UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIFÚNGICOS DE LEVEDURAS ISOLADAS DO ARROIO DILÚVIO EM PORTO ALEGRE

ANA CAROLINA MEDEIROS MILANEZI

Orientadora: Prof.ª. Dr.ª Sueli Teresinha Van Der Sand

Porto Alegre
Abril/2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIFÚNGICOS DE LEVEDURAS ISOLADAS DO ARROIO DILÚVIO EM PORTO ALEGRE

Ana Carolina Medeiros Milanezi
Bacharela em Ciências Biológicas - UFRGS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia Ambiental

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Sueli T. Van Der Sand

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil
Abril/2016

CIP - Catalogação na Publicação

Milanezi, Ana Carolina Medeiros
Avaliação do perfil de resistência a antifúngicos de leveduras isoladas do Arroio Dilúvio em Porto Alegre / Ana Carolina Medeiros Milanezi. -- 2016.
67 f.

Orientadora: Sueli Teresinha Van Der Sand.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Leveduras. 2. Resistência a antifúngicos. 3. Arroio Dilúvio. 4. Diversidade. I. Van Der Sand, Sueli Teresinha, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof.ª Dr.ª Sueli T. Van Der Sand por toda a confiança e atenção depositada desde a época do TCC.

A minha colega de laboratório e amiga Marcela Proença Borba por todos os conselhos, desabafos, crises de choro, crises de risadas e principalmente por ser uma inspiração pra mim na microbiologia.

Ao meu aluno de iniciação científica João Paulo Duarte Witusk por toda a disposição, dedicação e autonomia dentro do projeto. A aluna de iniciação científica Ana Elisa Ballarini que tantas vezes me salvou nas contas e nas autoclaves.

As amigas Themis Collares, Mariana Bahlis e Luciana Milagre por tornarem o laboratório um ambiente ainda mais divertido, por dividirem as angústias, cafés e chocolates (e por elogiarem tanto minha caipirinha de uva).

A todos que dividiram o laboratório 209/323 comigo e se dedicaram tanto para que nossas pesquisas continuassem mesmo com todas as adversidades.

Aos meus amigos Alexis Kellermann, Gabriel Sffair e Thayná Mendes, que mostraram um mundo novo e me inspiram a me tornar a cada dia mais uma pessoa melhor.

A minha melhor amiga e pessoa Paula Martinelli Vieira da Rosa, simplesmente por existir.

As minhas irmãs e meus pais, que há oito anos possibilitam e apoiam minha carreira acadêmica, e compreendem minha ausência para torná-la possível.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIFÚNGICOS DE LEVEDURAS ISOLADAS DO ARROIO DILÚVIO EM PORTO ALEGRE

Milanezi, AM

Autor: Ana Carolina Medeiros Milanezi

Orientadora: Prof.ª. Dr.ª Sueli T. Van der Sand

RESUMO

A água é um recurso essencial a todas as formas de vida, e a forma como é explorada se reflete nos âmbitos sociais, econômicos e ambientais. A urbanização em torno de bacias hidrográficas é responsável por diversas alterações de serviços ecossistêmicos importantes. O Arroio Dilúvio, em Porto Alegre, é um importante afluente do Lago Guaíba, que por sua vez é a principal fonte hídrica de abastecimento da cidade. Ao longo da história o Arroio sofreu diversas modificações, além de intensa contaminação através da deposição de esgoto. O estudo da microbiota deste ambiente permite maior elucidação do efeito de contaminantes sobre a diversidade e manifestação de diferentes fenótipos. Leveduras são fungos unicelulares amplamente difundidos no ambiente, e estudos sugerem que há uma correlação positiva entre leveduras e ambientes aquáticos poluídos. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar a diversidade e a resistência à antifúngicos de leveduras isoladas de amostras de água coletadas ao longo do Arroio Dilúvio em Porto Alegre. Isolados de leveduras provenientes do Arroio Dilúvio foram submetidos a testes de suscetibilidade frente a antifúngicos através dos métodos de disco-difusão em ágar e ensaio de concentração inibitória mínima. Para a realização das técnicas moleculares, foi extraído o DNA genômico dos isolados para amplificação da região ITS1-5.8S-IT2 do rDNA utilizando os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4. A região ITS foi submetida a técnica de PCR-RFLP utilizando as endonucleases *Hinf*I, *Hae*III e *Cfo*I e o perfil de restrição permitiu a construção de um dendrograma. Os ensaios de suscetibilidade mostraram alta prevalência de resistência a antifúngicos da classe dos azóis. Dezesseis isolados exibiram resistência a anfotericina B, dos quais 14 foram submetidos ao sequenciamento da região ITS. A análise das sequências permitiu a identificação de leveduras do gênero *Candida*, incluindo as espécies potencialmente patogênicas *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, e do gênero *Debaryomyces.* A resistência a antifúngicos em leveduras do Arroio Dilúvio, reforça a importância de estudos da microbiota ambiental e indica que a degradação do ambiente influencia no fenótipo exibido.

[1]Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (67 p.) abril, 2016.

ANALYSIS OF ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY OF YEASTS ISOLATED FROM ARROIO DILUVIO, PORTO ALEGRE

Milanezi, AM

Author: Ana Carolina Medeiros Milanezi

Advisor: Prof. Dr. Sueli T. Van der Sand

ABSTRACT

Water is an essential resource to all forms of life, and the way it is exploited is reflected in the social, economic and environmental spheres. Urbanization around watershed is responsible for several important ecosystem service changes. In Porto Alegre, Arroio Dilúvio is an important component of Lake Guaiba, which in turn is the main water source of the city. Throughout history, Arroio Dilúvio underwent several changes, and it suffers with intense contamination by the deposition of sewage. The study of the environment's microbiota enables further elucidation of the effect of contaminants on diversity and expression of phenotypes. Yeasts are unicellular fungi widespread in the environment, and studies suggest that there is a positive correlation between yeast and polluted aquatic environments. The aim of this study was to analyze the diversity and resistance to antifungals of yeasts isolated from water samples collected along the Arroio Dilúvio in Porto Alegre. Yeast isolates from the Arroio Dilúvio were subjected to susceptibility testing against antifungals through the agar disk diffusion method and the minimum inhibitory concentration test. For the molecular techniques, the genomic DNA of the isolates was extracted with further amplification of ITS1-5.8S-IT2 using primers ITS1 and ITS4. The ITS region was subjected to PCR-RFLP using the restriction enzymes *Hinf*I, *Hae*III and *Cfo*I and the restriction profile allowed the construction of a dendrogram. Susceptibility tests showed high prevalence of resistance to azole antifungals. Sixteen isolates exhibited resistance to amphotericin B, of which 14 were subjected to sequencing of the ITS region. The sequence analysis allowed the identification of *Candida* species, including the potentially pathogenic species *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*, and *Debaryomyces* genus. The manifestation of resistance to antifungals in yeasts isolated from Arroio Dilúvio reinforces the importance of studies of environmental microbiota and indicates that environmental degradation influences the phenotype displayed.

[1]Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (67 p.) April, 2016.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1
2. OBJETIVOS 3
2.1 Objetivo Geral 3
2.2 Objetivos Específicos 3
3. REVISÃO DA LITERATURA 4
3.1 Água 4
3.2 Qualidade da água 5
3.3 Arroio Dilúvio 7
3.4 Leveduras em ambientes aquáticos 8
3.5 Resistência a antifúngicos 11
3.5.1 Principais drogas antifúngicas e mecanismos de resistência 13
3.6 Estudo da diversidade de leveduras 15
4. MATERIAL E MÉTODOS 18
4.1 Recuperação dos isolados / cultura de leveduras 18
4.2 Teste de suscetibilidade aos antifúngicos 18
4.2.1 Método de disco-difusão em ágar 18
4.2.2 Ensaio de concentração inibitória mínima (CIM) 19
4.3 Extração de DNA genômico 20
4.4 Amplificação da região ITS do rDNA 21
4.5 PCR-RFLP 22
4.6 Sequenciamento dos isolados 22
4.7 Análise de dados 23
5. RESULTADOS 24
5.1 Recuperação dos isolados 24
5.2 Teste de suscetibilidade aos antifúngicos 24
5.2.1 Método de disco-difusão em ágar 24
5.2.2 Ensaio de concentração inibitória mínima (CIM) 25
5.3 Extração de DNA genômico e amplificação da região ITS 30
5.4 Perfil de restrição dos isolados através de PCR-RFLP 31
5.5 Sequenciamento dos isolados 33

6. DISCUSSÃO 36
7. CONCLUSÃO 45
8. REFERÊNCIAS 46
9. APÊNDICES 55

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1:	Valores do diâmetro da zona de inibição dos antifúngicos utilizados para atribuir um perfil de suscetibilidade (S), suscetibilidade dose-dependente (SDD) e resistência (R) dos isolados.	19
Tabela 2:	Classificação dos isolados como suscetíveis (S), suscetibilidade dose-dependente (SDD) e resistentes (R) no ensaio de concentração inibitória mínima de acordo com os pontos de corte do CLSI para os antifúngicos testados.	20
Tabela 3:	Média dos halos em mm obtidos através do ensaio de disco-difusão para cada amostra com seus respectivos perfis de suscetibilidade.	24
Tabela 4:	Número de amostras apresentando cada perfil de suscetibilidade relativo aos cinco antifúngicos testados no ensaio de concentração inibitória mínima.	26
Tabela 5:	Valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM - µg/ml) para os 95 isolados testados frente aos antifúngicos e seus respectivos perfis de suscetibilidade (S= Suscetível; SDD= Sensibilidade Dose-dependente; R= Resistente). Isolados em itálico foram submetidos ao sequenciamento.	26
Tabela 6:	Tamanho aproximado dos fragmentos ITS1-5.8S-ITS2 obtidos da amplificação dos isolados	30
Tabela 7:	Relação dos isolados submetidos ao sequenciamento e suas respectivas espécies ou gêneros, valores de similaridade (Id), sobreposição e acesso no banco de dados Mycobank.org.	33

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1:	Região do rDNA contendo as regiões ITS 1 e ITS 2, amplificadas pelos oligonucleotídeos iniciadores indicados pelas setas.	21
Figura 2:	Sítios de clivagem reconhecidos pelas enzimas de restrição *Hinf*I (A), *Hae*III (B) e *Cfo*I (C)	22
Figura 3:	Gráfico da ocorrência de cada perfil de suscetibilidade aos antifúngicos, atribuído por ponto de coleta (P1, P2 e P3), através do ensaio de concentração inibitória mínima.	26
Figura 4:	Gráfico da frequência relativa de cada perfil de suscetibilidade atribuído através do ensaio de concentração inibitória mínima para cada fármaco testado.	29
Figura 5:	Dendrograma dos isolados submetidos ao PCR-RFLP com as enzimas *Hinf*I, *Hae*III e *Cfo*I. Uma matriz de similaridade foi calculada através do software PAST (*Paleontological Data Analysis*) usando o coeficiente de Dice pelo método da ligação média não ponderada (UPGMA). Amostras com 100% de similaridade estão indicadas com algarismos romanos de I – XVI.	32

1. INTRODUÇÃO

A demanda por fontes de água doce aumenta progressivamente à medida que a sociedade avança. A disponibilidade e a qualidade da água tem grande influência no crescimento populacional, na urbanização, na migração, na industrialização e nas diversas consequências sociais e econômicas acompanhadas por estes fatores. Este recurso, que possibilitou o surgimento da vida em nosso planeta e é indispensável para sua manutenção, vem sofrendo nos últimos séculos com seu mal uso e intensa degradação em prol do avanço econômico.

As consequências disso podem ser observadas na saúde pública, no desenvolvimento econômico, na forma irresponsável em que são produzidos alimentos e energia (disponíveis para somente uma parcela da população), na desigualdade social e nos ecossistemas altamente modificados e degradados. Nenhum desses fatores se manifesta isoladamente, por isso, a água pode ser considerada o cerne do desenvolvimento sustentável. Embora seu papel central em todas estas questões seja cada vez mais reconhecido, o estudo, a manutenção e o fornecimento de serviços relacionados ao uso sustentável da água não recebem a atenção merecida.

A urbanização compromete diversos serviços ecossistêmicos relacionados às fontes de água. Alteração da composição e estrutura natural de bacias hidrográficas que compõem as cidades, deposição exacerbada e inconsequente de substâncias poluentes e tóxicas e mudanças de parâmetros físicos e químicos são apenas alguns exemplos da influência da urbanização em corpos da água. As consequências disso são diversas e podem ser facilmente observadas por comprometer a saúde da população que consume a água, pela falta de acesso ao saneamento e pelo aumento no risco de enchentes e inundações.

O Arroio Dilúvio em Porto Alegre (RS) faz parte de uma bacia hidrográfica que, ao longo da história e urbanização da cidade, sofreu e continua sofrendo sérias alterações. Diversos aspectos relacionados à adaptação dos organismos que compunham este ecossistema foram negligenciados. Apesar da constante preocupação relacionada à qualidade da água para consumo e de como o Arroio representa uma potencial fonte de disseminação de microrganismos patogênicos, efeitos menos evidentes são ocasionados com a degradação de ecossistemas aquáticos que também merecem atenção e estudo. Leveduras são microrganismos

eucarióticos, amplamente difundidos nos ecossistemas e bastante conhecidos e explorados por seu potencial biotecnológico. Apesar de sua importância, ainda é possível observar uma grande lacuna no estudo de leveduras, especialmente aquelas isoladas a partir do ambiente. Sabe-se que existe uma relação positiva entre poluição de ecossistemas aquáticos e a contagens de leveduras, mas pouco se sabe sobre como o ambiente pode estar influenciando na adaptação e na manifestação de diferentes fenótipos por estes microrganismos.

A resistência a drogas antifúngicas por leveduras e outros fungos tem recebido maior atenção com o aumento da manifestação de doenças causadas por estes organismos. Grande parte dos estudos dedicam seus esforços em compreender a manifestação da resistência dentro da prática clínica, em espécies patogênicas com resistência intrínseca ou adquirida pelo constante contato com as drogas. No entanto, trabalhos recentes utilizando leveduras isoladas de corpos de água onde foi possível observar resistência aos antifúngicos, sugerem que estes fenótipos podem ser resultado também de pressões do ambiente. Apesar da preocupação com o surgimento e difusão de espécies com potencial de infectar humanos e outros animais, outras questões podem ser levantadas a partir destas observações.

Portanto, este trabalho busca investigar se a manifestação de resistência em leveduras pode ser observada em espécies que não possuem características de patogenicidade, e se propõe a discutir como a poluição pode estar afetando estes microrganismos, o que poderia estar selecionando a resistência a antifúngicos no ambiente, além de contribuir com o estudo da taxonomia e diversidade de leveduras.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a diversidade e resistência à antifúngicos de leveduras isoladas de amostras de água coletadas ao longo do Arroio Dilúvio em Porto Alegre.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Verificar o padrão de suscetibilidade de leveduras isoladas do Arroio Dilúvio através de fungigrama e concentração inibitória mínima diante de diferentes antifúngicos.

2.2.2 Determinar o padrão de restrição (PCR-RFLP) do produto amplificado utilizando as regiões de espaçadores transcritos internos (*Internal Transcribed Spacer* – ITS) e 5.8S do rDNA dos isolados

2.2.3 Identificar os isolados com resistência aos antifúngicos das classes dos azóis e polienos simultaneamente através das sequências dos produtos de amplificação das regiões ITS e 5.8S do rDNA utilizando banco de dados *online*.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Água

A água é um líquido incolor, inodoro e insípido essencial para todas as formas de vida, um recurso determinante no desenvolvimento de todas as sociedades e culturas. De acordo com a Organização das Nações Unidas (UNESCO 2015), a água é o cerne do desenvolvimento sustentável por interligar aspectos sociais, econômicos e ambientais. Embora a água seja um recurso renovável, sua disponibilidade pode ser limitada por diversos fatores como o clima, condições físicas e geográficas, a viabilidade de exploração e a eficiência com que é conservada e utilizada (Vasudevan & Pathak 1999).

Estima-se que o total de água disponível no planeta seja de $1,5 \times 10^9$ km³ onde $1,4 \times 10^9$ km³ (aproximadamente 97,5%), concentra-se nos oceanos (UNESCO 2015). Dos 2,5% de água doce restante, grande parte se encontra inacessível na forma de gelo continental, geleiras e em águas subterrâneas (Oki & Kanae 2006, Lennart 2010). Levando em consideração as fontes de água doce acessíveis, somente 10% seriam apropriadas para uso humano, no entanto, este volume nem sempre está disponível para atender as demandas de cada região (Holland *et al.* 2015)

Controversamente, a exploração antropogênica destas fontes de água para uso doméstico, na agricultura e na indústria é na maior parte das vezes realizada de forma inadequada e não sustentável (UNESCO 2015). Além disso, o aumento da urbanização mundial tem exacerbado os efeitos negativos do impacto humano sobre as fontes de água doce, que tem sido bastante estudado nas últimas décadas. Klein (1979) cita alguns fatores decorrentes da urbanização que afetam a qualidade de bacias hidrográficas localizadas em centros urbanos, como:

- aumento do escoamento de águas pluviais em direção à bacia, que tem como consequência aumento na frequência e gravidade das inundações, intensificando a erosão o que pode resultar na alteração da composição do leito;
- alteração na temperatura natural do curso de água;
- alteração do caráter e do volume de entrada de energia no curso da água;
- introdução elevada de substâncias tóxicas como metais pesados, pesticidas, óleos combustíveis, detergentes, dentre outros; assim como de nutrientes.

Os efeitos da urbanização são, na maioria das vezes, difundidos por toda a bacia hidrográfica, mesmo que esta se encontre fora dos limites dos centros urbanos (Kaufman *et al.* 2011). Em um estudo realizado por Martinuzzi *et al.* (2014), onde foram projetados diversos cenários de tendência no aumento na urbanização, viu-se que esta continuará sendo a principal ameaça de ecossistemas de água doce.

