

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**TESE**

**ANÁLISE GENÉTICA E DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO  
DE DIAGNÓSTICO, BASEADO EM PCR, PARA DETECÇÃO DE  
*Cyniclomyces guttulatus* EM FEZES DE CÃES**

**TASSIA TORRES FURTADO**

**Seropédica, RJ**

**2020**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ANÁLISE GENÉTICA E DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO  
DE DIAGNÓSTICO, BASEADO EM PCR, PARA DETECÇÃO DE  
*Cyniclomyces guttulatus* EM FEZES DE CÃES**

**TASSIA TORRES FURTADO**

**Sob a orientação do Professor**

Dr. Douglas McIntosh

**Co-orientador**

Dr. Carlos Wilson Gomes Lopes

Tese submetida como requisito para  
obtenção do grau de **Doutor em  
Ciências**, no Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ

2020

F992a Furtado, Tassia Torres, 1985-  
Análise genética e desenvolvimento de um método de diagnóstico, baseado em PCR, para detecção de *Cyniclomyces guttulatus* em fezes de cães / Tassia Torres Furtado. - Seropédica, 2020.  
116 f.

Orientador: Douglas McIntosh.  
Coorientador: Carlos Wilson Gomes Lopes.  
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2020.

1. levedura. 2. biologia molecular. 3. doença gastrointestinal. 4. canino. I. McIntosh, Douglas, 1964-, orient. II. Wilson Gomes Lopes, Carlos, 1947-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA Nº 2305 / 2020 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.045563/2020-10

Seropédica-RJ, 11 de setembro de 2020.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS  
TASSIA TORRES FURTADO

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutora em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

TESE APROVADA EM 29/04/2020

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

---

Dr. Douglas McIntosh - UFRRJ

(Orientador)

---

Dr. Francisco de Assis Baroni - UFRRJ

---

Dr. Leandro Azevedo Santos - UFRRJ

---

Dr. Fábio Brito dos Santos - FIOCRUZ

---

Dr. Stefan Schwab - EMBRAPA

(Assinado digitalmente em 11/09/2020 17:53 )  
DOUGLAS MCINTOSH  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)  
Matricula: 1354903

(Assinado digitalmente em 14/09/2020 12:12 )  
FRANCISCO DE ASSIS BARONI  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DMIV (12.28.01.00.00.00.54)  
Matricula: 386849

(Assinado digitalmente em 12/09/2020 10:41 )  
LEANDRO AZEVEDO SANTOS  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

(Assinado digitalmente em 15/09/2020 18:55 )  
FABIO BRITO DOS SANTOS

15/09/2020

[https://sipac.ufrj.br/sipac/protocolo/documento/documento\\_visualizacao.jsf?idDoc=615187](https://sipac.ufrj.br/sipac/protocolo/documento/documento_visualizacao.jsf?idDoc=615187)

CPGACS (12.28.01.00.00.00.27)  
Matrícula: 2626406

ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 090.939.327-30

(Assinado digitalmente em 14/09/2020 13:19 )  
STEFAN SCHWAB  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 033.246.479-24

Para verificar a autenticidade deste documento entre em  
<https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **2305**, ano:  
**2020**, tipo: **ATA**, data de emissão: **11/09/2020** e o código de verificação: **e76eeab056**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, que permitiu que chegasse até aqui para concluir mais uma etapa da minha formação. Depois, a todos aqueles que contribuíram para que este trabalho se realizasse, a saber:

Ao meu orientador Dr. **Douglas McIntosh**, pelo suporte ao longo de todo o projeto, ensinamentos e por tornar o “nosso projeto” meu pequeno cientista uma realidade;

Ao Prof. Dr. **Carlos Wilson Gomes Lopes**, pela coorientação neste trabalho, pela amizade, pelas conversas, pelo incentivo à continuidade dos estudos, por todos os “acalmái-vos” e principalmente por acreditar em mim;

Ao Dr. **Gilberto Flausino** pela amizade, ensinamento e apoio técnico;

A toda equipe da Clínica **CTI Veterinário**, em especial ao Dr. **Paulo Daniel Sant’Anna Leal**, pelas amostras cedidas para realização deste trabalho;

A todos, **Professores e Técnicos Administrativos**, do DPA/IV, desta IFES. Em especial **Ivan, Arthur, Walter e Adonis** que estavam sempre dispostos a ajudar nem que fosse com uma palavra amiga;

A todos os professores do PPGCV/IV desta IFES e aos colegas do curso com os quais dividi os momentos durante esse trabalho;

Aos amigos do Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular (LabBioMol), **Daniel Paiva, Tatiana Werneck, Maristela Peckle, Lucas Aguiar**, pelo companheirismo durante a realização do trabalho;

Aos amigos que a Rural me deu **Aline Quintanilha, Thiago Pedro, Claudia Bezerra, Letícia Vidal, Caroline Carreiro, Prof. Vera Lúcia Jesus**, obrigada por tornarem a realização desse trabalho mais leve;

As minhas amigas-irmãs mais que queridas, **Keila Cristina e Vanessa Amaral** por todas as conversas, abraços, cafés e por sempre estarem presentes; parte dessa tese também é de vocês;

Aos meus amigos que entenderam a minha ausência em alguns momentos, prometo colocar todas as visitas em dia;

Ao meu amigo e companheiro **Graziane Grosso**, por toda paciência e ajuda ao longo dessa etapa. Obrigada por surtar junto comigo;

A minha família do coração, Tia **Sandra Mattos** e **Fernanda Mattos**, por todo apoio ao longo do desenrolar desse doutorado;

A minha família em especial minha mãe **Rejane Furtado** e minha irmã **Thais Furtado**, por todo apoio ao longo dessa caminhada;

A esta **IFES**, da qual faço parte, a **seus servidores** e, a **todos** que, de alguma forma, contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001;

**A todos, o meu muito obrigado!**

## **BIOGRAFIA**

**Tassia Torres Furtado** nasceu em 27 de maio de 1985. Em 2002 concluiu o Ensino Médio técnico em biotecnologia pelo Instituto de Tecnologia ORT. Ingressou na Universidade Santa Úrsula (USU) em 2003 se formando em 2006 no curso de Ciências Biológicas. Especialista em Ensino de Ciências pelo Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ) em 2011. No mesmo ano ingressou no quadro de técnicos administrativos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), no Departamento de Parasitologia Animal do Instituto de Veterinária. Concluiu em 2015, o mestrado no Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias desta IFES. Em 2016, ingressou no doutorado do CPGCV. Em 2018, organizou o I One Health Day da UFRRJ que foi premiado como melhor evento das Américas em competição promovida pela One Health Comission.

## RESUMO

FURTADO, Tassia Torres. **Análise Genética e Desenvolvimento de um Método de Diagnóstico, Baseado em PCR, Para Detecção de *Cyniclomyces guttulatus* em Fezes de Cães.** 115p. Tese em Ciência Veterinária. Instituto de Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2020.

O significado das infecções fúngicas dos animais tem sido ignorado por muitos veterinários. No entanto, problemas recentes causados por doenças fúngicas de destaque, por exemplo, a esporotricose de felinos e humanos no Brasil e a criptococose zoonótica em todo o mundo, demonstraram a necessidade de reverter essa tendência negativa há muito estabelecida. A levedura ascomicética *Cyniclomyces guttulatus* é a única espécie atualmente incluída no gênero *Cyniclomyces*. Tradicionalmente, era vista como um componente comensal da microbiota intestinal de coelhos e outros herbívoros. O aumento do interesse em *C. guttulatus* se desenvolveu com base em relatos da Europa, Ásia, América do Norte e Brasil, sugerindo que *C. guttulatus* representava um patógeno emergente e / ou oportunista de cães, onde sua presença em números elevados estava ligada a sinais clínicos, incluindo diarreia, gastroenterite e colangiohepatite. No entanto, pesquisas recentes conduzidas na Holanda e nos Estados Unidos argumentaram que a presença dessa levedura em cães que sofrem de doença gastrointestinal é provavelmente circunstancial e não tem relevância clínica. O diagnóstico de *C. guttulatus* em fezes e / ou em material clínico é realizado principalmente usando análises microscópicas e microbiológicas baseadas em cultura. Em uma minoria de estudos, a identificação definitiva das colônias da levedura foi feita utilizando a amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento de um fragmento do gene 26S rDNA (codifica a subunidade maior do RNA ribossomal). O presente estudo relata o desenvolvimento de métodos moleculares inovadores para detecção e caracterização de culturas de leveduras e para a detecção e caracterização independente de cultura de *C. guttulatus* diretamente de fezes de cães. A disponibilidade dos ensaios servirá para reduzir as dúvidas sobre a validade dos diagnósticos morfológicos e pode reduzir o tempo para confirmação do diagnóstico molecular para até 48 horas, ao invés do prazo atual de 7 a 10 dias. A genotipagem de uma coleção de isolados de porquinho-da-índia (n = 1), coelhos (n = 20) e cães (n = 8) utilizou amplificação por PCR e sequenciamento de fragmentos das sequências que codificam as subunidades maior (26S) e menor (18S) do RNA ribossomal, as subunidades *RPB1* e *RPB2* da RNA polimerase II, a citocromo oxidase II e as regiões espaçadoras internas transcritas (ITS). Alinhamento de sequências e avaliação da similaridade entre os nucleotídeos para a maioria das sequências serviram para apoiar dados de estudos anteriores que sugeriram a possível existência de duas espécies de *Cyniclomyces*. Curiosamente, o uso da região ITS indicou que pode haver pelo menos três espécies de *Cyniclomyces*. Conclui-se que a identificação das novas espécies de *Cyniclomyces* questiona grande parte dos dados produzidos até o momento em relação à patogenicidade desse organismo. Prevê-se que os resultados deste trabalho sirvam para estimular uma expansão do estudo do gênero *Cyniclomyces* e, como tal, contribuam significativamente para a compreensão do seu papel na saúde dos cães

**Palavras chave:** levedura; biologia molecular; doença gastrointestinal; canino

## ABSTRACT

FURTADO, Tassia Torres. **Genetic Analysis and Development of a PCR Based Diagnostic Method for Detection of *Cyniclomyces guttulatus* in Dogs Feces.** 115p. Thesis in Veterinary Science. Instituto de Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2020.

Many veterinary scientists have largely overlooked the significance of fungal infections in animals. However, recent high-profile fungal disease problems e.g. sporotrichosis of felines and humans in Brazil and zoonotic cryptococcosis worldwide, have demonstrated the need to revert this long-established negative trend. The ascomycete yeast *Cyniclomyces guttulatus* is the only species currently included in the genus *Cyniclomyces*. Traditionally, it was viewed as a commensal component of the gut microbiota of rabbits and other herbivores. Increased interest in *C. guttulatus* developed based on reports from Europe, Asia, North America and Brazil suggesting that *C. guttulatus* represented an emerging and/or opportunistic pathogen in dogs, where its presence, in large numbers, was linked to clinical signs including diarrhea, gastroenteritis and cholangiohepatitis. However, recent investigations conducted in the Netherlands and the United States have argued that the presence of this yeast in dogs suffering gastrointestinal disease is most likely circumstantial and is not of clinical relevance. Diagnosis of *C. guttulatus* in feces and/or in clinical material is conducted primarily using microscopic and microbiological culture-based analyses. In a minority of studies, definitive identification of yeast colonies was made using polymerase chain reaction (PCR) amplification and sequencing of a fragment of the universal yeast gene 26S (encodes for the large subunit of ribosomal RNA). The current study reports the development of innovative, molecular methods for the detection and characterization of yeast cultures and for the culture-independent detection and characterization of *C. guttulatus* directly from canine feces. The availability of the analyses will serve to reduce doubt over the validity of morphological diagnostics and can reduce the time for a confirmed molecular diagnosis to 48 hours, rather than the actual timescale of 7-10 days. Genotyping of a collection of isolates from guinea pigs (n=1), rabbits (n= 20) and dogs (n=8), used PCR-based amplification and sequencing of fragments of the sequences encoding the large (26S) and small (18S) subunits of ribosomal rDNA, the subunits *RPB1* and *RPB2* of the gene encoding RNA polymerase II, Cytochrome oxidase II and the internal transcribed spacer (ITS) regions of the nuclear ribosomal RNA gene cluster. Sequence alignments and evaluations of nucleotide similarity for most sequences, served to support data from earlier studies, which had suggested the possible existence of two species of *Cyniclomyces*. Intriguingly, the use of the ITS region indicated that there may exist at least three species of *Cyniclomyces*. The identification of the new species of *Cyniclomyces* calls into question much of the data produced until now in relation to the pathogenicity of this organism. It is envisaged that the findings of this research will serve to stimulate an expansion in the study of the genus *Cyniclomyces*, and as such will make meaningful contributions to our comprehension of its role in canine health.

**Key words:** yeast; molecular biology; gastrointestinal illness; canine

## LISTA DE FIGURAS

- |   | Págs. |
|---|-------|
| <b>Figura 1.</b> A - suspensão de fezes do cão (Carmella) com a presença de células de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> , seta indicando pseudo-hifas nas fezes; B - suspensão de fezes de cão (Lessie) onde são visualizados os ascósporos (morfologia de caixa de óculos, apontado pela seta).  | 44    |
| <b>Figura 2.</b> Culturas de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> após 48hrs de crescimento, visualizadas por microscopia óptica após coloração com azul de lactofenol. A – cultura proveniente da suspensão de fezes de cão (CC8) e cultura proveniente da suspensão de fezes de coelho (RC18).  | 45    |
| <b>Figura 3.</b> Comparação do crescimento em YPG das colônias típicas (CC8 e RC18) e atípica (RC19) de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> oriundas de cão e coelho durante 24 hrs, 48 hrs e 72 hrs. Células visualizadas sob microscopia óptica após a coloração com azul de lactofenol.   | 46    |
| <b>Figura 4.</b> Comparação da morfologia celular de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> (CC8) cultivada em caldo YPG suplementado com diferentes antibióticos. A- YPG padrão com ampicilina (100 µg/mL) e estreptomicina (20 µg/mL); B- YPG com cloranfenicol 50 µg/mL; C- nitrofurantoina 50 µg/mL; D- oxitetraciclina 50 µg/mL; E- rifampicina 50 µg/mL. Células coradas com azul de lactofenol e visualizadas sob microscopia óptica aumento após 48 hrs de crescimento.   | 47    |
| <b>Figura 5.</b> Produto da amplificação por PCR do gene 26S rDNA para uma amostragem (n=14) de isolados previamente identificados como <i>Cyniclomyces guttulatus</i> . Coluna 1 – GPC1; Colunas 2-9 isolados de coelho (FBC, RC1, RC2, RC3, RC16, RC17, RC18 e RC19); Colunas 10-14 isolados de cães (CC1, CC2, CC6, CC7, CC8); Coluna 15 controle positivo ( <i>Sacharomyces cereviseae</i> ); Controles negativos: AF (água fora) e AD (água dentro); M=100 pb marcador de peso molecular. As posições das bandas correspondentes a 100 e 500 pb estão indicadas ao lado direito da imagem. A posição de 630 pb esperada para o “amplicon” do gene 26S rDNA está indicada ao lado esquerdo da foto pela seta. | 48    |

**Figura 6.** Perfis de restrição com a enzima *DdeI* dos “amplicons” gerados na PCR para o gene 26S rDNA dos isolados de *Cyniclomyces guttulatus* e outras espécies de leveduras associadas com cães. 1- *Saccharomyces cerevisiae*, 2- *Candida parapsilosis*, 3- *Candida tropicalis*, 4- *Rhodotorula* spp., 5- *Candida albicans*, 6- *Malassezia pachydermatis*, 7- *Kasachstania pintolopessi*, 8- *Pichia kudriavzevii*, 9 e 18- “amplicon” sem corte, 10 e 19- marcador de peso molecular 50 pb, 11 a 17 Isolados de *Cyniclomyces guttulatus*. 11- ST1 coelho (RC5); 12- ST1 cão (CC8); 13- ST2 coelho (RC11); 14- ST2 cão (CC4); 15- ST3 coelho (RC8); 16- ST3 cão (CC7); 17- ST4 coelho (RC19). O tamanho correspondente a 500 pb, 250 pb, e 50 pb estão indicados ao lado direito da coluna 10. A- presença da banda de @40 pb; B- sobreposição das bandas de 71 e 72 pb. Seta- digestão parcial.

56

**Figura 7.** Perfis de restrição com a enzima *HaeIII* dos “amplicons” gerados na PCR para o gene 26S rDNA dos isolados de *Cyniclomyces guttulatus* e outras espécies de leveduras associadas com cães. 1- *Saccharomyces cerevisiae*, 2- *Candida parapsilosis*, 3- *Candida tropicalis*, 4- *Rhodotorula* spp., 5- *Candida albicans*, 6- *Malassezia pachydermatis*, 7- *Kasachstania pintolopessi*, 8- *Pichia kudriavzevii*, 9 e 18- “amplicon” sem corte, 10 e 19- marcador de peso molecular 50 pb, 11 a 17 Isolados de *Cyniclomyces guttulatus*. 11- ST1 coelho (RC5); 12- ST1 cão (CC8); 13- ST2 coelho (RC11); 14- ST2 cão (CC4); 15- ST3 coelho (RC8); 16- ST3 cão (CC7); 17- ST4 coelho (RC19). O tamanho correspondente a 500 pb, 250 pb, e 50 pb estão indicados ao lado direito da coluna 10. A- digestão parcial; B- “star activity”.

57

**Figura 8.** Perfis de restrição com a enzima *MspI* dos “amplicons” gerados na PCR para o gene 26S rDNA dos isolados de *Cyniclomyces guttulatus* e outras espécies de leveduras associadas com cães. 1- *Saccharomyces cerevisiae*, 2- *Candida parapsilosis*, 3- *Candida tropicalis*, 4- *Rhodotorula* spp., 5- *Candida albicans*, 6- *Malassezia pachydermatis*, 7- *Kasachstania pintolopessi*, 8- *Pichia kudriavzevii*, 9 e 18- “amplicon” sem corte, 10 e 19- marcador de peso molecular 50 pb, 11 a 17 Isolados de *Cyniclomyces guttulatus*. 11- ST1 coelho (RC5); 12- ST1 cão (CC8); 13- ST2 coelho (RC11); 14- ST2 cão (CC4); 15- ST3 coelho (RC8); 16- ST3 cão (CC7); 17- ST4 coelho (RC19). O tamanho correspondente a 500 pb, 250 pb, e 50 pb estão indicados ao lado direito da coluna 10. A- banda de 465 pb; B= ausência de banda de 78 pb.

58

**Figura 9.** Perfis de restrição gerados pela digestão com a enzima *HaeIII* do “amplicon” obtido com a PCR 26S rDNA das amostras clínicas. Coluna 1- Bob; Coluna 2- Chico; Coluna 3- Kiara; Coluna 4- Whipy; Coluna 5- Fred; Coluna 6- Lessie; Coluna 7- Escotty; Coluna 8- Nina pós; Coluna 9- Carmella; CC8- “amplicon” CC8 digerido com a enzima *HaeIII*; U- “amplicons sem digestão”; M- marcador de peso molecular 50 pb. As posições dos fragmentos esperados 461 e 173 pb (presentes na digestão da amostra CC8) estão indicados ao lado direito da figura assim como as bandas de 250 e 100 pb do marcador molecular.

61

**Figura 10.** Amplificação da PCR externa para *RPB1* em gel de agarose 2% com as amostras clínicas. Colunas 1a -10a DNA não diluído das amostras clínicas; Colunas 1b - 10b DNA diluído por um fator de 10; 1- Bob, 2- Chico, 3- Kiara, 4- Whipy, 5- Fred, 6- Lessie, 7- Escotty, 8- Nina pré (microscopia e cultura positiva), 9- Nina pós (microscopia e cultura negativa pós tratamento antifúngico), 10- Carmella; P1 (10 pg de DNA CC8); P2 (1 pg de DNA CC8), P3 (100 fg de DNA CC8) controles positivos; AD- água dentro; AF- água fora controles negativos; M- “amplicon” com o tamanho esperado para a PCR (631 pb). A posição do “amplicon” de 631 pb está indicada no lado direito da figura.

64

**Figura 11.** Amplificação da “nested” PCR para *RPB1* em gel de agarose 2% com as amostras clínicas. Colunas 1a - 10a DNA não diluído das amostras clínicas; Colunas 1b - 10b DNA diluído por um fator de 10; 1- Bob, 2- Chico, 3- Kiara, 4- Whipy, 5- Fred, 6- Lessie, 7- Escotty, 8- Nina pré (microscopia e cultura positiva), 9- Nina pós (microscopia e cultura negativa pós tratamento antifúngico), 10- Carmella; P1 (10 pg de DNA CC8); P2 (1 pg de DNA CC8), P3 (100 fg de DNA CC8) controles positivos; AD1- água dentro (PCR externa); AF1- água fora (PCR externa); AD2- água dentro (25 ciclos “nested” PCR); AF2- água fora (25 ciclos “nested” PCR) controles negativos; M- “amplicon” com 395 pb (fragmento esperado). A posição do “amplicon” de 395 pb está indicado no lado direito.

65

**Figura 12.** Perfis de bandas gerados com a digestão, com a enzima *RsaI* em gel de agarose 2,5%, dos “amplicons” da “nested” PCR (395 pb) para as amostras clínicas. Colunas 1 e 2- Bob; Coluna 3 e 4- Chico; Coluna 5- Kiara; Colunas 6 e 7- Whipy; Colunas 8 e 9- Fred; Colunas 10 e 11- Lessie; Colunas 12 e 13- Escotty; Colunas 14 e 15- Nina pré; Colunas 16 e 17- Carmella; ST1- CC8 representando o perfil para ST1 de cão; ST2- CC4 representando o perfil para ST2 de cão; ST3- CC7 representando o perfil de ST3 de cão; M- marcador de peso molecular 50 pb. As posições das bandas correspondentes a 400, 250 e 100 pb são mostradas ao lado direito da figura e as bandas de 307 e 74 pb referentes ao perfil gerado com essa enzima são mostradas ao lado esquerdo.

66

**Figura 13.** Perfis de bandas gerados com a digestão das amostras clínicas, com a enzima *MspI* em gel de agarose 2,5%, dos “amplicons” da “nested” PCR (395 pb) para as amostras clínicas. Colunas 1 e 2- Bob; Coluna 3 e 4- Chico; Coluna 5- Kiara; Colunas 6 e 7- Whippy; Colunas 8 e 9- Fred; Colunas 10 e 11- Lessie; Colunas 12 e 13- Escotty; Colunas 14 e 15- Nina pré; Colunas 16 e 17- Carmella; ST1- CC8 representando o perfil para ST1 de cão; ST2- CC4 representando o perfil para ST2 de cão; ST3- CC7 representando o perfil de ST3 de cão; M- marcador de peso molecular 50 pb. As posições das bandas correspondentes a 400, 250 e 100 pb são mostradas ao lado direito da figura e as bandas de 193 e 138 pb gerados nos perfis ST1 e ST3 são mostradas no lado esquerdo.

## LISTA DE TABELAS

	<b>Págs.</b>
<b>Tabela 1.</b> Detalhes de origem da amostra e ano de coleta dos animais que mostraram cultura positiva, porém sem manifestações gastrintestinais para as amostras fecais de porquinho-da-índia e coelho utilizadas no estudo (grupo A).	<b>28</b>
<b>Tabela 2.</b> Detalhes de origem, ano de coleta, presença de células cultiváveis e estado de saúde do animal (com referência aos sintomas gastrintestinais) para as fezes de cães saudáveis cedidas pelos tutores (grupo B).	<b>29</b>
<b>Tabela 3.</b> Detalhes para as amostras de cães cedidas por clínicas veterinárias como positivas na análise microscópica para presença de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> (grupos C e D).	<b>30</b>
<b>Tabela 4.</b> Iniciadores, mistura para PCR e condições do ciclo da PCR utilizado para amplificação dos alvos, 18S rDNA, COII ITS 1 e 2, <i>RPB2</i> , <i>COII</i> e <i>RPB1</i> .	<b>42</b>
<b>Tabela 5.</b> Agrupamento dos isolados de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> baseado no sequenciamento e alinhamento dos “amplicons” 26S rDNA (@590pb após a remoção dos “primers” das sequências).	<b>48</b>
<b>Tabela 6.</b> “Variance Table” comparando as sequências (@590 pb), do domínio D1/D2 do gene 26S rDNA amplificado dos isolados de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> (ST1, ST2 e ST3) e da sequência (JQ689012) cepa tipo (NRRL Y-17561).	<b>50</b>
<b>Tabela 7.</b> Comparação da sequência derivada do isolado de cão (CC4) do grupo ST2 com as sequências obtidas para os outros membros do grupo ST2 (GPC1 e isolados recuperados de coelhos).	<b>51</b>
<b>Tabela 8.</b> Comparação da variação de nucleotídeos entre as sequências obtidas dos isolados de cães dos grupos ST1 e ST3 com as sequências obtidas dos isolados ST1 e ST3 derivadas de coelho.	<b>51</b>
<b>Tabela 9.</b> Comparação entre as sequências do Grupo ST3 (provenientes de cão e de coelho) com a sequência FJ755179 (isolado canino de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> da Noruega).	<b>52</b>
<b>Tabela 10.</b> Comparação da variação de nucleotídeos entre a sequência de cão da Noruega (FJ55179) e as sequências obtidas dos isolados de coelho e cão do grupo ST1.	<b>53</b>

<b>Tabela 11.</b> Padrões de bandas gerados de acordo com as análises <i>in silico</i> , utilizando o produto da PCR 26S rDNA (domínio D1/D2) digerido com as enzimas <i>DdeI</i> , <i>HaeIII</i> e <i>MspI</i> no Programa NebCutter 2.0 (New England Biolabs).	<b>54</b>
<b>Tabela 12.</b> Tamanhos dos fragmentos (em pb), gerados através da digestão <i>in vitro</i> do produto da PCR 26S rDNA (domínio D1/D2), com as enzimas <i>DdeI</i> , <i>HaeIII</i> e <i>MspI</i> . Tamanhos dos fragmentos estimados com o auxílio do programa Gel Analyzer.	<b>55</b>
<b>Tabela 13.</b> Avaliação do PCR-RFLP do gene 26S rDNA como método para detectar <i>Cyniclomyces guttulatus</i> em duas amostras de fezes de cão adulteradas (“spiked”) com células do isolado CC4.	<b>59</b>
<b>Tabela 14.</b> “Primers” desenhados para amplificação do fragmento do gene para a subunidade 1 da RNA polimerase II ( <i>RPB1</i> ) de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> .	<b>62</b>
<b>Tabela 15.</b> Determinação dos limites de detecção (sensibilidade) do ensaio de PCR para os alvos 26S rDNA e <i>RPB1</i> .	<b>62</b>
<b>Tabela 16.</b> Padrões de bandas previstos na análise <i>in silico</i> dos “amplicons” para <i>RPB1</i> após a PCR externa e “nested”.	<b>63</b>
<b>Tabela 17.</b> Similaridade entre as sequências de nucleotídeos (em % de similaridade) de quatro marcadores para ST1, ST2, ST3 e ST4, em comparação com as sequências da cepa tipo de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> (NRRL Y-17561).	<b>68</b>
<b>Tabela 18.</b> “Variance table” das sequências do 18S rRNA (@1642 pb) dos isolados de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> (ST1, ST2, ST3 e ST4) em comparação com a sequência da cepa tipo (NRRL Y-17561, código GenBank JQ698886).	<b>69</b>
<b>Tabela 19.</b> “Variance table” das sequências de <i>RPB1</i> (@591 pb) dos isolados de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> (ST1, ST2, ST3) em comparação com a sequência da cepa tipo (NRRL Y-17561, código GenBank JQ713018).	<b>70</b>
<b>Tabela 20.</b> “Variance table” das sequências de <i>RPB2</i> (@661 pb) dos isolados de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> (ST1, ST2, ST3) em comparação com a sequência da cepa tipo (NRRL Y-17561, código GenBank JQ698950).	<b>71</b>
<b>Tabela 21.</b> “Variance table” das sequências de <i>COII</i> (@616 pb) dos isolados de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> de cão (ST1, ST2, ST3) em comparação com a sequência do isolado ST1 de coelho (RST1).	<b>72</b>
<b>Tabela 22.</b> Análise da similaridade (número de nucleotídeos diferentes / total de nucleotídeos) e % de similaridade observada para a região ITS (ITS1-5.8S rRNA-ITS2); ITS1 e ITS2.	<b>74</b>

**Tabela 23.** “Variance table” comparando a sequência (637 pb) da região ITS (ITS1-5.8S rRNA-ITS2) oriundas de coelho (RST2), de cão (DST2) e um isolado de *Cyniclomyces guttulatus* (EF464552) depositado no GenBank.

**75**

**Tabela 24.** “Variance table” comparando as sequências da região ITS (ITS1-5.8S rRNA-ITS2) para os isolados ST2 de coelho e de cão.

**76**

## LISTA DE QUADROS

	<b>Págs.</b>
<b>Quadro 1.</b> Informações fornecidas pelos médicos veterinários sobre os cães que apresentavam manifestações gastrintestinais e células com morfologia compatível com <i>Cyniclomyces guttulatus</i> .	<b>31</b>

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Págs.</b>
<b>Anexo 8.1</b> Parecer da CEUA .	<b>110</b>
<b>Anexo 8.2</b> Declaração do CTIVeterinário	<b>111</b>
<b>Anexo 8.3</b> “Variance table” comparando as sequências EF464552 com as sequências derivadas dos isolados de coelho (RST2) e de cão (DST2) de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> para a sequência da região ITS (ITS1/5.8S rDNA/ITS2), com a sequência equivalente obtida para os isolados ST1 (coelho e cão)	<b>112</b>
<b>Anexo 8.4</b> “Variance table” comparando a sequência (611pb) derivada dos isolados ST4 para a região ITS (ITS1-5.8S rDNA-ITS2) com as sequências obtidas para os isolados ST1, RST2 e ST3 de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> .	<b>113</b>

## LISTA DE ABREVIACOES E EQUIPAMENTOS

DNA - cido desoxirribonucleico.

RNA - cido ribonucleico.

RFLP - polimorfismo de comprimento dos fragmentos gerados por enzimas de restrição

PCR - Reação em cadeia da polimerase.

CEUA - Comit de tica no Uso de Animais

LQEPV - Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária

IFES - Instituição Federal de Ensino Superior

LabBioMol - Laboratório Multitusurio de Biologia Molecular

LCC - Laboratório de Coccidios e Coccidioses.

UFRRJ - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

DPA - Departamento de Parasitologia Animal

IV - Instituto de Veterinária

pb – pares de base

PBS - Solução fisiológica fosfatada tamponada.

$\mu$ L - microlitro

$\mu$ g - micrograma

ng – nanogramas

ST – “sequence type”

## SUMÁRIO

	<b>Págs.</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>03</b>
<b>2.1</b> Diarreia em Cães	<b>03</b>
<b>2.2</b> Microbiota e o Microbioma	<b>05</b>
<b>2.2.1</b> Microbioma Gastrintestinal	<b>07</b>
<b>2.3</b> Micologia Veterinária	<b>09</b>
<b>2.4</b> <i>Cyniclomyces guttulatus</i>	<b>15</b>
<b>2.5</b> Métodos Moleculares	<b>18</b>
<b>2.5.1</b> Diagnóstico Molecular de Leveduras	<b>19</b>
<b>2.6</b> Métodos Moleculares para Análise de Leveduras	<b>20</b>
<b>2.6.1</b> Reação em Cadeia da Polimerase (“Polymerase Chain Reaction” - PCR)	<b>20</b>
<b>2.6.2</b> Polimorfismo do Comprimento do Fragmento de Restrição (“Restriction Fragment Length Polymorphism” - RFLP)	<b>21</b>
<b>2.6.3</b> “Nested” PCR	<b>22</b>
<b>2.6.4</b> PCR em tempo real “Real time PCR”	<b>22</b>
<b>2.6.5</b> Sequenciamento	<b>22</b>
<b>2.6.6</b> DNA “Barcoding”	<b>23</b>
<b>2.7</b> Marcadores Moleculares de Leveduras	<b>23</b>
<b>2.7.1</b> DNA ribossomal 26S rDNA - região do domínio D1/D2 do gene 26S rDNA	<b>24</b>
<b>2.7.2</b> DNA ribossomal 18S (18S rDNA)	<b>24</b>
<b>2.7.3</b> ITS – Espaçador Interno Transcrito ITS1-5.8S-ITS2 (“internal transcribed spacers”)	<b>25</b>
<b>2.7.4</b> RNA Polimerase II – Subunidades 1 e 2 ( <i>RPB1</i> e <i>RPB2</i> )	<b>25</b>
<b>2.7.5</b> Citocromo c Oxidase (subunidade I) – <i>COII</i>	<b>25</b>

	<b>Págs.</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>27</b>
<b>3.1</b> Classificação e Origem das Amostras Examinadas para a Presença de <i>Cyniclomyces guttulatus</i>	<b>27</b>
<b>3.1.1</b> Manifestações Clínicas dos Animais que Apresentaram Células com Morfologia Compatível com <i>Cyniclomyces guttulatus</i>	<b>31</b>
<b>3.2</b> Processamento das Amostras Fecais	<b>31</b>
<b>3.3</b> Identificação Microscópica	<b>33</b>
<b>3.4</b> Análise Microbiológica	<b>33</b>
<b>3.4.1</b> Determinação da Susceptibilidade de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> a Compostos Antimicrobianos (Antibióticos)	<b>33</b>
<b>3.5</b> Extração de DNA de Células de Leveduras Recuperadas de Meio YPGA	<b>34</b>
<b>3.6</b> PCR para o Domínio D1/D2 do gene 26S rDNA	<b>35</b>
<b>3.7</b> Sequenciamento de DNA	<b>36</b>
<b>3.8</b> Desenvolvimento de um Sistema de PCR-RFLP, com Base na Digestão de “amplicons” Gerados para Domínio D1/D2, do gene 26S rDNA, como um Método de Identificação de Células Cultivadas de <i>Cyniclomyces guttulatus</i>	<b>36</b>
<b>3.9</b> Extração de DNA Fecal	<b>37</b>
<b>3.10</b> Desenvolvimento de um Ensaio de PCR Diagnóstico (espécie-específica), para Identificação de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> Diretamente das Fezes	<b>37</b>
<b>3.10.1</b> Padronização dos ensaios de PCR para <i>RPB1</i>	<b>38</b>
<b>3.10.2</b> Desenvolvimento de um Ensaio “Nested” PCR para a Detecção de <i>RPB1</i>	<b>39</b>
<b>3.11</b> Detecção de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> Diretamente de Material Fecal Através da PCR- <i>RPB1</i>	<b>39</b>
<b>3.12</b> Amplificação e Sequenciamento de Múltiplos Marcadores Moleculares para Caracterização dos Isolados de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> .	<b>41</b>
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>44</b>
<b>4.1</b> Seção 1 - Métodos Dependentes de Cultura	<b>44</b>
<b>4.1.1</b> Análise Microscópica das Fezes de Cães, Coelhos e Porquinho-da-Índia	<b>44</b>
<b>4.1.2</b> Isolamento, Cultura e Manutenção das Leveduras	<b>45</b>
<b>4.1.3</b> Análise Molecular das Culturas de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> Utilizando o Domínio D1/D2 do Gene 26S rDNA como Alvo	<b>47</b>
<b>4.1.4</b> Análise das Sequências dos “amplicons” 26S rDNA	<b>48</b>

	<b>Págs.</b>
<b>4.1.5</b> PCR-RFLP para a Identificação dos Isolados de <i>Cyniclomyces guttulatus</i>	<b>53</b>
<b>4.2</b> Seção 2 - Método de Detecção Diretamente das Fezes	<b>58</b>
<b>4.2.1</b> Avaliação de Métodos de Extração de DNA Fúngico das Fezes de Cães	<b>58</b>
<b>4.2.2</b> Detecção de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> em Amostras Fecais Adulteradas (“spiked”) Utilizando o método de PCR-RFLP para o gene 26S rDNA	<b>59</b>
<b>4.2.3</b> Avaliação do Método de PCR-RFLP Utilizando Amostras de Fezes Consideradas Positivas para <i>Cyniclomyces guttulatus</i> Através do Exame Microscópico e Negativas para Cultura (Amostras Clínicas)	<b>60</b>
<b>4.2.4</b> Desenvolvimento de um Ensaio de PCR Espécie-específica para <i>Cyniclomyces guttulatus</i> Utilizando a subunidade 1 da RNA Polimerase II ( <i>RPB1</i> ) como Alvo	<b>61</b>
<b>4.2.5</b> Avaliação do Método de PCR-RFLP para o Alvo <i>RPB1</i> para a Identificação de <i>Cyniclomyces guttulatus</i>	<b>63</b>
<b>4.2.6</b> Detecção e Identificação de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> em Fezes de Cães Através do Método de PCR-RFLP para <i>RPB1</i>	<b>63</b>
<b>4.3</b> Seção 3 – Análise Genética dos Isolados de <i>Cyniclomyces guttulatus</i>	<b>67</b>
<b>5</b> DISCUSSÃO	<b>77</b>
<b>6</b> CONCLUSÕES	<b>92</b>
<b>7</b> REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	<b>93</b>
<b>8</b> ANEXOS	<b>110</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Quando comparadas às doenças de origem viral ou bacteriana, as micoses, doenças causadas por fungos, tendem a atrair pouca atenção do público geral ou da comunidade médica e veterinária. A explicação mais provável para essa desconsideração equivocada é a natureza crônica e quase despercebida de muitas infecções fúngicas, as quais raramente são associadas com epidemias. Tais características estão em contraste com as notícias de patógenos virais de rápida disseminação, por exemplo, o SARS-CoV-2 que causa a Covid-19, atualmente responsável por uma pandemia global e em expansão, ou mesmo com a crescente crise associada a infecções nosocomiais, causadas por bactérias multi resistentes, as quais prevê-se que aumentem do nível atual de aproximadamente 700.000 mortes por ano para um nível de 50 milhões de mortes por ano até 2050. No entanto, o verdadeiro impacto das doenças fúngicas em plantas, animais e humanos, incluindo um número cada vez maior de infecções zoonóticas, está longe de ser insignificante. Neste contexto, globalmente, mais de 300 milhões de pessoas são acometidas por doenças graves relacionadas às infecção fúngicas, onde os fungos são responsáveis por mais de 1,6 milhão de óbitos de pessoas, um número maior que as mortes por malária e próximo aos números de óbitos por tuberculose.

Um exemplo perfeito das infecções fúngicas são os distúrbios gastrintestinais, especificamente diarreia crônica, associadas aos ascomicetos, entre eles, *Cyniclomyces guttulatus* (Robin) Van Der Walt and Scott, 1971. Esta levedura foi descrita pela primeira vez no trato gastrintestinal de coelhos por pesquisadores alemães no final do século XIX. As primeiras descrições dessa levedura consideravam que ela representava um componente comensal do trato digestivo de coelhos e roedores, onde era frequentemente observada em grande número em associação com a mucosa gastrintestinal e / ou nas fezes de animais saudáveis. Relatos esporádicos de uma relação com distúrbios gastrintestinais, especificamente diarreia, em animais de laboratório poderia indicar que *C. guttulatus* representasse um patógeno oportunista. No entanto, seria justo afirmar que, até o final do século XX, o interesse por essa espécie, único membro reconhecido do gênero *Cyniclomyces*, se limitou a tentar determinar a posição filogenética desta levedura dentro do grupo dos ascomicetos. Contudo, no início do século XXI, começaram a surgir relatos em vários países de uma possível associação entre este agente etiológico e distúrbios gastrintestinais, incluindo diarreia, diarreia com sangue e colangite em cães. Dados adicionais, baseados no exame microscópico das fezes de animais saudáveis, indicaram que *C. guttulatus* também ocorreu como um comensal do trato gastrintestinal de cães ou considerado como apenas um componente transitório nas fezes. Curiosamente, a análise molecular das culturas recuperadas a partir das fezes de cães indicou a possível existência de mais de uma espécie no gênero *Cyniclomyces*.

Para resolver a controvérsia em torno da natureza patogênica dessa levedura, pesquisadores holandeses realizaram uma extensa pesquisa sobre o significado clínico de *C. guttulatus* em cães com diarreia crônica e contextualizaram seus resultados em relação a um estudo prospectivo de tratamento. Conforme relatado por esses autores, a

identificação inicial dos animais que foram diagnosticados com *C. guttulatus* foi feita simplesmente através de exame microscópico das fezes.

O ressurgimento do interesse em *C. guttulatus* deve ser considerado como um fato positivo na saúde dos cães. O diagnóstico preciso de distúrbios gastrintestinais nesses animais é notoriamente complicado e, no caso específico de diarreia crônica, os possíveis agentes etiológicos variam de endoparasitos, agentes bacterianos, fúngicos e virais no trato gastrintestinal. Os exames microscópicos das fezes frescas ou das análises por centrifugo-flutuação são valiosos para a identificação preliminar de parasitos e / ou leveduras e podem fornecer orientação para a implementação de terapia apropriada. No entanto, para confirmar a fonte da infecção, o isolamento e a caracterização do patógeno são fundamentais. Embora considerado desafiador, foram relatados métodos para isolamento de *C. guttulatus* de amostras oriundas de material clínico e a disponibilidade de ensaios com a aplicação de técnicas de biologia molecular, especificamente a PCR (reação em cadeia da polimerase) que fornecem resultados confiáveis para a identificação via sequenciamento dos produtos da PCR.

O presente estudo teve como objetivo principal desenvolver e avaliar métodos de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição associado à técnica de PCR (PCR-RFLP) para a detecção e caracterização de *C. guttulatus* em fezes de cães, assim como fornecer dados moleculares em relação à possível existência de outras espécies do gênero *Cyniclomyces*. Para esse fim, as técnicas de DNA “barcoding” e a análise por sequenciamento da variabilidade genética foram aplicadas a uma coleção de isolados de *C. guttulatus* recuperados de coelhos, cães e de um porquinho-da-índia.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Diarreia em Cães

O trato gastrintestinal de cães é constituído por estômago, intestinos delgado e grosso e tem a capacidade de garantir a absorção dos nutrientes que esses animais necessitam. Além disso, possui papel regulador e protetor, e também tem a função de controlar a digestão e a absorção de nutrientes (RODRIGUES, 2019).

As doenças inflamatórias intestinais são constituídas por um grupo de desordens inflamatórias, agudas e crônicas tanto em animais como em humanos (HALL, 2009; JERGENS; SIMPSON, 2012; DANDRIEUX, 2016; ARSLAN, 2017). São consideradas o diagnóstico mais comum em cães e gatos que tenham problemas no sistema digestório de caráter crônico ou recorrente, embora sua verdadeira prevalência ainda seja desconhecida (DANDRIEUX, 2016; ARSLAN, 2017). Além disso, existem os casos de disbiose, caracterizada pelo desequilíbrio da microbiota presente no trato gastrintestinal, comumente caracterizada em animais com manifestações gastrintestinais, crônica e aguda, apesar de não se ter ideia da possível causa ou efeito do processo inflamatório (REDFERN et al., 2017).

Como em humanos, os cães também desenvolvem casos crônicos caracterizados por enteropatia associada a manifestações clínicas, como: vômitos, diarreia, dor abdominal ao toque, náusea e/ou perda de peso (JERGENS; SIMPSON, 2012; DANDRIEUX, 2016). Dessa forma, a definição de enteropatias crônicas é tão ampla que engloba quase todos os casos de diarreia crônica em cães (WESTERMARCK, 2016), incluindo aqui manifestações clínicas como diarreia responsiva à dieta, diarreia causada por antimicrobianos e doença inflamatória intestinal (REDFERN et al., 2017).

Existem fatores genéticos, ambientais e imunorregulatórios que afetam a etiologia e a patogênese das enfermidades gastrintestinais em cães e humanos, sendo estas diagnosticadas após a exclusão de condições extra-intestinais, como doenças hepáticas, pancreáticas ou renais, hipoadrenocorticismos e hipercalcemia, além de doenças infecciosas, parasitárias ou de outras etiologias. Entre essas, podem-se observar obstrução mecânica por intussuscepção, tumores sistêmicos ou intestinais (JERGENS; SIMPSON, 2012; MINAMOTO et al., 2015; DANDRIEUX, 2016). A rotina hematológica, análise de amostras fecais para determinar a presença de organismos patogênicos como bactérias e parasitos, avaliação das dietas, análise de imagens radiográficas e exame histopatológico, no caso de biópsia intestinal, podem fornecer informações que auxiliam na eliminação de outras causas de uma enteropatia crônica (CERQUETELLA et al., 2010).

Em cães, a doença gastrintestinal inflamatória ocorre como consequência de uma desregulação imunológica da mucosa em animais com predisposição à inflamação (ARSLAN, 2017). Um dos mecanismos mais estudados para explicar o desenvolvimento de inflamação intestinal crônica é a perda de tolerância a antígenos. No entanto, faltam estudos sobre sua prevalência, em parte, porque muitos casos não

são totalmente caracterizados e, em parte, porque os critérios histológicos necessários para seu diagnóstico definitivo permanecem controversos, sendo considerados de caráter subjetivo (HALL, 2009; CASCON et al., 2017).

O tratamento da doença inflamatória intestinal envolve dieta e antiinflamatórios, bem como a manipulação terapêutica da microbiota através do uso de antibióticos, probióticos e suplementos de fibras solúveis (JERGENS; SIMPSON, 2012; DANDRIEUX, 2016; JENSEN et al., 2019). Além disso, os antibióticos são prescritos como tratamento empírico para infecções gastrintestinais e permanecem como componentes da sequência terapêutica em cães e gatos com enteropatia crônica (REDFERN et al., 2017). Embora algumas das etiologias das doenças intestinais permaneçam desconhecidas, resultados de pesquisas e estudos clínicos indicam que as interações entre fatores genéticos e bactérias entéricas são cruciais para o desenvolvimento de manifestações clínicas, devido a respostas anormais do hospedeiro contra a microbiota comensal (JERGENS; SIMPSON, 2012; MONDO et al., 2019).

A diarreia em cães está entre as causas mais frequentes da procura por atendimento médico veterinário e, embora indique doença intestinal, é uma manifestação clínica que deve ser investigada com cautela na clínica de animais de companhia, já que muitos dos episódios são autolimitados ou respondem bem à manipulação da dieta (CAVE et al., 2002; GESKE et al. 2015), além da origem de um quadro diarreico crônico poder ser multifatorial (MUKARATIRWA; SINGH, 2010).

O diagnóstico de diarreia pode ser desafiador na clínica de animais de companhia, devido ao grande número de possíveis interações (ETTINGER et al., 2017). As causas mais comuns estão associadas à dieta: intolerância / alergia, alimento de baixa qualidade, mudança rápida na dieta (especialmente em filhotes), intoxicação alimentar, parasitos (no caso, helmintos e/ou protozoários), vírus, bactérias, fungos e utilização de fármacos (como antibióticos, anti-neoplásicos, anti-helmínticos, antiinflamatórios) (NELSON; COUTO, 2010). As diarreias podem ser diferenciadas em agudas ou crônicas. A diarreia aguda corresponde aquela que tem duração média de duas semanas e que, geralmente, responde ao tratamento indicado; enquanto a diarreia crônica é caracterizada quando o sinal clínico persiste por períodos mais longos e, normalmente, não responde ao tratamento indicado. A diarreia crônica pode levar a outras manifestações clínicas, como desnutrição, desidratação e perda de peso, podendo evoluir para uma forma mais grave e como consequência o óbito (LEAL et al., 2013; ETTINGER et al., 2017).

A diarreia crônica em cães é com frequência intermitente, de modo que as manifestações clínicas podem desaparecer espontaneamente por algum tempo, sem qualquer tratamento (WESTERMARCK, 2016). Seguir um planejamento lógico e completo, avaliando todos os possíveis agentes etiológicos que podem causar esse problema clínico, é essencial para chegar a um diagnóstico preciso e, consequentemente, ao tratamento correto. Excluir outras causas de gastroenterite através de uma detalhada avaliação clínica e laboratorial é essencial (CASCON et al., 2017).

Westermarck (2016) em seu artigo de revisão intitulado “Chronic diarrhea in dogs: What do we actually know about it?” apresentou um levantamento das principais causas de diarreia crônica em cães. Endoparasitos como nematóides, podem estar associados à diarreia crônica em cães, assim como alguns protozoários entre eles, *Giardia intestinalis*, que está frequentemente relacionada à diarreia em filhotes. O

mesmo autor afirma que as bactérias enteropatogênicas, como causadoras primárias da diarreia em cães, ainda são um tópico confuso nos livros de gastroenterologia. Marks e Kather (2003) afirmam que não há consenso, entre os laboratórios de diagnóstico, sobre quais espécies bacterianas devem ser avaliadas, ou quais os métodos de diagnóstico que devem ser utilizados. As indicações para a elaboração de painéis entéricos fecais em cães diarreicos são pouco definidas e resultam na realização de testes indiscriminados com má interpretação de resultados. Os organismos bacterianos mais citados como causas de diarreia são as espécies dos gêneros: *Clostridium* (*Clostridium perfringens* e *Clostridium difficile*), *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *Escherichia coli* (CAVE et al., 2002; WESTERMARCK, 2016; REDFERN et al., 2017). No entanto, existem relatos onde a composição das bactérias e fungos (microbiota) gastrintestinal de cães saudáveis e cães com diarreia não teve variação significativa (FOSTER et al., 2013; WESTERMARCK, 2016).

