

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTINSTITUCIONAL DE PÓS -GRADUAÇÃO  
EM BIOTECNOLOGIA**

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MOLECULARES  
PARA IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS  
CLÍNICOS DE *Candida* spp.**

**HUGO VALÉRIO CORRÊA DE OLIVEIRA**

**MANAUS-AM  
2007**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTIINSTITUCIONAL DE PÓS -GRADUAÇÃO  
EM BIOTECNOLOGIA**

**HUGO VALÉRIO CORRÊA DE OLIVEIRA**

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MOLECULARES  
PARA IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS  
CLÍNICOS DE *Candida* spp.**

**Dissertação Apresentada ao Programa  
Multiinstitucional de Pós-Graduação  
em Biotecnologia, da Universidade  
Federal do Amazonas, para Obtenção  
do Título de Mestre em Biotecnologia,  
Área de Concentração: Biotecnologias  
para a Saúde.**

**Orientadora: Adriana Sotero Martins, Dra.  
Co-orientadora: Elvira Carvajal, Dra.**

**MANAUS-AM  
2007**

Ficha Catalográfica  
(Catalogação na fonte realizada pela Biblioteca Central – UFAM)

	Oliveira, Hugo Valério Corrêa de
O48a	Desenvolvimento de marcadores moleculares para identificação de isolados clínicos de <i>Candida</i> spp / Hugo Valério Corrêa de Oliveira. - Manaus: UFAM, 2007. 100 f.; il. color. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2007. Orientadora: Prof <sup>a</sup> Dra. Adriana Sotero Martins Co-orientadora: Prof <sup>a</sup> Dra. Elvira Carvajal 1. Candidíase 2. Biologia molecular 3. Ginecologia 4. DNA recombinante I. Martins, Adriana Sotero II. Carvajal, Elvira III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título CDU 618.1(811.3)(043.3)

**HUGO VALÉRIO CORRÊA DE OLIVEIRA**

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MOLECULARES  
PARA IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS  
CLÍNICOS DE *Candida* spp.**

Dissertação Apresentada ao  
Programa Multiinstitucional de Pós-  
Graduação em Biotecnologia da  
Universidade Federal do Amazonas,  
para Obtenção do Título de Mestre  
em Biotecnologia, Área de  
Concentração: Biotecnologias para a  
Saúde.

**APROVADO EM 09/08/2007**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Dra. Adriana Sotero Martins, Presidente  
Fundação Oswaldo Cruz-RJ**

---

**Dr. Edmar Vaz de Andrade, Membro  
Universidade Federal do Amazonas**

---

**Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura, Membro  
Fundação Oswaldo Cruz-AM**

**Dedico este trabalho a minha mãe,  
pelo exemplo de vida, luta e  
dedicação aos filhos.**

## AGRADECIMENTOS

A meus pais e irmãos por todos os momentos alegres, tristes, engraçados, chatos, ridículos, deprimentes, amorosos, monótonos, esquisitos, irônicos, desconfortáveis, desconfiantes, nebulosos, irritantes, e tudo mais que caracteriza uma convivência normal (risos) em família. Família é tudo!

A minha orientadora e amiga, Dra. Adriana Sotero Martins, por toda confiança em mim creditada. Muito obrigado por me fazer enxergar a importância da simplicidade; muito obrigado por seu bom humor em todos os momentos. Desculpe não ter tido o caderno de laboratório organizado que você desejou, mas é o meu jeito desleijado de ser, e que ainda tento consertar.

A minha co-orientadora, Dra. Elvira Carvajal, pela co-orientação, dicas, sugestões e apontamentos bibliográficos.

A toda a equipe e infra-estrutura do Centro de Pesquisas Leônidas e Maria Deane, da FIOCRUZ, em especial, a do Laboratório de Biodiversidade em Saúde, que me acolheu e proporcionou o desenvolvimento do meu projeto.

A Secretaria Municipal de Saúde (SEMSA) de Manaus -AM pelo concedimento para a realização das coletas do Projeto Candidíase em suas Policlínicas.

Aos médicos(as), enfermeiras, técnicas e auxiliares de enfermagem das Policlínicas Dr. Antônio Comte Telles e Monte das Oliveiras, que colaboraram gratuitamente nas coletas de *Candida*.

A minha querida e já saudosa turma de mestrado: Juliana, Luana, Cynthia, e Michele. Às três últimas, um obrigado especial pelas festas, shows e porres tomados durante todo esse período (pra compensar o estresse).

Aos colegas de laboratório (e que se tornaram grandes amigos): Mota , Nete, Juracy e Flávio. Obrigado a vocês pela prestatividade quando eu precisei.

A Rosinete, contadora, ex-secretária do laboratório, que muito me ajudou em orçamentos e compras de reagentes e equipamentos durante a fase inicial de meu projeto . Boa sorte e toda felicidade do mundo em sua nova vida, valeu!

A Marizete, secretária do laboratório que, apesar da “constante chatice”, no fundo é uma ótima pessoa e muito me auxiliou nesta fase.

A Dra. Ormezinda Fernandes, pelas dicas, artigos, e auxílios na área de micologia. Você se tornou uma grande amiga; vale ouro!

A Dra. Vanessa de Paula, hoje pesquisadora da FIOCRUZ-RJ. Obrigado pelas agradáveis conversas e dicas em meu projeto, felicidades e sucesso em sua carreira!

Ao Dr. Sérgio Luz pela ajuda oferecida na última etapa de meu projeto.

Aos alunos de iniciação científica: Patrick, Gabriela, Iana, Lincoln, Luciano, Manoel, e Adna (minha co-orientada), pelo companheirismo, conversas, fofocas e tudo mais.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela qualidade das disciplinas e pela concessão de bolsa (CAPES).

A todos os meus professores da Pós-Graduação em Biotecnologia; muito aprendi com vocês. Um agradecimento especial ao Dr. José Odair Pereira, pelos conselhos, e ao Dr. Edmar Vaz de Andrade pelo convite para a realização do estágio docente na disciplina de Biologia Molecular da graduação em Ciências Biológicas .

A Deus.

Por fim, desses dois anos e meio, levo um pouco de todos vocês!

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS!

**“É com sabedoria que se  
constrói a casa, pela prudência  
ela se consolida”.**

**(Provérbios 24, 3)**

## RESUMO

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma das mais freqüentes infecções vaginais. As leveduras do gênero *Candida* são os agentes etiológicos desta infecção, sendo *Candida albicans* a responsável majoritária. Contudo, tem-se verificado um aumento na incidência de infecções causadas por outras espécies (*C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*). Com intuito de apresentar um viés para o processo de identificação das cinco espécies de *Candida*, comumente isoladas da vulva e vagina, foi feita a análise de marcadores moleculares espécie-específicos para a região ITS1-5.8S-ITS2, do rDNA. A análise das seqüências nucleotídicas dessa região apresentou-se bastante conservada para as cepas de uma mesma espécie e, paralelamente, divergente entre as espécies do gênero. Os marcadores se traduziram em segmentos nucleotídicos, dos quais foi possível desenvolver oligonucleotídeos espécie-específicos tecnicamente apropriados, além de sítios enzimáticos inter e intra-específicos capazes de identificar/diferenciar as espécies de *Candida*. Uma análise paralela do “fingerprint”, gerado por simples PCR, constatou a inadequabilidade do uso dos oligonucleotídeos universais *ITS1*, *ITS2*, *ITS3* e *ITS4* para a identificação dessas espécies. De forma contrária, os oligonucleotídeos espécie-específicos desenvolvidos apresentaram-se eficientes corroborando, na prática, com a hipótese apresentada neste trabalho. Enzimas de restrição selecionadas para a diferenciação das espécies de *Candida* constituem uma alternativa a ser explorada futuramente, em experimentos de PCR-RFLP.

Palavras-chave: CVV; *Candida* spp.; rDNA; marcadores moleculares; identificação molecular

## SUMMARY

The vulvovaginal candidiasis (VVC) it is one of the most frequent vaginal infections. The yeasts of the genus *Candida* are the etiologic agents of this infection, being *Candida albicans* the majority responsible. However, an increase has been verifying in the incidence of infections caused by other species (*C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* and *C. krusei*). With intention of presenting an inclination for the process of identification of *Candida*'s five species, commonly isolated of the vulva and vagina, it was made the analysis of species - specific molecular markers for the region ITS1 -5.8S-ITS2, of the rDNA. The analysis of the nucleotides sequences of that region came quite conserved for the strains of a same species and, parallel, divergent among the species of the genus. The markers were translated in nucleotides segments, of the which it was possible to develop species-specific oligonucleotides technically proper, besides ranches enzymatic inter and intra-specific capable of to identify/differentiate *Candida*'s species. A parallel analysis of the " fingerprint ", generated by simple PCR, it verified the inadequability of the use of the universal oligonucleotídeos *ITS1*, *ITS2*, *ITS3* and *ITS4* for the identification of those species. In a contrary way, the developed species-specific oligonucleotides came efficient corroborating, in practice, with the hypothesis presented in this work. Restriction enzymes selected for the differentiation of *Candida*'s species they constitute an alternative to be explored hereafter, in experiments of PCR-RFLP.

Words-key: VVC; *Candida* spp.; rDNA; molecular markers; molecular identification

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Processamento dos genes que compõem o RNA ribossômico da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (acompanhar explicação no item 3.4). Fonte: Modificado de Kressler, et al. 1999. ----- 34

Figura 2. Modelo esquematizando o isolamento da região ITS1 -5.8S-ITS2 pelos iniciadores de oligonucleotídeos universais *ITS1* e *ITS4*. As regiões de hibridização destes oligonucleotídeos envolvem trechos dos genes rRNA 18S e rRNA 28S, respectivamente. -- 49

Figura 3. Local de hibridização, no rDNA, de cada um dos quatro oligonucleotídeos universais (*ITS1*, *ITS2*, *ITS3*, e *ITS4*).----- 56

Figura 4. Imagem real do alinhamento realizado para as seqüências ITS1 -5.8S-ITS2 das cepas de *C. albicans* utilizadas neste trabalho. ----- 69

Figura 5. Imagem real do alinhamento realizado para cinco seqüências ITS1 -5.8S-ITS2: NW139715, de *C. albicans*, com 536pb; AY939793, de *C. glabrata*, com 881pb; AY939810, de *C. tropicalis*, 526pb; AY939803, de *C. parapsilosis*, com 520pb; e AY939808, de *C. krusei*, com 509pb. ----- 73

Figura 6. PCR realizado com a combinação dos oligonucleotídeos universais *ITS1*, *ITS2*, *ITS3*, e *ITS4*, demonstrando as três bandas características do rDNA (ITS1-5.8S-ITS2; ITS1; e ITS2) de 1-*C. albicans*, 2-*C. parapsilosis*, 3-*C. glabrata*, 4-*C. tropicalis*, e 5-*C. krusei*. M- marcador de tamanho molecular de 100pb. ----- 84

Figura 7. Fragmentos (ITS1-5.8S-ITS2; ITS1; e ITS2) amplificados independentemente pelos oligonucleotídeos universais *ITS1*, *ITS2*, *ITS3*, e *ITS4* e unidos em um mesmo poço. *C. albicans*: A1- ITS1-5.8S-ITS2; A2- ITS1; A3- ITS2; A123- ITS1-5.8S-ITS2, ITS1 e ITS2. *C. glabrata*: B1- ITS1-5.8S-ITS2; B2- ITS1; B3- ITS2; B123- ITS1-5.8S-ITS2, ITS1 e ITS2. *C. tropicalis*: C1- ITS1-5.8S-ITS2; C2- ITS1; C3- ITS2; C123- ITS1-5.8S-ITS2, ITS1 e ITS2. *C. parapsilosis*: D1- ITS1-5.8S-ITS2; D2- ITS1; D3- ITS2; D123- ITS1-5.8S-ITS2, ITS1 e ITS2. *C. krusei*: E1- ITS1-5.8S-ITS2; E2- ITS1; E3- ITS2; E123- ITS1-5.8S-ITS2, ITS1 e ITS2. M- marcador de tamanho molecular de 100pb. ----- 85

Figura 8. PCR-gradiente realizado para o par de oligonucleotídeos *CaF//CaR*, em *C. albicans* PCT-535. Poços: 1-47,0°C; 2-47,3°C; 3-48,4°C; 4-50,2°C; 5-52,5°C; 6-55,1°C; 7-57,8°C; 8-60,5°C; 9-63,0°C; 10-65,1°C; 11-66,7°C; 12-67,5°C. M- marcador de tamanho molecular de 100pb.----- 87

Figura 9. PCR-gradiente realizado para o par de oligonucleotídeos *CgF//CgR*, em *C. glabrata* PCT-213. Poços: 1-47,0°C; 2-47,3°C; 3-48,4°C; 4-50,2°C; 5-52,5°C; 6-55,1°C; 7-57,8°C; 8-60,5°C; 9-63,0°C; 10-65,1°C; 11-66,7°C; 12-67,5°C. M- marcador de tamanho molecular de 100pb.----- 88

Figura 10. PCR-gradiente realizado para o par de oligonucleotídeos *CtF//CtR*, em *C. tropicalis* PCT-505. Poços: 1-47,0°C; 2-47,3°C; 3-48,4°C; 4-50,2°C; 5-52,5°C; 6-55,1°C; 7-

57,8°C; 8-60,5°C; 9-63,0°C; 10-65,1°C; 11-66,7°C; 12-67,5°C. M- marcador de tamanho molecular de 100pb. ----- 88

Figura 11. PCR-gradiente realizado para o par de oligonucleotídeos *CpF//CpR*, em *C. parapsilosis* PCT-611. Poços: 1-47,0°C; 2-47,3°C; 3-48,4°C; 4-50,2°C; 5-52,5°C; 6-55,1°C; 7-57,8°C; 8-60,5°C; 9-63,0°C; 10-65,1°C; 11-66,7°C; 12-67,5°C. M- marcador de tamanho molecular de 100pb. ----- 88

Figura 12. PCR-gradiente realizado para o par de oligonucleotídeos *CkF//CkR*, em *C.krusei* PCT-740. Poços: 1-47,0°C; 2-47,3°C; 3-48,4°C; 4-50,2°C; 5-52,5°C; 6-55,1°C; 7-57,8°C; 8-60,5°C; 9-63,0°C; 10-65,1°C; 11-66,7°C; 12-67,5°C. M- marcador de tamanho molecular de 100pb.----- 89

Figura 13. Amplicons da PCR realizada com oligonucleotídeos espécie -específicos em gel de agarose 2% contendo brometo de etídeo 0,5µg/mL. 1- *C. albicans* PCT-535. 2- *C. parapsilosis* PCT-611. 3- *C. glabrata*. PCT-213. 4- *C. tropicalis* PCT-505. 5- *C. krusei* PCT-740. M- marcador de tamanho molecular de 100pb. ----- 93

Figura 14. PCR direto de colônia. 1- *C. glabrata* PCT-214. 2- *C. glabrata* PCT-380. 3- *C. glabrata* PCT-599. 4- *C. glabrata* MO-131. 5- *C. glabrata* PMO-158. 6- *C. parapsilosis* PCT-727. 7- *C. parapsilosis* PCT-342. 8- *C. parapsilosis* PCT-109. 9- *C. parapsilosis* PMO-107. 10- *C. parapsilosis* PMO-246. 11- *C. tropicalis* PCT-721. 12- *C. tropicalis* PCT-716. 13- *C. tropicalis* PCT-433. 14- *C. tropicalis* PMO-037. 15- *C. tropicalis* PMO-157. 16- *C. albicans* PCT-056. 17- *C. albicans* PCT-038. 18- *C. albicans* PCT-105. 19- *C. albicans* PMO-026. 20- *C. albicans* PMO-011. 21- *C. albicans* PCT-535. 22- *C. krusei* PCT-275. 23- *C. krusei* PCT-740. M- Marcador de tamanho molecular 100pb. Gel de agarose 2% contendo brometo de etídeo 0,5µg/mL. ----- 95

Figura 15. Amplicons da região ITS1-5.8S-ITS2, amplificados pelo par de oligonucleotídeos *ITS1* e *ITS4*. 1- *C. albicans* PCT-535. 2- *C. glabrata* PCT-213. 3- *C. tropicalis* PCT-505. 4- *C. parapsilosis* PCT-611. 5- *C. krusei* PCT-740. M- marcador de tamanho molecular de 100 pb. ----- 97

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Enzimas de restrição utilizadas -----	44
Tabela 2. Oligonucleotídeos universais. -----	45
Tabela 3. Oligonucleotídeos espécie-específicos propostos neste trabalho. -----	45
Tabela 4. Propriedades dos oligonucleotídeos espécie-específicos propostos. -----	76
Tabela 5. Índice de similaridade dos oligonucleotídeos com trechos das seqüências ITS1 - 5.8S-ITS2 de cinco espécies de <i>Candida</i> . -----	78
Tabela 6. Valor de energia livre do nucleotídeo vizinho. Fonte: Paula & Ferreira (2004). -----	78
Tabela 7. Estimativa do tamanho esperado para os fragmentos de digestão, obtidos para cada uma das enzimas interespecíficas selecionadas: <i>BshFI (HaeIII)</i> e <i>BseYI</i> . -----	80
Tabela 8. Sítios de restrição com características intra-específicas, extraídos do mapa de restrição de uma seqüência ITS1 -5.8S-ITS2 de <i>C. glabrata</i> , com comprimento de 881pb. --	81
Tabela 9. Sítios de restrição com características intra-específicas, extraídos do mapa de restrição de uma seqüência ITS1 -5.8S-ITS2 de <i>C. tropicalis</i> , com comprimento de 526pb. -	82
Tabela 10. Sítio de restrição com característica intra-específica, extraído do mapa de restrição de uma seqüência ITS1 -5.8S-ITS2 de <i>C. parapsilosis</i> , com comprimento de 520pb. -----	82
Tabela 11. Sítio de restrição com característica intra-específica, extraído do mapa de restrição de uma seqüência ITS1 -5.8S-ITS2 de <i>C. krusei</i> , com comprimento de 509pb. -----	82
Tabela 12. Fragmentos gerados pelos oligonucleotídeos universais para <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , e <i>C. krusei</i> .-----	86

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Cepas de <i>Candida</i> utilizadas neste trabalho. -----	39
Quadro 2. Seqüências adquiridas do genbank (NCBI) e seus respectivos números de acesso. -----	46
Quadro 3. Concentrações e respectivos valores usados na PCR dos iniciadores de oligonucleotídeos universais. [ ] = concentração. -----	57
Quadro 4. Condições de termociclagem da PCR utilizando os quatro iniciadores de oligonucleotídeos universais: “Multiplex PCR” + “Hot Start PCR” + “Duas temperaturas de anelamento.” -----	58
Quadro 5. Valores de temperatura (em °C) para cada uma das doze colunas, baseados no cálculo, pelo termociclador, da função gradiente de $G = \pm 10$ para uma temperatura central de 57°C. -----	60
Quadro 6. Concentrações e respectivos volumes usados na PCR dos iniciadores de oligonucleotídeos espécie-específicos. [ ] = concentração. -----	61
Quadro 7. Condições de termociclagem para a amplificação de fragmentos gerados pelos primers de oligonucleotídeos espécie-específicos. -----	62
Quadro 8. Concentrações e respectivos volumes usados na amplificação da região ITS1 -5.8S-ITS2. [ ] = concentração. -----	65
Quadro 9. Condições de termociclagem para a amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2, por uso dos iniciadores de oligonucleotídeos universais <i>ITS1</i> e <i>ITS2</i> . -----	65
Quadro 10. Reagentes e respectivos volumes usados na digestão das amostras de PCR das cepas de <i>Candida</i> com <i>HaeIII</i> . -----	66
Quadro 11. Reagentes e respectivos volumes usados na digestão das amostras de PCR das cepas de <i>Candida</i> com <i>BseYI</i> . -----	66
Quadro 12. Matriz de similaridade entre as seqüências ITS1 -5.8S-ITS2 de <i>C. albicans</i> . -----	70
Quadro 13. Matriz de similaridade entre as seqüências ITS1 -5.8S-ITS2 de <i>C. parapsilosis</i> . -----	71
Quadro 14. Matriz de similaridade entre as seqüências ITS1 -5.8S-ITS2 de <i>C. tropicalis</i> . -----	71
Quadro 15. Matriz de similaridade entre as seqüências ITS1 -5.8S-ITS2 de <i>C. krusei</i> . -----	72
Quadro 16. Matriz de similaridade entre as seqüências ITS1 -5.8S-ITS2 de <i>C. glabrata</i> . -----	72

Quadro 17. Matriz de similaridade entre as seqüências ITS1 -5.8S-ITS2 de cinco espécies de *Candida*. *Ca*, *Cg*, *CtR*, *Cp.*, e *CkR*, são abreviações para *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, e *C. krusei*, respectivamente. ----- 74

Quadro 18. Cálculo da energia livre de formação do duplex para os oligonucleotídeos espécie - específicos. ----- 79

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Composição nucleotídica entre diferentes seqüências ITS1 -5.8S-ITS2 de *Candida*. As seqüências são: NW139715, de *C. albicans*; AY939793, de *C. glabrata*; AY939810, de *C. tropicalis*; AY939803, de *C. parapsilosis*; e AY939808, de *C. krusei*.----- 75

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\Delta$	Delta
$\Delta G$	Varição da energia livre de Gibbs
ARS	Origem e replicação autônoma
ATCC	American Type Culture Collection
dATP	2' desoxirriboadenosina trifosfato
dCTP	2' desoxirribocitidina trifosfato
dTTP	2' Desoxirribotimidina trifosfato
dGTP	2' desoxirriboguanidina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídio trifosfatado
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ETS	Espaço transcrito externo
IGS	Espaço intergênico
ITS	Espaço transcrito interno
kb	Quilobases
Mb	Megabases
NTS	Espaço não transcrito
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucléico
S	Coefficiente de sedimentação “Svedberg”
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TBE	Tris-Borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
YPD	Extrato de levedura-peptona-glicose

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	VIII
<b>SUMMARY</b>	IX
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b>	X
<b>LISTA DE TABELAS</b>	XII
<b>LISTA DE QUADROS</b>	XIII
<b>LISTA DE GRÁFICOS</b>	XV
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b>	XVI
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	19
<b>2 OBJETIVOS</b>	22
2.1 Geral	22
2.2 Específicos	22
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b>	23
3.1 Candidíase Vulvovaginal	23
3.2 Epidemiologia da Candidíase Vulvovaginal	24
3.3 Diagnóstico Laboratorial da Candidíase	27
3.3.1 Identificação fenotípica das espécies	27
3.3.2 Identificação das espécies por métodos de biologia molecular	29
3.4 RNA Ribossômico	30
3.5 Evolução dos Genes Nucleares de RNA Ribossômico	36
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	38
4.1 Modelo de Estudo	38
4.2 Material	38
4.2.1 Microrganismos	38
4.2.2 Equipamentos	39
4.2.3 Meios de cultura	41
4.2.4 Soluções	42
4.2.5 Enzima de polimerização e outros produtos usados em biologia molecular	44
4.2.6 Enzimas de restrição	44
4.2.7 Oligonucleotídeos	44
4.3 Métodos	45
4.3.1 Obtenção de seqüências genômicas do RNA ribossômico de <i>Candida</i>	45
4.3.2 Depuração da região ITS1-5.8S-ITS2	48
4.3.3 Alinhamento computacional dos segmentos nucleotídicos ITS1-5.8S-ITS2	49
4.3.4 Desenho de iniciadores de oligonucleotídeos espécie-específicos	50
4.3.5 Análise de sítios de restrição	52
4.3.6 Extração de DNA cromossomal	54
4.3.6.1 Quantificação e pureza do DNA	55
4.3.7 Identificação com uso de iniciadores de oligonucleotídeos universais	56
4.3.8 Identificação com uso de oligonucleotídeos espécie-específicos	59

4.3.8.1 PCR -----	59
4.3.8.2 PCR de colônia -----	62
4.3.9 Identificação pelo método de PCR -RFLP -----	63
4.3.9.1 Uso da PCR para amplificação da região ITS1 -5.8S-ITS2 -----	64
4.3.9.2 Digestão enzimática -----	65
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO -----</b>	<b>68</b>
5.1 Processamento das Sequências Genômicas -----	68
5.1.1 Análise intra-específica -----	68
5.1.2 Análise interespecífica -----	72
5.2 Oligonucleotídeos Espécie-Específicos -----	75
5.2.1 Propriedades gerais -----	75
5.3 Análise dos Mapas de Restrição e Definição das Enzimas de Restrição -----	80
5.3.1 Enzimas interespecíficas -----	80
5.3.2 Enzimas intra-específicas -----	81
5.4 Identificação de <i>Candida</i> por Oligonucleotídeos Universais -----	83
5.5 Identificação de <i>Candida</i> por Oligonucleotídeos Espécie-Específicos -----	87
5.5.1 PCR direto de colônia -----	94
5.6 Identificação de <i>Candida</i> por PCR-RFLP -----	96
<b>6 CONCLUSÃO -----</b>	<b>98</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----</b>	<b>100</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A candidíase, de uma maneira geral, é a mais freqüente infecção fúngica oportunística. A Candidíase vulvovaginal (CVV) é a forma de candidíase de repetição mais comum (candidíase recorrente). Durante muito tempo, acreditava-se que apenas *Candida albicans* fosse capaz de causar a CVV; hoje, no entanto, sabe-se que outras espécies são capazes, em condições especiais do hospedeiro, de causar esta mesma ação.

A progressão da colonização para infecção em mucosas foi relatada como um processo dependente do mecanismo de defesa do hospedeiro e da habilidade de *Candida spp.* sobrepujar tal mecanismo, o que ocasiona em uma conversão da forma comensal à existência parasitária (SIDRIM, 1999; BARIOLLO, et al. 2005). Além de *C. albicans*, as outras espécies de *Candida* isoladas de amostras vulvovaginais são: *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*.