A urbanização gera impactos globais nos serviços ecossistêmicos e na biodiversidade, visto que leva a alterações no escoamento, aumento da poluição, extinção de espécies, introdução de espécies invasoras, mudanças no clima, dentre outros fatores (Dodds *et al.* 2013). Como reflexo, ocorre uma diminuição na qualidade de vida, segurança e equilíbrio dos organismos, tornando evidente a necessidade de estudar os impactos e formas de evitá-los ou diminuí-los quando possível.

3.2 Qualidade da água

O monitoramento da disponibilidade da água, seu uso e os impactos relacionados a ele representam um desafio na compreensão da qualidade e quantidade de água existente num âmbito global, visto que as informações disponíveis na literatura sobre as fontes de água disponíveis e seu manejo são frequentemente incompletas ou inexistentes (UNESCO, 2015). A segurança do consumo de água potável pela população humana, além da sua disponibilidade e acessibilidade, são há muito tempo um dos objetivos centrais em políticas internacionais de saúde pública e de desenvolvimento (Bain *et al.* 2014) e dependem de informações confiáveis para a correta implementação.

Investimentos na distribuição de água e no saneamento trazem benefícios que se estendem a diversos setores, visto que ao diminuir os riscos à população, diminui-se, em parte, a necessidade de investimentos nos cuidados à saúde. De acordo com as normas/orientações da Organização Mundial de Saúde (WHO 2011), a água segura para consumo não deve fornecer nenhum tipo de risco significativo à saúde ao longo da vida, sempre levando em consideração que existem diferentes estágios onde há uma maior suscetibilidade a aquisição de doenças.

Em um estudo realizado por Bain *et al.* (2014), foi estimado que em 2012, 1.9 bilhões de pessoas utilizavam fontes de água inapropriadas, ou então fontes

apropriadas, como sistemas subterrâneos protegidos e sistemas canalizados em regiões rurais, com contaminação fecal para consumo, saneamento e práticas de higiene. Apesar de importantes avanços, a estimativa atual é de que 748 milhões de pessoas não tenham acesso a fontes de água apropriadas para consumo e 2.5 bilhões não utilizam serviços de saneamento adequados (Bain *el al.* 2014).

A falta de acesso a fontes de água apropriadas, ao saneamento e higiene pessoal e doméstica inadequados são fatores que contribuem substancialmente para a manifestação de doenças diarreicas. Estas ocorrem pela ingestão de patógenos, especialmente microbianos, e resultam em milhares de mortes anualmente, principalmente entre crianças menores de cinco anos (WHO 2014).

O monitoramento da presença de micro-organismos indicadores de qualidade em águas superficiais ou subterrâneas é realizado para reduzir o risco de transmissão de doenças através de organismos patogênicos, sendo utilizados principalmente os coliformes totais, coliformes fecais e/ou *Escherichia coli* especificamente (Carr & Neary 2008). No entanto, mais de 100 espécies de leveduras com potencial de patogenicidade em humanos já foram isoladas em amostras de água, sugerindo que os parâmetros comumente utilizados sejam insuficientes para garantir a qualidade da água distribuída para toda a população (Van Wyk 2012).

Além da influência direta das atividades humanas, a qualidade da água deve ser avaliada também em relação a processos que ocorrem naturalmente no ambiente. A composição física e química da água pode ser alterada por fatores como: o intemperismo de minerais; processos atmosféricos de evapotranspiração; deposição de pó e sais pelo vento pela; lixiviação de matéria orgânica e nutrientes do solo; por fatores hidrológicos e processos biológicos no ambiente aquático (Carr & Neary 2008).

Alterações nos parâmetros físicos, químicos e biológicos da água atingem diretamente os organismos que fazem parte desse nicho, havendo perdas ecossistêmicas (Carr & Neary 2008). Como consequência disso, a degradação compromete a capacidade do ambiente em fornecer serviços básicos relacionados com a água (como purificação e armazenamento), que perde com isso a capacidade de auto regulação, acelerando o declínio na qualidade e disponibilidade da água. Dessa forma, a qualidade da água, embora seja em grande parte analisada visando o espectro de segurança para consumo humano,

atinge diversos níveis tróficos de organismos.

A microbiota de água doce tem grande importância na estrutura e função do ecossistema aquático e alterações nestas comunidades, muitas vezes resultantes de perda de qualidade na água, afetam diretamente outros componentes da cadeia alimentar. A influência da microbiota na distribuição e abundância de outros organismos mostra como oscilações nestas comunidades podem refletir mudanças na qualidade da água (Wang *et al.* 2004). Hoellein *et al.* (2014) sugerem que poucos estudos são realizados visando analisar os efeitos da poluição sobre comunidades microbianas, especialmente em fontes de água doce em ambientes urbanos, e destacam a importância de entender a relação entre estes dois fatores. Além disso, diversos processos biológicos são passíveis de alterações por influência da qualidade da água. Por isso, além de estudos visando a diversidade de micro-organismos em ambientes aquáticos comprometidos, é importante elucidar como estes seres estão se adaptando e respondendo a estas alterações.

3.3 Arroio Dilúvio

O Arroio Dilúvio, previamente conhecido como Arroio Jacareí (do guarani “Rio dos Jacarés”), Riacho, Riachinho, arroio da Azenha e riacho Ipiranga, constitui uma das bacias hidrográficas da região metropolitana de Porto Alegre. Nasce nos limites dos municípios de Porto Alegre e Viamão, de onde percorre por aproximadamente 17,6 km (Morandi & Faria 2000). O arroio possui uma área total de 83,74 km², abrangendo 36 bairros onde habitam cerca de 450 mil pessoas (PMPA & PMVM 2011).

O projeto de canalização, iniciado entre o final da década de 1930 e início da década de 1940, com sua execução nos 20 anos subsequentes, visava diminuir as inundações frequentemente provocadas devido a sua bacia de captação, que rapidamente acumulava água com as grandes chuvas (Young 2010). Apesar de minimizado este problema, diversos aspectos biológicos foram desconsiderados, afetando diversas espécies de organismos residentes do Arroio (Brandão & Kindel 2010).

Atualmente, a urbanização nos entornos do arroio, que apresenta 10 km do seu curso retido em estruturas de concreto na avenida Ipiranga, e a impermeabilização por ela acarretada, ocasionou significativo aumento na

quantidade de águas pluviais que alcançam o Dilúvio, que carregam consigo uma grande quantidade de sedimentos (Basso *et al.* 2011). O arroio recebe anualmente 50 mil metros cúbicos de terra, entulho e lixo, além de apresentar diversas ligações irregulares em sua rede de esgoto que resultam na deposição direta de esgoto doméstico e hospitalar no arroio, sem que seja realizado o tratamento prévio (PMPA & PMVM 2011, DEP 2016). Por estes motivos, observa-se a diminuição da qualidade de água, o assoreamento do arroio e inundações cada vez mais frequentes no seu entorno que levam a operações de limpeza e dragagem frequentes realizadas pelo Departamento de Esgotos Pluviais (Basso *et al.* 2011).

De acordo com Basso *et al.* (2011), a deposição de sedimentos sólidos no Arroio, que é resultado principalmente da intervenção humana, exerce grande influência na biota local por alterar parâmetros relacionados à adaptação dos organismos, como teor de oxigênio dissolvido, penetração de luz, inserção de material orgânico e inorgânico, além de elementos tóxicos como metais pesados. Tal impacto não fica restrito ao arroio e sua já prejudicada diversidade de organismos, visto que o Dilúvio desagua no Lago Guaíba, principal fonte de abastecimento de água de Porto Alegre.

3.4 Leveduras em ambientes aquáticos

Leveduras são fungos unicelulares que há muitos anos desempenham um papel extremamente importante para a humanidade, com aplicações industriais, agrícolas, ambientais, científicas, dentre outras (Johnson & Echavarri-Erasun 2011). São caracterizadas pelo seu crescimento resultante, na maioria das vezes, de brotamento ou fissão como forma primária de reprodução assexuada, que sob condições favoráveis, pode ocorrer de maneira ilimitada. Muitas espécies também apresentam um ciclo sexuado que ocorre sem a formação de corpos frutíferos (Kurtzman *et al.* 2011).

As leveduras apresentam uma grande variedade de grupos taxonômicos, que se reflete em uma vasta divergência nas sequências das linhagens e na sua múltipla origem evolutiva, assim como sua ampla distribuição e diversidade nos ecossistemas, podendo ser encontradas na atmosfera, no solo, associadas a plantas e animais, em ambientes extremos, nos oceanos e na água doce (Raspor & Zupan 2006, Bernard 2010, Lachance & Starmer 2011). Em geral, são os

colonizadores primários de substratos ricos em nutrientes, contribuindo para o aparecimento de outros organismos. Além de seu papel na decomposição e transformação, as leveduras vivem em associação com vírus, bactérias, outros fungos, algas, plantas vasculares e animais (Lachance & Starmer 2011).

Atualmente, existem aproximadamente 1600 espécies de leveduras conhecidas, embora estudos recentes sugiram que esse número representa uma subestimativa do número real de espécies existentes na natureza (Kurtzman *et al.* 2015). Espera-se que com o estudo de habitats e associações de leveduras com outros organismos ainda não explorados, muitas espécies novas sejam descritas.

As leveduras podem ser encontradas nos mais diversos ambientes aquáticos, livres ou em associação com sedimentos, outros organismos vivos e matéria orgânica. De acordo com Nagahama (2006), a maioria dos trabalhos envolvendo leveduras tem como interesse investigar a relação da poluição da água com os micro-organismos. Uma das primeiras observações dessa relação foi realizada por Woollett & Hedrick (1970), que analisaram amostras de água de três pontos distintos, um com baixos níveis de poluição indicados por parâmetros físicos, químicos e bacterianos, o segundo apresentando resíduos industriais e o terceiro altamente contaminado com resíduos domésticos. Os resultados qualitativos demonstraram populações distintas entre os pontos, com as menores contagens na área com baixa carga de contaminação e as maiores onde havia poluição de origem doméstica.

Assim, observa-se que fontes de água desprovidas de poluição intensa apresentam menores concentrações de leveduras em comparação com aquela observada em ambientes altamente eutrofizados. Diversos trabalhos observaram uma correlação positiva significativamente relevante entre as contagens de leveduras com os indicadores de qualidade da água em ambientes aquáticos, como coliformes fecais, coliformes totais e *Escherichia coli* (Hagler & Mendonça-Hagler 1981, Arvanitidou *et al.* 2002, de Almeida 2005, Medeiros *et al.* 2008, Coelho *et al.* 2010, Medeiros *et al.* 2012, Carneiro *et al.* 2015). No entanto, em ambientes aquáticos, a influência da poluição em populações microbianas pode ocorrer tanto pela introdução de espécies originadas de ambientes terrestres quanto do efeito direto dos contaminantes na adaptação das leveduras já presentes, ou pela combinação destes dois fatores (Francis 2013)

De acordo com Brilhante *et al.* (2015), em geral, observa-se uma

tendência na busca pela identificação das espécies potencialmente patogênicas como *Candida albicans, C. parapsilosis e C. glabrata* em estudos envolvendo principalmente água doce, porém o isolamento e contagens das mesmas mostra-se variável, sem um padrão. As espécies mais comumente isoladas nestes ambientes pertencem aos gêneros *Candida* (que em geral predomina sobre os outros)*, Cryptococcus, Rhodotorula, Saccharomyces,* e *Trichosporon*¸ com destaque às espécies *C. famata, R. mucilaginosa, T. beigelii,* e *Cryptococcus laurentii* que diversas vezes exibiram maiores contagens se comparadas aos indicadores de coliformes fecais.

Segundo Hageskal *et al.* (2009), apesar do crescente interesse sobre a relação das leveduras com a água e sua contaminação, pouco desse conhecimento é aplicado em medidas práticas. Uma das razões para isso é que o consumo de água com leveduras raramente leva a manifestações clínicas, diferente do que se observa em bactérias, vírus e parasitas. No entanto, muitas das espécies de leveduras encontradas na água podem se comportar como patógenos oportunistas, e dessa forma representam um risco à saúde para indivíduos imunocomprometidos (Pereira *et al.* 2009, Pereira *et al.* 2010, Pontara *et al.* 2011, Al-Gabr *et al.* 2014).

Além da taxa de recuperação de leveduras, outra forma de utilizá-las para inferir condições ambientais é através da avaliação de mudanças fenotípicas exibidas pelos micro-organismos nos ambientes alterados. Estas modificações ambientais, como a deposição de poluentes, poderiam acarretar na indução de mecanismos genéticos que levariam, por exemplo, a aparição de resistência dos micro-organismos a drogas antifúngicas (Brilhante *et al.* 2015).

Alguns estudos recentes avaliaram a susceptibilidade de leveduras isoladas de amostras de água a drogas antifúngicas e todos observaram a presença de resistência a pelo menos uma das drogas testadas (Medeiros *et al.* 2008, Brandão *et al.* 2010, Feltrin 2014). No entanto, estes trabalhos testaram somente isolados capazes de crescer em temperatura de incubação de 37ºC, característica que está diretamente relacionada à associação destes micro-organismos com humanos e outros animais de sangue quente (Buck 1975).

Visto que a maioria das leveduras tem preferência por temperaturas de crescimento entre 20 – 30º C, é importante que estes isolados que não apresentam o potencial de patogenicidade esperado e risco à saúde humana

sejam também estudados em relação à resistência a essas drogas, como forma de investigar a influência do ambiente e da poluição sobre o fenótipo desta comunidade.

3.5 Resistência a antifúngicos

Nos últimos anos, tem-se observado um aumento na prevalência de doenças causadas por fungos, assim como o aparecimento de novas espécies capazes de promover infecções (Cooper 2011). Diversos fatores podem ser atribuídos a essa tendência, como a pandemia da AIDS, a melhoria em diversos campos da saúde como a neonatologia que predispõe os pacientes a maior susceptibilidade, assim como o transplante de órgãos, o aumento no uso de drogas imunossupressoras, dentre outros (Perlin *et al.* 2015).

Apesar de a grande maioria das infecções se manifestarem superficialmente sobre a pele ou unhas, as infecções invasivas apresentam uma preocupante taxa de morbidade e mortalidade, muitas vezes por falta de diagnóstico preciso e dificuldades no tratamento (Brown *et al.* 2012). Por esse motivo, uma das medidas de profilaxia adotadas rotineiramente é a administração de antifúngicos em pacientes considerados suscetíveis/de risco (Shor & Perlin 2015).

Além do uso de drogas antifúngicas como forma de prevenção de doenças na rotina médica, algumas classes de antifúngicos, principalmente os azóis, são amplamente utilizadas na agricultura, em materiais de revestimento para garantir sua preservação (por exemplo, tintas), em produtos farmacêuticos, terapêuticos ou não (como shampoos, creme dental, sabonete, etc.) e até mesmo em objetos domésticos como colchões (Snelders *et al.* 2009). Como consequência de seu uso indiscriminado e da estabilidade destas moléculas, os antifúngicos são capazes de persistir no ambiente e contaminar a água, o solo e o ar (Azevedo *et al.* 2015). De fato, o esgoto doméstico é considerado a principal fonte de contaminação de fungicidas azóis na água e vários destes compostos não são removidos durante o tratamento de esgoto (Chen & Ying 2015).

O desenvolvimento de novas drogas antifúngicas também é limitado, se comparado com antibióticos, pela complexidade em identificar agentes capazes de eliminar o micro-organismo sem acometer as células eucarióticas do hospedeiro (Silva *et al.* 2012). Apesar das diversas classes de antifúngicos

atualmente disponíveis, poucas são efetivamente empregadas, e ainda assim não existe um único agente apropriado que atenda a população com suas respectivas variáveis no tratamento, como hipersensibilidade, local de infecção, risco de interações medicamentosas, dentre outras (Lewis 2011).

As principais classes de antifúngicos e seus mecanismos de ação são detalhadamente descritas na revisão publicada por Kathiravan *et al.* (2012). Das classes de antifúngicos conhecidas, somente quatro são utilizadas para o tratamento de infeções invasivas: azóis, polienos, equinocandinas e análogos de fluoropirimidina, que tem como alvo três vias metabólicas distintas dos fungos. Diversas outras classes disponíveis são utilizadas somente para o tratamento de infecções superficiais como medicamentos tópicos devido a sua baixa eficácia ou efeitos adversos quando administradas sistêmcamente (Vandeputte *et al.* 2012).

Pelos motivos acima citados, tem-se observado a emergência de fungos que apresentam resistência às drogas disponíveis. A resistência pode ser considerada primária, quando é uma característica intrínseca da espécie; ou secundária, quando resulta da aquisição de mecanismos de evasão específicos às classes de antifúngicos após a exposição de uma espécie previamente suscetível (Kontoyiannis & Lewis 2002, Kanafani & Perfect 2008, Shor & Perlin 2015). A resistência primária, apesar de relativamente incomum, resulta da seleção de espécies naturalmente menos suscetíveis, como pode ser observado para algumas espécies de *Candida* com os antifúngicos da classe dos azóis (Perlin *et al.* 2015).

Os mecanismos de resistência encontrado nos fungos são variados e de maneira geral são adquiridos através da modificação do alvo da droga, da diminuição da captação do fármaco e/ou redução dos níveis intracelulares pelo aumento na expressão de bombas de efluxo. A formação de biofilmes, comum entre leveduras e fungos filamentosos, também confere resistência pelo sequestro da droga na matriz extracelular característica desse tipo de organização (Kanafani & Perfect 2008, Perlin *et al.* 2015).

As respostas de adaptação à droga, podem resultar inicialmente em um perfil de resistência elevado *in vitro* que não se manifesta clinicamente. O resultado disso, é que os micro-organismos apresentam estabilidade e capacidade de sobreviver na presença destes agentes antifúngicos a longo prazo. Dessa forma, pode haver um acúmulo de mecanismos de resistência eficazes que

mais tarde se manifestam clinicamente. Por fim, diversas espécies apresentam plasticidade genética e selecionam mecanismos de resistência com a duplicação de segmentos cromossomais contendo o alvo da droga (Perlin *et al.* 2015).

