



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

NOVA

MEDICAL
SCHOOL
FACULDADE
DE CIÊNCIAS
MÉDICAS

itqb

UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

40 ANOS
FCT
FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



DESDE 1912
INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Atributos genómicos e fenotípicos que influenciam a ocorrência de *Saccharomyces cerevisiae* como microrganismo patogénico oportunista

Marta Afonso Morgadinho Martins

Dissertação para obtenção do
Grau de Mestre em Microbiologia Médica

Outubro 2019



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

NOVA

MEDICAL
SCHOOL
FACULDADE
DE CIÊNCIAS
MÉDICAS

itqb

UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

40 ANOS
FCT
FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



DESDE 1902
INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Atributos genómicos e fenotípicos que influenciam a ocorrência de *Saccharomyces cerevisiae* como microrganismo patogénico oportunista

Marta Afonso Morgadinho Martins

Dissertação para obtenção do
Grau de Mestre em Microbiologia Médica

Orientadores:

Professor Doutor José Paulo Sampaio (Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa)

Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa
(Yeast Genomics Lab/Departamento de Ciências da Vida)

Outubro 2019

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao meu orientador, Professor Doutor José Paulo Sampaio, pelos ensinamentos, partilha de conhecimento e orientação ao longo deste trabalho. Mas também, pela sua confiança em mim no desenvolvimento deste projeto e liberdade para partilhar as minhas sugestões e ideias.

Quero agradecer a todos os professores do Yeast Genomics Lab, Professora Doutora Paula Gonçalves e Professora Doutora Madalena Oom, por todas as intervenções construtivas no decorrer dos labmeetings assim como na disponibilidade para me esclarecer dúvidas no desenvolvimento do trabalho. Agradeço o apoio e aprendizagem bioinformáticos da Professora Doutora Patrícia Brito.

Gostaria de fazer um especial agradecimento à minha colega e professora doutoranda Ana Pontes, por me ter ensinado técnicas laboratoriais essenciais ao desenvolvimento das experiências. Por me ter introduzido à bioinformática. Pela sua paciência, esforço, dedicação e apoio incondicional a todo o meu trabalho. Pela sua força e determinação, ensinando-me a ultrapassar os momentos mais difíceis. Quero agradecer a todos os membros do Yeast Genomics Lab. À Doutora Carla Gonçalves pelas opiniões construtivas e transmissão de calma na resolução de problemas. Às minhas colegas de laboratório Cátia Gil, Carolina Ferreira e Alexandra Cabrita pelo apoio e momentos de descontração para ajudar a alegrar o dia.

Um agradecimento à PYCC, Cláudia Carvalho e Andreia Aires, pelo fornecimento de estirpes para a realização deste trabalho. Agradeço a todos os professores que me enviaram estirpes permitindo-me fazer uma análise mais ampla a nível fenotípico das estirpes de origem clínica, Professora Doutora Teresa Gonçalves da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Professor Doutor Gianni Liti da Universidade Côte d'Azur, Nice e Professora Sofia Costa de Oliveira da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. Gostaria de agradecer ao Professor Doutor Artur Moro do departamento de Química pela sua disponibilidade e ajuda técnica no funcionamento do fluorímetro. Agradeço ao Professor Doutor Daniel Sobral pela disponibilidade incansável na resolução de problemas informáticos, nomeadamente no período do mês de Agosto.

Agradeço à minha colega de mestrado e amiga Bárbara Simões, pela sua amizade, pelo seu apoio desde o primeiro dia de mestrado curricular. Pela sua motivação e força em todos os momentos bons e menos bons. Por todos os momentos passados em conjunto no decorrer desta etapa.

Por fim, expressar um grande agradecimento ao meu Pai, Mãe e irmão João pela confiança que depositaram em mim desde que decidi seguir a carreira científica. Por tudo o que me ensinaram que me permitiu gerir e enfrentar os desafios desta dissertação. Pelo seu apoio emocional, força e carinho incondicional.

