Host System to Study the Interaction between Phagocytes and Yeasts. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, 21 out. 2016.

KRAPPMANN, S. CRISPR-Cas9, the new kid on the block of fungal molecular biology. *Medical Mycology*, v. 55, n. 1, p. 16–23, 1 jan. 2017.

LEMAITRE, B. et al. The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. *Cell*, v. 86, n. 6, p. 973–983, set. 1996.

LEMOS TAVARES, P. et al. The interaction between *Sporothrix schenckii sensu stricto* and *Sporothrix brasiliensis* with *Acanthamoeba castellanii*. *Mycoses*, v. 63, n. 3, p. 302–307, mar. 2020.

LI, D.-D. et al. Using *Galleria mellonella*–*Candida albicans* Infection Model to Evaluate Antifungal Agents. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 36, n. 9, p. 1482–1487, 2013.

LI, Y. et al. A novel protease inhibitor in *Bombyx mori* is involved in defense against *Beauveria bassiana*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 42, n. 10, p. 766–775, out. 2012.

LIU, N. et al. Strategies in the discovery of novel antifungal scaffolds. *Future Medicinal Chemistry*, v. 8, n. 12, p. 1435–1454, ago. 2016.

MADENDE, M. et al. *Caenorhabditis elegans* as a model animal for investigating fungal pathogenesis. *Medical Microbiology and Immunology*, v. 209, n. 1, p. 1–13, fev. 2020.

MAGUIRE, R.; KELLY, S.; KAVANAGH, K. *Lepidoptera as Models for Studying Fungal Disease*. Reference Module in Life Sciences. [S.l.]: Elsevier, 2017. p. B9780128096338120000.

MARCOS-ZAMBRANO, L. J. et al. *Candida* isolates causing candidemia show different degrees of virulence in *Galleria mellonella*. *Medical Mycology*, v. 58, n. 1, p. 83–92, 1 jan. 2020.

MATSUMOTO, H. et al. Evaluation of Pathogenicity of *Candida albicans* in Germination- ready States Using a Silkworm Infection Model. *Medical Mycology Journal*, v. 54, n. 2, p. 131–140, 2013.

MATSUMOTO, Y. et al. A Silkworm Infection Model to Evaluate Antifungal Drugs for Cryptococcosis. *Medical Mycology Journal*, v. 58, n. 4, p. E131–E137, 2017.

MATSUMOTO, Y. et al. Quantitative evaluation of cryptococcal pathogenesis and antifungal drugs using a silkworm infection model with *Cryptococcus neoformans*: Silkworms for quantitative evaluating antifungal drug. *Journal of Applied Microbiology*, v. 112, n. 1, p. 138–146, jan. 2012.

MATSUMOTO, Y.; SEKIMIZU, K. Silkworm as an experimental animal for research on fungal infections. *Microbiology and Immunology*, v. 63, n. 2, p. 41–50, fev. 2019.

MATTERN, D. J. et al. Identification of the antiphagocytic trypanidin gene cluster in the human-pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 99, n. 23, p. 10151–10161, dez. 2015.

MERKEL, S. et al. *Drosophila melanogaster* as a model for the study of *Malassezia pachydermatis* infections. *Veterinary Microbiology*, v. 224, p. 31–33, out. 2018.

MOLLIER, P. et al. A glycoprotein highly toxic for *Galleria mellonella* larvae secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria sulfurescens*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 64, n. 3, p. 200–207, nov. 1994.

MORENO, E. et al. Oxygen-induced social behaviours in *Pristionchus pacificus* have a distinct evolutionary history and genetic regulation from *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 283, n. 1825, p. 20152263, 24 fev. 2016.

MOREY, A. T. et al. Antifungal Activity of Condensed Tannins from *Stryphnodendron adstringens*: Effect on *Candida tropicalis* Growth and Adhesion

Properties. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, v. 17, n. 4, p. 365–375, 15 fev. 2016.

MUHAMMED, M. et al. The role of mycelium production and a MAPK-mediated immune response in the *C. elegans*-*Fusarium* model system. *Medical Mycology*, v. 50, n. 5, p. 488–496, jul. 2012.

MUKHERJEE, K.; VILCINSKAS, A. The entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii* communicates with the insect host *Galleria mellonella* during infection. *Virulence*, v. 9, n. 1, p. 402–413, 31 dez. 2018.

MYLONAKIS, E. et al. *Galleria mellonella* as a Model System To Study *Cryptococcus neoformans* Pathogenesis. *Infection and Immunity*, v. 73, n. 7, p. 3842–3850, 1 jul. 2005.

MYLONAKIS, E. et al. Nonlinear partial differential equations and applications: Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 99, n. 24, p. 15675–15680, 26 nov. 2002.

MYLONAKIS, E. *Galleria mellonella* and the Study of Fungal Pathogenesis: Making the Case for Another Genetically Tractable Model Host. *Mycopathologia*, v. 165, n. 1, p. 1–3, jan. 2008.