3.5.1 Principais drogas antifúngicas e mecanismos de resistência

O isolamento e desenvolvimento de fórmulas biodisponíveis de moléculas pertencentes a classe dos polienos, produzidas por diversas espécies de bactérias do gênero *Streptomyces,* representa um marco na história da terapia antifúngica. Apesar das mais de 200 moléculas com atividade antifúngica produzidas por esta actinobactéria, a maioria apresenta toxicidade e por esse motivo, poucas são utilizadas na prática clínica, como a anfotericina B, nistatina, piramicina (natamicina) e candicidina (Mathew & Nath 2009, Lewis 2011, Vandeputte *et al.* 2012). Estas moléculas tem como alvo o ergosterol, principal componente da membrana dos fungos, onde se ligam à bicamada lipídica e formam poros, que resultam no aumento da permeabilidade da membrana, extravasamento do conteúdo citoplasmático e morte celular (Kathiravan *et al.* 2012).

Desde sua aprovação em 1959 pelo órgão *Food and Drug Administration* até o desenvolvimento dos azóis, a anfotericina B foi considerada e ainda é padrão ouro no tratamento de infecções sistêmicas devido ao seu amplo espectro de atividade e poucos relatos de resistência (Ghannoum & Rice 1999, Ellis 2002, Hamill 2013). Apesar de incomum, a resistência à anfotericina B está ligada principalmente com a diminuição dos níveis de ergosterol na membrana, que por sua vez está associada à perda de função nos genes *ERG3* e *ERG6*, envolvidos na biossíntese do ergosterol (Bondaryk *et al.* 2013, Spampinato *et al.* 2013). No entanto, devido à elevada hidrofobicidade e baixa absorção no trato gastrointestinal, a anfotericina B deve ser administrada por via intravenosa, resultando em diversos efeitos colaterais, o que reforçou a necessidade e esforços na busca por drogas alternativas (Lewis 2011, Vandeputte *et al.* 2012).

Os imidazóis, como o clotrimazol, miconazol, econazol e cetoconazol foram os primeiros agentes da classe dos azóis a serem introduzidos e testados; entretanto apresentavam diversas limitações relacionadas à toxicidade, biodisponibilidade, administração e interações medicamentosas e hormonais (Maertens 2004). Os triazóis, como o fluconazol, o itraconazol e o voriconazol

foram mais tarde desenvolvidos como uma alternativa mais segura aos imidazóis (Vandeputte *et al.* 2012). De fato, o fluconazol tornou-se rapidamente o antifúngico mais amplamente prescrito para o tratamento de infecções sistêmicas e em mucosas causadas por leveduras (Lewis 2011).

Os azóis tem como alvo a enzima lanosterol 14-α desmetilase, codificada pelo gene *ERG*11 que participa na biossíntese do ergosterol (Perlin *et al.* 2015). A ligação de um átomo de nitrogênio livre do anel azólico da droga com o átomo de ferro do grupo heme da enzima e sua consequente inibição, resulta na alteração da via biossíntética do ergosterol, com acúmulo de intermediários da rota e síntese de compostos tóxicos que inibem o crescimento celular (Vandeputte *et al.* 2012, Bondaryk *et al.* 2013). No entanto, a resistência observada aos antifúngicos pertencentes a esta classe é um dos maiores obstáculos no tratamento de doenças fúngicas (Lupetti *et al.* 2002).

Os principais mecanismos de resistência aos azóis incluem: mutações no gene *ERG*11, diminuindo a afinidade da droga à enzima; super expressão do gene *ERG*11, aumentando a demanda de antifúngico necessária para causar a inibição completa da via biossíntética; diminuição nas concentrações de azóis dentro da célula do fungo através de alterações na composição da membrana que levam a menor captação do fármaco ou pela expressão de bombas de efluxo; tolerância aos intermediários gerados pela inibição da enzima e por fim, a incorporação de colesterol das células do hospedeiro à membrana celular fúngica (Bondaryk *et al.* 2013).

As equinocandinas consistem na última classe descoberta de antifúngicos, e atualmente é representada pelas drogas caspofungina, introduzida em 2001, micafungina em 2005 e anidulafungina em 2006 (Sucher *et al.* 2009). Estes compostos atuam inibindo a síntese da parede celular dos fungos, bloqueando a ação da enzima β-1,3-glicano sintase responsável pela polimerização da uridina difosfato glicose em β-1,3-glicano, um dos componentes estruturais da parede celular fúngica, levando a instabilidade osmótica e lise celular (Vandeputte *et al.* 2012, Bondaryk *et al.* 2013, Spampinato *et al.* 2013). A resistência a estes agentes está ligada mutações no gene *FKS,* que codifica o sítio ativo Fkps do complexo da β-1,3-glicano sintase (Perlin *et al.* 2015).

As fluoropirimidinas são moléculas sintéticas com estrutura análoga ao nucleotídeo citosina, que interferem no metabolismo de pirimidinas, síntese de

DNA, RNA e proteínas. Na medicina, são utilizadas as moléculas 5-fluorocitosina e 5-fluorouracil, que ao entrar nas células fúngicas são alvo da ação de diversas enzimas, dando origem a intermediários que se incorporam nos processos de síntese de moléculas e replicação celular, impedindo que estes aconteçam de maneira apropriada e consequentemente, que as células fúngicas se reproduzam. Apesar das propriedades farmacológicas dessas drogas serem favoráveis, seu uso é limitado pela resistência frequentemente observada nos micro-organismos (Kathiravan *et al.* 2012, Vandeputte *et al.* 2012).

3.6 Estudo da diversidade de leveduras

Atualmente, 1.5 milhões de espécies de todos os organismos foram descritas, mas estima-se que existam aproximadamente 5 ± 3 milhões de eucariotos compondo a biodiversidade do planeta. Esforços taxonômicos e o reconhecimento de novas espécies são extremamente relevante para a Biologia pois fornecem informações valiosas a práticas sobre a composição de habitats e permitem que a dinâmica de populações envolvendo a diversidade de aspectos genéticos e bioquímicos seja investigada (Costello *et al.* 2013). Além disso, o rápido crescimento da população humana, a exploração por ela realizada e o impacto sobre os ecossistemas, resultam em alterações em diversos processos ecossistêmicos, na composição e diversidade dos habitats, tornando evidente a importância de explorar os organismos que compõem os ambientes.

Em relação ao estudo taxonômico de leveduras, a introdução de técnicas moleculares para a identificação destes micro-organismos através do uso de sequências de DNA como alternativa à identificação morfológica resultou em grande contribuição na descrição de novas espécies nas últimas décadas. O DNA ribossomal de fungos são amplamente utilizados para técnicas de identificação baseadas em amplificação devido a existência de domínios altamente conservados separados por sequências com variações entre diferentes espécies (Pincus *et al.* 2007). Em fungos, o DNA ribossomal consiste em agrupamentos gênicos contendo as regiões codificantes altamente conservadas 18S, 5.8S e 25S, separadas entre si por regiões não codificantes e com alta variabilidade, conhecidas como espaçadores transcritos internos ITS1 e ITS2. Estes agrupamentos se repetem várias vezes no genoma dos organismos e a combinação de regiões conservadas e variáveis permite a diferenciação entre as

espécies através do sequenciamento e comparação com sequencias depositadas nos bancos de dados (Nascimento 2004, Pham *et al.* 2011, Kurtzman *et al.* 2015).

Desde 2011, mais de 230 espécies de leveduras foram registradas no *MycoBank.org* (http://www.mycobank.org/), o banco de dados *online* específico para fungos, resultando em mais de 1600 espécies atualmente descritas (Kurtzman *et al.* 2015). Mesmo assim, ainda é possível observar uma grande lacuna no estudo destes micro-organismos nos mais diversos biomas, levando-se a crer que o número de leveduras ainda não descritas é muito maior que o estimado. Estudos de associações de micro-organismos com diferentes habitats até então não explorados, podem contribuir grandemente com a taxonomia de leveduras. Um exemplo disso pode ser observado no trabalho conduzido por Suh *et al.* (2005), onde em torno de 200 novas espécies foram descritas, isoladas a partir do trato digestório de insetos.

Diversas outras técnicas podem ser empregadas para agrupamento ou caracterização de espécies anteriormente à identificação através de sequenciamento, como o uso de oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos, sondas de ácidos nucléicos, polimorfismo de DNA amplificado ao acaso com micro-satélites (*Random Amplified Polymorphic DNA* – RAPD), reação em cadeia da polimerase em tempo real, eletroforese em gel de gradiente desnaturante (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* – DGGE), citometria de fluxo e polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP) (Kurtzman *et al.* 2015).

A técnica de RFLP possibilita identificar a diversidade genotípica dentro de populações e se baseia nos padrões de digestão enzimática promovidos por endonucleases em certos fragmentos de DNA.

A amplificação das regiões ITS de fungos através da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos, com sua subsequente digestão utilizando endonucleases, permite a identificação da variabilidade através dos padrões de restrição exibidos pelos organismos, que são visualizados em gel de eletroforese. A presença de polimorfismo pode ser observada com o tamanho dos fragmentos gerados após a digestão, que são resultado de mutações, inserções, deleções ou rearranjos dentro da região (Ferreira & Grattapaglia 1996).

Por estes motivos, a técnica do PCR-RFLP da região ITS tem sido

empregada em diversos trabalhos para o estudo da biodiversidade e na identificação de leveduras (Guillamón *et al.* 1998, Esteve-Zarzoso *et al.* 1999, Teresa Fernández-Espinar *et al.* 2000, Las Heras-Vazquez *et al.* 2003, Jeyaram *et al.* 2008, Pham *et al.* 2011, Chanprasartsuk *et al.* 2013, Fadda *et al.* 2013, Tofalo *et al.* 2014, Elena *et al.* 2015, Rinaldi *et al.* 2016).

Em um estudo conduzido por Esteve-Zarzoso *et al.* (1999), a digestão da região 5.8S-ITS com as endonucleases *Hinf*I, *Hae*III e *Cfo*I gerou padrões que permitiram a identificação de 132 espécies de leveduras pertencendo a 25 gêneros. Os autores sugerem que a padronização da técnica e a criação de um banco de dados dos padrões de restrição permitiria maior uso da mesma para identificação direta de espécies. Kurtzman *et al.* (2015) argumentam que pequenas diferenças nas condições utilizadas podem comprometer a reprodutibilidade, tornando a análise dos resultados subjetiva. No entanto, a técnica permite que seja realizada uma triagem inicial de isolados com perfis de restrição semelhantes para posterior identificação por técnicas mais precisas como o sequenciamento.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Recuperação dos isolados / Cultura de leveduras

Para a realização deste trabalho foram utilizados 116 isolados de leveduras, provenientes de três pontos distintos do Arroio Dilúvio, em Porto Alegre – RS (Feltrin 2014), armazenados em glicerol à -20º C no Laboratório de Microbiologia Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As amostras foram inicialmente inoculadas em placas contendo ágar Sabouraud pelo método de espalhamento em superfície e incubadas à 28º C por 48 h. Após, as colônias foram esgotadas em placas com ágar Sabouraud, de forma a garantir a pureza das culturas. Os isolados foram transferidos para tubos contendo ágar Sabouraud inclinado para posterior manipulação.

4.2 Teste de Suscetibilidade aos antifúngicos

A susceptibilidade das leveduras aos antifúngicos foi testada utilizando o método de disco-difusão em ágar e em ensaio de concentração inibitória mínima.

4.2.1 Método de disco-difusão em ágar

O ensaio de disco-difusão em ágar foi realizado de acordo com as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, M44-A2), utilizando discos dos antifúngicos (BIO-RAD) Fluconazol (25 µg), Voriconazol (1 µg), Cetoconazol (50 µg), Anfotericina B (100 µg) e Nistatina (100 IU). Uma suspensão de células foi adicionada em solução salina 0.85% e ajustada de forma a alcançar a concentração de 0,5 na escala de McFarland, correspondente a 1×10^6 à 5×10^6 células por mL. A partir desta suspensão as células foram inoculadas em placas contendo ágar Mueller-Hinton com 2% de glicose e azul de metileno, utilizando suabes estéreis. Discos de antifúngicos foram dispostos de forma equidistante sobre o inóculo e as placas foram incubadas a 28ºC por 48 h. Os halos de inibição foram medidos com o auxílio de um paquímetro e a partir os valores obtidos foi atribuído um perfil de suscetibilidade (S), susceptibilidade dose-dependente (SDD) ou resistência (R) de acordo com a Tabela 1. Esta classificação foi baseada no documento M44-S3 do CLSI (2012) para os discos contendo fluconazol e voriconazol e de acordo com as orientações do fabricante para os demais antifúngicos.

Tabela 1 – Valores do diâmetro da zona de inibição dos antifúngicos utilizados para atribuir um perfil de suscetibilidade (S), suscetibilidade dose-dependente (SDD) e resistência (R) dos isolados.

Antifúngico	Diâmetro da Zona de Inibição (mm)		
	S	SDD	R
Anfotericina B *	>10	-	≤ 10
Nistatina *	> 10	-	≤ 10
Voriconazol	≥ 17	14 – 16	≤ 13
Fluconazol	≥ 19	15 - 18	≤ 14
Cetoconazol *	≥ 20	11 – 19	≤ 10

* Recomendações do fabricante (Bio-Rad)

4.2.2 Ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizado em microplacas de 96 poços estéreis com fundo em “U”, seguindo a norma M27-A3 do CLSI (2008). Para este teste foram utilizados os antifúngicos Fluconazol, Cetoconazol, Voriconazol, Itraconazol e Anfotericina B. O antifúngico Fluconazol foi diluído em água destilada estéril para o preparo de uma solução estoque na concentração de 6,4 mg/mL. Os demais fármacos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) de modo a obter uma solução estoque na concentração de 1,6 mg/mL. Estas soluções foram, por sua vez, diluídas de acordo com as concentrações desejadas para o ensaio em meio RPMI-1640 tamponado (pH 7,0) com MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanosulfónico) e previamente filtrado.

As microplacas de 96 poços com fundo em U foram preparadas com a adição de 100 µL de meio RPMI-1640 pH 7,0. Após, os cinco antifúngicos testados foram adicionados à primeira coluna e diluídos seriadamente até a décima coluna. Dessa forma, as placas apresentaram um intervalo de concentração de 64 a 0,125 µg/mL para o antifúngico Fluconazol e 16 a 0,0313 µg/mL para os demais fármacos utilizados.

O inóculo de células foi obtido de colônias com 24 horas de crescimento em caldo Sabouraud, ajustadas na escala 0,5 de McFarland com solução salina 0,85%. A partir desta suspensão foi realizada uma diluição 1:50 que foi por sua vez, diluída a 1:20 com meio RPMI-1640, gerando uma concentração final de 2,5 x 10^3 cél/mL. Esta suspensão foi adicionada em duplicata em todos os poços, exceto na última coluna correspondente ao controle do meio de cultura. Como

controle de atividade dos antifúngicos, em cada ensaio foi utilizada a cepa *Candida krusei* ATCC 6258. As microplacas foram incubadas a 28ºC e os resultados registrados com 24 e 48 h de crescimento. Para interpretação dos resultados foram utilizados os pontos de corte estabelecidos pelo documento M27-S4 do CLSI indicados na tabela 2.

Tabela 2 – Classificação dos isolados como suscetíveis (S), suscetibilidade dose-dependente (SDD) e resistentes (R) no ensaio de concentração inibitória mínima de acordo com os pontos de corte do CLSI para os antifúngicos testados.

Antifúngico	Concentração (µg/mL)		
	S	SDD	R
Anfotericina B	≤ 1,0	-	≥ 2,0
Cetoconazol	≤ 8,0	-	≥ 16,0
Itraconazol	≤ 0,125	0,25 - 0,5	≥ 1,0
Voriconazol	≤ 0,125	0,25 - 0,5	≥ 1,0
Fluconazol	≤ 2,0	4	≥ 8,0

4.3 Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico dos isolados baseou-se no protocolo de Osorio-Cadavid *et al.* (2009). Os isolados foram inoculados em caldo Sabouraud e incubados por 16 horas à 28ºC com agitação constante. As células foram inicialmente precipitadas por centrifugação e ressuspendidas em 400 µL de tampão de lise (0,15M NaCl, 50mMTris-HCl, 10mM EDTA, 2% SDS, pH 8.0), seguido de incubação à 65º C durante uma hora para ruptura da membrana celular. Imediatamente após adicionou-se 200 µL de acetato de potássio 5M (pH 4.8), as amostras foram homogeneizadas por no mínimo 30 segundos e em seguida colocadas em banho de gelo durante 30 minutos. Após este período, as amostras foram centrifugadas por cinco minutos a 14 000 rpm, e o sobrenadante foi transferido para tubos novos. Uma segunda etapa de centrifugação foi realizada para reduzir as impurezas o sobrenadante transferido para um novo tubo com subsequente adição de 3 µL de RNAse (4 mg/mL) e incubação a 37ºC por uma hora.

As amostras foram submetidas a uma limpeza com clorofórmio, uma com fenol, uma com fenol clorofórmio (1:1) e por fim, uma com clorofórmio álcool isoamílico (24:1), utilizando-se sempre um volume do reagente para um volume

de amostra. O DNA foi precipitado adicionando-se 0,1 volume de acetato de sódio 3M e 2,5 volumes de álcool isopropílico com posterior incubação à - 20º C por 30 minutos. Após, foi centrifugado a 14 000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 500 µL de etanol 70%. As amostras foram novamente centrifugadas para obtenção do pellet contendo o DNA, que foi ressuspendido com 50 µL de Tris-EDTA (10 mM TRIS 1 mM EDTA, pH 7.4).