Acompanhar a epidemiologia da candidíase e a prevalência das espécies comumente associadas à infecção constituem medidas de saúde pública importante. Em pesquisa realizada a Secretaria de Estado de Saúde da cidade de Manaus-AM (SUSAM) e a duas Fundações de Saúde Públicas Estaduais, com competências para o diagnóstico e tratamento desta infecção, não foram achados um banco de dados organizado e consistente sobre a candidíase vulvovaginal (dados viciados).

A primeira abordagem clínica para a constatação de infecção por *Candida* baseia-se na análise sintomática das manifestações características da colonização destas leveduras em uma dada região do corpo. Manifestações como corrimento vaginal esbranquiçado, coceira vulvovaginal, sensação de queimação/ardência vulcovaginal, disúria e dispaur enia são indícios de CVV (ODS et al., 1988).

A segunda abordagem (de certa forma corroborativa com a anamnese do paciente) consiste na observação/constatação de células leveduriformes em brotamento, clamidósporos, pseudo-hifas e hifas septadas no material biológico “a fresco”. Entretanto, a simples observação destas estruturas não permite, ainda, afirmar ser *Candida* a responsável pela patologia; a presença de outros micorganismos na amostra deve ser averiguada e analisada quanto a sua ação ou isenção no presente quadro de vulvaginite. Caso fique constatado vulvovaginite causada por *Candida* spp., torna-se dispendioso identificar a espécie, ou as espécies, em questão (*C. albicans*, *C. não-albicans* ou associação destas).

Os achados micromorfológicos característicos de cada espécie constituem uma alternativa mais segura, entretanto, não exata (sem rigor) do ponto de vista do “controle de qualidade” para a identificação da(s) espécie(s) associada(s) à infecção. Sabe-se que existe a possibilidade de variabilidade e comportamento fenotípico instável, motivados por fatores genéticos e/ou ambientais. As características micromorfológicas comumente encontradas para cada espécie são: (i) *C. albicans*: clamidoconídios e blastoconídios em cacho. *C. albicans* tem a característica fenotípica de produzir um tubo germinativo, quando semeada, a 37°C, por período de 1,5 a 3 horas, em soro sanguíneo (que pode ser de qualquer animal) ou albumina purificada (*C. dubliniensis* também apresenta esta característica); (ii) *C. tropicalis*: blastoconídios em cadeias simples e ramificadas; (iii) *C. parapsilosis*: células gigantes e pseudo-hifas curvas e finas; (iv) *C. krusei*: blastoconídios alongados agrupados nas constrictões do pseudomicélio e; (v) *C. glabrata*: apenas pequenos blastoconídios.

Apesar de algumas estruturas achadas na micromorfologia serem patognomônicas de uma determinada espécie de levedura, a falta de rigor (mencionada anteriormente) na apresentação destas estruturas faz com que esses achados não dispensem provas complementares. Estas provas constituem de assimilação e a fermentação de carboidratos e a

assimilação de nitrogênio, para uma confirmação mais segura da identidade da espécie (SIDRIN & MOREIRA, 1999).

Limitações e procedimentos relativamente laboriosos acerca das técnicas de identificação fenotípica para o diagnóstico das micoses têm impulsionado recentes métodos baseados em biologia molecular. Estes métodos buscam um diagnóstico mais sensível e rápido. Entre os métodos estudados, se destaca a reação em cadeia da polimerase, ou PCR (do Inglês **P**olimerase **C**hain **R**eaction), que oferece um custo-benefício relativamente baixo se comparado aos outros métodos utilizados (ELLEPODA & MORRISON, 2005).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Desenvolver marcadores moleculares para identificação de cinco espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, e *C. krusei*) comumente isoladas da mucosa vulvovaginal.

### 2.2 Específicos

- Analisar a similaridade intra e interespecífica da região ITS1 -5.8S-ITS2 do rDNA das espécies de *Candida*..
- Identificar trechos com alta similaridade intra -específica para servir de subsídios para o desenho de oligonucleotídeos espécie -específicos
- Testar, por PCR, os oligonucleotídeos espécie -específicos desenvolvidos em cepas de *Candida* previamente isoladas e identificadas.
- Analisar o potencial de oligonucleotídeos universais disponíveis para a região ITS1 -5.8S-ITS2 de fungos para a diferenciação/identificação das espécies de *Candida*.
- Gerar um mapa de restrição para as seqüências ITS1 -5.8S-ITS2 das espécies de *Candida*.
- Selecionar endonuclease(s) de restrição com sítio(s) de ocorrência comum(uns) às espécies de *Candida* para análise de “fingerprint”.
- Selecionar endonucleases de restrição espécie-específicas.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Candidíase Vulvovaginal

As candidíases ou candidoses são as mais freqüentes infecções fúngicas oportunistas em humanos (SIDRIM, 1999). São causadas por espécies de *Candida*, entre as quais o agente etiológico de maior freqüência é *Candida albicans* (SIDRIM, 1999; GOMPERTZ et al., 2000; COLOMBO & GUIMARÃES, 2003). Os fatores que predisõem as micoses oportunistas são classificados em fatores intrínsecos ou próprios do hospedeiro (neoplasias, diabetes, hemopatias diversas, síndrome da imunodeficiência humana e todas as doenças que alteram a imunidade celular, envelhecimento, gravidez, prematuridade, entre outros); e fatores extrínsecos (antibioticoterapia, corticoidoterapia, antiblásticos, cirurgia de transplantes e ambientes hospitalares contaminados) (GOMPERTZ et al., 2000). Dentre os principais fatores que predisõem à infecção por *Candida* destacam-se diabetes mellitus, debilidade geral, imunodeficiência, uso de cateteres urinários ou intravenosos de demora, abuso de narcóticos intravenosos, tratamento prolongado com antimicrobianos e corticosteróides (EDMAN, 1998; MATSUMOTO et al., 2001; GODOY et al., 2003).

O espectro das candidíases é bastante extenso, indo desde manifestações banais, como a colonização de mucosas, até quadros sistêmicos com a invasão de vários órgãos. As mucosas mais frequentemente envolvidas, em quadros de candidíase, são as da boca, vagina e esôfago (SIDRIM, 1999).

Segundo Carvalho et al. (2003), dentre as mais de 180 espécies de *Candida* descritas, *C. albicans* está citada como responsável por 90% das infecções em pacientes com candidíase recorrente e é a espécie isolada na maioria dos casos de candidíase mucocutânea. A forma mais comum de candidíase de repetição é a candidíase vulvovaginal recorrente. Com relação

à candidíase vulvovaginal recorrente, esta é definida como infecção por *Candida* caracterizada por quatro ou mais episódios em período de doze meses. Estima-se que cerca de 75% das mulheres adultas apresentam pelo menos um episódio de vulvovaginite fúngica em sua vida, sendo que destas, 40 a 50% vivenciam novos surtos e 5% tornam-se recorrentes (FERRAZZA et al., 2005). Ods et al. (1988) preconiza como sintomas da candidíase vulvovaginal<sup>1</sup> (CVV) o corrimento vaginal esbranquiçado, coceira vulvovaginal, sensação de queimação/ardência vulvovaginal, disúria e dispaurenia.

### 3.2 Epidemiologia da Candidíase Vulvovaginal

A distribuição de *Candida* é muito ampla no meio ambiente, fazendo parte da microbiota normal ou participando de algumas patologias (GOMPertz et al. , 2000). Nas últimas décadas, o número de espécies de *Candida* de importância médica tem constantemente crescido, devido a uma multiplicidade de fatores predisponentes que facilitam uma conversão da forma comensal à existência parasitária, e constitui o grupo dominante de infecções fúngicas em hospitais (MATSUMOTO et al., 2001; BARIOLLO et al., 2005). Segundo Colombo & Guimarães (2003), em hospitais terciários, o gênero *Candida* responde por cerca de 80% das infecções fúngicas documentadas .

Entre as infecções invasivas causadas pelo gênero *Candida*, vale salientar a relevância clínica dos casos de infecção de corrente sanguínea, complicação esta conhecida como candidemia ou candidíase hematogênica. Nos Estados Unidos da América, no início dos anos 80, *Candida* spp. apresentava-se como o sétimo patógeno mais freqüente entre as infecções

---

<sup>1</sup> A CVV é caracterizada por inflamação da mucosa genital, que compromete principalmente vulva e vagina. Desenvolve-se em decorrência de infecção por leveduras do gênero *Candida* (CARVALHO, et al. 2003; ROSA & RUMEL, 2004; FERRAZZA, et al. 2005)

hospitalares. No período de 1986 a 1990, já se encontrava entre os cinco primeiros agentes mais comumente identificados em hemoculturas de pacientes internados em hospitais americanos (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003). De acordo com um estudo realizado por OSTROSKY-ZEICHNER, et al. (2003), a candidemia é agora a quarta infecção da corrente sanguínea mais comum nos Estados Unidos.

Na Europa, Voss et al. (1996) conduziram estudo retrospectivo de avaliação de infecções documentadas em corrente sanguínea em cinco hospitais da Holanda. Durante o período de 1897 a 1995, avaliou-se um total de 395.000 hemoculturas solicitadas nessas cinco instituições e se observou que a casuística de candidemia nesses hospitais teve um aumento de cerca de 100%, passando de 53 a 95 episódios/ano.

No Canadá, um estudo realizado em um hospital localizado em Winnipeg, Manitoba, durante o período de 1976 a 1996, constatou que, de um total de 816 fungemias analisadas, 771 foram causadas por espécies de *Candida*. Neste estudo, observou-se que entre 1976 e 1980 as espécies de *Candida* representavam a 13ª causa de infecção de corrente sanguínea, enquanto no período de 1991 a 1996 passaram a ser a 4ª causa de infecção neste sítio, perdendo em frequência apenas para infecções causadas por estafilococos coagulase -negativo (ECN), *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (COLOMBO & GUIMARÃES, 2003).

No Brasil, há poucos estudos epidemiológicos disponíveis na literatura sobre infecções causadas por *Candida* e os que existem, se limitam, quase que inteiramente, à candidemia (infecções hematogênicas por *Candida*). Colombo (2003) conduziu um estudo epidemiológico reunindo dados sobre infecções de corrente sanguínea documentada em quatro hospitais da cidade de São Paulo. Durante um período de 12 meses (março/2002 a fevereiro/2003), um total de 7.038 episódios de bacteremias e fungemias foi avaliado, sendo que *Candida* spp. respondeu por 4,3% do total das infecções de corrente sanguínea.

Para a candidíase vaginal, no Brasil, uma pesquisa realizada no ambulatório de ginecologia e obstetrícia da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, evidenciou que houve um aumento desse tipo de infecção nas últimas quatro décadas, evoluindo de 0,5% em 1968 para 22,5% em 1998 (ADAD et al., 2001).

Ferraza et al. (2005), em estudo envolvendo a distribuição de espécies de leveduras isoladas da vagina em duas localidades do sul do Brasil, Jaraguá do Sul – SC (Santa Catarina) e Maringá – PR (Paraná), observaram que *C. albicans* foi a levedura mais freqüente nas duas populações. Em SC, representou 77,4% dos isolados, ao passo que no PR, essa porcentagem foi de 50%.

Em outra abordagem da candidíase vulvovaginal na cidade de Maringá, Consolaro et al. (2004) realizaram um estudo com 161 mulheres, de 14 a 66 anos de idade, que correlacionou a freqüência e os tipos de leveduras encontradas em dois grupos de pacientes, mulheres assintomáticas e mulheres com diferentes manifestações clínicas da CVV. Deste total, os resultados da cultura foram positivos para 35 p acientes (21,7%). *C. albicans* foi isolado em 60% dos casos (21/35). A porcentagem de leveduras não -*C. albicans* foi dividida em 25,7% de *C. glabrata* (9/35), 5,7% de *C. parapsilosis* (2/35), 5,7% de *Saccharomyces cerevisiae* (2/35), e 2,9% de *Trichosporon* sp. (1/35). Este estudo constatou que *C. albicans* foi mais freqüente em mulheres sintomáticas, enquanto leveduras não -*C. albicans* são mais freqüentes em mulheres assintomáticas.

De acordo com Sobel et al. (1997), 80 a 90% de casos de CVV são causados por *Candida albicans*, enquanto 10 a 20% são devido a outras *Candida* não-*albicans* (*Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*). Em estudo realizado por Gupta, et al. (2004) é salientado a emergência de *Candida* não-*albicans* como agentes patológicos e/ou comensais, ultimamente.

A principal evidência para o aumento na incidência da candidíase em todo o mundo está no crescente uso (e também abuso) de agentes antifúngicos, em especial de azoles, que são usados tanto para profilaxia como para o tratamento propriamente dito da candidíase (MONTRAVERS & JABBOUR, 2006).

### **3.3 Diagnóstico Laboratorial da Candidíase**

#### **3.3.1 Identificação fenotípica das espécies**

Para o entendimento epidemiológico e conduta terapêutica adequada é essencial, primeiramente, que se identifiquem corretamente as diferentes espécies de *Candida* envolvidas na patologia. Uma avaliação secundária constitui os testes de resistência a antifúngicos.

A rotina de identificação envolve além do exame morfológico da colônia, a micromorfologia, a reprodução e várias reações bioquímicas. *C. albicans* tem sido identificada apenas pela produção de tubo germinativo em soro e produção de clamidósporos em ágar fubá acrescido de *tween* 80, desde que seja diferenciada de *C. dubliniensis*. Outras espécies, além da análise micromorfológica convencional e obrigatória, necessitam de provas complementares de assimilação e fermentação de carbono que por sua vez consomem tempo e são trabalhosos (SIDRIM & MOREIRA, 1999; SILVA & CANDIDO, 2005). Em acréscim ao mencionado, métodos mais rápidos e menos laboriosos têm sido desenvolvidos nos últimos anos, como consta em levantamento bibliográfico feito por Ellepola & Morrison (2005). Estes incluem testes tais como o RapID Yeast Plus System® (Innovative Diagnostic Systems) o qual contém substratos convencionais e cromogênicos e requer somente 4 a 5 horas para

concluir um resultado, o Fongiscreen test® (Sanofi Diagnostics Pauster), e o Automated Rapid Yeast Identification Panel® (Dade Microscan).

Atualmente são comercializados painéis manuais e automatizados para identificação de leveduras, através da capacidade assimilativa em substratos bioquímicos e enzimáticos, os quais são de realização e interpretação fáceis, além de oferecer o resultado em tempo menor (SILVA & CANDIDO, 2005).

No mercado mundial, os kits manuais mais conhecidos são o API 20C AUX® (bioMérieux-Vitek), o API Candida® (bioMérieux), ID 32C (bioMérieux- Marcy-l'Etoile), o Auxacolor® (Sanofi Diagnostics Pasteur), o Uni-Yeast-Tek kit® (Remel Laboratories), e o CandiFast® (International Microbio). Esses testes usam um aumento na turbidez ou a produção de cor em cada um de uma série de poços contendo diferentes substratos para produzir um perfil bioquímico particular.

Com relação aos sistemas automatizados, os mais utilizados são o AutoMicrobic® (BioMérieux-Vitek) e o Microscan Rapid Yeast Ident® (Baxter), os quais utilizam painéis onde a incubação e leitura são feitas por sistema automatizado (SIDRIM & MOREIRA, 1999).

Todos os sistemas descritos acima apresentam vantagens e desvantagens entre si, contudo, duas coisas são comuns a todos: o alto custo no mercado e a necessidade de obtenção de colônias puras.

Os kits de identificação, por conterem substratos orgânicos, necessitam de armazenamento refrigerado especial, ocupando grandes volumes nos refrigeradores. É interessante também salientar que cada unidade proporciona identificação para um número limitado de amostras, não condizendo com a grande quantidade de material que entra diariamente na rotina de um laboratório de micologia da rede pública de saúde (ELLEPOLA & MORRISON, 2005).

### 3.3.2 Identificação das espécies por métodos de biologia molecular

Novos métodos de biologia molecular empregando a PCR (reação em cadeia da polimerase) têm sido apontados como uma promessa segura para o diagnóstico clínico da candidíase, mas, não são ainda padronizados ou disponíveis na maioria dos laboratórios clínicos (ELLEPOLA & MORRISON, 2005). Estes sistemas podem, potencialmente, oferecer a vantagem de uma identificação rápida e específica das espécies causadoras da candidíase se comparado aos métodos fenotípicos tradicionais.

A maioria dos sistemas baseados em ácido nucléico usa a técnica da PCR para amplificar o DNA do fungo como o primeiro passo no processo de identificação. Antes que a amplificação por PCR possa ocorrer, alvos apropriados de DNA devem ser selecionados. Muitas regiões conservadas do DNA ribossomal (rDNA) têm sido os alvos mais frequentes para amplificação por PCR e tem incluído os genes rRNA 5.8S, 18S e 28S, organizados no rDNA. (SANDHU et al., 1995; KURTZMAN & ROBNETT, 1997; MANNARELLI & KURTZMAN, 1998; HUI et al., 2000; JAEGER et al., 2000; LOEFFLER et al., 2000; GUIVER et al., 2001). Outros alvos têm incluído regiões ITS<sup>2</sup> (ELIE et al., 1998; CHEN et al., 2000; ELLEPOLA et al., 2003; COIGNARD et al., 2004; MASSONET et al., 2004) ou regiões IGS<sup>3</sup> (CIRACK et al., 2003).

A principal vantagem de usar a amplificação de alvos de regiões do DNA para as quais são conservadas entre todas as espécies de *Candida* é que um produto da PCR pode ser obtido de todas as espécies usando um simples conjunto de iniciadores de oligonucleotídeos. A seguinte amplificação, sondas espécies-específicas podem ser desenhadas para regiões mais

---

<sup>2</sup> ITS (do inglês: Internal Transcribed Spacer: espaço transcrito interno) é subdividido em ITS1 e ITS2 (KRESSLER, et al. 1999), o primeiro se situa entre os genes rRNA 18S e rRNA 5.8S, o segundo entre o rRNA 5.8S e o rRNA 25/28S. Maiores detalhes encontram-se descritos na seção 2.4, adiante.

<sup>3</sup> IGS (do inglês Intergenic Spacer: espaço intergênico) é subdividido em IGS1 e IGS2 (KUMAR & SHUKLA, 2005), a primeira corresponde a sequência 3' ETS-NTS1 e a segunda corresponde à região 5' ETS-NTS2. Entre estas, encontra-se o gene rRNA 5S. Todo esse conjunto separa as regiões ITS1-5.8S-ITS2. Maiores detalhes encontram-se descritos na seção 2.4, adiante.

variáveis de DNA, localizadas entre sítios de oligonucleotídeos universais, para a identificação de organismos específicos (ELIE et al., 1998; ELLEPOLA et al., 2003; COIGNARD et al., 2004).

Seqüências de polimorfismos na região ITS do gene rRNA têm sido também usada como um meio para identificação de leveduras. Chen et al. (2000) usou 434 isolados, representando 34 espécies de leveduras, para determinação do comprimento da região ITS2 amplificada por PCR e analisada em eletroforese de capilaridade. Dessa PCR, foram obtidos produtos espécie-específicos para 92% dos isolados clínicos testados; para os 8% restantes das seqüências foram requeridas análises com enzimas de restrição para a diferenciação. Estes dados e a especificação de comprimentos de polimorfismos, para identificação de leveduras, foram confirmadas pela análise da seqüência de DNA da região ITS2 para 93 isolados.

### **3.4 RNA Ribossômico**

Os RNA ribossômicos (rRNA) são componentes essenciais na fisiologia celular, sendo o principal produto de transcrição em qualquer célula, constituindo geralmente de 80% a 90% da massa de RNA total dos procariotos e eucariotos.

As seqüências que codificam para rRNA (ou seja, rDNA) são reiteradas, ocorrendo em número variável nos diversos organismos estudados. Em eucariotos, essas cópias estão organizadas *in tandem* (repetições em bloco); a síntese acontece primeiramente, embora não exclusivamente, em um compartimento subnuclear especializado chamado nucléolo. Lá, os genes de rRNA são transcritos como precursores (pré-rRNAs), os quais sofrem processamento e modificações covalentes. A maturação de pré-rRNAs está intimamente ligada à agregação destes com proteínas ribossômicas (r-proteínas). Estes processos dependem de vários elementos cis-atuantes, e eles requerem um grande número de proteínas não-

ribossomais como fatores trans-atuantes. Evidências experimentais sugerem que o esboço básico de síntese de ribossomos é conservado ao longo dos eucariotos. Porém, a maioria desses conhecimentos vem da combinação de aproximações genético-moleculares e bioquímicas na levedura *Saccharomyces cerevisiae* (KRESSLER, 1999; GORAB, 2004).

Os RNAs ribossômicos são classificados conforme seu coeficiente de sedimentação sob um campo centrífugo, que depende tanto do tamanho, assim como da densidade da molécula, em unidades Svedberg (de símbolo S). De forma sucinta, e em ordem de colocação da esquerda para a direita, cada unidade de repetição do rDNA eucarionte possui uma organização consistindo de: (1) um espaçador transcrito externo, conhecido por 5'ETS (do inglês **External Transcribed Spacer**: espaço transcrito externo); (2) uma região que codifica para rRNA 18S; (3) um espaçador interno que é transcrito, conhecido por ITS1 (do inglês **Internal Transcribed Spacer**: espaço transcrito interno) (4) uma região que codifica para rRNA 5.8S; (5) um segundo espaço interno que é transcrito, conhecido com ITS2; (6) uma região que codifica para rRNA 25/28S (nos eucariotos, variável de 25S a 28S); (7) um segundo espaçador transcrito externo, conhecido por 3'ETS; (8) um espaçador que não é transcrito, conhecido por NTS1 (do inglês **Nontranscribed Spacer**: espaço não transcrito); (9) uma região que codifica para rRNA 5S; e (10) um segundo espaçador que não é transcrito, conhecido por NTS2. Para entender o enunciado acima e toda a explanação posterior, acompanhar o esquema da figura 1.

Em leveduras, a grande subunidade ribossomal 60S é composta de 46 proteínas ribossomais (r-proteínas) e três espécies de rRNA (5S, 5.8S e 25/28S), enquanto a pequena subunidade ribossomal 40S contém 32 r-proteínas e o rRNA 18S. Três dos quatro rRNAs (18S, 5.8S e 25/28S) são transcritos como um único e enorme pré-rRNA pela RNA polimerase I (rRNA pré-35S), enquanto que o quarto rRNA (5S) é transcrito independentemente como um pré-rRNA pela RNA polimerase III (rRNA pré-5S). Todos os

quatro rRNAs são transcritos a partir de uma unidade de rDNA de 9,1 kb, a qual é repetida 10 a 200 vezes no genoma das leveduras. O promotor para a rRNA polimerase I se localiza no início da região 5'ETS, e o promotor da RNA polimerase III se localiza no início do próprio gene do rRNA 5S. Próximo à região de terminalização do transcrito primário da RNA polimerase I (região 3' ETS) existe um *enhancer* associado com a regulação deste mesmo produto. Dentro de NTS2, existe uma fraca origem de replicação autônoma conhecida como seqüência ARS (WOOLFORD-JÚNIOR & WARNER, 1991; KRESSLER et al. 1999 ;MEIER & THOMA, 2005).

De acordo com Kressler et al (1999), o rRNA pré-35S contém as seqüências de rRNA 18S, 5.8S, e 25/28S, que são separadas por duas seqüências de espaços transcritos internos (ITS), ITS1 e ITS2, e flanqueados por duas seqüências de espaços transcritos e xternos (ETS), um 5'ETS e um 3'ETS.

O rRNA pré-35S é processado e dá origem ao pré-rRNA 35S; este último que difere do primeiro em seu 3' terminal, pois no mapa de terminação de transcrição de nucleotídeo, na posição + 210 da região 3'ETS, o rRNA pré-35S é estendido por mais 7 a 10 nucleotídeo (KRESSER et al., 1999). A maturação do pré-rRNA 35S contém 10 locais de processamento conhecidos, é um caminho de multipassos que requer muitos fatores trans-atuantes diferentes.

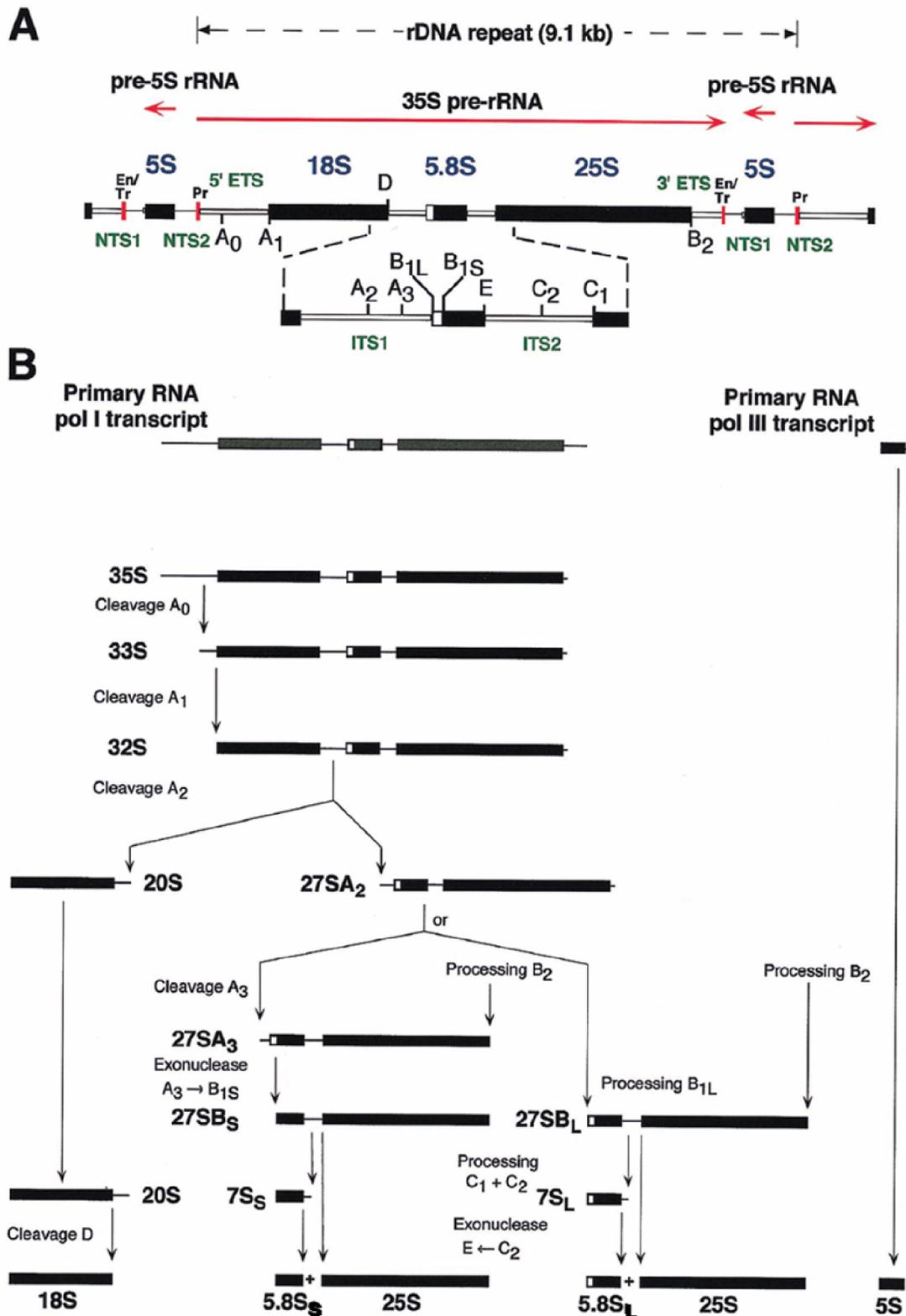
O processamento do pré-rRNA 5S é independente da maturação do pré-RNA 35S e cineticamente mais rápido do que a formação de rRNAs 18S, 5.8S, e 25/28S maduros (146). O 5' final do rRNA 5S maduro corresponde ao mesmo 5' do transcrito primário, enquanto que o 3' final é processado de um RNA pré-5S que é estendido por 7 a 13 nucleotídeos.