Dedico esta dissertação ao Tio Toi

Resumo

Saccharomyces cerevisiae é uma levedura amplamente utilizada na indústria fermentativa e farmacêutica para a produção de bebidas, alimentos e suplementos probióticos. O seu nicho natural são os carvalhos, no entanto, é frequentemente encontrada em ambientes antropogênicos como vinhas ou padarias. Dentro desta espécie podemos distinguir populações selvagens e domesticadas, sendo que as últimas possuem traços de domesticação genômicos e fenotípicos derivados da pressão seletiva dos ambientes criados pelo Homem. Contudo, *S. cerevisiae* possui a capacidade de colonizar nichos como o sistema gastro-intestinal, respiratório ou vaginal, podendo causar infecções como agente oportunista. Tem ocorrido um número crescente de casos de infecção em indivíduos imunocomprometidos, sendo as mais comuns a vaginite, pneumonia e fungêmia. Características como o crescimento a elevadas temperaturas, produção de pseudo-hifas, tolerância ao *stress* oxidativo e resistência ao sulfato de cobre são possíveis fatores de virulência. Dado isto, tem havido um aumento no interesse do estudo deste microrganismo como agente oportunista.

O objetivo deste estudo é elucidar as origens evolutivas e os mecanismos de virulência de estirpes Clínicas de *S. cerevisiae*. Deste modo, foram feitas análises genômicas para compreender em que populações se agrupam as estirpes Clínicas e ensaios fenotípicos para investigar características que diferenciem as estirpes Clínicas das não-clínicas. Assim, verificou-se que as estirpes Clínicas se agrupam na sua maioria nas populações domesticadas do Vinho e do Pão ou são estirpes mosaico. As estirpes mosaico resultam da recombinação entre as populações domesticadas do Saquê, Vinho e Pão. A nível fenotípico, as estirpes mosaico, seguindo-se das restantes estirpes Clínicas, são as mais tolerantes a elevadas temperaturas, produzem pseudo-hifas longas num curto período de tempo e são resistentes a elevadas concentrações de cobre. Estes resultados permitem-nos inferir que as estirpes Clínicas possuem uma combinação de mecanismos de virulência que lhes fornecem uma adaptação na transição para a patogenicidade oportunista.

Palavras-chave

Saccharomyces cerevisiae, infecção oportunista, Análise filogenética, Análise populacional, Mecanismos de virulência.

Abstract

Saccharomyces cerevisiae is a yeast broadly used in the fermentation and pharmaceutical industry for beverages, food and probiotic supplements production. Its natural ecological niche is the oak trees. However, is frequently found in anthropogenic environments like vineyard and bakeries. Within the *S. cerevisiae* species is possible to distinguish between wild or domesticated populations. This last type has acquired genomic and phenotypic traits due to the selective pressure imposed by human's environments. However, *S. cerevisiae* have the ability to colonize niches like the gastrointestinal, respiratory and vaginal systems, and it can cause infections as an opportunistic agent. There has been an increasing number of infections cases in immunocompromised individuals, the most common being vaginitis, pneumonia and fungemia. Characteristics such as high-temperature growth, pseudohyphae production, oxidative stress tolerance and copper sulfate resistance are factors associated with virulence. Given this, there has been an increase in the interest of studying this microorganism as an opportunistic agent. The goal of this study is to clarify the evolutionary origins and the virulence mechanisms of *S. cerevisiae* clinical strains. Thereby, it was performed genomic analyses in order to comprehend in which populations this strains cluster, as well as phenotypical assays, to investigate the characteristics that distinguish the clinical strains from the non-clinical ones. It was verified that the clinical strains cluster, mostly within the Wine and Bread domesticated populations or are mosaic strains. The mosaic strains are a result of the recombination between the Sake, Wine and Bread domesticated populations. At the phenotypical level, the mosaic strains, followed by the remaining clinical strains, appear to be greatly adapted to high temperatures, produce longer pseudohyphae in a short period of time and are more resistant to high copper concentrations. These results allow us to infer that clinical strains have a combination of virulence mechanisms that provide them with an adaptation in the transition to opportunistic pathogenicity.