O DNA extraído foi visualizado em gel de agarose 1% e a concentração foi determinada com o uso do espectrofotômetro NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific).

4.4 Amplificação da região rDNA ITS

A amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 (Figura 1) foi realizada em um volume final de reação de 25 µL. Foram adicionados na reação: 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' e ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (White *et al.* 1990), 2.5 µL de tampão de reação (10x), 1 µL de $MgCl_2$ 2mM, 1 µL de cada dNTP 2.5mM (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1.0 U de Taq DNA polimerase, 50 ng de DNA genômico e água deionizada estéril para completar o volume.

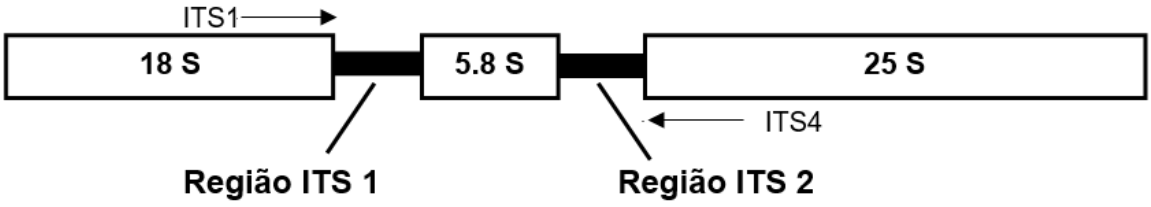

Figura 1. Região do rDNA contendo as regiões ITS 1 e ITS 2, amplificadas pelos oligonucleotídeos iniciadores indicados pelas setas.

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador ProFlex™ PCR System (Thermo Fisher Scientific) com um ciclo inicial de 94º C por cinco minutos, seguidos de 35 ciclos: a 94º C por 45 segundos (desnaturação), 53º C por 45 segundos (anelamento) e a 72º C por um minuto (alongamento) no final, um clico final de extensão a 72º C por cinco minutos e os produtos amplificados foram

resfriados a 4º C.

A detecção dos produtos de PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1,2% e visualizados e registrados através do sistema de fotodocumentação L-Pix Touch (Loccus Biotecnologia).

4.5 PCR-RFLP

Os produtos amplificados foram submetidos a digestão com as endonucleases de restrição *Hinf*I, *Hae*III e *Cfo*I (Promega) conforme as recomendações do fabricante para cada enzima. Os sítios de clivagem para cada enzima estão indicados na figura 2.

A) G▼ANT C
C TNA▲G

B) GG▼CC
CC▲GG

C) G CG▼C
C▲GC G

Figura 2. Sítios de clivagem reconhecidos pelas enzimas de restrição *Hinf*I (A), *Hae*III (B) e *Cfo*I (C)

Os produtos da digestão foram separados em gel de agarose 3%, utilizando o marcador de 100pb (Ludwig Biotec) como referência para o peso molecular. Após a corrida, foram observados no sistema de fotodocumentação L-Pix Touch (Loccus Biotecnologia) e as imagens capturadas através da câmera integrada ao aparelho.

4.6 Sequenciamento dos isolados

De acordo com seu perfil de susceptibilidade aos antifúngicos, algumas amostras foram selecionadas para análise da sequência dos nucleotídeos da região ITS1-5.8S-ITS2. A amplificação foi realizada seguindo as mesmas condições acima descritas no item 3.4.

Após confirmação da amplificação, os produtos foram purificados com o kit PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen) e encaminhados para sequenciamento na empresa Ludwig Biotec com o aparelho ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram analisadas e comparadas com sequências disponíveis no banco de dados *MycoBank.org* (http://www.mycobank.org/), específico para fungos.

4.7 Análise de dados

Para interpretação das imagens obtidas pela técnica de PCR-RFLP, foi utilizado o software CLIQS 1D Pro, onde foram obtidos os pesos moleculares dos fragmentos. Uma matriz binária de dados foi construída de acordo com a presença ou ausência de cada fragmento gerado por enzima. A comparação entre as amostras foi realizada através do coeficiente de similaridade de Dice e o agrupamento das mesmas para a construção dos dendrogramas utilizou-se o método da ligação média não ponderada (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages – UPGMA*) através do software PAST (*Paleontological Data Analysis*).

5. RESULTADOS

5.1 Recuperação dos isolados

A recuperação dos 116 isolados armazenados em glicerol à -20º C, em meio de cultura ágar Sabouraud resultou no crescimento de 104 leveduras. Estes isolados foram os estudados no presente trabalho.

5.2 Teste de suscetibilidade aos antifúngicos

5.2.1 Método de disco-difusão em ágar

O ensaio de disco-difusão em ágar não pode ser realizado em sua totalidade devido a problemas na importação e liberação dos discos de antifúngicos pela ANVISA no Brasil. A tabela 3 mostra os resultados obtidos em testes realizados com 25 isolados utilizando os discos disponíveis no laboratório. Destes, 60% apresentaram resistência a fluconazol (15/25), 24% foram suscetíveis (6/25) e 16% mostraram sensibilidade dose-dependente (4/25). Para o voriconazol, 44% dos isolados foram resistentes (7/16), 50% foram suscetíveis (8/16) e 6% apresentaram sensibilidade dose-dependente (1/16). Já para a anfotericina B, 32% foram resistentes (8/25) e 68% suscetíveis (17/25) ao fármaco. Em relação a nistatina, 31% dos isolados foram resistentes (5/16) e 69% suscetíveis (11/16).

Tabela 3. Média dos halos em mm obtidos através do ensaio de disco-difusão para cada amostra com seus respectivos perfis de suscetibilidade.

	Fluconazol		**Anfotericina B**		**Nistatina**		**Voriconazol**	
Amostra	**Média**	**Perfil**	**Média**	**Perfil**	**Média**	**Perfil**	**Média**	**Perfil**
I1B2	20	S	22,5	S	21,5	S	28	S
I1C1	0	R	13,5	S	0	R	0	R
I1C5	19,5	S	21,5	S	29,25	S	26,5	S
I2A2	12	R	23	S	28	S	28	S
I2A3	18,5	SDD	0	R	0	R	28,5	S
I2A4	0	R	8,5	R	0	R	0	R
I2A5	0	R	15,5	S	26,5	S	0	R
I2A7	0	R	0	R	0	R	0	R
I2A11	29	S	28	S	26	S		
I2A12	17	SDD	19,5	S	27	S		
I2A15	0	R	14	S	23	S		
I2B1	0	R	16	S	27,5	S		

Tabela 3 (continuação) Média dos halos em mm obtidos através do ensaio de disco-difusão para cada amostra com seus respectivos perfis de suscetibilidade.

I2B5	11	R	10	R	17	S		
I2B6	18,5	SDD	9,5	R	18	S		
I2B7	12	R	0	R	10	R		
I2B9	15	SDD	8	R	15,5	S		
I2B13	36	S	18,5	S	22,5	S		
I2B19	13	R	12,5	S			24	S
I2C4	0	R	11,5	S			16	SDD
I2C7	0	R	12,5	S			0	R
I2C8	0	R	17,5	S			0	R
I2C12	38,5	S	9,5	R			43	S
I2C23	0	R	17,5	S			0	R
I3A4	0	R	15,5	S			26	S
I3A10	20,5	S	21,5	S			34,5	S
I3C6	36,5	S	19,5	S			40,5	S

5.2.2 Ensaio de concentração inibitória mínima (CIM)

Dos 104 isolados testados no ensaio de concentração inibitória mínima, 9 amostras não apresentaram crescimento após 48 de incubação a 28º C nas placas de 96 poços com meio RPMI.

A figura 3 e a tabela 4 mostram o número de amostras que apresentaram resistência, sensibilidade dose-dependente e suscetibilidade para os três pontos distintos onde foram realizadas as coletas. Dos 95 isolados testados, 44,2% apresentaram resistência ao fluconazol (42/95), 18,9% apresentaram sensibilidade dose-dependente (18/95) e 36,8% dos isolados mostraram-se suscetíveis ao fármaco (35/95). Em relação ao cetoconazol, somente 5,3% (5/95) mostrou-se resistente. Para o antifúngico voriconazol, 24,2% dos isolados foram resistentes (23/95), 14,7% tiveram sensibilidade dose-dependente (14/95) e 61,1% foram suscetíveis (58/95). Ao itraconazol 7,4% dos isolados foram suscetíveis (7/95), 34,7% apresentaram sensibilidade dose-dependente (33/95) e 57,9% foram resistentes (55/95). Por fim, 16,8% dos isolados mostraram-se resistentes à anfotericina B (16/95) e 83,2% exibiram sensibilidade ao fármaco (79/95). Os pontos de corte dos isolados para o ensaio podem ser observados na tabela 5.

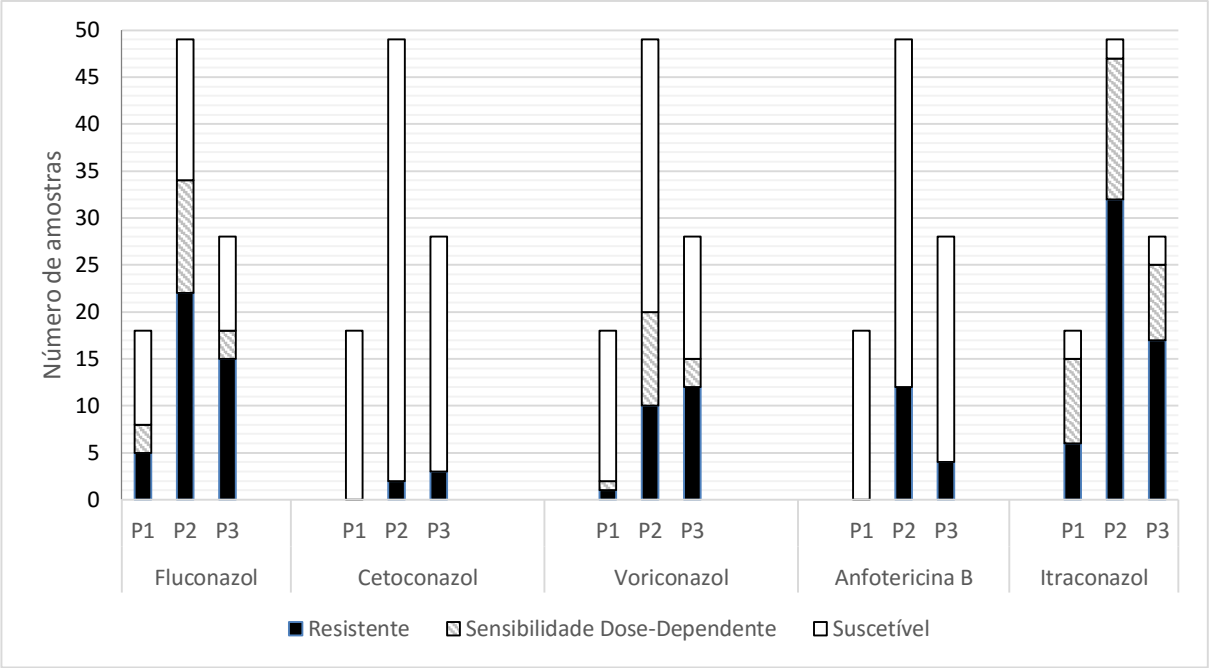

Figura 3. Gráfico da ocorrência de cada perfil de suscetibilidade aos antifúngicos, atribuído por ponto de coleta (P1, P2 e P3), através do ensaio de concentração inibitória mínima.

Tabela 4. Número de amostras apresentando cada perfil de suscetibilidade relativo aos cinco antifúngicos testados no ensaio de concentração inibitória mínima.

	Perfil de suscetibilidade			
	Resistente	Sensibilidade Dose-Dependente	Suscetível	**Total**
Fluconazol	42 (44,2%)	18 (18,9%)	35 (36,8%)	**95**
Cetoconazol	5 (5,3%)	-	90 (94,7%)	**95**
Voriconazol	23 (24,2%)	14 (14,7%)	58 (61,1%)	**95**
Anfotericina B	16 (16,8%)	-	79 (83,2%)	**95**
Itraconazol	55 (57,9%)	33 (34,7%)	7 (7,4%)	**95**

Tabela 5- Valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM - µg/ml) para os 95 isolados testados frente aos antifúngicos e seus respectivos perfis de suscetibilidade (S= Suscetível; SDD= Sensibilidade Dose-dependente; R= Resistente). Isolados em itálico foram submetidos ao sequenciamento.

	Fluconazol		**Cetoconazol**		**Voriconazol**		**Anfotericina B**		**Itraconazol**	
Isolado	**CIM**	**Perfil**	**CIM**	Perfil	**CIM**	**Perfil**	**CIM**	**Perfil**	**CIM**	Perfil
I1C5	0,12	S	0,03	S	0,03	S	0,12	S	0	SDD
I2A2	4	SDD	0,03	S	0,03	S	0,25	S	1	SDD
I2A3	4	SDD	0,06	S	0,06	S	1	S	1	SDD
I2A5	8	R	0,03	S	0,03	S	1	S	0	S
I2A7	4	SDD	4	S	1	R	16	R	2	R
I2A11	4	SDD	0,12	S	0,12	S	0,5	S	0	SDD
I2A12	0,25	S	0,12	S	0,06	S	1	S	2	R

Tabela 5 (continuação) Valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM - µg/ml) para os 95 isolados testados frente aos antifúngicos e seus respectivos perfis de suscetibilidade (S= Suscetível; SDD= Sensibilidade Dose-dependente; R= Resistente). Isolados em itálico foram submetidos ao sequenciamento.

I2A14	2	S	0,03	S	0,06	S	0,25	S	1	R
I2A15	64	R	2	S	1	R	1	S	1	R
I2B1	64	R	0,12	S	1	R	1	S	8	R
I2B5	4	SDD	0,12	S	0,12	S	1	S	2	R
I2B6	8	R	0,12	S	0,12	S	1	S	4	R
I2B7	64	R	0,12	S	1	R	1	S	4	R
I2B9	*32*	*R*	*0,5*	*S*	*1*	*R*	*2*	*R*	*4*	*R*
I2B13	1	S	0,03	S	0,06	S	0,5	S	1	R
I2B14	1	S	0,5	S	0,25	SDD	0,25	S	2	R
I2B15	64	R	1	S	0,5	SDD	0,5	S	2	R
I2B16	*1*	*S*	*0,06*	*S*	*0,12*	*S*	*16*	*R*	*2*	*R*
I2B17	*4*	*SDD*	*0,06*	*S*	*0,12*	*S*	*4*	*R*	*4*	*R*
I2B19	64	R	0,25	S	0,5	SDD	1	S	2	R
I2C1	4	SDD	0,12	S	0,06	S	1	S	1	SDD
I2C2	64	R	0,25	S	0,25	SDD	1	S	2	R
I2C3	64	R	0,25	S	0,12	S	0,5	S	2	R
I2C4	16	R	0,25	S	1	R	1	S	4	R
I2C7	*64*	*R*	*16*	*R*	*16*	*R*	*16*	*R*	*16*	*R*
I2C8	32	R	0,25	S	0,25	SDD	1	S	2	R
I2C12	*1*	*S*	*0,03*	*S*	*0,03*	*S*	*16*	*R*	*1*	*SDD*
I2C23	16	R	0,12	S	0,25	SDD	1	S	2	R
I2C24	*16*	*R*	*0,5*	*S*	*0,25*	*SDD*	*4*	*R*	*1*	*SDD*
I2C25	4	SDD	0,12	S	0,12	S	0,5	S	0	S
I3A4	0,5	S	0,03	S	0,03	S	1	S	1	R
I3A10	32	R	0,06	S	0,12	S	0,5	S	1	S
I3C5	0,5	S	0,03	S	0,03	S	1	S	0	SDD
I3C6	0,5	S	0,03	S	0,03	S	1	S	1	SDD
I3C7	16	R	0,12	S	0,06	S	0,5	S	0	S
I3C8	64	R	0,25	S	1	R	1	S	4	R
I3C10	0,5	S	0,03	S	0,03	S	1	S	1	R
I3C11	0,5	S	0,03	S	0,5	SDD	1	S	0	SDD
I3C12	4	SDD	0,06	S	0,12	S	0,5	S	0	SDD
I3C15	64	R	0,25	S	4	R	1	S	2	R
V1A2	0,5	S	0,03	S	0	S	1	S	0,12	S
V1A3	32	R	0,25	S	0,06	S	0,03	S	1	R
V1A4	32	R	0,25	S	0,06	S	0,06	S	1	R
V1A6	0,25	S	0,03	S	0	S	1	S	0,5	SDD
V1A7	32	R	0,25	S	0,25	SDD	0,5	S	2	R
V1A8	2	S	0	S	0,06	S	0,03	S	0,5	SDD
V1A10	1	S	0	S	0,03	S	0,03	S	0,5	SDD
V1A13	4	SDD	0	S	0,03	S	0	S	0,25	SDD
V1A14	0,12	S	0	S	0	S	0,5	S	0,5	SDD

Tabela 5 (continuação) Valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM - µg/ml) para os 95 isolados testados frente aos antifúngicos e seus respectivos perfis de suscetibilidade (S= Suscetível; SDD= Sensibilidade Dose-dependente; R= Resistente). Isolados em itálico foram submetidos ao sequenciamento.