Muitos nucleotídeos específicos do rRNA também sofrem, principalmente logo após a transcrição, modificações covalentes. Estas modificações incluem isomerização de uridina para pseudouridina ( $\Psi$ ) por rotação de base (modificação do nucleotídeo 45), metilação do grupo 2'-hidroxil de resíduos de açúcar (metilação de 2'-O-Ribose; modificação do

nucleotídeo 55), e metilação de base (cerca de 10 nucleotídeos modificados) (MADEN & HUGHES, 1997; BACHELLERIE & CAVAILLÉ, 1998; OFENGAND & FOURNIER, 1998; KRESSER et al., 1999)

As modificações e processamentos do pré-RNA não ocorrem em pré-RNAs “nus” (não associados ainda às r-proteínas). Em vez disso, os pré-RNAs são associados com algumas das r-proteínas no nucléolo para formar partículas pré-ribossomais. Em adição às r-proteínas, o pré-ribossomo nucleolar tem sido conhecido por conter proteínas não ribossomais (não-r-proteínas). A identidade destas proteínas não foram claramente estabelecidas, mas elas correspondem presumivelmente a fatores “trans-atuantes” requeridos para o processamento e modificação de pré-rRNA ou envolvidos na agregação dos pré-rRNAs com as r-proteínas (KRESSER et al., 1999).

Embora os caminhos de processamento de pré-RNAs e seus intermediários tenham sido bem caracterizados, o processo de agregação dos rRNAs e as aproximadamente 80 r-proteínas para a constituição das subunidades de RNA maduro é ainda pouco entendido.



**Figura 1.** Processamento dos genes que compõem o RNA ribossômico da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (acompanhar explicação no item 3.4). Fonte: Modificado de Kressler, et al. 1999.

A figura 1 destaca, de maneira simplificada, as etapas de processamento dos genes do rDNA que são utilizados para a composição do rRNA na levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

A “divisão A” da figura 1 destaca a estrutura de uma unidade de repetição do rDNA. Cada unidade contém um “operon” grande que codifica os 18S, 5.8S, e 25S rRNAs, que é transcrito por uma RNA polimerase I (pr = promotor; tr = terminator; en = enhancer), e um gene rRNA 5S transcrito pela RNA polimerase III. A seqüência contendo os genes 18S, 5,8S e 28S, do rRNA, é transcrita pela RNA polimerase I e são separadas por ITS1 e ITS2 e flanqueadas por um 5’ETS e uma 3’ETS. O gene rRNA 5S está localizado entre os dois espaços não transcritos, NTS1 e NTS2. As caixas pretas representam os rRNAs “maduros”, barras brancas representam os espaços transcritos, e linhas representam os espaços não transcritos. Os locais de processamento também estão indicados.

A “divisão B” da figura 1 destaca os caminhos de processamento do pré-rRNA: O transcrito primário da RNA polimerase é processado em seu 3’terminal para produzir o pré-rRNA 35S, o qual é detectável como um grande pré-rRNA. O pré-rRNA 35S é primeiramente processado nos locais A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, e A<sub>2</sub>, o que resulta na separação dos pre-rRNAs destinados para a pequena e a grande subunidades ribossomais. O pré-rRNA 20S é maturado pela clivagem endonucleolítica no sítio D. O precursor 27SA<sub>2</sub> é processado por dois caminhos alternativos. No caminho principal, aproximadamente 85% do pré-rRNA 27SA<sub>2</sub> é clivado no lugar A<sub>3</sub> e então digerido exonucleoliticamente 5’→3’ no local B<sub>1S</sub>. No caminho secundário, aproximadamente 15% das moléculas 27SA<sub>2</sub> são processadas no local B<sub>1L</sub>. Enquanto o processamento do local B<sub>1L</sub> é completado, o 3’terminal de 25S maduro é gerado pelo processamento no local B<sub>2</sub>. O subsequente processamento de ITS2 de ambas as espécies 27SB parecem ser o mesmo. A clivagem dos locais C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub> libera o rRNA 25S maduro e o pré-rRNA 7S. Este último sofre digestão exonucleolítica 5’→3’ em 3’terminal para gerar rRNA 5.8S maduro. O rRNA de pré-5S é processado em sua região 3’ terminal para gerar o rRNA 5S

maduro. É importante destacar que a metilação da pseudouridina e 2' -*O*-ribose acontecem no transcrito primário, e que, com exceção de Dim1p, uma metiltransferase que atua fazendo uma dimetilação em duas adenosinas adjacentes ao 3' final do rRNA 18S (m<sup>6,2</sup>-A<sub>1779</sub> e m<sup>6,2</sup>-A<sub>1780</sub>), a metilação de bases e o envolvimento de fatores protéicos trans -atuantes ainda não tem sido conhecidos (dados não mostrados na figura).

### 3.5 Evolução dos Genes Nucleares de RNA Ribossômico

Os genes ribossômicos formam grupos, representados por várias cópias de genes; o número elevado de cópias presente nos grupos pode refletir a necessidade dos organismos de sintetizar certos produtos gênicos em grande quantidade. Sob o ponto de vista da evolução, o arranjo dos genes em família foi uma aquisição importante, uma vez que permite uma regulação eficiente dos genes que codificam produtos com funções semelhantes. Foi a partir dessas seqüências repetitivas em eucariotos que se observou que a similaridade entre as seqüências de uma dada espécie é significativamente maior que a observada entre as seqüências de espécies diferentes (NAHUM, 2004).

Segundo Elder-Júnior & Turner (1995, apud NAHUM, 2004), esta explicação estaria em desacordo com o esperado, caso a divergência entre as seqüências de DNA fosse explicada somente por processos de mutação ao acaso e deriva genética. Portanto, as seqüências repetitivas, assim como os membros de famílias multigênicas, não evoluem independentemente. Denominou-se “evolução em concerto” o processo molecular que leva à homogeneidade<sup>4</sup> intra-específica das seqüências de DNA pertencentes a uma dada família.

---

<sup>4</sup> O termo “homogeneidade” usado aqui se refere ao alto grau de similaridade observado entre as seqüências de DNA.

Segundo Nahum (2004), o mecanismo molecular subjacente ao processo de “evolução em concerto” começou a ser decifrado apenas recentemente.

Kumar & Shukla (2005) afirmam que o DNA ribossomal é a maior região conservada no genoma, com capacidade de divergência filogenética. Os genes de rRNA (rRNA18S, rRNA5.8S, rRNA 25/28S e rRNA5S) são seqüências nucleotídicas relativamente conservadas entre fungos. Segundo Beven, et al. (1996), os espaços transcritos internos (ITS), ITS1 e ITS2, são bem menos conservadas do que os restos das subunidades ribossomais, e até mesmo, divergem extensamente entre espécies próximas relacionadas. Estes mesmos autores, analisando a diferença de tamanho dos fragmentos da região ITS1 e ITS2, gerados por PCR, para seis gêneros de fungos, concluíram que a região ITS2 é mais conservada do que ITS1, pois esta última apresentou maior variedade de tamanho entre as espécies testadas do que ITS2 (BEVEN et al. 1996; KUMAR & SHUKLA, 2005).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Modelo de Estudo

Estudo descritivo prospectivo transversal (do tipo detecção de casos) para avaliar a acuidade e a especificidade<sup>5</sup> diagnóstica da PCR na identificação de isolados primários de *Candida*, coletados da mucosa vulvovaginal.

Este trabalho é parte integrante e executora de um dos objetivos do projeto intitulado “Identificação Molecular e Caracterização Molecular dos Agentes Causadores da Candidíase na Cidade de Manaus” (Projeto Candidíase), aprovado no edital do MS/DECIT, e sob responsabilidade da pesquisadora Dra. Adriana Sotero Martins (FIOCRUZ). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Alfredo da Matta (CEP-FUAM), por meio do documento nº 0025/04 de 02/05/05.

### 4.2 Material

#### 4.2.1 Microrganismos

Neste estudo foram usados 106 isolados de *Candida* e um isolado leveduriforme<sup>6</sup> não identificado; todas elas isoladas de amostras vulvovaginais, procedentes de pacientes atendidas em duas Policlínicas da rede pública municipal de saúde em Manaus -AM, a saber:

---

<sup>5</sup> Entende-se por especificidade a capacidade do método em avaliar de forma inequívoca a substância em exame na presença de substâncias que poderiam interferir na sua determinação.

<sup>6</sup> Este isolado leveduriforme não pôde ser identificado pelo kit CandiFast®, mesmo após sucessivas tentativas de purificação das colônias.

“Policlínica Dr. Antônio Comte Telles” (zona leste), e “Policlínica Monte das Oliveiras” (zona oeste). Esses isolados compõem a coleção biológica de *Candida*, do “Projeto Candidíase”, alocadas no acervo da Coleção Microbiológica do Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane, da Fundação Oswaldo Cruz, (CPqLMD-FIOCRUZ).

Todas as leveduras se encontram identificadas. Esta identificação foi feita através da análise bioquímica de assimilação de carboidratos, realizada por meio do kit CandiFast® (International Microbio). As cepas utilizadas se encontram descritas no quadro 1, abaixo.

Alocadas

**Quadro 1.** Cepas de *Candida* utilizadas neste trabalho.

Espécie	Número de registro das cepas
<i>Candida albicans</i> n = 56	PCT-004; PCT-008; PCT-015; PCT-016; PCT-018; PCT-022; PCT-38; PCT-044; PCT-051; PCT-56; PCT-064; PCT-067; PCT-068; PCT-083; PCT-084; PCT-087; PCT-099; PCT-105; PCT-108; PCT-119; PCT-123; PCT-151; PCT-153; PCT-160; PCT-165; PCT-138; PCT-183; PCT-180; PCT-170; PCT-193; PCT-161; PCT-217; PCT-215; PCT-226; PCT-224; PCT-241; PCT-254; PCT-258; PCT-256; PCT-257; PCT-261; PCT-535; PCT-626; PCT-645; PCT-439; PCT-686; PCT-707; PMO-011; PMO-026; PMO-027; PMO-104; PMO-119; PMO-056; PMO-054; PMO-062; PMO-067
<i>Candida glabrata</i> n = 18	PCT-091; PCT-182; PCT-211; PCT-213; PCT-214; PCT-248; PCT-282; PCT-304; PCT-305; PCT-359; PCT-380; PCT-424; PCT-411; PCT-561; PCT-608; PCT-704; PMO-131; PMO-158
<i>Candida tropicalis</i> n = 18	PCT-061; PCT-141; PCT-187; PCT-266; PCT-295; PCT-433; PCT-407; PCT-409; PCT-433; PCT-363; PCT-345; PCT-375; PCT-505; PCT-594; PCT-716; PCT-721; PMO-037; PMO-157
<i>Candida parapsilosis</i> n = 12	PCT-031; PCT-109; PCT-144; PCT-342; PCT-385; PCT-386; PCT-611; PCT-727; PMO-030; PMO-102; PMO-107; PMO-246
<i>Candida krusei</i> n = 2	PCT-214; PCT-740
Saccharomycetales n = 1	PCT-011

PCT: código para "Policlínica Comte Telles"

PMO: código para "Policlínica Monte das Oliveiras"

#### 4.2.2 Equipamentos

- Agitador magnético com aquecimento (QUIMIS ®)
- Autoclave vertical (Marte ®)

- Autoclave vertical (PHOENIX ®)
- Balança digital de precisão (Marte ®)
- Banho Maria (QUIMIS ®)
- Câmara de fluxo laminar (VECO ®)
- Centrífuga de tubos (CELM ®, modelo Combate)
- Congelador (Consul ®, modelo biplex CRD36BRANA)
- Congelador (Eletrolux ®, modelo biplex DFF44 )
- Estação de trabalho para DNA (Loccus Biotecnologia ®)
- Freezer -20°C (Consul ®, modelo CVU24ABANA)
- Incubadora com agitação orbital de bancada CT -712 (CIENTEC ®)
- Incubadora com agitação orbital refrigerada (Shaker) MA83 (MARCONI ®)
- Microcentrífuga (Eppendorf ®, modelo 5417C)
- Microcentrífuga (Eppendorf ®, modelo 5417R)
- Microondas (BRASTEMP ®, modelo DMV38ABHNA)
- Sistema de eletroforese (Fisher Scientific ®)
- Sistema de eletroforese (Loccus Biotecnologia ®)
- Sistema de eletroforese (Pharmacia Biotech ®)
- Sistema de eletroforese (Thermo EC ®)
- Sistema de fotodocumentação (UVP-Biolmaging Systems ®, modelo EpiChemi<sup>3</sup> Darkroom)
- Termociclador (Eppendorf ®)
- Termociclador (Eppendorf ® Gradiente)
- Termociclador (PERKIN ELMER ®, modelo Gene Amp PCR Systems 9700)
- “Vórtex” maxi mix II (Thermolyne ®)

### 4.2.3 Meios de cultura

- **Meio Ágar Sabouraud** (4% glicose; 1% peptona; 1,5% ágar)

- Dextrose	40g
- Peptona	10g
- Ágar	15g
- Água deionizada (q.s.p.)	1000mL

O ágar foi previamente adicionado à água deionizada e aquecido em forno microondas para um derretimento moderado. Em seguida, adicionaram-se os demais ingredientes e o meio foi autoclavado por 15 minutos a 121°C.

Foi frequentemente utilizado meio Agar Sabouraud comercialmente pronto; a preparação deste consistiu apenas na diluição para a concentração desejada em água deionizada, com ligeiro aquecimento em forno de microondas. Após isso, o meio foi autoclavado seguindo-se as mesmas condições descritas no parágrafo anterior.

- **Meio YPD** (1% extrato de levedura; 2% glicose; 2% peptona)

- Extrato de levedura	10g
- Glicose	20g
- Peptona bacteriológica	20g
- Água deionizada (q.s.p.)	1000mL

Os ingredientes foram adicionados à água e, em seguida, autoclavou-se por 15 minutos à 121°C.

#### 4.2.4 Soluções

- Etanol Absoluto
- Etanol 70%
- Solução de brometo de etídeo 10mg/mL
- Solução de fenol saturado (pureza >99,0%)
  
- Solução de carregamento de DNA, ou “solução de load” (Glicerol 30%; Azul de bromofenol 0,025%; Xileno cianol 0,025%)
  - Glicerol 30mL
  - Azul de bromofenol 0,025g
  - Xileno cianol 0,025g
  - Água deionizada (q.s.p.) 100mL
  
- Tampão TE
  - Tris-HCl 1M (pH 7,8) 10mL
  - EDTA 0,5M (pH 8,0) 2mL
  - Água deionizada (q.s.p.) 1000mL
  
- Tampão TAE 50X
  - Tris base 242g
  - Ácido acético glacial 57mL
  - EDTA 1M (pH 8,0) 50mL
  - Água deionizada (q.s.p.) 1000mL

- Tampão TEB 10X
  - Tris base 108g
  - EDTA 0,5M 40mL
  - Ácido bórico 55g
  - Água deionizada (q.s.p.) 1000mL
  
- Solução de Acetato de Amônio 4M
  - Acetato de amônia 3,08g
  - Água deionizada (q.s.p.) 10mL
  
- Solução de RNase-A 10mg/mL
  - RNase-A 20mg/mL 0,5mL
  - Água deionizada (q.s.p.) 1mL
  
- Tampão de Lise (2% Triton X-100; 1% SDS; 100mM NaCl; 10mM Tris-HCl, pH 8,0; 1mM EDTA, pH 8,0)
  - Triton X-100 2mL
  - SDS 1g
  - NaCl 5,8g
  - EDTA 1M (pH 8,0) 1mL
  - Tris-HCl 10mM (pH 8,0) (q.s.p.) 100mL

#### 4.2.5 Enzima de polimerização e outros produtos usados em biologia molecular

- Enzima DNA polimerase (*Taq* DNA Polymerase – Invitrogen)
- Marcador de comprimento molecular de 100p b (Invitrogen)
- Conjunto de dNTP's: dATP; dCTP; dGTP; dTTP (Invitrogen)
- Agarose (Invitrogen e Gibco)

#### 4.2.6 Enzimas de restrição

A tabela 1 apresenta as enzimas de restrição utilizadas neste trabalho, suas origens e regiões de corte.

**Tabela 1.** Enzimas de restrição utilizadas

Enzima	Origem	Região de Corte	Fabricante
<i>Bse</i> YI	<i>Bacillus species</i>	5'...C $\nabla$ CCAGC...3' 3'...GGGTC $\blacktriangle$ G...5'	New England BioLabs <sup>TM</sup>
<i>Bsh</i> FI <sup>7</sup> ( <i>Hae</i> III)	<i>Bacillus sphaericus</i>	5'...GG $\nabla$ CC...3' 3'...CC $\blacktriangle$ GG...5'	Jena Bioscience <sup>TM</sup>

#### 4.2.7 Oligonucleotídeos

As tabelas 2 e 3 apresentam os oligonucleotídeos usados neste trabalho. Todos foram sintetizados e liofilizados pela empresa IDT (IDT, do inglês **I**ntegrated **D**N**A** **T**echnologies, Inc.).

<sup>7</sup> *BshFI* (comercialmente, a enzima que foi adquirida e usada neste projeto) é palíndromo de *Hae III* (enzima inicialmente escolhida); possui a mesma sequência de corte desta última, deixando extremidades abruptas. Portanto: *BshFI* = *Hae III*.

**Tabela 2.** Oligonucleotídeos universais.

Nome	Seqüência 5' → 3'
<i>ITS1</i>	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
<i>ITS2</i>	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
<i>ITS3</i>	GCATCGATGAAGAACGCAGC
<i>ITS4</i>	TCCTCCGCTTATTGATATGC

**Tabela 3.** Oligonucleotídeos espécie-específicos propostos neste trabalho.

Nome	Seqüência 5' → 3'
<i>CaF</i>	TTATCAACTTGTCACACCAG
<i>CaR</i>	TACGTGGTGGACGTTACCG
<i>CtF</i>	TCTTTGGTGGCGGGAGCAAT
<i>CtR</i>	TAAATTGTGGTGGCCACTAG
<i>CgF</i>	TGCGTGGATCTCTATTCC
<i>CgR</i>	AGATTAATAGAGAAGCTTGCGC
<i>CpF</i>	CTTTGGTAGGCCTTCTATATG
<i>CpR</i>	GGAGTTTGTACCAATGAGTG
<i>CkF</i>	CGGAACGAAAACAACAACACCTA
<i>CkR</i>	TTTCAGGCGAGTCGCAGCTC

### 4.3 Métodos

#### 4.3.1 Obtenção de seqüências genômicas do RNA ribossômico de *Candida*

A região nucleotídica ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal das cinco espécies de *Candida* estudadas neste trabalho (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*) foram obtidas de um banco internacional de genes na internet, o NCBI (do inglês National Center for Biotechnology, no seguinte endereço eletrônico: <http://www.ncbi.nih.gov>). As descrições das seqüências adquiridas apresenta m-se listadas abaixo (Quadro 2), junto a seus respectivos números de acesso.

**Quadro 2.** Sequências adquiridas do genbank (NCBI) e seus respectivos números de acesso.

<b>Organismo</b>	<b>Descrição das seqüências</b>	<b>No. de acesso</b>
<i>C. albicans</i> Cepa SC5314	gene 18S do rRNA, seqüência completa; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; gene 28S do rRNA, seqüência completa	NW139715
<i>C. albicans</i> Cepa ATCC 10231	gene 18S do rRNA, seqüência parcial; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completa; e gene 28S do rRNA, seqüência parcial	AY939786
<i>C. albicans</i> Cepa YNCY12-270505	gene 18S do rRNA, seqüência parcial; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completa; e gene 28S do rRNA, seqüência parcial	DQ231536
<i>C. albicans</i> Cepa YNCY11-270505	gene 18S do rRNA, seqüência completa; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; gene 28S do rRNA, seqüência parcial	DQ231535
<i>C. albicans</i> Cepa YNCY10-270505	gene 18S do rRNA, seqüência completa; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; gene 28S do rRNA, seqüência parcial	DQ231534
<i>C. albicans</i> Cepa YNCY8-270505	gene 18S do rRNA, seqüência completa; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; gene 28S do rRNA, seqüência parcial	DQ231532
<i>C. albicans</i> Cepa YNCY7-270505	gene 18S do rRNA, seqüência completa; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; gene 28S do rRNA, seqüência parcial	DQ231531
<i>C. albicans</i> Cepa YNCY6-270505	gene 18S do rRNA, seqüência completa; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; gene 28S do rRNA, seqüência parcial	DQ231530
<i>C. albicans</i> Cepa YNCY5-270505	gene 18S do rRNA, seqüência completa; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; gene 28S do rRNA, seqüência parcial	DQ231529
<i>C. albicans</i> Cepa YNCY3-270505	gene 18S do rRNA, seqüência completa; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; gene 28S do rRNA, seqüência parcial	DQ231527
<i>C. albicans</i> Cepa YNCY1-270505	gene 18S do rRNA, seqüência completa; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; gene 28S do rRNA, seqüência parcial	DQ231525
<i>C. albicans</i> Cepa VA 115839-03	gene 18S do rRNA, seqüência completa; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; gene 28S do rRNA, seqüência parcial	AY939807
<i>C. albicans</i> Cepa VA 115470-03	gene 18S do rRNA, seqüência completa; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; gene 28S do rRNA, seqüência parcial	AY939791
<i>C. albicans</i> Cepa ST 3477-03	gene 18S do rRNA, seqüência completa; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; gene 28S do rRNA, seqüência parcial	AY939789
<i>C. albicans</i> Cepa 290499/58	gene 18S do rRNA, seqüência completa; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; gene 28S do rRNA, seqüência parcial	AY672930
<i>C. albicans</i> Cepa wb175	gene 18S do rRNA, seqüência completa; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; gene 28S do rRNA, seqüência parcial	AF455531
<i>C. albicans</i> Cepa wb199	gene 18S do rRNA, seqüência completa; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; gene 28S do rRNA, seqüência parcial	AF455524
<i>C. albicans</i> Cepa wb304	gene 18S do rRNA, seqüência completa; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; gene 28S do rRNA, seqüência parcial	AF455483

<i>C. albicans</i> Cepa wb322	gene 18S do rRNA, seqüência completa; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; gene 28S do rRNA, seqüência parcial	AF455476
<i>C. albicans</i> Cepa wb378	gene 18S do rRNA, seqüência completa; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; gene 28S do rRNA, seqüência parcial	AF455457
<i>C. albicans</i> Cepa wb454	gene 18S do rRNA, seqüência completa; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; gene 28S do rRNA, seqüência parcial	AF455428
<i>C. albicans</i> var. <i>Stellatoidea</i>	gene 18S do rRNA, seqüência parcial; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; e gene 28S do rRNA, seqüência parcial	AJ853768
<i>C. glabrata</i> Cepa ATCC 90030	gene 18S do rRNA, seqüência parcial; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; e gene 28S do rRNA, seqüência parcial	AY939793
<i>C. glabrata</i> Cepa CBS 138	gene 18S do rRNA, seqüência completa; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; e gene 28S do rRNA, seqüência parcial	AY198398
<i>C. tropicalis</i> Cepa ATCC 750	gene 18S do rRNA, seqüência parcial; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; e gene 28S do rRNA, seqüência parcial	AY939810
<i>C. tropicalis</i> Cepa 36-28B	gene 18S do rRNA, seqüência parcial; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; e gene 28S do rRNA, seqüência parcial	DQ680841
<i>C. tropicalis</i> Cepa Yf 12c	gene 18S do rRNA, seqüência parcial; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; e gene 28S do rRNA, seqüência parcial	DQ666193
<i>C. tropicalis</i> Cepa MB2	gene 18S do rRNA, seqüência parcial; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; e gene 28S do rRNA, seqüência parcial	DQ666190
<i>C. tropicalis</i> Cepa MA6	gene 18S do rRNA, seqüência parcial; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; e gene 28S do rRNA, seqüência parcial	DQ666188
<i>C. tropicalis</i> Cepa UR 9344-03	gene 18S do rRNA, seqüência parcial; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; e gene 28S do rRNA, seqüência parcial	AY939801
<i>C. parapsilosis</i> Cepa VA 115230-03	gene 18S do rRNA, seqüência parcial; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; e gene 28S do rRNA, seqüência parcial	AY939803
<i>C. parapsilosis</i> Cepa DMC	gene 18S do rRNA, seqüência parcial; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; e gene 28S do rRNA, seqüência parcial	DQ683009
<i>C. parapsilosis</i> Cepa DMb	gene 18S do rRNA, seqüência parcial; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; e gene 28S do rRNA, seqüência parcial	DQ668350
<i>C. parapsilosis</i> Cepa ATCC 22019	gene 18S do rRNA, seqüência parcial; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; e gene 28S do rRNA, seqüência parcial	AY939798
<i>C. parapsilosis</i> Cepa CBS 604	gene 18S do rRNA, seqüência parcial; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; e gene 28S do rRNA, seqüência parcial	AY391843
<i>C. parapsilosis</i> Cepa wb176	gene 18S do rRNA, seqüência parcial; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; e gene 28S do rRNA, seqüência parcial	AF455530
<i>C. parapsilosis</i> Cepa wb235	gene 18S do rRNA, seqüência parcial; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; e gene 28S do rRNA, seqüência parcial	AF455514

<i>C. parapsilosis</i> Cepa wb271	gene 18S do rRNA, seqüência parcial; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; e gene 28S do rRNA, seqüência parcial	AF455500
<i>C. parapsilosis</i> Cepa wb295	gene 18S do rRNA, seqüência parcial; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; e gene 28S do rRNA, seqüência parcial	AF455488
<i>C. parapsilosis</i> Cepa wb437	gene 18S do rRNA, seqüência parcial; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; e gene 28S do rRNA, seqüência parcial	AF455433
<i>C. parapsilosis</i> Cepa ATCC 90018	gene 18S do rRNA, seqüência parcial; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; e gene 28S do rRNA, seqüência parcial	AJ585347
<i>Issatchenkia orientalis</i> <sup>8</sup> (anamorfo: <i>C.krusei</i> ) Cepa ATCC 24210	gene 18S do rRNA, seqüência parcial; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; e gene 28S do rRNA, seqüência parcial	AY939808
<i>Issatchenkia orientalis</i> <sup>9</sup> (anamorfo: <i>C.krusei</i> ) ST 3382-03	gene 18S do rRNA, seqüência parcial; espaço transcrito interno 1, gene 5.8S do rRNA e espaço transcrito interno 2, seqüências completas; e gene 28S do rRNA, seqüência parcial	AY939796

#### 4.3.2 Depuração da região ITS1-5.8S-ITS2

As seqüências de rDNA, obtidas no NCBI, foram inseridas no programa computacional BioEdit 7.0. Este programa contém um pacote operacional com funções diversificadas para manipulação de seqüências nucleotídicas, além compilar vários outros softwares que operam por meio de sua interface.