MYLONAKIS, E.; ABALLAY, A. Worms and Flies as Genetically Tractable Animal Models To Study Host-Pathogen Interactions. *Infection and Immunity*, v. 73, n. 7, p. 3833–3841, 1 jul. 2005.

NAKAYAMA, K. et al. Screening for CRISPR/Cas9-induced mutations using a co-injection marker in the nematode *Pristionchus pacificus*. *Development Genes and Evolution*, 6 fev. 2020.

NAMARA, L. et al. The effect of entomopathogenic fungal culture filtrate on the immune response of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology*, v. 100, p. 82–92, jul. 2017.

OKOLI, I.; BIGNELL, E. *Caenorhabditis elegans*-*Aspergillus fumigatus* (Nematode-mould) Model for Study of Fungal Pathogenesis. *British Microbiology Research Journal*, v. 7, n. 2, p. 93–99, 10 jan. 2015.

ORTEGA-RIVEROS, M. et al. Usefulness of the Non-conventional *Caenorhabditis elegans* Model to Assess *Candida* Virulence. *Mycopathologia*, v. 182, n. 9–10, p. 785–795, out. 2017.

PANTHEE, S. et al. Advantages of the Silkworm As an Animal Model for Developing Novel Antimicrobial Agents. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, 7 mar. 2017.

PUJOL, N. Anti-Fungal innate immunity in *C. elegans* is enhanced by evolutionary diversification of antimicrobial peptides. ***Plos Pathogens***, v. 4, n. 7, 2008.

PUKKILA-WORLEY, R. et al. *Candida albicans* Hyphal Formation and Virulence Assessed Using a *Caenorhabditis elegans* Infection Model. *Eukaryotic Cell*, v. 8, n. 11, p. 1750–1758, nov. 2009.

QUINDÓS, G. et al. The continuous changes in the aetiology and epidemiology of invasive candidiasis: from familiar *Candida albicans* to multiresistant *Candida auris*. *International Microbiology*, v. 21, n. 3, p. 107–119, 1 set. 2018.

RAE, R. et al. A subset of naturally isolated *Bacillus* strains show extreme virulence to the free-living nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Pristionchus pacificus*: Nematocidal *Bacillus* that kill *C. elegans* and *P. pacificus*. *Environmental Microbiology*, v. 12, n. 11, p. 3007–3021, nov. 2010.

RAE, R. et al. The importance of being regular: *Caenorhabditis elegans* and *Pristionchus pacificus* defecation mutants are hypersusceptible to bacterial pathogens. *International Journal for Parasitology*, v. 42, n. 8, p. 747–753, jul. 2012.

RAE, R.; SINHA, A.; SOMMER, R. J. Genome-Wide Analysis of Germline Signaling Genes Regulating Longevity and Innate Immunity in the Nematode *Pristionchus pacificus*. *PLoS Pathogens*, v. 8, n. 8, p. e1002864, 9 ago. 2012.

RAMIREZ-CAMEJO, L. A. et al. An opportunistic human pathogen on the fly: Strains of *Aspergillus flavus* vary in virulence in *Drosophila melanogaster*. *Medical Mycology*, v. 52, n. 2, p. 211–219, 1 fev. 2014.

REISS, J. Toxicity of molds to the larvae of *Tenebrio molitor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 21, n. 1, p. 112–113, jan. 1973.

RENWICK, J. et al. Susceptibility of Larvae of *Galleria mellonella* to Infection by *Aspergillus fumigatus* is Dependent upon Stage of Conidial Germination. *Mycopathologia*, v. 161, n. 6, p. 377–384, jun. 2006.

RHODES, J. Rapid Worldwide Emergence of Pathogenic Fungi. *Cell Host & Microbe*, v. 26, n. 1, p. 12–14, jul. 2019.

RIZZO, J. et al. Analysis of multiple components involved in the interaction between *Cryptococcus neoformans* and *Acanthamoeba castellanii*. *Fungal Biology*, v. 121, n. 6–7, p. 602–614, jun. 2017.

ROSOWSKI, E. et al. The Zebrafish as a Model Host for Invasive Fungal Infections. *Journal of Fungi*, v. 4, n. 4, p. 136, 13 dez. 2018.

SAMPAIO, A. DA G. et al. In Vivo Efficacy of Ellagic Acid against *Candida albicans* in a *Drosophila melanogaster* Infection Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 62, n. 12, p. e01716-18, /aac/62/12/e01716-18.atom, 24 set. 2018.

SCHMIEDEL, Y.; ZIMMERLI, S. Common invasive fungal diseases: an overview of invasive candidiasis, aspergillosis, cryptococcosis, and *Pneumocystis pneumonia*. *Swiss Medical Weekly*, 22 fev. 2016.