V1B1	2	S	0,12	S	0,12	S	0,5	S	4	R
V1B3	*16*	*R*	*4*	*S*	*8*	*R*	*2*	*R*	*8*	*R*
V1B4	0,5	S	0,12	S	0,03	S	0,06	S	1	R
V1C1	32	R	0,25	S	0,12	S	0,06	S	0,5	SDD
V1C4	1	S	0,03	S	0,03	S	0,25	S	0,5	SDD
V1C5	4	SDD	0,03	S	0,03	S	0,03	S	0,12	S
V1C7	0,5	S	0	S	0	S	0,12	S	0,12	S
V1C8	4	SDD	0,06	S	0,06	S	0,03	S	0,5	SDD
V2A1	*8*	*R*	*0*	*S*	*0,06*	*S*	*16*	*R*	*1*	*R*
V2A2	2	S	0,06	S	0,03	S	1	S	0,25	SDD
V2A5	4	SDD	0,12	S	0,03	S	0,25	S	0,25	SDD
V2A9	8	R	0,03	S	0,03	S	0,03	S	0,5	SDD
V2A10	*4*	*SDD*	*4*	*S*	*1*	*R*	*4*	*R*	*2*	*R*
V2A12	4	SDD	0,25	S	0,12	S	0,12	S	0,25	SDD
V2A13	*8*	*R*	*0,12*	*S*	*0,12*	*S*	*4*	*R*	*0,5*	*SDD*
V2B1	2	S	0,03	S	0,06	S	0,06	S	1	R
V2B2	2	S	2	S	16	R	1	S	8	R
V2B3	2	S	0,12	S	0,25	SDD	0,5	S	4	R
V2B6	16	R	1	S	0,12	S	0,06	S	8	R
V2B8	1	S	0	S	0	S	0,5	S	0,25	SDD
V2B11	0,5	S	0,03	S	0,03	S	1	S	1	R
V2B12	16	R	0,12	S	0,5	SDD	0,25	S	1	R
V2B19	2	S	0	S	0,03	S	0,12	S	1	R
V2C2	1	S	0,03	S	0,03	S	0,5	S	0,5	SDD
V2C5	2	S	0,03	S	0,03	S	0,5	S	0,5	SDD
V2C10	8	R	0,12	S	0,03	S	0,5	S	2	R
V2C12	*64*	*R*	*16*	*R*	*16*	*R*	*16*	*R*	*16*	*R*
V2C13	4	SDD	0,06	S	0,25	SDD	0,5	S	0,5	SDD
V3A2	*1*	*S*	*0,03*	*S*	*0,03*	*S*	*16*	*R*	*1*	*R*
V3A4	64	R	8	S	16	R	0,5	S	16	R
V3A10	4	SDD	0,03	S	0,03	S	0,5	S	0,03	S
V3A12	64	R	16	R	16	R	1	S	16	R
V3A13	64	R	0,06	S	2	R	0,25	S	2	R
V3A14	0,25	S	0,06	S	0,03	S	0,12	S	0,25	SDD
V3A16	16	R	0,5	S	0,12	S	1	S	1	R
V3A17	64	R	0,12	S	1	R	1	S	2	R
V3A19	64	R	0,5	S	0,5	SDD	1	S	2	R
V3A22	2	S	0,03	S	0,06	S	0,25	S	1	R
V3A24	64	R	1	S	2	R	1	S	4	R
V3B6	0,5	S	0	S	0	S	0,25	S	0,5	SDD
V3B7	64	R	0,25	S	1	R	1	S	8	R
V3B8	*4*	*SDD*	*1*	*S*	*0,5*	*SDD*	*2*	*R*	*0,5*	*SDD*
V3B9	*64*	*R*	*16*	*R*	*16*	*R*	*16*	*R*	*2*	*R*

Tabela 5- Valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM - µg/ml) para os 95 isolados testados frente aos antifúngicos e seus respectivos perfis de suscetibilidade (S= Suscetível; SDD= Sensibilidade Dose-dependente; R= Resistente). Isolados em itálico foram submetidos ao sequenciamento.

V3B12	*8*	*R*	*0,03*	*S*	*2*	*R*	*8*	*R*	*1*	*R*
V3C3	8	R	16	R	16	R	1	S	2	R
V3C5	1	S	0,03	S	16	R	1	S	0,5	SDD

A figura 4 mostra a frequência relativa de cada perfil de suscetibilidade em todas as amostras para os fármacos testados. Das 95 amostras testadas, 31,58% (30/95) não apresentaram resistência a nenhum dos fármacos, 23,16% (22/95) apresentaram resistência a somente um, 22,11% (21/95) resistentes a dois fármacos, 14,74% (14/95) foram resistentes a três, 5,26% (5/95) tiveram resistência a quatro fármacos e 3,16% (3/95) apresentaram resistência a todas as drogas. Das 22 amostras que exibiram resistência a apenas um dos fármacos testados, somente os isolados I2C12 e V3B8 foram resistentes à anfotericina B exclusivamente.

Dessa forma, 63 isolados apresentaram resistência a pelo menos um antifúngico da classe dos azóis. Observou-se o predomínio de resistência ao antifúngico itraconazol (55/95), seguido de fluconazol (42/95), voriconazol (23/95) e cetoconazol (5/95).

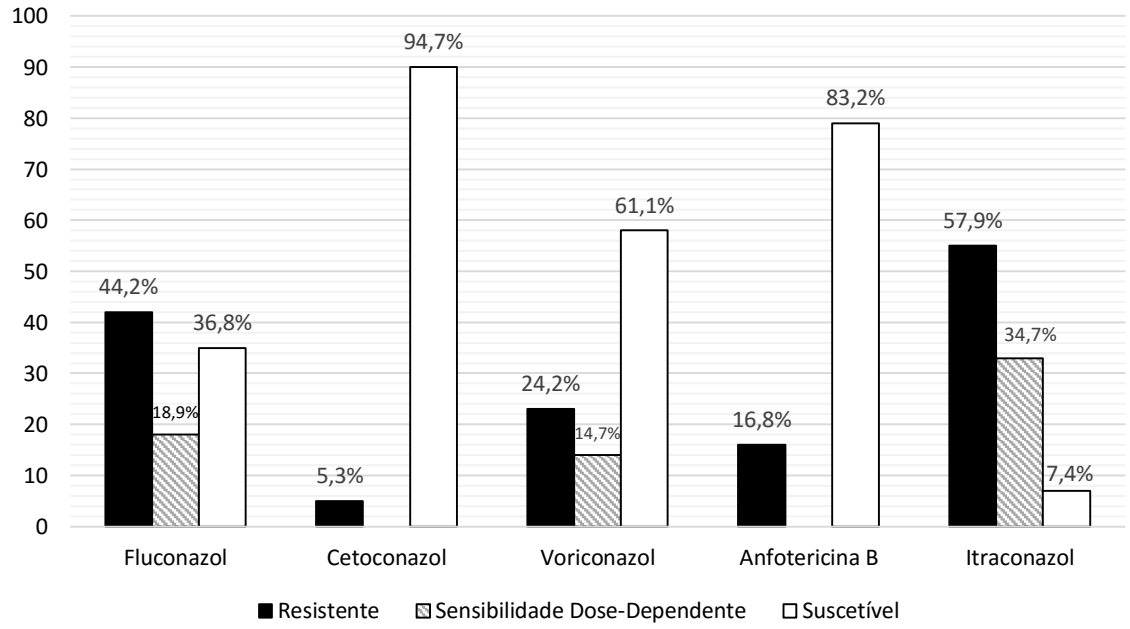

Figura 4. Gráfico da frequência relativa de cada perfil de suscetibilidade atribuído através do ensaio de concentração inibitória mínima para cada fármaco testado.

5.3 Extração de DNA genômico e amplificação da região ITS

Dos 104 isolados submetidos a extração de DNA, sete não apresentaram concentração de material genômico suficiente (provavelmente devido ao crescimento lento das amostras, dificultando a ruptura da membrana celular com o protocolo de extração utilizado) para a amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2. Dez isolados apresentaram amplificação de mais de um fragmento que possivelmente representaram contaminação das amostras e não foram utilizados para o ensaio de RFLP. A amplificação utilizando os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4 gerou fragmentos que variaram de 400 a 950 pb nas amostras (Tabela 6).

Tabela 6 - Tamanho aproximado dos fragmentos ITS1-5.8S-ITS2 obtidos da amplificação dos isolados

Isolado	ITS (pb)	Isolado	ITS (pb)	Isolado	ITS (pb)	Isolado	ITS (pb)
V1A8	400	V1C7	550	I2C25	650	V2A13	950
V2B1	400	V1C8	550	I2C3	650	V3C3	950
V2B19	400	V2A1	550	I2C4	650	V2B3	950
V2B8	400	V2A10	550	I2C8	650	I2A2	590/510
V3A22	400	V3A14	550	I3C10	650	I3C8	590/510
V3B6	400	V3A4	550	I3C11	650	I2B6	660/600
I3C5	450	V3B9	580	I3C6	650	I2B14	590/510
V2B12	450	I2B7	600	V3A13	650	I3C3	750/550
V2C13	450	I3A10	600	V3A2	650	V1A4	600/500/400
V3A12	450	V3C5	620	V3A24	650	V2A11	600/500/400
I2A11	460	I2A13	620	V3B7	650	V2A5	800/600
V2A9	460	I3A4	630	V2A12	660	V3A17	650/550/450
I2C1	470	I3C15	640	V2C2	660	V3A19	650/450
V1A7	470	I2A14	650	V3B12	670		
I2A15	480	I2A5	650	I2A3	700		
V2C12	480	I2B1	650	I2B17	700		
V2B2	490	V1A10	650	I2B9	700		
V3B8	490	V1A14	650	V2A2	700		
I2B15	500	V1A2	650	V2C5	700		
V1A13	500	V1A6	650	V2B9	750		
V1A3	500	V1B4	650	V2B6	750		
V1C1	500	V3A10	650	I3C2	760		
V1C5	500	I2B16	650	I1C5	800		
V2A7	500	I2B5	650	V2B11	850		
V3A16	500	I2C12	650	I2A12	950		
I2B19	550	I2C2	650	I2B13	950		
I3C12	550	I2C23	650	V1B1	950		
V1B3	550	I2C24	650	V1C4	950		

5.4 Perfil de restrição dos isolados através de PCR-RFLP

A partir da digestão realizada com as endonucleases de restrição *Hinf*I, *Hae*III e *Cfo*I, foram gerados diferentes padrões de fragmentos para cada amostra. Um dendrograma foi construído a partir do perfil de restrição que está apresentado na figura 5. Os fragmentos obtidos foram agrupados utilizando o coeficiente de similaridade de Dice pelo método da ligação média não ponderada (UPGMA). Fragmentos com menos de 50 pb não foram considerados para o agrupamento. Pode-se observar a presença de 53 unidades taxonômicas operacionais com 70% de similaridade. 41 amostras apresentaram 100% de similaridade com pelo menos um outro isolado, representando 16 unidades taxonômicas operacionais.

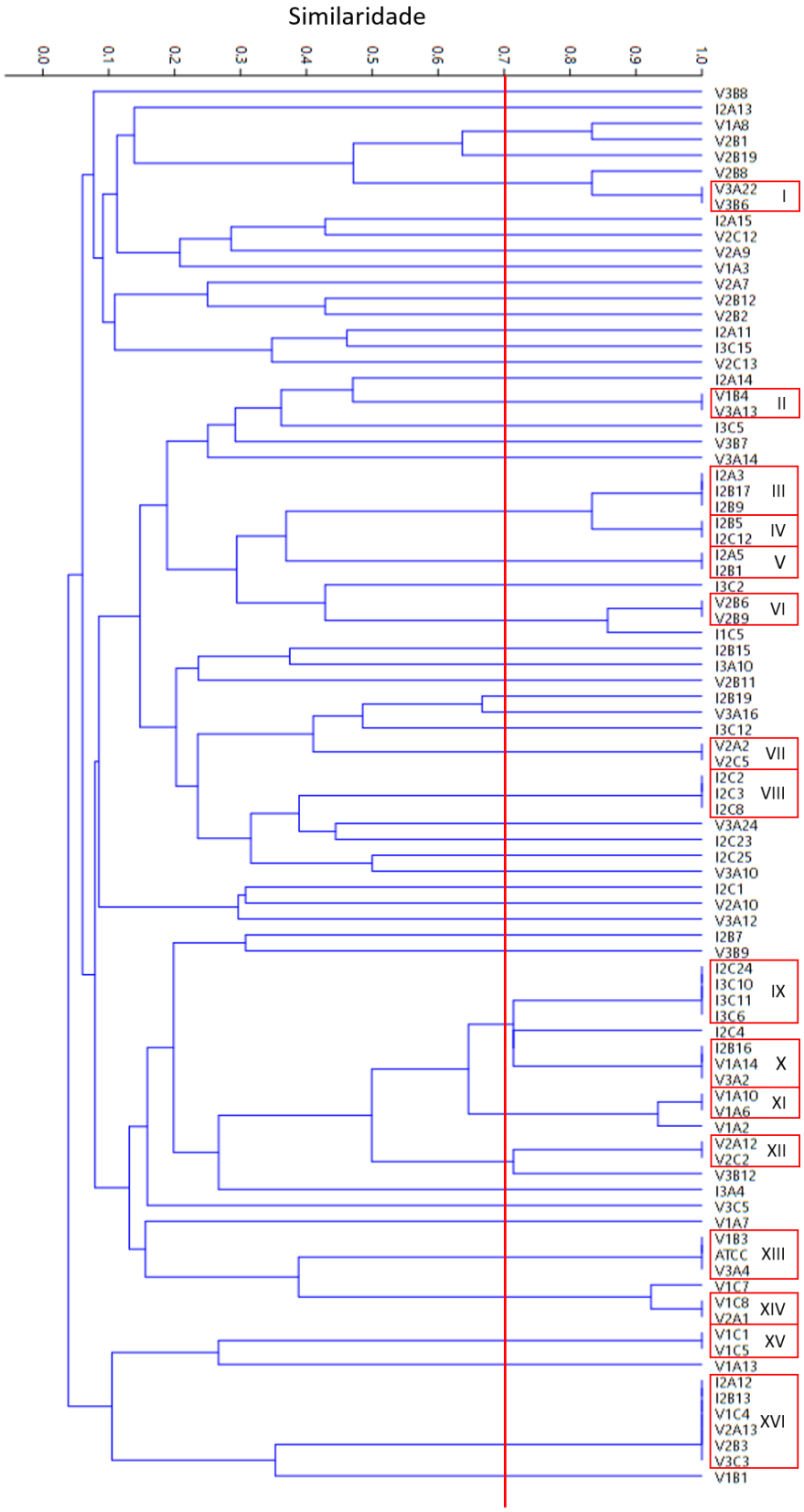

Figura 5. Dendrograma dos isolados submetidos ao PCR-RFLP com as enzimas *Hinf*I, *Hae*III e *Cfo*I. Uma matriz de similaridade foi calculada através do software PAST (*Paleontological Data Analysis*) usando o coeficiente de Dice pelo método da ligação média não ponderada (UPGMA). Amostras com 100% de similaridade estão indicadas com algarismos romanos de I – XVI.

5.5 Sequenciamento dos isolados

Foram selecionadas para o sequenciamento amostras que exibiram resistência à anfotericina B (polieno) e um antifúngico da classe dos azóis, totalizando assim 14 isolados. Além destes, os isolados I2B21, I3B5 e V2B14 analisados por Feltrin (2014) que apresentaram resistência ao fluconazol nos testes de fungigrama e CIM foram submetidos ao sequenciamento. As sequências de rDNA obtidas variaram de 396 à 858 pb. O isolado V2A10 apresentou identidade de 77,6% com a sequência da espécie *Candida bituminiphila* depositada no *MycoBank.org*. O isolado V2C12 apresentou 88.28% de identidade com a sequência de *Candida infanticola* e 88.27% de similaridade com *Candida sorbophila*. Os demais isolados apresentaram no mínimo 95% de correspondência com sequências disponíveis no *MycoBank*.org que podem ser observadas na tabela 7.

Tabela 7. Relação dos isolados submetidos ao sequenciamento e suas respectivas espécies ou gêneros, valores de identidade de sequência (Id), sobreposição e acesso no banco de dados *Mycobank.org*.

Amostra	**Espécie/Gênero**	**Id (%)**	**Sobreposição**	**Acesso**
V1B3	*Candida tropicalis*	99.743	77.49	JF300164
V2A1	*Candida parapsilosis*	100	96.545	EU552502
V2A10	*Candida bituminiphila*	77.6	67,93	PYCC 5546
V2A13	*Candida glabrata*	100	92.075	KC408959
V2C12	*Candida sp.*	95.238	90.152	SN-102 18S
	Wickerhamiella sp.	86.685	91.919	ECC3S.12
	Candida infanticola	88.283	91.919	HQ695009
	Candida sorbophila	88.272	81.061	CBS 7266
V3A2	*Debaryomyces hansenii*	100	93.791	KF273864
	Debaryomyces vanrijiae	100	92.32	CBS 5458
	Debaryomyces occidentalis	100	92.32	CBS 6472
	Debaryomyces etchellsii	100	92.32	CBS 2012
	Schwanniomyces capriottii,	100	86.275	MITS3100
	Debaryomyces fabryi	99.826	93.791	CBS 789
	Candida saitoana	99.826	93.791	CBS 8046
	Debaryomyces prosopidis	99.826	93.791	CBS 8450
V3B8	*Candida pseudolambica*	99.483	94.161	CBS 4325
	Pichia occidentalis	87.805	96.594	MITS1079
	Candida phayaonensis	83.204	92.701	PYCC 6468
	Pichia cephalocereana	81.265	98.054	CBS 7910
	Pichia kluyveri	80.893	96.594	MITS2782

Tabela 7 (continuação): Relação dos isolados submetidos ao sequenciamento e suas respectivas espécies ou gêneros, valores de similaridade (Id), sobreposição e acesso no banco de dados *Mycobank.org*.