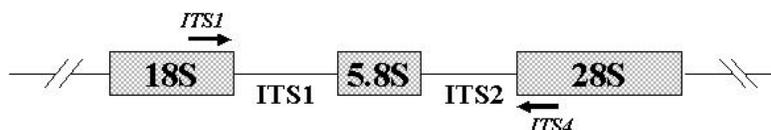
No BioEdit, as seqüências brutas de rDNA inseridas tiveram destacadas a região nucleotídica ITS1-5.8S-ITS2, delimitada inteiramente pelos oligonucleotídeos universais *ITS1* “senso”<sup>10</sup> e *ITS4* “anti-senso”<sup>11</sup>. Os fragmentos depurados incluíram as próprias regiões de hibridização destes oligonucleotídeos. O procedimento consistiu no alinhamento da seqüência dos oligonucleotídeos com suas respectivas regiões complementares, utilizando -se para isto o

<sup>8, 9</sup> *Issatchenkia orientalis* é a forma sexuada de *C. krusei* (fungo anamórfico). Foi com esta descrição que se encontrou as poucas seqüências ITS1-5.8S-ITS2 para *C. krusei*, no genbank.

<sup>10, 11</sup> Os termos “senso” e “anti-senso”, usados neste trabalho, referem-se, respectivamente, aos sentidos de direção 5'→3' e 3'→5' das seqüências de DNA adquiridas no banco de genes e usadas como referencial para essa designação.

aplicativo “Clustal W”, software para alinhamentos de múltiplas seqüências, constante do pacote operacional do BioEdit versão 7.0.

Ao término dos procedimentos mencionados acima, todas as seqüências ITS1-5.8S-ITS2 depuradas continham exatos 30 pares de bases finais do gene rRNA 18S (segmento onde ocorre a hibridização do oligonucleotídeo *ITS1*), e que antecede à região ITS1, e exatos 59 pares de bases iniciais do gene rRNA 28S (segmento onde ocorre a hibridização do oligonucleotídeo *ITS4*), posterior à região ITS2. O gene 5.8S se encontra entre os dois espaços transcritos internos, ITS1 e ITS2 (ver figura 2).



**Figura 2.** Modelo esquematizando o isolamento da região ITS1-5.8S-ITS2 pelos iniciadores de oligonucleotídeos universais *ITS1* e *ITS4*. As regiões de hibridização destes oligonucleotídeos envolvem trechos dos genes rRNA 18S e rRNA 28S, respectivamente.

#### 4.3.3 Alinhamento computacional dos segmentos nucleotídicos ITS1 -5.8S-ITS2

Após depuração da região ITS1-5.8S-ITS2 das espécies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (descrito na seção anterior), estas seqüências foram organizadas separadamente em grupos (“arquivos”), cada qual pertencente à sua respectiva espécie.

Em cada grupo de seqüências foi realizado um múltiplo alinhamento, por meio do “Clustal W” (BioEdit 7.0). Esse alinhamento objetivou analisar a similaridade entre as

seqüências oriundas de uma mesma espécie e avaliar a representabilidade<sup>12</sup> e uso de quaisquer delas para o desenvolvimento de marcadores genéticos, capazes de caracterizar/identificar uma dada espécie de *Candida*. Essa análise de similaridade das seqüências foi feita por meio de uma “matriz de identidade de seqüências”, função esta oferecida pelo programa Bioedit 7.0. O múltiplo alinhamento das seqüências é um critério previamente exigido pelo programa para a montagem da matriz.

Após a realização dos procedimentos descritos acima, foram escolhidas e separadas cinco seqüências ITS1-5.8S-ITS2: NW139715 (*C. albicans*), AY939793 (*C. glabrata*), AY939810 (*C. tropicalis*), AY939803 (*C. parapsilosis*), e AY939808 (*C. krusei*). Foi feita uma matriz de similaridade para essas seqüências. No critério de seleção das seqüências, foi dado privilégio para seqüências oriundas de cepas ATCC (do inglês American Type Culture Collection) conhecidas como “cepas padrão”.

Estas cinco seqüências foram usadas como subsídios para a análise e desenvolvimento de marcadores moleculares (oligonucleotídeos e sítios de restrição) espécie-específicos.

#### 4.3.4 Desenho de iniciadores de oligonucleotídeos espécie-específicos

As cinco seqüências ITS1-5.8S-ITS2, cada qual, representativa para uma espécie de *Candida*, foram alinhadas no “Clustal W” (BioEdit 7.0). Este procedimento foi realizado para a observação de regiões “não consenso” em cada uma delas; ou seja, trechos de nucleotídeos

---

<sup>12</sup> Se uma dada seqüência genômica (a qual serve como sítio para hibridização de oligonucleotídeo) ocorre em uma cepa de uma dada espécie, a ocorrência dela em todas as demais cepas da mesma espécie (ou, pelo menos, na maior parte das cepas de uma dada espécie) é tida como representativa. Esta representatividade ganha significância se as cepas forem provenientes de lugares geográficos distantes e entre si.

únicos que só existem para uma dada sequência ITS1-5.8S-ITS2, não encontrando similaridade com as demais.

Depois de identificadas, as regiões “não consenso” de cada uma das seqüências foram analisadas objetivando-se a retirada de trechos nucleotídicos representativos, possíveis de serem usados para o desenho de iniciadores de oligonucleotídeos espécie-específicos. De cada uma das cinco seqüências ITS1-5.8S-ITS2, das diferentes espécies de *Candida*, foram retirados/copiados um ou alguns trechos “não consenso”.

A partir dessas seqüências “não consenso”, foi feito o desenho de diversos iniciadores de oligonucleotídeos (“senso” e “antisenso”), obedecendo determinados critérios; a saber:

- (i) Tamanho do oligonucleotídeo compreendido entre um mínimo 18 e um máximo de 25 pares de base (pb).
- (ii) Temperatura de anelamento ( $T_m$ ) entre 50° e 62°C. Para a determinação da  $T_m$ , foi usada a fórmula empírica proposta por Wu, et al. (1991), descrita da seguinte maneira:  
$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 2AT + 4GC.$$
- (iii) % de nucleotídeos GC entre 40% e 60%.

Cada oligonucleotídeo espécie-específico proposto, elaborado para uma espécie de *Candida*, teve sua seqüência alinhada (“Clustal W”) à região ITS1-5.8S-ITS2 das outras quatro espécies. Esses alinhamentos serviram para testar a similaridade dos oligonucleotídeos com as referidas seqüências, ou melhor, as chances de hibridização destes oligonucleotídeos com prováveis regiões alvo, existentes nas seqüências ITS1-5.8S-ITS2 das outras espécies (obviamente, existe similaridade de 100% dos oligonucleotídeos com trechos da seqüência ITS1-5.8S-ITS2 da qual foram retirados).

Dentre todos os oligonucleotídeos testados (elaborados inicialmente de acordo com três critérios básicos, descritos acima), foi dado privilégio à seleção dos que:

- (i) Apresentassem a menor percentagem (%) de pareamento de bases com a região ITS1-5.8S-ITS2 das outras espécies; usou-se o critério de um máximo de 60% da extensão íntegra, sem “gaps” (do inglês Gaps: lacunas, intervalos, espaços vazios), do oligonucleotídeo fazendo pontes de hidrogênio com a seqüência molde testada.
- (ii) Diferença de temperatura de anelamento não maior do que 4°C entre os oligonucleotídeos que compõem cada par (senso e anti-senso).
- (iii) Pudessem conter, quando as condições de representatividade assim o permitissem, de um valor de energia livre para formação de duplex ( $\Delta G$ ) maior do que  $-8,0$  Kcal/mol. O método utilizado para o cálculo de  $\Delta G$  é descrito por Ryclick (1993), e é uma simplificação do método de Breslauer, et al (1986).
- (iv) Propiciassem, junto a seu respectivo par (senso/anti-senso), a geração de fragmentos nucleotídicos (amplicons) de comprimento  $\geq 200$ pb, possíveis de serem observados em géis de agarose corados com brometo de etídeo.
- (v) Gerassem, quando possível, amplicon com tamanho característico para cada espécie, possíveis de serem diferenciados das demais quando visualizados em gel de agarose corado com brometo de etídeo.

Observados os critérios de inclusão e exclusão, foi selecionado, para cada espécie de *Candida*, um único par de oligonucleotídeos que reunisse as melhores condições propostas para a identificação molecular destas leveduras.

#### 4.3.5 Análise de sítios de restrição

Para todas as cinco seqüências ITS1-5.8S-ITS2, cada uma originária de uma espécie de *Candida*, foi gerado, por meio do programa BioEdit 7.0, um mapa de restrição. Neste

procedimento não houve (e nem deve ser feito) alinhamento das seqüências, uma vez que a análise de sítios de restrição se dá sobre a própria estrutura nucleotídica primária das seqüências.

Os critérios selecionados/usados nas opções oferecidas pelo programa para a geração do mapa de restrição em cada uma das seqüências foram:

(i) Utilizar todas as enzimas de restrição atualmente conhecidas (todas elas se encontram disponíveis no banco de dados do BioEdit 7.0) com reconhecimento de corte para quatro (4), cinco (5), seis (6) e acima de seis (>6) pares de bases, mostrando também seus respectivos isosquisômeros.

(ii) Utilizar todas as enzimas de restrição com sítios de reconhecimento d egerado atualmente conhecidas (todas elas se encontram disponíveis no banco de dados do BioEdit 7.0).

(iii) Mostrar a freqüência e a posição numérica de corte das enzimas que possuem sítios de restrição em cada uma das cinco seqüências ITS1 -5.8S-ITS2 analisada.

Após a geração dos mapas de restrição, foram observadas e selecionadas as enzimas que satisfizessem os seguintes critérios:

(i) Enzimas com ocorrência(s) de corte(s) localizado(s) exclusivamente para a seqüência ITS1-5.8S-ITS2 de cada uma das cinco espécies de *Candida* (sítios de restrição intra-específicos ou homotípicos<sup>13</sup>); e com fragmentos possíveis de serem visualizados em géis de agarose ou poliacrilamida.

---

<sup>13</sup> O termo “intra-específico” ou “homotípico”, usado neste trabalho, refere-se ao(s) sítio(s) de restrição existente(s) na região ITS1-5.8S-ITS2 de uma única espécie de *Candida* em relação a um grupo total de cinco, e

(ii) Enzima(s) de ocorrência comum, porém com sítios localizados em posições distintas dentro da região ITS1-5.8S-ITS2 para, no mínimo, três das cinco espécies de *Candida* (sítios de restrição interespecíficos ou heterotípicos<sup>14</sup>); e com fragmentos possíveis de serem visualizados em géis de agarose ou poliacrilamida.

#### 4.3.6 Extração de DNA cromossomal

A extração do DNA cromossomal das cepas de *Candida* seguiu o protocolo para isolamento rápido de DNA cromossomal de leveduras, descrito por Ausubel et al. (1994).

Uma suspensão de 10mL de células crescidas em meio YPD, incubada com agitação de 200rpm durante 16 horas à 29°C, foi centrifugada a 5000 x g por 5 minutos à 25 °C. Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 5mL de água destilada estéril. Repetiu-se a centrifugação nas mesmas condições e desprezou-se o sobrenadante. O sedimento foi ressuspenso em 500µL de água destilada estéril e transferido para microtubo. A suspensão foi centrifugada a 20800 x g por 5 minutos à 25 °C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200µL de tampão de lise (descrito no item 4.2.4). Adicionou-se à suspensão 0,3 gramas de pérolas de vidro, de 0,5mm de diâmetro, (aproximadamente 200µL de volume) previamente tratadas com ácido nítrico, e a seguir 200 µL de solução contendo fenol, clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 25:24:1. A mistura foi agitada mecanicamente em um agitador de tubos (vórtex) por 3 minutos, em

---

que têm em comum o fato de serem, estas, as espécies de um mesmo gênero rotineiramente isoladas da mucosa vulvovaginal.

<sup>14</sup> O termo “interespecífico” ou “heterotípico”, usado neste trabalho, refere-se ao(s) sítio(s) de restrição, existente na região ITS1-5.8S-ITS2, comuns a diferentes espécies de *Candia* (neste trabalho, para um mínimo de três e máximo de cinco espécies).

potência máxima. A seguir foi adicionado 200µL de solução TE às amostras e a mistura foi homogeneizada. O tubo foi centrifugado a 20800 x g por 5 minutos à 25°C e a fase aquosa foi transferida para um outro microtubo. Adicionou-se 1mL de etanol absoluto gelado (-20°C), homogeneizou-se a mistura manualmente, incubou-se por no mínimo 5 minutos à 25°C ou a -20°C e a seguir o tubo foi centrifugado à 20800 x g por no mínimo 3 minutos à 25°C. Após descarte do sobrenadante, o precipitado recebeu 1mL de etanol a 70% e foi, a seguir, centrifugado nas mesmas condições. Descartou-se o sobrenadante e ao precipitado adicionou-se 400µL de solução TE. A mistura foi completamente dissolvida e a seguir adicionou-se 3µL de uma solução de 10mg/mL de RNase A. O tubo foi incubado por 5 minutos à 37°C. Posteriormente, adicionou-se 10µL de solução de acetato de amônio 4 M e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado (-20°C). A mistura foi homogeneizada manualmente, incubada por, no mínimo, 5 minutos à 25°C ou a -20°C e a seguir, centrifugada a 20800 x g por no mínimo 3 minutos à 25°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado recebeu 500µL de etanol a 70%, repetindo-se a centrifugação nas mesmas condições. Descartou-se o sobrenadante e esperou-se que o precipitado ficasse seco para então ressuspendê-lo em 100µL água deionizada autoclavada e estocá-lo a -20°C.

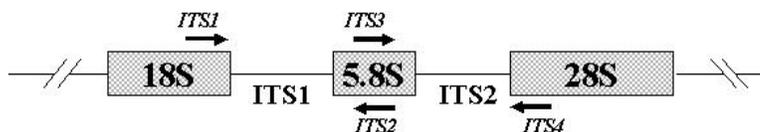
#### **4.3.6.1 Quantificação e pureza do DNA**

As concentrações e purezas de DNA foram estimadas através de análise espectrofotométrica em comprimento de onda ultravioleta ( $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ ), como preconizado por Sambrook, et al. (1989). A leitura espectrofotométrica em 260nm foi usada para determinar a concentração de DNA (1OD = 50µg de DNA dupla fita/µL), enquanto a razão entre as absorvâncias de 260nm e 280nm foi usada para avaliar a pureza do ácido nucléico.

Foram utilizadas extrações de DNA que apresentaram um grau de pureza igual ou maior a 1,6 e igual ou menor a 1,8.

#### 4.3.7 Identificação com uso de iniciadores de oligonucleotídeos universais

Os oligonucleotídeos universais para fungos *ITS1*, *ITS2*, *ITS3* e *ITS4* foram usados, na PCR, para análise de polimorfismos de tamanho de fragmentos da região ITS1 -5.8S-ITS2 das cinco espécies de *Candida* descritas neste trabalho. A figura 3 destaca os locais de hibridização de cada um dos iniciadores de oligonucleotídeos.



**Figura 3.** Local de hibridização, no rDNA, de cada um dos quatro oligonucleotídeos universais (*ITS1*, *ITS2*, *ITS3*, e *ITS4*).

Pela figura acima, é possível entender que o conjunto desses oligonucleotídeos é capaz de amplificar três fragmentos, são eles: a região ITS1-5.8S-ITS2, por meio dos oligonucleotídeos *ITS1* e *ITS4*; a região ITS1, por meio dos oligonucleotídeos *ITS1* e *ITS2*; e a região ITS2, por meio dos oligonucleotídeos *ITS3* e *ITS4*.

Para a utilização dos quatro oligonucleotídeos em um único tubo de reação, foi desenvolvida uma estratégia que envolveu a junção de um “ Multiplex PCR” com um “Hot Start PCR”, seguido de dois “steps” (do inglês Step: passo; etapa) de hibridização, ou seja, utilização de duas temperaturas de anelamento durante o processo de termociclagem. Esta estratégia inédita (não se encontra descrita na literatura) objetivou a amplificação de todos os

fragmentos (amplicons) possíveis de serem gerados pelo uso em conjunto desses oligonucleotídeos em um único sistema reacional.

Nas reações de PCR foram utilizadas 19 cepas de *C. albicans* (PCT-004; PCT-008; PCT-015; PCT-016; PCT-018; PCT-022; PCT-044; PCT-051; PCT-064; PCT-067; PCT-087; PCT-153; PCT-183; PCT-180; PCT-217; PCT-254; PCT-257; PCT-535; PCT-626); 11 cepas de *C. glabrata* (PCT-091; PCT-182; PCT-211; PCT-213; PCT-248; PCT-282; PCT-304; PCT-305; PCT-359; PCT-380; PCT-424); 9 cepas de *C. tropicalis* (PCT-061; PCT-141; PCT-187; PCT-266; PCT-407; PCT-409; PCT-345; PCT-375; PCT-505); 5 cepas de *C. parapsilosis* (PCT-031; PCT-109; PCT-144; PCT-386; PCT-611); e 1 cepa de *C. krusei* (PCT-740).

As concentrações dos reagentes empregados e seus respectivos volumes reacionais se encontram descritos no quadro 3, abaixo.

**Quadro 3.** Concentrações e respectivos valores usados na PCR dos iniciadores de oligonucleotídeos universais. [ ] = concentração.

Reagente [ ] do estoque	[ ] final do tubo da reação	Volume do tubo da reação (uL)
Buffer 10X	1X	2μL
dNTP mix 10mM	0,15mM	0,3μL
MgCl <sub>2</sub> 50mM	1,8mM	0,72μL
<i>ITS1</i> “senso” 20μM	10 pmoles	0,5μL
<i>ITS2</i> “anti-senso” 20μM	10 pmoles	0,5μL
<i>ITS3</i> “senso” 20μM	10 pmoles	0,5μL
<i>ITS4</i> “anti-senso” 20μM	10 pmoles	0,5μL
Taq DNA Pol. 5U/μL*	2,5 U	0,5μL
DNA template	~	2μL
	H <sub>2</sub> O (q.s.p.)	12,48μL
	TOTAL	20μL

\* Veja nota sobre DNA polimerase no Quadro 4 .

Ao término da desnaturação inicial à 94°C, a máquina foi programada para pausar, mantendo a mesma temperatura (94°C), para a adição da enzima DNA polimerase. As condições de termociclagem obedeceram à seguinte programação (quadro 4).

**Quadro 4.** Condições de termociclagem da PCR utilizando os quatro iniciadores de oligonucleotídeos universais: “Multiplex PCR” + “Hot Start PCR” + “Duas temperaturas de anelamento.”

Ciclos	Temperatura °C	Tempo	Repetições
Desnaturação inicial	94°C	4 min	1x
Pausa (Taq DNA Pol.)*	94°C	-	-
Desnaturação	94°C	1 min	30x
1º Anelamento	52°C	45 seg	
2º Anelamento	48°C	45 seg	
Extensão	72°C	1 min	
Extensão final	72°C	10 min	1x
	4°C	∞	-

\* A DNA polimerase foi adicionada manualmente, com auxílio de uma micropipeta, em todos os microtubos após a etapa de desnaturação inicial (quando o termociclador foi pausado à 94°C), até que esta operação se completasse (“Hot Start” manual).

Como controle positivo, cada um dos três fragmentos foi amplificado separadamente por três pares de oligonucleotídeos universais (*ITS1//ITS4*; *ITS1//ITS2*; e *ITS3//ITS4*), resultados da combinação dos mesmos. As reações de PCR foram realizadas em microtubos com capacidade para 200µL; o volume da reação foi de 20µL. As concentrações dos reagentes utilizados foram: tampão para PCR 1X; dNTPmix 0,1mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5mM; 10 pmoles de cada um dos oligonucleotídeo que compunham o par; Taq DNA Polymerase (Invitrogen) 1,5U; 2µL de amostra de DNA genômico (concentração de DNA na amostra entre 10ng a 100ng); rever método de extração na seção 3.3.6. As condições de termociclagem foram: um ciclo de 94°C por 4 min; 30 ciclos, cada, de 94°C por 30seg, 55°C por 30 seg e 72°C por um minuto; um ciclo de 72°C por 10min; e 4°C ∞.

#### 4.3.8 Identificação com uso de oligonucleotídeos espécie -específicos

Os cinco pares de oligonucleotídeos espécie -específicos propostos (ver seção 3.3.4) foram usados para a confirmação da identificação de todas as 10 6 cepas de *Candida* (ver seção 3.2.2), bem como para a análise do isolado PCT -011. O método usado foi a reação em cadeia da polimerase, PCR.

As condições experimentais estabelecidas para a análise empírica da funcionalidade e representatividade de cada par de oligonucleotídeo na identificação de suas respectivas espécies foram as seguintes:

- (i) Reação de PCR das cepas<sup>15</sup> de cada uma das cinco espécies de *Candida* com seu respectivo par de oligonucleotídeos espécie -específicos.
- (ii) Reação de PCR das cepas de cada uma das cinco espécies de *Candida* com oligonucleotídeos não-específicos para sua identificação (ou seja, os quatro pares de oligonucleotídeos espécie -específicos referentes a identificação das demais espécies de *Candida* associadas à mucosa vulvovaginal)<sup>16</sup>.

##### 4.3.8.1 PCR

Para que todos os cinco pares de oligonucleotídeos pudessem ser usados em uma mesma condição de termociclagem foi averiguada a possibilidade de uso de uma única temperatura de anelamento ( $T_m$ ). Esta temperatura foi avaliada empiricamente com o uso de um termociclador Eppendorf com função “gradiente” (função em que cada uma das doze

---

<sup>15</sup> O termo “reação de PCR das cepas” significa que foi realizado PCR com as amostras de DNA genômico extraído de cada uma das cepas.

<sup>16</sup> Esta etapa serviu como um indicador de especificidade dos oligonucleotídeos espécie -específicos utilizados para identificação das espécies de *Candida* encontradas em amostras vulvovaginais.

colunas de seu termobloco pode gerar e manter uma temperatura própria, independente das demais).

Nesse equipamento, foi inserida uma temperatura central de 57°C para uma função gradiente de  $G = \pm 10$ , ou seja, o termociclador distribuiu entre as doze colunas do termo bloco um espectro de temperatura correspondente a 10°C acima e 10°C abaixo da temperatura central de 57°C, inserida. A temperatura calculada, pelo termociclador, para cada uma das colunas se encontra descrita no quadro 5, abaixo.

**Quadro 5.** Valores de temperatura (em °C) para cada uma das doze colunas, baseados no cálculo, pelo termociclador, da função gradiente de  $G = \pm 10$  para uma temperatura central de 57°C.

Coluna	Temperatura °C	Coluna	Temperatura °C	Coluna	Temperatura °C
1	47,0	5	52,5	9	63,0
2	47,3	6	55,1	10	65,1
3	48,4	7	57,8	11	66,7
4	50,2	8	60,5	12	67,5

Utilizando-se da função “gradiente”, foram testadas doze amostras (distribuídas respectivamente entre as colunas 1 e 12) para cada par de oligonucleotídeos espécie-específicos; cada par condizente à amplificação de suas respectivas amostras de DNA. As reações de PCR foram realizadas em microtubos com capacidade para 200µL; o volume da reação foi de 20µL. As concentrações dos reagentes utilizados foram: tampão 1X; dNTP mix 0,18mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5mM; “iniciador senso” (*CaF*, *CgF*, *CtF*, *CpF* ou *CkF*) 10pmoles; “iniciador anti-senso” (*CaR*, *CgR*, *CtR*, *CpR* ou *CkR*) 10pmoles; Taq DNA Polymerase (Invitrogen) 1,5U; 2µL de amostra de DNA genômico (ver método de extração na seção 4.3.6). As condições de termociclagem foram: um ciclo de 94°C por 4 min; 30 ciclos, cada, de 94°C por 30 seg, 57°C com  $G = \pm 10$  por 30 seg e 72°C por um minuto; um ciclo de 72°C por 10min; e 4°C ∞.