Os estudos em pacientes com diarreia crônica geralmente começam com o exame inicial do animal, cujo principal objetivo é determinar se os sinais de diarreia são causados por alguma doença não-intestinal. Parâmetros sanguíneos são utilizados para ajudar no diagnóstico e monitorar o progresso da diarreia em cães, porém não há comprovação de testes laboratoriais que possam ser recomendados para avaliação da seriedade da doença ou acompanhamento do seu progresso. Assim, duas metodologias são indicadas para acompanhar cães com diarreia: monitorar a consistência fecal e avaliar os sinais clínicos e outros achados que se considerem importantes (WESTERMARCK, 2016).

Existe um consenso de que tratamentos devem ser iniciados com um teste de alimentação. Caso os sinais de diarreia desapareçam após a troca da dieta e regime alimentar, isso indicaria que a dieta era a causa primária da manifestação clínica. Esse diagnóstico deve ser confirmado, voltando assim à dieta original e acompanhando para verificar se o quadro de diarreia não retornou. (WESTERMARCK, 2016). A nutrição desempenha um papel fundamental como fator predisponente no controle das doenças gastrintestinais e alguns casos podem ser tratados com sucesso apenas com terapia dietética (CHANDLER, 2018). No entanto, excluída a dieta como causa do quadro diarreico, devem-se avaliar as causas secundárias que podem estar associadas ao quadro diarreico no animal.

## **2.2 Microbiota e o Microbioma**

A microbiota intestinal é o conjunto dos microrganismos (bactérias, fungos, protozoários e vírus; principalmente bacteriófagos), que habitam aquele nicho e formam um ecossistema altamente complexo, podendo afetar a saúde dos animais. Tal característica de complexidade levou a um grande interesse no estudo da interação desses microrganismos com a saúde do hospedeiro (GARCIA-MAZCORRO; MINAMOTO, 2013; HONNEFFER et al., 2014; SUCHODOLSKI, 2016; REDFERN et al., 2017; PASSOS; MORAES-FILHO, 2017; MONDO et al., 2019). Evidências têm mostrado que uma alteração permanente na composição da microbiota ou disbiose pode alterar as respostas imunes, metabólicas, permeabilidade intestinal e motilidade digestiva do hospedeiro, caracterizando-se, assim, um estado inflamatório (PASSOS; MORAES-FILHO, 2017). Nem sempre fica claro se a disbiose é causa ou efeito da

doença gastrointestinal. É provável que haja uma sobreposição: a inflamação poderá causar disbiose assim como a disbiose pode causar a inflamação. Estudos funcionais recentes demonstraram que a disbiose, quando presente, é um fator de risco que pode exacerbar a inflamação em indivíduos geneticamente suscetíveis (SUCHODOLSKI, 2016). Além disso, ainda existem discussões sobre qual seria a constituição de uma microbiota saudável, quais seriam suas variações biológicas normais dentro e entre os indivíduos ao longo da vida e como empregar nosso conhecimento sobre a microbiota para a prevenção ou tratamento de enfermidades gastrointestinais (GARCIA-MAZCORRO; MINAMOTO, 2013; RINNINELLA et al., 2019). Para atingir esse objetivo, futuros estudos colaborativos devem complementar as caracterizações filogenéticas da microbiota gastrointestinal com análises funcionais (metabólicas) de acordo com Garcia-Mazcorro e Minamoto (2013); Redfern et al. (2017) e Passos e Moraes-Filho, (2017).

Historicamente, o desenvolvimento da microbiologia como ciência foi influenciado pela necessidade de conhecimentos sobre microorganismos causadores de doenças no homem e em outros animais (MANFIO, 2003). Ao longo do tempo, a microbiologia vem deixando de focar apenas em alguns microrganismos considerados causadores de doenças para uma compreensão maior e de um número mais amplo de microrganismos que habitam a diversidade de nichos existentes na Terra (DOOLITTLE; FINLAY, 2018).

A maioria dos estudos microbiológicos clássicos baseia-se nos princípios desenvolvidos por Robert Koch ao final do século XIX (os chamados Postulados de Koch), os quais estavam centrados no isolamento dos microrganismos em culturas puras para confirmar o seu papel na doença sob investigação (ANTONELLI; CUTLER, 2016). A importância desse modelo microbiológico não deve ser subestimada, uma vez que a produção de culturas puras bacterianas permanece essencial para o estudo da virulência, susceptibilidade a antibióticos e sequenciamento genômico a fim de facilitar a compreensão e o tratamento de doenças (LAGIER et al., 2015; CARINI, 2019). Contudo, nos últimos 20 anos houve uma mudança de paradigma na maneira como os microrganismos são vistos por muitos microbiologistas (DOOLITTLE et al., 2018). Nesse novo modelo, as culturas puras são consideradas artificiais e não são representativas da realidade microbiana encontrada na maioria dos ambientes, incluindo as doenças causadas por microrganismos em humanos, animais e plantas (NAI; MEYER, 2018). Toda a microbiota presente no ambiente deve ser considerada, assim como toda sua informação genética (o microbioma) (CANI, 2018). Além disso, existe uma tendência entre os microbiologistas e outros cientistas em considerar o conceito do microbioma como um componente do “hologenoma” (ROSENBERG; ZILBER-ROSENBERG, 2016). Nesse modelo, animais e plantas não são mais vistos como entidades autônomas, mas sim redes biológicas compostas pelo hospedeiro e seus microrganismos associados, ou seja, “holobiontes”. Assim sendo, o genoma coletivo forma o “hologenoma” e os modelos biológicos de animais e plantas que não levam em conta essas associações intergenômicas estão incompletos (BORDENSTEIN; THEIS, 2015; WATKINS; BOCCHI, 2020).

A influência dos microrganismos comensais na saúde humana já é reconhecida. No entanto, nos últimos 25 anos, com o advento e aplicação das técnicas baseadas em biologia molecular aos componentes não cultiváveis da microbiota, enfatizou-se a extensão do microbioma e a sua importância fundamental em praticamente todos os aspectos da biologia humana e animal (ALVES et al., 2018; SONG et al., 2019). Os

resultados dos diversos estudos sobre o tema mostram que os microrganismos e seus metabólitos desempenham um papel essencial na biologia humana e animal (NASH et al., 2017; GOMEZ, 2019; SONG et al., 2019) e podem ser o componente central não só no avanço das doenças causadas por microrganismos como também em uma variedade de patologias não infecciosas como doenças mentais, doenças metabólicas, obesidade, doenças degenerativas (ex. Alzheimer, Parkinson) e até câncer (NASH et al., 2017; INGALA et al; 2018; TIZARD; JONES, 2018; FIEDOROVÁ et al., 2019; MONDO et al., 2019).

Em contraste com a medicina humana, a medicina veterinária tem sido mais lenta em chamar a atenção para os impactos da microbiota e do microbioma sobre a saúde e o comportamento dos animais. Contudo, na última década, progressos consideráveis têm sido alcançados na definição e compreensão das comunidades microbianas (a microbiota) em pequenos animais, especialmente com o auxílio das técnicas de sequenciamento de nova geração (SCHMITZ; SUCHODOLSKI, 2016; BARKO et al., 2018; TIZARD; JONES, 2018; MONDO et al., 2019). Em comum com as descobertas nos estudos com humanos, está bem estabelecido que a microbiota e o microbioma têm papel fundamental no desenvolvimento, comportamento e saúde de praticamente todos os membros do reino animal investigados até o momento, indo desde insetos até baleias (LEWIS; LIZÉ, 2015; LI et al., 2019).

### **2.2.1 Microbioma Gastrintestinal**

O trato gastrintestinal de animais é colonizado por um grupo complexo de microrganismos (bactérias, fungos, protozoários e vírus) que é afetado por diversos fatores associados ao hospedeiro e ao ambiente externo (GARCIA-MAZCORRO; MINAMOTO, 2013; SCHMITZ; SUCHODOLSKI, 2016; BARKO et al., 2018). Apesar dessa complexidade, há um crescente aumento no número de publicações sugerindo que o microbioma gastrintestinal pode ser estudado com o objetivo de melhorar a saúde do hospedeiro através da sua manipulação (GARCIA-MAZCORRO; MINAMOTO, 2013, SCHMITZ; SUCHODOLSKI, 2016; TIZARD; JONES, 2018; MONDO et al., 2019).

A parte anterior do sistema gastrintestinal contém uma diversidade relativamente pequena de microrganismos quando comparada com a parte posterior que contém uma quantidade maior e mais diversificada, permitindo assim que as amostras fecais, que são facilmente coletadas, forneçam uma ideia da microbiota intestinal (SUHR; HALLEN-ADAMS, 2015). Apesar da maioria dos estudos do microbioma gastrintestinal em mamíferos focar no microbioma fecal, ainda não está bem definido se as amostras fecais refletem a realidade do microbioma de outras subregiões do intestino (BARKO et al., 2018). A principal razão para a utilização de fezes como indicador do microbioma gastrintestinal ocorre por conta do método de coleta do material ser menos invasivo, não causando desconforto aos animais e permitindo a repetição da amostragem ao longo do tempo (INGALA et al., 2018; FORGACS et al., 2019); entretanto, há uma crescente compreensão que novas estratégias para as análises de amostras não fecais na avaliação da microbiota gastrintestinal serão necessárias para superar as limitações que foram identificadas com a utilização das fezes como fonte primária dos estudos (MARTINSON et al., 2019). Para o melhor entendimento do papel da microbiota

intestinal no organismo e no processo saúde-doença será necessário a aquisição de dados microbianos de forma precisa e reprodutível (FIEDOROVA et al., 2019).

As informações e experiências adquiridas com o projeto microbioma humano forneceram uma boa base de dados para os estudos do microbioma em animais de companhia (COELHO et al., 2018). Embora existam diferenças metabólicas entre as espécies, considera-se provável que os resultados provenientes de estudos realizados em humanos possam ser extrapolados e até aplicados aos outros animais (DENG; SWANSON, 2015, TRINH et al. 2018). A maioria dos estudos que descrevem o microbioma intestinal humano em estados saudáveis e doentes enfatiza o componente bacteriano. No entanto, fungos e vírus (bacteriófagos) também são membros importantes da microbiota e seu papel no processo saúde-doença ainda está sendo avaliado (SCHMITZ; SUCHODOLSKI, 2016; SUTCLIFFE; MAURICE, 2019). O “micobioma”, termo utilizado para especificar o conteúdo genômico da microbiota fúngica vem ganhando reconhecimento e até destaque como parte fundamental do microbioma (FOSTER et al., 2013; SUHR; HALLEN-ADAMS, 2015; TIEW et al., 2020). Quando comparado à biota bacteriana, o micobioma intestinal humano tem apresentado uma baixa diversidade sendo dominado por leveduras, principalmente dos gêneros *Saccharomyces*, *Malassezia* e *Candida* (NASH et al., 2017; TIEW et al., 2020).

Em animais de companhia, principalmente cães e gatos, o microbioma gastrintestinal se mostra tão complexo quanto o presente em humanos e em outros animais. As bactérias são o grupo de microorganismos mais abundante e metabolicamente ativo, constituindo em 95-98% do total de microrganismos (GARCIA-MAZCORRO; MINAMOTO, 2013; SCHMITZ; SUCHODOLSKI, 2016). Em relação ao micobioma, os fungos já foram detectados no trato gastrintestinal de diversos mamíferos além dos humanos, incluindo cães, gatos, ratos, suínos e muitos herbívoros ruminantes e não ruminantes (HUSEYIN et al., 2017). Foster e colaboradores (2013) relataram que cães e gatos abrigam várias espécies de fungos em seu intestino representando 2% das células microbianas em amostras fecais e apenas 0,01% do microbioma total dos cães. O papel dos fungos na doença gastrintestinal é incerto, uma vez que não foram observadas diferenças claras entre amostras fecais de cães saudáveis ou com diarreia aguda (FOSTER et al., 2013), nas quais a maioria dos fungos encontrados eram do grupo dos Ascomycetos (97%) sendo o gênero *Candida* o mais predominante.

O microbioma intestinal e sua manipulação têm sido objeto de intenso estudo, e os avanços nessa área foram auxiliados por novas técnicas independentes de cultura e com o foco em como o microbioma está associado a muitas enfermidades (SAVELKOUL et al., 2018) sendo a sua caracterização o primeiro passo para determinar o seu real papel na saúde ou na doença no animal (GARCIA-MAZCORRO; MINAMOTO, 2013; DENG; SWANSON, 2015). Atualmente, é reconhecido que a maioria das bactérias intestinais não pode ser cultivada utilizando as técnicas convencionais para cultivo de microrganismos e as ferramentas moleculares vêm ajudar na caracterização do microbioma intestinal, que não foi caracterizado anteriormente, além da capacidade de fornecer informações sobre a funcionalidade do microbioma (SCHMITZ; SUCHODOLSKI, 2016).

Um ecossistema microbiano balanceado é essencial para a saúde do animal, pois fornece estímulos ao sistema imunológico, ajuda na defesa contra enteropatógenos e fornece benefícios nutricionais (SCHMITZ; SUCHODOLSKI, 2016; SONG et al., 2019). Como descrito anteriormente, o microbioma parece participar de processos

fisiológicos e imunológicos vitais e há crescente evidência para uma associação entre a composição da microbiota e uma variedade de doenças gastrintestinais e sistêmicas, mas não está claro como isso afeta diretamente a patogênese de um estado de doença (MONDO et al., 2019). Portanto, melhorar a nossa compreensão do microbioma intestinal pode ser útil no desenvolvimento de procedimentos de diagnóstico inovadores e também de novas terapias.

Apesar da impressionante quantidade de artigos publicados na última década, onde a maioria emprega tecnologias baseadas em sequenciamento, ainda tem muito a ser explorado conforme mencionaram Walter et al. (2020). Neste contexto, uma proporção substancial dos estudos tem sido estritamente descritiva e evidências reprodutíveis em apoio a muitos dos efeitos / impactos sugeridos para o microbioma ainda precisam ser determinados. A importância de incluir variáveis temporais e espaciais nos estudos da microbiota / microbioma de qualquer espécie pode parecer óbvia, no entanto, poucos estudos incluem tais variáveis (JI et al., 2019). Como resultado, muitos dados produzidos sobre esse tópico carecem de profundidade e levantam questões quanto à sua reprodutibilidade (SCHLOSS et al., 2018; COOKE et al., 2019). Os desenvolvimentos tecnológicos foram acompanhados por um crescimento considerável no número de variáveis metodológicas, incluindo tipo de amostragem, técnica de armazenamento, método de extração de DNA, escolha dos pares de iniciadores “primers”, tecnologia de sequenciamento, comprimento de leitura, tamanho do alvo e “pipelines” de análise, entre outros. Um aspecto frequentemente deixado de lado é que o aumento na variabilidade das variáveis ameaça comprometer tanto a reprodutibilidade quanto a comparabilidade dos estudos realizados (BLAKE; SUCHODOLSKI, 2016; FIEDOROVA et al, 2019; LAUDADIO et al., 2019).

### **2.3 Micologia Veterinária**

Micologia é um ramo das ciências biológicas que estuda os membros do reino Fungi o qual tem aproximadamente 150.000 espécies reconhecidas e uma diversidade estimada de aproximadamente 1,5 milhão de espécies (MADIGAN et al., 2016; NARANJO-ORTIZ; GABALDÓN, 2019). Os fungos são unicelulares (leveduras) ou pluricelulares, quimio-heterotróficos e eucariotas. Esses são encontrados em aproximadamente todos os nichos ecológicos do planeta, onde desempenham papéis essenciais no balanço ecológico atuando como saprofíticos, simbioses ou mesmo parasitas (SHARON; SHLEZINGER, 2013; MADIGAN et al., 2016; SEVINDIK et al., 2017).

Tanto os aspectos positivos como os aspectos negativos dos fungos despertam interesse e estimulam inúmeros estudos. Do lado positivo, encontram-se estudos sobre a versatilidade desses organismos incluindo as aplicações biotecnológicas como produção de antibióticos, ácidos orgânicos, etanol e outros metabólitos secundários em seu uso como agentes de biorremediação ou controle biológico, seu papel nos processos fermentativos naturais e industriais na produção de pão, queijo, vinho, cerveja e molho de soja, além do seu papel primário como decompositores de matéria orgânica e reciclagem de nutrientes (MORAES et al., 2010); Do outro lado, estão os estudos sobre seu papel como organismos deterioradores ou como patógenos para plantas, humanos e animais têm também estimulado inúmeros estudos (CHUKU, 2018; VAN DYKE et al., 2019).

Para fins práticos, os fungos são agrupados em leveduras, fungos filamentosos e organismos semelhantes a fungos (fungos *lato sensu*). Leveduras são unicelulares, ovais ou esféricas, se reproduzem por brotamento, e em alguns casos, por divisão binária. Os fungos filamentosos consistem em massas de filamentos chamados de hifas que crescem através da prolongação das suas pontas em redes denominadas micélios. Fungos *lato sensu* podem ser exemplificados por espécies dos gêneros *Prototheca* e *Pythium*, que foram tradicionalmente estudados como agentes causadores de micose devido à produção de elementos que se assemelham a fungos nos tecidos, e alguns podem formar colônias parecidas com leveduras em meios de cultura (SATYANARAYANA et al., 2019). Tradicionalmente, o reino Fungi está dividido em quatro filos: dois que dividem uma origem monofilética (Dikarya: Ascomycetes e Basidiomycetes) e dois considerados fungos basais (Zygomycota e Chytridiomycota). Entretanto, o projeto da árvore da vida fúngica – AFTOL “The Fungal Tree of Life” em <https://aftol.umn.edu> – revelou que os dois filos dos fungos basais são polifiléticos e assim existem 8 a 10 filos dentro do reino Fungi (JAMES et al., 2006; STAJICH et al., 2009).

A micologia, médica e veterinária, se sobrepõem como especialidades dentro do campo da microbiologia. Nessas áreas de estudo, há pesquisas conduzidas para determinar a sistemática e a taxonomia das espécies patogênicas, elucidar os mecanismos da patogênese como fatores de virulência e colonização, desenvolvimento de métodos para detecção e diagnóstico, elaboração de estratégias de prevenção e controle das infecções fúngicas, assim como, o tratamento das infecções causadas por esses organismos (SEYEDMOUSAVI et al., 2018). A sobreposição natural dessas duas áreas surge uma vez que alguns fungos patogênicos para humanos são zoonóticos, e tem a sua origem nos animais.

No caso de parasitismo humano / animal, patógenos verdadeiros se referem àqueles que são capazes de causar doença em indivíduos saudáveis, enquanto patógenos oportunistas são aqueles que causam infecções somente em situações de imunossupressão ou em algum desequilíbrio na homeostase (SEYEDMOUSAVI et al., 2018). Deste modo, o termo patógeno fúngico oportunista refere-se às espécies que normalmente não causariam infecções em indivíduos saudáveis, porém são capazes de causar infecções sob certas circunstâncias em indivíduos imunodeficientes, cancerosos, transplantados com órgãos, diabéticos, pacientes debilitados e pacientes que recebem tratamento prolongado com antibióticos (DEDEAUX et al., 2018; WICKES; WIEDERHOLD, 2018). Mesmo assim, seria justo afirmar que o termo fungo oportunista ainda é vago. Teoricamente, muitas espécies fúngicas podem causar infecções caso existam as condições favoráveis. Assim sendo, seria interessante observar que mais de um milhão de espécies fúngicas são encontradas na natureza e apenas algumas dezenas delas foram associadas a infecções em humanos e / ou animais. As razões pelas quais essa pequena porção do universo fúngico é patogênica estimularam a extensa pesquisa e debate sobre o tema (HEITMAN, 2011; SEYEDMOUSAVI et al., 2018). A emergência de microrganismos patogênicos envolve diversos caminhos, incluindo transmissão zoonótica de animais para humanos em condições naturais, mudanças no hospedeiro ou no alcance do vetor e mudanças no patógeno através de alterações genéticas (STEINBACH et al., 2007; HEITMAN, 2011; ENGERING et al., 2015; MATSUMOTO et al., 2019; NARANJO-ORTIZ; GABALDÓN, 2019).

As doenças fúngicas podem ser agrupadas de várias maneiras. Como relatado acima, os fungos oportunistas raramente causam doenças sem a presença de algum fator predisponente subjacente, como trauma, alterações metabólicas ou imunossupressão. Os fungos patogênicos causam infecção sem fator predisponente e podem ser agrupados em micoses superficiais ou cutâneas, subcutâneas e sistêmicas. Micoses superficiais e cutâneas estão associadas à pele e seus anexos. As micoses subcutâneas afetam principalmente a derme, ossos, músculos e fáscia. Micoses sistêmicas são ocasionadas por fungos que invadem órgãos internos após disseminação hematogênica a partir dos pulmões (SIDRIM; ROCHA, 2004; TORTORA et al., 2016; MADIGAN et al., 2016).

As micoses devem ser incluídas no diagnóstico diferencial de qualquer condição crônica que não tenha respondido ao tratamento ou cuja etiologia não seja evidente (SCHWARTZ et al., 2016). O diagnóstico preciso é facilitado pela compreensão e aplicação de critérios pelos quais se pode distinguir entre contaminação, colonização e infecção (ANVISA, 2004). Nesse contexto, os animais geralmente são cobertos com pelos ou penas que fornecem um ambiente ideal para a colonização por fungos que pode ocorrer na ausência de uma doença evidente. Na avaliação inicial de um caso suspeito de infecção fúngica, o médico / médico veterinário deve determinar se as manifestações clínicas são compatíveis, se elementos fúngicos são observados no tecido do hospedeiro ou em fluidos orgânicos, se são recuperados fungos das amostras, se são detectados microscopicamente no tecido ou em outras amostras clínicas e que sejam compatíveis com as amostras isoladas em cultura. As amostras de fungos devem ser inoculadas nos meios de cultura que garantam o crescimento adequado a esses microorganismos e impeçam o crescimento de contaminantes bacterianos (ANVISA, 2004).

A patogenicidade desses microorganismos depende do *status* imunológico do hospedeiro. A frequência das doenças causadas por fungos aumenta dia a dia em todo o reino animal, incluindo os humanos. O cenário foi ampliado não só com o surgimento, mas também com a reemergência de fungos oportunistas. Além disso, as micoses endêmicas estão se tornando cada vez mais evidentes em diversas partes do mundo principalmente pela facilidade de se movimentar de um lugar para outro (CASADEVALL, 2018). Embora poucos fungos patogênicos sejam transmissíveis de pessoa para pessoa, as infecções fúngicas transmitidas por fontes zoonóticas ou mesmo saprofíticas têm sido uma das principais preocupações (HEITMAN, 2011). Além de causar micoses, alguns destes agentes etiológicos podem prejudicar indiretamente seu hospedeiro, secretando em seu metabolismo toxinas que são capazes de exercer efeitos nocivos, mesmo em concentrações muito baixas. Esses compostos orgânicos (micotoxinas) são resistentes ao calor e podem entrar no organismo hospedeiro por inalação ou pela ingestão de alimentos contaminados.

Apesar do uso de antifúngicos eficazes, a morbidade das doenças fúngicas sempre permaneceu alta. Além disso, um aumento inevitável da resistência a antifúngicos nos patógenos estabelecidos, o aquecimento global, o advento de novos patógenos e mais casos de baixa imunidade certamente podem comprometer as opções terapêuticas existentes (CASADEVALL, 2018; RODRIGUES; ALBUQUERQUE, 2018). Ainda, deve-se lembrar que os fungos também são importantes patógenos vegetais, além de o serem para animais e, como tal, inovações importantes podem advir dos estudos em botânica e procedente de micoses consideradas direta ou indiretamente como patogênicas para humanos e/ou animais (CASADEVALL, 2018).

Existe uma ideia controversa entre muitos pesquisadores, incluindo bacteriologistas e virologistas que a micologia médica e a veterinária surgiram na segunda metade do século XX. Contudo, isto está longe de ser uma verdade. Contribuições significativas para o nosso conhecimento no mundo dos microrganismos foram feitas por micologistas ao longo do século XIX. Entre as mais notáveis está a descoberta do pesquisador Italiano Agostino Bassi em 1835, que o *Beauveria bassiana* causava doença no bicho da seda, registrando a primeira observação da teoria germinativa da doença (WAINRIGHT, 2008). Somente seis anos depois, em 1841, o pesquisador húngaro David Gruby isolou o fungo *Trichophyton schoenleinii* responsável pela condição conhecida como favus (uma inflamação dermatofítica crônica). A descoberta do ágar para uso em meio de cultura ainda estava por vir, porém Gruby foi capaz de cultivar o fungo em fatias de batata e inocular para crescimento em tecido saudável para reproduzir as lesões de favus, comprovando com sucesso os postulados de Koch, antes mesmo destes serem estabelecidos (SATYANARAYANA et al., 2017).

Essas descobertas foram formidáveis, mas logo foram ofuscadas pelas descobertas subsequentes nos campos da bacteriologia e virologia. De fato, apesar dessas contribuições valiosas, o campo da micologia médica e veterinária realmente passou por um longo período de obscuridade, em relação às outras áreas da microbiologia médica e veterinária. Uma reviravolta no reconhecimento dessa área do conhecimento começou em meados do século XX e foi estimulada por três eventos não relacionados na medicina humana (CLARK; DRUMMOND, 2019). Em primeiro lugar, o desenvolvimento de fármacos imunossupressores potentes que foram empregados para controlar a rejeição de tecidos após transplantes de órgãos (SAULLO et al., 2019); em segundo lugar, a indução de imunossupressão em pacientes que recebem quimio, rádio ou imunoterapia para câncer (MARIETTE et al., 2017); e terceiro, o surgimento de infecções retrovirais, principalmente o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) na década de 80 (LIMPER et al., 2017). O sistema imunológico debilitado desses pacientes os deixou à mercê de numerosos patógenos oportunistas, incluindo aqui fungos como *Pneumocystis jirovecii*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Talaromyces* (syn. *Penicillium*) *marneffeii*, *Candida* spp., *Coccidioides* spp., e *Emmonsia* spp.) e, como resultado, houve um ressurgimento no estudo desses agentes etiológicos, com o objetivo principal de desenvolver opções eficazes de tratamento. No entanto, seria justo afirmar que, mesmo com esse renascimento, o impacto de doenças fúngicas na comunidade em geral, incluindo animais, ainda era objeto de atenção limitada. Isso pode parecer surpreendente, dado o enorme impacto que esses organismos exercem sobre essas espécies, tanto diretamente como patógenos de vertebrados ou indiretamente como patógenos de plantas ou como organismos de deterioração / contaminação dos estoques de alimentos (CASADEVALL, 2018). Em parte, esse aparente desinteresse reflete a natureza crônica da maioria das infecções fúngicas, o que contrasta com a natureza aguda de destaque da maioria dos patógenos bacterianos e virais. Infelizmente, poucos microbiologistas e provavelmente nenhum membro do público em geral percebem que, globalmente, mais de 300 milhões de pessoas são diagnosticadas com doenças graves relacionadas a fungos; ou que os fungos matam coletivamente mais de 1,6 milhão de pessoas anualmente, número superior ao número de mortes por malária e semelhante ao número de mortes causada pela tuberculose (RODRIGUES; ALBUQUERQUE, 2018); ou, ainda, que fungos e oomicetos destroem um terço de todas as culturas alimentares a cada ano (CASADEVALL, 2018). Além disso, a infestação de anfíbios levou à maior perda de

biodiversidade causada por doenças fúngicas já registrada (SCHEELE et al., 2019; SHUKLA, 2019), enquanto os fungos também causam mortalidade em massa de morcegos, abelhas e outros animais (BERNARD; GRANT, 2019).

Embora todos os fungos tenham papéis essenciais na biosfera, e alguns tenham papéis importantes na indústria, agricultura e saúde, os fungos como um todo são pouco estudados e frequentemente sub-representados nas aulas de biologia em todos os níveis de ensino (CASADEVALL, 2018). No entanto, é provável que a micologia em breve tenha uma renovação ainda maior do seu foco de interesse. Em primeiro lugar, porque os fungos estão se tornando mais proeminentes nas preocupações humanas, à medida que seu impacto na saúde humana, animal e do ecossistema está aumentando (BERNARD; GRANT, 2019). Além disso, os micologistas se organizaram para tornar sua disciplina mais visível e possibilitar projetos científicos mais amplos, como as análises globais da filogenia fúngica, bem como sua estrutura, função e evolução do genoma (FEAU et al., 2018; KISS et al., 2019). Esse esforço, combinado com as tecnologias de sequenciamento de nova geração, permitem agora uma compreensão profunda e global sobre a biologia e organização dos fungos (MA; FEDOROVA, 2010; CASADEVALL, 2018). Também possibilitam o desenvolvimento de estratégias que ajudarão a combater fungos quando estes interferirem negativamente com a saúde humana e animal, como no caso de micoses, ou para aplicações benéficas, como o uso de fungos como fonte de energia renovável (BABU; SARMA, 2019). É importante enfatizar que a micologia, médica e veterinária também estão representadas como um componente do conceito de saúde única (“one health”), que propõe uma abordagem holística ao estudo da saúde humana, animal e ambiental como um único tópico interligado (GHOSH et al., 2018). Dois exemplos claros disso são a natureza transdisciplinar da pesquisa sobre esporotricose na América Latina e a pesquisa global sobre criptococose (ARENAS et al., 2018; RAMÍREZ-SOTO et al., 2018; BRITO-SANTOS et al., 2019; ENGELTHALER; CASADEVALL, 2019).

Uma das características da micologia veterinária que pode ter servido para limitar sua atratividade, em relação a outros campos da microbiologia, particularmente para pesquisadores mais jovens, é o fato de que tradicionalmente a micologia se baseia no uso de morfologia e testes fenotípicos como componentes centrais para o diagnóstico e detecção de patógenos (CHUKU, 2018). No entanto, existe uma tendência crescente para a aplicação de novas tecnologias moleculares e “ômicas”, em análises taxonômicas e filogenéticas, para o desenvolvimento de testes de diagnóstico e para o estudo dos mecanismos de patogenicidade e resistência antifúngica (SINGH; GUPTA, 2017; WICKES; WIEDERHOLD, 2018). Felizmente, essa tendência positiva permitirá que a micologia, médica e veterinária, retornem às suas posições de destaque no campo da microbiologia.

A importância dos fungos como componentes da microbiota de praticamente todos os animais e plantas agora é claramente reconhecida (TIEW et al., 2020). No entanto, como em vários outros aspectos da microbiologia, o fato de os fungos estarem presentes em todos os lugares da natureza e a quase imperceptibilidade de suas atividades, levaram ao fato de serem negligenciados durante a primeira década de estudos sobre a microbiota (HUSEYIN et al., 2017). Como mencionado, a maioria dos estudos se concentrou quase exclusivamente sobre os componentes bacterianos da microbiota, desconsiderando fagos, fungos, e outros organismos eucarióticos presentes nesse microbioma (SHKOPOROV et al., 2019). Felizmente, esse descuido foi corrigido e a maioria dos estudos realizados em pesquisas com microbiomas nos últimos sete anos

reverteu essa prática claramente inadequada e a análise do micobioma foi estabelecida como um componente integrante de muitas investigações (RICHARD; SOKOL, 2019; TIEW et al., 2020). Em comum com os estudos iniciais da microbiota bacteriana, a maioria dos estudos publicados sobre o micobioma tem sido amplamente descritivo e serviu principalmente para catalogar as espécies que estão presentes nos micobiomas de seres humanos e aquelas presentes na produção aviária, animais de companhia e silvestres (TIEW et al., 2020). No entanto, evidências da importância funcional do micobioma intestinal (e dos metabólitos associados) de humanos e animais estão começando a surgir, com sugestões de papéis deste no balanço imunológico do hospedeiro por fungos simbiotes, bem como possíveis efeitos prejudiciais na doença neurológica e em animais com doenças crônicas do trato gastrointestinal (LIMON et al., 2017; GETZKE 2019; TIEW et al., 2020).

Além das doenças fúngicas bem estabelecidas nos animais, na última década viu-se o surgimento ou reemergência de vários fungos considerados patogênicos ou com potencial para serem patogênicos tanto para humanos quanto para animais (BERNARD; GRANT, 2019; FRIEDMAN; SCHWARTZ, 2019). Os patógenos emergentes podem incluir espécies recém-identificadas em contextos clínicos, espécies que estão aumentando drasticamente em prevalência ou passando por uma expansão populacional (por exemplo, como resultado de uma população crescente de hospedeiros vulneráveis), e espécies que estão mudando seu nicho ecológico ou se espalhando para novas localizações geográficas (DEBOURGOGNE et al., 2016; BENEDICT et al., 2017). Os fatores (“drivers”) por trás do surgimento desses patógenos são numerosos e objeto de debate. É geralmente aceito que as mudanças antropogênicas na interface humano-animal-ecossistema, incluindo mudanças no uso da terra, urbanização descontrolada, aumento do contato de animais de produção e humanos com a vida selvagem, são fatores casuais extremamente importantes (GHOSH et al., 2018; ALMEIDA et al., 2019). Além disso, redes mundiais de comércio contribuem para a disseminação de agentes infecciosos em novos hospedeiros, na medida que os agentes infecciosos sejam carregados para o mundo inteiro. De fato, o aumento da transmissão transcontinental provavelmente é responsável por muitos dos surtos de doenças fúngicas que ocorreram fora de seus centros endêmicos tradicionais de infecção, entre o final do século XX e no século XXI (FISHER et al., 2012; DE HOOG et al., 2018). Para entender como novas doenças emergem é essencial estudar a dispersão, os sistemas de acasalamento, a adaptação do hospedeiro e os mecanismos de especiação (GIRAUD et al., 2010; OKAMOTO et al., 2019). A determinação de sequências genômicas completas desde meados da década de 2000 permitiu que os estudos de genômica comparativa começassem a inferir os mecanismos de patogenicidade (GABALDÓN, 2019).

Como mencionado acima, nem todas as doenças emergentes ou fúngicas são fáceis de serem estudadas ou mesmo de serem classificadas definitivamente como doenças. Esse é particularmente o caso quando se trabalha com organismos comensais tradicionalmente vistos como inofensivos e até benéficos para seus hospedeiros.

## 2.4 *Cyniclomyces guttulatus*

*Cyniclomyces guttulatus* (syn. *Saccharomycopsis guttulatus*) é um ascomiceto associado ao trato gastrointestinal de coelhos, cobaias, chinchilas e outros roedores podendo ser isolado a partir de diferentes amostras, incluindo fezes secas, úmidas e conteúdo estomacal (ZIERDT et al., 1988). As alterações associadas à presença desta levedura em seus hospedeiros ainda não são conclusivas. Contudo, recentemente, um estudo na China assinalou que a presença de *C. guttulatus* poderia servir como um probiótico para coelhos (TUANYUAN et al., 2019). Sua classificação passou por uma série de modificações até chegar à denominação atual, através de Van Der Walt e Scott, (1971) que propuseram a criação de um novo gênero denominado *Cyniclomyces*, tendo como única espécie descrita *C. guttulatus* (FLAUSINO, 2013). Pertence ao Filo Ascomycota, Classe Saccharomycetes, Ordem Saccharomycetales, Família Saccharomycetaceae (KIRK et al., 2008).

A natureza fastidiosa de *C. guttulatus* foi relatada por vários autores, a maioria dos quais não conseguiu isolar ou manter as culturas desta levedura usando meios de cultura rotineiramente empregados para o cultivo de outras espécies de leveduras ou fungos filamentosos, mesmo quando encontrada em grande quantidade no material utilizado como inóculo, conforme determinado por exames microscópicos (PARLE, 1956; SHIFRINE; PHAFF, 1958; RICHLE; SCHOLER, 1961; PHAFF; MILLER, 1971; BUECHER; PHAFF, 1972). Como resultado dessas dificuldades, os trabalhos sobre esta levedura essencialmente cessaram até que Zierdt et al. (1988) relataram o desenvolvimento de um meio líquido complexo e enriquecido denominado “Fastidious Microorganism Medium” (FMM), e o mesmo meio solidificado pela adição de ágar (1,5% p / v), denominado (FMMA). Com base nos achados de estudos anteriores, o pH do meio FMM foi ajustado para pH 1 ou 2 (com HCl) e as culturas, inoculadas com fezes de coelhos ou de cobaias, foram incubadas a 36 °C em uma atmosfera de 10% de CO<sub>2</sub>. Esses autores observaram que a inoculação de FMM com “pellets” fecais, conteúdo de ceco ou estômago resultou em bom crescimento da levedura e que as condições de baixo pH e elevada concentração de CO<sub>2</sub> serviram para reprimir o crescimento da maioria das bactérias e outros fungos. A subcultura da levedura em tubos contendo FMM ou em placas de FMMA frescos produziu culturas viáveis e permitiu o isolamento de colônias que foram subsequentemente usadas para análises ultraestruturais (por microscopia eletrônica de transmissão). É importante observar que o crescimento produzido em meio líquido e sólido podia ser mantido sob refrigeração (4 °C) por até dois meses sem perda de viabilidade. Uma vez recuperadas como culturas puras, os isolados de *C. guttulatus* eram cultivados em meios líquidos e sólidos, com valores de pH entre 1 a 8 e sem a necessidade de uma atmosfera de CO<sub>2</sub> elevada. Em contraste, nenhum dos outros meios examinados (incluindo o ágar Sabouraud), permitiu a formação de colônias isoladas mesmo após o ajuste do pH para 1 ou 2, com ou sem o uso da atmosfera de 10% de CO<sub>2</sub> durante a incubação. Embora este represente um momento importante na história dessa espécie, seu impacto em estudos subsequentes foi limitado, pois nenhuma outra investigação empregou as técnicas de cultura relatadas por Zierdt et al. (1988), provavelmente devido à natureza complexa do meio FMM.

Após uma lacuna de mais de duas décadas, houve um retorno ao estudo relacionado aos métodos de isolamento de *C. guttulatus* por pesquisadores brasileiros (FLAUSINO; BARONI, 2009), que relataram a cultura da levedura a partir de fezes de coelho usando um caldo, denominado YPG, composto por 1% de extrato de levedura,

1% de peptona de proteose e 2% de glicose e ajustando o pH para 3, com incubação a 37 °C. As subculturas foram preparadas, utilizando inóculos com muitas células (100 µL) em placas de YPGA (sem ajuste de pH), solidificadas com ágar (2% p / v) e incubação em atmosfera de 10% de CO<sub>2</sub>. Embora significativamente mais simples, que o uso do meio FMM, esse método de cultura teve a desvantagem de que a manutenção em longo prazo exigia sucessivos repiques em caldo YPG, uma vez que tentativas de manter as culturas refrigeradas a 4 °C ou como estoques em glicerol não tiveram êxito. Mais recentemente, a utilização do YPG como meio de isolamento e cultura para *C. guttulatus* foi confirmada por pesquisadores chineses (TUANYUAN et al., 2019). No entanto, nesse estudo, o pH do meio de isolamento foi ajustado para 1 e o pH das placas de YPGA usadas para manutenção e subcultura de rotina foi ajustado para 4,5. Em contraste, estudos anteriores, por pesquisadores holandeses (MANDIGERS et al., 2014) relataram o isolamento bem sucedido de *C. guttulatus* a partir de fezes de coelho em ágar Sabouraud dextrose incubando a 37 °C, em condições de microaerofilia, por um período mínimo de cinco dias. Além disso, este procedimento foi utilizado para produzir colônias para extração de DNA a partir de seis amostras fecais de cães.

Embora *C. guttulatus* não seja reconhecida como habitante natural em carnívoros (SHIFRINE; PHAFF, 1958), esta levedura foi observada por Saito et al. (1984) em cães no Japão e posteriormente, Howers e Blankenstein (2001) relataram o mesmo achado em cães que tiveram manifestações clínicas de diarreia, na Holanda. Em sequência, casos de diarreia com a presença de *C. guttulatus* foram relatados em cães na Europa, nos EUA e no Japão (SAITO et al., 1984; NEEL et al., 2006; GJERDE et al., 2009; DIKSTRA et al., 2010; MANDIGERS et al., 2014; WINSTON et al., 2016). Alguns casos também foram observados em cães, no município do Rio de Janeiro, sendo que um deles apresentava sintomas de gastroenterite hemorrágica (FLAUSINO et al., 2012) e em cães com histórico de gastrite e colangiohepatite (FURTADO et al., 2013). Desde então, o número de relatos de casos de infecções causadas por essa levedura como causa primária e / ou secundária de diarreia crônica e alterações gastrintestinais em cães vem aumentando (GESKE et al., 2015; GARINO JR. et al., 2017; KLUTHCOVSKY et al., 2017; ALVES et al., 2018; FERRAZ et al., 2019). Além disso, a presença dessa levedura foi relatada em casos de co-infecção com *Cystoisospora canis* no Brasil (LEAL et al., 2013) e *Giardia intestinalis* na Holanda (DUIJVESTIJN et al., 2016). Recentemente, a espécie *C. guttulatus* foi considerada patogênica quando em associação com a infecção natural com espécies do gênero *Eimeria* em coelhos na China continental (TUANYUAN et al., 2019).

Flausino et al. (2012), relataram a observação de um elevado número de células de uma levedura, morfologicamente consistente com as descrições anteriores de *C. guttulatus*, nas fezes e nos lavados estomacais de três cães na cidade do Rio de Janeiro que tinham em seus históricos, manifestações recorrentes caracterizadas por vômitos e diarreia crônica. A presença dessa levedura foi também observada nas fezes de 17 animais de um grupo de 66 cães saudáveis (= 24,5%), embora em níveis expressivamente mais baixos do que os relatados nos animais doentes. Uma identificação definitiva de *C. guttulatus* foi obtida com base na análise da sequência de nucleotídeos de um fragmento de aproximadamente 600 pares de bases do domínio variável (D1/D2) da subunidade maior (26S) do DNA ribossomal (FLAUSINO et al., 2012). Em um estudo posterior, também realizado no Rio de Janeiro, essa espécie foi observada em casos de colangite biliar em três cães com histórico de gastrite com espessamento da mucosa do estômago e colangiohepatite com hipertrofia da vesícula biliar além de diarreia e vômito (FURTADO et al., 2013). Nesse estudo, a levedura, foi

isolada a partir de lavados estomacais de dois cães identificados como positivos para *C. guttulatus* e a identificação definitiva da levedura foi determinada através de análise das sequências de nucleotídeos. Esses estudos representaram os primeiros relatos de *C. guttulatus* em associação com manifestações gastrintestinais em cães no hemisfério sul e forneceram peso adicional à hipótese de que essa espécie de levedura pode atuar como um patógeno oportunista e emergente em cães, sendo sub-diagnosticado na rotina veterinária de animais de companhia (GARINO JR et al., 2017).

Dados adicionais, baseados no exame microscópico das fezes de animais saudáveis, indicam que *C. guttulatus* também pode ocorrer como comensal no trato gastrintestinal de cães (FLAUSINO et al., 2012; MANDIGERS et al., 2014; DUIJVESTIJN et al., 2016), enquanto outros autores sugerem que é apenas um organismo transitório que pode ter sido originado pela ingestão de fezes de coelho (WINSTON et al., 2016).

Em uma tentativa de resolver a controvérsia em torno da natureza patogênica dessa levedura, pesquisadores europeus realizaram uma extensa pesquisa sobre o significado clínico de *C. guttulatus* em cães com diarreia crônica e contextualizaram suas descobertas em relação a um estudo prospectivo de tratamento (MANDIGERS et al., 2014). Conforme relato desses mesmos autores, as identificações iniciais dos animais que apresentavam *C. guttulatus* foram feitas através do exame microscópico das fezes, mas sem confirmação através da cultura. Também realizaram um ensaio de reação em cadeia da polimerase (PCR), empregando “primers” universais que amplificam o domínio D1/D2 do gene que codifica a subunidade maior (26S) do DNA ribossomal (KURTZMAN; ROBNETT, 1998; FLAUSINO et al., 2012). Contudo, deve-se notar que os iniciadores utilizados nesse ensaio não são espécie-específico e que, na ausência de dados de sequenciamento, as identificações fornecidas como *C. guttulatus* devem ser consideradas como presuntivas.

A principal conclusão resultante do trabalho de Mandigers et al. (2014) foi a ausência de evidências diretas para apoiar a hipótese de que *C. guttulatus* é um patógeno primário em cães. No entanto, em uma minoria de casos de diarreia crônica, uma associação entre a presença desta levedura, provavelmente como patógeno oportunista, foi apoiada pelos resultados do estudo retrospectivo do tratamento. Conclusões semelhantes foram alcançadas em um estudo retrospectivo posterior de infecções por *C. guttulatus* de cães examinados em um hospital veterinário universitário nos EUA durante o período de 2006 a 2013 (WINSTON et al., 2016). Nesse estudo, a identificação da levedura foi restrita à detecção de células nas fezes por microscopia, que demonstraram morfologias consistentes com as consideradas características de *C. guttulatus* (ZIERDT et al., 1988).

Recentemente, casos isolados de cães infectados com *C. guttulatus* foram relatados por Alves et al. (2018) no Nordeste e por Ferraz et al. (2019) no Sul do Brasil. Nos dois casos, o diagnóstico foi feito através do exame microscópico de fezes de cães com diarreia crônica. É importante ressaltar que ambos os casos foram resolvidos com sucesso através do tratamento antifúngico, especificamente com fluconazol, indicando que, na opinião desses autores, *C. guttulatus* era o agente etiológico responsável pela diarreia crônica.

O ressurgimento do interesse em *C. guttulatus* deve ser considerado um desenvolvimento positivo na saúde dos animais de companhia. O diagnóstico preciso de distúrbios digestivos em cães é notoriamente complicado e, no caso específico de diarreia crônica, os possíveis agentes etiológicos variam de endoparasitos a vírus passando por agentes bacterianos e fúngicos (WESTERMARK, 2016). O exame microscópico das fezes frescas ou os métodos de análise por centrifugo flutuação são

valiosos para a identificação presuntiva de parasitas e / ou leveduras e podem fornecer orientação para a implementação da terapia apropriada (MANDIGERS et al., 2014; DUIJVESTIJN et al., 2016). No entanto, para confirmar a fonte da infecção, seria ideal o isolamento e a caracterização do patógeno. Embora considerado desafiador por muitos autores, métodos para o isolamento de *C. guttulatus* do material clínico foram relatados (ZIERDT et al., 1988; FLAUSINO; BARONI, 2009; MANDIGERS et al., 2014; TUANYUAN et al., 2019) e a disponibilidade de ensaios de PCR fornecem a base para a identificação definitiva do organismo via sequenciamento de produtos de PCR (“amplicons”) (FLAUSINO et al., 2012). No entanto, em contraste com outras regiões do mundo, o custo da realização do sequenciamento de nucleotídeos no Brasil aumentou ao invés de diminuir durante a última década, um fenômeno impulsionado por uma crise contínua no financiamento das pesquisas científicas (MONTEIRO, 2020).

As possíveis infecções causadas por essa levedura têm sido diagnosticadas pela identificação direta com auxílio de microscópio óptico de células leveduriformes cilíndricas, que podem estar agrupadas em pequenas cadeias ou isoladas (ZIERDT et al., 1988; FURTADO et al., 2013). É necessário, o isolamento a partir de material clínico em cultura pura, seguido por análise da sequência de nucleotídeos de uma região variável (domínio D1/D2) do gene 26S rDNA. Dessa forma, se mostra evidente que as melhorias na identificação, detecção e caracterização de *C. guttulatus* associada a cães irão exigir a aplicação de métodos moleculares que servirão de apoio na identificação dessa espécie em cães apresentando manifestações clínicas de doença gastrointestinal. No entanto, dadas as dificuldades associadas à cultura desta levedura, estudos relatando a caracterização molecular de *C. guttulatus* são raros. Neste contexto um levantamento das sequências disponíveis no banco de dados GenBank, produzido e mantido pelo Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI) dos EUA, revelou sequências da região D1/D2 do gene para o 26S rDNA de uma cepa isolada de um coelho nos EUA (KURTZMAN; ROBNET, 1998), um isolado de cão na Noruega (GJERDE et al., 2009) e um coelho e um cão no Brasil (FLAUSINO et al., 2012). Kurtzman e Robnet (2013), depositaram uma variedade de sequências parciais, todas obtidas do mesmo isolado de coelho citado acima, para os genes 18S rRNA, fator de alongamento de tradução 1, e RNA polimerase II (subunidades 1 e 2). Mais recentemente duas sequências, dos genes 18S rRNA e 26S rDNA, ambas derivadas de um isolado de coelho, foram depositadas no GenBank por pesquisadores Chineses (TUANYUAN et al., 2019).