V3B9	*Candida tropicalis*	100	76.647	KF031305
V3B12	*Debaryomyces hansenii*	100	92.434	CBS 4233
	Cryptococcus albidus	100	92.434	CBS 10959
	Candida famata	100	92.434	WM 730
	Debaryomyces occidentalis	100	90.954	CBS 6472
	Debaryomyces vanrijiae	100	90.954	CBS 5458
	Schwanniomyces capriottii,	100	84.868	NR_111306.1
	Wickerhamomyces sp.	99.824	93.586	JF781473.1
I2B9	*Debaryomyces hansenii*	100	94.127	EF190231
	Debaryomyces nepalensis	100	93.801	CBS 7761
I2B16	*Debaryomyces hansenii*	100	91.83	CBS 4233
	Debaryomyces occidentalis	100	90.359	CBS 6472
	Debaryomyces vanrijiae	100	90.359	CBS 5458
	Debaryomyces vanrijiae	100	84.314	NR_111306.1
	Wickerhamomyces sp	99.824	92.974	
I2B17	*Debaryomyces hansenii*	100	93.964	EF194843
	Candida saitoana	100	93.638	CBS 8046
	Debaryomyces prosopidis	100	93.638	CBS 8450
	Debaryomyces fabryi	100	93.638	CBS 789
	Debaryomyces occidentalis	100	92.17	CBS 5655
I2C12	*Debaryomyces hansenii*	100	94.262	FR686593
	Debaryomyces tyrocola	99.83	96.23	HE681105
	Debaryomyces fabryi	99.826	94.098	CBS 789
	Debaryomyces occidentalis	99.823	92.623	CBS 5655
	Debaryomyces macquariensis	99.823	92.623	CBS 5572
I2C24	*Candida railenensis*	99.823	93.212	HQ438312
I2B21	*Candida inconspicua*	98.444	59.953	KM252842.1
	Pichia cactophila	97.455	64.169	CBS 7103
I3B5	*Candida glabrata*	99.874	92.657	KC253982.1
V2B14	*Candida parapsilosis*	100	97.566	GU373657

Seis isolados apresentaram identidade acima de 99% com espécies do gênero *Candida*. A partir disso, o isolado V2A1 foi identificado como *C. parapsilosis* (100% de similaridade), o isolado V2A13 como *C. glabrata* (100% de similaridade), os isolados V1B3 e V3B9 como *C. tropicalis* (99,74% e 100% de similaridade, respectivamente), o isolado V3B8 como *C. pseudolambica* (99,48% de similaridade) e o isolado I2C24 como *C. railenensis* (99.82% de

similaridade).

Os demais isolados, por apresentarem um alto grau de similaridade com diferentes espécies dentro de mesmo gênero, deverão ser submetidos a um novo sequenciamento buscando outros fragmentos de DNA a fim de identificá-los.

6. DISCUSSÃO

A qualidade da água é um aspecto que requer a atenção de órgãos públicos, dos fornecedores de água, de autoridades da saúde e da população. Indicadores microbiológicos são utilizados para garantir a segurança da qualidade da água para o consumo, visto que a presença de determinados microrganismos sugere contaminação fecal acompanhada de prováveis outros patógenos. No entanto, a principal preocupação em relação à qualidade da água utilizando os métodos com indicadores microbiológicos se referem à água destinada ao consumo, atividades recreativas, uso em hortifrutigranjeiros, entre outros, porém muitas vezes desconsiderando aspectos de caráter ambiental.

Leveduras são microrganismos que ocorrem naturalmente em ambientes aquáticos, seja de forma permanente ou transitória. Diversos estudos indicam que o aumento da poluição destes ambientes é acompanhado do aumento da concentração de leveduras. No entanto, pouco desse conhecimento é empregado para estudar e avaliar a qualidade de ecossistemas aquáticos (Hageskal *et al.* 2009).

Até a presente data, o estudo de Feltrin (2014) foi o único realizado no Arroio Dilúvio levando em consideração a avaliação de leveduras presentes nesse ambiente, local altamente degradado pela ação do homem. O trabalho resultou em um alto número de leveduras provenientes do arroio, e permitiu no presente estudo a avaliação destes fungos quanto a sua diversidade e resistência a drogas antifúngicas, sendo um indicativo de que várias dessas leveduras são potencialmente patogênicas.

O ensaio de concentração inibitória mínima (CIM) é a primeira escolha para avaliar o perfil de suscetibilidade de leveduras, visto que apresenta valores padronizados para diversas drogas antifúngicas, ao contrário do ensaio de disco-difusão, que apresenta valores padronizados somente para caspofungina, fluconazol e voriconazol. O uso das duas técnicas concomitantemente, utilizando valores sugeridos pelo fabricante, busca aumentar a confiança dos resultados, uma vez que o presente trabalho trata de leveduras de origem ambiental e sem nenhum prévio conhecimento das mesmas. Feltrin (2014) realizou testes de suscetibilidade de 50 dos isolados, que foram coletados desse ambiente. Os isolados estudados eram termotolerantes (crescimento a 37º C) apresentando

fatores de virulência e, portanto potenciais oportunistas à saúde do homem.

Apesar de incompleto, o ensaio de disco-difusão realizado neste trabalho exibiu alta prevalência no perfil de resistência e de suscetibilidade dose-dependente dos isolados aos antifúngicos da classe dos azóis. Somente quatro isolados apresentaram resistência exclusivamente a um polieno (anfotericina B ou nistatina), 15 isolados apresentando resistência a voriconazol ou fluconazol.

Esta tendência foi confirmada através do ensaio de CIM, onde 63 dos 95 isolados apresentaram resistência a no mínimo um antifúngico da classe dos azóis. Os resultados referentes ao ensaio de CIM vão ao encontro de resultados obtidos em outros trabalhos testando o perfil de susceptibilidade de leveduras isoladas do ambiente. Feltrin (2014) observou que 30% dos isolados testados, que eram termotolerantes e com fatores de virulência, apresentaram resistência a fluconazol e itraconazol. De forma semelhante, Medeiros *et al.* (2008) observaram que 50% das leveduras isoladas a partir de amostras de água de lagos e rios da Bacia do Rio Doce (Minas Gerais/BR) foram capazes de crescer a 37º C, exibiram resistência à itraconazol e nenhum apresentou sensibilidade ao fármaco. Apesar de em menor incidência, o estudo de Medeiros *et al.* (2008) também apresentou espécies com resistência ao fluconazol, incluindo espécies potencialmente patogênicas previamente consideradas suscetíveis ao fármaco em estudos clínicos. É interessante observar que houve a prevalência de leveduras resistentes isoladas a partir de fontes de água com maiores índices de contaminação (Medeiros *et al.* 2008). Brandão *et al.* (2010) também relataram elevado perfil de resistência ao itraconazol e anfotericina B de leveduras isoladas de lagos de água doce no sudeste do Brasil capazes de crescer a 37º C. Estes trabalhos reforçam a relação entre a qualidade da água e as contagens de leveduras, já que observaram correlação positiva com as concentrações de coliformes presentes nos locais de coleta.

Desnos-Ollivier *et al.* (2012) avaliaram o perfil de suscetibilidade de 1592 leveduras isoladas de animais, água e outras fontes ambientais, alimentos, produtos industriais. Diferente de outros estudos, mostraram elevado perfil de resistência ao fluconazol, com 46.5% das leveduras com valores de MIC igual ou maior a 8 µg/mL, ponto de corte utilizado para considerar a amostra resistente no ensaio para este fármaco. Brilhante *et al.* (2016) testaram a resistência de 37 isolados de leveduras obtidas do lago Catú (Ceará/BR) e observaram que sete

(18,9%) apresentaram resistência a fluconazol e itraconazol simultaneamente, cinco (13,5%) apresentaram resistência ao itraconazol e um (2,7%) apresentava resistência ao fluconazol, sendo que a resistência foi observada em maior prevalência no ponto de coleta próximo de onde havia deposição de esgoto doméstico sem tratamento de água.

Visto que os pontos de coleta escolhidos por Feltrin (2014) consistem em regiões próximas a hospitais localizados nos entornos do Arroio Dilúvio, a possível deposição de esgoto hospitalar contendo leveduras resistentes ou antifúngicos que atuariam como fator de seleção representam uma possível hipótese para a manifestação de resistência aos antifúngicos testados, mas espera-se que o esgoto hospitalar tenha o destino apropriado. Apesar da inegável importância em avaliar estes microrganismos e sua resistência no âmbito clínico, a variabilidade no perfil de resistência de amostras de água e outras fontes registrada na literatura sugere grande influência de fatores ambientais e da contaminação destes na manifestação dos diferentes fenótipos observados. A manifestação de resistência em espécies isoladas a partir do ambiente que anteriormente apresentavam suscetibilidade aos fármacos quando isoladas a partir de amostras clínicas, levou a Desnos-Ollivier *et al.* (2012) reforçarem a influência do ambiente sobre os organismos, e levanta a questão de qual fator poderia estar selecionando microrganismos resistentes em um ambiente em que não se espera a presença de fármacos como fator direto de seleção.

Alguns trabalhos sugerem que o uso continuo e indiscriminado de antifúngicos e fungicidas da classe dos azóis na agricultura e em outros produtos rotineiramente utilizados pela população, resulta na contaminação de corpos da água e do solo, agindo como agentes seletores em fungos isolados do ambiente (Hof 2008, Azevedo *et al.* 2015, Chen & Ying 2015). Esta hipótese foi corroborada em um estudo realizado por Snelders *et al.* (2009), onde foi observada alta resistência ao itraconazol em 15 isolados ambientais de fungos filamentosos pertencente ao gênero *Aspergillus*. Os mesmos apresentaram suscetibilidade reduzida ao voriconazol, mas, em contrapartida, nenhum exibiu resistência à anfotericina B, pertencente a classe dos polienos. O trabalho ainda comparou a resistência a outros 15 isolados sensíveis ao itraconazol, observando que os mesmos foram também sensíveis ao voriconazol. As

amostras que apresentaram resistência se agruparam geneticamente com fungos isolados de pacientes, e os autores sugerem que a resistência é adquirida por pressão do ambiente (onde fungicidas estariam presentes), e este seria fonte de contaminação dos pacientes (Snelders *et al.* 2009).

Visto que azóis interagem e tem como alvo o mesmo sítio ativo na enzima lanosterol 14-α-desmetilase, tanto os azóis utilizados na clínica quanto os azóis utilizados na agricultura compartilham do mesmo modo de ação (Azevedo *et al.* 2015). Dessa forma, pode-se levantar a hipótese de que a resistência a um ou mais antifúngicos pertencentes a classe dos azóis pode ocorrer de forma cruzada, e o surgimento de um mecanismo capaz de evadir a ação de uma droga se aplique a outros fármacos pertencentes a mesma classe. Este cenário parece provável visto que além de fungicidas serem utilizados indiscriminadamente há muitos anos, estes apresentam um tempo de meia vida longo, persistindo e acumulando no ambiente e permitindo a seleção gradual de mecanismos de resistência pelos micro-organismos (Azevedo *et al.* 2015).

Outra hipótese na forma como leveduras podem adquirir resistência no ambiente é levantada por (Brilhante *et al.* 2015). No trabalho, os autores argumentam que os resultados observados nos estudos de Medeiros *et al.* (2008) e Brandão *et al.* (2010) poderiam estar relacionados à atividade antropogênica e ao ambiente altamente degradado do qual foram isoladas as leveduras. A presença de resíduos industriais e outros poluentes em corpos da água são capazes de promover alterações tanto na expressão quanto na sequência de genes e nucleotídeos, que ocasionalmente poderiam ocorrer em vias relacionadas à resistência (Brilhante *et al.* 2015).

A manifestação da resistência a antifúngicos através da exposição de leveduras a compostos inespecíficos provenientes das mais diversas fontes de poluição, poderia se dar, principalmente, pelo aumento da expressão de bombas de efluxo codificadas pelos genes *CDR1* e *CDR2* na membrana da célula. Estes genes são responsáveis por diversas atividades nas células, como a diminuição de componentes tóxicos intracelulares, a secreção de moléculas relacionadas a comunicação celular, adaptação ao estresse, dentre outros. Visto que azóis são capazes de entrar passivamente na célula de fungos, o aumento da expressão destas proteínas ocasionaria, de forma indireta, a diminuição de sua concentração e consequente resistência do microrganismo (Brilhante *et al.*

2015). Este efeito não se aplica igualmente a todas as drogas da classe, visto que alguns azóis, como o posaconazol, não são eliminados tão prontamente; mas antifúngicos como o voriconazol, fluconazol, cetoconazol e voriconazol são rapidamente transportados por estas proteínas (Hof 2008). Esta observação pode explicar parcialmente porque Snelders *et al.* (2009) observou maior perfil de resistência ao itraconazol e voriconazol quando comparados ao posaconazol.

Esta hipótese de resistência através do aumento na expressão de bombas de efluxo foram reforçadas no trabalho recentemente publicado por Brilhante *et al.* (2016), onde leveduras oriundas de lagos de água doce com resistência ao fluconazol e itraconazol tiveram a atividade de suas bombas de efluxo inibidas pela adição de prometazina e haloperidol. Ensaios de CIM realizados após este ensaio resultaram em reversão do fenótipo de resistência aos azóis, indicando o envolvimento direto das bombas de efluxo na sensibilidade das leveduras ao fármaco (Brilhante *et al.* 2016).

Por este motivo, Brilhante *et al.* (2015) sugerem a utilização de leveduras pertencentes ao gênero *Candida* como indicadores de eutrofização e contaminação por coliformes fecais em ambientes aquáticos, tanto pela correlação positiva já observada em outros estudos, quanto pela variabilidade e manifestação de resistência a antifúngicos.

No entanto, dada a variabilidade no perfil de resistência observada no presente trabalho, não é possível inferir se a resistência observada por leveduras do gênero *Candida* seria uma resposta direta a alterações no ambiente aquático. Isto porque, caso estes microrganismos tenham alcançado o ambiente junto com dejetos de origem principalmente humana, a resistência pode ter sido adquirida previamente à deposição na água, através da exposição a antifúngicos em humanos e animais.

O sequenciamento dos isolados deste trabalho foi realizando visando identificar as amostras com resistência a duas classes de antifúngicos, resultando em nove leveduras pertencentes do gênero *Candida.* O perfil de resistência frente ao itraconazol e ao fluconazol das espécies *C. tropicalis, C. parapsilosis* e *C. glabrata* em amostras de água também foi observado nos estudos de Medeiros *et al.* (2008), Brandão *et al.* (2010) e Brilhante *et al.* (2016). Porém, nestes trabalhos não há registro de resistência à anfotericina B da espécie de *C. parapsilosis*, diferente do que foi observado para o isolado V2A1,

que apresentou valor de CIM de 16 µg/mL para o fármaco.

Nos últimos anos tem se observado o aumento da incidência e resistência de leveduras a antifúngicos em candidíases causadas por candidas não-albicans como *C. parapsilosis, C. glabrata* e *C. tropicalis* (Silva *et al.* 2012) e a presença destas no Arroio Dilúvio merece atenção. As águas do arroio desaguam no Lago Guaíba, que por sua vez, serve como fonte de abastecimento para a cidade de Porto Alegre (Brandão & Kindel 2010). Como previamente discutido, os parâmetros microbiológicos utilizados para assegurar a qualidade da água para consumo não consideram a presença de leveduras e outros fungos, sendo assim, a presença destas espécies pode oferecer um risco à população.

Os isolados V3B8 e I2C24 foram identificados como *C. pseudolambica* e *C. railenensis* respectivamente e não foram encontrados registros de patogenicidade ou de resistência destas espécies na literatura. Ambas espécies são incapazes de crescer à 37ºC, apresentam ecologia generalista, permitindo a ocupação de diversos habitats, como em associação com insetos, árvores em decomposição, solo e bivalves (Lachance *et al.* 2011). Além destes ambientes, a espécie *C. pseudolambica* foi também isolada de lagos artificiais (Silva-Bedoya *et al.* 2014), corpos d'água hiperácidos (Libkind *et al.* 2014) e, junto com outras cepas de levedura, é utilizada para bioaumentação no tratamento de efluentes (Chigusa & Nakai 1996, Hoellein *et al.* 2014). Silva-Bedoya *et al.* (2014) argumentam que além de indicadores de qualidade da água, a presença de leveduras em ambientes degradados oferece a possibilidade de explorar aspectos fisiológicos de interesse biotecnológico e industrial, em função da vasta adaptação enzimática que estes microrganismos apresentam para que seja possível sobreviver às condições dos ambientes onde foram isolados. Neste sentido, estudos visando analisar a resistência destas leveduras são bastante relevantes. A manifestação de resistência a antifúngicos observada no presente trabalho sugere que a aquisição deste fenótipo está relacionada a pressões ambientais. No entanto, faltam trabalhos investigando a resistência destas espécies para que se possa afirmar que esta seja de fato adquirida.

Este trabalho observou alta prevalência de isolados resistentes a antifúngicos da classe dos azóis exclusivamente. Por isso, a identificação dos mesmos poderia elucidar a existência e relevância de leveduras não pertencentes ao gênero *Candida* ou reforçar o domínio deste gênero em

amostras ambientais. Assim, uma análise mais ampla, abrangendo leveduras em toda a sua diversidade e comparando ambientes livres ou pouco contaminados com ambientes altamente degradados, poderia contribuir fortemente na elucidação e compreensão dos efeitos da poluição sobre estes microrganismos.

A suscetibilidade frente a anfotericina B observada neste trabalho, apesar de em menor prevalência, é um aspecto que merece destaque. A aquisição de resistência a esse fármaco mostra-se extremamente rara mesmo após 50 anos de sua introdução na terapia fúngica (Vincent *et al.* 2013). Sokol-Anderson *et al.* (1988) observaram que a resistência frente a anfotericina B, além de ocorrer diretamente por alterações no conteúdo de esteróis na membrana celular, pode ser resultado de melhor adaptação aos efeitos oxidativos ocasionados pela droga, havendo maior expressão da enzima catalase em leveduras resistentes do gênero *Candida*. Estas observações foram corroboradas por Linares *et al.* (2013), que observaram o aumento da expressão de superóxido dismutase e catalase em cepas de *C. albicans* e *C. dubliniensis* resistentes à anfotericina B e ao fluconazol. Visto que ambientes altamente contaminados podem induzir uma reposta oxidativa nos organismos (Mahboob *et al.* 2014), pode-se levantar a hipótese de que a resistência observada nos isolados neste trabalho frente duas classes de antifúngicos simultaneamente seja, também, resultado de adaptação ao estresse oxidativo causado pelo ambiente.