Após a termociclagem, as amostras de PCR foram aplicadas em gel de agarose 2%, contendo brometo de etídeo 0,5µg/mL, e submetidas a voltagem de 4,0V/cm por aproximadamente 1 hora. O gel foi visualizado em um transiluminador por emissão de luz UVA, UVB e UVC (260nm, 270nm e 280nm, respectivamente), e fotografado através do sistema de fotodocumentação deste aparelho.

Os pares de oligonucleotídeos foram testados, por PCR, de acordo com o roteiro descrito na seção 4.3.8. As reações ocorreram em microtubos com capacidade para 200µL; o volume da reação foi de 20µL. As concentrações dos reagentes foram as mesmas descritas anteriormente para a PCR “gradiente”, entretanto, agora com uso de uma temperatura única de anelamento para todos os oligonucleotídeos. O quadro 6, abaixo, descreve em detalhes as concentrações dos reagentes empregados e seus respectivos volumes reacionais.

**Quadro 6.** Concentrações e respectivos volumes usados na PCR dos iniciadores de oligonucleotídeos espécie-específicos. [ ] = concentração.

Reagente [ ] do estoque	[ ] final do tubo da reação	Volume do tubo da reação (µL)
Tampão PCR 10X	1X	2µL
dNTP mix 10mM	0.1mM	0,2µL
MgCl <sub>2</sub> 50mM	1,5mM	0,6µL
<i>Iniciador senso</i> * 20µM	10 pmoles	0,5µL
<i>Iniciador anti-senso</i> ** 20µM	10 pmoles	0,5µL
Taq DNA Pol. 5U/µL	1,5 U	0,3µL
DNA template	~	2µL
	H <sub>2</sub> O (q.s.p.)	13,8µL
	TOTAL	20µL

\* Iniciador senso é referente aos oligonucleotídeos de direção 5' → 3' da seqüência adquirida no banco de genes, ou seja: *CaF*, ou *CgF*, ou *CtF*, ou *CpF*, ou *CkF*

\*\* Iniciador anti-senso é referente aos oligonucleotídeos de direção 3' → 5' da seqüência adquirida no banco de genes, ou seja: *CaR*, ou *CgR*, ou *CtR*, ou *CpR*, ou *CkR*

As condições de termociclagem seguiram a programação descrita no quadro seguinte.

**Quadro 7.** Condições de termociclagem para a amplificação de fragmentos gerados pelos primers de oligonucleotídeos espécie-específicos.

Ciclos	Temperatura °C	Tempo	Repetições
Desnaturação inicial	94°C	4 min	1x
Desnaturação	94°C	30 seg	30x
Anelamento	52°C	30 seg	
Extensão	72°C	1 min	
Extensão final	72°C	10 min	1x
	4°C	∞	-

#### 4.3.8.2 PCR de colônia

Para a análise da viabilidade de uma PCR diretamente a partir de colônias de *Candida*, foram utilizadas duas técnicas descritas, respectivamente, nos dois parágrafos abaixo. Para este experimento foram utilizadas 23 cepas de *Candida*, sendo: seis cepas de *C. albicans* (PCT-38, PCT-56, PCT-105, PCT-535, PMO-026, e PMO-011), cinco cepas de *C. glabrata* (PCT-214, PCT-380, PCT-599, PMO-131, e PMO-158), cinco cepas de *C. tropicalis* (PCT-721, PCT-716, PCT-433, PMO-037, e PMO-157), cinco cepas de *C. parapsilosis* (PCT-727, PCT-342, PCT-109, PMO-107, e PMO-246), e duas cepas de *C. krusei* (PCT-275 e PCT-740). As concentrações e volumes dos reagentes utilizados na PCR dessas cepas, bem como as condições de termociclagem, encontram-se descritas respectivamente nos quadros 6 e 7, citados anteriormente.

Na primeira técnica, descrita por Martin et al. (2000), para isolamento rápido de DNA genômico de leveduras, uma colônia (cultura de 24h) de aproximadamente 1mm de diâmetro foi resuspensa, com auxílio de uma micropipeta, em 100µL de uma solução de lise (EDTA 0,1M; NaOH 0,1M), contida em um microtubo do tipo “Eppendorf” com capacidade para 200µL. Esta solução foi agitada em um vórtex por 2-3 minutos; em seguida, 5 µL foi usado diretamente na PCR dos oligonucleotídeos espécie-específicos. Foram realizadas três rodadas de experimento, cada rodada utilizou o total de 23 cepas de *Candida*, com os produtos de

PCR de cada rodada sendo visualizados em um gel de agarose a 2%. Uma modificação foi realizada nesta técnica onde, resuspendeu-se a colônia em 20 $\mu$ L de tampão de lise (ao invés de 100 $\mu$ L) e, utilizou-se 2 $\mu$ L de amostra para a PCR (ao invés de 5 $\mu$ L). Nesta adaptação, foram realizadas quatro rodadas de experimento, cada rodada utilizou o total de 23 cepas de *Candida*, com os produtos de PCR de cada rodada sendo visualizados em um gel de agarose a 2%.

A segunda técnica foi adaptada dos procedimentos descrito por Freschi, et al. (2005), para isolamento rápido de DNA genômico de *Salmonella*. Uma colônia (cultura de 24h) de aproximadamente 1mm de diâmetro foi resuspensa, com auxílio de uma micropipeta, em 20 $\mu$ L de água deionizada autoclavada, contida em um microtubo do “tipo Ependorf” com capacidade para 200 $\mu$ L. A seguir, as amostras foram aquecidas em “banho seco” por um período de 15 minutos à 98°C. Após esse período, os microtubos foram centrifugados a 8.000rpm por 3 minutos e, 2 $\mu$ L do sobrenadante de cada amostra foi utilizado diretamente nas reações de PCR. Foi testado, também, 5 $\mu$ L de sobrenadante. Foram realizadas três rodadas de experimento, sendo duas com a utilização de 2 $\mu$ L de template e uma com 5 $\mu$ L. Cada rodada utilizou o total de 23 cepas de *Candida*, com os produtos de PCR de cada rodada sendo visualizados em um gel de agarose a 2%.

#### **4.3.9 Identificação pelo método de PCR-RFLP**

A identificação por PCR-RFLP (RFLP, do inglês **R**estriction **F**ragment **L**enght **P**olymorphism: polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição ) objetivou o uso das enzimas de restrição interespecíficas *Bse*YI e *Bsh*FI para digestão da região amplificada ITS1-5.8S-ITS2 das cinco espécies de *Candida*. Foram utilizadas apenas cinco cepas: uma cepa de

*C. albicans* (PCT-535), uma cepa de *C. glabrata* (PCT-213), uma cepa de *C. tropicalis* (PCT-505), uma cepa de *C. parapsilosis* (PCT-611); e uma cepa de *C. krusei* (PCT-740).

As condições experimentais estabelecidas para a análise empírica da funcionalidade e representatividade dessas enzimas de restrição foram:

- (i) Amplificação, por PCR, da região ITS1-5.8S-ITS2 das cinco cepas de *Candida*.
- (ii) Digestão dos produtos de PCR (amplicons) com a enzima interespecífica *Bse*YI.
- (iii) Digestão dos produtos de PCR (amplicons) com a enzima interespecífica *Hae*III.

Os detalhes de cada etapa desta metodologia estão descritas a seguir.

#### **4.3.9.1 Uso da PCR para amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2**

Foi realizada a amplificação, por PCR, da região ITS1-5.8S-ITS2 de cada uma das cinco cepas de *Candida*; esta amplificação foi feita com uso dos iniciadores de oligonucleotídeos universais *ITS1* e *ITS4*. As reações de PCR foram realizadas em microtubos com capacidade para 200 $\mu$ L; o volume da reação foi de 50 $\mu$ L. As concentrações dos reagentes e seus respectivos volumes reacionais encontram-se descritos no quadro 8.

**Quadro 8.** Concentrações e respectivos volumes usados na amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2. [ ] = concentração.

Reagente [ ] do estoque	[ ] final do tubo da reação	Volume do tubo da reação (uL)
Tampão PCR 10X	1X	5 $\mu$ L
dNTP mix 10mM	0.15mM	0,75 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> 50mM	1,5mM	1,5 $\mu$ L
<i>ITS1</i> 20 $\mu$ M	10 pmoles	0,5 $\mu$ L
<i>ITS4</i> 20 $\mu$ M	10 pmoles	0,5 $\mu$ L
Taq DNA Pol. 5U/ $\mu$ L	2U	0,4 $\mu$ L
DNA template	~	2 $\mu$ L
	H <sub>2</sub> O (q.s.p.)	39,35 $\mu$ L
	TOTAL	50 $\mu$ L

As condições de termociclagem seguiram a seguinte programação, descrita no quadro 9, abaixo.

**Quadro 9.** Condições de termociclagem para a amplificação da região ITS1 -5.8S-ITS2, por uso dos iniciadores de oligonucleotídeos universais *ITS1* e *ITS2*.

Ciclos	Temperatura °C	Tempo	Repetições
Desnaturação inicial	94°C	4 min	1x
Desnaturação	94°C	30 seg	30x
Anelamento	55°C	30 seg	
Extensão	72°C	1 min	
Extensão final	72°C	10 min	1x
	4°C	$\infty$	-

#### 4.3.9.2 Digestão enzimática

A enzima *HaeIII* possui sítios de corte localizados nas regiões ITS1-5.8S-ITS2 de todas as cinco espécies de *Candida* estudadas neste trabalho (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, e *C. krusei*). Já a enzima *BseYI*, possui sítios de corte localizados nas regiões ITS1-5.8S-ITS2 de três espécies (*C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*).

Para a digestão com *HaeIII*, uma alíquota de 10 $\mu$ L de cada uma das cinco amostras de PCR foi retirada e adicionada a um microtubo, com capacidade para 200 $\mu$ L. Em cada um deles foi acrescentado o tampão da enzima *HaeIII*, a própria enzima *HaeIII*, e água deionizada em quantidade suficiente para completar um volume final de reação de 20 $\mu$ L. O quadro 10, abaixo, evidencia melhor esses valores.

**Quadro 10.** Reagentes e respectivos volumes usados na digestão das amostras de PCR das cepas de *Candida* com *HaeIII*.

Reagentes	Quantidade
Amostra de PCR	10 $\mu$ L
Água deionizada	7,5 $\mu$ L
Tampão da enzima (Buffer S)	2 $\mu$ L
Enzima <i>HaeIII</i> 10U/ $\mu$ L	0,5 $\mu$ L (5U)

O tempo de digestão dos produtos de PCR das cepas de *Candida* com a enzima *HaeIII* foi de aproximadamente 16 horas durante a noite (overnight) com uma temperatura de incubação de 37°C (temperatura ótima da enzima).

A digestão com *BseYI* seguiu os mesmos preceitos descritos para *HaeIII*. O quadro 11, abaixo, destaca melhor esses valores.

**Quadro 11.** Reagentes e respectivos volumes usados na digestão das amostras de PCR das cepas de *Candida* com *BseYI*.

Reagentes	Quantidade
Amostra de PCR	10 $\mu$ L
Água deionizada	7,5 $\mu$ L
Tampão da enzima (Buffer S)	2 $\mu$ L
Enzima <i>BseYI</i> 5U/ $\mu$ L	1 $\mu$ L (5U)

O tempo de digestão dos produtos de PCR das cepas de *Candida* com a enzima *BseYI* foi de aproximadamente 16 horas durante a noite (overnight) com uma temperatura de incubação de 37°C (temperatura ótima da enzima).

Após a digestão enzimática, todas as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12%, preparado a partir de uma solução de acrilamida 30% (30g de acrilamida + 0.8g de Bis-acrilamida + tampão TEB 0,5% em q.s.p. 100mL), e submetidas à voltagem de 3V/cm por 3 horas.

O gel foi, posteriormente corado com brometo de etídeo 0,5µg/mL, visualizado em um transiluminador por emissão de luz UVA, UVB e UVC (260nm, 270nm e 280nm, respectivamente), e fotografado através do sistema de fotodocumentação deste aparelho .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

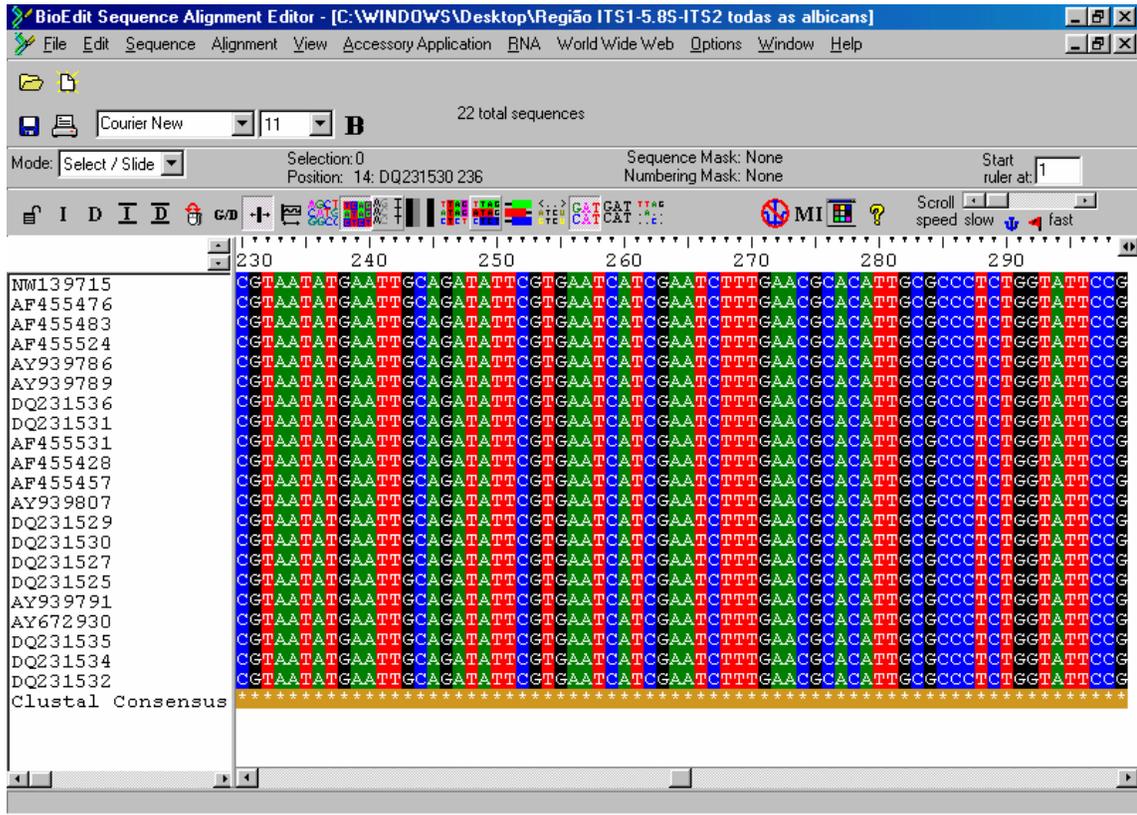
### 5.1 Processamento das Seqüências Genômicas

Os alinhamentos realizados com as seqüências genômicas da região ITS1 -5.8S-ITS2, das cepas de *Candida* usadas neste trabalho, foram examinados sob dois aspectos : intra-especificamente e interespecificamente.

#### 5.1.1 Análise intra-específica

O alinhamento das seqüências da região ITS1 -5.8S-ITS2 para as cepas de cada espécie de *Candida* foi analisado por meio de uma matriz de similaridade de seqüências, calculada pelo próprio Bioedit 7.0. Os valores de 1,000 indicam similaridade total (ou seja, de 100%) entre duas seqüências distintas; a sigla “ID” (identidade) indica que uma seqüência está sendo confrontada com ela própria, ou seja, possuem a mesma identidade; a similaridade diminui quando os valores numéricos se afastam, para menos, de 1,000.

A figura 4 exhibe o alinhamento realizado com as seqüências de uma mesma espécie, no caso abaixo, seqüências de cepas de *C. albicans*. O mesmo foi feito às outras quatro espécies.



**Figura 4.** Imagem real do alinhamento realizado para as seqüências ITS1-5.8S-ITS2 das cepas de *C. albicans* utilizadas neste trabalho.

Os quadros 12, 13, 14, 15 e 16 exibem os resultados da matriz de similaridade feitos para cada uma das cinco espécies de *Candida*.

**Quadro 12.** Matriz de similaridade entre as seqüências ITS1-5.8S-ITS2 de *C. albicans*.

Seqüências (n° acesso)	NW139715	AF455476	AF455483	AF455524	AY939786	AY939789	DQ231536	DQ231531	AF455531	AF455428	AF455457	AY939807	DQ231529	DQ231530	DQ231527	DQ231525	AY939791	AY672930	DQ231535	DQ231534	DQ231532
NW139715	ID	0,998	0,996	0,998	1,000	0,996	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
AF455476	0,998	ID	0,998	1,000	0,998	0,994	0,998	0,998	0,998	0,998	0,998	0,998	0,998	0,998	0,998	0,998	0,998	0,998	0,998	0,998	0,998
AF455483	0,996	0,998	ID	0,998	0,996	0,992	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996
AF455524	0,998	1,000	0,998	ID	0,998	0,994	0,998	0,998	0,998	0,998	0,998	0,998	0,998	0,998	0,998	0,998	0,998	0,998	0,998	0,998	0,998
AY939786	1,000	0,998	0,996	0,998	ID	0,996	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
AY939789	0,996	0,994	0,992	0,994	0,996	ID	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996
DQ231536	1,000	0,998	0,996	0,998	1,000	0,996	ID	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
DQ231531	1,000	0,998	0,996	0,998	1,000	0,996	1,000	ID	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
AF455531	1,000	0,998	0,996	0,998	1,000	0,996	1,000	1,000	ID	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
AF455428	1,000	0,998	0,996	0,998	1,000	0,996	1,000	1,000	1,000	ID	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
AF455457	1,000	0,998	0,996	0,998	1,000	0,996	1,000	1,000	1,000	1,000	ID	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
AY939807	1,000	0,998	0,996	0,998	1,000	0,996	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	ID	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
DQ231529	1,000	0,998	0,996	0,998	1,000	0,996	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	ID	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
DQ231530	1,000	0,998	0,996	0,998	1,000	0,996	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	ID	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
DQ231527	1,000	0,998	0,996	0,998	1,000	0,996	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	ID	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
DQ231525	1,000	0,998	0,996	0,998	1,000	0,996	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	ID	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
AY939791	1,000	0,998	0,996	0,998	1,000	0,996	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	ID	1,000	1,000	1,000	1,000
AY672930	1,000	0,998	0,996	0,998	1,000	0,996	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	ID	1,000	1,000	1,000
DQ231535	1,000	0,998	0,996	0,998	1,000	0,996	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	ID	1,000	1,000
DQ231534	1,000	0,998	0,996	0,998	1,000	0,996	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	ID	1,000
DQ231532	1,000	0,998	0,996	0,998	1,000	0,996	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	ID

O quadro 12 demonstra uma alta similaridade entre as seqüências ITS1 -5.8S-ITS2 das 21 cepas de *C. albicans* utilizadas; média de  $0,998 \pm 0,002$ . Isto sugere que esta região é altamente conservada em *C. albicans*, sendo propícia ao desenvolvimento de marcadores moleculares espécie-específicos.

**Quadro 13.** Matriz de similaridade entre as seqüências ITS1 -5.8S-ITS2 de *C. parapsilosis*.

Seqüências (n° acesso)	AY939803	AY939798	AY391843	AF455530	AF455514	AF455500	AF455488	AF455433
AY939803	ID	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
AY939798	1,000	ID	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
AY391843	1,000	1,000	ID	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
AF455530	1,000	1,000	1,000	ID	1,000	1,000	1,000	1,000
AF455514	1,000	1,000	1,000	1,000	ID	1,000	1,000	1,000
AF455500	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	ID	1,000	1,000
AF455488	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	ID	1,000
AF455433	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	ID

O quadro 13 demonstra uma alta similaridade entre as seqüências ITS1 -5.8S-ITS2 das oito cepas de *C. parapsilosis* utilizadas; média absoluta de  $1,000 \pm 0,000$ . Isto sugere que esta região é altamente conservada em *C. parapsilosis*, sendo propícia ao desenvolvimento de marcadores moleculares para a identificação molecular d esta espécie.

**Quadro 14.** Matriz de similaridade entre as seqüências ITS1 -5.8S-ITS2 de *C. tropicalis*.

Seqüências (n° acesso)	AY939801	AY939810	DQ666188	DQ666190	DQ666193	DQ680841
AY939801	ID	0,996	1,000	0,996	0,996	1,000
AY939810	0,996	ID	0,996	1,000	1,000	0,996
DQ666188	1,000	0,996	ID	0,996	0,996	1,000
DQ666190	0,996	1,000	0,996	ID	1,000	0,996
DQ666193	0,996	1,000	0,996	1,000	ID	0,996
DQ680841	1,000	0,996	1,000	0,996	0,996	ID

O quadro 14 demonstra uma alta similaridade entre as seqüências ITS1 -5.8S-ITS2 das seis cepas de *C. tropicalis*; média de  $0,998 \pm 0,002$ . Isto sugere que esta região é altamente

conservada em *C. tropicalis*, sendo propícia ao desenvolvimento de marcadores moleculares para a identificação molecular desta espécie.

**Quadro 15.** Matriz de similaridade entre as seqüências ITS1 -5.8S-ITS2 de *C. krusei*.

Seqüências (n° acesso)	AY939808	AY939796
AY939808	ID	0,992
AY939796	0,992	ID

O quadro 15 demonstra uma alta similaridade entre as seqüências ITS1 -5.8S-ITS2 das duas cepas de *C. krusei*; média de  $0,992 \pm 0,000$ . Isto sugere que esta região é altamente conservada em *C. krusei*, sendo propícia ao desenvolvimento de marcadores moleculares para a identificação molecular desta espécie.

**Quadro 16.** Matriz de similaridade entre as seqüências ITS1 -5.8S-ITS2 de *C. glabrata*.

Seqüências (n° acesso)	AY939793	AY198398
AY939793	ID	1,000
AY198398	1,000	ID

O quadro 16 demonstra uma alta similaridade entre as seqüências ITS1 -5.8S-ITS2 das duas cepas de *C. glabrata*, média absoluta de  $1,000 \pm 0,000$ . Isto sugere que esta região é altamente conservada em *C. glabrata*, sendo propícia ao desenvolvimento de marcadores moleculares para a identificação molecular desta espécie.

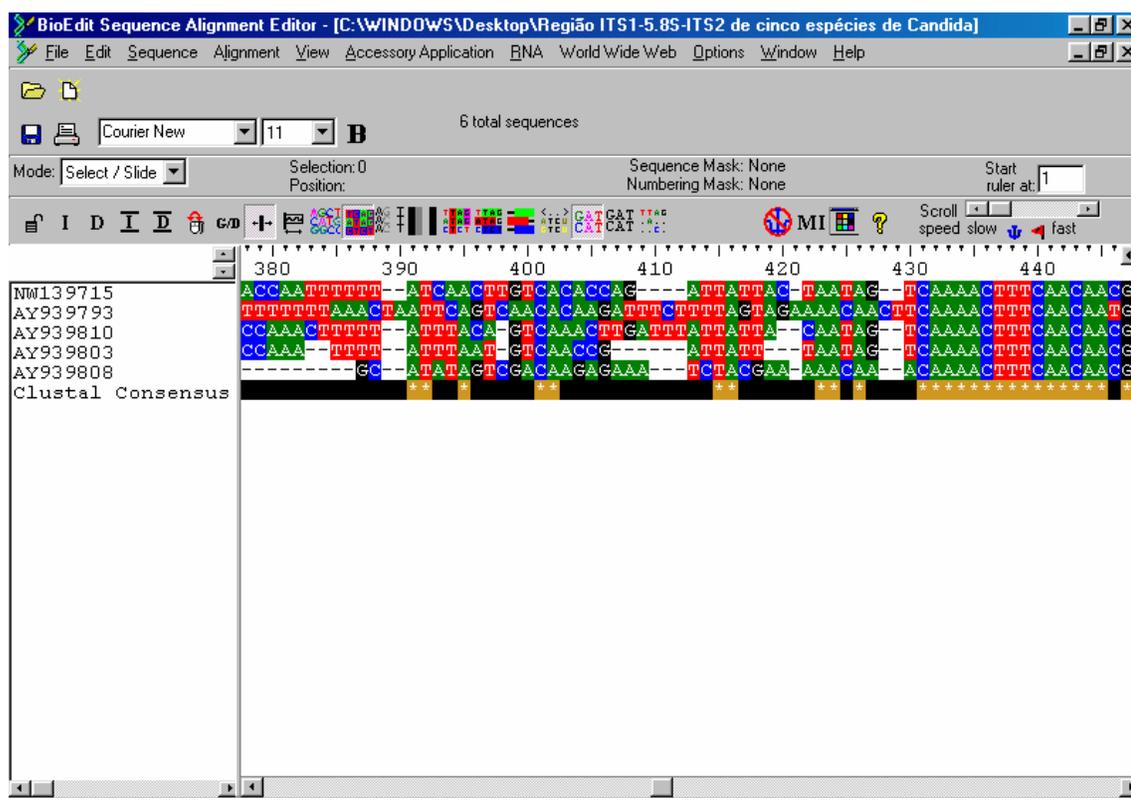
### 5.1.2 Análise interespecífica

O alinhamento realizado com as cinco seqüências ITS1 -5.8S-ITS2 (NW139715 de *C. albicans*, com 536pb; AY939793 de *C. glabrata*, com 881pb; AY939810, de *C. tropicalis*,

com 526pb; AY939803, de *C. parapsilosis*, com 520pb; e AY939808, de *C. krusei*, com 509pb) demonstrou a presença de alguns trechos não -consenso em cada uma delas.