## 2.5 Métodos Moleculares

A identificação de fungos ao nível de espécie é fundamental na pesquisa científica básica (ecologia e taxonomia) e aplicada (genômica, bioprospecção) assim como no tratamento de doenças (RAJA et al., 2017). Dessa maneira, o desenvolvimento de um sistema eficiente de identificação de espécies, baseado nas características morfológicas, aplicável a todos os fungos permanece sendo um desafio para os micologistas (TEKPINAR; KALMER, 2019). Assim os métodos moleculares surgem como uma ferramenta para auxiliar essa identificação, tornando a identificação mais rápida e eficiente, contribuindo na taxonomia, classificação, inferências filogenéticas, determinação de espécies e na identificação dos fungos (IRINYI et al., 2016). No entanto, o diagnóstico não deve se basear apenas em testes moleculares e

sim servir de ferramenta para fornecer informações importantes que ajudem a chegar ao correto diagnóstico (LACKNER; LASS-FLÖRL, 2017), complementando os dados morfológicos e bioquímicos. Raja e colaboradores (2017) afirmam que, sempre que possível, é preferível a utilização conjunta de testes morfológicos e moleculares para identificação dos fungos. Com os avanços das tecnologias baseadas em biologia molecular é esperada uma melhora na identificação e na descoberta de novas espécies (IRINYI et al., 2016).

### **2.5.1 Diagnóstico Molecular de Leveduras**

O diagnóstico de infecções fúngicas apresenta uma série de desafios que vão desde o declínio na experiência necessária para a identificação dos fungos até um número reduzido de instrumentos e ensaios específicos para fungos, principalmente quando comparados com bactérias e vírus. (WICKES; WIDERHOLD, 2018).

Historicamente, os testes de diagnóstico molecular para infecções invasivas são trabalhosos e exigem um alto grau de conhecimento técnico enfrentando diversos desafios que se concentram na necessidade de identificar com rapidez e precisão as espécies patogênicas além de organismos desconhecidos isolados de pacientes e amostras clínicas (WICKES; WIDERHOLD, 2018).

Os métodos convencionais para identificação de fungos associados com doenças em humanos ou em animais geralmente se baseiam na identificação dos sintomas da doença, cultura e isolamento dos organismos, e análises laboratoriais para identificação por morfologia e testes bioquímicos (ATKINS; CLARK, 2004; WICKES; WIDERHOLD, 2018). No entanto, esses métodos geralmente são vistos como demorados e só englobam as espécies patogênicas e as espécies cultiváveis. Dessa maneira, vem crescendo o interesse em métodos alternativos de identificação diretamente de material clínico sem a necessidade de cultivo (GABALDÓN, 2019).

O crescente interesse no diagnóstico molecular é resultado de uma necessidade de aprimoramento do conhecimento sobre infecções causadas por fungos nos últimos anos e do rápido desenvolvimento de métodos de diagnóstico auxiliares, em particular a reação em cadeia da polimerase (PCR) (LACKNER; LASS-FLÖRL, 2017). Além disso, alguns métodos que estão surgindo tem a promessa de detectar o agente infeccioso e a presença de mecanismos de resistência a antifúngicos associados a estes organismos (WICKES; WIDERHOLD, 2018; GABALDON, 2019). Em contraste com os métodos clássicos de cultura, os métodos moleculares não detectam somente os organismos viáveis, e sim as moléculas que indicam a presença do organismo na amostra (LACKNER; LASS-FLÖRL, 2017). Porém, os resultados dos métodos moleculares, devem ser analisados com cuidado, pois somente a presença do DNA não necessariamente está relacionada à infecção (a espécie pode ser apenas um organismo comensal), ou mesmo com a presença de células vivas, pois o DNA de células mortas também pode ser detectado (GABALDON, 2019).

No entanto, para o diagnóstico molecular de doenças fúngicas, utilizando procedimentos de amplificação de DNA, a escolha do alvo adequado, identificação rápida e barata dos produtos de PCR são pré-requisitos importantes (TROST et al., 2004; GARNER et al., 2010). Embora os testes atualmente disponíveis almejem a identificação de um número amplo de espécies, estes focam apenas nas espécies

patogênicas enquanto a detecção de espécies raras ou emergentes fica em segundo plano. Outro problema frequentemente encontrado no diagnóstico fúngico é que a microbiologia é um campo de estudo dinâmico e a descoberta de novos organismos identificados por métodos moleculares acontece quase diariamente. Assim, os métodos moleculares que dependem de banco de dados para a identificação das espécies devem ser atualizados regularmente (WICKES; WIDERHOLD, 2018). Neste contexto, é necessário considerar tanto a caracterização dos patógenos fúngicos raros, quanto a dos novos fungos possivelmente patogênicos que necessitam de métodos de identificação, como no caso recente de *Candida auris* nos EUA, que necessitou de um método de identificação rápido para ajudar no controle da infecção (LEACH et al., 2018).

Expectativas são colocadas no diagnóstico molecular, e o número de laboratórios que agora utilizam essa tecnologia está aumentando, resultando na necessidade de padronização e organização dos laboratórios (LACKNER; LASS-FLÖRL, 2017). Contudo, ainda se tem um longo caminho a percorrer até um método de diagnóstico sair do conceito para aplicação na rotina clínica (GABALDON, 2019).

## **2.6 Métodos Moleculares para Análise de Leveduras**

A identificação clássica baseada em caracteres fenotípicos é desafiadora. Dessa forma, os dados moleculares que complementam os dados morfológicos, são muito promissores para delimitação e identificação de espécies, classificação taxonômica e inferência filogenética (MARCOS; PINCUS, 2013; SIQUEIRA; DE ALMEIDA, 2018; WICKES; WIDERHOLD, 2018). Os dados moleculares são baseados na caracterização da variabilidade dos nucleotídeos nas sequências de DNA das espécies, às vezes intimamente relacionadas, e têm sido aplicados para caracterizar espécies fúngicas desde a década de 1990 (WHITE et al., 1990; TEKPINAR; KALMER, 2019).

### **2.6.1 Reação em Cadeia da Polimerase (“Polymerase Chain Reaction” – PCR)**

A PCR é um dos mais antigos e mais utilizados métodos moleculares para o diagnóstico fúngico (MEYER et al., 1993; ARVANITIS et al., 2014; LACKNER; LASS-FLÖRL, 2017). A técnica da PCR permite a amplificação de um fragmento de DNA em um alvo específico gerando milhões de cópias dessa sequência (MULLIS et al., 1986). Tem potencial comprovado para o diagnóstico permitindo a rápida e seletiva detecção da sequência alvo do DNA.

A detecção e identificação de patógenos por PCR é baseada no desenvolvimento de um conjunto de “primers” (ou iniciadores) que amplificam seletivamente um alvo. Esse alvo pode ser espécie-específico gerando somente um “amplicon” (produto gerado na PCR) ou ter um alcance mais amplo produzindo diferentes “amplicons” para a maioria dos representantes de um determinado grupo, sendo considerado universal (GABALDON, 2019). Uma das vantagens em se utilizar “primers” universais para a PCR é que estes permitem a detecção tanto dos fungos comuns como de fungos raros. Porém seu resultado deve ser interpretado com cautela

uma vez que todos os fungos – patogênicos, não-patogênicos, comensais, saprofíticos – podem estar presentes e dar um resultado falso positivo devido à alta sensibilidade do ensaio da PCR (LACKNER; LASS-FLÖRL, 2017). Assim, uma desvantagem em se utilizar a PCR para o diagnóstico fúngico é a potencial contaminação, uma vez que os fungos são encontrados em todos os ambientes e podem facilmente contaminar superfícies além do material utilizado nas etapas de realização da PCR, incluindo os reagentes e os tubos de coleta. Cuidados são necessários para evitar os falso-positivos associados aos contaminantes (ARVANITIS et al., 2014).

Várias técnicas baseadas em PCR vêm sendo sugeridas para a identificação de espécies fúngicas. Métodos baseados em PCR são fáceis de serem aplicados e têm como vantagem exigir quantidades pequenas de material inicial ou DNA molde (KURTZMAN, 2014). O potencial da PCR pode ir além da determinação de espécies podendo ser utilizada, em combinação com análises pós-amplificação, para caracterizar diferenças genéticas mais sutis como as associadas ao perfil de resistência (GABALDON, 2019).

Segundo Arvanitis et al. (2014), alguns aspectos devem ser considerados quando se usa a PCR para o diagnóstico fúngico, como: escolha da amostra, método de extração do DNA, seleção dos “primers”, qual será o alvo utilizado para a realização da PCR, tipo da PCR (convencional, “nested” PCR, “real-time” PCR, multiplex), e co-infecção por diferentes patógenos. Além disso, quando possível, os métodos baseados em PCR precisam ser validados usando cepas de referência e outros isolados previamente caracterizados, além da atualização dos bancos de dados (WICKES; WIEDERHOLD, 2018).

As técnicas baseadas em PCR, como o exemplificado na detecção direta de *Candida auris* em amostras clínicas (“swabs” e esponjas) por Leach et al. (2018), proporcionaram um aumento na velocidade do diagnóstico deste patógeno emergente. No entanto, como mostrado no estudo, não houve uma correspondência entre os resultados positivos na cultura e na PCR. Essas discrepâncias mostram os riscos quanto à adoção somente de métodos moleculares para o diagnóstico. Da mesma forma, no campo da microbiologia alimentar, ferramentas de identificação rápida de patógenos e fungos deterioradores estão disponíveis, porém devem ser complementadas com métodos mais básicos, ao menos para a identificação preliminar (CORBETT; DE SMIDT, 2019).

## **2.6.2 Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição ("Restriction Fragment Length Polymorphism" - RFLP)**

A técnica de RFLP é uma ferramenta molecular baseada no polimorfismo de fragmentos gerados pela digestão do DNA através do uso de endonucleases de restrição gerando perfis de restrição. Este método tem mostrado resultados promissores para a caracterização de várias espécies de leveduras (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998; CORBETT; SMIDT, 2019). A técnica de RFLP tem como princípio que as diferenças genéticas entre os indivíduos podem criar sítios de restrição e essas diferenças podem ser visualizadas através da separação em eletroforese após a digestão com endonucleases de restrição (TROST et al., 2004).

A análise dos produtos da PCR em combinação com o RFLP (PCR-RFLP) é uma técnica simples e rápida e fornece resultados confiáveis (TROST et al., 2004). A técnica envolve três etapas: amplificação, digestão e separação em gel (agarose ou poliacrilamida) por eletroforese. Essa união permitiu a distinção entre diferentes espécies de leveduras (ECHEVERRIGARA et al., 2013; GABALDON, 2019). O PCR-RFLP tem sido usado com sucesso na identificação de diferentes espécies de leveduras como *Candida* (TROST et al., 2004), *Malassezia* (MIRHENDI et al., 2005), de fungos deteriorantes em alimentos (CORBETT; De SMIDT, 2019) entre outras. No entanto, apesar do poder / potencial dessas técnicas, seu uso permanece limitado aos laboratórios de pesquisa e não chega aos ambientes clínicos.

### 2.6.3 “Nested” PCR

A “Nested” PCR é uma modificação da PCR que foi desenhada para melhorar a sensibilidade e a especificidade das reações de PCR. Envolve o uso de dois conjuntos de “primers” e duas reações sucessivas de PCR. O primeiro conjunto de “primers”, denominados “primers” externos, gera um “amplicon” que será usado como molde para a reação seguinte, com os “primers” denominados internos. Embora a “nested” PCR demande mais trabalho e custo, pode aumentar significativamente a sensibilidade e especificidade da amplificação do DNA com a combinação de dois pares de “primers” (GABALDON, 2019), porém o potencial de contaminação da reação também aumenta devido à manipulação adicional dos produtos da amplificação (ARVANITIS et al., 2014).

### 2.6.4 PCR em tempo real “Real time PCR”

A PCR quantitativa (qPCR) também conhecida como PCR em tempo real “Real time PCR”, quando comparada com a PCR convencional, oferece a vantagem de quantificar a carga de patógeno ao longo da reação sem a necessidade de uma etapa adicional, embora tenha a desvantagem de um custo mais elevado (GABALDON, 2019). Permite ver os resultados à medida que os ciclos de amplificação ocorrem, detectando a amplificação por fluorescência e permitindo o uso de múltiplas sondas para diferentes alvos na mesma reação (WICKES; WIDERHOLD, 2018).

Diversos kits comerciais para PCR em tempo real estão disponíveis para a identificação de espécies de *Candida* e *Aspergillus*, e fornecem especificidade e sensibilidade na identificação quando comparados aos métodos tradicionais (GABALDON, 2019). A PCR em tempo real permite a quantificação do DNA amplificado e, portanto, poderia ajudar a diferenciar a infecção da colonização fúngica (ARVANITIS et al., 2014).

### 2.6.5 Sequenciamento

O sequenciamento de DNA é uma técnica que tem como objetivo determinar a ordem exata dos nucleotídeos num fragmento de DNA, e vem sendo utilizada cada vez mais por micologistas como primeira escolha de método para identificação das espécies.

Uma vez que a diversidade das características morfológicas pode gerar confusões na caracterização de espécies, o sequenciamento de DNA veio como meio de fornecer informações que ajudem na identificação (JOHNSTON et al., 2019; TEKPINAR; KALMER, 2019). Assim essa técnica vem se tornando o novo “padrão ouro” para a identificação molecular de fungos (WICKES; WIEDERHOLD, 2018). Atualmente, o sequenciamento de DNA de diferentes regiões genômicas tem se tornado uma poderosa ferramenta na produção de dados moleculares para rápida identificação de espécies, superando os métodos tradicionais usados na descrição de espécies fúngicas (STIELOW et al., 2015; TEKPINAR; KALMER, 2019).

Os avanços recentes nas tecnologias de sequenciamento têm revolucionado a maneira como a pesquisa microbiológica é realizada. Uma variedade de técnicas de sequenciamento de nova geração “Next Generation Sequencing” (NGS) está disponível, com mais técnicas sendo desenvolvidas para aumentar o rendimento, a qualidade da leitura e a precisão dessa tecnologia. Portanto, mesmo não sendo o alvo principal das pesquisas com NGS, esta pode ser uma ferramenta para o diagnóstico de infecções causadas por leveduras (GABALDON, 2019).

### **2.6.6 DNA “Barcoding”**

O conceito de “DNA barcoding” surgiu em 2003 por Hebert e colaboradores, com a ideia de usar uma única sequência para fornecer a identificação de todos os organismos eucariotas do planeta. Na proposta original, a sequência escolhida foi um fragmento (de aproximadamente 700 pares de bases) do gene mitocondrial codificando a subunidade 1 da proteína citocromo c oxidase (COII). Esse projeto ficou conhecido como “Barcode of Life” (BOLD, <http://www.boldsystems.org>) e foi progressivamente desenvolvido até seu estabelecimento oficial em 2007 (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007). O DNA “barcoding” tinha como objetivo atribuir espécimes desconhecidos a espécies conhecidas e aprimorar a descoberta de novas espécies facilitando a sua identificação (HEBERT et al., 2003; DULLA et al. 2016). Apesar de ter sido bem-sucedido, para vários grupos de animais e algumas plantas, a abordagem de amplificação do gene COI não teve tanto sucesso em relação aos fungos (GILMORE et al. 2009; SANTAMARIA et al. 2009; VIALLE et al. 2009; DENTINGER et al. 2011). Assim em 2012 foi proposto por Schoch e colaboradores a região espaçadora interna transcrita (ITS1-5.8S-ITS2) como o “barcode” para o Reino Fungi. Em 2015, foi sugerido o fator de alongamento de tradução 1  $\alpha$  (TEF 1 $\alpha$ ) como um “barcode” secundário para a identificação de espécies fúngicas porém não foi implementado devido a ausência de um banco de dados de referência (MEYER et al., 2019).

### **2.7 Marcadores Moleculares de Leveduras**

As análises moleculares são baseadas na variabilidade das sequências de DNA de espécies relacionadas e têm sido aplicados para caracterizar espécies fúngicas desde a década de 90 (WHITE et al., 1990; TEKPINAR; KALMER, 2019). A identificação molecular tem sido amplamente aplicada a pesquisas de diversidade microbiana devido à necessidade de sistemas de identificação independentes da cultura (FREZAL; LEBLOIS, 2008).

Os genes que codificam os RNAs ribossomais são frequentemente utilizados na caracterização de espécies uma vez que estão presentes em todos os organismos, sendo utilizados como alvo para identificação e diagnóstico por serem constituídos por diferentes domínios, alguns conservados e outros variáveis, assim se tornando úteis em estudos evolutivos e para determinar relações filogenéticas entre as espécies (WICKES; WIEDERHOLD, 2018). Tanto as regiões codificadoras como as não codificadoras podem ser utilizadas como marcador molecular. No entanto, a escolha de uma ou mais regiões que podem ser utilizadas como marcador para um determinado grupo de organismos, é considerada uma das etapas mais importantes na caracterização de espécies (TEKPINAR; KALMER, 2019).

Atualmente, com o avanço da bioinformática e a disponibilidade das sequências genômicas completas de um número cada vez maior de espécies fúngicas a identificação de regiões para o diagnóstico através de ensaios espécie-específico torna-se mais fácil e rápido (GABALDON, 2019). O DNA “barcoding” e o sequenciamento em larga escala vieram para mudar a forma como a diversidade dos fungos é mensurada dentro do ecossistema e essas novas tecnologias permitem o acesso à diversidade de fungos que não pode ser cultivada (JOHNSTON et al., 2019) não se limitando somente as espécies patogênicas.

### **2.7.1 DNA ribossomal 26S rDNA - região do domínio D1/D2 do gene 26S rDNA**

O domínio D1/D2 do gene 26S rDNA contém duas regiões de sequências altamente variáveis (no nível intra-específico) que são flanqueadas por regiões de sequências altamente conservadas (no nível do reino) (KURTZMAN; ROBNETT, 1998; KURTZMAN, 2014). Com base nessa observação, essa região foi proposta como base para um sistema de genotipagem baseado em PCR, no qual “primers” universais complementares às regiões conservadas são usados para gerar um fragmento de aproximadamente 600 pares de bases, que é posteriormente analisado para determinar as sequências presentes dentro das regiões variáveis (KURTZMAN; ROBNETT, 1998; KURTZMAN, 2014).

### **2.7.2 DNA ribossomal 18S (18S rRNA)**

Um alvo comum dos ensaios de diagnóstico de fungos por PCR é o 18S rRNA uma vez que sua frequência no genoma garante uma alta sensibilidade ao ensaio (BIALEK et al., 2000). Além disso, a disponibilidade de sequências nos bancos de dados públicos torna o 18S rRNA um possível marcador em análises filogenéticas (YARZA et al., 2017). As sequências de nucleotídeos do gene para a subunidade menor do RNA ribossomal (18S rRNA) foram usadas para investigar as relações evolutivas dentro do grupo dos fungos (BRUNS et al., 1992). As sequências do 18S rRNA ainda são amplamente utilizadas para investigação taxonômica por compreenderem regiões conservadas e hipervariáveis. No entanto, em contraste com o domínio D1/D2 do gene 26S rDNA, a sequência do gene 18S rRNA apesar de ser um marcador filogenético importante para a classificação de espécies fúngicas raramente resolve os táxons fúngicos ao nível de espécie ou gênero (YARZA et al., 2017).

### **2.7.3 ITS – Espaçador Interno Transcrito ITS1-5.8S-ITS2 (“internal transcribed spacers”)**

Inicialmente a região proposta para DNA “barcoding” foi o gene mitocondrial citocromo c oxidase (*COI*), porém este não funcionou para todos os grupos de fungos sendo necessária a busca de um marcador capaz de separar o maior número de espécies fúngicas. Schoch e colaboradores (2012) propuseram a região do espaçador interno transcrito (ITS1-5.8S-ITS2) como principal marcador para “barcoding” de fungos com a possibilidade de desenvolvimento de marcadores adicionais quando necessário e este se tornou o alvo amplamente aceito como padrão para identificação de espécies fúngicas (SCHOCH et al., 2012; IRINYI et al., 2016), existindo muitos “primers” universais já descritos para a amplificação dessa região (GABALDON, 2019).

A região ITS se tornou o DNA “barcoding” para identificação e taxonomia molecular de fungos devido à disponibilidade de “primers” universais, múltiplas cópias dentro do genoma, o que aumenta as chances de eficiência na amplificação e sequenciamento, e bom poder de resolução, o que facilita a discriminação das espécies para a maioria dos fungos. Além disso, o número de sequências disponíveis nos bancos de dados é muito maior que o de qualquer outro gene (SCHOCH et al. 2012). No entanto, em alguns casos, a região ITS não permite discriminar todos os fungos ao nível de espécies, o que exige o uso de outros marcadores (WICKES; WIEDERHOLD, 2018).

### **2.7.4 RNA Polimerase II – Subunidades 1 e 2 (*RPB1* e *RPB2*)**

O uso de genes codificadores de proteínas é considerado valioso para determinar as relações filogenéticas dos fungos. A principal vantagem do uso de genes codificadores de proteínas é a presença, na maioria dos casos, de uma única cópia no genoma. A RNA polimerase II é uma enzima responsável pela transcrição em pré mRNA de genes que codificam proteínas (TEKPINAR; KALMER, 2019).

Os genes codificadores das subunidades *RPB1* e *RPB2* foram considerados mais eficientes como ferramenta filogenética do que os genes codificadores de RNA ribossomal nuclear para a resolução sistemática molecular dos Ascomycetos. Os marcadores de proteínas como *RPB1* e *RPB2* têm alto poder de resolução de espécies, mas as falhas que podem ocorrer na PCR, no sequenciamento e no alinhamento das sequências podem limitar seu potencial na identificação de espécies (TEKPINAR; KALMER, 2019).

### **2.7.5 Citocromo c Oxidase (subunidade I) – *COII***

O gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (*COII*) é um dos marcadores mais conhecidos para a sistemática molecular. Embora as regiões nucleares no DNA tenham ganhado um maior destaque nas análises filogenéticas, muitas vezes seu excesso de variabilidade faz com que perca seu poder discriminatório, por isso a utilização de outros marcadores genômicos como esse

mitocondrial (TEKPINAR; KALMER, 2019). A sequência do gene *COII* se mostra adequada para o papel de marcador molecular, pois sua taxa de mutação é rápida o suficiente para distinguir espécies intimamente relacionadas e também por sua sequência ser conservada entre indivíduos da mesma espécie (SARVANANDA, 2018).

Com base na avaliação da literatura revisada acima, é aparente que nosso conhecimento dos fungos ainda é um trabalho em andamento. Novas técnicas em biologia molecular estão sendo gradualmente adotadas por micologistas e parecem adequadas para fornecer soluções para questões de importância ecológica, incluindo a identificação e caracterização de patógenos fúngicos emergentes. O ascomiceto *C. guttulatus* foi observado como um organismo comensal no trato gastrointestinal de coelhos há mais de 120 anos e, apesar de períodos ocasionais de interesse acadêmico, permaneceu um mistério para os micologistas. No entanto, atualmente estamos em um dos períodos de interesse mais ativos. O relato, no início deste século, de uma possível associação entre essa espécie de levedura e distúrbios gastrintestinais em cães causou controvérsia e debate entre os micologistas veterinários. A pesquisa relatada nesta tese foi desenvolvida com o objetivo principal de produzir métodos inovadores para melhorar a compreensão da ecologia desta levedura e facilitar a detecção e caracterização de forma econômica, rápida e reprodutível, além de fornecer meios para aprimorar a caracterização de *C. guttulatus* em contextos clínicos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos envolvendo experimentação animal foram avaliados e aprovados pela CEUA/IV/UFRRJ Processo #6304270617. O estudo foi realizado nas dependências do Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular (LabBioMol), do Departamento de Parasitologia Animal (DPA) e no Laboratório de Coccídios e Coccidiose (LCC), Anexo I, do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), *Campus Seropédica*, RJ.

#### 3.1 Classificação e Origem das Amostras Analisadas para a Presença de *Cyniclomyces guttulatus*

Amostras de fezes foram coletadas entre 2011 e 2019 provenientes de diferentes localidades e foram classificadas nos seguintes grupos: (A) – fezes de coelhos e de porquinho-da-índia coletadas de animais saudáveis e criados em biotério na UFRRJ; (B) – fezes de cães coletadas de animais saudáveis por seus tutores e classificadas como negativas para *C. guttulatus* ao exame microscópico da suspensão de fezes; (C) – fezes de cães coletadas de animais sob tratamento médico veterinário como consequência de sintomas de doença gastrointestinal e com células de morfologia compatível com *C. guttulatus* ao exame microscópico da suspensão de fezes e (D) – fezes de cães coletadas de animais sob atendimento médico veterinário de rotina ou por outra causa que não doença gastrointestinal e positiva para presença de células com morfologia compatível com *C. guttulatus*. Detalhes de todas as amostras estão nas tabelas 1, 2 e 3. Também são apresentados os detalhes sobre as amostras provenientes de outras fontes de material clínico (ex. lavado estomacal ou aspirado da vesícula biliar) que foram coletados e processados conforme reportado anteriormente por (FLAUSINO et al., 2012; FURTADO et al., 2013).

**Tabela 1.** Detalhes de origem da amostra e ano de coleta dos animais que mostraram cultura positiva, porém sem manifestações gastrintestinais para as amostras fecais de porquinho-da-índia e coelho utilizadas no estudo (grupo A).

<b>Origem</b>	<b>Animal</b>	<b>Ano de Coleta</b>	<b>Cultura positiva</b>	<b>Manifestações gastrintestinais</b>	<b>Código da cultura</b>
UFRRJ (LCC)	Porquinho-da-índia	2011	Sim	Não	GPC1
UFRRJ (IZ)	Coelho - RF1	2009	Sim	Não	FBC*
UFRRJ (LQEPV)	Coelho - RF2	2012	Sim	Não	RC1
UFRRJ (LQEPV)	Coelho - RF3	2012	Sim	Não	RC2
UFRRJ (LQEPV)	Coelho - RF4	2012	Sim	Não	RC3
UFRRJ (LQEPV)	Coelho - RF5	2012	Sim	Não	RC4
UFRRJ (LQEPV)	Coelho - RF6	2012	Sim	Não	RC5
UFRRJ (LQEPV)	Coelho - RF7	2012	Sim	Não	RC6
UFRRJ (LQEPV)	Coelho - RF8	2012	Sim	Não	RC7
UFRRJ (IZ)	Coelho - RF9	2012	Sim	Não	RC8
UFRRJ (IZ)	Coelho - RF10	2012	Sim	Não	RC9
UFRRJ (IZ)	Coelho - RF11	2012	Sim	Não	RC10 <sup>a</sup>
UFRRJ (IZ)	Coelho - RF12	2013	Sim	Não	RC11
UFRRJ (IZ)	Coelho - RF13	2014	Sim	Não	RC12
UFRRJ (IZ)	Coelho - RF14	2014	Sim	Não	RC13
UFRRJ (IZ)	Coelho - RF15	2014	Sim	Não	RC14
UFRRJ (IZ)	Coelho - RF16	2014	Sim	Não	RC15
UFRRJ (IZ)	Coelho - RF17	2018	Sim	Não	RC16 <sup>a</sup>
UFRRJ(LQEPV)	Coelho - RF18	2019	Sim	Não	RC17 <sup>a</sup>
UFRRJ (LQEPV)	Coelho - RF19	2019	Sim	Não	RC18
UFRRJ (LQEPV)	Coelho - RF19a	2019	Sim	Não	RC19 <sup>a</sup>

LCC = Laboratório de Coccídeos e Coccidiose; LQEPV = Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária, DPA, IV, UFRRJ; IZ= Instituto de Zootecnia UFRRJ; \*FBC = cultura isolada conforme descrição de Flausino e Baroni (2009); <sup>a</sup> = colônia com morfologia atípica

**Tabela 2.** Detalhes de origem, ano de coleta, presença de células cultiváveis e estado de saúde do animal (com referência aos sintomas gastrintestinais) para as fezes de cães saudáveis cedidas pelos tutores (grupo B).

<b>Origem (Município)</b>	<b>Espécie Animal</b>	<b>Ano de coleta</b>	<b>Cultura Positiva</b>	<b>Manifestações gastrintestinais</b>	<b>Código de Identificação da amostra</b>
<b>Rio de Janeiro</b>	Cão - Pandora	2019	Não	Não	DF1
<b>Rio de Janeiro</b>	Cão - Magrela	2019	Não	Não	DF2
<b>Rio de Janeiro</b>	Cão - Shakira	2019	Não	Não	DF3
<b>Rio de Janeiro</b>	Cão - Princesa	2019	Não	Não	DF4
<b>Rio de Janeiro</b>	Cão - Namy	2019	Não	Não	DF5
<b>Seropédica</b>	Cão – Pitt	2019	Não	Não	DF6
<b>Seropédica</b>	Cão - Cremosa	2019	Não	Não	DF7
<b>Rio de Janeiro</b>	Cão - Justin	2019	Não	Não	DF8
<b>Rio de Janeiro</b>	Cão - Pantera	2019	Não	Não	DF9
<b>Rio de Janeiro</b>	Cão - Mel	2019	Não	Não	DF10
<b>Rio de Janeiro</b>	Cão -Toquinho	2019	Não	Não	DF11
<b>Rio de Janeiro</b>	Cão -Branquinho	2019	Não	Não	DF12
<b>Seropédica</b>	Cão - Beagle 1	2018	Não	Não	DF13
<b>Seropédica</b>	Cão - Beagle 2	2018	Não	Não	DF14
<b>Rio de Janeiro</b>	Cão - Pops	2018	Não	Não	DF15

**Tabela 3.** Detalhes para as amostras de cães cedidas por clínicas veterinárias como positivas na análise microscópica para presença de *Cyniclomyces guttulatus* (grupos C e D).

<b>Origem</b>	<b>Animal</b>	<b>Ano de Coleta</b>	<b>Manifestação Gastrintestinal</b>	<b>Código da Cultura (se positivo)</b>
CTIVet	Husky	2011	Sim*	CC1
CTIVet	Sausage 1	2012	Sim*	CC2
CTIVet	Sausage 2	2012	Sim*	CC3
CTIVet	Tequila	2013	Sim	CC4
CTIVet	Lalá	2013	Não	CC5
CTIVet	Thor	2013	Não	CC6
CTIVet	November	2014	Não	CC7
CTIVet	Bob	2015	Não	-
CTIVet	Whipy	2017	Não	-
CTIVet	Escotty	2017	Não	-
CTIVet	Kiara	2017	Sim	-
CTIVet	Fred	2018	Não	-
CTIVet	Lessie	2018	Não	-
VetZS	Chico	2018	Sim	-
CTIVet	Nina pré	2019	Sim	CC8
CTIVet	Carmella	2019	Sim	-
CTIVet	Nina Pós	2019	Não	-

CTIVet = Centro de Tratamento Intensivo 24 hrs - Barra da Tijuca, Rio de Janeiro, RJ; VetZS - Clínica Veterinária Zona Sul, Copacabana, RJ; \* detalhes da coleta desse material (lavado estomacal ou aspirado da vesicular biliar) foram reportados previamente por Flausino et al. (2012) e Furtado et al. (2013);

### 3.1.1 Manifestações Clínicas dos Animais que Apresentaram Células com Morfologia Compatível com *Cyniclomyces guttulatus*

No quadro abaixo podem ser visualizadas as informações a respeito das manifestações clínicas, relacionadas aos sintomas gastrintestinais, dos oito animais avaliados como positivos para presença de células com morfologia compatível com *C. guttulatus*.

**Quadro 1.** Informações fornecidas pelos médicos veterinários sobre os cães que apresentavam manifestações gastrintestinais e células com morfologia compatível com *Cyniclomyces guttulatus*

Origem da Amostra	Nome do Animal	Ano de Coleta	Manifestações clínicas
CTIVet	Husky	2011	Diarreia
CTIVet	Sausage 1	2012	Colangiohepatite e gastrite
CTIVet	Sausage 2	2012	Problemas hepáticos associados à vesícula biliar; Gastrite
CTIVet	Tequila	2013	Animal com hábito de coprofagia. Era um filhote e chegou à residência muito magra. Animal proveniente de canil.
CTIVet	Kiara	2017	Animal apresentava quadro de colangiohepatite e enzimas hepáticas alteradas.
VetZS	Chico	2018	Animal com quadros de vômito e fezes gordurosas. Presença de outras leveduras ( <i>Candida</i> spp.) nas fezes.
CTIVet	Nina	2019	Animal com quadro de diarreia.
CTIVet	Carmella	2019	Animal com quadros esporádicos de diarreia com muco apresentando cistos de <i>Giardia intestinalis</i> em exame coproparasitológico

CTIVet = Clínica Centro de Tratamento Intensivo 24 hrs – Barra da Tijuca, Rio de Janeiro, RJ; VetZS = Clínica Veterinária Zona Sul, Copacabana, Rio de Janeiro, RJ.

### 3.2 Processamento das Amostras Fecais

Os estágios iniciais de processamento das amostras variavam de acordo com o local ou a época em que as amostras foram coletadas. Nesse contexto, as fezes provenientes de coelhos e de porquinho-da-índia foram coletadas em recipientes de

plástico estéreis logo após a defecação e foram processadas dentro de um período máximo de duas horas após a coleta. Por outro lado, o material coletado de cães saudáveis (por seus tutores) foi armazenado a 4 °C (por até 24 hrs) antes de ser transportado sob refrigeração até a UFRRJ. A maior variação no processamento ocorreu em relação ao material coletado dos animais sob atendimento veterinário. O procedimento geral para essas amostras foi: o médico veterinário informava que tinha identificado um material positivo, com células semelhantes a *C. guttulatus*, e era combinada uma forma de transporte do material até o laboratório. O material coletado pelos veterinários no período de 2011-2016 foi mantido em temperatura ambiente até o transporte (também realizado em temperatura ambiente) para a UFRRJ (em geral 24 a 48 hrs após a coleta). Em alguns casos, uma alíquota das fezes era diluída em solução fisiológica também sendo armazenada em temperatura ambiente até o transporte ao nosso laboratório. Em contraste, as amostras coletadas pelos veterinários entre 2017-2019, eram divididas em duas partes: uma parte da amostra (mínimo de 1 g) era congelada (-20 °C) e outra parte era ressuspensa em solução fisiológica salina (aproximadamente 1 g / 10 mL), e mantida em temperatura ambiente até o transporte para o laboratório na mesma temperatura, com o transporte sendo realizado até 48hrs após a coleta. As amostras congeladas foram transportadas em banho de gelo até sua chegada ao laboratório.

Chegando ao laboratório, as amostras frescas de fezes de coelho, porquinho-da-índia e cão (coletadas por veterinários entre 2011-2016) foram pesadas e ressuspensas em solução salina (0,9%) tamponada com fosfato (Fosfato de sódio bibásico, fosfato de sódio monobásico e cloreto de sódio pH 7,4 – “Phosphate Buffered Saline” (PBS), para obter uma concentração final de 150 mg/mL. Essa suspensão foi dividida em alíquotas de 1 mL em microtubos de fundo cônico de 1,5 mL e tampa rosca (Sarstedt), com um dos tubos sendo utilizado nas análises microbiológicas conforme descrito abaixo. Os outros tubos foram centrifugados (16.000 xg) por 10 min, para sedimentar as fezes e os sobrenadantes foram descartados. Os “pellets” contendo 150 mg de fezes foram armazenados a -20 °C para análises futuras (microbiológica e molecular).

As amostras de fezes provenientes de cães saudáveis, coletadas por seus tutores, foram mantidas a 4 °C enquanto era realizado o exame microscópico para a presença de *C. guttulatus*. Depois disso, foram processadas como descrito acima para as fezes frescas de coelho, porquinho-da-índia e cão.

As amostras oriundas de cães coletadas pelos veterinários (2017-2019) foram processadas examinando a suspensão em solução salina através da microscopia óptica para verificar a presença de células compatíveis com *C. guttulatus* e foram submetidas à análise microbiológica conforme descrito abaixo. Uma porção de cada uma das amostras congeladas (aproximadamente 1 g) foi separada (sem permitir o total descongelamento da amostra), pesada e o descongelamento ocorreu naturalmente à temperatura ambiente (24 °C). O material descongelado foi ressuspensa em PBS como descrito acima e dividido em alíquotas, sendo que uma parte foi utilizada para as análises microscópica e microbiológica, e o restante armazenado a -20 °C na forma de “pellets” de 150 mg.

### 3.3 Identificação Microscópica

A presença de células morfológicamente compatíveis com a descrição de *C. guttulatus* foi inicialmente avaliada através da análise direta em microscópio óptico binocular (Olympus Bx51) com objetiva 40X de uma gota de suspensão das fezes em PBS, entre lâmina e lamínula. Amostras consideradas positivas foram coradas através da mistura de 100 µL de suspensão com 10 µL de solução azul de lactofenol (Fenol, Ácido láctico, Glicerol e Azul de metila) (nº de catálogo 113741 - Sigma Aldrich) e visualizadas novamente sob microscopia.

### 3.4 Análise Microbiológica

Alíquotas (10 µL) das amostras fecais ou 100 µL de fezes ressuspenas em PBS foram utilizadas para inocular 3 mL de caldo YPG (extrato de levedura 1%, peptona de proteose 1%, glicose 2% e pH 3,5), suplementado com ampicilina 100 µg/mL e estreptomicina 20 µg/mL em tubos estéreis, tipo “falcon” de 15 mL (Sarstedt). Os sistemas foram incubados a 37 °C em uma “candle jar” (para produzir uma atmosfera elevada de CO<sub>2</sub>). As culturas foram examinadas diariamente, ao longo de cinco dias, para a presença de células de levedura morfológicamente compatíveis com *C. guttulatus*. Para crescimento em meio sólido YPGA (meio YPG com antibióticos acrescido de 2% ágar), a inoculação foi realizada com 100 µL de suspensão em YPG e os sistemas foram incubados a 37 °C em atmosfera elevada de CO<sub>2</sub> por até sete dias. As placas foram visualizadas após 72 hrs de incubação e após esse tempo foram examinadas diariamente. Colônias isoladas, com morfologia compatível com a descrição de *C. guttulatus* (FLAUSINO; BARONI, 2009), foram usadas para reinocular em meio YPGA, e esse processo foi realizado mais uma vez para a obtenção de culturas puras. Estoques foram preparados em caldo YPG com glicerol 17% e armazenados a -20 °C. Estoques de trabalho foram mantidos a 4 °C em caldo YPG.

#### 3.4.1 Determinação da Susceptibilidade de *Cyniclomyces guttulatus* a Compostos Antimicrobianos (Antibióticos)

Os antibióticos ampicilina e estreptomicina são rotineiramente adicionados aos meios de cultura utilizados para isolamento e manutenção de culturas de *C. guttulatus*. Algumas amostras de fezes apresentaram um crescimento excessivo de bactérias mesmo com a suplementação de ampicilina e estreptomicina. Baseado nessa observação foi realizado um conjunto de testes para avaliar a possibilidade de se utilizar outros antibióticos no meio de cultura, para inibir o crescimento bacteriano, sem interferir no crescimento de *C. guttulatus*. Os antibióticos testados foram: cloranfenicol, nitrofurantoina, oxitetraciclina e rifampicina nas concentrações finais de 20 e 50 µg/mL para todos eles. Três cepas (CC8, RC18 e RC19), foram inoculadas em 3 mL de YPG (suplementado com ampicilina e estreptomicina), com 30 µL de uma suspensão de trabalho (mantida a 4 °C), e os sistemas foram incubados a 37 °C por 48 hrs. Após a confirmação microscópica de morfologia compatível com *C. guttulatus*, as culturas

resultantes foram utilizadas para inocular (30 µL em 3 mL) no caldo YPG com ampicilina e estreptomomicina (controle positivo), ou em caldo YPG contendo um dos diferentes antibióticos testados. Alíquotas de 50 µL das suspensões de células em cultivo foram examinadas microscopicamente, coradas com solução azul de lactofenol ao longo de 24 hrs, 48 hrs e 72 hrs de crescimento para determinar possíveis mudanças na morfologia celular ou outros efeitos negativos no crescimento. As células foram contadas na Câmara de Neubauer segundo descrito por (LEE et al., 1981 UFRGS, 2013).

### 3.5 Extração de DNA de Células de Leveduras Recuperadas do Meio YPGA

Em condições de esterilidade, uma colônia de cada isolado de *C. guttulatus* (ou das outras espécies de levedura utilizadas no estudo), foi ressuspensa em 350 µl de PBS em microtubos de fundo cônico de 1,5 mL e tampa rosca contendo 50 mg de esferas de vidro - “glass beads” (425-600 µm; n° de catálogo G8772 - Sigma Aldrich). As amostras foram agitadas, na velocidade máxima, por 60 seg num aparelho Mini-Beadbeater-16 (Biospec; Bartlesville, OK, USA). Foram adicionados em cada amostra 350 µL de tampão de lise celular (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, EDTA 20 mM pH 8.0, cloreto de sódio 400 mM, dodecil sulfato de sódio 1%, cloreto de cálcio 10 mM) e as amostras foram incubadas por 15 min a 56 °C. Em seguida, em uma cabine de exaustão de gases, foram acrescentados 700 µL de fenol tamponado com TRIS (pH 7,4 – 7,8; n° de catálogo p1037 - Sigma Aldrich) e o sistema foi misturado manualmente para formar uma emulsão. As amostras foram centrifugadas por 5 min em 16.000 xg para separar as fases (fenol e DNA em solução aquosa). Após esse procedimento, foram retirados 650 µL da fase superior aquosa, sendo esse volume transferido para um novo tubo com tampa de rosca (Sarstedt) de 1,5 mL. Em seguida, foram adicionados 650 µL de uma mistura de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico [25:24:1] (n° de catálogo p3803 - Sigma Aldrich), e os tubos foram novamente misturados para elaborar uma emulsão e centrifugados por 5 min em 16.000 xg para separar as fases.

Após, foram retirados 600 µL da fase superior aquosa, sendo transferidos para um novo tubo com tampa de rosca de 1,5 mL. Em seguida, foram adicionados 600 µL de isopropanol (Merck), e o conteúdo foi homogeneizado gentilmente por inversão (para minimizar a fragmentação do DNA). Os tubos foram então incubados durante 15 min em temperatura ambiente (aproximadamente 24 °C), para precipitar o DNA presente nas amostras. Passado esse período, as amostras foram centrifugadas por 20 min em 16.000 xg e depois invertidos para descartar o líquido deixando o “pellet” de DNA no fundo do tubo. Os “pellets” foram lavados com 500 µL de etanol 70%, (para remoção do excesso de sal), e centrifugados por 3 min a 16.000 xg. O sobrenadante foi eliminado invertendo o tubo e o processo de lavagem foi repetido com o mesmo volume de etanol 70%. Para remover o restante do álcool, os tubos foram colocados invertidos e sem tampa sobre um papel absorvente durante 1 min e em seguida incubados abertos a 70 °C durante 5 min para evaporar o etanol residual. Após seco, o DNA foi ressuspensão em 50 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 0,5 mM pH 9), e o sistema foi incubado a 4 °C durante a noite. No dia seguinte, a solução de DNA foi aquecida a 56 °C por 10 min e subsequentemente armazenada a -20 °C para posterior análise molecular.

### 3.6 PCR para o Domínio D1/D2 do Gene 26S rDNA

O ensaio de PCR empregado para amplificar um fragmento de aproximadamente 630 pares de bases (pb) da região do domínio D1/D2 do gene 26S DNA ribossomal (rRNA), utilizou o “master-mix”, os iniciadores (“primers”) e as condições de ciclagem descritas por Kurtzman e Robnett (1998), com modificações. Especificamente, as reações foram preparadas utilizando-se 2 µL de DNA; 1X tampão de reação; 200 µM de cada dNTP, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 20 pmol de cada primer (“forward” NL1 - 5'-TGCTGGAGCCATGGATC-3' e “reverse” NL4 -5'-AACGGCTTCGACAACAGC-3') e 0,5 U de Go Taq G2 Flexi DNA polimerase (nº de catálogo M7805 - Promega) em um volume final de 25 µL. O programa de ciclagem foi composto das seguintes etapas; uma fase de desnaturação inicial de 94 °C por 5 min (para desnaturar as fitas de DNA), seguida de 35 ciclos (cada um constituído de 94 °C por 35 seg, 52 °C por 20 seg, 72 °C por 20 seg), e uma fase final de extensão 72 °C por 5 min. Para análise da amplificação resultante, 5 µL do produto de cada amostra foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1,5%, com tampão de corrida Tris-Acetato EDTA (TAE - Tris base 20 mM, ácido acético 10 mM, EDTA 0,5 mM – pH 8,0), sob campo de 5 v/cm, durante 45 min. A determinação dos tamanhos dos produtos foi feita através da comparação visual com marcadores de peso molecular (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, nº de catálogo SM0241 - Thermo Fisher Scientific). Os géis foram corados em solução de brometo de etídio (5 µg/mL), observados e digitalmente registrados em transiluminador (Lpix - Loccus Biotecnologia). O volume restante de cada reação foi estocado a -20 °C para análises moleculares posteriores.

Em todas as reações de PCR realizadas neste estudo foram incorporados dois controles negativos. O primeiro destes compreendia uma amostra em que o DNA teste foi substituído pela mesma quantidade de água para biologia molecular, que foi adicionada ao tubo antes destes serem retirados do ambiente (livres de DNA) no qual as misturas para a reação da PCR foram preparadas e distribuídas para os tubos de reação individuais. Este controle, denominado água dentro, serviu para confirmar que os componentes da mistura da reação estavam livres de DNA contaminante. O segundo controle negativo denominado água fora, também foi composto de um tubo pelo qual o DNA foi substituído por um volume equivalente de água para biologia molecular. No entanto, este tubo controle foi mantido no ambiente (potencialmente contaminado por DNA), durante o período em que o DNA teste foi adicionado aos tubos individuais, contendo alíquotas da mistura principal para PCR. Este foi sempre o último tubo a ser preparado. Deste modo, o controle que foi intitulado água fora, serviu para determinar se havia ocorrido contaminação durante o processo de adição de amostras de DNA teste nos tubos individuais de reação. Uma reação positiva em qualquer controle negativo invalidava todas e quaisquer reações positivas registradas com o DNA teste das amostras.

### 3.7 Sequenciamento de DNA

Os produtos das reações de PCR foram purificados com ExoProStar (n° de catálogo US78211 - GE Healthcare Life Sciences) e submetidos ao sequenciamento através do “Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems). Os “amplicons” foram sequenciados em ambas as direções utilizando os mesmos “primers” empregados na PCR, e a reação de sequenciamento foi realizada no termociclador modelo 9700 (Applied Biosystems), utilizando as seguintes condições: desnaturação inicial a 96 °C durante 60 seg, seguidos de 30 ciclos de 96 °C por 10 seg, 50 °C por 5 seg para o anelamento e 60 °C por 4 min para a extensão. Após a reação, a remoção dos nucleotídeos não incorporados foi feita através de precipitação com EDTA/etanol seguido por ressuspensão em 10 µL de formamida (Applied Biosystems). Os produtos da reação de sequenciamento foram analisados utilizando o Analisador Genético de DNA modelo 3500 (Applied Biosystems), localizado no Departamento de Parasitologia Animal, UFRRJ. O alinhamento das sequências resultantes foi realizado utilizando o programa Sequencher 5.4.3 (Genecodes), e a comparação com o banco de dados GenBank usando o programa BlastN. Variações entre as sequências foram determinadas utilizando a função “variance table” do programa Sequencher 5.4.3.

### 3.8 Desenvolvimento de um Sistema de PCR-RFLP, com Base na Digestão de “amplicons” Gerados para Domínio D1/D2, do gene 26S rDNA, como um Método de Identificação de Células Cultivadas de *Cyniclomyces guttulatus*

O sistema de PCR-RFLP 26S foi desenvolvido com o intuito de fornecer um método econômico, rápido e reprodutível para a identificação diferencial de culturas suspeitas de ser *C. guttulatus*. As análises preliminares, envolveram testes de digestão *in silico* empregando o programa NEBcutter (New England Biolabs, EUA). Para esse fim, foram utilizadas sequências que corresponderam ao domínio D1/D2 de uma variedade de espécies de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* (código GenBank LC334458), *Candida parapsilosis* (NG054833), *Candida tropicalis* (MK691414), *Rhodotorula* sp. (AB893596), *Candida albicans* (MH891781), *Malassezia pachydermatis* (KY108421), *Kasachtania pintolopessi* (KY107940) e *Pichia kudriavzevii* (KU167717), associadas à microbiota fúngica de cães no Brasil (BRITO et al., 2009) e sequências de *C. guttulatus* previamente depositadas no GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), junto com as sequências geradas na atual investigação. As endonucleases de restrição avaliadas foram *DdeI*, *HaeIII*, *HinfI*, *HhaI*, *MspI*, *NdeI*, *RsaI*, *SspI* e *SstI*. Os achados desta análise indicaram que seria possível gerar padrões de bandas específicas para cada uma das diferentes espécies de leveduras examinadas usando uma combinação de três enzimas *HaeIII*, *MspI* e *DdeI*, que também forneceria padrões de bandas distintos e característicos para *C. guttulatus*. Estas hipóteses foram testadas *in vitro*, empregando os “amplicons” produzidos a partir do DNA isolado das 29 cepas identificadas como *C. guttulatus* junto com os “amplicons” gerados a partir do DNA extraído da cultura das leveduras da microbiota de cães analisadas na digestão *in silico*. As culturas de leveduras para *S. cerevisiae*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Rhodotorula* sp. e *C. albicans* foram cedidas pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Carlos Alberto da Rocha Rosa (DMIV, IV, UFRRJ); a cultura de *M. pachydermatis* foi cedida

pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Francisco de Assis Baroni (DMIV, IV, UFRRJ), e as culturas de *K. pintolopessi* e *P. kudriavzevii* foram isoladas a partir de material fecal de cão pelo Dr. Gilberto Flausino (DMIV, IV, UFRRJ) e cedidas para a realização do trabalho.