Em relação a análise dos fragmentos gerados pela técnica de PCR-RFLP, o dendrograma gerado indica a presença de 53 unidades taxonômicas operacionais com 70% de similaridade. Esteve-Zarzoso *et al.* (1999) sugerem o uso e padronização do ensaio para identificação de espécies de leveduras. No entanto, o surgimento de técnicas moleculares mais precisas, juntamente com a dificuldade de reprodução das condições do ensaio em diferentes laboratórios, fazem com que o PCR-RFLP seja mais indicado para o estudo da diversidade (Kurtzman *et al.* 2015). Além disso, o número de espécies de leveduras descritas nos últimos anos tem crescido e o banco de dados de PCR-RFLP-ITS (https://www.yeast-id.org), que disponibiliza o perfil de fragmentos de restrição de aproximadamente 200 espécies, não contempla grande parte das leveduras atualmente conhecidas.

Apesar de sua limitação para identificação direta, a técnica de PCR-RFLP pode ser aliada às técnicas de identificação moleculares para permitir a

diferenciação entre isolados que apresentaram sequências alinhadas com mais de uma espécie. Neste trabalho, seis dos 17 isolados submetidos ao sequenciamento exibiram entre 95% e 100% de similaridade com mais de uma espécie de levedura do gênero *Debaryomyces* disponível no *MycoBank.org*, e todas alinharam com 100% de similaridade com a espécie *D. hansenii.* Os diferentes padrões de restrição produzidos pelo PCR-RFLP poderiam sugerir que sejam de outras espécies do gênero que também apresentaram alta porcentagem de similaridade no sequenciamento.

Os isolados V3A2 e I2B16 apresentaram 100% de similaridade entre si na técnica de PCR-RFLP, e através do sequenciamento, apresentaram alinhamento em comum com as espécies *Debaryomyces hansenii*, *Debaryomyces vanrijiae* e *Debaryomyces occidentalis*, todas com 100% de similaridade. As amostras I2B9 e I2B17 também exibiram o mesmo padrão de restrição, mas suas sequências alinharam apenas com a espécie de *Debaryomyces hansenii* em comum. No entanto, testes adicionais devem ser realizados para identificação precisa entre as espécies do gênero *Debaryomyces*. Wrent *et al.* (2015) observaram que as espécies *D. hansenii*, *D. fabryi* e *D. subglobosus* produziram o mesmo perfil de fragmentos de restrição após digestão com as endonucleases *Hinf*I*, Hae*III e *Cfo*I. O mesmo já havia sido observado por Ramos *et al.* (1998), que analisaram o perfil de restrição gerado por dez endonucleases na região ITS de dez espécies do gênero, e observaram alta homogeneidade. Dessa forma, não é possível afirmar se os diferentes padrões de restrição obtidos neste trabalho representam de fato polimorfismo entre as espécies do gênero *Debaryomyces*. Estas diferenças podem ser resultado de limitações da técnica, como a resolução e interpretação das imagens do gel de agarose e, por isso, outras abordagens devem ser utilizadas para permitir uma identificação confiável.

Características fisiológicas e morfológicas das espécies do gênero *Debaryomyces* não parecem suficientes para diferenciá-las, podendo muitas vezes levar a identificações errôneas (Martorell *et al.* 2005, Wrent *et al.* 2015, Tafer *et al.* 2016). Além disso, a região ITS é altamente conservada em *Debaryomyces*. Martorell *et al.* (2005) observaram que as espécies *D. castellii, D. coudertii, D. hansenii, D. nepalensis, D. polymorphus, D pseudopolymorphus, D. robertsiae, D. udenii* e *D. vanrijiae* apresentaram sequencias da região ITS com similaridade acima de 99% com uma ou mais espécies do gênero. Por isso,

diversos marcadores moleculares alternativos tem sido propostos, como o uso da sequência de introns dos genes ACT1 (Martorell *et al.* 2005) e RPL33 (Jacques *et al.* 2009), e do homólogo putativo do gene PAD1 (Wrent *et al.* 2015). O desenvolvimento de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene PAD1 permitiram a diferenciação precisa entre *D. hansenii* e outras espécies do gênero e, além destes marcadores, os domínios 1 e 2 (D1/D2) do gene da subunidade maior do ribossomo também podem ser utilizados como alternativa para melhor distinção dentro do gênero (Wrent *et al.* 2015).

As limitações do uso do PCR-RFLP para a identificação de espécies também puderam ser observadas nos dois isolados identificados no sequenciamento como *Candida tropicalis* (V1B3 e V3B9), visto que aparecem em unidades taxonômicas operacionais distintas. Apesar da utilização de um marcador molecular e uma cepa de *Candida albicans* como controle para o cálculo e padronização do tamanho dos fragmentos, a diferença de 30pb entre o tamanho do fragmento ITS e entre os produtos da digestão observado para os dois isolados foi suficiente para que estes aparecessem separados. Assim, a técnicas moleculares precisas de identificação, como o sequenciamento da região ITS e D1/D2 do rDNA, além de marcadores moleculares alternativos para distinção entre espécies do mesmo gênero, mostram-se extremamente importantes para o reconhecimento de espécies e na contribuição para a taxonomia de leveduras.

Além de espécies potencialmente patogênicas com perfil de resistência, foram encontradas leveduras com potencial biotecnológico. Em conjunto, estes resultados corroboram a importância em se avaliar a diversidade biológica em ambientes degradados e em relacionar a contaminação na adaptação dos mesmos. O estudo da resistência em leveduras ambientais é extremamente relevante visto que a aquisição destes mecanismos por fungos acontece em taxas muito menores do que é observado em bactérias, por exemplo. Mesmo assim, os estudos analisando leveduras ambientais (que ainda são escassos) indicam que este fenótipo não é tão raro quanto se espera.

diversos marcadores moleculares alternativos tem sido propostos, como o uso da sequência de introns dos genes ACT1 (Martorell *et al.* 2005) e RPL33 (Jacques *et al.* 2009), e do homólogo putativo do gene PAD1 (Wrent *et al.* 2015). O desenvolvimento de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene PAD1 permitiram a diferenciação precisa entre *D. hansenii* e outras espécies do gênero e, além destes marcadores, os domínios 1 e 2 (D1/D2) do gene da subunidade maior do ribossomo também podem ser utilizados como alternativa para melhor distinção dentro do gênero (Wrent *et al.* 2015).

As limitações do uso do PCR-RFLP para a identificação de espécies também puderam ser observadas nos dois isolados identificados no sequenciamento como *Candida tropicalis* (V1B3 e V3B9), visto que aparecem em unidades taxonômicas operacionais distintas. Apesar da utilização de um marcador molecular e uma cepa de *Candida albicans* como controle para o cálculo e padronização do tamanho dos fragmentos, a diferença de 30pb entre o tamanho do fragmento ITS e entre os produtos da digestão observado para os dois isolados foi suficiente para que estes aparecessem separados. Assim, a técnicas moleculares precisas de identificação, como o sequenciamento da região ITS e D1/D2 do rDNA, além de marcadores moleculares alternativos para distinção entre espécies do mesmo gênero, mostram-se extremamente importantes para o reconhecimento de espécies e na contribuição para a taxonomia de leveduras.

Além de espécies potencialmente patogênicas com perfil de resistência, foram encontradas leveduras com potencial biotecnológico. Em conjunto, estes resultados corroboram a importância em se avaliar a diversidade biológica em ambientes degradados e em relacionar a contaminação na adaptação dos mesmos. O estudo da resistência em leveduras ambientais é extremamente relevante visto que a aquisição destes mecanismos por fungos acontece em taxas muito menores do que é observado em bactérias, por exemplo. Mesmo assim, os estudos analisando leveduras ambientais (que ainda são escassos) indicam que este fenótipo não é tão raro quanto se espera.

7. CONCLUSÃO

Foram recuperados 104 isolados de leveduras provenientes do Arroio Dilúvio em Porto Alegre, dos quais 95 foram avaliados em relação à resistência a agentes antifúngicos através do ensaio de concentração inibitória mínima e 97 utilizados nas técnicas moleculares.

Foi possível observar alta prevalência de leveduras com resistência a antifúngicos da classe dos azóis através do ensaio de concentração inibitória mínima. A técnica de disco-difusão realizado com alguns isolados sugere que as leveduras apresentam a mesma tendência de resistência aos azóis.

Apesar de o número de isolados resistentes à anfotericina B ter sido menor (16/95), visto que a manifestação deste fenótipo é incomum, a resistência ao fármaco foi utilizada como critério para o sequenciamento dos isolados.

A técnica de PCR-RFLP-ITS permitiu a construção de um dendrograma onde foram formadas 53 unidades taxonômicas operacionais com 70% de similaridade, indicando a diversidade de leveduras encontrada no Arroio Dilúvio.

O sequenciamento da região ITS das amostras permitiu a identificação com 100% de identidade com as espécies *Candida tropicalis, C. parapsilosis, C. glabrata, C. railenensis* e *C. inconspicua,* no entanto, outros isolados apresentaram entre 95% e 100% de similaridade com mais de uma espécie, principalmente pertencentes ao gênero *Debaryomyces.*

8. REFERÊNCIAS

Al-Gabr, H., T. Zheng , X. Yu (2014). Fungi Contamination of Drinking Water. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 228. D. M. Whitacre, Springer International Publishing. **228:** 121-139.

Arvanitidou, M., K. Kanellou, V. Katsouyannopoulos , A. Tsakris (2002). "Occurrence and densities of fungi from northern Greek coastal bathing waters and their relation with faecal pollution indicators." Water Research **36**(20): 5127-5131.

Azevedo, M.-M., I. Faria-Ramos, L. C. Cruz, C. Pina-Vaz , A. Gonçalves Rodrigues (2015). "Genesis of Azole Antifungal Resistance from Agriculture to Clinical Settings." Journal of Agricultural and Food Chemistry **63**(34): 7463-7468.

Bain, R., R. Cronk, R. Hossain, S. Bonjour, K. Onda, J. Wright, H. Yang, T. Slaymaker, P. Hunter, A. Prüss-Ustün , J. Bartram (2014). "Global assessment of exposure to faecal contamination through drinking water based on a systematic review." Tropical Medicine & International Health **19**(8): 917-927.

Basso, L. A., L. G. R. Moreira , F. Pizzato (2011). "A influência da precipitação na concentração e carga de sólidos em cursos d'água urbanos: o caso do arroio Dilúvio, Porto Alegre-RS." Geosul **26**(52): 145-163.

Bernard, D. (2010). "Yeats evolutionary genomics." Nature Reviews | Genetics **11**.

Bondaryk, M., W. Kurzątkowski , M. Staniszewska (2013). "Antifungal agents commonly used in the superficial and mucosal candidiasis treatment: mode of action and resistance development." Postepy dermatologii i alergologii **30**(5): 293-301.

Brandão, L. R., A. O. Medeiros, M. C. Duarte, A. C. Barbosa , C. A. Rosa (2010). "Diversity and antifungal susceptibility of yeasts isolated by multiple-tube fermentation from three freshwater lakes in Brazil." Journal of Water and Health.

Brandão, T. V. , E. A. I. Kindel (2010). "Dilúvio: visões sobre um arroio." REMEA - Revista eletrônica do Mestrado em Educaçào Ambiental **25**.

Brilhante, R. S. N., M. A. N. Paiva, C. M. S. Sampaio, D. S. C. M. Castelo-Branco, L. P. Alencar, T. J. P. G. Bandeira, R. A. Cordeiro, W. Aquino Pereira Neto, J. L. B. Moreira, J. J. C. Sidrim , M. F. G. Rocha (2015). "Surveillance of Azole Resistance Among Candida spp. as a Strategy for the Indirect Monitoring of Freshwater Environments." Water, Air, & Soil Pollution **226**(3): 1-9.

Brilhante, R. S. N., M. A. N. Paiva, C. M. S. Sampaio, D. S. C. M. Castelo-Branco, C. E. C. Teixeira, L. P. d. Alencar, T. J. P. G. Bandeira, A. J. Monteiro, R. A. Cordeiro, W. A. Pereira-Neto, J. J. C. Sidrim, J. L. B. Moreira , M. F. G. Rocha (2016). "Azole resistance in Candida spp. isolated from Catú Lake, Ceará, Brazil: an efflux-pump-mediated mechanism." Brazilian Journal of Microbiology **47**: 33-38.

Brown, G. D., D. W. Denning, N. A. R. Gow, S. M. Levitz, M. G. Netea , T. C. White

(2012). "Hidden Killers: Human Fungal Infections." Science Translational Medicine **4**(165): 165rv113-165rv113.

Buck, J. (1975). "Distribution of aquatic yeasts — Effect of incubation temperature and chloramphenicol concentration on isolation." Mycopathologia **56**(2): 73-79.

Carneiro, M. T., D. M. Silva, T. G. P. Chagas, V. Zahner, M. D. Asensi , A. N. Hagler (2015). "Bioindicadores Complementares à Colimetria na Análise da Qualidade da Água: O Potencial das Leveduras no Lago Juturnaíba/RJ." Sistemas & Gestão **10**(3): 542-552.

Carr, G. M. , J. P. Neary (2008). Water quality for ecosystem and human health, UNEP/Earthprint.

Chanprasartsuk, O., C. Prakitchaiwattana , R. Sanguandeekul (2013). "Comparison of Methods for Identification of Yeasts Isolated during Spontaneous Fermentation of Freshly Crushed Pineapple Juices." Journal of Agricultural Science and Technology **15**(Supplementary Issue): 1779-1790.

Chen, Z.-F. , G.-G. Ying (2015). "Occurrence, fate and ecological risk of five typical azole fungicides as therapeutic and personal care products in the environment: A review." Environment International **84**: 142-153.

Chigusa, K. , Y. Nakai (1996). Apparatus for biologically treating lipid-containing waste water, Google Patents.

CLSI 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard **M27-A3**. 2008.

CLSI 2009. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Guideline, **M44-A2**. 2009.

CLSI 2012. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts: Informational Supplement **M44-S3**. 2009.

CLSI 2012. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Fourth Informational Supplement **M27-S4**. 2012.

Coelho, M. A., J. M. F. Almeida, I. M. Martins, A. Jorge da Silva , J. P. Sampaio (2010). "The dynamics of the yeast community of the Tagus river estuary: testing the hypothesis of the multiple origins of estuarine yeasts." Antonie van Leeuwenhoek **98**(3): 331-342.

Cooper Jr, C. R. (2011). Chapter 2 - Yeasts Pathogenic to Humans. The Yeasts (Fifth Edition). C. P. K. W. F. Boekhout. London, Elsevier**:** 9-19.

Costello, M. J., R. M. May , N. E. Stork (2013). "Can We Name Earth's Species Before They Go Extinct?" Science **339**(6118): 413-416.

de Almeida, J. M. G. C. F. (2005). "Yeast community survey in the Tagus estuary."

FEMS Microbiology Ecology **53**(2): 295-303.

DEP, Departamento de Esgotos Pluviais (2016). "O Arroio Dilúvio." from http://www2.portoalegre.rs.gov.br/dep/. Acesso em janeiro 2016

Desnos-Ollivier, M., V. Robert, D. Raoux-Barbot, M. Groenewald , F. Dromer (2012). "Antifungal Susceptibility Profiles of 1698 Yeast Reference Strains Revealing Potential Emerging Human Pathogens." PLoS ONE **7**(3): e32278.

Dodds, W. K., J. S. Perkin , J. E. Gerken (2013). "Human Impact on Freshwater Ecosystem Services: A Global Perspective." Environmental Science & Technology **47**(16): 9061-9068.

Elena, R., E.-S. Simona, P. Diana, S. Ionela, M. Cojocaru , V. Tatiana (2015). "Identification of species of the genus Candida by analysis of 5.8 S rRNA gene." Romanian Biotechnological Letters **20**(4): 10585.

Ellis, D. (2002). "Amphotericin B: spectrum and resistance." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **49**(suppl 1): 7-10.

Esteve-Zarzoso, B., C. Belloch, F. Uruburu , A. Querol (1999). "Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers." International Journal of Systematic Bacteriology **49**(1): 329-337.

Fadda, M. E., M. B. Pisano, L. Scaccabarozzi, V. Mossa, M. Deplano, P. Moroni, M. Liciardi , S. Cosentino (2013). "Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of yeast species isolated from bovine intramammary infection." Journal of Dairy Science **96**(12): 7692-7697.

Feltrin, T. (2014). Ocorrência de leveduras oportunistas em amostras de água do Arroio Dilúvio em Porto Alegre. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. **Mestre**.

Ferreira, M. E. , D. Grattapaglia (1996). "Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética."

Francis, M. (2013). "A preliminary investigation of marine yeast biodiversity in New Zealand waters."

Ghannoum, M. A. , L. B. Rice (1999). "Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance." Clinical Microbiology Reviews **12**(4): 501-517.

Guillamón, J. M., J. Sabaté, E. Barrio, J. Cano , A. Querol (1998). "Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region." Archives of Microbiology **169**(5): 387-392.

Hageskal, G., N. Lima , I. Skaar (2009). "The study of fungi in drinking water." Mycological Research **113**(2): 165-172.

Hagler, A. N. , L. C. Mendonça-Hagler (1981). "Yeasts from Marine and Estuarine Waters with Different Levels of Pollution in the State of Rio de Janeiro, Brazil." Applied and Environmental Microbiology **41**(1): 173-178.

Hamill, R. J. (2013). "Amphotericin B Formulations: A Comparative Review of Efficacy and Toxicity." Drugs **73**(9): 919-934.