Sobre esse alinhamento foi desenvolvida uma “matriz de similaridade”, calculada pelo programa Bioedit 7.0. A interpretação numérica dessa matriz encontra-se descrita na seção anterior.

A figura 5 exhibe o alinhamento previamente realizado com as cinco seqüências ITS1 - 5.8S-ITS2, cada uma representativa para uma espécie de *Candida*.



**Figura 5.** Imagem real do alinhamento realizado para cinco seqüências ITS1-5.8S-ITS2: NW139715, de *C. albicans*, com 536pb; AY939793, de *C. glabrata*, com 881pb; AY939810, de *C. tropicalis*, 526pb; AY939803, de *C. parapsilosis*, com 520pb; e AY939808, de *C. krusei*, com 509pb.

Os resultados da matriz de similaridade de seqüências, feito para as regiões ITS1 -5.8S-ITS2 dessas espécies, encontram-se descritas no quadro 17, abaixo.

**Quadro 17.** Matriz de similaridade entre as seqüências ITS1 -5.8S-ITS2 de cinco espécies de *Candida*. *Ca*, *Cg*, *CtR*, *Cp.*, e *CkR*, são abreviações para *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, e *C. krusei*, respectivamente.

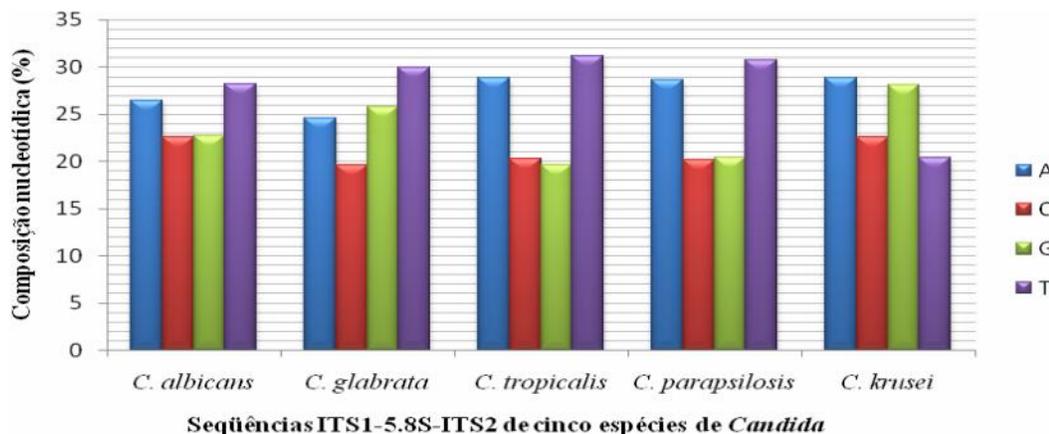
Seqüências	NW139715- <i>Ca</i>	AY939793- <i>Cg</i>	AY939810- <i>CtR</i>	AY939803- <i>Cp.</i>	AY939808- <i>Ck</i>
NW139715- <i>Ca</i>	ID	0,408	0,824	0,757	0,605
AY939793- <i>Cg</i>	0,408	ID	0,390	0,391	0,379
AY939810- <i>Ct</i>	0,824	0,390	ID	0,800	0,613
AY939803- <i>Cp</i>	0,757	0,391	0,800	ID	0,581
AY939808- <i>Ck</i>	0,605	0,379	0,613	0,581	ID

A análise dos valores discriminados acima demonstra :

- (i) Um índice de similaridade relativamente alto entre as seqüências ITS1 -5.8S-ITS2 de: *C. tropicalis* e *C. albicans* (0,824); *C. parapsilosis* e *C. albicans* (0,763); e entre *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (0,800);
- (ii) Um índice de similaridade baixo entre as seqüências ITS1 -5.8S-ITS2 de: *C. krusei* e *C. glabrata* (0,379);
- (iii) Um índice de similaridade razoavelmente baixo entre as seqüências ITS1 -5.8S-ITS2 das demais espécies.

Como laboriosamente descrito na seção 4.3.4, trechos não-consenso de cada seqüência foram utilizados para o desenho de oligonucleotídeos com potencial espécie -específicos.

O gráfico 1 evidencia a relação da composição nucleotídica entre as mesmas seqüências ITS1-5.8S-ITS2 utilizadas anteriormente para a análise interespecífica. É possível perceber poucas variações, entretanto, sem valor significativo. Os indícios de variabilidade são mais bem indicados pela matriz de similaridade de seqüências (quadro 17), que avalia as diferenças de combinação nucleotídica, ao invés da composição.



**Gráfico 1.** Composição nucleotídica entre diferentes seqüências ITS1 -5.8S-ITS2 de *Candida*. As seqüências são: NW139715, de *C. albicans*; AY939793, de *C. glabrata*; AY939810, de *C. tropicalis*; AY939803, de *C. parapsilosis*; e AY939808, de *C. krusei*.

## 5.2 Oligonucleotídeos Espécie-Específicos

### 5.2.1 Propriedades gerais

Os pares de oligonucleotídeos, desenhados a partir dos trechos de seqüências analisadas, que foram selecionados são:

(i) Para *C. albicans*: *CaF* 5'TTATCAACTTGTCACACCAG3' e *CaR* 5'TACGTGGTGGACGTTACCG3';

(ii) Para *C. glabrata*: *CgF* 5'TGCGTGGATCTCTCTATTCC3' e *CgR* 5'AGATTAATAGAGAAGCTTGCGC3';

(iii) Para *C. tropicalis*: *CtF* 5'TCTTTGGTGGCGGGAGCAAT3' e *CtR* 5'TAAATTGTGGTGGCCACTAG3';

(iv) Para *C. parapsilosis*: *CpF* 5'CTTTGGTAGGCCTTCTATATG3' e *CpR* 5'GGAGTTTGTACCAATGAGTG3';

(v) Para *C. krusei*: *CkF* 5'CGGAACGAAAACAACAACACCTA3' e *CkR* 5' TTTCAGGCGAGTCGCAGCTC3'.

Estes oligonucleotídeos foram nomeados com as iniciais designativas da espécie (gênero e epítipo específico), seguido da letra maiúscula em “itálico” *F* ou *R*, que significam "Forward" (do inglês Forward: senso, movendo-se para a frente) e "Reverse" (do inglês Reverse: anti-senso, movendo-se na direção reversa), respectivamente.

As letras *F* e *R* estão baseadas segundo o sentido das seqüências nucleotídicas do rDNA, adquiridas no NCBI (sentido 5' → 3'), e que foram usadas neste trabalho.

A Tabela 4 destaca algumas informações dos oligonucleotídeos escolhidos; estes se encontram organizados aos pares; cada par representativo à sua respectiva espécie de *Candida*. As informações da tabela discriminam: comprimento em pares de base (pb), % de GC, temperatura de anelamento (°C), local de hibridização dos oligonucleotídeos, e tamanho do fragmento amplificado (amplicon).

**Tabela 4.** Propriedades dos oligonucleotídeos espécie -específicos propostos.

Espécie	Oligonucleotídeo	Comprimento	% GC	T <sub>m</sub>	Hibridização	Amplicon
<i>C. albicans</i>	<i>CaF</i>	20pb	40,00	56°C	ITS1	~335pb
	<i>CaR</i>	19pb	55,00	60°C	ITS2	
<i>C. tropicalis</i>	<i>CtF</i>	20pb	55,00	62°C	ITS1	~383pb
	<i>CtR</i>	20pb	45,00	58°C	ITS2	
<i>C. glabrata</i>	<i>CgF</i>	20pb	50,00	60°C	ITS1	~490pb
	<i>CgR</i>	22pb	40,91	62°C	ITS2	
<i>C. parapsilosis</i>	<i>CpF</i>	21pb	42,86	60°C	ITS1	~351pb
	<i>CpR</i>	20pb	40,00	58°C	ITS2	
<i>C. krusei</i>	<i>CkF</i>	23pb	43,48	66°C	ITS1	~310pb
	<i>CkR</i>	20pb	60,00	64°C	ITS2	

Como pôde ser observado na tabela 4, todos os locais de hibridização dos iniciadores de oligonucleotídeos *F* estão localizados na região do espaço transcrito interno 1 (*ITS1*). De modo semelhante, todos os locais de hibridização dos primers de oligonucleotídeos *R* estão localizados na região do espaço transcrito interno 2 (*ITS2*). O gene 5.8S, localizado entre a região *ITS1* e *ITS2*, é obviamente transcrito e constante dos amplicons produzidos pelos cinco pares de oligonucleotídeos.

Dentre todos os critérios previamente estabelecidos para o desenho dos oligonucleotídeos (ver seção 4.3.4), o par *CkF //CkR* não se ajustou ao critério “temperatura de anelamento entre 50°C e 62°C”, baseado no cálculo da fórmula  $T_m (^{\circ}\text{C}) = 2AT + 4GC$ . Estes oligonucleotídeos encerraram em uma “*T<sub>m</sub>*” de 66°C e 64°C, respectivamente. Tal fato ocorreu pela impossibilidade de ajuste nos oligonucleotídeos sem que isso prejudicasse sua representatividade para a espécie *C. krusei*.

Outro critério, o que preceitua a “% de pareamento de bases máxima de 60% da extensão íntegra, sem “gaps” do oligonucleotídeo com a seqüência molde testada”, não pôde ser estabelecido para os oligonucleotídeos *CtF*, *CgR* e *CkF*. *CtF* apresentou uma % de pareamento de bases de 65,00% com um trecho da região *ITS1* -5.8S-*ITS2* de *C. glabrata*. O oligonucleotídeo *CgR* apresentou uma % de pareamento de bases de 63,63% com um trecho da região *ITS1*-5.8S-*ITS2* de *C. albicans* e um trecho da mesma região em *C. tropicalis*. Por último, *CkF* apresentou um índice de similaridade de 60,87% com um trecho da região *ITS1* -5.8S-*ITS2* de *C. glabrata*. Esses resultados, e de todos os demais oligonucleotídeos, podem ser mais bem visualizados na tabela 5, a seguir.

**Tabela 5.** Índice de similaridade dos oligonucleotídeos com trechos das seqüências ITS1-5.8S-ITS2 de cinco espécies de *Candida*.

Oligonucleotídeos	<i>C. albicans</i> (NW139715)	<i>C. tropicalis</i> (AY939810)	<i>C. glabrata</i> (AY939793)	<i>C. parapsilosis</i> (AY939803)	<i>C. krusei</i> (AY939808)
<i>CaF</i> (NW139715)	100,0%	50,00%	60,00%	50,00%	50,00%
<i>CaR</i> (NW139715)	100,0%	57,90%	52,63%	47,37%	47,37%
<i>CtF</i> (AY939810)	65,00%	100,00%	65,00%	55,00%	60,00%
<i>CtR</i> (AY939810)	50,00%	100,00%	50,00%	60,00%	50,00%
<i>CgF</i> (AY939793)	55,00%	55,00%	100,00%	50,00%	55,00%
<i>CgR</i> (AY939793)	63,63%	63,63%	100,00%	55,00%	54,54%
<i>CpF</i> (AY939803)	57,14%	47,62%	57,14%	100,00%	52,38%
<i>CpR</i> (AY939803)	60,00%	55,00%	50,00%	100,00%	45,00%
<i>CkF</i> (AY939808)	47,83%	43,48%	60,87%	56,52%	100,00%
<i>CkR</i> (AY939808)	55,00%	40,00%	55,00%	55,00%	100,00%

A estabilidade do duplex dos iniciadores de oligonucleotídeos com o DNA molde, em uma PCR, foi determinada de maneira precisa, por meio do cálculo da energia livre de formação de duplex ( $\Delta G$ ). O método utilizado é uma simplificação do método de Breslauer et al. (1986, apud PAULA & FERREIRA, 2004), descrito por Rychlik (1993, apud PAULA & FERREIRA, 2004). Para os cálculos, fez-se necessário utilizar os valores de energia livre do nucleotídeo vizinho mais próximo, descrito na tabela 6.

**Tabela 6.** Valor de energia livre do nucleotídeo vizinho. Fonte: Paula & Ferreira (2004).

Primeiro nucleotídeo (5')	Segundo nucleotídeo			
	dA	dC	dG	dT
	$\Delta G$ (Kcal/mol)			
<b>DA</b>	-1,9	-1,3	-1,6	-1,5
<b>DC</b>	-1,9	-3,1	-3,6	-1,6
<b>DG</b>	-1,6	-3,1	-3,1	-1,3
<b>DT</b>	-1,0	-1,6	-1,9	-1,9

Tomando-se por base os valores de energia livre ( $\Delta G$ ) dos pares de nucleotídeos, descritos na tabela 6, calculou-se o  $\Delta G$  dos três pares de nucleotídeos finais da região 3' terminal para cada um dos iniciadores de oligonucleotídeo, como detalhado no quadro 18:

**Quadro 18.** Cálculo da energia livre de formação do duplex para os oligonucleotídeos espécie-específicos.

<i>C. albicans</i>	<p><b>CaF:</b> 5'...CCAG 3'</p> $\Delta G(\text{CCAG}) = \Delta G(\text{CC}) + \Delta G(\text{CA}) + \Delta G(\text{AG})$ $\Delta G(\text{CCAG}) = - (3,1) + (1,9) + (1,6)$ $\Delta G(\text{CCAG}) = - 6,6 \text{ Kcal/mol}$	<p><b>CaR:</b> 5'...ACCG 3'</p> $\Delta G(\text{ACCG}) = \Delta G(\text{AC}) + \Delta G(\text{CC}) + \Delta G(\text{CG})$ $\Delta G(\text{ACCG}) = - (1,3) + (3,1) + (3,6)$ $\Delta G(\text{ACCG}) = - 8,0 \text{ Kcal/mol}$
<i>C. glabrata</i>	<p><b>CgF:</b> 5'...TTCC 3'</p> $\Delta G(\text{TTCC}) = \Delta G(\text{TT}) + \Delta G(\text{TC}) + \Delta G(\text{CC})$ $\Delta G(\text{TTCC}) = - (1,9) + (1,6) + (3,1)$ $\Delta G(\text{TTCC}) = - 6,6 \text{ Kcal/mol}$	<p><b>CgR:</b> 5'...GCGC 3'</p> $\Delta G(\text{GCGC}) = \Delta G(\text{GC}) + \Delta G(\text{CG}) + \Delta G(\text{GC})$ $\Delta G(\text{GCGC}) = - (3,1) + (3,6) + (3,1)$ $\Delta G(\text{GCGC}) = - 9,8 \text{ Kcal/mol}$
<i>C. tropicalis</i>	<p><b>CtF:</b> 5'...CAAT 3'</p> $\Delta G(\text{CAAT}) = \Delta G(\text{CA}) + \Delta G(\text{AA}) + \Delta G(\text{AT})$ $\Delta G(\text{CAAT}) = - (1,9) + (1,9) + (1,5)$ $\Delta G(\text{CAAT}) = - 5,3 \text{ Kcal/mol}$	<p><b>CtR:</b> 5'...CTAG 3'</p> $\Delta G(\text{CTAG}) = \Delta G(\text{CT}) + \Delta G(\text{TA}) + \Delta G(\text{AG})$ $\Delta G(\text{CTAG}) = - (1,6) + (1,0) + (1,6)$ $\Delta G(\text{CTAG}) = - 4,2 \text{ Kcal/mol}$
<i>C. parapsilosis</i>	<p><b>CpF:</b> 5'...TATG 3'</p> $\Delta G(\text{TATG}) = \Delta G(\text{TA}) + \Delta G(\text{AT}) + \Delta G(\text{TG})$ $\Delta G(\text{TATG}) = - (1,0) + (1,5) + (1,9)$ $\Delta G(\text{TATG}) = - 4,4 \text{ Kcal/mol}$	<p><b>CpR:</b> 5'...AGTG 3'</p> $\Delta G(\text{AGTG}) = \Delta G(\text{AG}) + \Delta G(\text{GT}) + \Delta G(\text{TG})$ $\Delta G(\text{AGTG}) = - (1,6) + (1,3) + (1,9)$ $\Delta G(\text{AGTG}) = - 4,8 \text{ Kcal/mol}$
<i>C. krusei</i>	<p><b>CkF:</b> 5'...CCTA 3'</p> $\Delta G(\text{CCTA}) = \Delta G(\text{CC}) + \Delta G(\text{CT}) + \Delta G(\text{TA})$ $\Delta G(\text{CCTA}) = - (3,1) + (1,6) + (1,0)$ $\Delta G(\text{CCTA}) = - 5,7 \text{ Kcal/mol}$	<p><b>CkR:</b> 5'...GCTC 3'</p> $\Delta G(\text{GCTC}) = \Delta G(\text{GC}) + \Delta G(\text{CT}) + \Delta G(\text{TC})$ $\Delta G(\text{GCTC}) = - (3,1) + (1,6) + (1,6)$ $\Delta G(\text{GCTC}) = - 6,3 \text{ Kcal/mol}$

Pela análise dos valores de  $\Delta G$  dos oligonucleotídeos é possível constatar que *CgR* não se ajustou a condição que predileciona por uma energia livre de formação do duplex maior do que -8 Kcal/mol. Este oligonucleotídeo não pôde ter sua região 3' modificada para

não prejudicar e/ou interferir na sua especificidade/ representabilidade para a espécie *C. glabrata*, e encerrou uma  $\Delta G$  de -9,8 Kcal/mol.

### 5.3 Análise dos Mapas de Restrição e Definição das Enzimas de Restrição

#### 5.3.1 Enzimas interespecíficas

A análise do mapa de restrição de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* demonstrou duas enzimas com ocorrência de sítios de corte para mais de uma espécie, e que satisfizeram os critérios de seleção previamente estabelecidos (ver seção 4.3.5), são elas *BshFI (HaeIII)* e *BseYI*.

A enzima *BshFI (HaeIII)* possui sítios de corte (GG'CC) localizados nas regiões ITS1-5.8S-ITS2 das cinco espécies de *Candida*. A enzima *BseYI* possui sítio(s) de corte (C'CCAG\_C) localizado(s) na região ITS1-5.8S-ITS2 de três espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*). Ver detalhes na tabela 7, a seguir.

**Tabela 7.** Estimativa do tamanho esperado para os fragmentos de digestão, obtidos para cada uma das enzimas interespecíficas selecionadas: *BshFI (HaeIII)* e *BseYI*.

Espécie	Amplicon ITS1-5.8S-ITS2 (tamanho completo desta região)	Fragmentos gerados pelas enzimas	
		<i>BshFI (HaeIII)</i>	<i>BseYI</i>
<i>C. albicans</i>	536pb	92pb; 444pb	93pb; 196pb; 247pb
<i>C. glabrata</i>	881pb	222pb; 659pb	81pb; 800pb
<i>C. tropicalis</i>	526pb	80pb; 446pb	526pb
<i>C. parapsilosis</i>	520pb	14pb; 106pb; 400pb	145pb; 375pb
<i>C. krusei</i>	509pb	38pb; 89pb; 382pb	509pb

**Obs.:** Os fragmentos de digestão com mesmo comprimento (em pares de bases) do amplicon indicam que a enzima não possui sítios de restrição neste fragmento.

### 5.3.2 Enzimas intra-específicas

Com a geração do mapa de restrição para a seqüência ITS1-5.8S-ITS2 de *C. albicans*, com comprimento de 536 pb, resultou em 70 diferentes sítios de restrição para enzimas. A comparação desses sítios de restrição com os das demais *Candida* não demonstrou nenhuma ocorrência de um sítio com características intra-específicas; todos têm ocorrência comum em outra(s) espécie(s).

Com a geração do mapa de restrição para a seqüência ITS1-5.8S-ITS2 de *C. glabrata*, com comprimento de 881pb, resultou em 113 diferentes sítios de restrição para enzimas. A comparação desses sítios de restrição com os das demais *Candida* demonstrou a ocorrência de sete sítios específicos para enzimas; ou seja, são sítios unicamente existentes para *C. glabrata*, são eles: *AatII*, *AseI*, *DraI*, *EcoRI*, *PstI*, *SacI*, e *ZraI*. Veja os detalhes na tabela 8, abaixo.

**Tabela 8.** Sítios de restrição com características intra-específicas, extraídos do mapa de restrição de uma seqüência ITS1-5.8S-ITS2 de *C. glabrata*, com comprimento de 881pb.

Enzima	Sítio	isosquisômeros	Fragmentos gerados
<i>AatII</i>	G_ACGTC		65pb; 816pb
<i>AseI</i>	AT'TA_AT		183pb; 698pb
<i>DraI</i>	TTT'AAA		385pb; 496pb
<i>EcoRI</i>	G'AAAT_C		370pb; 511pb
<i>PstI</i>	C_TGCA'G		181pb; 700pb
<i>SacI</i>	G_AGCT'C		58pb; 823pb
<i>ZraI</i>	GAC'GTC		67pb; 814pb

A geração do mapa de restrição para a seqüência ITS1-5.8S-ITS2 de *C. tropicalis*, com comprimento de 526pb, resultou em 67 diferentes sítios de restrição para enzimas. A comparação desses sítios de restrição com os das demais *Candida* demonstrou a ocorrência de dois sítios específicos para enzimas; ou seja, são sítios unicamente existentes para *C. tropicalis*, são eles: *MscI* e *SmaI*. Veja os detalhes na tabela 9.

**Tabela 9.** Sítios de restrição com características intra-específicas, extraídos do mapa de restrição de uma seqüência ITS1-5.8S-ITS2 de *C. tropicalis*, com comprimento de 526pb.

Enzima	Sítio	isosquisômeros	Fragmentos gerados
<i>MscI</i>	TGG'CCA		80pb; 446pb
<i>SmaI</i>	CCC'GGG		184pb; 342pb

A geração do mapa de restrição para a seqüência ITS1 -5.8S-ITS2 de *C. parapsilosis*, com comprimento de 520pb, resultou em 61 diferentes sítios de restrição para enzimas. A comparação desses sítios de restrição com os das demais *Candida* demonstrou a ocorrência de um sítio específico para enzima; ou seja, um sítio unicamente existente para *C. parapsilosis*: *StuI*. Veja os detalhes na tabela 10, abaixo.

**Tabela 10.** Sítio de restrição com característica intra-específica, extraído do mapa de restrição de uma seqüência ITS1-5.8S-ITS2 de *C. parapsilosis*, com comprimento de 520pb.

Enzima	Sítio	Isosquisômeros	Fragmentos gerados
<i>StuI</i>	AGG' CCT		106pb; 414pb

A geração do mapa de restrição para a seqüência ITS1 -5.8S-ITS2 de *C. krusei*, com comprimento de 509pb, resultou em 86 diferentes sítios de restrição para enzimas. A comparação desses sítios de restrição com os das demais *Candida* demonstrou a ocorrência de três sítios específicos para enzimas; ou seja, são sítios unicamente existentes para *C. krusei*, são eles: *BmgBI*, *EspI*, e *Sall*. Veja os detalhes na tabela 11, abaixo.

**Tabela 11.** Sítio de restrição com característica intra-específica, extraído do mapa de restrição de uma seqüência ITS1-5.8S-ITS2 de *C. krusei*, com comprimento de 509pb.

Enzima	Sítio	isosquisômeros	Fragmentos gerados
<i>BmgBI</i>	CAC'GTC		176pb; 333pb
<i>FspI</i>	TGC'GCA		204pb; 305pb
<i>Sall</i>	G'TCGA_C		103pb; 406pb

#### 5.4 Identificação de *Candida* por Oligonucleotídeos Universais

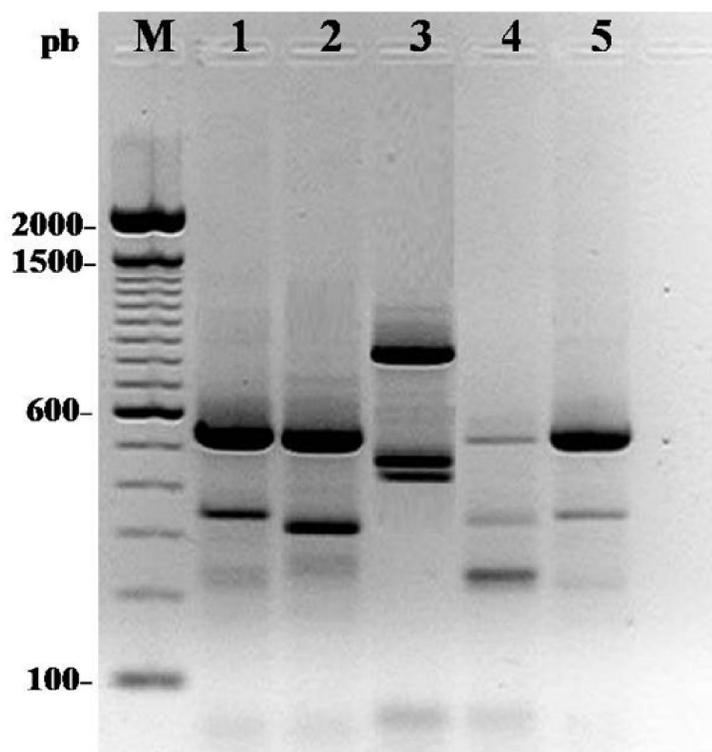
A estratégia de PCR desenvolvida para a amplificação dos fragmentos ITS1 -5.8S-ITS2, ITS1 e ITS2, do rDNA de cada espécie, em uma única reação (ver seção 4.3.7), foi satisfatoriamente alcançada.