As reações enzimáticas para clivagem de produtos de amplificação de 26S rDNA ocorreram em um volume final de 12 µL, contendo de 3 a 9 µL do produto de PCR a ser avaliado (de acordo com a qualidade da amplificação e intensidade da banda resultante), 1,2 µL do tampão de reação enzimática próprio para cada enzima, 1,2 U da enzima de restrição selecionada e 1,2 µL de albumina de soro bovino (BSA - 0,1 mg/mL), com posterior adição de água ultra pura para atingir o volume final desejado. As reações foram incubadas a 37 °C durante 3 hrs. Os padrões de PCR-RFLP resultantes após a digestão foram avaliados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% em tampão TBE (Tris 45 mM, Ácido Bórico e EDTA 1 mM) por 1 hr / 75 V ou em géis de agarose (2.5%) em tampão TBE, em voltagem constante de 5 v / cm, durante 90 min. O procedimento de coloração e registro dos géis ocorreu como descrito previamente para avaliação dos produtos de PCR. Objetivando melhor predição do tamanho nos fragmentos resultantes, a análise comparativa foi feita com o auxílio de marcador de peso molecular (50 bp “Molecular Weight Ladder”, n° de catálogo M1041 - Sinapse) e o tamanho das bandas foi estimado com o auxílio do programa gel analyzer (<http://www.gelanalyzer.com/>).

### **3.9 Extração de DNA Fecal**

A possibilidade de extração de DNA fúngico diretamente de material fecal de cães foi avaliada utilizando dois métodos. No primeiro método, foi utilizado um kit comercial “Quick-DNA Fecal / Soil Microbe Miniprep” (Zymo Research) seguindo as instruções do fabricante e, em segundo lugar, um método caseiro baseado na técnica de fenol-clorofórmio. Pelo método de fenol-clorofórmio, foram adicionados 350 µl de PBS a cada “pellet” de 150 mg de fezes congelada em microtubos fundo cônico de 1,5 mL (Sarstedt), junto com 50 mg de esferas de vidro - “glass beads” (425-600µm; Sigma-Aldrich). Os tubos foram submetidos a um ciclo de 1 min no mini-beadbeater e em seguida foram adicionados 350 µl de solução de lise celular e as misturas foram incubados por 3 hrs a 56 °C. Após a lise, o DNA foi extraído por sucessivas etapas de fenol e fenol/clorofórmio, precipitado com isopropanol, ressuspenso em 100 µL de tampão AE e guardados a -20 °C conforme descrito anteriormente.

### **3.10 Desenvolvimento de um Ensaio de PCR Diagnóstico (espécie-específica), para Identificação de *Cyniclomyces guttulatus* Diretamente das Fezes**

O método de PCR-RFLP desenvolvido tendo como alvo o domínio D1/D2 do gene 26S rDNA, foi considerado como um método eficiente para a confirmação de isolados de *C. guttulatus*. No entanto, devido à natureza universal dos iniciadores empregados na reação de PCR, ao se aplicar o procedimento às amostras fecais, este não

iria amplificar somente o DNA de *C. guttulatus* e sim o DNA de todas as leveduras presentes na amostra fecal que contém inúmeras espécies de leveduriformes. Para superar essa limitação, foi desenvolvida uma estratégia que permitiu a amplificação direta de um fragmento de DNA específico de *C. guttulatus* a partir do material fecal. A região escolhida como alvo foi o gene que codifica a subunidade 1 da enzima RNA polimerase II (*RPBI*) (código GenBank JQ713018). Essa sequência (2613 pb) foi submetida a uma busca no Blast (“Basic Local Alignment Search Tool”) para identificar sequências com pelo menos 75% de similaridade e 75% de cobertura. Essa busca retornou um total de 18 sequências: dois isolados de *Naumovozyma castellii*; três isolados de *Naumovozyma dairenensis*; um isolado de *Kazachstania unispora*; quatro isolados de *Torulaspota delbrueckii*; um isolado de *Kazachstania viticola*; um isolado de *Saccharomyces jurei*; quatro isolados de *Tetrapisispora phaffii*; um isolado de *Zygosaccharomyces kombuchaensis*; um isolado descrito como *Saccharomycetaceae* sp. e um isolado de *Wickerhamomyces anomalus*. Essas sequências foram baixadas no formato FASTA e alinhadas automaticamente usando o programa Sequencher 5.4.3 (GeneCodes), com o intuito de identificar regiões com pelo menos 25 nucleotídeos de comprimento exclusivos de *C. guttulatus*. Com base nesta análise, “primers” foram desenhados manualmente e posteriormente avaliados para uma série de características, incluindo temperatura de fusão, potencial para formação de grampos e dímeros, entre outras incompatibilidades, usando a ferramenta “PCR Primer Stats” disponível online no endereço eletrônico: ([http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr\\_primer\\_stats.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html)). Com base nos achados dessa análise, os seguintes “primers” foram sintetizados: RPB-F1 (5'-GGT TGG GAT TCG ATG AAG AG -3 ') como iniciador “forward” e RPB-R1 (5'- TTC CAA CCG TAC TGC AAC TG -3') com iniciador “reverse”. O tamanho do “amplicon” que seria gerado com essa combinação de “primers” foi estimado em 631 pb, baseado no alinhamento com a sequência de *C. guttulatus* depositada no GenBank com o código JQ713018.

### 3.10.1 Padronização dos Ensaio de PCR para *RPBI*

A concentração do cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ), assim como a temperatura de anelamento foram otimizadas com o uso de um gradiente de magnésio (2 mM; 2,5 mM e 3 mM) e outro de temperatura (50 °C até 60 °C), empregando três diferentes amostras de DNA (RC5, CC4 e RC8) de *C. guttulatus* como molde. Essa análise indicou que a melhor temperatura de anelamento seria 56 °C e a concentração de  $MgCl_2$  2,5 mM.

Para avaliar a sensibilidade desta PCR, quando comparada com a do gene 26S rDNA (descrito acima), três amostras de DNA purificados de cepas distintas de *C. guttulatus* (RC5, CC4 e RC8) foram diluídas em série ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ), em tampão AE. Em seguida, a sensibilidade da reação de PCR para 26S rDNA foi comparada com a da PCR para *RPBI* esta última utilizando-se a mesma diluição de DNA, nas seguintes condições da reação: 2  $\mu$ L de DNA, 1X tampão de reação; 200  $\mu$ M de cada dNTP, 2,5 mM de  $MgCl_2$ , 20 pmol de cada primer e 0,5 U de Go Taq G2 Flexi DNA polimerase (Promega) em um volume final de 25  $\mu$ L. As condições de ciclagem foram: uma desnaturação inicial de 94 °C por 5 min, seguidos de 35 ciclos 94 °C por 45 seg, 56 °C por 30 seg, 72 °C por 30 seg, e uma extensão final de 72 °C por 5 min. Para confirmar a presença dos “amplicons” com os tamanhos esperados (aproximadamente 631 pb), uma alíquota de 5  $\mu$ L de cada reação de PCR foi visualizada por eletroforese em gel de

agarose (2%), corado com brometo de etídio (2,5 µg/mL), e fotografado conforme descrito anteriormente.

A especificidade dos “primers” foi avaliada *in silico* empregando o software primerBLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e *in vitro*, usando as mesmas amostras de DNA de outras espécies de leveduras utilizadas na avaliação da técnica de PCR-RFLP do gene 26S rDNA, descrita acima.

### 3.10.2 Desenvolvimento de um Ensaio “Nested” PCR para a Detecção de *RPBI*

A sensibilidade reduzida do ensaio da PCR para *RPBI* quando comparada com a PCR para o gene 26S rDNA, foi considerada como uma possível limitação. Assim, na tentativa de aumentar a sensibilidade da detecção, sem prejudicar a especificidade do ensaio, foram desenhados “primers” internos seguindo os mesmos passos relatados no desenho dos “primers” externos. Através desta análise foi desenhado um par de “primers” internos; NF1-Rpol (5´- AGG AGG CTG AAA GTC TTC TG -3´) e NR1-Rpol (5´-TGC TCT CTT ACT GTA CCT C – 3´) que gerariam um produto de 395 pb.

As etapas de otimização e determinação de especificidade e sensibilidade do ensaio “nested” foram executadas seguindo os métodos descritos acima para o ensaio *RPBI* externo. Através deste procedimento o protocolo de amplificação foi desenvolvido utilizando 1 µL da PCR externa (“primers” RPB-F1 e RPB-R1) de PCR; 1X tampão de reação; 200 µM de cada dNTP, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 20 pmol de cada primer e 0,5 U de Go Taq G2 Flexi DNA polimerase (Promega) em um volume final de 25 µL. As condições de ciclagem foram: uma fase de desnaturação inicial de 94 °C por 5 min seguidos de 25 ciclos 94 °C por 35 seg, 52 °C por 20 seg, 72 °C por 20 seg, e uma extensão final de 72 °C por 5 min. Uma alíquota de 5 µL da reação de PCR foi examinada por eletroforese em gel de agarose (2%), corado com brometo de etídio (2,5 µg/mL), para confirmar a presença do “amplicon” esperado (395 pb).

### 3.11 Detecção de *Cyniclomyces guttulatus* Diretamente de Material Fecal Através da PCR *RPBI*

Com base nas análises descritas acima, os ensaios de PCR externo e “nested” para *RPBI* foram considerados como meios promissores para a detecção específica e sensível de *C. guttulatus*. No entanto, para ser utilizada como um método de diagnóstico haveria um requisito para determinar a capacidade destes ensaios em detectar o DNA de *C. guttulatus* em amostras extraídas de fezes. Para avaliar essa possibilidade, foi desenvolvida uma estratégia em duas etapas. Na primeira etapa, o ensaio foi avaliado usando amostras de fezes que foram adulteradas (“spiked”) através da adição de quantidades conhecidas de células de *C. guttulatus*. A segunda fase da avaliação empregou amostras fecais que foram identificadas por microscopia e / ou por cultura como positivas para *C. guttulatus*.

Os experimentos de “spiking” foram realizados da seguinte maneira: duas amostras de fezes foram coletadas de animais considerados saudáveis e avaliadas

microscopicamente como negativas para a presença de células morfológicamente compatíveis com *C. guttulatus*. Além disso, também foram submetidas a testes microbiológicos. Cada amostra fecal foi ressuspensa em um volume de 30 mL de PBS, para obter um concentração de 150 mg/mL. A suspensão fecal foi dividida em alíquotas (1 mL) entre 25 microtubos de 1,5 mL e tampa rosca (Sarstedt). Os tubos foram centrifugados (16.000 xg) por 10 min, para sedimentar as fezes e os sobrenadantes foram descartados. Os “pellets” contendo 150 mg de fezes foram armazenados a -20 °C.

O DNA foi extraído em duplicata de cada amostra, usando o *kit* comercial, e foi usado como alvo a PCR para o gene 26S rDNA e para os dois ensaios de *RPBI* (externo e “nested”). Conforme esperado, a amplificação positiva foi registrada no ensaio para 26S rDNA, mas nenhuma amplificação foi observada para o ensaio *RPBI*. Estes dados indicaram que ambas as amostras de fezes eram efetivamente negativas para *C. guttulatus* e como tal, poderiam ser empregadas nos experimentos de “spiking”.

A primeira rodada de experimentos determinou a capacidade dos ensaios para *RPBI* em detectar diferentes quantidades de células de *C. guttulatus*, testadas no formato de culturas puras ou quando misturadas com 150 mg de fezes de cão, após a extração de DNA usando o *kit* comercial. As células utilizadas nesta avaliação inicial foram produzidas descongelando uma cultura (CC4) de estoque em glicerol (contendo  $2 \times 10^7$  células / mL, quantificada como descrito acima), coletando as células por centrifugação e lavando-as duas vezes com PBS para remover o excesso de glicerol e em seguida, ressuspendendo em um volume final de 2 mL de PBS para atingir uma concentração de  $1 \times 10^7$  células / mL. Tubos em duplicata foram preparados contendo (A) 100 µL da suspensão de *C. guttulatus*, (B) 150 mg de fezes, ou (C) 150 mg de fezes mais 100 µL da suspensão de *C. guttulatus* para cada uma das amostras fecais, e o DNA foi extraído de acordo com o protocolo do fabricante do kit. O DNA extraído foi diluído por um fator de 10 ou 100 em tampão AE (Qiagen) e submetido a PCR 26S e *RPBI* (externa e “nested”). Os resultados deste ensaio indicaram que o kit comercial foi eficiente na extração do DNA de ambas as amostras e que todos os ensaios para *RPBI* geravam “amplicons” dos tamanhos esperados em amostras não diluídas e diluídas por um fator de 10, que foram “spiked” com  $1 \times 10^6$  células de *C. guttulatus*. Estes resultados indicaram que, pelo menos para as duas amostras fecais, não houve inibição aparente do ensaio.

A etapa seguinte de avaliação da detecção direta de *C. guttulatus* em fezes de cães constituiu em examinar um número maior (n = 15, incluindo as duas amostras empregadas na análise inicial), de amostras fecais (consideradas negativas para *C. guttulatus* por microscopia e cultura), e utilizando dois isolados de *C. guttulatus*, um de cachorro (CC8) e outro de coelho (RC18), no lugar das células congeladas utilizadas nos experimentos iniciais. A determinação da sensibilidade de detecção foi realizada usando preparações contendo quantidades diferentes de células ( $1 \times 10^6$  células / mL) ou ( $1 \times 10^4$  células / mL), produzidas através de uma cultura com 48 hrs de crescimento em caldo YPG. O procedimento empregado foi essencialmente o mesmo que o descrito acima. Assim, vários tubos contendo 150 mg de cada amostra fecal foram preparados e armazenados a -20 °C. Tubos para cada um dos grupos teste foram montados em duplicata para cada uma das culturas de *C. guttulatus* (A) 150 mg de fezes mais 100 µl de suspensão da cepa CC8 ( $1 \times 10^6$  células / mL); (B) 150 mg de fezes mais 100 µl de suspensão da cepa CC8 ( $1 \times 10^4$  células / mL); (C) 150 mg de fezes mais 100 µL de suspensão da cepa RC18 ( $1 \times 10^6$  células / mL), (D) 150 mg da fezes mais 100 µL de

suspensão da cepa RC18 ( $1 \times 10^4$  células / mL) e (E) 150 mg de fezes. O DNA foi extraído de cada amostra e examinado (sem diluição) na PCR para o gene 26S rDNA e nos dois ensaios de PCR para *RPB1*.

Outra etapa da avaliação do ensaio *RPB1* envolveu a extração de DNA de uma coleção de amostras fecais ( $n = 10$ ) derivadas de cães considerados positivos para a presença de *C. guttulatus* com base em evidências microscópicas, mas negativos para cultura (exceto a amostra CC8, que foi positiva). Este conjunto de amostras clínicas também incluiu uma amostra fecal coletada após tratamento com antifúngicos do cão Nina que em amostras prévia foi positivo para cultura (CC8). A amostra pós-tratamento foi considerada negativa para *C. guttulatus*, com base em análises de microscopia e na cultura em YPG. O DNA dessas amostras foi extraído em duplicata, a partir de 150 mg de cada amostra fecal, e foi empregado em duas concentrações: (A) não diluído ou (B) diluído por um fator de 10. Cada amostra foi examinada através dos ensaios de PCR para o gene 26S rDNA e nos ensaios de PCR para *RPB1*.

Os “amplicons” detectados neste experimento foram sequenciados para confirmar sua identidade. No entanto, com o propósito de reduzir os custos associados à análise pós-amplificação das amostras positivas, foram desenvolvidas estratégias de PCR-RFLP para os “amplicons” gerados pelos dois ensaios com *RPB1* como alvo. Os procedimentos usados no desenvolvimento dos sistemas do PCR-RFLP para *RPB1*, foram os mesmos descritos acima para o sistema PCR-RFLP para 26S rDNA. As enzimas identificadas, por análise *in silico*, como sendo adequadas para os ensaios *RPB1* foram *HindIII*, *MspI* e *RsaI*.

### **3.12 Amplificação e Sequenciamento de Múltiplos Marcadores Moleculares para a Caracterização dos Isolados de *Cyniclomyces guttulatus***

As sequências dos genes para a subunidade menor do ribossomo 18S rRNA, subunidade 2 do gene mitocondrial citocromo C oxidase (*COII*), e as subunidades 1 e 2 da RNA polimerase II (*RPB1* e *RPB2*), bem como da região espaçadora interna transcrita (ITS1-5.8S-ITS2) foram amplificados por PCR utilizando os iniciadores e as condições de ciclagem fornecidas na tabela 4. Os procedimentos de sequenciamento e as análises comparativas foram executados conforme descrito acima para os “amplicons” de 26S rDNA.

**Tabela 4.** Iniciadores, mistura para PCR e condições do ciclo da PCR utilizado para amplificação dos alvos, 18S rDNA, COII ITS 1 e 2, *RPB2*, *COII* e *RPB1*.

Alvo e Tamanho do Produto	Iniciadores (primers)	Mistura para PCR	Condições da PCR	Referências
<b>18S DNA ribossomal</b> (≈ 1755bp)	Primer Forward <b>5'-GTAGTCATATGCTTGGTCTC-3'</b>  Primer Reverse <b>5'-CCTTCCGCAGGTTACCTACGG-3'</b>	1x Tampão 3 mM MgCl <sub>2</sub> 200 μM dNTPs 10 μM cada iniciador 0,5 U GoTaq G2 Flexi DNA polimerase <b>2 μL do DNA</b>	Ativação de Taq a 94°C por 5 min. <b>35 ciclos:</b> Desnaturação a 94°C por 1min, Anelamento a 58°C por 30 seg e Extensão a 72°C por 30 seg. Extensão final a 72°C por 5 min.	Kurtzman e Robnett (2013) (com adaptações)
<b>ITS DNA ribossomal</b> (≈ 750bp)	Primer Forward <b>5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'</b>  Primer Reverse <b>5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'</b>	1x Tampão 3 mM MgCl <sub>2</sub> 200 μM dNTPs 10 μM cada iniciador 0,5 U GoTaq G2 Flexi DNA polimerase <b>2 μL do DNA</b>	Ativação de Taq a 94°C por 5 min. <b>35 ciclos:</b> Desnaturação a 94°C por 1min, Anelamento a 58°C por 30 seg e Extensão a 72°C por 30 seg. Extensão final a 72°C por 5 min.	Schoch et al. (2012) (com adaptações)
<b><i>RPB2</i></b> (≈ 680bp)	Primer Forward <b>5'-GTTGGTACAGATCCGATGCC-3'</b>  Primer Reverse <b>5'-CACCCATAGCTTGCTTACC-3'</b>	1x Tampão 2 mM MgCl <sub>2</sub> 200 μM dNTPs 10 μM cada iniciador 0,5 U GoTaq G2 Flexi DNA polimerase <b>2 μL do DNA</b>	Ativação de Taq a 94°C por 5 min. <b>35 ciclos:</b> Desnaturação a 94°C por 1min, Anelamento a 51°C por 30 seg e Extensão a 72°C por 30 seg. Extensão final a 72°C por 5 min.	Kurtzman e Robnett (2013) (com adaptações)
<b><i>COII</i></b> (≈ 590bp)	Primer Forward <b>5'-ATTTATTGTCRTTTTAATCA-3'</b>  Primer Reverse <b>5'-GGTATTTTAGAATTACATGA-3'</b>	1x Tampão 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> 200 μM dNTPs 10 μM cada iniciador 0,5 U GoTaq G2 Flexi DNA polimerase <b>2 μL do DNA</b>	Ativação de Taq a 94°C por 5 min. <b>6 ciclos</b> constituídos por: Desnaturação a 94°C por 30seg, Anelamento a 47°C por 15 seg e Extensão a 72°C por 30 seg. E mais <b>34 ciclos</b> de: Desnaturação a 94°C por 15seg, Anelamento a 51°C por 15 seg e Extensão a 72°C por 20 seg. Extensão final a 72°C por 5 min.	Kurtzman e Robnett (2013) (com adaptações)

Continua

**Tabela 4.** Iniciadores, mistura para PCR e condições do ciclo da PCR utilizado para amplificação dos alvos, 18S rDNA, COII ITS 1 e 2, *RPB2*, COII e *RPBI* (continuação).

Alvo e Tamanho do Produto	Iniciadores (primers)	Mistura para PCR	Condições da PCR	Referências
<b><i>RPBI</i> externo (≈ 700bp)</b>	Primer Forward F1 <b>5'-GGTTGGGATTCGATGAAGAG-3'</b>  Primer Reverse R1 <b>5'-TTCCAACCGTACTGCAACTG-3'</b>	1x Tampão 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> 200 μM dNTPs 20 μM cada iniciador 0,5 U GoTaq G2 Flexi DNA polimerase <b>2 μL do DNA</b>	Ativação de Taq a 94°C por 5 min. <b>35 ciclos</b> constituídos por: Desnaturação a 94°C por 15 seg, Anelamento a 56°C por 20 seg e Extensão a 72°C por 20 seg. Extensão final a 72°C por 5 min.	Este trabalho
<b><i>RPBI</i> nested (≈ 400bp)</b>	Primer Forward <b>5'- AGGAGGCTGAAAGTCTTCTG-3'</b>  Primer Reverse <b>5'-TGCTCTCTTACTGTACCTC-3'</b>	1x Tampão 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> 200 μM dNTPs 20 μM cada iniciador 0,5 U GoTaq G2 Flexi DNA polimerase <b>2 μL do DNA</b>	Ativação de Taq a 94°C por 5 min. <b>25 ciclos</b> constituídos por: Desnaturação a 94°C por 15 seg, Anelamento a 52°C por 20 seg e Extensão a 72°C por 20 seg. Extensão final a 72°C por 5 min.	Este trabalho

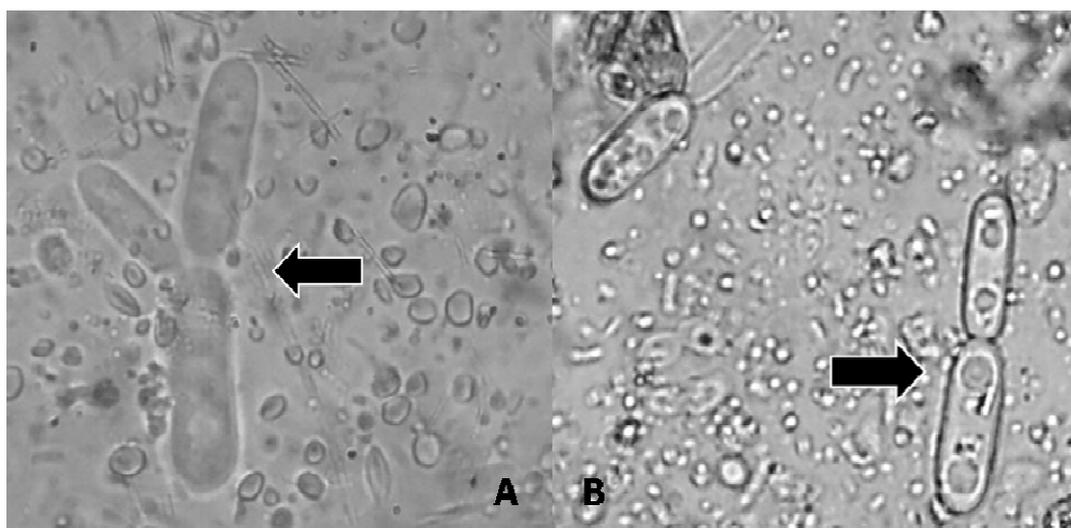
## 4. Resultados

Os resultados apresentados estão divididos em três seções. Primeiramente, são apresentados os dados dos métodos dependentes de cultura, em combinação com a análise molecular (PCR, sequenciamento e PCR-RFLP), utilizando o domínio D1/D2 do gene 26S rDNA como alvo de uma abordagem para o estudo da interação entre *C. guttulatus* e seus hospedeiros. Em seguida, são apresentados os dados associados ao desenvolvimento de métodos para a detecção direta (independente de cultura) e caracterização de *C. guttulatus* em amostras fecais de cães. A terceira seção apresenta os dados de uma análise molecular interisolados, focando nas variações das sequências de diferentes marcadores.

### 4.1 Seção 1. Métodos Dependentes de Cultura

#### 4.1.1 Análise Microscópica das Fezes de Cães, Coelhos e Porquinho-da-Índia

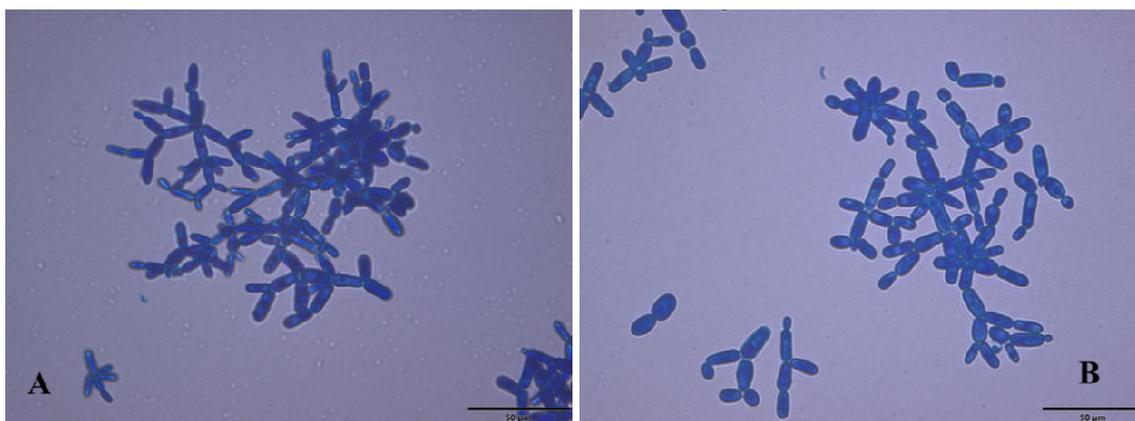
Um total de 17 amostras fecais (tabela 3) coletadas de cães (entre 2011-2019), com a colaboração de veterinários, foram analisadas por meio de microscopia óptica, sendo confirmadas como positivas para células com morfologia compatível com a descrição de *C. guttulatus* (figura 1a e 1b). Uma única amostra de fezes de porquinho-da-índia e 19 amostras de fezes de coelho (tabela 1) também foram identificadas como positivas para a presença de células de *C. guttulatus*. Por outro lado, a análise microscópica de um total de 15 amostras fecais de cães saudáveis (tabela 2) e cedidas por seus tutores, não apresentaram evidências da presença de células de *C. guttulatus*.



**Figura 1.** A - suspensão de fezes do cão (Carmella) com a presença de células de *Cyniclomyces guttulatus*, seta indicando pseudo-hifas nas fezes; B - suspensão de fezes de cão (Lessie) onde são visualizados os ascósporos (morfologia de caixa de óculos, apontado pela seta).

#### 4.1.2 Isolamento, Cultura e Manutenção das Leveduras

O crescimento de células com morfologia compatível com *C. guttulatus* foi observado em caldo YPG na amostra de fezes de porquinho-da-índia e em 19 das 19 amostras (100%) de fezes de coelhos. No caso das amostras de cães coletadas pelos veterinários, 8 das 17 amostras (47%) apresentaram cultura positiva para células com morfologia compatível com *C. guttulatus* (figuras 2a e 2b). O restante das amostras de cães (n = 9) apresentaram um crescimento excessivo de bactérias mesmo com a adição de ampicilina e estreptomicina ao meio.



**Figura 2.** Culturas de *Cyniclomyces guttulatus* após 48hrs de crescimento, visualizadas por microscopia óptica após coloração com azul de lactofenol. A – cultura proveniente da suspensão de fezes de cão (CC8) e cultura proveniente da suspensão de fezes de coelho (RC18).

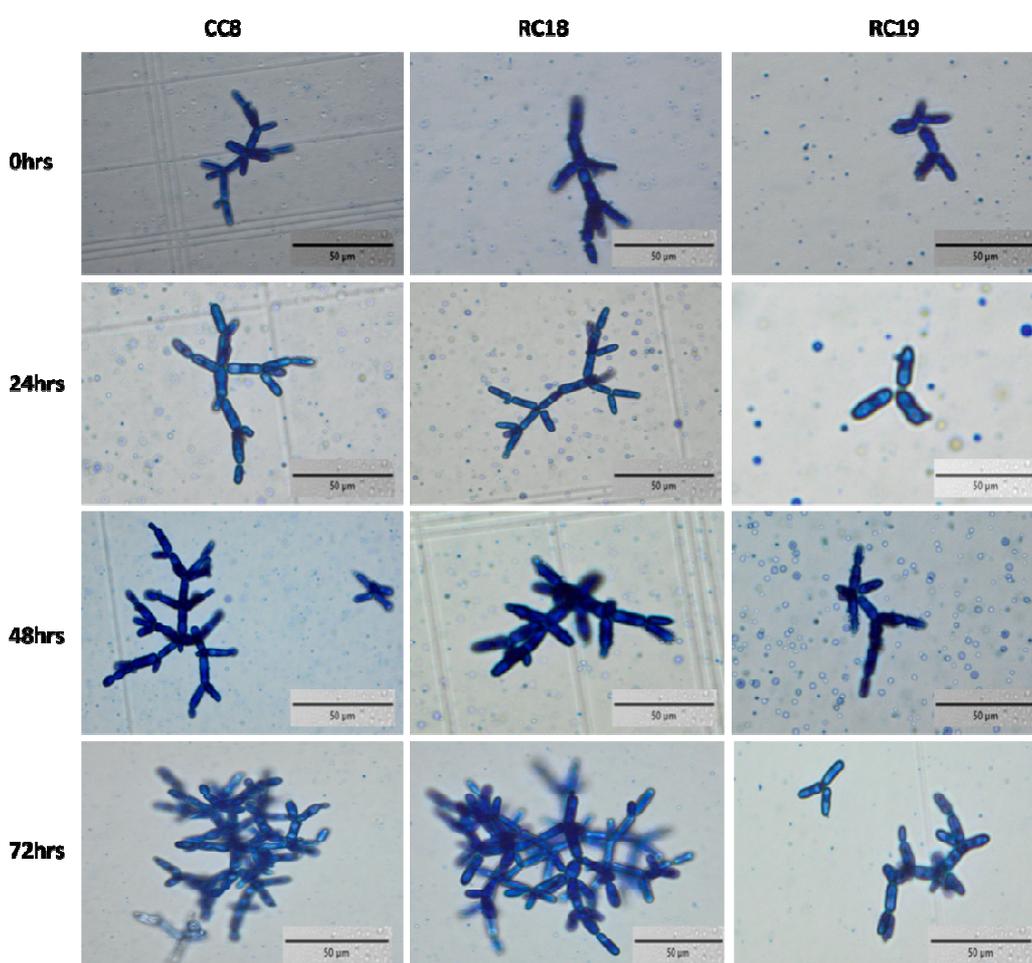
Uma única amostra coletada em 2019 (Nina) não apresentou crescimento a partir da suspensão de fezes em solução salina enviada pelos veterinários. Contudo, as fezes congeladas no momento da coleta e descongeladas posteriormente na chegada ao laboratório foram positivas na cultura para *C. guttulatus*. A amostra coletada deste mesmo animal após o tratamento com antifúngicos (Nina pós) foi considerada negativa ao exame microscópico e não apresentou crescimento de células de *C. guttulatus*.

Repiques das culturas em caldo foram feitos em placas com YPGA e produziram colônias com a morfologia compatível com *C. guttulatus* (FLAUSINO; BARONI, 2009), após 72 hrs de incubação. Contudo, no caso de três amostras de coelhos (RC10, RC16, RC17), colônias com morfologia ligeiramente diferente (atípicas) foram observadas após cinco dias, sem a presença de colônias com a morfologia esperada. A mesma morfologia atípica das colônias foi observada posteriormente em outro coelho (RF19), junto com colônias que apresentavam a morfologia esperada (típica) para *C. guttulatus*. Novamente, a colônia atípica foi observada após cinco dias de incubação enquanto as colônias típicas foram observadas em 72 hrs de incubação. As colônias com morfologia atípica não foram observadas em nenhuma das culturas provenientes das amostras de cães.

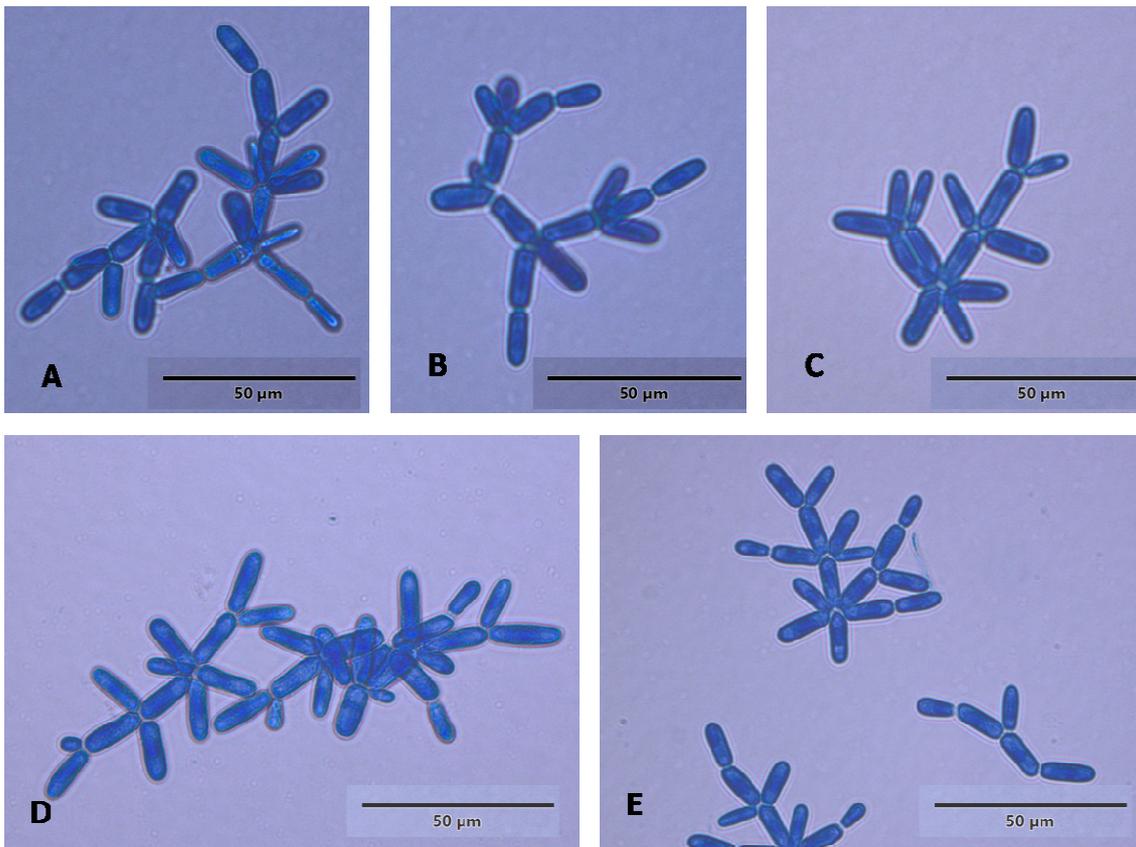
Foram realizadas subculturas das colônias (típicas e atípicas) em YPGA que produziram culturas puras que foram utilizadas para produzir estoques de culturas em YPG suplementado com glicerol (17% v/v) e armazenados a -20 °C. Não foi obtido sucesso na tentativa de recuperar as culturas a partir desses estoques em glicerol, apesar da observação de elevados números de células íntegras ao exame microscópico. A

manutenção das culturas em YPG por um longo período (oito meses) se mostrou viável com o armazenamento a 4 °C, para a cultura (CC8) obtida a partir do cão Nina, e para os dois tipos de colônias (RC18 e RC19), obtidas a partir do coelho (RF19). Colônias em YPGA dos mesmos isolados, armazenados a 4 °C, permaneceram viáveis por seis meses.

Imagens da morfologia das células ao longo do crescimento por 72 hrs para os isolados de cão (CC8) e coelho (RC18 e RC19) representando as colônias de morfologia típica e atípica recuperadas de coelho (RF19) são mostradas na figura 3. Em apoio às observações feitas nas placas YPGA, o crescimento em meio líquido de células derivadas das colônias atípicas foi mais lento do que o observado nas células das colônias com morfologia típica.



**Figura 3.** Comparação do crescimento em YPG das colônias típicas (CC8 e RC18) e atípica (RC19) de *Cyniclomyces guttulatus* oriundas de cão e coelho durante 24 hrs, 48 hrs e 72 hrs. Células visualizadas sob microscopia óptica após coloração com azul de lactofenol.

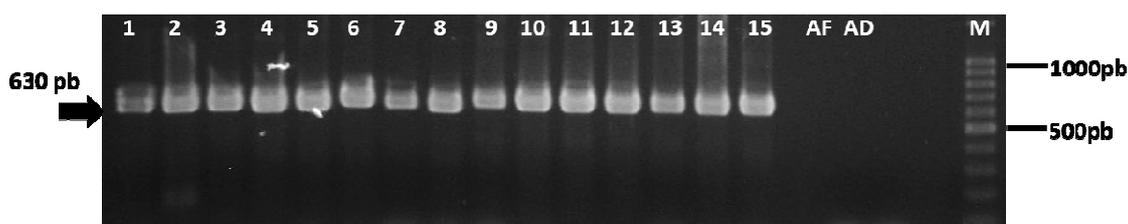


**Figura 4.** Comparação da morfologia celular de *Cyniclomyces guttulatus* (CC8) cultivada em caldo YPG suplementado com diferentes antibióticos. A- YPG padrão com ampicilina (100 µg/mL) e estreptomicina (20 µg/mL); B- YPG com cloranfenicol 50 µg/mL; C- nitrofurantoina 50 µg/mL; D- oxitetraciclina 50 µg/mL; E- rifampicina 50 µg/mL. Células coradas com azul de lactofenol e visualizadas sob microscopia óptica aumento após 48 hrs de crescimento.

Na figura 4, podemos observar que a inclusão de um antibiótico (cloranfenicol, nitrofurantoina, oxitetraciclina ou rifampicina) na concentração de 50 µg/mL ao caldo YPG (rotineiramente suplementado com ampicilina e estreptomicina) não interferiu no crescimento e na morfologia das células de nenhum dos isolados analisados.

#### 4.1.3 Análise Molecular das Culturas de *Cyniclomyces guttulatus* Utilizando o Domínio D1/D2 do Gene 26S rDNA como Alvo

Foi obtido um produto com o tamanho de aproximadamente 630 pb para todas as culturas (n = 29), previamente identificadas como *C. guttulatus* baseado na análise microscópica das culturas em YPG. Os resultados obtidos na amplificação podem ser visualizados na figura 5, onde podemos ver a amplificação de uma amostragem representativa das amostras analisadas (n = 14) assim como controles positivos e negativos.



**Figura 5.** Produto da amplificação por PCR do gene 26S rDNA para uma amostragem (n=14) de isolados previamente identificados como *Cynicomyces guttulatus*. Coluna 1 – GPC1; Colunas 2-9 isolados de coelho (FBC, RC1, RC2, RC3, RC16, RC17, RC18 e RC19); Colunas 10-14 isolados de cães (CC1, CC2, CC6, CC7, CC8); Coluna 15 controle positivo (*Sacharomyces cerevisiae*); Controles negativos: AF (água fora) e AD (água dentro); M=100 pb marcador de peso molecular. As posições das bandas correspondentes a 100 e 500 pb estão indicadas ao lado direito da imagem. A posição de 630 pb esperada para o “amplicon” do gene 26S rDNA está indicada ao lado esquerdo da foto pela seta.

#### 4.1.4 Análise das Sequências dos “amplicons” 26S rDNA

O sequenciamento dos “amplicons” de 630 pb obtidos para um único isolado de porquinho-da-índia, 20 isolados de coelho (16 com colônias típicas e quatro com colônias atípicas) e oito isolados de cães foram separados em quatro grupos denominados “Sequence Types” (ST1, ST2, ST3 e ST4) de acordo com a similaridade encontrada nas sequências (tabela 5). Os grupos ST1 (n = 10), ST2 (n = 12) e ST3 (n = 3) foram vistos tanto em cães como em coelhos (colônias com morfologia típica), e a sequência de porquinho-da-índia foi agrupada em ST2. O grupo ST4 abrange quatro sequências dos isolados de coelhos que apresentaram a morfologia atípica da colônia. A maioria dos isolados de coelho (10 / 20) foi identificada como ST2, e um único isolado (RC8) foi identificado como ST3. Em contrapartida, o grupo ST1 predominou nos isolados de cães (5 / 8) com um único isolado (CC4) identificado como ST2 e dois isolados (CC1 e CC7) representando o grupo ST3.

**Tabela 5.** Agrupamento dos isolados de *Cynicomyces guttulatus* baseado no sequenciamento e alinhamento dos “amplicons” 26S rDNA (@590pb após a remoção dos “primers” das sequências).

Código dos Isolados	“Sequence type”
RC1, RC3, RC4, RC5, RC18, CC2, CC3, CC5, CC6, CC8 (n=10)	ST1
GP1*, FBC*, RC2, RC6, RC7, RC9, RC11, RC12, RC13, RC14, RC15, CC4 (n= 12)	ST2
RC8, CC1, CC7 (n=3)	ST3
RC10, RC16, RC17, RC19 (n=4)	ST4

\*Previamente sequenciado pelo nosso grupo e depositados no GenBank com os números de acesso KC484339 (GP1) e JQ861267 (FBC).

Nenhum dos isolados apresentou 100% de similaridade com a sequência (número de acesso GenBank JQ689012), proveniente da cepa tipo de *C. guttulatus* (NRRL Y-17561), isolada de um coelho nos EUA (KURTZMAN; ROBNETT, 2013). Em vez disso, a análise do BlastN mostrou que as sequências de ST1 tinham 98,5% de similaridade (9 diferenças entre os 591 nucleotídeos), enquanto as sequências ST3 tinham 98,5% de similaridade com a sequência da cepa tipo (JQ689012). As sequências ST1 e ST3 eram bem similares entre si (99%, seis nucleotídeos de diferença entre os 591pb). As sequências do grupo ST2 de coelhos apresentaram uma baixa similaridade (96,8%, 25 diferenças entre os 589 nucleotídeos) para a cepa tipo (JQ689012) e foram idênticas às sequências (KC484339) e (JQ861267) previamente depositadas por nosso grupo no GenBank (FLAUSINO et al., 2012). A sequência ST2 obtida do isolado de cão (CC4) foi levemente diferente das obtidas pelos coelhos, especificamente ela teve o tamanho de 590 pb, devido à ausência de uma deleção de nucleotídeo observada nos isolados de coelho e porquinho-da-índia.

Um menor grau de similaridade dos nucleotídeos (90,6%, 57 diferenças entre os 590 nucleotídeos) foi observado entre o grupo ST4 e a cepa tipo (JQ689012). O grau de similaridade entre ST2 e ST4 foi um pouco mais alto (92,6%, 44 nucleotídeos de diferença entre os 590). Os resultados do BlastN para ST4 mostraram um valor de 99% de similaridade com uma região de 464 nucleotídeos (especificamente os nucleotídeos 1519-1918), que representam uma sequência parcial do terminal 5' do gene 26S rDNA, incluído como parte da sequência EU753976 (tamanho de 1981 nucleotídeos). A sequência EU753976 foi depositada no GenBank como um ascomiceto não cultivado que estava presente nas fezes de *Pygathrix nemaeus nemaeus*, um primata, criado em cativeiro no zoológico de San Diego, Califórnia, EUA. As outras sequências similares, com valores próximos de 82% eram de membros dos gêneros *Zygosaccharomyces* e *Kazachstania*.

As análises das variações de nucleotídeos (considerada como a avaliação do número e da posição das bases em uma dada sequência ou grupo de sequências, relativa aos mesmos aspectos em uma sequência utilizada como referência) foram realizadas utilizando a função “Variance Table” no programa Sequencer (GeneCodes).

Os dados da análise comparativa das variações de nucleotídeos entre os grupos ST1, ST2 e ST3, usando como referência a sequência (JQ639012), são mostrados na tabela 6. Observou-se que as diferenças em cinco nucleotídeos (começando no nucleotídeo 184 e terminando no nucleotídeo 422) foram comuns entre os grupos ST1 e ST3 e que quatro dessas diferenças também foram observadas no grupo ST2. Além disso, foi observado que três dos quatro nucleotídeos diferentes observados no grupo ST1 também estavam presentes no grupo ST2. A quarta diferença (uma substituição de C por A na posição 512) não foi observada no grupo ST2. No entanto, o grupo ST2 mostrou uma substituição de nucleotídeo (T por A) na mesma posição. As outras duas diferenças encontradas no grupo ST3, em comparação com a cepa tipo (JQ689012) e ST1, também foram encontradas no grupo ST2. Os isolados de coelho e porquinho-da-índia, dentro do grupo ST2, mostraram um total de 14 substituições únicas, quando comparados com ST1, ST3 e a cepa tipo (JQ689012) e duas deleções, o que justificou o tamanho menor da sequência (589 pb).

No caso do isolado de cão CC4, também agrupado como ST2, o tamanho maior da sequência (590 pb) foi atribuído à permanência da guanidina (G) na posição 546 (tabela 7). Outra diferença foi a substituição da citosina (em todas as outras sequências de ST2), por uma timina na posição 531.

**Tabela 6.** “Variance Table” comparando as sequências (@590 pb), do domínio D1/D2 do gene 26S rDNA amplificado dos isolados de *Cyniclomyces guttulatus* (ST1, ST2 e ST3) e da sequência (JQ689012) cepa tipo (NRRL Y-17561).

Top Sequence	USA	RST2	GPST2	DST2	ST1	ST3	Total	
19	C		T	T	T		3	
69	G		T	T	T		3	
70	A		T	T	T		3	
112	G		A	A	A		3	
173	C		T	T	T	T	4	
176	A		T	T	T		3	
177	G		C	C	C	C	4	
179	C		:	:	:		3	
181	C		T	T	T		3	
184	N		C	C	C	C	5	
197	G		A	A	A		3	
405	C		T	T	T	T	4	
412	T		C	C	C	C	5	
419	T		:	:	:		3	
420	C					T	2	
421	A		C	C	C	C	5	
422	T		C	C	C	C	5	
469	G		T	T	T		3	
477	C		T	T	T		3	
487	T		C	C	C	C	4	
511	T		C	C	C	C	4	
512	C		T	T	T	A	4	
515	C		G	G	G		3	
523	G		A	A	A		3	
533	C				T		1	
546	:		A	A	A		3	
547	G			:			1	
548	G		:				1	
<b>Total</b>		<b>0</b>	<b>25</b>	<b>25</b>	<b>25</b>	<b>9</b>	<b>7</b>	<b>91</b>

”Top sequence” = USA = cepa tipo; RST2 = isolado de coelho do grupo ST2; GPST2 = isolado de porquinho-da-índia do grupo ST2; DST2 = isolado de cão do grupo ST2; ST1 = isolado do grupo ST1; ST3 = isolado do grupo ST3. Os números apresentados na primeira coluna (lado esquerdo) indicam a posição do nucleotídeo (baseado na sequência de referência) onde a variação foi registrada. As letras na segunda coluna são os nucleotídeos encontrados na posição (baseado na sequência de referência); o símbolo “:” indica que não havia nucleotídeo naquela posição. Os números da última coluna (lado direito) mostram o número de sequências comparadas que tiveram variação na posição indicada na segunda coluna. O total de diferenças encontrados em cada sequência é mostrado na última linha da tabela.

**Tabela 7.** Comparação da sequência derivada do isolado de cão (CC4) do grupo ST2 com as sequências obtidas para os outros membros do grupo ST2 (GPC1 e isolados recuperados de coelhos).

Top Sequence		DST2	RST2	GPST2	Total
531	T		C	C	2
546	G		:	:	2
Total		0	2	2	4

“Top sequence” = DST2 (isolado canino - CC4) grupo ST2; RST2 (isolados de coelho, grupo ST2); GPST2 (isolado do porquinho da índia, grupo ST2).