SCHROECKENSTEIN, D.; MEIERDAVIS, S.; BUSH, R. Occupational sensitivity to *Tenebrio molitor* linnaeus (yellow mealworm). *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 86, n. 2, p. 182–188, ago. 1990.

SCORZONI, L. et al. Evaluation of *Caenorhabditis elegans* as a host model for *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*. *Pathogens and Disease*, v. 76, n. 1, 1 fev. 2018.

SIFRI, C. D; BEGUN, J; AUSUBEL, F. M. The worm has turned – microbial virulence modeled in *Caenorhabditis elegans*. *TRENDS in Microbiology*, v. 13, n. 3, 2005.

SINGULANI, J. et al. Evaluation of the efficacy of antifungal drugs against *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* in a *Galleria mellonella*

model. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 48, n. 3, p. 292–297, set. 2016.

SINGULANI, J. L. et al. Applications of Invertebrate Animal Models to Dimorphic Fungal Infections. *Journal of Fungi*, v. 4, n. 4, p. 118, 19 out. 2018.

SINGULANI, J. L. et al. Applications of Invertebrate Animal Models to Dimorphic Fungal Infections. *Journal of Fungi*, v. 4, n. 4, p. 118, 19 out. 2018.

SLATER, J. L. et al. Pathogenicity of *Aspergillus fumigatus* mutants assessed in *Galleria mellonella* matches that in mice. *Medical Mycology*, v. 49, n. S1, p. S107–S113, abr. 2011.

SMITH, J. A. A Question of Pain in Invertebrates. *ILAR Journal*, v. 33, n. 1–2, p. 25–31, 1 jan. 1991.

SOMMER, R. J. The future of evo–devo: model systems and evolutionary theory. *Nature Reviews Genetics*, v. 10, n. 6, p. 416–422, jun. 2009.

ST, L. et al. Characterization and Ultrastructural Localization of Chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during Fungal Invasion of Host (*Manduca sexta*) Cuticle. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 3, p. 907–912, 1 mar. 1996.

STEENBERGEN, J. N. et al. *Cryptococcus neoformans* Virulence Is Enhanced after Growth in the Genetically Malleable Host *Dictyostelium discoideum*. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 9, p. 4862–4872, 1 set. 2003.

STEENBERGEN, J. N. et al. Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. *Infection and Immunity*, v. 72, n. 6, p. 3478–3488, 1 jun. 2004.

STERKEN M. G.; SNOEK L. B.; KAMMENGA, J.E. et al. The laboratory domestication of *Caenorhabditis elegans*. **Trends in genetics**, v. 31, p. 224–231, 2015.

TAMPAKAKIS, E.; OKOLI, I.; MYLONAKIS, E. A *C. elegans*-based, whole animal, in vivo screen for the identification of antifungal compounds. *Nature Protocols*, v. 3, n. 12, p. 1925–1931, dez. 2008.

THEWES, S.; SOLDATI, T.; EICHINGER, L. Editorial: Amoebae as Host Models to Study the Interaction With Pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 9, p. 47, 19 mar. 2019.

THOMPSON, G. R. et al. Phenotypic Differences of *Cryptococcus* Molecular Types and Their Implications for Virulence in a *Drosophila* Model of Infection. *Infection and Immunity*, v. 82, n. 7, p. 3058–3065, jul. 2014.

TINDWA, H. et al. Cloning, Characterization and Effect of TmPGRP-LE Gene Silencing on Survival of *Tenebrio Molitor* against *Listeria monocytogenes* Infection. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 14, n. 11, p. 22462–22482, 14 nov. 2013.

TREVIJANO-CONTADOR, N.; ZARAGOZA, O. Immune Response of *Galleria mellonella* against Human Fungal Pathogens. *Journal of Fungi*, v. 5, n. 1, p. 3, 26 dez. 2018.

TZOU, P. How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host–pathogen interactions. *Current Opinion in Microbiology*, v. 5, n. 1, p. 102–110, 1 fev. 2002.

VIJ, R.; CRAWFORD, C. J.; CASADEVALL, A. Variation in cell surface hydrophobicity among *Cryptococcus neoformans* strains influences interactions with amoeba. preprint. [S.I.]: *Microbiology*, 6 dez. 2019.

VILCINSKAS, A.; MATHA, V.; GÖTZ, P. Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of plasmatocytes isolated from the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology*, v. 43, n. 12, p. 1149–1159, nov. 1997.

WOJDA, I. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*: *Galleria mellonella* immunity. *Insect Science*, v. 24, n. 3, p. 342–357, jun. 2017.

WUYEP, P. A. et al. Alcoholic extracts from *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Mull. Arg. improved survival of *Drosophila melanogaster* infected with virulent *Aspergillus* species. 2018.

ZEHRBACH, A. M. D.; ROGERS, A. R.; TARR, D. E. K. An Investigation of the Potential Antifungal Properties of CNC-2 in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Nematology*, v. 49, n. 4, p. 472–476, dez. 2017.