A realização de um “Hot start PCR” objetivou eliminar os rastros, também conhecidos como “smears” (do inglês Smears: sujeira; mancha; esfregação) observados nos géis de agarose, e que se configuram como uma falta de especificidade da enzima DNA polimerase na reação de PCR. De forma a, também, aprimorar a eficiência e especificidade, mas agora da amplificação dos 3 amplicons do rDNA possíveis de serem amplificados com a utilização dos oligonucleotídeos universais, foi utilizado 2 temperaturas de hibridização. Como dos quatro oligonucleotídeos universais, três apresentam uma mesma de  $T_m = 62^\circ\text{C}$  (*ITS1*, *ITS2*, *ITS3*) e um apresenta uma  $T_m = 58^\circ\text{C}$  (*ITS4*), optou-se, durante a etapa de anelamento por utilizar duas temperaturas de fusão, cada uma com exatos  $10^\circ\text{C}$  abaixo das duas  $T_m$  aferidas, ou seja, as temperaturas de fusão utilizadas foram  $48^\circ\text{C}$  e  $52^\circ\text{C}$ . Um fato concreto a ser destacado é que ensaios repetidamente realizados com apenas 1 etapa de anelamento (1 step) a uma dada temperatura envolvendo esses oligonucleotídeos universais não foi capaz de amplificar os três fragmentos em uma mesma reação. Estes ensaios foram conferidos a diferentes temperaturas e diferentes intervalos de tempo. Em alguns casos esporádicos, foi constatado a presença de 2 amplicons fracos e mal definidos que não demonstravam repetibilidade quando refeitos nas mesma condições. Portanto, a utilização de duas etapas de anelamento (2 steps), consistiu de importância fundamental para o funcionamento da reação.

A figura 6, a seguir, mostra as três regiões amplificadas pelos oligonucleotídeos universais em cinco espécies de *Candida*. Deve-se perceber que o fragmento maior sempre

representa a região amplificada ITS1-5.8S-ITS2, e que os dois fragmentos menores correspondem às regiões ITS1 e ITS2.

Para a confirmação da confiabilidade dos fragmentos amplificados pelas estratégias de PCR adotadas, foi feito um controle positivo, com os três fragmentos da região ITS1 -5.8S-ITS2 sendo amplificados, cada qual, e separadamente, por um único par de oligonucleotídeos, respectivamente: *ITS1//ITS4*; *ITS1//ITS2*; *ITS3//ITS4* (ver figura 6).

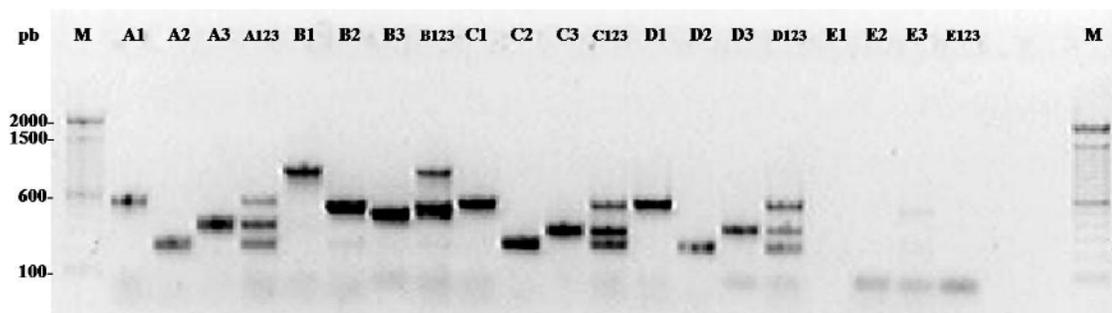


**Figura 6.** PCR realizado com a combinação dos oligonucleotídeos universais *ITS1*, *ITS2*, *ITS3*, e *ITS4*, demonstrando as três bandas características do rDNA (ITS1-5.8S-ITS2; ITS1; e ITS2) de 1-*C. albicans*, 2-*C. parapsilosis*, 3-*C. glabrata*, 4-*C. tropicalis*, e 5-*C. krusei*. M- marcador de tamanho molecular de 100pb.

Na figura 6, acima, com exceção de *C. glabrata* (poço 3), todos os amplicons localizados na parte mais superior do gel são fragmentos referentes à região ITS1-5.8S-ITS2; os localizados no centro são referentes à região ITS2; e as localizadas na parte mais inferior, referentes à região ITS1. Em *C. glabrata*, apesar de o amplicon superior ser, também,

referente à região ITS1-5.8S-ITS2, o amplicon localizado na parte central é referente à região ITS1 e o inferior, à região ITS2. Maiores detalhes são explanados a seguir (e apartados na tabela 11).

A figura 7, a seguir, permite comparar e corroborar os amplicons gerados em PCRs independentemente com os amplicons gerados em uma mesma PCR.



**Figura 7.** Fragmentos (ITS1-5.8S-ITS2; ITS1; e ITS2) amplificados independentemente pelos oligonucleotídeos universais *ITS1*, *ITS2*, *ITS3*, e *ITS4* e unidos em um mesmo poço. *C. albicans*: A1- ITS1-5.8S-ITS2; A2- ITS1; A3- ITS2; A123- ITS1-5.8S-ITS2, ITS1 e ITS2. *C. glabrata*: B1- ITS1-5.8S-ITS2; B2- ITS1; B3- ITS2; B123- ITS1-5.8S-ITS2, ITS1 e ITS2. *C. tropicalis*: C1- ITS1-5.8S-ITS2; C2- ITS1; C3- ITS2; C123- ITS1-5.8S-ITS2, ITS1 e ITS2. *C. parapsilosis*: D1- ITS1-5.8S-ITS2; D2- ITS1; D3- ITS2; D123- ITS1-5.8S-ITS2, ITS1 e ITS2. *C. krusei*: E1- ITS1-5.8S-ITS2; E2- ITS1; E3- ITS2; E123- ITS1-5.8S-ITS2, ITS1 e ITS2. M- marcador de tamanho molecular de 100pb.

As cinco seqüências ITS1-5.8S-ITS2 (NW139715-*Ca*; AY939793-*Cg*; AY939810-*Ct*; AY939803-*Cp*, e AY939808-*Ck*), utilizadas neste trabalho para a investigação de oligonucleotídeos e sítios de restrição, foram analisadas quanto à geração de fragmentos produzidos pelos oligonucleotídeos universais. Todos os fragmentos mensurados pela análise direta dessas seqüências corroboram com as observadas na figura 6; uma relativa exceção é feita à região ITS1 de *C. krusei*, amplificada pelos oligonucleotídeos *ITS1* e *ITS2* (compare os valores previstos na tabela 12, a seguir, com o comprimento das bandas de *C. krusei*, na figura 6).

É bastante provável que esta região possua a região ITS1 de comprimento muito parecido ao de *C. albicans*, *C. tropicalis* e/ou *C. parapsilosis*, ou seja, aproximadamente 220 pares de bases. Esta hipótese foi sugerida pelo fato de que as raras seqüências de *C. krusei* (*Issatchenkia orientalis*), encontradas no "Genbank", não apresentam confiabilidade, pois além de poucas, se encontram bastante corrompidas e imprecisas (variáveis) quanto ao tamanho dos segmentos, se comparado às seqüências das demais espécies. É bem provável que a seqüência de *C. krusei* utilizada neste trabalho para o desenho de oligonucleotídeos espécie-específicos e para a geração do mapa de restrição se encontre incompleta, ou seja, algumas bases aminadas (púricas ou pirimídicas) podem estar "desfalcando" esta seqüência.

**Tabela 12.** Fragmentos gerados pelos oligonucleotídeos universais para *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, e *C. krusei*.

Pares de oligonucleotídeos	Região amplificada	Fragmentos gerados pela combinação dos oligonucleotídeos universais				
		<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>
<i>ITS1 – ITS4</i>	ITS1-5.8S-ITS2	536pb	881pb	526pb	520pb	509pb
<i>ITS1 – ITS2</i>	ITS2	218pb	482pb	218pb	229pb	182pb
<i>ITS3 – ITS4</i>	ITS3	338pb	419pb	328pb	311pb	347pb

Generalizando os dados das figuras 6 e 7 pode ser verificado que o fragmento gerado pelos oligonucleotídeos *ITS1* e *ITS4* (ITS1-5.8S-ITS2) é capaz de diferenciar, com segurança, apenas a espécie *C. glabrata*, em relação às outras quatro espécies de *Candida*, quando analisado em gel de agarose. De modo semelhante, os fragmentos gerados pelos oligonucleotídeos *ITS1* e *ITS2* (ITS1), e *ITS3* e *ITS4* (ITS2) são capazes de diferenciar, com segurança, também, apenas a espécie *C. glabrata*, em relação às outras quatro espécies de *Candida*, quando analisadas em gel de agarose.

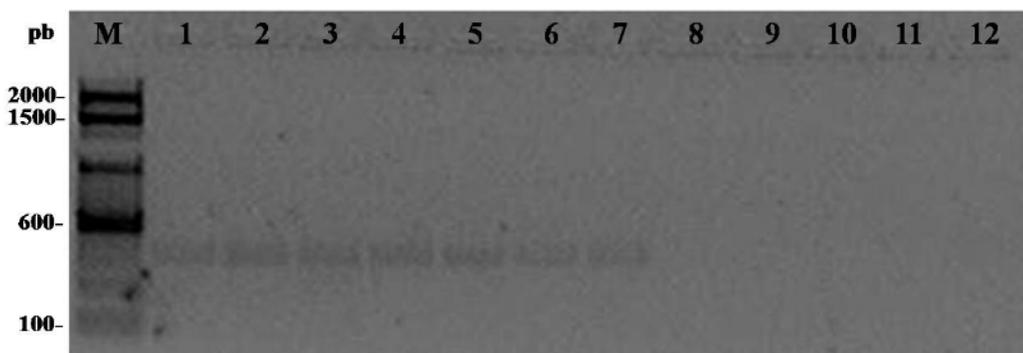
Sugere-se haver possibilidade de exploração da diferenciação de algumas espécies pela diferença de tamanho desses fragmentos em uma malha mais densa de um gel de

poliacrilamida ( $\geq 12\%$  de acrilamida), dada a pequena diferença existente entre os fragmentos.

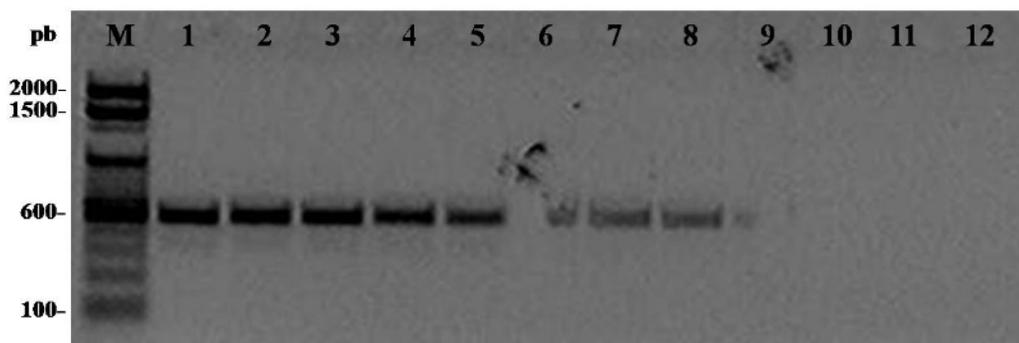
Um outro fato importante a ser destacado seria a ocorrência de “possíveis” polimorfismos de comprimentos (inserção ou deleção) ou de único nucleotídeo (SNP, do inglês **S**ingle **N**ucleotide **P**olimorfism) existentes na região ITS1-5.8S-ITS2 de uma mesma espécie. Pois, estes eventos, ainda que de ocorrência significativa bastante rara para isolados de uma mesma espécie (excluindo-se o caso de deriva genética), tornaria dificultoso o processo de identificação (rever “evolução em concerto”, seção 3.5).

### 5.5 Identificação de *Candida* por Oligonucleotídeos Espécie-Específicos

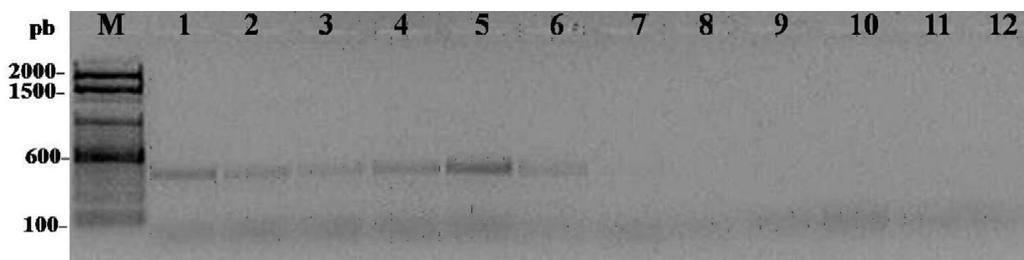
Os resultados da PCR com gradiente de temperatura para *C. albicans* demonstrou uma amplificação na faixa de 47°C a 57,8°C; para *C. glabrata*, entre 47°C a 60,5°C; para *C. tropicalis*, entre 47°C e 57,8°C; para *C. parapsilosis*, entre 47°C e 67,5°C; e para *C. krusei*, entre 47°C e 60,5°C (fig. 8, 9, 10, 11, 12, respectivamente). Os 12 valores de temperatura testados se encontram descritos na seção 4.3.8.1.



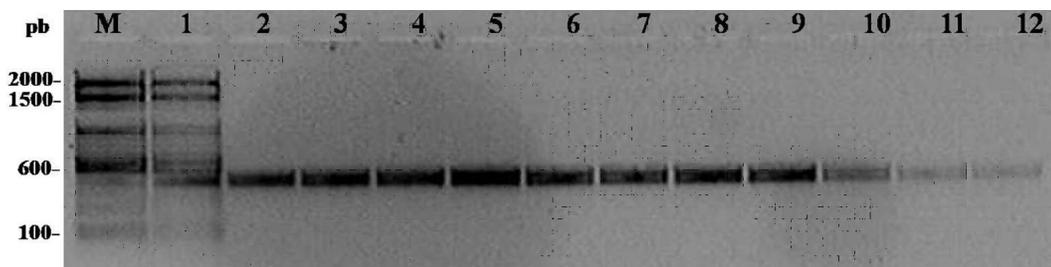
**Figura 8.** PCR-gradiente realizado para o par de oligonucleotídeos *CaF//CaR*, em *C. albicans* PCT-535. Poços: 1-47,0°C; 2-47,3°C; 3-48,4°C; 4-50,2°C; 5-52,5°C; 6-55,1°C; 7-57,8°C; 8-60,5°C; 9-63,0°C; 10-65,1°C; 11-66,7°C; 12-67,5°C. M- marcador de tamanho molecular de 100pb.



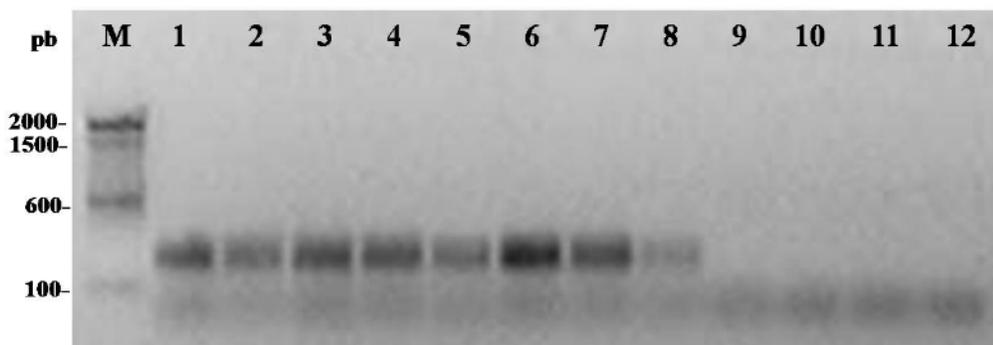
**Figura 9.** PCR-gradiente realizado para o par de oligonucleotídeos *CgF//CgR*, em *C. glabrata* PCT-213. Poços: 1-47,0°C; 2-47,3°C; 3-48,4°C; 4-50,2°C; 5-52,5°C; 6-55,1°C; 7-57,8°C; 8-60,5°C; 9-63,0°C; 10-65,1°C; 11-66,7°C; 12-67,5°C. M- marcador de tamanho molecular de 100pb.



**Figura 10.** PCR-gradiente realizado para o par de oligonucleotídeos *CtF//CtR*, em *C. tropicalis* PCT-505. Poços: 1-47,0°C; 2-47,3°C; 3-48,4°C; 4-50,2°C; 5-52,5°C; 6-55,1°C; 7-57,8°C; 8-60,5°C; 9-63,0°C; 10-65,1°C; 11-66,7°C; 12-67,5°C. M- marcador de tamanho molecular de 100pb.



**Figura 11.** PCR-gradiente realizado para o par de oligonucleotídeos *CpF//CpR*, em *C. parapsilosis* PCT-611. Poços: 1-47,0°C; 2-47,3°C; 3-48,4°C; 4-50,2°C; 5-52,5°C; 6-55,1°C; 7-57,8°C; 8-60,5°C; 9-63,0°C; 10-65,1°C; 11-66,7°C; 12-67,5°C. M- marcador de tamanho molecular de 100pb.



**Figura 12.** PCR-gradiente realizado para o par de oligonucleotídeos *CkF//CkR*, em *C.krusei* PCT-740. Poços: 1-47,0°C; 2-47,3°C; 3-48,4°C; 4-50,2°C; 5-52,5°C; 6-55,1°C; 7-57,8°C; 8-60,5°C; 9-63,0°C; 10-65,1°C; 11-66,7°C; 12-67,5°C. M- marcador de tamanho molecular de 100pb.

Dentre o espectro de temperatura onde foi observada amplificação, foi tendenciada uma média em torno dos sete primeiros valores de temperatura (47°C ↔ 57,8°C). Este procedimento foi levado em consideração essencialmente para quatro espécies, já que em *C. parapsilosis* houve amplificação nas doze temperaturas testadas. Como resultado deste procedimento, a temperatura média, para amplificação de qualquer um dos pares de oligonucleotídeos espécie-específicos, por PCR, encerrou-se em 52°C, sendo este o valor normatizado como temperatura de hibridização ( $T_m$ ).

A identidade dos 106 isolados de *Candida* (ver seção 4.2.1) foi confirmada com êxito pelos oligonucleotídeos espécie-específicos. Entretanto, a cepa de PCT-214, identificada pelo kit Candifast® (International Microbio) como *C. krusei*, foi molecularmente caracterizada como *C. glabrata*, pelo par de oligonucleotídeo *CgF//CgR* (oligonucleotídeo espécie-específico capaz de amplificar somente segmento do rDNA de *C. glabrata*). A cepa PCT-241, identificada pelo kit como *C. albicans*, foi molecularmente caracterizada como *C. glabrata*, pois não gerou amplicon quando da reação com o par de oligonucleotídeos *CaF//CaR*, fato que não ocorreu com o par *CgF//CgR*. O uso deste último gerou amplificação do fragmento

característico de *C. glabrata*. A cepa PCT-011, até então não identificada, foi caracterizada pelo par de oligonucleotídeos *CaF//CaR* como sendo *C. albicans*.

Os oligonucleotídeos espécie-específicos não amplificaram DNA genômico de cepas não condizentes à sua especificidade (controle indicador de especificidade dos oligonucleotídeos espécie-específicos).

Pelos resultados acima descritos, é possível sugerir que os oligonucleotídeos espécie-específicos apresentam uma maior especificidade do que os métodos de assimilação de carboidratos, utilizados pela maioria dos “kits” comerciais. Estes últimos necessitam de colônias rigorosamente isoladas e purificadas, fato este que é, na maioria dos casos, o grande responsável pela geração de resultados errôneos e imprecisos dos kits.

Ao contrário, o método de identificação, por PCR, utilizando os oligonucleotídeos espécie-específicos para as espécies *Candida* encontradas na mucosa vulvovaginal não necessitam de tais cuidados. Por mais que quaisquer das cinco espécies de *Candida* que estejam no meio de extração de DNA e tenham tido o seu material genético misturado com as demais, a especificidade do par de oligonucleotídeos o permite hibridizar com seu genoma específico e promover amplificação do fragmento característico<sup>17</sup>.

A análise de similaridade entre a única seqüência ITS1-5.8S-ITS2 de *C. albicans* var. *Stellatoidea* adquirida (AJ853768) e a seqüência NW139715 de *C. albicans* (matriz de similaridade não mostrada neste trabalho) apresentaram uma identidade de 0,997, não demonstrando, dessa forma,, diferença estatística significativa (as seqüências são praticamente idênticas/similares). Desta forma, sugere-se que o par de oligonucleotídeo

---

<sup>17</sup> Cada um dos cinco pares de oligonucleotídeos demonstraram ser estritamente específicos para o genoma de sua respectiva espécie de *Candida*, mesmo na presença de material genético das outras espécies como contaminante (contaminantes genéticos de outras espécies de *Candida* não relacionadas à mucosa vulvovaginal e de outros organismos necessitam ser melhor de terminados/definidos experimentalmente quanto a sua interferência ou não na especificidade da reação).

*CaF//CaR* também é capaz de identificar *C. albicans* var. *Stellatoidea*<sup>18</sup>. Entretanto, para a confirmação desta variedade de *C. albicans*, métodos envolvendo de assimilação e carboidratos devem ser realizados (*C. albicans* var. *Stellatoidea* é sacarose negativa).

Neste trabalho, nenhum isolado de *C. albicans* var. *Stellatoidea*, capaz de ser identificado pelo “kit” Candifast<sup>®</sup>, foi encontrado nas amostras vulvovaginais coletadas.

Em avaliação dos subgrupos de *C. albicans*, McCULLOUGH, et al. (1999), discutem a especulação que existe sobre uma possível existência, defendida por alguns taxonomistas, de dois subgrupos *Stellatoidea* (*C. albicans* var. *Stellatoidea* tipo I e tipo II, com o tipo II apresentando o fenótipo *sacarose-negativo*). Embasados por dados moleculares realizados com o “possível tipo I”, McCULLOUGH, et al. (1999) argumentam que esta não merece status de espécie, devendo portanto ser enquadrada como *C. albicans*.

Um outro fato importante a ser comentado é a respeito dos três subgrupos de *C. parapsilosis*: grupo I, grupo II, e grupo III, e que juntos formam o que se costuma chamar de “complexo *Candida parapsilosis*”. A diferença destes grupos está baseada em diferenças cariotípicas, evidenciadas por perfil isoenzimático e de RAPD, que subdividem essa espécie em três grandes grupos até o momento. Lin et al. (1995), em análise do gene rRNA 5.8S e suas regiões ITS adjacentes (ITS1 e ITS2), confirmou a alta similaridade destas regiões entre os três grupos de *C. parapsilosis*. De acordo com as análises realizadas por esse autor, ficou evidenciado uma similaridade de 100% do gene rRNA 5.8S entre todos os três grupos de *C. parapsilosis*. Para a região ITS1 foi constatada uma similaridade de 87,7% entre os grupos I e II; 84,5% entre os grupos II e III; e 82,1% entre os grupos I e III. Para a região ITS2 foi constatada uma similaridade de 99,6% entre os grupos I e II; 97,6% entre os grupos II e III; e 97,2% entre os grupos I e III. As poucas diferenças existentes nas regiões ITS dos três grupos correspondem a algumas mutações pontuais espalhados nessas seqüências, seguidas de uma

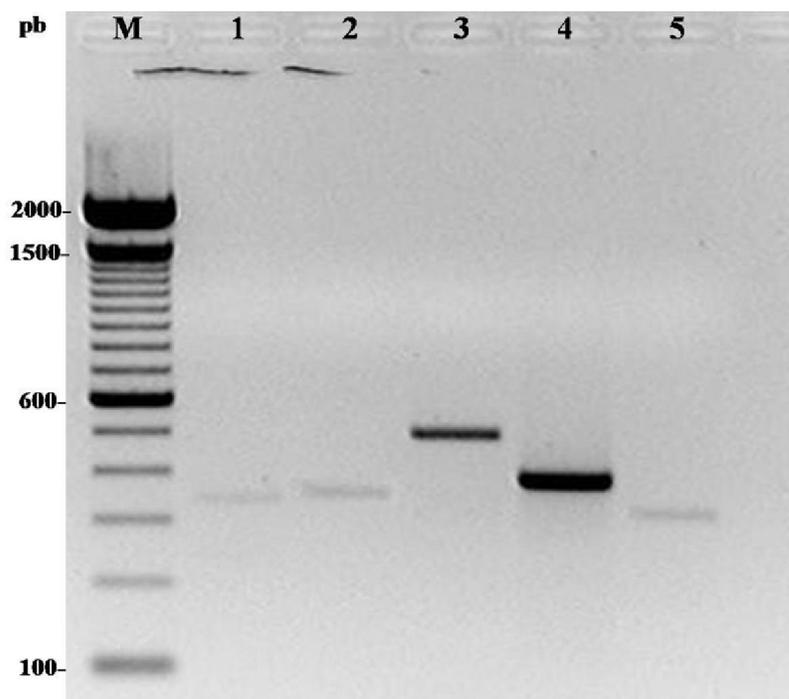
---

<sup>18</sup> *C. albicans* var. *Stellatoidea* difere de *C. albicans* pela incapacidade de assimilar sacarose (sac-), enquanto esta última o faz, sendo, portanto, a diferenciação entre elas ser feita pela análise da assimilação deste carboidrato.

ou outra deleção nucleotídica. Desta maneira, estes dados viabilizam as regiões ITS como propícias ao uso de marcadores moleculares com potencial espécie-específico para a identificação de *C. parapsilosis*, pois são capazes de restringir os três grupos (ou três genótipos) em um único táxon.

Pela avaliação feita nas próprias seqüências utilizadas por Lin et al. (1995), o oligonucleotídeo *CaF* (21pb), desenvolvido neste trabalho para a identificação de *C. parapsilosis*, hibridiza em toda a sua extensão apenas nas seqüências ITS1 do grupo I. Nesta mesma região de hibridização nos grupos II e III existem bases que divergem das do grupo I, além da presença de “gaps” (lacunas, buracos, resultados da deleção/exclusão de nucleotídeos). Diferentemente de *CaF*, o oligonucleotídeo *CaR* hibridiza por completo nas seqüências ITS2 de todos os três grupos (I, II e III), ou seja ele é capaz de amplificar indiferentemente os três grupos de *C. parapsilosis*.