Uma comparação entre os isolados do grupo ST3 mostrou que o isolado CC1 recuperado do cão Husky em 2011 e o isolado CC7 recuperado do cão November em 2014 demonstraram 100% de similaridade com o único isolado (RC8) oriundo de coelho e agrupado como ST3 (tabela 8). A análise de variância entre os isolados de cães dos grupos ST1 e dos isolados de coelhos também do grupo ST1, quando comparados com as sequências do grupo ST3 mostrou que os isolados CC2 e CC3 (ST1) isolados de dois cães em 2012 (FURTADO et al., 2013) foram idênticos e mostraram apenas dois nucleotídeos de diferença quando comparados às sequências dos isolados de coelho do mesmo grupo (ST1) tendo 99,7% de similaridade. Os isolados CC5 e CC6 (Lalá e Thor), ambos recuperados de cães em 2013 também apresentaram alto grau de similaridade (99,8%) com os outros isolados do grupo ST1 apresentando apenas uma única substituição (C por T) na posição 477 (tabela 8). A sequência obtida do isolado CC8 (ST1) foi idêntica às sequências obtidas dos isolados de coelho.

**Tabela 8.** Comparação da variação de nucleotídeos entre as sequências obtidas dos isolados de cães dos grupos ST1 e ST3 com as sequências obtidas dos isolados ST1 e ST3 derivadas de coelho.

Top Sequence	CC1 ST3	CC7 ST3	RC8 ST3	CC2 CC3	CC5 CC6	ST1	Total
173	T			C	C	C	3
177	C			G	G	G	3
405	C				T	T	2
450	T			C			1
477	C				T		1
487	T			C	C	C	3
511	T			C	C	C	3
512	C			A	A	A	3
Total	0	0	0	6	7	6	19

CC1, CC7 e RC8 (grupo ST3); CC2, CC3, CC5, CC6 (grupo ST1 isolados de cães); ST1 = isolados oriundos de coelho e CC8 (isolado do cão Nina).

Além das análises da variação de nucleotídeos realizadas entre as sequências deste estudo e da sequência (JQ689012), proveniente da cepa tipo (NRRL Y-17561), as sequências também foram comparadas com uma sequência de 533 pb (número de acesso no GenBank FJ755179) depositada por pesquisadores da Noruega em 2009. Este isolado de *C. guttulatus* foi recuperado a partir de fezes diarreicas de um cão e, além do isolado depositado pelo nosso grupo, é o único proveniente de cão no GenBank para *C. guttulatus*. Como mostrado na tabela 9, os isolados de origem de cão do grupo ST3 (CC1 e CC7) tiveram oito nucleotídeos de diferença quando comparados com a sequência do cão da Noruega, o que equivale a 98,4% de similaridade.

**Tabela 9.** Comparação entre as sequências do Grupo ST3 (provenientes de cão e de coelho) com a sequência FJ755179 (isolado canino de *Cyniclomyces guttulatus* da Noruega).

Top Sequence		FJ755179	CC1	CC7	RC8	Total
149	C		T	T	T	3
153	G		C	C	C	3
381	T		C	C	C	3
445	T		G	G	G	3
453	T		C	C	C	3
463	C		T	T	T	3
487	C		T	T	T	3
488	A		C	C	C	3
<b>Total</b>		<b>0</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>24</b>

FJ755179 (isolado de cão da Noruega); CC1 e CC7 (isolados de cão do grupo ST3); RC8 (isolado de coelho do grupo ST3).

Os dados referentes à variabilidade de nucleotídeos, obtidos através da comparação da sequência norueguesa com as sequências obtidas dos isolados de cães brasileiros (CC2, CC3, CC5 e CC6) do grupo ST1 estão apresentados na tabela 10. Foi observado que, no caso dos isolados recuperados em 2012 (CC2, CC3), houve uma diferença de quatro nucleotídeos quando comparados com a sequência da Noruega, o que corresponde a 99,2% de similaridade. Um grau de similaridade maior (99,8%) foi observado no caso dos isolados CC5 e CC6 (recuperados em 2013), que apresentaram apenas um nucleotídeo de diferença para a sequência da Noruega. As sequências dos isolados de coelhos obtidas dos isolados do grupo ST1 e o isolado de cão de 2019 (CC8) apresentou uma diferença de dois nucleotídeos. Assim sendo, o isolado de origem norueguesa foi considerado representativo do grupo ST1.

**Tabela 10.** Comparação da variação de nucleotídeos entre a sequência de cão da Noruega (FJ55179) e as sequências obtidas dos isolados de coelho e cão do grupo ST1.

Top Sequence		FJ755179	ST1	CC5 CC6	CC2 CC3	Total
381	T				C	1
426	T				C	1
445	T		G	G	G	3
453	T		C		C	2
Total		0	2	1	4	7

FJ755179 (isolado de cão da Noruega); ST1 (isolados de coelhos e isolado de cão CC8); CC5 e CC6 (isolado de cão 2013) grupo ST1; CC2 e CC3 (isolados de cão 2012) grupo ST1.

#### 4.1.5 PCR-RFLP para a Identificação dos Isolados de *Cyniclomyces guttulatus*

Foram realizadas análises *in silico* preliminares com as sequências obtidas para o gene 26S rDNA (“amplicons” de aproximadamente 630 pb, incluindo os “primers”) e os resultados destas indicaram que as enzimas de restrição *DdeI*, *HaeIII* e *MspI* poderiam ser utilizadas para a identificação dos isolados de *C. guttulatus* quando comparados com as outras leveduras comumente encontradas nas fezes de cães de acordo com os padrões de bandas gerados pela digestão com as enzimas de restrição. Os resultados dessas análises *in silico* são mostrados na tabela 11. Pode-se observar que, utilizando a enzima *DdeI*, cada ST geraria um padrão de banda de aproximadamente 326, 163 e 73 pb. No caso de ST1 e ST3 existe uma banda adicional de 71 pb também seria digerida, porém não seria possível sua distinção da banda de 73 pb. Todavia, no caso de ST2 e ST4 a presença de um sítio de restrição adicional dentro da banda de 71 pb resultou na produção de bandas de 42 e 29 pb (tabela 11). Assim sendo, essa enzima mostrou potencial para a identificação diferencial entre ST1 e ST3 de ST2 e ST4.

Em comum com a enzima *DdeI*, é possível observar que a digestão com a enzima *HaeIII* também permitiria a distinção dos isolados de *C. guttulatus* quando comparado com outras espécies de leveduras. Além disso, a digestão com essa enzima produz um perfil único para o grupo ST4 que claramente separaria este dos outros ST’s (tabela 12). Essa enzima também mostrou potencial para separar ST2 em comparação com ST1 e ST3.

No caso da enzima *MspI* a capacidade de distinguir *C. guttulatus* das outras espécies de leveduras foi claramente observada. Como as outras duas enzimas, *MspI* também gerou padrões que permitiam diferenciar os ST’s de *C. guttulatus* das outras leveduras. Os ST1, ST2 (de coelho e porquinho-da-índia) e ST3 geraram padrões idênticos enquanto ST2 proveniente de cão (CC4) gerou um padrão único e fácil de identificar. O “amplicon” de ST4 possui um sítio de restrição adicional, gerando duas bandas, uma menor (de 21 pb) e a outra maior para 365 pb, em contraste a banda de 388 ou 386 pb observada em ST1, ST2 (coelhos e porquinho-da-índia) e ST3 (tabela 11).

**Tabela 11.** Padrões de bandas gerados de acordo com as análises *in silico*, utilizando o produto da PCR 26S rDNA (domínio D1/D2) digerido com as enzimas *DdeI*, *HaeIII* e *MspI* no Programa NebCutter 2.0 (New England Biolabs).

Sequência/Enzima	<i>DdeI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>MspI</i>	Tamanho do fragmento (pb)
<i>Cyniclomyces guttulatus</i> NRRL Y-17561 (JQ689012.1)	327, 164, 72, 71 pb	461, 173 pb	388, 96, 78, 40, 32 pb	634
ST1	327, 164, 72, 71 pb	461, 173 pb	388, 96, 78, 40, 32 pb	634
ST2 Coelho	326, 163, 72, 42, 29 pb	441, 173, 18 pb	386, 96, 78, 40, 32 pb	632
ST2 Cão	326, 163, 73, 42, 29 pb	441, 174, 18 pb	465, 96, 40, 32 pb	633
ST3	327, 164, 72, 71pb	461, 173 pb	388, 96, 78, 40, 32 pb	634
ST4 Coelho	325, 164, 73, 42, 29 pb	266, 141, 100, 93, 33 pb	365, 96, 79, 40, 32, 21 pb	633
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (LC334458.1)	293, 211, 69, 42 pb	322, 160, 133 pb	583, 32 pb	615
<i>Candida parapsilosis</i> (NG054833.1)	284, 212, 75, 52, 6 pb	443, 111, 57, 18 pb	457, 172 pb	629
<i>Candida tropicalis</i> (MK691414.1)	290, 212, 69, 42 pb	227, 206, 162, 18 pb	613 pb	613
<i>Rhodotorula</i> spp. (AB893596.1)	536, 50, 47 pb	445, 120, 68 pb	431, 133, 69 pb	633
<i>Candida albicans</i> (MH891781.1)	360, 212, 42 pb	301, 163, 132, 18 pb	245, 167, 134, 68 pb	614
<i>Malassezia pachydermatis</i> (KY108421.1)	226, 189, 176, 50 pb	621, 20 pb	--	641
<i>Kazachstania pintolopesii</i> (KY107940.1)	293, 211, 69, 42 pb	455, 80, 61, 19 pb	443, 130, 32, 10 pb	615
<i>Pichia kudriavzevii</i> (KU167717.1)	339, 197, 42, 29 pb	237, 209, 68, 60, 33 pb	415, 192 pb	607

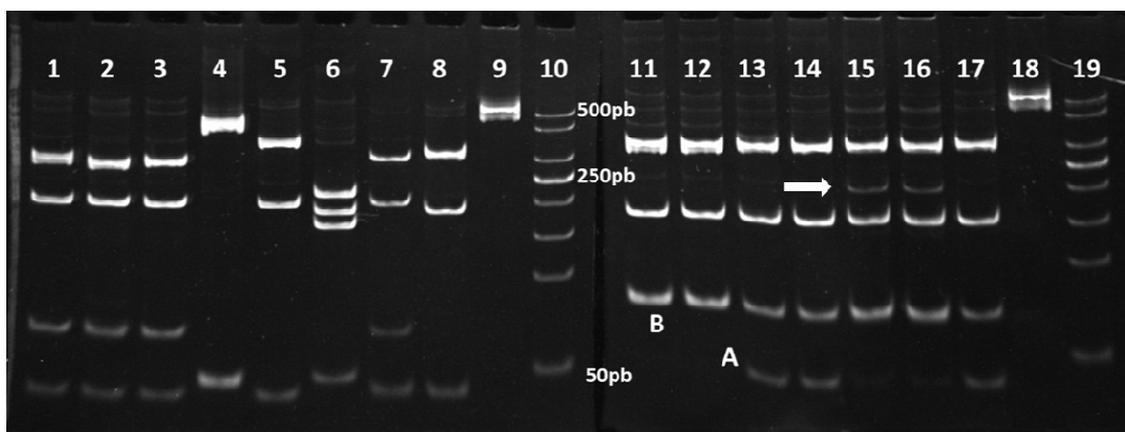
Os padrões de bandas gerados a partir dos “amplicons” da PCR do gene 26S rDNA após a digestão *in vitro* com as enzimas *DdeI*, *HaeIII* e *MspI* seguida de eletroforese para separação dos fragmentos em gel de poliacrilamida (8%) são mostrados na tabela 12. As imagens dos géis utilizados na análise estão nas figuras 6, 7 e 8. Os tamanhos dos fragmentos das bandas foram estimados utilizando o programa Gel Analyzer, com o marcador de peso molecular de 50 pb como perfil de referência.

**Tabela 12.** Tamanhos dos fragmentos (em pb), gerados através da digestão *in vitro* do produto da PCR 26S rDNA (domínio D1/D2), com as enzimas *DdeI*, *HaeIII* e *MspI*. Tamanhos dos fragmentos estimados com o auxílio do programa Gel Analyzer.

Sequência/Enzima	<i>DdeI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>MspI</i>
Tamanho do Fragmento (pb)			
<b>ST1 Coelho (RC5)</b>	337, 170, 81 pb	440, 162 pb	394, 93, 75, 44, 39 pb
<b>ST1 Cão (CC8)</b>	334, 166, 79 pb	436, 161 pb	398, 93, 75, 44, 38 pb
<b>ST2 Coelho (RC11)</b>	327, 159, 74, 48 pb	419, 155 pb	394, 93, 74, 44, 39 pb
<b>ST2 Cão (CC4)</b>	324, 156, 74, 48 pb	419, 155 pb	452, 92, 44, 39 pb
<b>ST3 Coelho (RC8)</b>	321, 156, 73 pb	443, 162 pb	394, 91, 72, 44, 39 pb
<b>ST3 Cão (CC7)</b>	321, 156, 72 pb	439, 162 pb	394, 90, 72, 43, 38 pb
<b>ST4 Coelho (RC19)</b>	327, 157, 72, 47 pb	257, 124, 90, 84 pb	369, 90, 73, 43, 38 pb
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	292, 191, 66, 46 pb	354, 148, 126 pb	589 pb
<i>Candida parapsilosis</i>	273, 186, 64, 45 pb	413, 98, 48, 37 pb	477, 153 pb
<i>Candida tropicalis</i>	277, 183, 63, 44 pb	222, 181, 138 pb	580 pb
<i>Rhodotorula spp.</i>	410, 48 pb	381, 164 pb	425, 156 pb
<i>Candida albicans</i>	330, 176, 43 pb	298, 142, 117 pb	258, 149, 121, 65 pb
<i>Malassezia pachydermatis</i>	200, 170, 149, 48 pb	528 pb	554 pb
<i>Kazachstania pintolopesii</i>	289, 172, 45 pb	465, 73, 56, 44 pb	473, 116, 45 pb
<i>Pichia kudriavzevii</i>	303, 172, 45 pb	230, 186, 63, 56, 45 pb	398, 171, 45 pb

No geral, os padrões de bandas, com relação ao número de bandas geradas para os quatro “sequence types” de *C. guttulatus* estão de acordo com os padrões gerados na análise *in silico*. Essa concordância também foi observada nos perfis gerados para as outras leveduras.

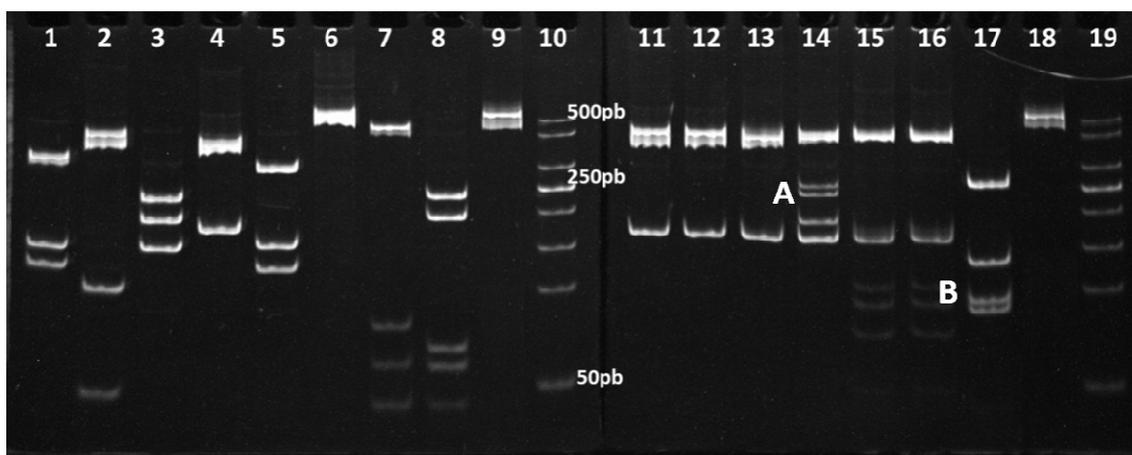
Como mostrado na figura 6, e conforme previsto após as análises *in silico*, os padrões de bandas gerados para as amostras de *C. guttulatus* (colunas 11 a 17) foram claramente distintos dos gerados para as outras espécies de leveduras (coluna 1-8). A comparação dos fragmentos gerados pelos diferentes ST's de *C. guttulatus* confirmaram que os isolados ST1 e ST3 têm perfis idênticos (com alguma digestão parcial em ST3). Além disso, os fragmentos de 72 e 71 pb presentes nesses isolados não foram separados resultando em uma banda com uma intensidade maior quase equivalente a banda de 164 pb (indicando a presença de duas bandas). No caso do ST2 (colunas 13 e 14) e ST4 (coluna 17) a banda de 73 pb é visível porém com uma intensidade menor em comparação com ST1 e ST3. A presença de uma banda de aproximadamente 40 pb é visualizada nas amostras correspondentes a ST2 e ST4, apresentando padrões de bandas diferentes quando comparado com ST1 e ST3.



**Figura 6.** Perfis de restrição com a enzima *DdeI* dos “amplicons” gerados na PCR para o gene 26S rDNA dos isolados de *Cyniclomyces guttulatus* e outras espécies de leveduras associadas com cães. 1- *Saccharomyces cerevisiae*, 2- *Candida parapsilosis*, 3- *Candida tropicalis*, 4- *Rhodotorula* spp., 5- *Candida albicans*, 6- *Malassezia pachydermatis*, 7- *Kasachstania pintolopessi*, 8- *Pichia kudriavzevii*, 9 e 18- “amplicon” sem corte, 10 e 19- marcador de peso molecular 50 pb, 11 a 17 Isolados de *Cyniclomyces guttulatus*. 11- ST1 coelho (RC5); 12- ST1 cão (CC8); 13- ST2 coelho (RC11); 14- ST2 cão (CC4); 15- ST3 coelho (RC8); 16- ST3 cão (CC7); 17- ST4 coelho (RC19). O tamanho correspondente a 500 pb, 250 pb, e 50 pb estão indicados ao lado direito da coluna 10. A- presença da banda de @40 pb; B- sobreposição das bandas de 71 e 72 pb. Seta- digestão parcial.

Como visto para a enzima *DdeI*, a digestão dos “amplicons” com *HaeIII* forneceu um método simples de distinção dos isolados de *C. guttulatus* (figura 7, colunas 11-17) quando comparado com as outras espécies de leveduras (colunas 1-8). O isolado de *Rhodotorula* spp. (coluna 4) apresentou um padrão de bandas similar aos observados para ST1, ST2 e ST3, porém, com uma análise mais detalhada de acordo com os dados gerados com o programa gel analyzer (tabela 13), pode-se concluir que os padrões foram efetivamente diferentes. Digestão parcial e / ou “star activity” foram observadas em algumas amostras (colunas 14, 15 e 16), resultando na presença de

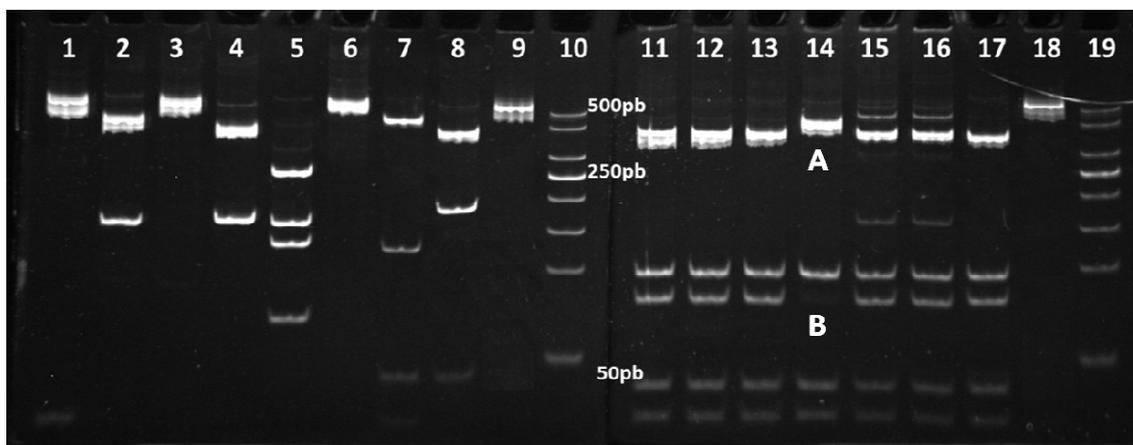
bandas inesperadas. Esse efeito não foi visto repetidamente. Em contraste, as bandas de 461 e 173 pb (identificadas na análise *in silico*) foram observadas na digestão com os isolados ST1 e ST3 e as bandas de 441 e 174 pb foram observadas em todos os isolados do grupo ST2. Contudo, a banda de 18 pb dos isolados ST2 não foi observada em nenhum gel ao longo do estudo. A análise dos géis, sem a ajuda dos programas de bioinformática, no caso o gel analyzer, não teria permitido a detecção da diferença de 20 pb que foi prevista na banda maior dos isolados dos grupos ST1 e ST3 (461 pb) com a banda do grupo ST2 (441 pb). Contudo, a redução no tamanho da banda do grupo ST2 foi detectada com o auxílio do programa gel analyzer (tabela 13). A digestão dos “amplicons” do grupo ST4 produziu um padrão de bandas único (coluna 17), confirmando o esperado pela análise *in silico*.



**Figura 7.** Perfis de restrição com a enzima *HaeIII* dos “amplicons” gerados na PCR para o gene 26S rDNA dos isolados de *Cyniclomyces guttulatus* e outras espécies de leveduras associadas com cães. 1- *Saccharomyces cerevisiae*, 2- *Candida parapsilosis*, 3- *Candida tropicalis*, 4- *Rhodotorula* spp., 5- *Candida albicans*, 6- *Malassezia pachydermatis*, 7- *Kasachstania pintolopessi*, 8- *Pichia kudriavzevii*, 9 e 18- “amplicon” sem corte, 10 e 19- marcador de peso molecular 50 pb, 11 a 17 Isolados de *Cyniclomyces guttulatus*. 11- ST1 coelho (RC5); 12- ST1 cão (CC8); 13- ST2 coelho (RC11); 14- ST2 cão (CC4); 15- ST3 coelho (RC8); 16- ST3 cão (CC7); 17- ST4 coelho (RC19). O tamanho correspondente a 500 pb, 250 pb, e 50 pb estão indicados ao lado direito da coluna 10. A- digestão parcial; B- “star activity”.

Os padrões de bandas gerados pela digestão dos “amplicons” com a enzima *MspI* são mostrados na figura 8. Como observado com as outras duas enzimas, a digestão com a enzima *MspI* resultou em padrões de bandas (colunas 11-17) que permitiram a identificação diferencial dos quatro ST’s identificados através das análises de sequenciamento dos isolados de *C. guttulatus* quando comparados com as outras espécies de leveduras (colunas 1-8). Os perfis encontrados para ST1, ST2 (coelho) e ST3 foram idênticos, e as bandas relativas aos fragmentos foram facilmente identificadas. O perfil visto para ST4 foi bem similar aos observados para ST1, ST2 (coelho) e ST3, com uma pequena redução da banda maior imperceptível no gel de eletroforese, também apresentando um perfil com cinco fragmentos. Porém, o uso do programa gel analyzer, novamente permitiu a detecção dessa sutil diferença, confirmando os resultados da análise *in silico*. Por outro lado, o perfil de bandas para o isolado ST2 de cão (CC4) foi distinto e permitiu sua confirmação como “sequence type” pela ausência da banda de 78 pb detectada nos outros isolados, assim como o aumento

da banda maior para 465 pb ao invés de 388 pb. A análise da sequência desse isolado mostrou que isso ocorreu pela perda de um sítio de restrição para a enzima *MspI*, resultado da substituição de uma citosina (C) por uma timina (T) no nucleotídeo da posição 555.



**Figura 8.** Perfis de restrição com a enzima *MspI* dos “amplicons” gerados na PCR para o gene 26S rDNA dos isolados de *Cyniclomyces guttulatus* e outras espécies de leveduras associadas com cães. 1- *Saccharomyces cerevisiae*, 2- *Candida parapsilosis*, 3- *Candida tropicalis*, 4- *Rhodotorula* spp., 5- *Candida albicans*, 6- *Malassezia pachydermatis*, 7- *Kasachstania pintolopessi*, 8- *Pichia kudriavzevii*, 9 e 18- “amplicon” sem corte, 10 e 19- marcador de peso molecular 50 pb, 11 a 17 Isolados de *Cyniclomyces guttulatus*. 11- ST1 coelho (RC5); 12- ST1 cão (CC8); 13- ST2 coelho (RC11); 14- ST2 cão (CC4); 15- ST3 coelho (RC8); 16- ST3 cão (CC7); 17- ST4 coelho (RC19). O tamanho correspondente a 500 pb, 250 pb, e 50 pb estão indicados ao lado direito da coluna 10. A- banda de 465 pb; B= ausência de banda de 78 pb.

## 4.2 Seção 2 - Método de Detecção Diretamente das Fezes

Os resultados apresentados abaixo se referem à etapa de desenvolvimento de um método de identificação direta de *C. guttulatus* em fezes de cães.

### 4.2.1 Avaliação de Métodos de Extração de DNA Fúngico das Fezes de Cães

Os experimentos foram realizados com o intuito de comparar a capacidade de dois métodos de extração (kit comercial e extração com fenol/clorofórmio) de DNA fúngico com qualidade suficiente para ser amplificado por PCR. Para isso utilizamos duas amostras (tabela 2: Beagle 1 e Pops) de fezes de cão. Essas amostras foram avaliadas como negativas microscopicamente para a presença de *C. guttulatus* e também não apresentaram crescimento na cultura. Um “amplicon” com o tamanho esperado (@630 pb) foi obtido para as duas amostras com os dois métodos de extração testados. Contudo, a intensidade da amplificação nas amostras extraídas através do kit

comercial foi superior nas duas amostras analisadas. Por essa razão, todos os experimentos subsequentes foram realizados utilizando o kit como método de extração para o DNA fecal.

#### 4.2.2 Detecção de *Cyniclomyces guttulatus* em Amostras Fecais Adulteradas (“spiked”) Utilizando o método de PCR-RFLP para o gene 26S rDNA

A capacidade de extrair DNA fúngico amplificável diretamente das fezes de cão indicou que o kit comercial poderia ser utilizado para extrair DNA de *C. guttulatus* diretamente desse tipo de amostras (incluindo amostras positivas para microscopia e negativas para cultura). Para testar essa hipótese, as mesmas duas amostras de fezes de cão utilizadas nos experimentos realizados para escolha do método de extração descrito acima foram adulteradas (“spiked”) com células do isolado CC4 como descrito no material e métodos e foram processadas com o kit comercial, seguida da PCR para o gene 26S rDNA e do PCR-RFLP para o mesmo alvo. Os resultados desses experimentos são mostrados na tabela 13. As amostras de fezes não adulteradas (controles negativos) resultaram em “amplicons” similares (em termos de intensidade), aos encontrados na primeira análise. A digestão desses “amplicons” com a enzima *HaeIII* mostrou a presença das bandas 463, 417, 335 e 178 pb no Beagle 1 e as bandas 300 e 168 pb para a amostra Pops (tabela 13).

**Tabela 13.** Avaliação do PCR-RFLP do gene 26S rDNA como método para detectar *Cyniclomyces guttulatus* em duas amostras de fezes de cão adulteradas (“spiked”) com células do isolado CC4.

Amostra de DNA	Intensidade de Amplificação	Padrões de Bandas Obtidos na Digestão com a enzima <i>HaeIII</i> (pb)
Fezes 1 <sup>A</sup>	+++	463, 417, 335, 178
Fezes 2 <sup>B</sup>	++	300,168
CC4 (10 <sup>6</sup> células)	+++	441, 173
CC4 (10 <sup>5</sup> células)	++	441, 173,
CC4 (10 <sup>4</sup> células)	+ (fraco)	441
CC4 (10 <sup>6</sup> células) + Fezes 1 <sup>A</sup>	++++	441, 173
CC4 (10 <sup>5</sup> células) + Fezes 1 <sup>A</sup>	++++	441, 173
CC4 (10 <sup>4</sup> células) + Fezes 1 <sup>A</sup>	+++	463 ,417,335, 178
CC4 (10 <sup>6</sup> células) + Fezes 2 <sup>B</sup>	++++	441, 173
CC4 (10 <sup>5</sup> células) + Fezes2 <sup>B</sup>	++++	441, 173
CC4 (10 <sup>4</sup> células) + Fezes 2 <sup>B</sup>	++	441, 300, 168

DNA extraído a partir de um pellet de 150mg de cada amostra fecal (com e sem adulteração); <sup>A</sup> amostra fecal do cão Beagle 1; <sup>B</sup> amostra fecal do cão Pops.

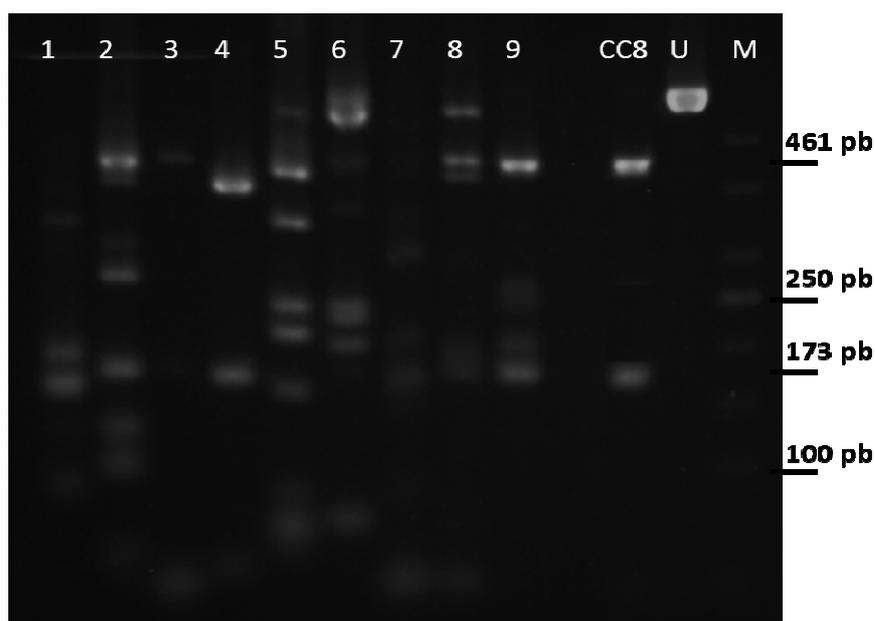
Os controles positivos, constituídos de DNA extraído de “pellets” com  $10^6$  e  $10^5$  células do isolado CC4, produziram “amplicons” com o tamanho esperado e quando digeridos, revelaram a presença de duas bandas de 441 e 173 pb e nenhuma evidência da banda menor de 18 pb. O DNA extraído a partir do “pellet” de  $10^4$  células resultou em uma amplificação fraca por PCR e quando submetida à digestão, somente foi possível visualizar a banda de 441 pb e com uma intensidade bem fraca. Para as amostras adulteradas, o DNA extraído das amostras onde foi adicionado  $10^6$  ou  $10^5$  células da cultura CC4 produziu “amplicons” mais intensos do que os gerados pelas fezes não adulteradas. A digestão dessas amostras com a enzima *HaeIII* produziu bandas claras de 441 e 173 pb, sem evidência de nenhuma das bandas observadas nas fezes não adulteradas. Em contraste, ambas as amostras adulteradas com  $10^4$  células resultaram em “amplicons” com intensidade semelhante às observadas nas amostras não adulteradas. A digestão desses “amplicons” produziu perfis nos quais o fragmento de 441 pb (derivado de *C. guttulatus*) estava presente como uma banda fraca, juntamente com as bandas que foram registradas nas fezes do controle negativo. Assim, não foi possível confirmar a presença de *C. guttulatus* nessas amostras. Com isso, os dados indicaram que o método de PCR-RFLP tendo como alvo o gene 26S rDNA poderia detectar *C. guttulatus*, quando presente em uma quantidade de pelo menos  $10^5$  células em 150 mg de fezes.

Dados similares aos observados com o isolado CC4 foram observados em experimentos subsequentes avaliando um número maior de amostras fecais ( $n = 15$ , incluindo as duas previamente analisadas), que foram adulteradas com  $10^5$  e  $10^3$  células do isolado de cão CC8. Uma diferença que deve ser ressaltada é que as células do isolado CC8 (ST1) foram derivadas de uma cultura em crescimento, em vez de uma cultura congelada (possivelmente, não viável) como a utilizada no experimento anterior. Um produto de 630 pb foi amplificado nos dois controles positivos para as amostras de leveduras, demonstrando a sensibilidade deste ensaio. A digestão desses “amplicons” com a enzima *HaeIII* produziu o padrão esperado de 461 e 173 pb. Um “amplicon” para a PCR do gene 26S rDNA foi observado para todas as amostras de fezes onde não foi adicionada levedura (controle negativo / amostras não adulteradas). A digestão dos “amplicons” das amostras fecais com a enzima *HaeIII*, produziu padrões de bandas diferentes e nenhum deles compatível com o esperado para *C. guttulatus*. Em contraste, a digestão dos “amplicons” gerados com as mesmas 15 amostras que foram adulteradas com a adição de  $10^5$  células da cultura CC8, revelou a presença apenas das bandas de 461 e 173 pb, características de CC8. Por outro lado, todas as amostras onde foram adicionadas  $10^3$  células produziram os mesmos perfis de bandas observados em sua amostra equivalente de controle negativo. Esses achados sugeriram que, quando *C. guttulatus* está presente como componente predominante do microbioma, o método de PCR-RFLP do gene 26S rDNA consegue detectar sua presença sem a necessidade da cultura.

#### **4.2.3 Avaliação do Método de PCR-RFLP Utilizando Amostras de Fezes Consideradas Positivas para *Cynicomyces guttulatus* Através do Exame Microscópico e Negativas para Cultura (Amostras Clínicas)**

Uma amplificação forte do produto esperado (@630 pb) foi observada para cada uma das nove amostras fecais examinadas. O resultado da digestão com a enzima *HaeIII* para esses “amplicons” e para o “amplicon” gerado da cultura CC8 (ST1) e

utilizado como referência na digestão são mostrados na figura 9. Pode-se observar que, na amostra do cão Kiara (coluna 3), as únicas bandas visíveis são as de 461 e 173 pb indicando a presença de *C. guttulatus*. Além disso, a banda de 461 pb foi observada nas amostras 2, 5, 8 e 9. Contudo a presença de inúmeras outras bandas, provavelmente provenientes dos “amplicons” gerados para outras espécies de fungos presentes nas fezes, não permitiu a identificação definitiva da presença de *C. guttulatus* nessas amostras. Em contraste com o dados promissores produzidos pelos experimentos de “spiking”, os resultados obtidos na análise das amostras clínicas com o PCR-RFLP para o gene 26S rDNA não seria adequado como método de identificação direta de *C. guttulatus* em amostras fecais de cães.



**Figura 9.** Perfis de restrição gerados pela digestão com a enzima *HaeIII* do “amplicon” obtido com a PCR 26S rDNA das amostras clínicas. Coluna 1- Bob; Coluna 2- Chico; Coluna 3- Kiara; Coluna 4- Whipy; Coluna 5- Fred; Coluna 6- Lessie; Coluna 7- Escotty; Coluna 8- Nina pós; Coluna 9- Carmella; CC8- “amplicon” CC8 digerido com a enzima *HaeIII*; U- “amplicons sem digestão”; M- marcador de peso molecular 50 pb. As posições dos fragmentos esperados 461 e 173 pb (presentes na digestão da amostra CC8) estão indicados ao lado direito da figura assim como as bandas de 250 e 100 pb do marcador molecular.

#### 4.2.4 Desenvolvimento de um Ensaio de PCR Espécie-específica para *Cyniclomyces guttulatus* Utilizando a subunidade 1 da RNA Polimerase II (*RPB1*) como Alvo

A tabela 14 fornece detalhes das sequências dos primers (e seus locais de anelamento em relação à sequência número GenBank JQ713018), que foram desenhados para uso nos ensaios de PCR externo e “nested” tendo o gene para a subunidade 1 da RNA polimerase II (*RPB1*) como alvo. Os “primers” foram considerados específicos para *C. guttulatus* baseado na análise *in silico* feita com o auxílio do programa Primer-blast e foram previstos “amplicons” de 631 pb (PCR externo) e 395 pb (“nested” PCR).

**Tabela 14.** “Primers” desenhados para amplificação do fragmento do gene para a subunidade 1 da RNA polimerase II (*RPBI*) de *Cyniclomyces guttulatus*.

Par de “primer”	Sequência	Posição de anelamento relativo à sequência JQ713018
<sup>a</sup> RPB F1	5'- GGT TGG GAT TCG ATG AAG AG -3'	101-120
<sup>a</sup> RPB R1	5'- TTC CAA CCG TAC TGC AAC TG -3'	712-731
<sup>b</sup> NF1Rpol	5'- AGG AGG CTG AAA GTC TTC TG -3'	308- 327
<sup>b</sup> NR1Rpol	5'- TGC TCT CTT ACT GTA CCT C - 3'	684-702

<sup>a</sup> “Primers externos” (geram um produto de 631pb); <sup>b</sup> “primers nested” (geram um produto de 395 pb).

A otimização da reação (concentração de magnésio e temperatura de anelamento), mostrou que as melhores condições de amplificação da PCR para o “primer” externo era MgCl<sub>2</sub> a 2,5 mM e uma temperatura de anelamento de 56 °C. No caso do “primer nested”, as melhores condições para realização da PCR foram MgCl<sub>2</sub> a 2 mM e uma temperatura de anelamento de 52 °C. De acordo com os achados da análise *in silico*, o DNA extraído de outras espécies de leveduras não resultaria em “amplicons” quando utilizado como molde para esta PCR. Além disso, o “sequence type” ST4 não produziu “amplicons” para essa PCR enquanto que os outros “sequence types” (ST1, ST2 e ST3) resultaram em “amplicons” com o tamanho previsto. Na tabela 15, comparamos a sensibilidade destes novos ensaios de PCR para *RPBI* com o ensaio para o gene 26S rDNA empregado anteriormente para identificação de *C. guttulatus*. Pode-se observar que para cada uma das amostras de DNA avaliadas, a PCR externa para *RPBI* foi menos sensível quando comparada com a PCR para o gene 26S rDNA. Especificamente, a primeira não é sensível para detectar a última amostra (100 fg de DNA) que foi amplificada na PCR para o gene 26S rDNA. Contudo, o ensaio “nested” se mostrou tão sensível quanto o ensaio para o gene 26S rDNA.

**Tabela 15.** Determinação dos limites de detecção (sensibilidade) do ensaio de PCR para os alvos 26S rDNA e *RPBI*.

Isolado	CC8 (ST1)			CC4 (ST2)			CC7 (ST3)		
	1 pg	100 fg	10 fg	1 pg	100 fg	10 fg	1 pg	100 fg	10 fg
Quantidade de DNA									
PCR	Intensidade de Amplificação								
<sup>a</sup> 26 S rDNA	++	+	-	++	+	-	++	+	-
<sup>b</sup> <i>RPBI</i> (externo)	+	-	-	+	-	-	+	-	-
<sup>c</sup> <i>RPBI</i> “nested”	+++	++	-	+++	++	-	+++	++	-

<sup>a</sup> ensaio de PCR para amplificação do alvo 26S rDNA [35 ciclos]; <sup>b</sup> ensaio de PCR para amplificação do alvo *RPBI* (“primers” externos) [35 ciclos] <sup>c</sup> ensaio de PCR para a amplificação do alvo *RPBI* (“primers” internos) [25 ciclos utilizando 1 µL do “amplicon” do PCR externo como molde].

#### 4.2.5 Avaliação do Método de PCR-RFLP para o Alvo *RPB1* para a Identificação de *Cyniclomyces guttulatus*

Foi realizada uma análise de digestão *in silico* utilizando as sequências de 631 pb para *RPB1* representativas dos isolados ST1, ST2 e ST3. Os resultados dessa análise são mostrados na tabela 16. Pode-se observar que as enzimas *HindIII* e *RsaI* produziram os mesmos perfis para todos os “sequence types” enquanto a enzima *MspI* poderia ser utilizada para a identificação diferencial dos isolados ST2 dos cães.

**Tabela 16.** Padrões de bandas previstos na análise *in silico* dos “amplicons” para *RPB1* após a PCR externa e “nested”.

	Enzima	<i>HindIII</i>	<i>MspI</i>	<i>RsaI</i>
Tamanho do “amplicon”		Fragmentos gerados em pb	Fragmentos gerados em pb	Fragmentos gerados em pb
631 pb ST1		470, 161	400, 138, 93	514, 74, 33, 10
631 pb ST2 Coelho		470, 161	400, 138, 93	514, 74, 33, 10
631 pb ST2 cão		470, 161	400, 231	514, 74, 33, 10
631 pb ST3		470, 161	400, 138, 93	514, 74, 33, 10
395 pb ST1		395	193, 138, 64	307, 74, 14
395 pb ST2 Coelho		395	193, 138, 64	307, 74, 14
395 pb ST2 Cão		395	202, 193	307, 74, 14
395 pb ST3		395	193, 138, 64	307, 74, 14

#### 4.2.6 Detecção e Identificação de *Cyniclomyces guttulatus* em Fezes de Cães Através do Método de PCR-RFLP para *RPB1*

DNA extraído das 15 amostras de fezes de cão, coletadas de animais saudáveis e classificadas como negativas para *C. guttulatus* por microscopia e cultura, não resultou em “amplicons” do tamanho esperado em nenhum dos ensaios de PCR para *RPB1* conforme previsto. Por outro lado, uma amplificação forte de tamanho esperado (631 pb) ocorreu com as mesmas amostras quando adulteradas com  $10^5$  células da cultura CC8 (representativa de ST1). No caso das amostras adulteradas com  $10^3$  células, a maioria (10 / 15) das amostras produziu uma banda de amplificação fraca, enquanto o restante das amostras deu resultado negativo. Em contraste com os resultados observados após a PCR externa, todas as amostras adulteradas com  $10^3$  células resultaram em forte amplificação do fragmento previsto (395 pb) no ensaio “nested”.

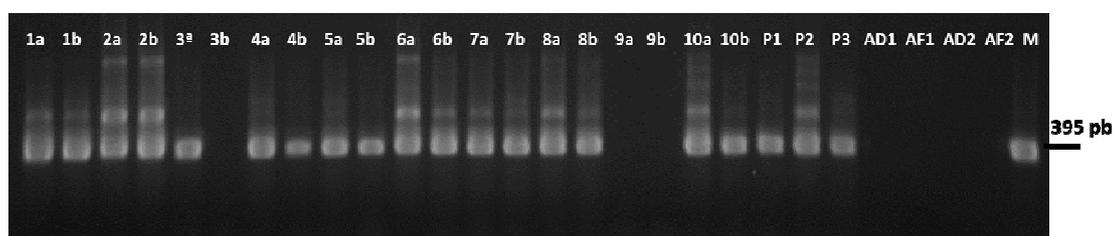
Importante ressaltar que os controles negativos não apresentaram “amplicons”, confirmando a ausência de contaminação. Os “amplicons” produzidos na PCR externa e na “nested” PCR foram digeridos com as enzimas *HindIII*, *MspI* e *RsaI* e geraram os perfis de bandas esperados. Contudo, os padrões de bandas gerados com os “amplicons” em menor concentração de DNA de 631 pb provenientes da PCR externa foram mais difíceis de analisar. Esse dados indicam que o que foi visto com o método de PCR-RFLP para o gene 26S rDNA também ocorre com a PCR externa para *RPBI*, onde só foi possível identificar com confiança a presença de *C. guttulatus* nas fezes quando esta levedura está presente em grande quantidade ( $10^5$  células). Além disso, os resultados da análise de PCR-RFLP para os “amplicons” da “nested” PCR indicaram que o método permitia a identificação confiável de *C. guttulatus* quando presente em quantidades consideravelmente mais baixas ( $10^3$  células) nas amostras.

Os resultados da amplificação do DNA extraído das amostras clínicas (n = 8), que foram avaliadas como positivas para *C. guttulatus* por microscopia, e negativas por cultura, são mostrados nas figuras 10 (PCR externa) e 11 (“nested” PCR). As figuras também fornecem os dados do cão Nina antes e depois do tratamento com antifúngicos (Nina pré e Nina pós). As amostras foram submetidas a PCR sem diluição e em uma diluição por um fator de 10 (1:10) em tampão AE. Como mostra a figura 10, as amostras do cão Kiara (colunas 3a e 3b) e Nina pós (colunas 9a e 9b) não resultaram em “amplicons” visíveis na PCR externa. Cinco amostras resultaram em “amplicons” para o DNA concentrado e diluído (1:10) inclusive a amostra Nina pré (colunas 8a e 8b). As outras amostras resultaram em “amplicons” apenas com o DNA não diluído. A PCR resultou em “amplicons” do tamanho esperado nos controles positivos, confirmando que o ensaio estava funcionando como determinado pelo limite de detecção, e nenhum dos controles negativos (AF e AD) apresentou “amplicom”, descartando a possibilidade de contaminação.



**Figura 10.** Amplificação da PCR externa para *RPBI* em gel de agarose 2% com as amostras clínicas. Colunas 1a -10a DNA não diluído das amostras clínicas; Colunas 1b - 10b DNA diluído por um fator de 10; 1- Bob, 2- Chico, 3- Kiara, 4- Whippy, 5- Fred, 6- Lessie, 7- Escotty, 8- Nina pré (microscopia e cultura positiva), 9- Nina pós (microscopia e cultura negativa pós tratamento antifúngico), 10- Carmella; P1 (10 pg de DNA CC8); P2 (1 pg de DNA CC8), P3 (100 fg de DNA CC8) controles positivos; AD- água dentro; AF- água fora controles negativos; M- “amplicon” com o tamanho esperado para a PCR (631 pb). A posição do “amplicon” de 631 pb está indicada no lado direito da figura.

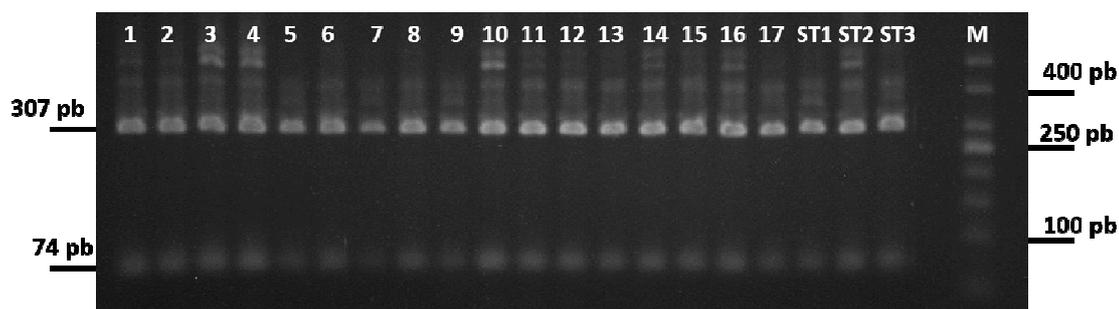
Os resultados da “nested” PCR para as amostras clínicas estão apresentados na figura 11. Pode-se observar que o DNA com e sem diluição proveniente da amostra Nina pós não resultou em amplificação (colunas 9a e 9b) assim como o DNA diluído da amostra Kiara (coluna 3b), enquanto o DNA sem diluição mostrou uma amplificação bem intensa (coluna 3a). Todas as outras amostras, incluindo o DNA não diluído que não haviam amplificado na PCR externa resultaram em “amplicons” com banda intensa na “nested” PCR (figura 11). Importante ressaltar que os controles negativos da reação externa (AF1 e AD1), assim como os controles negativos (AF2 e AD2) da “nested” PCR não apresentaram “amplicons”. Esse resultado confirma a ausência de contaminação.



**Figura 11.** Amplificação da “nested” PCR para *RPBI* em gel de agarose 2% com as amostras clínicas. Colunas 1a - 10a DNA não diluído das amostras clínicas; Colunas 1b - 10b DNA diluído por um fator de 10; 1- Bob, 2- Chico, 3- Kiara, 4- Whipy, 5- Fred, 6- Lessie, 7- Escotty, 8- Nina pré (microscopia e cultura positiva), 9- Nina pós (microscopia e cultura negativa pós tratamento antifúngico), 10- Carmella; P1 (10 pg de DNA CC8); P2 (1 pg de DNA CC8), P3 (100 fg de DNA CC8) controles positivos; AD1- água dentro (PCR externa); AF1- água fora (PCR externa); AD2- água dentro (25 ciclos “nested” PCR); AF2- água fora (25 ciclos “nested” PCR) controles negativos; M- “amplicon” com 395 pb (fragmento esperado). A posição do “amplicon” de 395 pb está indicado no lado direito.