Hoellein, T., M. Rojas, A. Pink, J. Gasior , J. Kelly (2014). "Anthropogenic Litter in Urban Freshwater Ecosystems: Distribution and Microbial Interactions." PLoS ONE **9**(6): e98485.

Hof, H. (2008). "Is there a serious risk of resistance development to azoles among fungi due to the widespread use and long-term application of azole antifungals in medicine?" Drug Resistance Updates **11**(1–2): 25-31.

Holland, R. A., K. A. Scott, M. Flörke, G. Brown, R. M. Ewers, E. Farmer, V. Kapos, A. Muggeridge, J. P. W. Scharlemann, G. Taylor, J. Barrett , F. Eigenbrod (2015). "Global impacts of energy demand on the freshwater resources of nations." Proceedings of the National Academy of Sciences **112**(48): E6707-E6716.

Jacques, N., S. Mallet , S. Casaregola (2009). "Delimitation of the species of the Debaryomyces hansenii complex by intron sequence analysis." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **59**(5): 1242-1251.

Jeyaram, K., W. M. Singh, A. Capece , P. Romano (2008). "Molecular identification of yeast species associated with 'Hamei' — A traditional starter used for rice wine production in Manipur, India." International Journal of Food Microbiology **124**(2): 115-125.

Johnson, E. A. , C. Echavarri-Erasun (2011). Chapter 3 - Yeast Biotechnology. The Yeasts (Fifth Edition). C. P. K. W. F. Boekhout. London, Elsevier**:** 21-44.

Kanafani, Z. A. , J. R. Perfect (2008). "Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact." Clinical Infectious Diseases **46**(1): 120-128.

Kathiravan, M. K., A. B. Salake, A. S. Chothe, P. B. Dudhe, R. P. Watode, M. S. Mukta , S. Gadhwe (2012). "The biology and chemistry of antifungal agents: A review." Bioorganic & Medicinal Chemistry **20**(19): 5678-5698.

Kaufman, M. M., D. T. Rogers , K. S. Murray (2011). Urban watersheds: geology, contamination, and sustainable development, CRC Press.

Klein, R. D. (1979). "URBANIZATION AND STREAM QUALITY IMPAIRMENT1." JAWRA Journal of the American Water Resources Association **15**(4): 948-963.

Kontoyiannis, D. P. , R. E. Lewis (2002). "Antifungal drug resistance of pathogenic fungi." The Lancet **359**(9312): 1135-1144.

Kurtzman, C., J. W. Fell , T. Boekhout (2011). The Yeasts: A Taxonomic Study,

Elsevier Science.

Kurtzman, C. P., R. Q. Mateo, A. Kolecka, B. Theelen, V. Robert , T. Boekhout (2015). "Advances in yeast systematics and phylogeny and their use as predictors of biotechnologically important metabolic pathways." FEMS Yeast Research **15**(6).

Lachance, M.-A., T. Boekhout, G. Scorzetti, J. W. Fell , C. P. Kurtzman (2011). Chapter 90 - Candida Berkhout (1923). The Yeasts (Fifth Edition). London, Elsevier**:** 987-1278.

Lachance, M.-A. , W. T. Starmer (2011). Yeast Ecology. The Yeasts: A Taxonomic Study. C. Kurtzman, J. W. Fell and T. Boekhout, Elsevier Science.

Las Heras-Vazquez, F. J., L. Mingorance-Cazorla, J. M. a. Clemente-Jimenez , F. Rodriguez-Vico (2003). "Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers." FEMS Yeast Research **3**(1): 3-9.

Lennart, B. (2010). "The global atmospheric water cycle." Environmental Research Letters **5**(2): 025202.

Lewis, R. E. (2011). "Current Concepts in Antifungal Pharmacology." Mayo Clinic Proceedings **86**(8): 805-817.

Libkind, D., G. Russo , M. R. van Broock (2014). "20 Yeasts from extreme aquatic environments: hyperacidic freshwaters."

Linares, C. E. B., S. R. Giacomelli, D. Altenhofen, S. H. Alves, V. M. Morsch , M. R. C. Schetinger (2013). "Fluconazole and amphotericin-B resistance are associated with increased catalase and superoxide dismutase activity in Candida albicans and Candida dubliniensis." Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical **46**: 752-758.

Lupetti, A., R. Danesi, M. Campa, M. D. Tacca , S. Kelly (2002). "Molecular basis of resistance to azole antifungals." Trends in Molecular Medicine **8**(2): 76-81.

Maertens, J. A. (2004). "History of the development of azole derivatives." Clinical Microbiology and Infection **10**: 1-10.

Mahboob, S., H. F. Alkkahem Al-Balwai, K. A. Al-Ghanim, F. Al-Misned, Z. Ahmed , E.-A. M. Suliman (2014). "Biomarkers of oxidative stress as indicators of water pollution in Nile tilapia (Oreochromis niloticus) from a water reservoir in Riyadh, Saudi Arabia." Toxicological & Environmental Chemistry **96**(4): 624-632.

Martinuzzi, S., S. R. Januchowski-Hartley, B. M. Pracheil, P. B. McIntyre, A. J. Plantinga, D. J. Lewis , V. C. Radeloff (2014). "Threats and opportunities for freshwater conservation under future land use change scenarios in the United States." Global change biology **20**(1): 113-124.

Martorell, P., M. T. Fernández-Espinar , A. Querol (2005). "Sequence-based

identification of species belonging to the genus Debaryomyces." FEMS Yeast Research **5**(12): 1157-1165.

Mathew, B. P. , M. Nath (2009). "Recent Approaches to Antifungal Therapy for Invasive Mycoses." ChemMedChem **4**(3): 310-323.

Medeiros, A. O., L. M. Kohler, J. S. Hamdan, B. S. Missagia, F. A. R. Barbosa , C. A. Rosa (2008). "Diversity and antifungal susceptibility of yeasts from tropical freshwater environments in Southeastern Brazil." Water Research **42**(14): 3921-3929.

Medeiros, A. O., B. S. Missagia, L. R. Brandão, M. Callisto, F. A. R. Barbosa , C. A. Rosa (2012). "Water quality and diversity of yeasts from tropical lakes and rivers from the Rio Doce basin in Southeastern Brazil." Brazilian Journal of Microbiology **43**: 1582-1594.

Morandi, I. C. , C. M. Faria (2000). A difícil recuperação de arroios em áreas urbanas - arroio dilúvio - Porto Alegre - RS. XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental.

Nagahama, T. (2006). Yeast Biodiversity in Freshwater, Marine and Deep-Sea Environments. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. C. Rosa and G. Péter, Springer.

Nascimento, E. J. M. d. (2004). Caracterização molecular de Bipolaris sorokiniana usando análise de restrição das regiões ITS1 e ITS2 do DNA ribossomal amplificado. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. **Mestrado**.

Oki, T. , S. Kanae (2006). "Global Hydrological Cycles and World Water Resources." Science **313**(5790): 1068-1072.

Pereira, V. J., M. C. Basílio, D. Fernandes, M. Domingues, J. M. Paiva, M. J. Benoliel, M. T. Crespo , M. V. San Romão (2009). "Occurrence of filamentous fungi and yeasts in three different drinking water sources." Water Research **43**(15): 3813-3819.

Pereira, V. J., D. Fernandes, G. Carvalho, M. J. Benoliel, M. V. San Romão , M. T. Barreto Crespo (2010). "Assessment of the presence and dynamics of fungi in drinking water sources using cultural and molecular methods." Water Research **44**(17): 4850-4859.

Perlin, D. S., E. Shor , Y. Zhao (2015). "Update on Antifungal Drug Resistance." Current Clinical Microbiology Reports **2**(2): 84-95.

Pincus, D. H., et al. (2007). "Yeast identification — past, present, and future methods." Medical Mycology **45**(2): 97-121.

Pham, T., T. Wimalasena, W. G. Box, K. Koivuranta, E. Storgårds, K. A. Smart , B. R. Gibson (2011). "Evaluation of ITS PCR and RFLP for Differentiation and Identification of Brewing Yeast and Brewery 'Wild' Yeast Contaminants." Journal of the Institute of

Brewing **117**(4): 556-568.

PMPA , PMVM (2011). Programa de revitalização do arroio Dilúvio: um futuro possível.

Pontara, A. V., C. D. D. d. Oliveira, A. H. Barbosa, R. A. d. Santos, R. H. Pires , C. H. G. Martins (2011). "Microbiological monitoring of mineral water commercialized in Brazil." Brazilian Journal of Microbiology **42**: 554-559.

Ramos, J. P., P. Valente, A. N. Hagler , O. Leoncini (1998). "Restriction analysis of the ITS region for characterization of the *Debaryomycel* species." The Journal of General and Applied Microbiology **44**(6): 399-404.

Raspor, P. , J. Zupan (2006). Yeasts in Extreme Environments. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. C. Rosa and G. Péter, Springer.

Rinaldi, A., G. Blaiotta, M. Aponte , L. Moio (2016). "Effect of yeast strain and some nutritional factors on tannin composition and potential astringency of model wines." Food Microbiology **53, Part B**: 128-134.

Shor, E. , D. S. Perlin (2015). "Coping with Stress and the Emergence of Multidrug Resistance in Fungi." PLoS Pathog **11**(3): e1004668.

Silva-Bedoya, L. M., M. Ramírez-Castrillón , E. Osorio-Cadavid (2014). "Yeast diversity associated to sediments and water from two Colombian artificial lakes." Brazilian Journal of Microbiology **45**: 135-142.

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

Snelders, E., R. A. G. Huis in 't Veld, A. J. M. M. Rijs, G. H. J. Kema, W. J. G. Melchers , P. E. Verweij (2009). "Possible Environmental Origin of Resistance of Aspergillus fumigatus to Medical Triazoles." Applied and Environmental Microbiology **75**(12): 4053-4057.

Sokol-Anderson, M., J. E. Sligh, S. Elberg, J. Brajtburg, G. S. Kobayashi , G. Medoff (1988). "Role of cell defense against oxidative damage in the resistance of Candida albicans to the killing effect of amphotericin B." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **32**(5): 702-705.

Spampinato, C., D. Leonardi , #xed (2013). "Candida Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents." BioMed Research International **2013**: 13.

Sucher, A. J., E. B. Chahine , H. E. Balcer (2009). "Echinocandins: The Newest Class of Antifungals." Annals of Pharmacotherapy **43**(10): 1647-1657.

Suh, S.-O., J. V. McHugh, D. D. Pollock , M. Blackwell (2005). "The beetle gut: a

hyperdiverse source of novel yeasts." Mycological Research **109**(Pt 3): 261-265.

Tafer, H., K. Sterflinger , K. Lopandic (2016). "Draft Genome of Debaryomyces fabryi CBS 789T, Isolated from a Human Interdigital Mycotic Lesion." Genome Announcements **4**(1).

Teresa Fernández-Espinar, M., B. Esteve-Zarzoso, A. Querol , E. Barrio (2000). "RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus Saccharomyces: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts." Antonie van Leeuwenhoek **78**(1): 87-97.

Tofalo, R., G. Perpetuini, G. Fasoli, M. Schirone, A. Corsetti , G. Suzzi (2014). "Biodiversity study of wine yeasts belonging to the “terroir” of Montepulciano d'Abruzzo “Colline Teramane” revealed Saccharomyces cerevisiae strains exhibiting atypical and unique 5.8S-ITS restriction patterns." Food Microbiology **39**: 7-12.

UNESCO (2015). "Water for a sustainable world." The United Nations World Water Development Report.

Van Wyk, D. A. B. (2012). "Diversity and characteristics of yeasts in water sources of the North West Province."

Vandeputte, P., S. Ferrari , A. T. Coste (2012). "Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections." International Journal of Microbiology **2012**.

Vasudevan, P. , N. Pathak (1999). "DRWH water quality: A literature review." Centre for Rural Development & Technology: Indian Institute of Technology. Delhi, India.

Vincent, B. M., A. K. Lancaster, R. Scherz-Shouval, L. Whitesell , S. Lindquist (2013). "Fitness Trade-offs Restrict the Evolution of Resistance to Amphotericin B." PLoS Biol **11**(10): e1001692.

Wang, R. C., X. H. Wen , Y. Qian (2004). "Succession of aquatic microbial communities as a result of the water quality variations in continuous water." J Environ Sci (China) **16**(5): 772-778.

White, T., T. Bruns, S. Lee , J. Taylor (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. M. Innis, D. Gelfand, J. Shinsky and T. White, Academic Press**:** 315-322.

WHO (2011). "Guidelines for drinking-water quality." World Health Organization: 564.

WHO (2014). "Preventing diarrhoea through better water, sanitation and hygiene: exposures and impacts in low- and middle-income countries." World Health Organization.

Woollett, L. L. , L. R. Hedrick (1970). "Ecology of yeasts in polluted water." Antonie van Leeuwenhoek **36**(1): 427-435.

Wrent, P., E.-M. Rivas, E. Gil de Prado, J. M. Peinado , M.-I. de Silóniz (2015). "Development of species-specific primers for rapid identification of Debaryomyces hansenii." International Journal of Food Microbiology **193**: 109-113.

Young, J. (2010). Caracterização de Areias de Dragagem de Arroio Urbano para Avaliação do seu Potencial de Uso como Agregado Miúdo em Argamassas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

9. APÊNDICES

Apêndice 1: Relação dos isolados submetidos ao sequenciamento e suas respectivas espécies ou gêneros, valores de similaridade (Id), sobreposição e acesso no banco de dados NCBI (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

Amostra	Espécie/gênero	Id	Query	Acesso
V1B3	*Candida tropicalis*	390/391(99%)	77	KP675518.1
	Candida dubliniensis	388/390(99%)	77	KT715474.1
	Rhodotorula sp	388/390(99%)	77	LC018776.1
V2A1	*Candida parapsilosis*	487/488(99%)	99	FJ809941.1
	Candida parapsilosis	480/482(99%)	97	FJ662414.1
V2A10	*Sem correspondência*			
V2A13	*Candida glabrata*	830/833(99%)	96	AY939793.1
V2C12	*Candida sp.*	349/368(95%)	92	EF621564.2
	Candida infanticola	343/390(88%)	95	HQ695009.1
	Wickerhamiella siamensis	328/388(85%)	94	AB924024.1
V3A2	*Debaryomyces subglobosus*	600/607(99%)	98	KP132015.1
	Debaryomyces hansenii	600/607(99%)	98	KP132004.1
	Debaryomyces fabryi	599/607(99%)	98	KJ705004.1
	Debaryomyces prosopidis	598/606(99%)	98	NR_077067.1
	Debaryomyces vindobonensis	598/607(99%)	98	HE681106.1
V3B8	*Candida pseudolambica*	331/331(100%)	80	KM384061.1
	Pichia occidentalis	371/418(89%)	97	KP132530.1
	Issatechenkia occidentalis	351/395(89%)	92	DQ872864.1
	Issatchenkia scutulata	363/413(88%)	97	HE660072.1
V3B9	*Candida tropicalis*	459/493(93%)	98	FJ662410.1
V3B12	*Debaryomyces hansenii*	599/603(99%)	99	JN851059.1
	Debaryomyces subglobosus	600/607(99%)	99	KP132015.1
	Debaryomyces fabryi	599/607(99%)	99	HE681098.1
	Debaryomyces prosopidis	598/606(99%)	99	NR_077067.1
	Debaryomyces vindobonensis	598/607(99%)	99	HE681106.1
I2B9	*Debaryomyces hansenii*	603/608(99%)	98	EF190234.1
	Debaryomyces nepalensis	603/609(99%)	98	KJ705003.1
	Debaryomyces coudertii	597/608(98%)	98	JN942655.1
	Debaryomyces fabryi	597/609(98%)	98	HE681098.1
	Debaryomyces vindobonensis	596/609(98%)	98	HE681106.1
I2B16	*Debaryomyces hansenii*	596/600(99%)	97	JN851059.1
	Debaryomyces subglobosus	600/608(99%)	98	KP132015.1
	Debaryomyces fabryi	599/608(99%)	98	KJ705004.1
	Debaryomyces prosopidis	595/603(99%)	98	NR_077067.1
	Debaryomyces vindobonensis	598/608(98%)	98	HE681106.1
I2B17	*Debaryomyces hansenii*	597/603(99%)	98	JN851059.1
	Debaryomyces subglobosus	599/606(99%)	98	KP132014.1
		599/606(99%)	98	KJ705004.1
	Debaryomyces prosopidis	590/593(99%)	96	NR_077067.1
	Debaryomyces vindobonensis	598/606(99%)	98	HE681106.1

I2C12	*Debaryomyces hansenii*	602/606(99%)	99	FR686593.2
	Debaryomyces subglobosus	601/606(99%)	99	KP132014.1
	Debaryomyces fabryi	601/606(99%)	99	KJ705004.1
	Debaryomyces prosopidis	599/604(99%)	98	NR_077067.1
	Debaryomyces vindobonensis	600/606(99%)	99	HE681106.1
I2C24	*Candida railenensis*	534/543(98%)	88	KM384068.1
	Candida railenensis	587/593(99%)	97	HQ438304.1
	Candida oleophila	588/600(98%)	98	KC349937.2
	Candida zeylanoides	571/598(95%)	98	HF545668.1
	Candida santamariae	576/601(96%)	98	HE862239.1
	Candida boleticol	559/578(97%)	94	HQ623551.1
I2B21	*Pichia cactophila*	370/414(89%)	96	KR818926.1
	Pichia cactophila	373/419(89%)	97	KP132500.1
	Candida inconspicua	370/414(89%)	96	KR089895.1
	Nakazawaea ernobi	353/393(90%)	91	EU343827.1
I3B5	*Candida glabrata*	827/829(99%)	96	KP131702.1
	Candida glabrata	821/829(99%)	96	AY939793.1
V2B14	*Candida parapsilosis*	481/481(100%)	97	GU373657.1
	Candida parapsilosis	490/491(99%)	99	FJ809941.1