A figura 13, a seguir, destaca os produtos da PCR obtidos com cada um dos cinco pares de oligonucleotídeos espécie-específicos.



**Figura 13.** Amplicons da PCR realizada com oligonucleotídeos espécie-específicos em gel de agarose 2% contendo brometo de etídeo 0,5µg/mL. 1- *C. albicans* PCT-535. 2- *C. parapsilosis* PCT-611. 3- *C. glabrata*. PCT-213. 4- *C. tropicalis* PCT-505. 5- *C. krusei* PCT-740. M- marcador de tamanho molecular de 100pb.

Pela análise dos amplicons, é possível afirmar que todos corroboraram perfeitamente com as previsões realizadas sobre os fragmentos gerados para os respectivos oligonucleotídeos espécie-específicos, e que se apresentam descritas na tabela 4, da seção 5.2.1. Estes amplicons apresentam diferenças de tamanho que variam de um mínimo de ~310pb (para *C. krusei*) a um máximo de ~490pb (para *C. glabrata*). Os amplicons de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, e *C. parapsilosis* apresentam tamanhos relativamente próximos (~335pb, ~383pb, ~310pb, ~351pb, respectivamente), o que dificultaria a interpretação de um “Multiplex-PCR” em gel de agarose, isto difere para *C. glabrata* (~490pb).

De modo semelhante à análise feita para os amplicons obtidos com os oligonucleotídeos universais, sugere-se que a pequena diferença de tamanho entre os

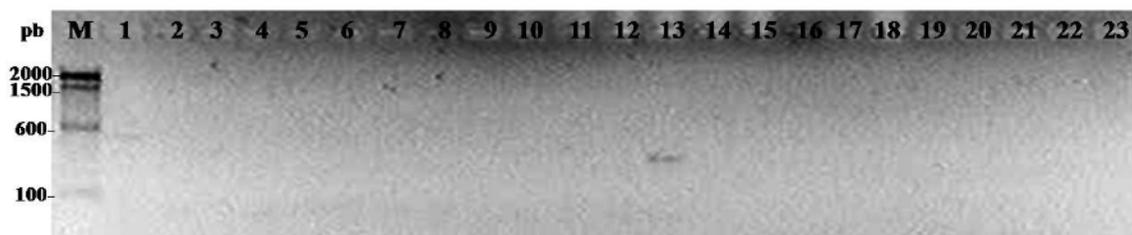
amplicons obtidos com os oligonucleotídeos espécie-específicos pode ser melhor explorada utilizando-se géis de poliacrilamida. Esta concepção, baseia-se no desenvolvimento futuro de um sistema “Multiplex-PCR”, que viabilize a utilização de todos os oligonucleotídeos espécie-específicos em um único sistema reacional, e que dispense a utilização de cinco reações de PCR (cada uma contendo um par específico para a identificação de uma *Candida*) para cada *Candida* que se deseje identificar. É bom salientar que a utilização de géis de poliacrilamida tornariam os procedimentos mais laboriosos do que se fosse m utilizados géis de agarose.

### 5.5.1 PCR direto de colônia

A tentativa de realização de uma PCR diretamente a partir de colônias de *Candida*, por meio da técnica descrita por Martin et al. (2000), e também sobre as adaptações experimentais realizadas sobre esta, não logrou êxito, não sendo amplificados nenhum fragmento (pelo menos visualmente, em gel de agarose). Este insucesso sugere que o NaOH ou o EDTA, da solução de lise, podem ter inibido a ação/funcionamento da DNA polimerase, na reação. Outra hipótese também sugere que “debris” (do inglês Debris: restos, fragmentos) celulares e/ou componentes endógenos (ainda quimicamente ativos) das próprias leveduras lisadas pelo calor, podem ter tido/desempenhado este mesmo efeito.

A tentativa de realização de uma PCR diretamente a partir de colônias de *Candida*, adaptada da técnica descrita por Freschi et al. (2005), para *Salmonella*, obteve resultados insatisfatórios. O termo “resultados insatisfatórios”, usado aqui, traduz-se por uma ineficiência de amplificação, ou seja, bandas fracas foram visualizadas no gel de agarose, ora para algumas cepas, ora para nenhuma (figura 14). O insucesso dessas amplificações nos

remete à mesma sugestão feita sobre os resultados do experimento anterior, ou seja, sugere-se que debris celulares e/ou componentes endógenos (ainda quimicamente ativos) das próprias leveduras lisadas pelo calor, podem ter tido/desempenhado um efeito inibitório sobre a DNA polimerase, na reação. Uma alternativa sugerida para minimizar esta ineficiência seria a realização de um “Nested-PCR” ou “Seminested-PCR”. Entretanto, esta sugestão se tornaria dispendioso para locais/laboratórios que apresentem uma oferta diária de material clínico, com suspeita de candidíase, muito grande.



**Figura 14.** PCR direto de colônia. 1- *C. glabrata* PCT-214. 2- *C. glabrata* PCT-380. 3- *C. glabrata* PCT-599. 4- *C. glabrata* MO-131. 5- *C. glabrata* PMO-158. 6- *C. parapsilosis* PCT-727. 7- *C. parapsilosis* PCT-342. 8- *C. parapsilosis* PCT-109. 9- *C. parapsilosis* PMO-107. 10- *C. parapsilosis* PMO-246. 11- *C. tropicalis* PCT-721. 12- *C. tropicalis* PCT-716. 13- *C. tropicalis* PCT-433. 14- *C. tropicalis* PMO-037. 15- *C. tropicalis* PMO-157. 16- *C. albicans* PCT-056. 17- *C. albicans* PCT-038. 18- *C. albicans* PCT-105. 19- *C. albicans* PMO-026. 20- *C. albicans* PMO-011. 21- *C. albicans* PCT-535. 22- *C. krusei* PCT-275. 23- *C. krusei* PCT-740. M- Marcador de tamanho molecular 100pb. Gel de agarose 2% contendo brometo de etídeo 0,5µg/mL.

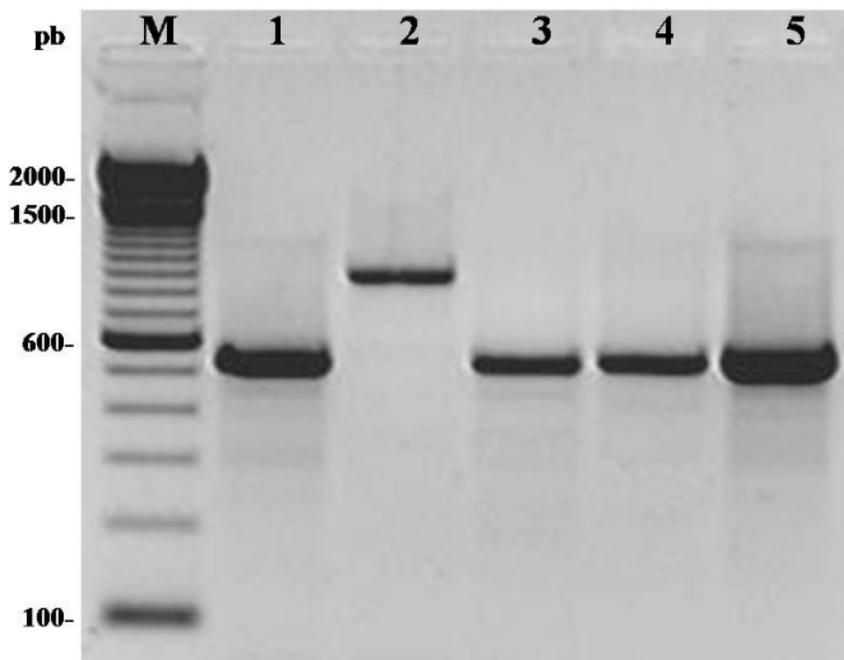
Na figura 14, acima, é possível visualizar, ainda que discretamente, uma banda fraca no poço 1, correspondente à *C. glabrata* PCT-214 e uma no poço 13, correspondente à *C. tropicalis* PCT-433 (este PCR utilizou 2µL de amostra). Este experimento foi refeito 3 vezes, em um (o que utilizou 5µL de amostra) não foi observado nenhuma banda, ainda que fraca, em outro (o que utilizou 2µL de amostra), observou-se uma banda para *C. tropicalis* PMO-037 e outra para *C. albicans* PCT-105. É perceptível (ainda que seja precoce afirmar) que quanto maior o volume de amostra bruta de DNA molde utilizada (5 µL), maior o grau de

inibição da PCR, ao contrário, com menos amostra bruta de DNA molde utilizada (2 $\mu$ L), menor o grau de inibição da PCR (presença de algumas bandas). Isto reitera o que já foi sugerido em parágrafos anteriores sobre a ineficiência da PCR como causa da péssima qualidade do DNA molde (advindo do extrato bruto de leveduras lisadas pelo calor).

Um fato positivo a ser considerado é que a realização de uma PCR diretamente a partir de colônias proporcionaria uma economia de recursos, pela não-necessidade de aquisição de reagentes necessários à extração convencional de DNA genômico das leveduras, bem como a eximção dos técnicos de laboratório ao manusear tais substâncias tóxicas.

### **5.6 Identificação de *Candida* por PCR-RFLP**

A figura 15, a seguir, destaca a região amplificada ITS1-5.8S-ITS2 de cinco espécies de *Candida* antes da digestão. Os amplicons foram separados em gel de agarose 2%.



**Figura 15.** Amplicons da região ITS1-5.8S-ITS2, amplificados pelo par de oligonucleotídeos *ITS1* e *ITS4*. 1- *C. albicans* PCT-535. 2- *C. glabrata* PCT-213. 3- *C. tropicalis* PCT-505. 4- *C. parapsilosis* PCT-611. 5- *C. krusei* PCT-740. M- marcador de tamanho molecular de 100 pb.

A digestão dos amplicons ITS1-5.8S-ITS2 das espécies de *Candida* com as enzimas *Bse*YI e *Hae*III não pôde ser visualizada em gel de poliacrilamida 12%. No lugar dos fragmentos esperados, foi observado nos géis um constante “rastros” (smears), sem a nítida presença de bandas. Isto sugere em uma falta de padronização, ainda necessária, para a digestão dos produtos de PCR e/ou mesmo, na necessidade de uma purificação destes produtos (como descrito na seção 4.3.9.2, 10µL dos produtos de PCR eram utilizados diretamente como amostra para a digestão). Um dos possíveis fatores dessa “falta de padronização” promove indícios sobre o tempo excessivo pelo qual se procedeu a digestão das amostras, ou seja, as 16 horas usadas (overnight). Esse período prolongado de digestão pode ter diminuído a especificidade das enzimas, ocasionando a degradação total do DNA.

Ajustes futuros serão padronizados para uma melhor conduta deste processo.

## 6 CONCLUSÃO

1- A análise intra-específica das seqüências ITS1-5.8S-ITS2 das espécies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* demonstraram ser estas bem conservadas. De forma contrária, a análise interespecífica destas seqüências as demonstrou serem divergentes. Estas características indiciam-nas como boas regiões para o desenvolvimento de marcadores espécie-específicos.

2- A identificação realizada com os oligonucleotídeos universais demonstrou serem estes não apropriados, ou seguros, do ponto de vista da análise de amplicons, para a identificação das espécies de *Candida* abordadas neste trabalho.

3- Os oligonucleotídeos espécie-específicos se mostraram altamente eficientes (de alta especificidade) na identificação das cepas de *Candida* utilizadas neste trabalho.

4- Pelas poucas, e ao mesmo tempo, baixa qualidade das seqüências de *C. krusei*, adquiridas no NCBI, sugere-se o seqüenciamento de diversos isolados (com a preferência de que sejam provenientes de regiões distintas) para uma melhor análise do par de oligonucleotídeo *CkF//CkR* desenvolvido (apesar de estes terem desempenhado, na prática, suas funções perfeitamente).

5- A análise dos sítios de restrição interespecíficos permitiu selecionar duas enzimas (*Bse* e *Hae*) que podem vir a desempenhar um papel promissor para a diferenciação, por PCR-RFLP (geração de fingerprint), das cinco espécies de *Candida* isoladas da mucosa vaginal.

Ensaio e delineamentos experimentais ainda serão necessários para padronização da técnica e confirmação da representatividade destes sítios enzimáticos.

6- A análise dos sítios de restrição intra-específicos permitiu definir, para cada espécie de *Candida*, enzimas espécie-específicas que podem vir a ser utilizadas como um viés para a diferenciação e/ou confirmação destas, frente a um impasse diagnóstico. Ensaio e delineamentos experimentais futuros serão realizados para a confirmação da representatividade e uso destas enzimas.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ADAD, S.J. et al. Frequency of *Trichomonas vaginalis*, *Candida* sp. and *Gardnerella vaginalis* in cervical-vaginal smears in four different decades. *São Paulo Med J*, v. 119, p. 200-205, 2001.

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

AUSUBEL, F.M. et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Green Publishing Associates and Wiley-Inter-Science, 1994. Supplenet 27, section-IV, pp. 13.11.1-13.11.4

BACHELLERIE, J.P.; CAVAILLÉ, J. Small nucleolar RNAs guide the ribose methylations of eukaryotic rRNAs. In: Grosjean, H.; Benne, R. (ed.). *Modification and editing of RNA*. Washington, D.C: ASM Press, , 1998. p. 255 –272.

BARIOLLO, M.F.G. et al. Ferramentas moleculares para caracterização de *Candida albicans* (Robin) Berkhout (1923) em estudos Epidemiológicos. *Estud. Biolog*, v. 27(58), p. 21-47, 2005.

BEN-YAACOV, R. et al. *Candida albicans* gene encoding resistance to benomyl and methotrexate is a multidrug resistance gene. *Antimicrob. Agents Chemoter.*, v. 38, p. 648-652, 1994.

BENNETT, J. Fármacos antimicrobianos. In: GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. As bases farmacológicas da terapêutica. 9.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1996. p. 864-875.

BRESLAUER, K.J. et al. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 83, 1986, p. 3746-3750.

BEVEN, A.F. et al. The organization of ribosomal RNA processing correlates with the distribution of nucleolar snRNAs. Journal of Cell Science, v. 109, p. 1241-1251, 1996.

CARVALHO, L.P. et al. Avaliação da resposta imune celular em pacientes com candidíase recorrente. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 36(5), 571-576, 2003.

CHAU, A.S. et al. Application of real-time quantitative PCR to molecular analysis of *Candida albicans* strains exhibiting reduced susceptibility to azoles. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 48(6), p. 2124-2131, 2004.

CHEN, Y.C. et al. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. J Clin. Microbiol., v. 38, p. 2302-2310, 2000.

CIRAK, M.Y.; KALKANCI, A.; KUSTIMUR, S. use of molecular methods in identification of *Candida* species and evaluation of fluconazole resistance. Mem. Inst. Oswaldo Cruz., v. 98, p. 1027-1032, 2003.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica. 2. ed. Vol. 17, nº 15. Traduzido e disponibilizado pela ANVISA, 2005.

COIGNARD, C. et al. Resolution of discrepant results for *Candida* species identification by using DNA probes. J Clin. Microbiol., v. 42, p. 858-861, 2004.

COLOMBO, A.L. Contribuições para o entendimento da epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida spp.* e para sua abordagem terapêutica. 2003. Tese (Livre-Docência) – Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida spp.* Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 36(5), p. 599 -607, 2003.

CONSOLARO, M.E.L. et al. Correlation of *Candida* species and symptoms among patients with vulvovaginal candidiasis in Maringá, Paraná, Brazil. Rev Iberoam Micol, v. 21, p. 202-205, 2004.

COWEN, L.E. et al. Population genomics of drug resistance in *Candida albicans*. PNAS, v. 99(14), p.9284-9289, 2002.

EDMAN, J.C. Micologia médica. In: JAWETZ, E.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A. Microbiologia médica. Rio de Janeiro, 1998. p. 420-443.

ELDER-JÚNIOR, J.F.; TURNER, B.J. Concerted evolution of repetitive DNA in eukaryotes. *Q. Ver. Biol.*, vol, 70, p. 297 -320, 1995.

ELLEPOLA, A.N.B.; MORRISON, C.J. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *The Journal of Microbiology*, v. 43, n. S (special issue), p. 65 -84, 2005.

ELLEPOLA, A.N.B. et al. Rapid and unequivocal differentiation of *Candida dubliniensis* from other *Candida* species using species-specific DNA probes: comparison with phenotypic identification methods. *Oral. Microbiol. Immunol.*, v. 18, p. 379 -388, 2003.

ELLIE, C.M. et al. Rapid identification of *Candida* species using species-specific DNA probes. *J Clin. Microbiol.*, v. 36, p. 3260-3265, 1998.

FERRAZA, M.H.S.H. et al. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. *Ver Brás Ginecol Obstet*, v. 27(2), p. 58-63, 2005.

FRADE, J.P.; WARNOCK, D.W.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.A. Rapid quantification of drug resistance gene expression in *Candida albicans* by reverse transcriptase lightcycler PCR and fluorescent probe hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42(5), p. 2085 -2093, 2004.

FRANZ, R.; MICHEL, S.; MORSCHHAUSER, J. A fourth gene from the *Candida albicans* *CDR* family of ABC transporters. *Gene*, v. 39, p. 422-426, 1998.

FRESCHI, C.R.; CARVALHO, L. F. O. S.; OLIVEIRA, C. J. B. Comparison of DNA - extraction and selective enrichment broths on the detection of *Salmonella typhimurium* in swine feces by polymerase chain reaction (PCR). Brazilian Journal of Microbiology, v. 36, p. 363-367, 2005.

GAUR, N.A. et al. Expression of the *CDR1* efflux pump in clinical *Candida albicans* is controlled by a negative regulatory element. Biochemical and biophysical research communications, v. 332, p. 206-214, 2005.

GODOY, et al. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida spp.* Bloodstream isolates from Latin American hospitals. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 98(3), p. 401-405, 2003.

GOLDWAY, M. et al. Multidrug resistance in *Candida albicans*: disruption of the *BEN<sup>r</sup>* gene. Antimicrob. Agents Chemother., v. 39, p. 422 -426, 1995.

GOMPERTZ, O.F. et al. Micoses oportunisticas e outras micoses. In: TRABULSI, L.R. et al. Microbiologia. São Paulo, 2000. p. 413 -419.

GUIVER, M.; LEVI, K.; OPPENHEIM, B.A. Rapid identification of *Candida* species by TaqMan PCR. J Clin. Pathol., v. 54, p. 362 -366, 2001.

GUPTA, N. et al. Epidemiology and molecular typing of *Candida* isolates from burn patients. Mycopathologia, vol. 158, p. 397-405, 2004.

HALL, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis, program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95 -98.

HENRY, K.W.; NICKELS, J.T.; EDLIND, T.D. Upregulation of *ERG* genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 44, n. 10, p. 2693-2700, oct. 2000.

HUI, M. et al. Rapid identification of medically important *Candida* to species level by Polymerase chain reaction and single-strand conformational polymorphism. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., v. 38, p. 95-99, 2000.

JAEGER, E.E. et al. Rapid detection and identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Fusarium* species in ocular samples using nested PCR. J Clin. Microbiol., v. 38, p. 2902 - 2908, 2000.

KOHLI, A. et al. Specificity of drug transport mediated by *CaMDR1*: a mayor facilitator of *Candida albicans*. J. Biosci., v. 26, n. 3, p. 333-339, 2001.

KRESSLER, D.; LINDER, P.; CRUZ, J. Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and Cellular Biology, v.19(12), p.7897 - 7912, 1999.

KUMAR, M.; SHUKLA, P.K. Use of PCR targeting of internal transcribed spacer regions and single-stranded conformation polymorphism analysis of sequence variation in different

regions of rRNA genes in fungi for rapid diagnosis of mycotic keratitis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43(2), p. 662-668, 2005.

KURTZMAN, C.P.; ROBNETT, C.J. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large -subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J Clin. Microbiol.*, v. 35, p. 1216-1223, 1997.

LIN, D.; WU, L-C.; RINALDI, M.G.; LEHMANN, P.F. Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. *Journal of Clinical Microbiology*, v.33(7), p. 1815-1821, 1995.

LOEFFLER, J. et al. Identification of rare *Candida* species and other yeasts by Polymerase chain reaction and slot blot hybridization. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 38, p. 207-212, 2000.

LYONS, C.N.; WHITE, T.C. Transcriptional analyses of antifungal drug resistance in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 44(9), p. 2296-2303, 2000.

MADEN, B.E.H.; HUGHES, J.M.X. 1997. Eukaryotic ribosomal RNA: the recent excitement in the nucleotide modification problem. *Chromosoma* 105:391-400, 1997.

MANNARELLI, B.M.; KURTZMAN, C.P. Rapid identification of *Candida albicans* and other human pathogenic yeasts by using short oligonucleotides in a PCR. *J Clin. Microbiol.*, v. 36, p. 1634-1641, 1998.

MARCHETTI, O. et al. Fungicidal synergism of fluconazole and cyclosporine in *Candida albicans* is not dependent on multidrug efflux transporters encoded by the *CDR1*, *CDR2*, *CaMDR1*, and *FLU1* genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47(5), p. 1565 -1570, 2003.

MARTIN, C. et al. Development of a PCR-based line probe assay for identification of fungal pathogens. *J. Clin. Microbiol.*, v. 38, p. 3735 -3742, 2000.

MASSONET, C. et al. Comparison of VITEK 2 with ITS2-fragment length polymorphism analysis for identification of yeast species. *J. Clin. Microbiol.*, v. 42, p. 2209 -2211, 2004.

MATHIEU, M.C. et al. Aromatic hydrocarbon receptor (AhR).AhR nuclear translocator - and p53-mediated induction of the murine multidrug resistance *MDR1* gene by 3-methylcholanthrene and benzo(a)pyrene in hepatoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 276(7), p. 4819-4827, 2001.

MATSUMOTO, F.E. et al. Yeasts isolated from blood and catéter in children from a public hospital of São Paulo, Brasil. *Mycopathologia*, v. 154, p. 63 -69, 2001.

McCULLOUGH, M.J.; CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A. Molecular and Phenotypic Characterization of Genotypic *Candida albicans* Subgroups and Comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37(2), p. 417 -421, 1999.

MONTRAVERS, P.; JABBOUR, K. Clinical consequences of resistant *Candida* infections in intensive care. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 27, p. 1 -6, 2006.

MOYSÉS-NETO, M. et al. Candidíase em pacientes transplantados renais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 30(6), p. 485 -491, 1997.

NAHUM, L.A. Evolução dos genomas. In: MATIOLI, S. R. (ed.). *Biologia molecular e evolução*. São Paulo: Holos, 2004. p. 82-96.

OFENGAND, J.; FOURNIER, M.J. The pseudouridine residues of rRNA: number, location, biosynthesis, and function. In: H. Grosjean and R. Benne (ed.), *Modification and editing of RNA*. Washington, D.C.: ASM Press, 1998. p. 229 -253.

OSTROSKY-ZEICHNER, L. et al. Antifungal susceptibility survey of 2,000 boodstream *Candida* isolates in the united states. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47(10), p. 3149-3154, 2003.

PAIXÃO, G.C.; SIDRIM, J.J.C. Meios de cultura usados em micologia. In: SID RIM, J.J.C.; MOREIRA, J.L.B. *Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 247-254.

PAULA, R.A.; FERREIRA, W.J. PCRSYS: sistema aplicado à seleção de primers para reação em cadeia da polimerase. *UNOPAR Cient.*, v.2/3(1), p. 65-73, 2004.

ROCHA, M.F.G.; SIDRIM, J.J.C. Drogas antifúngicas. In: SIDRIM, J.J.C.; MOREIRA, J.L.B. Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 36-44.

ROSA, M.I.; RUMEL, D. Fatores associados à Candidíase Vulvovaginal: Estudo Exploratório. RBGO, v.26(1), p. 65-70, 2004.

RYCHLIK, W. Selection of primer for polymerase chain reaction. In: WHITE, B.A. Methods in molecular biology. Totowa, NJ: Humana Press, 1993, p. 31-40.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989.

SANDHU, G. et al. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. J Clin. Microbiol., v. 33, p. 2913-2919, 1995.

SANGLARD, D. et al. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. Antimicrob Agents Chemother, v. 39, p. 2378-2386, 1995.

SANGLARD, D. et al. Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. Microbiology, v. 143, p. 405-416, 1997.

SIDRIM, J.J.C. Micoses oportunistas. In: SIDRIM, J.J.C.; MOREIRA, J.L.B. Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1999. p. 171-191.

SIDRIM, J.J.C.; MOREIRA, J.L.B. Diagnóstico laboratorial das leveduras. In: SIDRIM, J.J.C.; MOREIRA, J.L.B. Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 247-254.

SILVA, J.O.; CANDIDO, R.C. Avaliação do sistema API 20C AUX na identificação de leveduras de interesse clínico. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 38(3), p. 261-263, 2005.

SOBEL, J.D. Candidal vulvovaginitis. Clin. Obst. Gynec., v. 36, p. 153-212, 1997.

TAVARES, W. Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1996. 792 p.

VOSS, A. et al. Occurrence of yeast bloodstream infections between 1987 and 1995 in five Dutch university hospitals. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, v. 15, p. 909-912, 1996.

WHITE, R.C. et al. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 46(6), p. 1704-1713, 2002.

WIRSCHING, S. et al. Activation of the multiple drug resistance gene *MDR1* in fluconazole-resistant, clinical *Candida albicans* strains is caused by mutations in a *trans*-regulatory factor. *Journal of Bacteriology*, v. 182(2), p. 400-404, 2000.

WIRSCHING, S. et al. MDR1-mediated drug resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45(12), p. 3416-3421, 2001.

WOOLFORD-JÚNIOR, J.L.; WARNER, J.R. The ribosome and its synthesis. In: BROACH, J. R.; PRINGLE, J. R.; JONES, E. W. (ed.). *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: genome dynamics, protein synthesis, and energetics*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991. p. 587-626.

WU, D.Y. The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA and Cell Biology*, v. 10(3), p. 233-238, 1991.