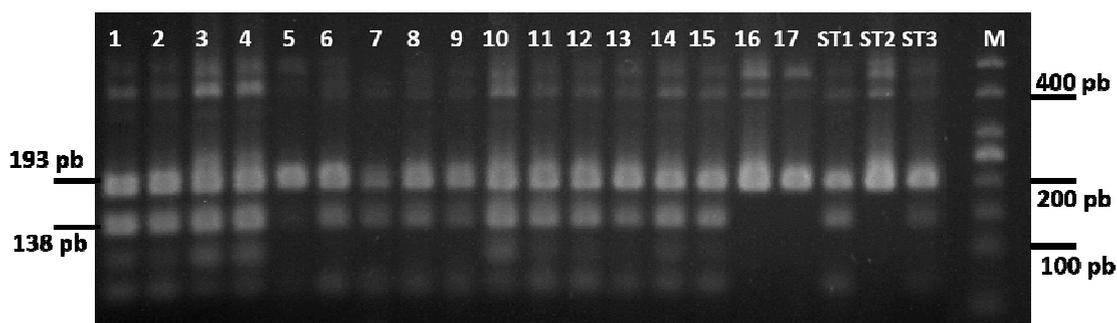
A digestão do “amplicon” de 631 pb com a enzima *HindIII* confirmou que estes eram representativos de *C. guttulatus*. Além disso, a digestão com a enzima *MspI* indicou que as leveduras presentes nas fezes de todos os animais, exceto do cão Carmella, pertenciam aos “sequence types” ST1 ou ST3 de *C. guttulatus*. O padrão de digestão observado nas amostras de fezes do cão Carmella foi idêntico ao visto no controle ST2 (CC4). Os resultados obtidos com a digestão dos “amplicons” de 395 pb com as enzimas *RsaI* e *MspI* são mostrados nas figuras 12 e 13, respectivamente.

Conforme mostrado na figura 12, os padrões gerados com a enzima *RsaI* foram idênticos, confirmando a presença de *C. guttulatus* em todas as amostras clínicas.



**Figura 12.** Perfis de bandas gerados com a digestão, com a enzima *RsaI* em gel de agarose 2,5%, dos “amplicons” da “nested” PCR (395 pb) para as amostras clínicas. Colunas 1 e 2- Bob; Coluna 3 e 4- Chico; Coluna 5- Kiara; Colunas 6 e 7- Whippy; Colunas 8 e 9- Fred; Colunas 10 e 11- Lessie; Colunas 12 e 13- Escotty; Colunas 14 e 15- Nina pré; Colunas 16 e 17- Carmella; ST1- CC8 representando o perfil para ST1 de cão; ST2- CC4 representando o perfil para ST2 de cão; ST3- CC7 representando o perfil de ST3 de cão; M- marcador de peso molecular 50 pb. As posições das bandas correspondentes a 400, 250 e 100 pb são mostradas ao lado direito da figura e as bandas de 307 e 74 pb referentes ao perfil gerado com essa enzima são mostradas ao lado esquerdo.

Como mostrado na figura 13, a digestão com a enzima *MspI* confirmou que as amostras apresentavam DNA de *C. guttulatus*. Sobretudo, os resultados demonstraram de forma conclusiva que as amostras de fezes provenientes dos cães Kiara (coluna 5) e Carmella (colunas 16 e 17) continham leveduras que pertencem ao grupo ST2 de cão. Essas duas amostras apresentaram o mesmo perfil do controle ST2 de cão (coluna ST2).



**Figura 13.** Perfis de bandas gerados com a digestão das amostras clínicas, com a enzima *MspI* em gel de agarose 2,5%, dos “amplicons” da “nested” PCR (395 pb) para as amostras clínicas. Colunas 1 e 2- Bob; Coluna 3 e 4- Chico; Coluna 5- Kiara; Colunas 6 e 7- Whippy; Colunas 8 e 9- Fred; Colunas 10 e 11- Lessie; Colunas 12 e 13- Escotty; Colunas 14 e 15- Nina pré; Colunas 16 e 17- Carmella; ST1- CC8 representando o perfil para ST1 de cão; ST2- CC4 representando o perfil para ST2 de cão; ST3- CC7 representando o perfil de ST3 de cão; M- marcador de peso molecular 50 pb. As posições das bandas correspondentes a 400, 250 e 100 pb são mostradas ao lado direito da figura e as bandas de 193 e 138 pb gerados nos perfis ST1 e ST3 são mostradas no lado esquerdo.

Como um todo, os dados apresentados nesta seção demonstraram que o método de PCR-RFLP representa um meio pelo qual é possível identificar a presença de *C. guttulatus* diretamente das fezes de cães sem a necessidade da cultura.

#### 4.3 Seção 3 – Análise Genética dos Isolados de *Cyniclomyces guttulatus*

Nesta seção, serão detalhados os resultados referentes às análises das sequências de cinco marcadores moleculares provenientes dos isolados de *C. guttulatus* obtidos ao longo deste estudo.

A tabela 17 indica os dados relativos à similaridade (% de similaridade) determinada para os marcadores 26S rDNA, RNAPolIII subunidade 1 (*RPB1*), RNAPolIII subunidade 2 (*RPB2*) e 18S rDNA. No caso desses marcadores, as sequências foram comparadas com a sequência disponível para cepa tipo (NRRL Y-17561) depositada no GenBank. Para os marcadores que não possuíam sequência disponível derivada da cepa tipo, *COII* e ITS, não foi possível realizar uma comparação com essas sequências. Como observado anteriormente para as sequências do 26S rDNA, nenhum dos isolados brasileiros mostrou 100% de similaridade com a sequência derivada da cepa tipo (NRRL Y-17561), em nenhum dos marcadores. A similaridade observada para o 18S rRNA foi de 99,9% para as sequências de ST1 e ST3, 99,5% para ST2 e 98% para ST4. No caso de *RPB1*, os valores registrados para as amostras ST1 e ST3 foram muito semelhantes com ST1 (97,9%), mostrando 13 nucleotídeos (nt) diferentes em relação a cepa tipo e ST3 (97,7%) com 14 diferenças encontradas. Os dados para os isolados ST2 mostraram uma divergência maior em relação à cepa tipo e também entre os isolados de coelho e de cão. O isolado ST2 de coelho apresentou uma similaridade de 98,3% (10 nt diferentes dentre os 591 nt), enquanto o ST2 de cão apresentou um valor de 96,1% (23 de 591 nt). Nenhuma sequência estava disponível para o isolado ST4. No caso da subunidade 2 da RNA polimerase II (*RPB2*), as sequências ST1 e ST3 apresentaram valores de similaridade idênticos (98%; 10/661 nt), assim como os dois isolados ST2 que apresentaram o mesmo valor de similaridade de 96,3%. A sequência ST4 mostrou 73 nucleotídeos de diferença em comparação com a cepa tipo com apenas 89% de similaridade.

**Tabela 17.** Similaridade entre as sequências de nucleotídeos (em % de similaridade) de quatro marcadores para ST1, ST2, ST3 e ST4, em comparação com as sequências da cepa tipo de *Cyniclomyces guttulatus* (NRRL Y-17561).

Gene	26S rDNA	18S rRNA	<i>RPB1</i>	<i>RPB2</i>
“Sequence Type” (ST)	% de similaridade	% de similaridade	% de similaridade	% de similaridade
Nº de acesso GenBank	<sup>a</sup> JQ689012	<sup>a</sup> JQ698886	<sup>a</sup> JQ713018	<sup>a</sup> JQ698950
ST1	98,5	99,9	97,9	98
ST2 coelho	95,8	99,5	98,3	96,3
ST2 cão	95,9	99,5	96,1	96,3
ST3	98,8	99,9	97,7	98
ST4	90,6	98	NA	89

<sup>a</sup> Sequências oriundas da cepa tipo depositadas no GenBank. 26S rDNA tamanho da sequência 591 pb; 18S rRNA tamanho da sequência 1642 pb; *RPB1* tamanho da sequência 591 pb; *RPB2* tamanho da sequência 661 pb.

Os dados apresentados abaixo, na forma de tabela de variação de nucleotídeos (“variance tables”) mostram detalhes específicos relativos às variações nas sequências de nucleotídeos (número de modificações e a posição nas sequências onde ocorreu a modificação, em comparação com a sequência da cepa tipo). No caso das sequências de *COII*, devido à ausência de uma sequência tipo, a comparação foi realizada utilizando o ST1 de coelho (RST1) como referência. A análise comparativa da região ITS de ST1, ST2, ST3 e ST4 incluiu a sequência com número de acesso GenBank EF464552 (especificamente, a região entre os nucleotídeos 1271-1980), derivada de um isolado de *C. guttulatus* em associação com um nematódeo (*Passalurus ambiguus*) recuperado do intestino de rato nos EUA. Devido ao elevado número de diferenças encontradas em algumas comparações, a tabela de variação de nucleotídeos ficou muito extensa, dessa forma as “variance tables” relativas a essas comparações são mostradas nos anexos 8.3 e 8.4, contudo os resultados das análises estão apresentados abaixo.

As análises das variações relativas ao 18S rRNA incluindo as sequências para ST4 são apresentadas na tabela 18. Pode-se observar que o isolado ST3 apresentou apenas um nucleotídeo de diferença em relação à cepa tipo. Essa única diferença para ST3 ocorreu em uma substituição (G-T), na posição 589 (tabela 18). A substituição nessa mesma posição também foi observada nos outros três “ST’s”, ocorrendo em ST2 e ST4 também uma substituição (G-T) e em ST1 uma substituição (G-C). As sequências oriundas dos isolados ST1 apresentaram duas variações de nucleotídeos, que incluem uma substituição na posição 589 (G-C), e uma substituição na posição 1395 (C-T). A mesma substituição foi observada nas sequências dos isolados ST2 e ST4 (tabela 18). Oito das nove substituições observadas em ST2 também foram observadas em ST4. A única diferença observada somente em ST2 foi uma substituição (T-C) na posição 537.

**Tabela 18.** “Variance table” das sequências do 18S rRNA (@1642 pb) dos isolados de *Cyniclomyces guttulatus* (ST1, ST2, ST3 e ST4) em comparação com a sequência da cepa tipo (NRRL Y-17561, código GenBank JQ698886).

Top Sequence	JQ698886	ST1	ST2	ST3	ST4	Total
63	:				G	1
64	T				C	1
109	G				A	1
131	G				C	1
365	T				C	1
522	C		T		T	2
533	G		A		C	2
535	A		T		T	2
536	T		A		G	2
537	T		C			1
550	G		A		A	2
565	T				C	1
585	G				A	1
587	C				:	1
589	G	C	T	T	T	4
590	T				G	1
591	G				C	1
592	T				G	1
595	C				T	1
653	G				A	1
655	T				G	1
662	A				G	1
663	A				G	1
927	A				T	1
932	A				:	1
933	G				T	1
934	T				A	1
937	G				C	1
1,238	T				C	1
1,253	:				A	1
1,254	G				C	1
1,262	C		T		T	2
1,268	T				G	1
1,395	C	T	T		T	3
1,614	G				A	1
<b>Total</b>		<b>0</b>	<b>2</b>	<b>9</b>	<b>1</b>	<b>34</b>
				<b>1</b>	<b>34</b>	<b>46</b>

Os dados da análise da variação de nucleotídeos para *RPB1* são mostrados na tabela 19. Das substituições observadas para ST1 (14 substituições) e ST3 (15 substituições), 12 foram localizadas na mesma posição e 11 / 12 foram idênticas entre as mesmas. As duas substituições, (T-C) na posição 103 e (G-A) na posição 330 foram detectadas nas sequências de ST1 e ST2 derivada de coelho (tabela 19), enquanto as substituições observadas em ST3 nas posições 318, 354 e 408 não foram vistas em nenhum outro ST.

**Tabela 19.** “Variance table” das sequências de *RPB1* (@591 pb) dos isolados de *Cyniclomyces guttulatus* (ST1, ST2, ST3) em comparação com a sequência da cepa tipo (NRRL Y-17561, código GenBank JQ713018).

Top Sequence	JQ713...	ST1	RST2	DST2	ST3	Total
6	T			C		1
12	C	T	T	T	T	4
36	A			G		1
54	T			A		1
57	C	T	T		T	3
87	G			A		1
90	A	G	G		G	3
103	T	C	C			2
120	T			C		1
129	C	T	T	T	T	4
135	A			T		1
147	G			A		1
180	C			T		1
186	T	C			C	2
195	T	C	C	C	C	4
210	A			G		1
225	T	C			C	2
246	G	A			C	2
249	A			G		1
252	A	G	G		G	3
255	T			C		1
288	N	G	G	A	G	4
300	C			T		1
318	G				A	1
330	G	A	A			2
354	C				T	1
372	A			G		1
408	G				A	1
438	G			A		1
450	A	T	T		T	3
474	C			T		1
483	G			A		1
492	G			A		1
519	T	C	C		C	3
525	C			A		1
552	C			T		1
582	A			G		1
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>14</b>	<b>11</b>	<b>24</b>	<b>15</b>	<b>64</b>

Foi observada uma maior variação entre as sequências dos isolados ST2 de coelho e cão. Somente quatro das variações, relativas à sequência da cepa tipo, ocorreram na mesma posição (12, 129, 195 e 228). Três das quatro substituições foram idênticas nas duas sequências. Todas as 11 substituições observadas na sequência de ST2 de coelho também foram vistas na sequência ST1. Somente 4 / 24 variações observadas na sequência do isolado ST2 de cão também foram vistas em ST1.

Os dados da análise da variação de nucleotídeos para *RPB2* são mostrados na tabela 20. Das 14 variações observadas em ST1, 11 foram as mesmas variações observadas em ST3. As três alterações adicionais vistas em ST1, (T-C) na posição 212, (A-T) na posição 499 e (T-C) na posição 571 foram únicas para esse ST (tabela 20).

As variações de nucleotídeos vistas nas duas sequências representativas de ST2 (coelho e cão) foram idênticas. Dentre o total de 35 variações observadas em ST2, seis foram observadas também para ST1 e ST3.

**Tabela 20.** “Variance table” das sequências de *RPB2* (@661 pb) dos isolados de *Cyniclomyces guttulatus* (ST1, ST2, ST3) em comparação com a sequência da cepa tipo (NRRL Y-17561, código GenBank JQ698950).

Top Sequence	JQ698950.1	ST1	ST2	ST3	Total
16	N	A	A	A	3
38	T		C		1
67	A		G		1
77	A	C		C	2
85	N	T	T	T	3
97	N	G	G	G	3
103	T		C		1
109	C		T		1
121	T		C		1
148	C		T		1
184	G	A		A	2
211	G		A		1
212	T	C			1
220	N	A	A	A	3
250	C		A		1
251	T		C		1
253	A		C		1
262	G	A	A	A	3
271	C		T		1
274	G		A		1
301	G		T		1
361	T	C	C	C	3
364	G		A		1
367	T	C		C	2
376	G	A		A	2
379	T	C		C	2
433	G		A		1
436	G		A		1
442	G		A		1
445	T		C		1
466	G		A		1
481	T		C		1
487	A		G		1
493	G		T		1
499	A	T			1
517	T		A		1
523	G		A		1
529	C		T		1
538	G		T		1
550	T		C		1
571	T	C			1
619	C		T		1
658	C		T		1
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>14</b>	<b>35</b>	<b>11</b>	<b>60</b>

Os dados para a análise de variação de sequências de *COII* são mostrados na tabela 21. Devido à ausência de uma sequência oriunda da cepa tipo (NRRL Y-17561), as comparações foram realizadas utilizando a sequência do isolado ST1 de coelho (RST1). Apenas uma variação foi observada para ST3 e quatro substituições foram observadas entre ST1 de coelho e de cão. A substituição (C-T) na posição 529 não foi vista na sequência de cão ST1, porém foi detectada nas sequências ST2 e ST3. As nove variações observadas entre as sequências ST2 de coelho e cão foram idênticas. Contudo somente uma substituição (C-T) na posição 448 foi observada na sequência ST1 de cão.

**Tabela 21.** “Variance table” das sequências de *COII* (@616 pb) dos isolados de *Cyniclomyces guttulatus* de cão (ST1, ST2, ST3) em comparação com a sequência do isolado ST1 de coelho (RST1).

Top Sequence		RST1	DST1	RST2	DST2	ST3	Total
74	T			A	A		2
121	T			C	C		2
208	A		T				1
277	C			T	T		2
322	C		T				1
325	T		A				1
445	A			T	T		2
448	C		T	T	T		3
451	A			T	T		2
460	A			T	T		2
529	C			T	T	T	3
556	T			A	A		2
<b>Total</b>		<b>0</b>	<b>4</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>1</b>	<b>23</b>

Os dados relacionados às variações de sequências para a região ITS (ITS1-5.8S rRNA-ITS2) e para as regiões ITS separadamente (ITS1 e ITS2) são apresentados na tabela 22. Na ausência de uma sequência para a cepa tipo as comparações foram realizadas entre os diferentes “sequence types” encontrados de *C. guttulatus*. A primeira comparação realizada ocorreu entre as sequências de ST1 (idênticas entre cão e coelho), e as três diferentes sequências de ST2 para região ITS (ITS1-5.8S rRNA-ITS2). O grau de similaridade variou de 86% (90 / 652 nt) encontrada na sequência de ST2 de cão (DST2), até 88% (77 / 652 nt) para as sequências de coelhos (RST2). A análise da variação de nucleotídeos dessa comparação mostrou um total de 73 diferenças observadas nas três sequências de ST2 (Anexo 8.3). O RST2 (proveniente de coelho) apresentou três diferenças únicas e DST2 (proveniente de cão) apresentou sete diferenças únicas. Todas as 85 diferenças observadas na sequência EF464552 também foram observadas na sequência DST2. Além disso, a região entre os nucleotídeos 357-461 continha 11 diferenças que foram observadas em EF464552 e DST2, porém não

foram vistas em RST2. Três dessas alterações foram encontradas na região correspondente ao 5.8S rRNA (nucleotídeos 254-412), com as outras oito diferenças observadas na região 5' do ITS2 (nucleotídeos 412-637). Cada uma das sequências ST2 demonstrou aproximadamente 60% de suas diferenças (em relação a ST1) na região ITS2.

Como visto na tabela 22, a comparação entre as sequências ST1 e ST3 demonstrou 94% de similaridade (39 / 652 nt). As diferenças observadas foram agrupadas exclusivamente na sequência de ITS1. A comparação entre as sequências ST3 e ST2 revelou um grau de similaridade de 82% (EF464552 e DST2) e 83% para RST2. Nenhuma das 39 diferenças de nucleotídeos observadas nas sequências ST3 (relativas à ST1) foi observada nas sequências ST2.

O grau de similaridade observado entre as sequências de ST4 e as sequências de ST1, ST2 e ST3 foi consideravelmente menor (67% - 71%). Em todos os casos, as diferenças dos nucleotídeos foram distribuídas entre as duas regiões ITS (ITS 1 e ITS2) (tabela 22). A análise da “variance table” dessas comparações (anexo 8.4) mostrou um total de 71 diferenças na região ITS1 (nucleotídeos 1 - 234), que foram compartilhadas pelos ST1, ST2 e ST3, enquanto que 50% (12 / 24) das diferenças foram observadas na sequência 5.8S rRNA eram comuns a todos os ST's e 69 das diferenças observadas em ITS2 também foram compartilhadas entre os ST's.

**Tabela 22.** Análise da similaridade (número de nucleotídeos diferentes / total de nucleotídeos) e % de similaridade observada para a região ITS (ITS1-5.8S rRNA-ITS2); ITS1 e ITS2.

<b>Sequência</b>	<b>Comparada com</b>	<b>ITS total (# nt diferente) % Similaridade</b>	<b>ITS1 (# nt diferente)</b>	<b>ITS2 (# nt diferente)</b>
<b>ST1 (652 pb)</b>	ST2 EF464552 (638 pb)	85/652 ( <b>87%</b> )	27/249	54/246
<b>ST1 (652 pb)</b>	RST2 (637 pb)	77/652 ( <b>88%</b> )	30/249	46/246
<b>ST1 (652 pb)</b>	DST2 (637 pb)	90/652 ( <b>86%</b> )	29/249	56/246
<b>ST1 (652 pb)</b>	ST3 (662pb)	39/652 ( <b>94%</b> )	39/249	0/249
<b>ST3 (662 pb)</b>	EF464552 (638 pb)	124/662 ( <b>82%</b> )	66/259	54/246
	RST2 (637 pb)	116/662 ( <b>83%</b> )	69/259	46/246
	DST2 (637 pb)	125/662 ( <b>82%</b> )	64/259	56/246
<b>ST4 (611 pb)</b>	ST1 (652 pb)	179/611 ( <b>71%</b> )	82/234	93/220
	RST2 (637 pb)	162/611 ( <b>73%</b> )	84/234	82/200
	ST3 (662pb)	200/611 ( <b>67%</b> )	103/234	94/200
<b>ST2 EF464552 (638 pb)</b>	RST2 (637 pb)	15/638 ( <b>97,6%</b> )	4/249	8/232
<b>ST2 EF464552 (638 pb)</b>	DST2 (637 pb)	9/638 ( <b>98,6%</b> )	4/249	4/232
<b>RST2 (637 pb)</b>	DST2 (637 pb)	22/637 ( <b>96.5%</b> )	6/249	12/232

A última comparação realizada buscou determinar a variação entre as três sequências ST2. São os dados relacionados à comparação entre a sequência de coelho (RST2) e a sequência de cão (DST2) e a sequência EF464552 e são apresentados na tabela 23.

**Tabela 23.** “Variance table” comparando a sequência (637 pb) da região ITS (ITS1-5.8S rRNA-ITS2) oriundas de coelho (RST2), de cão (DST2) e um isolado de *Cyniclomyces guttulatus* (EF464552) depositado no GenBank.

Top Sequence		EF464552.	RST2	DST2	Total
33	G			:	1
128	G			A	1
218	T		G	G	2
221	A			G	1
222	G		C		1
225	C		G		1
227	C		T		1
339	G			A	1
370	C		T		1
371	C		T		1
374	T		C		1
410	T		C		1
420	T		:		1
422	T		:		1
423	C		G		1
424	T		A		1
444	C			T	1
447	C		T		1
452	:		T		1
456	G		A		1
491	A			G	1
591	A			G	1
627	C			T	1
<b>Total</b>		<b>0</b>	<b>15</b>	<b>9</b>	<b>24</b>

Todas as diferenças observadas, exceto pela substituição (T-G) na posição 218 foram específicas para as sequências de RST2 e DST2. Além disso, a sequência oriunda de coelho mostrou três diferenças únicas na sequência 5.8S rRNA (posições 370, 371 e 374) enquanto DST2 mostrou apenas uma substituição (G-A) na posição 339. No caso da sequência de RST2 a maioria (8 / 15) das substituições ocorreu na região ITS2 enquanto nas sequências de DST2 as substituições foram igualmente distribuídas entre ITS1 e ITS2.

Ao comparar somente as sequências ST2 de coelho e cão (tabela 24), foi observada uma maior variação entre as sequências RST2 e DST2 do que havia sido observado anteriormente nas comparações com EF464552. Especificamente, o grau de variação de nucleotídeos foi de 96,5% correspondendo a 22 diferenças entre os 637 pb. A maioria (12 / 22) das diferenças ocorreu dentro da sequência ITS2 (tabela 24).

**Tabela 24.** “Variance table” comparando as sequências da região ITS (ITS1-5.8S rRNA-ITS2) para os isolados ST2 de coelho e de cão.

Top Sequence		RST2	DST2	Total
33	G		:	1
128	G		A	1
221	A		G	1
222	C		G	1
225	G		C	1
227	T		C	1
339	G		A	1
370	T		C	1
371	T		C	1
374	C		T	1
410	C		T	1
420	:		T	1
422	:		T	1
423	G		C	1
424	A		T	1
444	C		T	1
447	T		C	1
452	T		:	1
456	A		G	1
491	A		G	1
591	A		G	1
627	C		T	1
<b>Total</b>		<b>0</b>	<b>22</b>	<b>22</b>

## 5 Discussão

*Cyniclomyces guttulatus* é um enigma e tem sido alvo de constante debate entre pesquisadores. Uma levedura comensal inofensiva para alguns microbiologistas e um patógeno emergente de cães para outros. A pesquisa realizada no presente estudo não procurou resolver a questão se *C. guttulatus* tem sido um patógeno verdadeiro de cães, ou mesmo se representa um patógeno oportunista. Em vez disso, o estudo foi conduzido com o indicativo de desenvolver meios inovadores, através dos quais futuros estudos possam catalogar e caracterizar de maneira mais completa e confiável as interações entre essa levedura e seus hospedeiros caninos.

A presença de *C. guttulatus*, provavelmente como microorganismo comensal, no trato gastrointestinal de coelhos foi detectada pela primeira vez há mais de 100 anos pelo uso do exame microscópico direto dos tecidos intestinais e amostras de fezes (SHIFRINE; PHAFF, 1958; ZIERDT et al., 1988). Pode parecer surpreendente que, em 2020, no momento em que a biologia molecular é a abordagem central e, em alguns casos, a principal estratégia aplicada ao estudo de muitas doenças infecciosas e / ou parasitárias, no que tange a identificações de espécies, a microscopia continue sendo o principal método empregado em praticamente todos os estudos que relataram a presença de *C. guttulatus* em cães como organismo comensal ou patógeno presumível, principalmente na clínica veterinária.

O presente estudo também empregou a microscopia como primeiro e essencial passo para a obtenção de todos os dados aqui relatados. Nesse contexto, a microscopia foi o método utilizado para caracterizar as amostras fecais como positivas ou negativas para a presença de células com morfologia compatível com *C. guttulatus* (ZIERDT et al., 1988; FLAUSINO; BARONI, 2009; FLAUSINO et al., 2013; FURTADO et al., 2013). No caso específico das amostras fecais de cães, a microscopia forneceu o *status* negativo para as amostras que foram usadas como componente fundamental dos experimentos de “spiking” empregados no desenvolvimento do método para a detecção e caracterização de *C. guttulatus* independente de cultura. Além disso, o exame microscópico direto da suspensão de fezes frescas foi o único método utilizado pelos médicos veterinários que enviaram as “amostras clínicas”, suspeitas de estarem infectadas com *C. guttulatus*, ao laboratório. Por fim, a microscopia também foi fundamental para a caracterização das culturas, produzidas em caldo YPG, derivadas de fezes ou de culturas em placas de YPGA, utilizadas para o sequenciamento ou para a preparação do inóculo utilizado nos experimentos de “spiking”.

As técnicas baseadas em biologia molecular desenvolvidas neste estudo para a identificação de isolados cultivados de *C. guttulatus*, e aquelas que permitiram a caracterização direta e independente da cultura nas fezes de cão, representam resultados significativos. No entanto, vale a pena considerar que um dos achados mais importantes deste estudo foi o fato de que as 16 amostras identificadas pelos médicos veterinários como infectadas com *C. guttulatus* foram posteriormente confirmadas como positivas pelos métodos de biologia molecular aplicados para detectar a presença desta levedura. Com base nesses resultados, alguns pesquisadores podem se sentir motivados em

questionar a necessidade do desenvolvimento de métodos de diagnóstico alternativos. No entanto, é importante lembrar que apenas 8 / 16 das amostras de cães que apresentaram *C. guttulatus* ao exame microscópico de fezes estavam associadas a cães que manifestavam sinais clínicos de doença gastrointestinal. Claramente, o possível significado e / ou as razões para esse fenômeno não podem ser elucidados apenas por microscopia.

A dependência da microscopia, como uma ferramenta preliminar, utilizada no estudo de *C. guttulatus*, surgiu devido as dificuldades associadas ao isolamento e à manutenção de culturas puras (SPENCER et al., 1997; ZIERDT et al., 1988; FLAUSINO; BARONI, 2009). No presente estudo, 100% dos coelhos examinados forneceram culturas, em caldo YPG, de células que demonstram características morfológicas compatíveis com a descrição prévia de *C. guttulatus*. No entanto, a subcultura dessas leveduras em placas de YPGA, indicou que as células observadas nas fezes de quatro coelhos deram origem a colônias com morfologia atípica e que cresceram mais lentamente do que o tipo de colônia descrita por Flausino e Baroni (2009).

Em contraste com os sucessos obtidos com fezes de coelho e porquinho-da-índia, apenas 50% (8 / 16) das amostras fecais de cães resultaram no crescimento de células, apesar das claras evidências microscópicas e moleculares subsequentes de que continham células de *C. guttulatus*. A diferença observada no sucesso da cultura pode ser explicada pela demora no processamento das amostras de cães em relação ao material do coelho e de porquinho-da-índia. Nesse contexto, as amostras de coelho foram invariavelmente processadas e usadas como inóculo para o caldo YPG em até 2 hrs após a coleta. Por outro lado, as amostras de cães eram frequentemente mantidas em temperatura ambiente por até 48 hrs antes do início do processamento. Também é pertinente observar que, antes de 2017, não foram feitas tentativas para padronizar a coleta ou o armazenamento das fezes dos cães. No entanto, é interessante notar que sete das oito amostras que resultaram em crescimento de *C. guttulatus* foram coletadas durante o período de 2011 a 2014, período em que os procedimentos de coleta e processamento não eram padronizados. Também, deve-se considerar que esses sucessos iniciais foram seguidos por repetidas falhas na cultura da levedura. É importante ressaltar que a oitava amostra (Nina) para produzir células cultiváveis foi coletada e processada usando os protocolos padronizados implementados em 2018. A decisão de incluir o congelamento de uma parte das fezes foi inserida principalmente para conservar o material para futuras análises moleculares. No entanto, no caso da amostra do cão Nina, foram as fezes congeladas, e não a parte ressuspensa em solução fisiológica, que resultou no crescimento das células de *C. guttulatus*. Apesar desse resultado promissor, não obtivemos sucesso na tentativa de cultivo com o material coletado do cão Carmella.

Com base nesses resultados, fica claro que, até que sejam desenvolvidos métodos otimizados para a coleta, armazenamento e transporte das fezes dos cães, a capacidade de cultivar *C. guttulatus* permanecerá um desafio. A incapacidade de cultivar um patógeno é geralmente vista como um impedimento à obtenção de evidências definitivas de seu envolvimento no processo de doença. Nesse contexto, a falta de crescimento em uma cultura pura pode dificultar a execução dos experimentos considerados necessários para confirmar ou refutar os postulados de Koch (ANTONELLI; CUTLER, 2016). No entanto, dificuldades na obtenção de culturas puras não impediram o progresso no estudo de outros microrganismos, incluindo

*Mycobacterium leprae*, *Francisella tularensis* e espécies dos gêneros *Legionella*, *Bordetella* e *Brucella* (LAGIER et al., 2015).

Embora limitado a um único sucesso, o uso de fezes congeladas como fonte de material cultivável de *C. guttulatus* apresenta uma série de vantagens e pode servir de base para um método padronizado de coleta e armazenamento. O interesse em determinar os efeitos do congelamento sobre a viabilidade da microbiota fecal foi estimulado pela necessidade de desenvolver lotes padronizados de fezes para uso no procedimento conhecido como transplante fecal (RAMAI et al., 2019). Este procedimento é amplamente empregado na medicina humana e, em menor grau, na medicina veterinária como tratamento para uma variedade de distúrbios gastrintestinais (CAMMAROTA et al., 2016; CHAITMAN et al., 2019; KIM; GLUCK, 2019). No caso de fezes humanas, dados de dois estudos recentes (TANG et al., 2017; SUMMERS, 2019) demonstraram que os processos de congelamento e descongelamento de amostras fecais não resultaram em alterações significativas na composição ou na viabilidade dos componentes bacterianos da microbiota fecal. Além disso, o congelamento não induziu impactos negativos sobre a eficácia dos tratamentos de transplante fecal. Na ausência de dados, examinando os efeitos do congelamento e descongelamento das fezes sobre os componentes fúngicos da microbiota cultivável, não é possível concluir que as células de levedura responderiam da mesma maneira que as células bacterianas. Ainda são necessárias mais análises sobre esse tópico para melhorar o isolamento de *C. guttulatus*.

O crescimento excessivo de bactérias fecais nas culturas em caldo YPG foi a principal razão para a incapacidade na obtenção *C. guttulatus* a partir de fezes de cães. Conforme relatado por outros autores, uma combinação de pH baixo e CO<sub>2</sub> elevado, juntamente com a inclusão dos antibióticos ampicilina e estreptomicina, foram estratégias utilizadas nas tentativas de inibir ou retardar o crescimento bacteriano. No entanto, oito das 16 amostras positivas para microscopia resultaram em meios de cultura repletos de bactérias no procedimento de cultivo, demonstrando a necessidade de melhorias nesse aspecto que se tornou crítico no estudo. Resultados positivos foram obtidos a partir dos experimentos que avaliaram os impactos de outros antibióticos, sobre o crescimento ou morfologia celular no caldo YPG.

A obtenção de culturas puras é vista como um pré-requisito para a execução da caracterização molecular de um organismo, uma vez que a presença de mais de uma fonte de ácidos nucléicos invalida muitas análises moleculares. Este é particularmente o caso ao usar métodos baseados em PCR que empregam "primers" universais. Tais iniciadores são projetados para permitir a amplificação de um alvo comum a todos os membros de um grupo taxonômico (WHITE et al., 1990; STIELOW et al., 2015). Devido a dificuldades associadas ao cultivo de *C. guttulatus* a partir de fezes de cão, não é surpresa que os dados de caracterização molecular de *C. guttulatus* disponíveis na literatura sejam limitados. Atualmente, apenas duas sequências de 600 pb correspondentes ao domínio D1/D2 do gene 26S rDNA estão disponíveis no GenBank. Essas sequências foram depositadas por pesquisadores noruegueses (número de acesso FJ755179) e brasileiros (número de acesso JQ861266). Ambas as sequências foram determinadas para os "amplicons" gerados usando os "primers" universais (NL1 e NL4), que foram relatados para permitir a amplificação desse alvo da maioria dos fungos conhecidos (KURTZMAN; ROBBETT, 1998). Como resultado, a execução de análises pós-amplificação (mais comumente sequenciamento) de "amplicons" é essencial. A comparação das sequências obtidas dos isolados, norueguês e brasileiro,

demonstrou que estes eram distintos da cepa tipo oriunda de uma cultura recuperada de coelhos nos EUA. Observou-se que o grau de similaridade nucleotídica registrado entre os isolados de cão e de coelho superou o nível esperado para os isolados co-específicos (GJERDE et al., 2009; FLAUSINO et al., 2012). Como resultado, ambos os grupos de pesquisa levantaram a possibilidade de que os isolados de cães representassem uma espécie nova ou uma espécie críptica do gênero *Cyniclomyces*. No entanto, como discutido por Flausino et al. (2012), seria imprudente atribuir muita importância a esses dados, uma vez que há um número limitado de sequências disponíveis em bancos de dados públicos.

Uma reavaliação deste tópico foi realizada no presente estudo, por meio do sequenciamento do domínio D1/D2 do gene que codifica o 26S rDNA, dos 29 isolados cultivados derivados de porquinho-da-índia (n = 1), coelhos (n = 20) e cães (n = 8). Os resultados dessa avaliação confirmaram e ampliaram os achados relatados por Flausino et al. (2012), fornecendo evidências da existência de quatro genótipos distintos, nenhum dos quais compartilhando 100% de similaridade com a sequência proveniente da cepa tipo dos EUA. As sequências foram classificadas em quatro grupos denominados “sequence types” (STs), que apresentaram um valor máximo de similaridade de 98,8% (ST3) e um valor mínimo de similaridade de 90,6% (ST4) em relação à sequência da cepa tipo. O genótipo ST4 foi registrado exclusivamente para os quatro isolados recuperados de coelhos (RC10, RC16, RC17 e RC19) e que demonstraram uma morfologia atípica da colônia e uma taxa de crescimento mais lenta em meio YPG. Apesar de mostrar essas características diferenciais, observou-se que a morfologia celular dos isolados ST4 era indistinguível, quando comparada com os isolados pertencentes aos outros três ST's.

É importante ressaltar que os genótipos ST1, ST2 e ST3 foram registrados nos isolados de cão e de coelho, enquanto o genótipo ST4 foi detectado apenas em coelhos. No entanto, dado o número limitado de culturas obtidas a partir de cão, a possibilidade de que essa variante de sequência também possa estar associada aos cães não deve ser descartada. O nível elevado de divergência da sequência para os isolados ST4 sugeriu que estes não eram *C. guttulatus*. Evidentemente, deve-se considerar que a existência de outra espécie de levedura demonstrando a mesma morfologia microscópica de *C. guttulatus*, poderia servir para complicar ou mesmo invalidar a microscopia como método para a detecção desta levedura.

Nesse contexto, é apropriado falar sobre o estudo de Mandigers et al. (2014), que buscou fornecer uma posição definitiva em relação ao papel de *C. guttulatus* como patógeno (verdadeiro ou oportunista) em cães na Holanda. Nesse estudo, um total de 300 amostras foram coletadas em cães com manifestações gastrointestinais e dentre estes, 57 cães identificados com diarreia e a presença de células de levedura com morfologia compatível com a descrição de *C. guttulatus* identificadas através do exame microscópico. Além disso, os autores relataram o isolamento da levedura diretamente das fezes de seis cães, em ágar Sabouraud Dextrose, um resultado que contradiz os achados de estudos anteriores que descreveram esse meio como inadequado para o isolamento de *C. guttulatus* (FLAUSINO; BARONI, 2009). Mais uma vez, o exame microscópico dessas culturas indicou a presença de células com morfologia compatível com *C. guttulatus*. O DNA foi extraído da levedura cultivada e foi realizado o ensaio de PCR para o gene 26S rDNA, usando os iniciadores universais (NL1 e NL4). Surpreendentemente, nenhuma análise pós-amplificação foi realizada nos produtos gerados pela PCR. A capacidade de amplificação do DNA obtido a partir das culturas,

foi utilizada como evidência para confirmar a detecção de *C. guttulatus* neste trabalho. Infelizmente, essa conclusão foi falha, uma vez que os “primers” universais amplificam o mesmo alvo na maioria dos fungos, incluindo o genótipo ST4 e outras espécies de leveduras reconhecidas como componentes do microbioma dos cães (FOSTER et al., 2013, DWORECKA-KASZAK et al., 2016). As razões para esse descuido não foram explicadas pelos autores. A principal conclusão resultante desse estudo foi que *C. guttulatus* não é um patógeno verdadeiro em cães, mas em um pequeno número de casos de diarreia crônica, pode atuar como um patógeno oportunista. No entanto, essas conclusões devem ser tratadas com cautela, devido à falta da caracterização molecular das amostras e a capacidade de produzir culturas com morfologia compatível com as de *C. guttulatus* em placas de ágar Sabouraud Dextrose. Como tal, pode-se argumentar que, ao contrário de suas afirmações, as questões relacionadas ao potencial de *C. guttulatus* de atuar como patógeno de cães permanecem sem solução.

No entanto, se a microscopia não puder ser aplicada com segurança para a detecção de *C. guttulatus* e se os métodos atuais para a cultura de levedura a partir de fezes de cão são ineficientes, como será possível responder às questões relativas à sua patogenicidade? O sequenciamento de DNA geralmente fornece os meios definitivos para estabelecer a identidade de um organismo. No entanto, a execução da análise por sequenciamento requer um nível de habilidade técnica que não é comumente encontrada no contexto da clínica veterinária pela necessidade de um diagnóstico imediato para definir um tratamento eficaz para o paciente em questão. Além disso, o sequenciamento é caro quando comparado à microscopia ou as técnicas de cultura. Nesse contexto, o sequenciamento de um único “amplicon” (ambas as fitas) por um serviço terceirizado (por exemplo, Universidade de São Paulo) tem um custo de aproximadamente R\$ 70,00 por amostra. A crise financeira em curso que afligiu a pesquisa científica brasileira desde 2015 torna impraticável o uso rotineiro do sequenciamento para muitos laboratórios de pesquisa. Essa situação contrasta com a observada em algumas regiões do mundo, onde os custos de sequenciamento diminuíram nos últimos 15 anos, resultando no amplo uso do sequenciamento como componente padrão da maioria das pesquisas sobre doenças infecciosas e parasitárias, que possam avaliar as espécies encontradas em procedimentos na clínica veterinária.

A execução da análise por sequenciamento dos isolados recuperados no estudo foi considerada essencial para concluir os objetivos propostos, que incluía a caracterização genética entre os isolados. Os dados do sequenciamento produzidos em relação aos “amplicons” do gene 26S rDNA representam a maior coleção de sequências de *C. guttulatus* produzidas até o presente momento e o extenso polimorfismo registrado nessas amostras serviu para estimular e justificar a análise subsequente de marcadores moleculares adicionais. É importante ressaltar que a disponibilidade dos novos dados de sequenciamento dos quatro ST’s, juntamente com a existência de sequências de outras leveduras em bancos de dados públicos, possibilitou o desenvolvimento de métodos independentes do sequenciamento, para a detecção e caracterização de células cultivadas de *C. guttulatus*, incluindo PCR-RFLP, conforme já foi relatado em outras espécies fúngicas (TROST et al., 2004; MIRHENDI et al., 2005; RUOSTA et al., 2019; CORBETT; DE SMIDT, 2019). As sequências dos quatro ST’s foram analisadas *in silico* para avaliar a possibilidade de desenvolvimento de um sistema de PCR-RFLP capaz de identificar *C. guttulatus* em comparação com outras espécies de leveduras relatadas como componentes do microbioma de cães dentro e fora do território brasileiro (BRITO et al., 2009; FOSTER 2013).

Os resultados da análise *in silico* indicaram que um sistema baseado na digestão de “amplicons” (PCR-RFLP) com três enzimas de restrição distintas (*DdeI*, *HaeIII* e *MspI*) produziria padrões de bandas que permitiam a identificação diferencial de *C. guttulatus* das outras espécies de fungos analisadas. Esses achados foram posteriormente confirmados *in vitro*, assim como a capacidade do sistema em distinguir entre alguns dos “sequence types” encontrados no estudo. A enzima *DdeI* gerou um padrão que permite separar ST2 e ST4 de ST1 e ST3. Por outro lado, a enzima *HaeIII* e *MspI* geraram padrões únicos para ST4 sendo que com *MspI* este padrão só foi confirmado com o auxílio do programa gel analyzer, enquanto com *HaeIII* é possível diferenciar visualmente ST1, ST2 e ST3 de ST4. Além disso, a enzima *MspI* forneceu um meio para identificação específica do genótipo ST2 proveniente do isolado de cão (CC4). Todo o processo de amplificação, digestão, eletroforese e análise de padrões de bandas poderia ser executado em um só dia.

No entanto, seria pertinente perguntar se esse método é prático para os médicos veterinários que lidam com casos clínicos suspeitos de infecção por *C. guttulatus*? A resposta é: que seu uso seria limitado no âmbito da clínica veterinária e possivelmente não causaria impacto na escolha do tratamento. Como discutido anteriormente, os clínicos veterinários baseariam sua decisão em manifestações clínicas, evidências microscópicas e cultura do microrganismo, quando necessário para a decisão de iniciar o tratamento com um antifúngico. Normalmente, essa decisão seria tomada após a detecção de células de *C. guttulatus* (50 ou mais células, em cinco lâminas, por campo com aumento de 400X) na suspensão de fezes (MANDIGERS et al., 2014). O problema com o sistema, no contexto do diagnóstico, é a dependência de culturas como fonte de DNA para o ensaio de PCR. O transporte das fezes para um laboratório que realizaria o teste levaria entre 24 a 48 hrs, o crescimento da levedura em YPG exigiria 72 a 96 hrs, com a recuperação de colônias em YPGA demorando mais 72 hrs, a extração de DNA seguida do método de PCR-RFLP exigiria provavelmente 36-48 hrs adicionais, resultando em um processo que pode levar até 10 dias para fornecer uma identificação definitiva da levedura. No entanto, a utilidade do sistema como meio de diagnóstico confirmatório é indiscutível, assim como seu valor como ferramenta para pesquisa básica e aplicada sobre a espécie em questão, *C. guttulatus*.

A dependência da cultura e o fato dos protocolos atuais de cultivo não serem confiáveis acabam criando barreiras que impedem a implementação do diagnóstico molecular das infecções por *C. guttulatus*. No entanto, uma solução para superar esses obstáculos poderia ser o desenvolvimento de sistemas de detecção e identificação independentes de cultura e idealmente também independentes do sequenciamento. Levantou-se a hipótese de utilizar o método de PCR-RFLP para o gene 26S rDNA em situações em que a carga de levedura era alta (pelo menos  $10^6$  células por grama de fezes). Tais níveis são compatíveis com a observação de 1-5 células por campo microscópico e são representativos das observações feitas nas fezes cedidas pelos clínicos veterinários ao longo do estudo.

A principal dificuldade associada ao uso de testes baseados em ácidos nucleicos (principalmente a PCR), para detectar DNA de patógenos no DNA total extraído de fezes, é a presença de substâncias (orgânicas e inorgânicas) que, ao mesmo tempo, são copurificadas com o DNA e inibem, parcial ou totalmente, a amplificação das sequências alvo (SCHRADER et al., 2012). O teste de sensibilidade da PCR para o gene 26S rDNA demonstrou que ela poderia detectar a sequência alvo quando uma quantidade de pelo menos 100 fg de DNA (purificado a partir de culturas puras de *C.*

*guttulatus*) era utilizada como molde. Essa quantidade de DNA é equivalente a três células de levedura, com base no valor de 34 fg de DNA por célula de *Saccharomyces cerevisiae*, conforme relatado por Sherman (2002). Por um lado, considerou-se provável que a PCR não apresentasse problemas para amplificar o alvo 26S em amostras fecais contendo  $10^6$  células de *C. guttulatus* por grama de fezes. Por outro lado, um problema em potencial seria a presença de células de outras espécies fúngicas, também gerando “amplicons” que, após a digestão, poderiam mascarar ou pelo menos complicar a interpretação dos perfis de bandas.

A escolha do método para extração de DNA é reconhecida como sendo uma primeira etapa crítica em qualquer procedimento para examinar material biológico (fezes, solo, sangue, tecido), para a presença de DNA microbiano / parasitário (FIEDOROVA et al., 2019). A explosão do interesse no estudo do microbioma intestinal, que ocorreu nos últimos 15 anos, resultou na publicação de inúmeros estudos (WESOLOWSKA-ANDERSEN et al., 2014; MATHAY et al., 2015; GREATHOUSE et al., 2019) que investigam o tópico da extração de DNA fecal e a avaliação dos inúmeros sistemas comerciais de extração, os “kits”. No entanto, antes da adoção dos “kits”, a maioria dos estudos moleculares que utilizavam material fecal empregavam métodos “caseiros” de extração de DNA, baseados principalmente na lise de células microbianas com detergentes, seguida pela purificação e isolamento de DNA usando solventes orgânicos, mais frequentemente fenol e clorofórmio. O resultado de numerosos estudos demonstrou que os “kits” oferecem melhorias no rendimento de DNA e, mais importante, fornecem remoção mais eficaz de inibidores, do que pode ser alcançado com o método fenol / clorofórmio. Infelizmente, o desempenho aprimorado tem um custo elevado. Atualmente, o custo por amostra utilizando “kits” é de aproximadamente R\$ 40,00 por amostra, enquanto os custos com fenol / clorofórmio estão na faixa de R\$ 2,50 por amostra.

Devido às restrições financeiras enfrentadas no país, considerou-se necessário avaliar o protocolo de extração por fenol / clorofórmio como uma alternativa econômica para a extração de DNA fecal baseada em “kits”. O suporte para essa decisão foi o fato de que a PCR para o gene 26S rDNA era altamente sensível, e que a quantidade de DNA alvo seria suficiente em uma amostra contendo  $10^6$  células por grama de fezes. Infelizmente, os resultados da comparação entre o protocolo de fenol / clorofórmio (usado neste estudo para extrair DNA de culturas puras de células de levedura) e o *kit* “Quick DNA Fecal / Soil Microbe Miniprep” demonstraram superioridade do *kit* e, por esse motivo, todos os experimentos subsequentes empregaram este método para extração de DNA a partir de material fecal.

O uso de amostras adulteradas “spiked” representa uma estratégia comum no desenvolvimento de PCR e outros ensaios baseados em biologia molecular para detecção de patógenos em material biológico (ARASTEHFAR et al., 2019; WOLF et al., 2020). Os resultados obtidos nos experimentos baseados na adulteração de 15 amostras de fezes de cão, consideradas negativas para a presença de *C. guttulatus*, parecem confirmar a hipótese de que o sistema de PCR-RFLP para o alvo 26S rDNA possa ser empregado para a detecção direta e caracterização de *C. guttulatus* em amostras de fezes que continham pelo menos  $10^5$  células por 150 mg de fezes, ou seja, a quantidade máxima de fezes que pode ser processada utilizando o respectivo kit. Uma comparação da intensidade de bandas registradas para as amostras adulteradas com  $10^5$  células e das amostras fecais não adulteradas mostrou que, em todos os casos, a quantidade de “amplicons” era muito maior nas amostras adulteradas. No entanto, o

mesmo efeito não foi observado no caso de fezes adulteradas com  $10^3$  células.

A análise dos padrões de digestão gerados dos “amplicons” produzidos a partir das fezes não adulteradas revelou a presença de numerosas bandas, consistentes com a amplificação do alvo de diferentes espécies fúngicas. Os mesmos perfis foram registrados nas amostras com  $10^3$  células, com evidências apenas limitadas da presença de bandas que podem ter sido originadas pela digestão de “amplicons” de *C. guttulatus*. No entanto, essa possibilidade não pôde ser confirmada. Por outro lado, as fezes adulteradas com  $10^5$  células produziram padrões de bandas claros e compatíveis com os previstos para *C. guttulatus*, e ausência das bandas observadas nas amostras não adulteradas. Esta observação foi interpretada como resultante da produção de grandes quantidades de “amplicons” (produzidos a partir da grande quantidade de DNA extraído das  $10^5$  células de *C. guttulatus*), durante os ciclos iniciais da PCR, que essencialmente saturavam a reação, resultando na amplificação limitada das quantidades substancialmente mais baixas de DNA associadas às outras espécies de fungos presentes nas fezes. O fato desse fenômeno não ocorrer na presença de  $10^3$  células de *C. guttulatus* indicam que o método de PCR-RFLP para o gene 26S rDNA só teria valor quando aplicado em amostras nas quais *C. guttulatus* era o componente predominante do microbioma.

A aplicação do método de PCR-RFLP para o gene 26S rDNA para a análise das amostras fecais “clínicas” (positivas para *C. guttulatus* por microscopia, mas que não geraram culturas) produziu dados que contradiziam os dos experimentos de “spiking”. Deste modo, foi observada uma forte amplificação do produto de 630 pb em todas as amostras, mas, após digestão dos “amplicons”, a presença de bandas derivadas de *C. guttulatus* não puderam ser facilmente diferenciadas das outras bandas presentes nas amostras. Presumiu-se que essas bandas fossem derivadas de “amplicons” gerados a partir de outros componentes do microbioma.

Esse resultado foi inadequado e inesperado, pois todas as amostras continham pelo menos  $10^6$  células por grama de fezes com base nos números de células vistos nos exames microscópicos. A explicação mais provável para a incapacidade do DNA de *C. guttulatus* em saturar a reação (como foi evidenciado nos experimentos de “spiking”), foi a presença de um número maior de espécies fúngicas nas amostras clínicas do que nas fezes (oriundas de cães saudáveis) utilizadas nos experimentos de “spiking”. É possível que as condições fisiológicas que permitiram o crescimento de *C. guttulatus* nas amostras clínicas também tenham influenciado no crescimento de outras espécies de fungos. Como resultado, o ensaio 26S produziu grande quantidade de “amplicons” que subsequentemente geraram padrões complexos de bandas na digestão com as endonucleases de restrição.

Com base no desempenho do ensaio de PCR-RFLP para o gene 26S rDNA em fornecer um meio de detecção direta de *C. guttulatus* nas fezes de cães, foram realizados experimentos usando um alvo que se considerou como específico para *C. guttulatus*. A sequência selecionada como alvo foi o gene que codifica a subunidade 1 da RNA polimerase II (*RPB1*). A natureza única dessa sequência, em relação àquelas depositadas no GenBank para outras espécies de leveduras, foi confirmada em uma pesquisa no BLAST. Especificamente, foi detectado o nível máximo de similaridade de sequência de 82%, um nível mostrado em diferentes espécies, incluindo: *Naumovozyma castellii*, *Naumovozyma dairenensis*, *Kazachstania unispora*; *Torulaspora delbrueckii* e *Kazachstania viticola*. O alinhamento da sequência de *C. guttulatus* com as 18 sequências que mostraram maior semelhança foi utilizado para

identificar regiões com pelo menos 20 pb dentro da sequência de *C. guttulatus* que mostrassem no máximo 60% de similaridade de nucleotídeos com qualquer uma das outras sequências. Um número limitado de sites foi detectado e os “primers” foram desenhados manualmente. A análise *in silico* da compatibilidade descartou a maioria das combinações possíveis de “primers”. Dois pares de iniciadores, previstos para serem funcionais *in silico*, mostraram-se altamente específicos para *C. guttulataus* também *in vitro*. O primeiro par gerou um “amplicon” de 631 pb, enquanto o segundo par que foi projetado para anelar internamente no produto de 630 pb do primeiro par produziu um “amplicon” de 395 pb. Nenhuma combinação gerou “amplicons” a partir do DNA extraído das culturas caracterizadas como ST4 com base na sequência 26S rDNA.

Uma comparação da sensibilidade da PCR para *RPBI* externo e da “nested” PCR (com base em 35 ciclos de amplificação do primeiro ciclo, seguidos de 25 ciclos utilizando os iniciadores internos), foi feita com a PCR para o gene 26S rDNA. Observou-se que a PCR 26S rDNA foi mais sensível (amplificando o alvo quando 100 fg de DNA de *C. guttualtus* foi utilizado como molde), do que a PCR para *RPBI* utilizando os “primers” externos. No entanto, o ensaio “nested” mostrou uma sensibilidade equivalente a do ensaio 26S rDNA. Deve-se lembrar que o gene que codifica o 26S rDNA está presente em várias cópias no genoma da maioria das espécies de leveduras examinadas até o momento, enquanto a sequência *RPBI* foi registrada com mais frequência como um gene de cópia única (por genoma) (TEDERSOO et al., 2016). Essa diferença explica a sensibilidade superior (quando são utilizados números equivalentes de células) do ensaio 26S rDNA.

A sensibilidade registrada para a primeira rodada (externa) da PCR para *RPBI* pode ser considerada suficiente para garantir a amplificação das amostras a partir de  $10^5$  células em cada 150 mg de fezes. No entanto, o uso do ensaio “nested” forneceria um segundo nível de confirmação para resultados positivos no primeiro ensaio e ofereceria a possibilidade de detectar amostras com apenas  $10^3$  células em 150 mg de fezes. O uso da “nested” PCR oferece vantagens em relação a ensaios de rodada única, incluindo aumento de especificidade e sensibilidade (GENC et al., 2010). No entanto, o uso rotineiro da “nested” PCR em ambientes de diagnóstico apresenta um risco aumentado para a detecção de falsos positivos devido a problemas de contaminação (HU, 2016).

As vantagens da PCR-RFLP (em termos de custo e tempo) em relação ao sequenciamento foram claramente demonstradas com o ensaio 26S rDNA e o desenvolvimento de sistemas de PCR-RFLP para os produtos gerados a partir dos dois ensaios para *RPBI* foi considerado necessário e importante. O desenvolvimento desses sistemas seguiu os mesmos passos que os empregados para o método 26S rDNA. Dados produzidos a partir do sequenciamento de “amplicons” gerados dos isolados representativos pertencentes aos genótipos ST1, ST2 (isolados de coelho e de cão) e ST3, foram utilizados para análises *in silico* para identificar enzimas de restrição que produzissem padrões de bandas específicos para identificação de *C. guttulatus*. Com base nessa análise, as enzimas *Hind*III (PCR externa) e *Rsa*I (PCR externa e “nested”) foram vistas como possíveis para fornecer perfis que identificassem todos os isolados como *C. guttulatus*. O uso da enzima *Msp*I permitiu diferenciar a sequência ST2 de cão dos três outros ST’s. A análise *in vitro* utilizando “amplicons” produzidos a partir de 29 isolados cultivados confirmou os dados previstos nas análises *in silico*.

A avaliação do método de PCR-RFLP para *RPB1*, foi realizada utilizando as mesmas amostras adulteradas e as amostras clínicas examinadas utilizando o método de PCR-RFLP para o gene 26S rDNA. Os resultados com as fezes “spiked” utilizando apenas a PCR externa foram compatíveis com os encontrados no método do 26S rDNA. No entanto, a “nested” PCR mostrou-se mais sensível, permitindo a detecção e caracterização de *C. guttulatus* em todas as 15 amostras adulteradas com  $10^3$  células do isolado de cão CC8 (ST1). A aplicação subsequente dos dois sistemas às amostras clínicas demonstrou que a maioria das amostras foi positiva para a presença de *C. guttulatus* (confirmando a análise microscópica). A utilização da “nested” PCR confirmou os resultados da PCR externa e demonstrou que as amostras que não haviam produzido uma quantidade de produto de PCR detectável na PCR externa eram de fato positivas para *C. guttulatus*.

Dois resultados específicos são particularmente merecedores de atenção. Primeiramente, a amostra de fezes que foi coletada (após a terapia antifúngica) do cão Nina foi negativa nas duas PCR's para *RPB1* externa e “nested”. Essa observação indicou que o método de PCR-RFLP têm o potencial de servir como método para avaliar a eficácia dos tratamentos antifúngicos. Além disso, os resultados da PCR confirmaram o status negativo (baseado em microscopia), registrado pelo veterinário que avaliou as fezes. O segundo resultado foi a caracterização de duas amostras (provenientes das fezes coletadas nos cães Kiara e Carmella) como representativas do genótipo ST2 de cão. As outras seis amostras foram classificadas como ST1 ou ST3. Esses valores corroboraram os achados obtidos na análise genética (sequenciamento dos amplicons 26S rDNA) dos isolados de cão cultivados, onde a maioria (7 / 8) foi registrada como ST1 ou ST3 e apenas um isolado (CC4) foi identificado como ST2.

O desenvolvimento de um sistema inovador de detecção e caracterização, que utilizaria o DNA extraído diretamente das fezes de cão como molde, representou um avanço significativo no estabelecimento de um método de diagnóstico rápido, econômico e reprodutível, que tem potencial para ser aplicado ao manejo prático de casos suspeitos de doença gastrointestinal associada a *C. guttulatus*. Em comparação ao método dependente de cultura, o método independente de cultura ofereceria uma redução significativa no “tempo de resposta” necessário para fornecer aos veterinários um diagnóstico confirmado da presença de *C. guttulatus*. Além disso, fornece um meio de produzir material para análises baseadas em sequências nos casos onde a cultura não é possível. Tais informações podem contribuir para melhorias no entendimento da epidemiologia e de outros aspectos da biologia de *C. guttulatus*.

Foi interessante observar que, como para o gene 26S rDNA, o fragmento de 631 pb da PCR *RPB1* também demonstrou um elevado grau de variação de nucleotídeos. A observação de que as sequências ST1 e ST3 eram muito semelhantes não foi totalmente inesperada. Por outro lado, a notável divergência entre os isolados ST2 recuperados de coelhos e o isolado de cão (CC4) foi considerada particularmente interessante e acrescentou suporte à análise genética do 26S rDNA que indicava a possível existência de mais espécies dentro do gênero *Cyniclomyces*.

A incapacidade dos “primers” externos ou da “nested” PCR em gerar “amplicons” a partir dos isolados classificados como ST4 (com base no sequenciamento de gene 26S rDNA) forneceu mais evidências para considerar esses isolados como representativos de uma levedura que não seja *C. guttulatus*. Como discutido em relação aos dados microscópicos, o fato de o isolado ST4 ainda não ter sido identificado em amostras de cães pode simplesmente refletir o número limitado de

amostras examinadas até o momento. Portanto, a possibilidade de ser detectada em cães no futuro, com base na cultura e sequenciamento do 26S rDNA, não pode ser descartada. Se isso acontecer, seria vantajoso ter um sistema que possa identificar diretamente das fezes quando a cultura não for possível.

Como discutido no início desta seção, o objetivo da investigação não foi determinar se *C. guttulatus* é um patógeno de cães. O objetivo deste estudo foi desenvolver métodos, baseados na aplicação da biologia molecular, que sirvam para melhorar a detecção dessa levedura em material clínico obtido de cães com sinais de doença gastrointestinal, bem como de animais que não manifestam esses sintomas. A aplicação cuidadosa desses métodos em estudos futuros, feito para investigar a participação de *C. guttulatus* nos processos de saúde / doença, fornecerá aos clínicos veterinários a oportunidade de resolver pelo menos alguns dos enigmas que cercam esta levedura.

Um componente importante da estratégia experimental projetada no início deste trabalho, foi a suposição (baseada nos dados limitados de sequenciamento disponíveis) de que *C. guttulatus* é o único membro do gênero *Cyniclomyces*. No entanto, no processo de aquisição de sequências para uso no desenvolvimento dos sistemas de PCR-RFLP, foram encontradas evidências, com base na detecção de polimorfismo extensivo de nucleotídeos inter-isolados, quanto à existência de duas espécies adicionais desta levedura. Em resposta a esses dados, uma análise de múltiplas sequências foi realizada e analisada abaixo.

A taxonomia, sistemática e filogenética dos ascomicetos têm sido e continuam sendo objeto de inúmeros estudos (SCHOCH et al., 2009; IRINYI et al., 2016). Embora empregada para uma variedade de propósitos, a análise molecular da variação genética em fungos é frequentemente empregada na resolução de espécies (VU et al., 2016). Para decidir se uma cepa pertence a uma determinada espécie, é importante conhecer a semelhança das cepas dentro dessa espécie. A semelhança das linhagens dentro das espécies de leveduras foi estudada anteriormente em diversos estudos, dentre os quais se destacam os estudos marcantes de Kurtzman e Robnett (1998), incluindo a análise de 500 espécies de leveduras, Fell et al. (2000) com 337 linhagens de 230 espécies de leveduras e Scorzette et al. (2002) em 450 linhagens de 242 espécies de leveduras.

Dois abordagens são comumente utilizadas na micologia para identificação de fungos com base no sequenciamento: DNA “barcoding” utilizando a região ITS e taxonomia molecular baseada no alinhamento de sequências que utilizam um ou vários genes, empregando ferramentas de bioinformática para construção de árvores estimando as relações filogenéticas (XU, 2016). No DNA “barcoding”, se compara uma sequência desconhecida com um banco de dados de sequências conhecidas, como o GenBank e identifica-se as espécies com base na similaridade entre as sequências (VU et al., 2016). Alternativamente, na taxonomia molecular, o usuário tem como objetivo identificar uma espécie desconhecida, colocando-a em uma estrutura evolutiva com outras sequências homólogas, usando uma abordagem filogenética (WU et al., 2019). É importante perceber que alguns “barcoding”, devido à sua rápida evolução e, portanto, alta divergência nos níveis taxonômicos mais baixos (espécie e gênero), não são úteis para a reconstrução filogenética em níveis mais profundos (família ou ordem). Em 2012, o “International Fungal Barcoding Consortium” formalmente recomendou que a região ITS (espaçador interno transcrito) do DNA ribossomal fosse utilizada como o principal “barcode” fúngico (SCHOCH et al., 2012). Desde então, o número de espécies, incluindo muitas que nunca foram cultivadas, mas foram identificadas usando o

“barcode” aumentou exponencialmente de algumas centenas em 2012 para muitos milhares em 2019 (WU, 2019). A utilidade e a facilidade de aplicação deste método são claramente exemplificadas pelo estudo de Vu et al. (2016), que relatou a análise do “barcode” de DNA em mais de 9000 isolados de leveduras, com base no sequenciamento da região ITS e domínio D1/D2 do gene 26S rDNA.

A escolha dessas sequências foi baseada na observação de que a maioria das espécies de leveduras mostrou menos de 1% de divergência nas regiões ITS ou na subunidade maior do ribossomo 26S (KURTZMAN; ROBNETT, 1998). Idealmente, os “barcodes” devem ser exclusivos para uma única espécie e constantes dentro de cada espécie para garantir a consistência da identificação (HEBERT et al., 2003). Não é surpreendente que, à medida que o uso desses métodos tenha aumentado, foram sendo encontradas exceções à previsão de 1% ou mais de divergência dos nucleotídeos entre as espécies para as sequências D1/D2 e ITS (XU, 2016; WU et al., 2019). No geral, espécies de importância médica mostram uma baixa variabilidade intra-específica na região ITS e, conseqüentemente, o sequenciamento da região ITS pode ser usado para a identificação da maioria delas. Diversidades intra-específica excepcionais de 1,5% a 2% foram encontradas em quatro espécies, *Candida intermedia*, *Galactomyces candidus*, *Fusarium solani* e *Kodamaea ohmeri* e mais de 2% em duas espécies *Lichtheimia ramosa* e *Clavispora lusitaniae* (LACANCHE et al, 2003; IRINYI et al., 2015), considerando esses resultados e a probabilidade de outras exceções, que sem dúvida serão encontradas no futuro. O mesmo grupo de micologistas selecionou o gene que codifica o fator de alongamento de tradução 1 (TEF1) como um “barcode” de DNA secundário para fungos (STIELOW et al. 2015). No entanto, em comparação com o ITS “barcode”, o uso desse marcador por micologistas tem sido limitado (MEYER et al., 2018).

O baixo número de sequências, depositadas em bancos de dados públicos, derivadas de isolados de *C. guttulatus*, serviu para impedir qualquer tentativa de avaliar a variabilidade genética dentro dessa espécie ou testar a afirmação de que *C. guttulatus* é a única espécie do gênero *Cyniclomyces*. No entanto, a singularidade da cepa tipo (Y-17561), entre os ascomicetos, foi determinada a partir da análise filogenética de máxima parcimônia das sequências genéticas concatenadas de 18S rRNA, 26S rDNA e fator de alongamento de tradução-1a (KURTZMAN; ROBNETT, 2013).

A análise das múltiplas sequências produzidas neste estudo, incluindo a região *COII* e ITS para as quais não há sequências disponíveis da cepa tipo, forneceu evidências da existência de três espécies distintas no gênero *Cyniclomyces* e sugerem a existência de duas espécies adicionais. Como discutido anteriormente, a observação dos pesquisadores brasileiros e noruegueses de que as sequências D1/D2 derivadas de isolados de cão apresentaram divergência nucleotídica superior a 1% em comparação com a sequência depositada para a cepa do tipo (FLAUSINO et al., 2012), sugerindo a existência de mais espécies de *Cyniclomyces*. Essa sugestão foi reforçada pela análise das sequências D1/D2 obtidas dos isolados recuperados no presente estudo. Especificamente, observou-se que as culturas típicas coletadas de cães, coelhos e porquinho-da-índia podem ser agrupadas em três tipos distintos de sequência (ST1, ST2, ST3). Além disso, as culturas atípicas recuperadas de coelhos formaram um quarto tipo de sequência (ST4), considerado uma nova espécie, que possivelmente poderia pertencer a um novo gênero.

A análise comparativa das sequências de 18S rRNA confirmaram as limitações deste marcador para a identificação ao nível de espécie (XU, 2016). No entanto, a observação de que as sequências derivadas dos isolados de ST4 apresentaram 98% de semelhança de nucleotídeos com a sequência da cepa tipo, indicou que eram membros do gênero *Cyniclomyces*. Um suporte para esta afirmação foi fornecido pelos resultados de uma pesquisa BlastN utilizando a sequência da cepa tipo, que demonstrou que o nível máximo de similaridade em relação aos outros gêneros de ascomicetos foi de 92%.

Os níveis de similaridade de nucleotídeos registrados para as sequências *RPB2* e *COII* derivadas dos isolados de ST4 foram de 89% (em comparação com a sequência da cepa tipo *RPB2*) e de 95,5% em comparação com a sequência de *COII* determinada para o genótipo ST1. Esses valores forneceram um suporte adicional para a classificação do ST4 como uma nova espécie. Não haviam dados disponíveis para a sequência *RPB1*, dos isolados ST4, uma vez que os iniciadores utilizados neste estudo falharam na amplificação a partir de seu DNA. A comparação das sequências ITS, produzidas a partir dos isolados ST4, com uma sequência da cepa tipo não foi possível. Entretanto, a comparação com as sequências ITS obtidas para os outros ST's revelou um nível máximo de similaridade de 73% com o genótipo ST2 apoiando o *status* de nova espécie dos isolados ST4.

As sequências ST1 e ST3 indicaram graus de variação semelhantes em relação aos dois genes ribossomais (18S e 26S) e às três sequências codificadoras de proteínas (*COII*, *RPB1*, *RPB2*), sem dados que sugiram que representem espécies distintas. Por outro lado, os resultados da análise comparativa das sequências ITS demonstraram um nível de divergência de 6%, concentrada inteiramente na porção ITS1 da sequência. Esse valor excedeu em muito o limite de divergência amplamente utilizado de 1,5%, empregado para definir isolados co-específicos para a maioria das espécies fúngicas. Além disso, esse valor era duas vezes maior do que o valor de divergência de 3% que foi revisto para algumas espécies fúngicas (XU, 2016). Utilizando-se esses critérios, poderia se justificar a afirmação de que os isolados ST3 seriam uma nova espécie. No entanto, existe uma crescente percepção entre os micologistas de que todas as abordagens baseadas em análises de sequência de DNA (medidas de similaridade, relações filogenéticas e identificação com base na comparação direta de sequências) utilizadas para determinar a eficácia do DNA "barcode", apresentam limitações (BADOTTI et al., 2017; SUNDARESAN et al., 2019) simplesmente descrevendo novas espécies baseadas em um único valor de divergência de sequência provavelmente causada a superestimção do número de espécies fúngicas. Em uma tentativa de reduzir a identificação incorreta de novas espécies fúngicas, foram feitos esforços para produzir maiores quantidades de dados de sequências de ITS, que foram despositadas nos bancos de dados globais aumentando assim o conhecimento e as fontes de comparação na identificação de novas espécies (VU et al., 2016; SUNDARESAN et al., 2019). Além disso, em um esforço para aumentar a robustez na delimitação filogenética utilizando sequências ITS, as regiões ITS1 e ITS2 foram ainda mais exploradas como sequências individuais (YANG et al., 2018; WU et al., 2019). Os resultados desses estudos indicaram que a região ITS2 é filogeneticamente mais informativa que a região ITS1. A importância dessa observação para o caso específico das sequências ST3 é óbvia, uma vez que as sequências ITS2 eram idênticas entre ST1 e ST3 e isso sugere que elas não representariam espécies diferentes. É importante ressaltar que este resultado demonstrou a necessidade de olhar além dos números de "%" de similaridade e destacou o valor da realização da análise de variância nucleotídica (número e posição

específica dos nucleotídeos variantes), como a que foi conduzida com as sequências produzidas neste estudo.

Em contraste com a situação com ST3, o uso do ITS “barcode” demonstrou claramente que os isolados de ST2 devem representar uma nova espécie. Os níveis de divergência nucleotídica registrados em toda a sequência ITS, para as três sequências ST2 (em comparação com ST1), estavam entre 12 e 14%. Além disso, os valores registrados para a região ITS1 variaram de 11 a 13%, com níveis de divergência entre 19 e 23% registrados para as sequências ITS2. No entanto, a possibilidade do grupo ST2 representar duas espécies distintas foi levantada com base nas comparações diretas entre as três sequências ST2 (incluindo a sequência de número de acesso GenBank EF464552). Esta conclusão foi baseada no valor de divergência de 3,5% (registrado para toda a região ITS), quando as sequências DST2 (cão) e RST2 (coelho) foram comparadas. A avaliação detalhada da variação de nucleotídeos demonstrou que os isolados de cão (DST2) apresentaram 22 diferenças para a sequência de coelho (RST2) com a maioria (12 diferenças) localizada na sequência ITS2 (232 pb), resultando em um valor de divergência de 5,2%. Com base nas críticas e nas limitações do ITS “barcode” e dada a falta de uma sequência de cepa tipo, a classificação de DST2 e RST2 em espécies separadas seria especulativa. No entanto, um suporte adicional a essa hipótese foi dado pela análise da variação nucleotídica específica nas sequências *RPB1*. Primeiramente, a diferença no nível de similaridade da sequência (em comparação com a sequência da cepa tipo) foi de 2,2%, onde RST1 mostrou 98,3% de similaridade com a cepa tipo (JQ713018) e as sequências DST1 mostraram 96,1%. Em segundo lugar, apenas quatro em um total de 35 diferenças de nucleotídeos (mostrada na sequência JQ713018) eram comuns às sequências RST2 e DST2. Como uma ressalva, apenas uma sequência de cão, gerada a partir do isolado CC4, estava disponível para uso nesta análise. Como tal, deve-se ter cuidado antes de atribuir muita importância a esses dados. Nesse contexto, as sequências *COII* e *RPB2* de RST2 e DST2 eram idênticas. Claramente, a resolução desta questão exigirá a aquisição de mais sequências de isolados mostrando o genótipo ST2 para o domínio D1/D2 do 26S rDNA. Foi interessante observar que o uso do sistema PCR-RFLP para *RPB1* forneceu evidências (na ausência das culturas) para a presença de isolados de DST2 nas fezes de dois cães analisados. Experimentos serão realizados para sequenciar o gene *RPB1* dessas amostras e, se possível, obter as sequências para marcadores adicionais. Amostras de fezes de ambos os animais foram negativas para a cultura, utilizando os protocolos atuais, devido ao crescimento bacteriano. No entanto, seria necessário investigar a possibilidade de obter culturas a partir das fezes congeladas, utilizando antibióticos alternativos como forma de reduzir o crescimento bacteriano.

Evidentemente, a existência de pelo menos três e, possivelmente, cinco espécies distintas de *Cyniclomyces* apresenta uma série de novos problemas para os pesquisadores que tentem confirmar ou refutar o papel de *C. guttulatus* como patógeno.

A análise das sequências realizada neste estudo forneceu dados robustos e reprodutíveis. No entanto, o aumento do uso desses métodos por micologistas revelou que muitos dos argumentos empregados em 2012, para justificar a escolha da sequência ITS como “barcode” universal para fungos, não estavam corretos. De fato, há uma crescente percepção de que uma abordagem “one-size fits all” (tamanho único) não funciona, e que muitos fungos não seguem as regras que os seres humanos tentaram aplicar a eles (VU et al., 2017; SUNDARESAN et al., 2019). As tentativas de resolver isso usando “barcodes” secundários obtiveram algum sucesso, mas os custos adicionais

associados ao sequenciamento de um segundo gene serviram para limitar a adoção dessa abordagem de dois ou mais marcadores (WU et al., 2019). Encontrar soluções para essas limitações representa um dos maiores desafios enfrentados pela micologia no século XXI.

Na ausência dessas soluções, pesquisas futuras sobre a especiação em *C. guttulatus* utilizando o material genético produzido neste estudo devem ser conduzidas da seguinte forma: obter sequências de alguns isolados que permitam uma investigação mais profunda da variação da sequência inter-isolado, e obter sequências de marcadores adicionais (por exemplo, fator de alongamento de tradução 1) que foram propostos para superar algumas das limitações do ITS “barcode” (XU, 2016; MEYER et al., 2019). A execução de análises filogenéticas também será necessária para permitir a compreensão sobre a relação evolutiva dos isolados e identificar possíveis exemplos / influências de co-especiação, troca de hospedeiros, hibridação, rearranjo cariotípico e mecanismos epigenéticos, conforme relatado para outras espécies de fungos (GIRAUD et al., 2008; EBERLEIN et al., 2019).

O maior mal-entendido a respeito da ciência por parte do público é de que os cientistas resolvem problemas; na realidade, os cientistas estão principalmente preocupados em criá-los. Como resultado, definir o que constitui um bom problema científico tem sido objeto de muita discussão (MACHADO; SILVA, 2007; ALON, 2009). No entanto, um dos aspectos mais importantes de um bom problema científico é que ele gera mais problemas (idealmente, bons), os quais só podem ser resolvidos com mais pesquisas (YANAI, LERCHER, 2019). Com base nesse critério, os problemas investigados neste estudo foram claramente bons. Como afirmado no início desta discussão, *C. guttulatus* é um enigma. Os dados relatados neste estudo tentaram desvendar alguns dos mistérios que envolvem essa levedura.

A questão agora é: Qual será o impacto desses achados? Por um lado, prevê-se que a publicação de métodos inovadores desenvolvidos para a detecção e caracterização aprimoradas de *C. guttulatus* servirá para estimular o interesse da comunidade veterinária, dentro e fora do território do brasileiro, e esperançosamente resultar em mais atenção ao potencial papel desta levedura nos casos de doenças gastrointestinais de cães. Por outro lado, a publicação dos dados em relação à variação genética e a possível existência de várias espécies de *Cyniclomyces*, deve ser interessante para a comunidade da micologia veterinária e pode resultar em um ressurgimento do interesse na biologia dessa levedura.

## 6 CONCLUSÕES

Concluiu-se que os resultados desta investigação cumpriram o objetivo principal do estudo, que foi o de desenvolver métodos que pudessem superar algumas das barreiras (dificuldade na cultura e dados genéticos limitados) que retardavam o progresso na resolução do problema maior que é: "*Cyniclomyces guttulatus* é um patógeno de cães?".

Os dados moleculares confirmaram os resultados obtidos no exame microscópico direto das fezes de cães quanto à presença de células de levedura, com morfologias compatíveis com a descrição de *C. guttulatus*, sendo um método fundamental para a detecção desse potencial patógeno e desenvolvimento dos métodos ao longo da tese.

Os protocolos existentes para o isolamento e manutenção de culturas de *C. guttulatus* são ineficientes devido ao crescimento excessivo de bactérias fecais contaminantes. Atenção especial deve ser dada à resolução das deficiências nos métodos atuais para cultivo dessa levedura.

*Cyniclomyces guttulatus* pode ser cultivada a partir de fezes congeladas e as culturas podem ser mantidas por longos períodos a 4°C em caldo YPG ou como colônias isoladas em placas de YPGA.

É possível detectar a presença de *C. guttulatus* em amostras de fezes de cão e coelho através da aplicação de métodos moleculares simples como o PCR-RFLP, de modo independente de cultura e com potencial para auxiliar no diagnóstico da presença desse possível patógeno.

Os protocolos de PCR-RFLP direcionados às sequências 26S rDNA e *RPBI* representam alternativas inovadoras, econômicas e rápidas em relação ao sequenciamento para a identificação e filogenia dos isolados de *C. guttulatus*.

O sistema de PCR-RFLP baseado na “nested” PCR para *RPBI* pode detectar e caracterizar até 20 células de *C. guttulatus*, diretamente das fezes de cães, dentro de 24 horas após o recebimento de uma amostra fecal.

Há evidências de que o gênero *Cyniclomyces* não é constituído de uma única espécie. Parecem existir espécies distintas em cães e coelhos. E uma terceira espécie em potencial também foi detectada exclusivamente em coelhos. A possível existência de mais duas espécies foi caracterizada ao usar o ITS “barcode”.

*Cyniclomyces* ainda é um enigma.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADANE, M., GEBREYOHANNES, M., GEBREYOHANNES, G., A Brief Review on Molecular Diagnostic Tools: Principles, Application and Limitations, **Advances in Biological Research**, v. 10, n. 6, p. 388-397, 2016.
- ALMEIDA, F., RODRIGUES, M.L., COELHO, C., The still underestimated problem of fungal diseases worldwide, **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 214, 2019.
- ALON, U. How to choose a good scientific problem. **Molecular Cell**, v.35, n. 6, p.726-728, 2009.
- ALVES, P.V., VASCONCELOS, J.G., GOMES, K.E.P., MAGALHÃES, H.K.N., CAMELO, K. da S., NETO, R.L.V. Infecção Por *Cyniclomyces guttulatus* Em Cão **Ciência Animal**, v.28, n.4, p.71-73, 2018.
- ANTONELLI, G., CUTLER, S. ,Evolution of the Koch postulates: towards a 21st-century understanding of microbial infection, **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 7, p. 583-584, 2016.
- ANVISA. **Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica**. Manual da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Módulo VII, 2004. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)>.
- ANVISA. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, v.9, p. 47, 2010. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)>.
- ARASTEHFAR, A., FANG, W., DANESHNIA, F., AL-HATMI, A.M., LIAO, W., PAN, W., KHAN, Z., AHMAD, S., ROSAM, K., LACKNER, M., LASS-FLÖRL, C., Novel multiplex real-time quantitative PCR detecting system approach for direct detection of *Candida auris* and its relatives in spiked serum samples, **Future Microbiology**, v. 14, n. 1, p.33-45, 2019.
- ARENAS, R., SÁNCHEZ-CARDENAS, C.D., RAMIREZ-HOBAK, L., RUÍZ ARRIAGA, L.F., VEGA MEMIJE, M., Sporotrichosis: from KOH to molecular biology, **Journal of Fungi**, v. 4, n. 2, p.62, 2018.
- ARSLAN, H. H. Inflammatory Bowel Disease and Current Treatment Options in Dogs. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v.12, n. 3, p 150-158, 2017.
- ARVANITIS, M., ANAGNOSTOU, T., FUCHS, B. B., CALIENDO, A. M., MYLONAKIS, E., Molecular and nonmolecular diagnostic methods for invasive fungal infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, p. 490-526, 2014.
- ATKINS, S. D., CLARK, I. M., Fungal molecular diagnostics: a mini review. **Journal Applied Genetics**, v. 45, n. 1, p. 3-15, 2004.
- BABU, P.R., SARMA, V.V., Fungi as Promising Biofuel Resource, In. **Gupta, V. G.; Pandey, A. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**, Amsterdam: Elsevier. 2019. p. 149-164.

- BADOTTI, F., DE OLIVEIRA, F.S., GARCIA, C.F., VAZ, A.B., FONSECA, P.L., NAHUM, L.A., OLIVEIRA, G., GÓES-NETO, A., Effectiveness of ITS and sub-regions as DNA barcode markers for the identification of Basidiomycota (Fungi). **BMC Microbiology**. v. 17, n. 1, p.42, 2017.
- BARKO, P. C., MCMICHAEL, M. A., SWANSON, K. S., WILLIAMS, D.A., The gastrointestinal microbiome: a review. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 32, n. 1, p. 9-25, 2018.
- BENEDICT, K., RICHARDSON, M., VALLABHANENI, S., JACKSON, B.R., CHILLER, T., Emerging issues, challenges, and changing epidemiology of fungal disease outbreaks, **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p.e403-11, 2017.
- BERNARD, R.F., GRANT, E.H., Identifying Common Decision Problem Elements for the Management of Emerging Fungal Diseases of Wildlife, **Society & Natural Resources**, v. 32, n.9,p. 1040-55, 2019.
- BIALEK, R., IBRICEVIC, A., AEPINUS, C., NAJVAR, L.K., FOTHERGILL, A.W., KNOBLOCH, J., GRAYBILL, J.R., Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a nested PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 8, p. 2940-2942. 2000.
- BLAKE, A. B.; SUCHODOLSKI, J. S., Importance of gut microbiota for the health and disease of dogs and cats, **Animal Frontiers**, v. 6, n. 3, p. 37-42, 2016.
- BORDENSTEIN, S. R.; THEIS, K. R., Host biology in light of the microbiome: ten principles of holobionts and hologenomes. **PLoS Biol**, v. 13, n. 8, p. e1002226, 2015.
- BOUNDY-MILLS, K.; MILLER, M.W. *Cyniclomyces van der Walt & D.b. Scott (1971)*. In: KURTZMAN, C.P.; FEL, J.W.; BOEKHOUT, T. *The Yeasts, a Taxonomic Study*. San Diego: Elsevier, 2011. p. 357-360.
- BRITO, E. H., FONTENELLE, R.O., BRILHANTE, R.S., CORDEIRO, R.A., MONTEIRO, A.J., SIDRIM, J.J., ROCHA, M.F. The anatomical distribution and antimicrobial susceptibility of yeast species isolated from healthy dogs. **Veterinary Journal**, v. 182, n. 2, p. 320-326, 2009.
- BRITO-SANTOS, F., REIS, R.S., COELHO, R.A., ALMEIDA-PAES, R., PEREIRA, S.A., TRILLES, L., MEYER, W., WANKE, B., DOS SANTOS, L. M., GREMIÃO, I.D., Cryptococcosis due to *Cryptococcus gattii* VGII in southeast Brazil: The One Health approach revealing a possible role for domestic cats, **Medical Mycology Case Reports**, v. 1, n. 24, p. 61-64. 2019.
- BUECHER, E.J. ; PHAFF, H.J. Dimorphism In A New Isolate Of *Saccharomyces* Schiöningg. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 18, n. 6, p. 901-907, 1972.
- CAMMAROTA, G., PECERE, S., IANIRO, G., MASUCCI, L., CURRÒ, D., Principles of DNA-based gut microbiota assessment and therapeutic efficacy of fecal microbiota transplantation in gastrointestinal diseases. **Digestive Diseases**, v. 34, n. 3, p. 279-285, 2016.
- CANI, P. D., Human gut microbiome: hopes, threats and promises. **Gut**, v. 67, n. 9, p. 1716-1725, 2018.
- CARINI P. A “Cultural” Renaissance: Genomics Breathes New Life into an Old Craft. **MSystems**, v. 4, n. 3, p. e00092-19, 2019

- CASADEVALL, A. Fungal diseases in the 21st Century: the near and far horizons. **Pathogens & Immunity**, v. 3, n. 2, p. 183, 2018.
- CASCON, C. M. et al. Avaliação clínica, endoscópica e histopatológica de cães com doença inflamatória intestinal. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, p. 1287-1291, 2017.
- CAVE, N. J., MARKS, S. L., KASS, P. H., MELLI, B.S., BROPHY, M. A., Evaluation of a routine diagnostic fecal panel for dogs with diarrhea, **Journal-of the American Veterinary Medical Association**, v. 221, n. 1, p. 52-59, 2002.
- CERQUETELLA, M., SPATERNA, A., LAUS, F., TESEI, B., ROSSI, G., ANTONELLI, E., VILLANACCI, V., BASSOTTI, G., Inflammatory bowel disease in the dog: differences and similarities with humans, **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 9, p. 1050, 2010.
- CHAITMAN, J., JERGENS, A., E., GASCHEN, F., GARCIA-MAZCORRO, J. F., MARKS, S. L., MARROQUIN-CARDONA, A. G., WEESE, J. S., Commentary on key aspects of fecal microbiota transplantation in small animal practice. **Veterinary Medicine: Research and Reports**, v. 7, p. 71, 2016.
- CHANDLER, M., Gastrointestinal disorders and diet. **Companion Animal**, v. 23, n. 7, p. 381-387, 2018.
- CHUKU, A, Effective Diagnostic Techniques in the Identification of Medically Important Fungi: A Developing World Perspective. **Annual Research & Review in Biology**, p. 1-9, 2018.
- CLARK, C., DRUMMOND, R.A, The hidden cost of modern medical interventions: How medical advances have shaped the prevalence of human fungal disease, **Pathogens**. v. 8, n. 2, p.45, 2019
- COELHO, L.P., KULTIMA, J.R., COSTEA, P.I., FOURNIER, C., PAN, Y., CZARNECKI-MAULDEN, G., HAYWARD, M.R., FORSLUND, S.K., SCHMIDT, T.S., DESCOMBES, P., JACKSON, J.R., Similarity of the dog and human gut microbiomes in gene content and response to diet. **Microbiome**, v.6, n.1, p.1, 2018.
- COOKE, I., MEAD, O., WHALEN, C., BOOTE, C., MOYA, A., YING, H., ROBBINS, S., STRUGNELL, J., DARLING, A., MILLER, D., VOOLSTRA, C.R., Molecular techniques and their limitations shape our view of the holobiont. **Zoology**, v. 16, 125695, 2019
- CORBETT K. M., DE SMIDT, O., Culture-dependent diversity profiling of spoilage yeasts species by PCR-RFLP comparative analysis, **Food Science and Technology International**, v. 25, n.8, p. 671-9, 2019.
- DANDRIEUX, J. R. S. Inflammatory bowel disease versus chronic enteropathy in dogs: are they one and the same?, **Journal of Small Animal Practice**, v. 57, n. 11, p. 589-599, 2016.
- DE HOOG, G. S., AHMED, S. A., DANESI, P., GUILLOT, J., GRÄSER, Y., Distribution of pathogens and outbreak fungi in the fungal kingdom. In: SEYEDMOUSAVI, S.; DE HOOG, G. S.; GUILLOT, J.; VERWEIJ, P. E. **Emerging and Epizootic Fungal Infections in Animals**. Springer, Cham, 2018. p. 3-16.
- DEBOURGOGNE, A., DORIN, J., MACHOUART, M., Emerging infections due to filamentous fungi in humans and animals: only the tip of the iceberg?, **Environmental Microbiology Reports**, v. 8, n.3, p. 332-42, 2016.

- DEDEAUX, A., GROOTERS, A., WAKAMATSU-UTSUKI, N., TABOADA, J., Opportunistic fungal infections in small animals. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 54, n. 6, p. 327-337, 2018.
- DENG, P., SWANSON, K.S., Gut microbiota of humans, dogs and cats: current knowledge and future opportunities and challenges. **British Journal of Nutrition**. n. 113, v. p. 6–17, 2015.
- DENTINGER, B. T. M., DIDUKH, M. Y., MONCALVO, J. M., Comparing COI and ITS as DNA barcode markers for mushrooms and allies (Agaricomycotina), **PLoS one**, v. 6, n. 9, 2011.
- DIJKSTRA M., KRAUS J. S., BOSJE J. T, DEN HERTOEG E. Protein-losing enteropathy in Rottweilers. **Tijdschrift Voor Diergeneeskunde**, v. 135, n. 10, p. 406-412, 2010.
- DOOLITTLE, W. F. FINLAY, B.B., How has microbiology changed over the past 25 years?, **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 4, p. 246-250, 2018.
- DUIJVESTIJN, M., MUGHINI-GRAS, L., SCHUURMAN, N., SCHIJF, W., WAGENAAR, J.A., EGBERINK, H., Enteropathogen infections in canine puppies:(co-) occurrence, clinical relevance and risk factors. **Veterinary Microbiology**, v. 195, p. 115-122, 2016.
- DULLA, E. L., KATHERA, C., GURIJALA, H. K., MALLAKUNTALA, T. R., SRINIVASAN, P., PRASAD, V., JASTI, P. K., Highlights of DNA Barcoding in identification of salient microorganisms like fungi, **Journal de Mycologie Medicale**, v. 26, n. 4, p. 291-297, 2016.
- DWORECKA-KASZAK, B., DABROWSKA, I., KASZAK, I., The mycobiome—a friendly cross-talk between fungal colonizers and their host. **Annals of Parasitology**, v. 62, n. 3, 2016.
- EBERLEIN, C., HÉNAULT, M., FIJARCZYK, A., CHARRON, G., BOUVIER, M., KOHN, L. M., ANDERSON, J.B., LANDRY, C.R., Hybridization is a recurrent evolutionary stimulus in wild yeast speciation. **Nature Communications**, v.10, n.1, p.1-4, 2019
- ECHEVERRIGARAY, S., RANDON, M., DA SILVA, K., ZACARIA, J., DELAMARE, A.P., Identification and characterization of non-saccharomyces spoilage yeasts isolated from Brazilian wines. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n.6, p.1019-1027,
- ENGELTHALER, D.M., CASADEVALL, A., On the Emergence of *Cryptococcus gattii* in the Pacific Northwest: Ballast Tanks, Tsunamis, and Black Swans. **mBio**, v. 10, n. 5, p. e02193-19. 2019
- ENGERING, A., HOGERWERF, L., SLINGENBERGH, J., Pathogen–host–environment interplay and disease emergence. *Emerging microbes & infections*. v. 2, n. 2, p. e5, 2013
- ETTINGER, S. J., FELDMAN, E. C., COTE, E., **Textbook of Veterinary Internal Medicine**-eBook. Elsevier health sciences, 2017.
- FEAU, N., BEAUSEIGLE, S., BERGERON, M.J., BILODEAU, G.J., BIROL, I., CERVANTES-ARANGO, S., DHILLON, B., DALE, A.L., HERATH, P., JONES, S.J.,

- LAMARCHE, J., Genome-Enhanced Detection and Identification (GEDI) of plant pathogens, **Peer Journal**, v.6, p. e4392. 2018
- FELL, J.W., BOEKHOUT, T., FONSECA, A., SCORZETTI, G., STATZELL-TALLMAN, A., Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 50, n. 3, p. 1351-1371, 2000.
- FERRAZ, A. DOS SANTOS PIRES, B., DOS SANTOS, E.M., EVARISTO, T.A., DE OLIVEIRA NOBRE, M., NIZOLI, L.Q., Presença de *Cyniclomyces guttulatus* em amostra fecal de cão com diarreia crônica. Relato de caso. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 13, n. 2, p. 246-251, 2019.
- FERREIRA, M. E., GRATTAPAGLIA, D., **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3<sup>a</sup> ed. Brasília: EMBRAPA-Cenargen, 1998. 220p.
- FIEDOROVA, K., RADVANSKÝ, M., NĚMCOVÁ, E., GROMBIŘÍKOVÁ, H., BOSÁK, J., ČERNOCHOVÁ, M., LEXA, M., ŠMAJS, D., FREIBERGER, T., The impact of DNA extraction methods on stool bacterial and fungal microbiota community recovery. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 821, 2019.
- FISHER, M.C.; HENK, D.A.; BRIGG, C.J.; BROWNSTEIN, J.S.; MADOFF, L.C.; MCCRAW, S.L.; GUPRR, S.J. Emerging fungal Threats to Animal, Plant and Ecosystem Health, **Nature**, v. 484, n.7393, p. 186-194, 2012.
- FLAUSINO, G.; BARONI, F. DE A., Isolation of *Cyniclomyces guttulatus* (Robin) Van Der Walt and Scott (1971) in Brazil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 31, n. 2, p. 100-103, 2009.
- FLAUSINO, G. Identificação fenotípica e genotípica de isolados de *Cyniclomyces guttulatus* (Robin, 1853) Van der Walt e Scott, 1971 e de *Eimeria cavidae* Sheather, 1924 procedentes do porquinho-da-índia (*Cavia porcellus* Linnaeus, 1758). Seropédica, 133p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2013.
- FLAUSINO, G.; FURTADO, T. T.; MCINTOSH, D.; TEIXEIRA FILHO, W. L. Differential diagnosis between endogenous stages of *Cyniclomyces guttulatus* (Robin) Van Der Walt and Scott, 1971 and *Eimeria caviae* Sheather, 1924 from Guinea pig *Cavia porcellus* Linnaeus. **Coccidia**. v. 1, n. 2, p. 21-24. 2013.
- FLAUSINO, G.; LEAL, P. D. S.; MCINTOSH, D.; AMARAL, L.G.; TEIXEIRA FILHO, W. L.; FLAUSINO, W.; LOPES, C. W. G. Isolation and Characterization of *Cyniclomyces guttulatus* (Robin) Van Der Walt and Scott, 1971 in Dogs in Brazil. **Current Microbiology**, v. 65, n. 5, p. 542–546, 2012.
- FORGACS, D., WALLEN, R. L., BOEDEKER, A. L., DERR, J. N., Evaluation of fecal samples as a valid source of DNA by comparing paired blood and fecal samples from American bison (*Bison bison*). **BMC genetics**, v. 20, n. 1, p. 22, 2019.
- FOSTER, M.L.; DOWD, S.E.; STEPHENSON, C.; STEINER, J.M.; SUCHODOLSKI, J.S. Characterization of the Fungal Microbiome (mycobiome) in Fecal Samples from Dogs. **Veterinary Medicine International**, v. 2013, n.23, p.1-8, 2013.
- FRÉZAL, L.; LEBLOIS, R., Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, n. 5, p. 727-736, 2008.

- FRIEDMAN, D.Z., SCHWARTZ, I.S., Emerging fungal infections: New patients, new patterns, and new pathogens, **Journal of Fungi**, v. 5, n. 3, p.67, 2019.
- FURTADO, T. T.; FLAUSINO, G.; LEAL, P. D.; FERREIRA, J. P.; MCINTOSH, D.; FLAUSINO, W.; TEIXEIRA FILHO, W. L.; DE ALMEIDA, E. C.; LOPES C. W.G. Diagnóstico de colangite associado à mucocele da vesícula biliar por *Cyniclomyces guttulatus* em cães-Relato de casos. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 35, n. 1, p. 1-6. 2013.
- GABALDÓN, T., Recent trends in molecular diagnostics of yeast infections: from PCR to NGS, **FEMS Microbiology Reviews**, v. 43, n. 5, p. 517-47, 2019.
- GARCIA-MAZCORRO, J. F., MINAMOTO, Y., Gastrointestinal microorganisms in cats and dogs: a brief review. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 45, n. 2, p. 111-124, 2013.
- GARINO JR, F., FEITOSA, T.J.O., ANDRADE, Y.C.C., ARAÚJO, K.N., BARRETO, S.W.M., Diarreia Crônica Em Um Cão Por *Cyniclomyces guttulatus* - Relato de Caso, **38º Congresso Brasileiro da Anclivepa, 2017. P. 585 Anais** Recife. Anclivepa: Brasília, 2017.
- GARNER, C.D., STARR, J.K., McDONOUGH, P.L., ALTIER, C., Molecular Identification of Veterinary Yeast Isolates by Use of Sequence-Based Analysis of the D1/D2 Region of the Large Ribosomal Subunit. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.6, p. 2140-2146, 2010.
- GENC, A., EROGLU, F., KOLTAS, I. S., Detection of *Plasmodium vivax* by nested PCR and real-time PCR, **Korean Journal of Parasitology**, v.48, n. 2, p.99, 2010.
- GESKE, B. ; BATISTA, T. N. ; JORGE, M., Diagnóstico de *Cyniclomyces guttulatus* em cão com diarreia crônica: RELATO DE CASO, (Trabalho Científico Aprovado exposto na forma de pôster em congresso da Anclivepa), 2015.
- GETZKE, F., THIERGART, T., HACQUARD, S., Contribution of bacterial-fungal balance to plant and animal health, **Current Opinion in Microbiology**, v. 49, p.66-72, 2019.
- GHOSH, P.N., FISHER, M.C., BATES, K.A., Diagnosing emerging fungal threats: a one health perspective. **Frontiers in Genetics**, v. 9, p.376, 2018
- GILMORE, S. R., GRAEFENHAN, T., LOUIS-SEIZE, G. E. R. R. Y., SEIFERT, K. A.. Multiple copies of cytochrome oxidase 1 in species of the fungal genus *Fusarium*, **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 90-98, 2009.
- GIRAUD, T., GLADIEUX, P., GAVRILETS, S., Linking the emergence of fungal plant diseases with ecological speciation, **Trends in Ecology & Evolution**, v. 25, n. 7, p. 387-95, 2010.
- GIRAUD, T., REFRÉGIER, G., LE GAC, M., DE VIENNE, D.M., HOOD, M.E., Speciation in fungi. **Fungal Genetics and Biology**. v. 45, n. 6, p.791-802, 2008.
- GJERDE, B., HOLTET, L., SANDEN, S., Dahlgren, S. S., A *Cyniclomyces guttulatus*-like yeast associated with recurrent gastroenteritis in a dog. **Norsk Veterinærtidsskrift**, v. 121, n. 6, p. 507-510, 2009.
- GOMEZ, A., Beyond the gut: Systemic effects of the swine gut microbiome. **Journal of Animal Science**, v. 97, p.63, 2019.

GREATHOUSE, K. L., SINHA, RASHMI; V. E., DNA extraction for human microbiome studies: the issue of standardization. **Genome biology**, v. 20, n. 1, p. 212, 2019.

HALL, E. J., Inflammatory bowel disease in dogs and cats. Semantic Scholar: Hill's GI Booklet. 2009

HEBERT, P. D. N., RATNASINGHAM, S., DE WAARD, J. R., Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, suppl.\_1, p. S96-S99, 2003.

HEBERT, P.D., RATNASINGHAM, S., DEWAARD, J.R., Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, suppl.\_1, p. S96–S99, 2003

HEITMAN, J., Microbial pathogens in the fungal kingdom. **Fungal Biology Reviews**, v. 25, n. 1, p. 48-60, 2011.

HONNEFFER, J. B., MINAMOTO, Y., SUCHODOLSKI, J. S., Microbiota alterations in acute and chronic gastrointestinal inflammation of cats and dogs. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 44, p. 16489, 2014.

HOUWERS D.J., BLANKENSTEIN B. *Cyniclomyces guttulatus* (Brillendoosjesgist) endiarree bij honden. **Tijdschr Diergeneeskd**, v.126, p.14-15, 2001.

HU, Y., Regulatory concern of polymerase chain reaction (PCR) carryover contamination. **Polymerase Chain Reaction for Biomedical Applications**., 2016.

HUSEYIN, C. E., O'TOOLE, P. W., COTTER, P. D., SCANLAN, P. D., Forgotten fungi—the gut mycobiome in human health and disease. **FEMS microbiology reviews**, v. 41, n. 4, p. 479-511, 2017.

INGALA, M. R., SIMMONS, N. B., WULTSH, C., KRAMPIS, K., SPEER, K.A., PERKINS, S. L., Comparing microbiome sampling methods in a wild mammal: fecal and intestinal samples record different signals of host ecology, evolution. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 803, 2018.

IRINYI, L., LACKNER, M., DE HOOG, G.S., MEYER, W., DNA barcoding of fungi causing infections in humans and animals. **Fungal Biology**, v. 120, n.2, p. 125–36, 2016.

IRINYI, L., SERENA, C., GARCIA-HERMOSO, D., ARABATZIS, M., DESNOS-OLLIVIER, M., VU, D., DA CUNHA, K. C.,. International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database-the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. **Medical Mycology**, v. 53, n. 4, p. 313–337, 2015.

JAMES, T.Y., KAUFF, F., SCHOCH, C.L., MATHENY, P.B., HOFSTETTER, V., COX, C.J., CELIO, G., GUEIDAN, C., FRAKER, E., MIADLIKOWSKA, J., LUMBSCH, H.T., RAUHUT, A., REEB, V., ARNOLD, A.E., AMTOFT, A., STAJICH, J.E., HOSAKA, K., SUNG, G.H., JOHNSON, D., O'ROURKE, B., CROCKETT, M., BINDER, M., CURTIS, J.M., SLOT, J.C., WANG, Z., WILSON, A.W., SCHUSSLER, A., LONGCORE, J.E., O'DONNELL, K., MOZLEY-STANDRIDGE, S., PORTER, D., LETCHER, P.M., POWELL, M.J., TAYLOR, J.W.,

- WHITE, M.M., GRIFFITH, G.W., DAVIES, D.R., HUMBER, R.A., MORTON, J.B., SUGIYAMA, J., ROSSMAN, A.Y., ROGERS, J.D., PFISTER, D.H., HEWITT, D., HANSEN, K., HAMBLETON, S., SHOEMAKER, R.A., KOHLMAYER, J., VOLKMANN-KOHLMEYER, B., SPOTTS, R.A., SERDANI, M., CROUS, P.W., HUGHES, K.W., MATSUURA, K., LANGER, E., LANGER, G., UNTEREINER, W.A., LUCKING, R., BUDEL, B., GEISER, D.M., APTROOT, A., DIEDERICH, P., SCHMITT, I., SCHULTZ, M., YAHR, R., HIBBETT, D.S., LUTZONI, F., MCLAUGHLIN, D.J., SPATAFORA, J.W., VILGALYS, R., Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. **Nature**. v. 443, p.818-822, 2006.
- JENSEN, A.P., BJØRNVAD, C. R., Clinical effect of probiotics in prevention or treatment of gastrointestinal disease in dogs: A systematic review. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 33, n. 5, p.1849-64, 2019.
- JERGENS, A. E.; SIMPSON, K. W. Inflammatory Bowel Disease in Veterinary Medicine. **Frontiers in Bioscience**, p. 1404-1419. 2012
- Jl, B.W., SHETH, R.U., DIXIT, P.D., HUANG, Y., KAUFMAN, A., WANG, H.H., VITKUP, D., Quantifying spatiotemporal variability and noise in absolute microbiota abundances using replicate sampling, **Nature Methods**, v. 16, n. 8, p.731-6, 2019.
- JOHNSTON, P. R. QUIJADA, L., SMITH, C. A., BARAL, H. O., HOSOYA, T., BASCHIEN, C., CARL, S., A multigene phylogeny toward a new phylogenetic classification of Leotiomycetes, **IMA Fungus**, v. 1, n. 1, p. 1, 2019.
- KIM, K. O.K., GLUCK, M., Fecal microbiota transplantation: an update on clinical practice. **Clinical Endoscopy**, v. 52, n. 2, p. 137, 2019.
- KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; MINTER, D.W.; STALPERS, J.A. **Ainsworth & Bisby's dictionary of the Fungi**. 10<sup>th</sup> Ed. Wallingford: CABI. 2008. p. 1-746.
- KISS, E., HEGEDIS, B., VARGA, T., MERENYI, Z., KOSZO, T., BALINT, B., PRASANNA, A.N., KRIZSAN, K., RIQUELME, M., TAKESHITA, N., NAGY, L.G., Comparative genomics reveals the origin of fungal hyphae and multicellularity, **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2019.
- KLUTHCOVSKY, L., SGARBOSSA, R., BEVILACQUA, L., FAM, A., NOGUEIRA, F., Infecção Por *Cyniclomyces Guttulatus* Em Um Cão Com Alterações Gastrointestinais: Relato De Caso. 38º Congresso Brasileiro da Anclivepa, Anais ... Recife.p.2353, 2017.
- KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C.J. Relationships Among Genera of the *Saccharomycotina* (Ascomycota) from Multigene Phylogenetic Analysis of Type Species. **FEMS Yeast Research**, v. 13, n. 1, p. 23-33, 2013.
- KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C.J., Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, n.4, p. 331-371, 1998.
- KURTZMAN, C.P.; Use of Gene Sequence Analyses and Genome Comparisons for Yeasts Systematics. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 64, n. 2, p. 325-332, 2014
- LACHANCE, M. A., DANIEL, H. M., MEYER, W., PRASAD, G. S., GAUTAM, S. P., BOUNDY-MILLS, K.. The D1/D2 domain of the large-subunit rDNA of the yeast

- species *Clavispora lusitaniae* is unusually polymorphic. **FEMS Yeast Research**, v. 4, n. 3, p. 253-258, 2003.
- LACKNER, M., LASS-FLÖRL, C., Commercial molecular tests for fungal diagnosis from a practical point of view. In: LION, T. **Human Fungal Pathogen Identification**. Humana Press: New York, 2017. p. 85-105.
- LAGIER, J. C., EDOUARD, S., PAGNIER, I., MEDIANNIKOV, O., DRANCOURT, M., RAOULT, D., Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v.28, n.1, p, 208-236, 2015.
- LAGIER, J.C., HUGON, P., KHELAIPIA, S., FOURNIER, PE., LASCOLA, B., RAOULT, D., The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 1, p. 237-264, 2015.
- LAUDADIO, I.; FULCI, V.; STRONATI L.; CARISSIMI, C. Next-generation metagenomics: Methodological challenges and opportunities. **Omic: a Journal of Integrative Biology**,v.23, n.7, p.327-33, 2019
- LEACH, L.; ZHU, Y.; CHATURVEDI, S. Development and validation of a real-time PCR assay for rapid detection of *Candida auris* from surveillance samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 2, p. e01223-17, 2018.
- LEAL, P. D. S.; COELHO, C.D.; FLAUSINO, G. Diagnóstico de infecções concomitantes por *Cystoisospora canis*(Nemeséri, 1959) e *Cyniclomyces guttulatus* (Robin, 1853):Relato de caso. **Coccidia**, v. 1, n. 2, p. 44-48, 2013.
- LEWIS, Z., LIZÉ, A., Insect behaviour and the microbiome. **Current Opinion in Insect Science**, v. 9, p. 86-90, 2015.
- LI, Y., HAO, Y., GAO, B., GENG, P., HUANG, H., YU, L., WANG, T. T., Chemical profile and in vitro gut microbiota modulatory, anti-inflammatory and free radical scavenging properties of *chrysanthemum morifolium* cv. Fubaiju, **Journal of Functional Foods**, v. 58, p. 114-122, 2019.
- LIMON, J.J., SKALSKI, J.H., UNDERHILL, D.M., Commensal fungi in health and disease, **Cell Host & Microbe**, v. 22, n. 2, p.156-65, 2017.
- LIMPER, A.H., ADENIS, A., LE, T., HARRISON, T.S., Fungal infections in HIV/AIDS, **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p.e334-43, 2017.
- MA, L.J., FEDOROVA, N.D., A practical guide to fungal genome projects: strategy, technology, cost and completion, **Mycology**, v. 1, n. 1, p.9-24, 2010.
- MACHADO, A., SILVA, F.J., Toward a richer view of the scientific method: The role of conceptual analysis. **American Psychologist**. v. 62, n. 7, p.671, 2007.
- MADIGAN, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., Stahl, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14ª Edição. Artmed Editora. 2016.
- MANDIGERS, P. J. J., DUIJVESTIJN, M. B., ANKRINGA, N., MAES, S., VAN ESSEN, E., SCHOORMANS, A. H., HOUWERS, D. J., The clinical significance of *Cyniclomyces guttulatus* in dogs with chronic diarrhea, a survey and a prospective treatment study. **Veterinary Microbiology**, v. 172, n.1-2, p. 241-247, 2014.

MANFIO, G.P., Avaliação do Estado do Conhecimento da Diversidade Biológica do Brasil. Microbiota. Ministério do Meio Ambiente. 2003. Disponível: [https://www.mma.gov.br/estruturas/chm/arquivos/Aval\\_Conhec\\_Cap2.pdf](https://www.mma.gov.br/estruturas/chm/arquivos/Aval_Conhec_Cap2.pdf).

MARCOS J. Y ; PINCUS, D.H. Fungal Diagnostics: Review of Commercially Available Methods. **Methods in Molecular Biology**, n.968, p.25-54, 2013.

MARIETTE, C., TAVERNIER. E., HOCQUET, D., HUYNH, A., ISNARD, F., LEGRAND, F., LHÉRITIER, V., RAFFOUX, E., DOMBRET, H., IFRAH, N., CAHN, J.Y., Epidemiology of invasive fungal infections during induction therapy in adults with acute lymphoblastic leukemia: a GRAALL-2005 study. **Leukemia & Lymphoma**, v. 58, n. 3, p.586-93, 2017

MARKS, S. L., KATHER, E. J., Bacterial-associated diarrhea in the dogs: a critical appraisal, **The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 33, n.5, p.1029–1060, 2003.

MARTINSON, J., PINKHAM, N. V., PETERS, G. W., CHO, H., HENG, J., RAUCH, M., WALK, S. T., Rethinking gut microbiome residency and the Enterobacteriaceae in healthy human adults. **The ISME Journal**, v. 13, n. 9, p. 2306-2318, 2019.

MATHAY, C., HAMOT, G., HENRY, E., GEORGES, L., BELLORA, C., LEBRUN, L., BETSOU, F., Method optimization for fecal sample collection and fecal DNA extraction. **Biopreservation and Biobanking**, v. 13, n. 2, p. 79-93, 2015.

MATSUMOTO, Y., AZAMI, S., SHIGA, H., NAGAMACHI, T., MORIYAMA, H., YAMASHITA, Y., YOSHIKAWA, A., SUGITA, T., Induction of signal transduction pathways related to the pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* in the host environment. **Drug Discoveries & Therapeutics**. v.13, n.4, p.177-82, 2019.

MEYER, W. MITCHELL, T. G., FREEDMAN, E. Z., VILGALYS, R., Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 9, p. 2274-2280, 1993.

MEYER, W., IRINYI, L., HOANG, M.T., ROBERT, V., GARCIA-HERMOSO, D., DESNOS-OLLIVIER, M., YURAYART, C., TSANG, C.C., LEE, C.Y., WOO, P.C., PCHELIN, I.M., Database establishment for the secondary fungal DNA barcode translational elongation factor 1 $\alpha$  (TEF1 $\alpha$ ). **Genome**. v. 62, n. 3, p.160-169, 2019.

MINAMOTO, Y., OTONI, C.C., STEELMAN, S.M., BUYUKLEBLEBICI, O. STEINER, J.M., JERGENS, A.E., SUCHODOLSKI, J.S., Alteration of the fecal microbiota and serum metabolite profiles in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. **Gut Microbes**, v.6, n1, p. 33-47, 2015.

MIRHENDI, H., MAKIMURA, K., ZOMORODIAN, K., YAMADA, T., SUGITA, T., YAMAGUCHI, H., A simple PCR-RFLP method for identification and differentiation of 11 *Malassezia* species. **Journal of Microbiological Methods**, v. 61, n. 2, p. 281-284, 2005.

MONDO, E., MARLIANI, G., ACCORSI, P. A., COCCHI, M., DI LEONE, A., Role of gut microbiota in dog and cat's health and diseases, **Open Veterinary Journal**, v. 9, n. 3, p. 253–258, 2019.

MONTEIRO, M. Science is a war zone: some comments on Brazil, Tapuya: Latin American Science, **Technology and Society**, v. 3, p. 4-8, 2020.

MORAES, M.E., CAPUTO, L., AMENDOEIRA, R. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde – Cap. 4 Micologia. **Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio-EPSJV**, v.4, cap.4, p. 399-496, 2010.

MUKARATIRWA, S.; SINGH, V. P. Prevalence of gastrointestinal parasites of stray dogs impounded by the Society for the Prevention of Cruelty to Animals (SPCA), Durban and Coast, South Africa. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 81, n. 2, p. 123-125, 2010.

MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R. K., HORN, G. T., ERLICH, H., Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In: **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 263-273, 1986.

NAI, C.; MEYER, V., From axenic to mixed cultures: technological advances accelerating a paradigm shift in microbiology. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 6, p. 538-554, 2018.

NARANJO-ORTIZ, M. A., GABALDÓN, T., Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi, **Biological Reviews**, v. 94, n. 6, p. 2101-2137, 2019.

NASH, A. K., AUCHTUNG, T. A., WONG, M. C., SMITH, D. P. GESSELL, J. R., ROSS, M. C., STEWARTS, C.J., METCALF, G.A., MUZNY, D.M., GIBBS, R.A., AJAMI, N.J., PETROSINO, J.F., The gut mycobioeme of the Human Microbiome Project healthy cohort. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 153, 2017.

NEEL, J.A., PIPERSOVA I., MOROFF, S., MOTSINGER-REIF, A., GOOKIN, J.L., 2013. *Cyniclomyces guttulatus* in companion animals: a first look at a potential pathogen. **CVM Annual Research Forum and Litwack Lecture**, p. 24, 2013.

NEEL, J.A., TARIGO, J., GRINDEM, C.B., Gallbladder aspirate from a dog. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 35, p. 467–470, 2006.

NELSON, W. R.; COUTO, G. C. **Medicina interna de pequenos animais**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 1674 p. 2010.

OKAMOTO, K.W., AMARASEKARE, P., POST, D.M., VASSEUR, D.A., TURNER, P.E., The interplay between host community structure and pathogen life history constraints in driving the evolution of host range shifts, **Functional Ecology**. v. 33, n. 12, p. 2338-53, 2019.

PARLE, J.N, The growth of *Sacchacomycopsis guttulata*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 22, n. 3, p. 237-242, 1956.

PASSOS, M. do C. F.; MORAES-FILHO, J. P. Intestinal Microbiota in Digestive Diseases. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 54, n. 3, p. 255-262, 2017.

PHAFF, H.J., MILLER M.W., *Cyniclomyces* van der Walt et Scott. In: KREGER-VAN RIJ, N.J.W. **The yeasts: a taxonomic study**. 3<sup>a</sup> ed., Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1971. p. 125-129.

PURTY, R. S.; CHATTERJEE, S. DNA barcoding: an effective technique in molecular taxonomy. **Austin J Biotechnol Bioeng**, v. 3, n. 1, p. 1059, 2016.

RAJA, H. A., MILLER, A. N., PEARCE, C. J., OBERLIES, N. H., Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 3, p. 756-770, 2017.

- RAMAI, D., ZAKHIA, K., OFOSU, A., OFORI, E., REDDY, M. Fecal microbiota transplantation: donor relation, fresh or frozen, delivery methods, cost-effectiveness. **Annals of Gastroenterology**, v. 32, n. 1, p. 30, 2019.
- RAMÍREZ-SOTO, M., AGUILAR-ANCORI, E., TIRADO-SÁNCHEZ, A., BONIFAZ, A., Ecological determinants of sporotrichosis etiological agents. **Journal of Fungi**, v.4, n.3, p.95, 2018.
- RATNASINGHAM, S., HEBERT, P. D.N., BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 3, p. 355-364, 2007.
- REDFERN, A., SUCHODOLSKI, J., JERGENS, A., Role of the gastrointestinal microbiota in small animal health and disease, **Veterinary Record**, v. 181, n.14, p. 370, 2017.
- RICHARD, M.L., SOKOL, H., The gut mycobiota: insights into analysis, environmental interactions and role in gastrointestinal diseases, **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 16, n. 6, p.331-45, 2019
- RICHLE, R.; SCHOLER, H.J. *Saccharomyces guttulata* Von kaninchen: kulturelle eigenschaften und mögliche bedeatung. **Pathologie und Microbiologie**, v. 24, n. 5, p. 783-793, 1961.
- RINNINELLA, E., RAOUL, P., CINTONI, M., FRANCESCHI, F., MIGGIANO, G.A.D., GASBARRINI, A., MELE, M.C., What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. **Microorganisms**, v. 7, n. 1, p. 14, 2019.
- RODRIGUES M. L.; ALBUQUERQUE P. C., Searching for a change: The need for increased support for public health and research on fungal diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12. n. 6, p. e0006479, 2018.
- RODRIGUES, M. S. H., Disbiose em cães. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos, Faculdade de Medicina Veterinária, 2019. Disponível: <https://dspace.uniceplac.edu.br/handle/123456789/182> .
- ROSENBERG, E., ZILBER-ROSENBERG, I., Microbes drive evolution of animals and plants: the hologenome concept, **MBio**, v. 7, n. 2, p. e01395-15, 2016.
- RUOSTA, F. N., CHARISZADEH, A., GHAHRI, M., JAFARI, Z., MIRHENDI, H., Frequency of Uncommon Clinical Yeast Species Confirmed by ITS-Sequencing, **Archives of Clinical Infectious Diseases**, v.14, n.1, e: 62816, 2019.
- SAITO, K.; SAITO, H.; WATANABE, T.; SAITO, H. *Cyniclomyces guttulatus*: it can now be clearly observed in canine feces. Saito Animal Hospital, M.B. Network, Kitasato Institute, p. 153-196, 1984.
- SANTAMARIA, M., VICARIO, S., PAPPADÀ, G., SCIOSCIA, G., SCAZZOCCHIO, C., SACCONI, C., Towards barcode markers in Fungi: an intron map of Ascomycota mitochondria, **BMC Bioinformatics**, v. 10, n. S6, p. S15, 2009.
- SARVANANDA, L. Short introduction of DNA barcoding. **International Journal of Resesearch**, v. 5, n. 4, p. 673-685, 2018.

- SATYANARAYANA, T., DESHMUKH, S.K., JOHRI, B.N., editors. **Developments in Fungal Biology and Applied Mycology**. Springer Singapore; 2017.
- SAULLO J.L., PERFECT, .JR., ALEXANDER, B.D., Invasive Fungal Disease in the Transplant Population: An Overview. **In: SAFDA, A. Principles and Practice of Transplant Infectious Diseases**, New York: Springer, p. 519-541, 2019.
- SAVELKOUL, E. H., PATHMAKANTHAN, S., HAWKEY, P., IQBAL, T. H., Manipulating gut microbiota using faecal microbiome transplantation: update on evidence and guide for use. **Gastrointestinal Nursing**, v. 16, n. 9, p. 43-49, 2018.
- SCHEELE, B.C., PASMANS, F., SKERRATT, L.F., BERGER, L., MARTEL, A.N., BEUKEMA, W., DE LA RIVA, I., Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. **Science**, v. 363, n. 6434, p. 1459-1463, 2019.
- SCHLOSS, P.D., Identifying and overcoming threats to reproducibility, replicability, robustness, and generalizability in microbiome research. **MBio**. v. 9, n. 3, p. e00525-18, 2018.
- SCHMITZ, S.; SUCHODOLSKI, J., Understanding the canine intestinal microbiota and its modification by pro-, pre- and synbiotics - what is the evidence?, **Veterinary Medicine and Science**, v.2, n.2, p.71-94, 2016.
- SCHOCH, C. L., SEIFERT, K. A., HUHNDORF, S., ROBERT, V., SPOUGE, J. L., LEVESQUE, C. A., Fungal Barcoding Consortium,. From the cover: nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 16, p. 6241, 2012.
- SCHOCH, C. L., SEIFERT, K. A., HUHNDORF, S., ROBERT, V., SPOUGE, J.L., LEVESQUE, C.A., CHEN, W., Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 109, n. 16, p. 6241–6246, 2012.
- SCHOCH, C.L., SUNG, G.H., LOPEZ-GIRALDEZ, F., TOWNSEND, J.P., MIADLIKOWSKA, J., HOFSTETTER, V., The Ascomycota tree of life: a phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. **Systematic Biology**. v. 58, n. 2, p. 224–239, 2009.
- SCHRADER, C., SCHIELKE, A., ELLERBROEK, L., JOHNE, R., PCR inhibitors—occurrence, properties and removal, **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 5, p. 1014-1026, 2012.
- SCHWARTZ, I.S., KENYON, C., THOMPSON, G.R., Endemic mycoses: What’s new about old diseases?. **Current Clinical Microbiology Reports**. v.3, n. 2, p.71-80, 2016
- SCORZETTI, G., FELL, J. W., FONSECA, A., STATZELL-TALLMAN, A., Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. **FEMS Yeast Research**, v. 2, n. 4, p. 495-517, 2002.
- SEVINDIK, M., AKGUL, H., AKATA, I., SELAMOGLU, Z., *Geastrum pectinatum* as an alternative antioxidant source with some biochemical analysis. **Medical Mycology: Open Access**, v. 3, n. 2, p. 1-4, 2017.

- SEYEDMOUSAVI, S., BOSCO, S.D., DE HOOG, S., EBEL, F., ELAD, D., GOMES, R.R., JACOBSEN, I.D., JENSEN, H.E., MARTEL, A., MIGNON, B., PASMANS, F., Fungal infections in animals: a patchwork of different situations. **Medical Mycology**. v. 56, n. suppl\_1, p. 165-87, 2018.
- SEYEDMOUSAVI, S., GUILLOT, J., TOLOOE, A., VERWEIJ, P.E., DE HOOG, G.S., Neglected fungal zoonoses: hidden threats to man and animals. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 21, n.5, p. 416-25, 2015.
- SHARON, A., SHLEZINGER, N., Fungi infecting plants and animals: killers, non-killers, and cell death, **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 8, 2013.
- SHERMAN, F., Getting started with yeast. In: M Wilchek, EA Bayer **Methods in enzymology**. Academic Press, p. 3-41, 2002
- SHIFRINE, M.; PHAFF, H. J. On the isolation, ecology and taxonomy of *Saccharomycopsis guttulata*, **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 24, n. 1, p. 193-209, 1958.
- SHIFRINE, M.; PHAFF, H.J. Nutritional requirements of *Saccharomycopsis guttulata* (Robin) Schiöningh. **Mycologia**, v. 51, n. 3, p. 318-328, 1959.
- SHKOPOROV, A.N., HILL, C., Bacteriophages of the human gut: the “known unknown” of the microbiome, **Cell Host & Microbe**, v. 25, n.2, p.195-209, 2019
- SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. 1ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- SINGH, R. K.; TRIPATHI, R.; RANJAN, A.; SRIVASTAVA, A. K. Fungi as potential candidates for bioremediation. In: Singh, P.; Kumar, A.; Borthakur, A. **Abatement of Environmental Pollutants**, Elsevier. 2020. p. 177-191.
- SIQUEIRA, J. P. Z., DE ALMEIDA, M. T. G., Biologia Molecular como ferramenta de detecção fúngica no sangue: auxílio diagnóstico e redução de gastos. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 25, n. 3, p. 41-45, 2018.
- SONG, J. S., WOODHAMS, D. C., MARTINO, C., ALLABAND, C., MU, A., JAVORSCHI-MILLER-MONTGOMERY, S., SUCHODOLSKI, J.S., KNIGHT, R., Engineering the microbiome for animal health and conservation. **Experimental Biology and Medicine**. v. 244, n. 6, p.494-504, 2019.
- SPATAFORA, J. W., AIME, M. C., GRIGORIEV, I. V., MARTIN, F., STAJICH, J. E., BLACKWELL, M., The fungal tree of life: from molecular systematics to genome-scale phylogenies. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 5., 1-32, 2017.
- SPENCER, J. F. T., SPENCER, D. M., DE FIGUEROA, L. I. C. Yeasts as Living Objects: Yeast Nutrition. In: SPENCER J. F. T.; SPENCER D. M. (eds) **Yeasts in Natural and Artificial Habitats**. Berlin: Springer, 1997.
- STAJICH, J.E., BERBEE, M.L., BLACKWELL, M., HIBBETT, D.S., JAMES, T.Y., SPATAFORA, J.W., TAYLOR, J.W. The fungi. **Current Biology**. v. 19, p.840–845, 2009.
- STEINBACH, W. J., REEDY, J. L., CRAMER, R. A., PERFECT, J. R., HEITMAN, J., Harnessing calcineurin as a novel anti-infective agent against invasive fungal infections. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 418-430, 2007.
- STIELOW, J. B., LÉVESQUE, C. A., SEIFERT, K. A., MEYER, W., IRINY, L., SMITS, D., ROBERT, V. , One fungus, which genes? Development and assessment of

universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes, **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 35, p. 242-263, 2015.

SUCHODOLSKI, J. S., Diagnosis and interpretation of intestinal dysbiosis in dogs and cats. **The Veterinary Journal**, v. 215, p. 30-37, 2016.

SUHR, M. J., HALLEN-ADAMS, H. E. The human gut mycobiome: pitfalls and potentials—a mycologist’s perspective, **Mycologia**, v. 107, n. 6, p. 1057-1073, 2015.

SHUKLA, A. K., Emerging Infectious Diseases Caused by Fungi in Animals and Their Prevention. **Recent Developments in Fungal Diseases of Laboratory Animals**. Springer, Cham, p. 1-5. doi: 10.1007/978-3-030-18586-2\_1. 2019.

SUMMERS, B.D., Is Frozen Fecal Microbiota Transplantation as Effective as Fresh Fecal Microbiota Transplantation via Colonoscopic Versus Nasogastric Tube Administration in Treating Adults with *Clostridium difficile* Infection? 2019. 12p. Dissertation (Health Sciences – Physician Assistant) - Philadelphia College of Osteopathic Medicine, Philadelphia, 2019.

SUNDARESAN, N., SAHU, A.K., JAGAN, E.G., PANDI, M., Evaluation of ITS2 molecular morphometrics effectiveness in species delimitation of Ascomycota—A pilot study. **Fungal Biology**. v. 123, n. 7, p.517-527, 2019.

SUTCLIFFE, S.G., MAURICE, C.F., Not Just a Passing Phage. **Cell host & Microbe**. v. 26, n. 4, p. 448-9, 2019.

TANG, G., YIN, W., LIU, W., Is frozen fecal microbiota transplantation as effective as fresh fecal microbiota transplantation in patients with recurrent or refractory *Clostridium difficile* infection: a meta-analysis?. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 88, n. 4, p. 322-329, 2017.

TEDERSOO, L., LIIV, I., KIVISTIK, P. A., ANSLAN, S., KÕLJALG, U., BAHRAM, M., Genomics and metagenomics technologies to recover ribosomal DNA and single-copy genes from old fruit-body and ectomycorrhiza specimens, **MycKeys**, v. 13, p. 1, 2016.

TEKPINAR, A. D.; KALMER, A., Utility of various molecular markers in fungal identification and phylogeny, **Nova Hedwigia**, v. 108, n. 3-4, p. 3-4, 2019.

TIEW, P.Y., MAC AOGAIN, M., ALI, N.A., THNG, K.X., GOH, K., LAU, K.J., CHOTIRMALL, S.H., The Mycobiome in Health and Disease: Emerging Concepts, Methodologies and Challenges. **Mycopathologia**, v.1, p.1-25, 2020.

TIZARD, I. R.; JONES, S. W., The microbiota regulates immunity and immunologic diseases in dogs and cats. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 48, n. 2, p. 307-322, 2018.

TORTORA, GERARD J.; CASE, CHRISTINE L.; FUNKE, BERDELL, R. **Microbiologia**. 12ª Edição. Porto Alegre: Artmed Editora, 2016

TRINH, P., ZANEVELD, J. R., SAFRANEK, S., RABINOWITZ, P. M., One health relationships between human, animal, and environmental microbiomes: a mini-review. **Frontiers in Public Health**, v. 6, p. 235, 2018.

TROST, A.; GRAF, B.; EUCKER, J.; SEZER, O.; POSSINGER, K.; GÖBEL, U. Identification of Clinically Relevant Yeasts by PCR-RFLP. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, n.2, p. 201-211, 2004.

TUANYUAN, S.; HONGCHAO, S.; YUAN, F.; HAO, L.; YONGXUE, Z.; LIU, Y.; GUOLIAN, B.; XUN, S. *Cyniclomyces guttulatus* is an opportunistic pathogen in rabbits with coccidiosis. **BioRxiv**, v. 1, p.850230, 2019.

VAN DYKE, M.C., TEIXEIRA, M.M., BARKER, B.M., Fantastic yeasts and where to find them: the hidden diversity of dimorphic fungal pathogens. **Current Opinion in Microbiology**, v. 52, p.55-63, 2019.

VIALLE, A., FEAU, N., ALLAIRE, M., DIDUKH, M., MARTIN, F., MONCALVO, J. M., HAMELIN, R. C. Evaluation of mitochondrial genes as DNA barcode for Basidiomycota. **Molecular Ecology Resources**, v.9,p. 99-113, 2009.

VU, D., GROENEWALD, M., DE VRIES, M., GEHRMANN, T., STIELOW, B., EBERHARDT, U., AL-HATMI, A., GROENEWALD, J.Z., CARDINALI, G., HOUBRAKEN, J., BOEKHOUT, T., CROUS, P.W., ROBERT, V., VERKLEY, G.J.M., Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. **Studies in Mycology**, v. 92, p. 135-154, 2019.

VU, D., GROENEWALD, M., SZÖKE, S., CARDINALI, G., EBERHARDT, U., STIELOW, B., DE VRIES, M., VERKLEIJ, G.J., CROUS, P.W., BOEKHOUT, T., ROBERT, V., DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation. **Studies in Mycology**. v. 85, p.91-105, 2016.

WAINWRIGHT, M., Some highlights in the history of fungi in medicine—A personal journey, **Fungal Biology Reviews**, v. 22, n. 3-4, p. 97-102, 2008.

WALTER, J., ARMET, A.M., FINLAY, B.B., SHANAHAN, F., Establishing or Exaggerating Causality for the Gut Microbiome: Lessons from Human Microbiota-Associated Rodents. **Cell**, v. 180, n. 2, p. 221-32, 2020.

WATKINS, A., BOCCHI, F., Pathogen versus microbiome causation in the holobiont. **Biology & Philosophy**. v. 35, n.1, p.7, 2020.

WESOLOWSKA-ANDERSEN, A., BAHL, M. I., CARVALHO, V., KRISTIANSEN, K., SICHERITZ-PONTÉN, T., GUPTA, R., LICHT, T. R., Choice of bacterial DNA extraction method from fecal material influences community structure as evaluated by metagenomic analysis. **Microbiome**, v. 2, n. 1, p. 19, 2014.

WESTERMARCK, E. Chronic diarrhea in dogs: what do we actually know about it?; **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 31, n. 2, p. 78-84, 2016.

WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J., Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J. et al. (eds), **PCR protocols: a guide to methods and applications**: Academic Press, Inc., New York, USA. 1990. p. 315-322.

WICKES, B. L., WIEDERHOLD, N. P., Molecular diagnostics in medical mycology, **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2018.

WINSTON, J. A. et al. *Cyniclomyces guttulatus* infection in dogs: 19 cases (2006-2013). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 52, n. 1, p. 42-51, 2016.

WOLF, L. A.; MARIMUTHU, S.; SUMMERSGILL, J. T. Detection of *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in whole blood specimens using a duplex real-time

- PCR assay on the ARIES instrument, **Ticks and Tick-borne Diseases**, p. 101387. 2020.
- WU, B., HUSSAIN, M., ZHANG, W., STADLER, M., LIU, X., XIANG, M., Current insights into fungal species diversity and perspective on naming the environmental DNA sequences of fungi. **Mycology**. v. 10, n. 3, p.127-40, 2019.
- WU, Z. W., WANG, Q. M., LIU, X. Z., BAI, F. Y., Intragenomic polymorphism and intergenomic recombination in the ribosomal RNA genes of strains belonging to a yeast species *Pichia membranifaciens*, **Mycology**, v. 7, n. 3, p. 102-111, 2016.
- XU, J., Fungal DNA barcoding. **Genome**, v. 59, n. 11, p. 913-932, 2016.
- YANAI, I., LERCHER, M., What is the question?. **Genome Biol**, v. 20, p. 289. 2019.
- YANG, R.H., SU, J.H., SHANG, J.J., WU, Y.Y., LI, Y., BAO, D.P., YAO, Y.J., Evaluation of the ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS), specifically ITS1 and ITS2, for the analysis of fungal diversity by deep sequencing. **PLoS one**. v. 13, n. 10, 2018.
- YARZA, P., YILMAZ, P., PANZER, K., GLÖCKNER, F. O., REICH, M., A phylogenetic framework for the kingdom Fungi based on 18S rRNA gene sequences, **Marine genomics**, v. 36, p. 33-39, 2017.
- ZIERDT, C. H.; DETLEFSON, C.; MULLER, J.; WAGGY, K.S. *Cyniclomyces guttulatus* (*Saccharomycopsis guttulata*) – Culture, ultrastructure and physiology. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 54, n. 4, p. 357-366, 1988.

## 8 ANEXOS

### 8.1 Parecer da CEUA/IV/UFRRJ

 <b>UFRRJ</b> Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro	<b>Comissão de Ética no Uso de Animais</b> Instituto de Veterinária	
---	--	---

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Análise Genética de Isolados Brasileiros de Desenvolvimento de um Método de Diagnóstico Baseado em PCR, para Detecção de *Cyrclicomyces gutturalis* em Fezes de Cães", protocolado sob o CEUA nº 6304270617 ~~seus~~, sob a responsabilidade de **Douglas McIntosh** e equipe; Tássia Torres Furtado; Gilberto Flausino; Carlos Wilson Gomes Lopes - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 09/11/2018.

We certify that the proposal "Genetic Analysis of Brazilian Isolates for Development of a PCR Based Diagnostic Method for Detection of *Cyrclicomyces gutturalis* in Dog Feces", utilizing 150 Dogs (males and females), protocol number CEUA 6304270617 ~~is~~ ~~seus~~, under the responsibility of **Douglas McIntosh** and team; Tássia Torres Furtado; Gilberto Flausino; Carlos Wilson Gomes Lopes - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 11/09/2018.

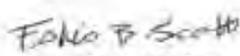
Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 01/2019 a 05/2019 Área: Parasitologia Animal

Origem:	Animais provenientes de nascido espontâneo						
Espécie:	Cães	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	0 a 48 meses	N:	150
Linagem:	Diversas raças			Peso:	0 a 50 kg		

Local do experimento: Laboratório Multicelular de Biologia Molecular

Seropédica, 17 de março de 2020

 Prof. Dr. Fabio Barbour Scott Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro	 Carlos Alexandre Rey Masiles Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
--	---

## 8.2 Declaração CTIVeterinário



AV. DAS AMÉRICAS 3939 BL 2 LOJA I BARRA DA TIJUCA, ESPLANADA DA  
BARRA. TELS: 3326 0440 / 2431 7445 / 964107998  
CNPJ: 03.274.141.0001/90

### DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que autorizo a utilização de amostras fecais, bem como ter acesso aos seus prontuários atendidos no Centro de Terapia Intensiva e Emergência Veterinária, sob minha responsabilidade para serem usados no ANÁLISE GENÉTICA DE ISOLADOS BRASILEIROS E DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE DIAGNÓSTICO, BASEADO EM PCR, PARA DETECÇÃO DE *Cyniclomyces guttulatus* em Fezes de cães procedentes da Barra da Tijuca, Rio de Janeiro, RJ, cujos resultados farão parte dos dados da Tese de doutorado da Biomédica, TASSIA TORRES FURTADO, discente do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias/UFRRJ.

Rio de Janeiro, 15 de dezembro de 2017.

**Paulo Daniel Sant'Anna Leal, MV, MSc, DSc.**  
**CRMVRJ 3260**  
Coordenador Técnico do Centro de Terapia Intensiva e Emergência  
Veterinária

**8.3 “Variance table” comparando as sequências EF464552 com as sequências derivadas dos isolados de coelho (RST2) e de cão (DST2) de *Cyniclomyces guttulatus* para a sequência da região ITS (ITS1-5.8S rRNA-ITS2), com a sequência equivalente obtida para os isolados ST1 (coelho e cão)**

Top Sequence	ST1	EF464552	RST2	DST2	Total
33	G			:	1
128	G			A	1
147	C	G	G	G	3
150	T	C	C	C	3
152	T	A	A	A	3
155	C	:	:	:	3
157	G	C	C	C	3
159	:	C	C	C	3
163	A	T	T	T	3
165	T	G	G	G	3
181	:	C	C	C	3
183	C	T	T	T	3
184	:	T	T	T	3
187	:	C	C	C	3
206	A	G	G	G	3
207	G	A	A	A	3
209	G	A	A	A	3
210	A	T	T	T	3
214	C	G	G	G	3
219	C	T	G	G	3
221	G	A	A	A	3
222	A			G	1
223	G		C		1
225	T	:	:	:	3
227	C		G		1
229	C		T		1
232	:	G	G	G	3
234	C	T	T	T	3
235	A	C	C	C	3
242	T	:	:	:	3
243	A	:	:	:	3
249	A	:	:	:	3
251	A	T	T	T	3
252	T	A	A	A	3
344	G			A	1
375	T	C		C	2
376	T	C		C	2
379	C	T		T	2
415	C	T		T	2
425	:	T		T	2
427	:	T		T	2
428	G	C		C	2
429	A	T		T	2

449	C				T	1
452	T		C		C	2
457	T		:		:	2
461	A		G		G	2
485	G		A	A	A	3
486	C		T	T	T	3
490	A		:	:	:	3
491	A		G	G	G	3
495	C		:	:	:	3
496	A		:	:	:	3
498	C		G	G	G	3
499	A				G	1
503	G		C	C	C	3
507	T		C	C	C	3
510	C		G	G	G	3
511	A		T	T	T	3
529	T		:	:	:	3
530	A		:	:	:	3
538	G		:	:	:	3
540	C		:	:	:	3
542	G		:	:	:	3
543	A		T	T	T	3
546	C		:	:	:	3
547	A		G	G	G	3
549	T		G	G	G	3
550	G		A	A	A	3
552	T		A	A	A	3
553	A		C	C	C	3
555	T		A	A	A	3
560	C		:	:	:	3
561	G		A	A	A	3
567	C		G	G	G	3
592	:		T	T	T	3
602	C		:	:	:	3
603	A		:	:	:	3
604	C		G	G	G	3
608	A				G	1
609	C		T	T	T	3
625	T		:	:	:	3
626	T		:	:	:	3
627	G		:	:	:	3
629	G		:	:	:	3
630	G		A	A	A	3
633	A		G	G	G	3
635	G		C	C	C	3
637	C		T	T	T	3
638	A		T	T	T	3
640	T		C	C	C	3
642	A		C	C	C	3
645	C		T	T	T	3
648	T		C	C		2
658	A		G	G	G	3
Total		0	85	77	91	253

**8.4 “Variance table” comparando a sequência (611 pb) derivada dos isolados ST4 para a região ITS (ITS1-5.8S rRNA-ITS2) com as sequências obtidas para os isolados ST1, RST2 e ST3 de *Cynicomyces guttulatus***

Top Sequence	ST4	ST1	RST2	ST3	Total
21	G	:	:	C	3
24	A	:	:	:	3
25	A	:	:	:	3
28	T	:	:	:	3
30	T	:	:	:	3
31	A			G	1
32	T	G	G	G	3
33	T	G	G	G	3
34	A	C	C	G	3
35	G			C	1
37	T	:	:	:	3
38	A	G	G		2
39	A	G	G	G	3
43	T	A	A	A	3
47	T	G	G	G	3
48	T	C	C	C	3
50	:	C	C		2
52	C	T	T	T	3
55	:	A	A		2
56	:	A	A	T	3
58	T	G	G	G	3
61	A	G	G		2
63	T			:	1
65	T	G	G	C	3
66	G	C	C	C	3
68	T	:	:	:	3
69	T	C	C	C	3
82	C	T	T	T	3
83	C	T	T	T	3
85	:			T	1
86	:			G	1
87	:			G	1
88	C			T	1
90	:			T	1
91	:			T	1
92	:			T	1
93	A			C	1
94	G	C	C	C	3
98	T	G	G	G	3
101	:	A	A	A	3
112	:	G	G	G	3
113	:	G	G	G	3
114	C	:	:	G	3

115	C		G	G	G	3
116	C				A	1
117	T				G	1
120	:		T	T	T	3
122	:		C	C	C	3
126	:		C	C	C	3
128	C		G	G	G	3
129	A		T	T	T	3
131	A		C	C	C	3
132	T				:	1
133	T				:	1
134	T		C	C	C	3
136	T		C	C	C	3
137	C		T	T	T	3
139	:				T	1
140	C				T	1
142	:				G	1
143	:		C	C	C	3
144	T		:	:	C	3
146	:		T	T	T	3
147	A		:	:	T	3
149	T		:	:	:	3
150	T		G	G	A	3
153	A				G	1
169	C			G		1
172	T			:		1
173	C		:		:	2
174	T		:		:	2
175	A		:		:	2
176	C		:	:	:	3
178	T			G		1
179	T			:		1
180	G			:		1
181	C			:		1
183	A		G	C	G	3
184	A		T	T	T	3
185	:			C		1
187	C		T	T	T	3
189	A			T		1
191	:		T	G	T	3
194	:		T	T	T	3
198	T		C	C	C	3
200	:		T	T	T	3
201	C		G	G	G	3
204	C		T	T	T	3
207	C		:		:	2
208	:		T	T	T	3
209	:		C	T	C	3
210	G		:	T	:	3
211	G		:	C	:	3
213	T		C	C	C	3
216	A		G	G	G	3
232	C		A	G	A	3
233	A		G		G	2
235	:		G	A	G	3
236	T		A		A	2
240	G		C		C	2
245	T		C	G	C	3

247	C		G	:	G	3
249	G			A		1
250	T			C		1
252	T		A	A	A	3
253	C			G		1
254	T		:	:	:	3
256	C			T		1
257	T		A	A	A	3
259	:			G		1
261	G		:	T	:	3
263	:		A		A	2
266	A		:	:	:	3
268	:		A	A	A	3
269	G		A	:	A	3
271	:		T		T	2
274	:		A	A	A	3
275	T		C	C	C	3
278	A			:		1
280	T		A		A	2
281	T			A		1
403	T		C	C	C	3
405	C		T	T	T	3
408	T		C	C	C	3
414	G		A	A	A	3
415	A		G	G	G	3
444	T		C	C	C	3
453	C		:	:	:	3
454	T		G	G	G	3
457	:		A	A	A	3
476	T		:	:	:	3
477	T		C	C	C	3
482	:		T	T	T	3
483	:		G	G	G	3
484	C		G	G	G	3
486	A		T	T	T	3
487	G		A	A	A	3
489	A		C	C	C	3
493	:		C	C	C	3
494	:		G	G	G	3
495	A		G	G	G	3
508	C		G	G	G	3
511	:		T	T	T	3
512	C		G	G	G	3
514	A		G		G	2
515	T		C		C	2
518	A		:	:	:	3
520	A			:		1
521	A			G		1
522	T		G	G	G	3
523	G		A	A	A	3
525	:		C		C	2
526	T		A	G	A	3
528	:		C		C	2
529	T		A	A	A	3
531	A		T	T	T	3
533	:		G	C	G	3
534	:		C	C	C	3
537	T			C		1

540	A		C	G	C	3
541	C		A	T	A	3
556	:		A	A	A	3
557	:		C	C	C	3
558	:		A	A	A	3
559	:		T		T	2
560	:		A		A	2
561	:		C	C	C	3
562	:		A	A	A	3
564	:		T	T	T	3
565	:		T	T	T	3
568	G			:		1
569	:		C	C	C	3
570	:		C		C	2
572	:		G		G	2
573	T		A		A	2
575	:		G	G	G	3
576	C			G		1
577	:		A		A	2
579	:		T		T	2
581	A		C		C	2
582	:		T	C	T	3
584	G		C	C	C	3
585	T			C		1
586	A		G		G	2
587	A		G	G	G	3
588	G		C		C	2
591	A		G		G	2
594	:		C	C	C	3
597	:		C	G	C	3
598	A		G	G	G	3
599	T		C	C	C	3
620	T		G	G	G	3
622	:			T		1
625	:		T	T	T	3
628	:		A	A	A	3
629	:		T	T	T	3
630	:		C	C	C	3
631	:		A	A	A	3
632	C			:		1
633	:		A		A	2
634	:		C	G	C	3
638	:		A	A	A	3
639	:		C	T	C	3
647	A		G	G	G	3
648	A		G	G	G	3
649	C		T	T	T	3
654	A		G	G	G	3
655	T			C		1
656	:		T		T	2
657	:		G	A	G	3
659	T		G	G	G	3
660	C		G	G	G	3
661	:			T		1
663	T		G		G	2
664	C		A	T	A	3
667	G		T	:	T	3
669	A			:		1

670	:		G		G	2
671	T			:		1
672	C		G	G	G	3
673	A			C		1
675	:		T	T	T	3
676	C			T		1
677	:		G	G	G	3
679	:		T	C	T	3
686	:		C	C	C	3
687	T		A	A	A	3
689	G		A		A	2
690	C		A	A	A	3
691	T		A	A	A	3
Total		0	182	181	197	560