Key-words: *Saccharomyces cerevisiae*, opportunistic infection, phylogenetic analysis, populational analysis, virulence mechanisms.

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Palavras-chave.....	ii
Abstract.....	iii
Key-words.....	iii
Abreviaturas.....	viii
1.Introdução.....	1
1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : a espécie e o seu nicho ecológico.....	1
1.2 Populações selvagens e domesticadas.....	2
1.3 Recombinação inter-linhagens e estirpes mosaico.....	3
1.4 <i>Candida glabrata</i> : uma levedura oportunista filogeneticamente próxima de <i>S.cerevisiae</i>	4
1.5 <i>S. cerevisiae</i> como microrganismo patogénico oportunista.....	5
1.5.1 Colonização de novos nichos e ocorrência de infeções oportunistas.....	5
1.5.2 Probiótico baseado em <i>Saccharomyces boulardii</i> corresponde a <i>S. cerevisiae</i> ?.....	6
1.5.3 Estudos de caso e impacto na saúde humana.....	8
1.5.4 Diagnóstico e terapêutica.....	10
1.6 Fatores que contribuem para a emergência de <i>S. cerevisiae</i> como agente patogénico oportunista...	11
1.6.1 Fatores fenotípicos.....	11
1.6.2 Fatores genotípicos.....	14
1.7 Objetivos do estudo.....	17
2.Materiais e Métodos.....	18
2.1 Estirpes de leveduras e seu armazenamento.....	18
2.1.1 Culturas de estirpes utilizadas no estudo.....	18
2.1.2 Seleção de estirpes para análise fenotípica.....	18
2.1.3 Seleção de estirpes para análise do genoma.....	18
2.1.4 Manutenção das estirpes.....	19

2.2 Ensaio fenotípicos.....	18
2.2.1 Temperatura máxima de crescimento	19
2.2.2 Produção de pseudo-hifas	19
2.2.3 Resistência ao sulfato de cobre	20
2.2.4 Ensaio de tolerância ao <i>stress</i> oxidativo.....	20
2.2.4.1 Viabilidade celular	21
2.2.5 Presença de ROS intracelulares	21
2.3 Análise do genoma completo	22
2.3.1 Extração de DNA para sequenciação do genoma completo	22
2.3.2 Sequenciação do genoma completo e mapeamento das <i>reads</i>	23
2.3.3 Análise filogenética.....	24
2.3.4 Análise populacional.....	24
3.Resultados e Discussão.....	25
3.1 Divisão das estirpes por análise genómica ou por grupos ecológicos/tecnológicos.....	25
3.2 Análise Filogenética	31
3.3 Análise populacional.....	33
3.4 Caracterização fenotípica	36
3.4.1 Temperatura máxima de crescimento	36
3.4.2 Produção de pseudo-hifas	40
3.4.3 Ensaio de resistência ao Sulfato de Cobre.....	46
3.4.4 Tolerância ao <i>stress</i> oxidativo	49
4.Considerações Finais	55
5.Perspectivas Futuras.....	57
6.Referências Bibliográficas.....	58

Índice de Figuras

Figura 1. Filogenia baseada em sequências 18S rDNA de 11 ascomicetas de entre os quais 5 espécies de <i>Candida</i>	4
Figura 2. Árvore filogenética Neighbor-joining das regiões ITS1-5.8S-ITS2 de estirpes <i>S. boulardii</i> e outras espécies de <i>Saccharomyces</i>	7
Figura 3. Mecanismos de sobrevivência de <i>S. cerevisiae</i> após fagocitose por macrófago.....	16
Figura 4. Esquema representativo do protocolo utilizado no ensaio de tolerância ao stress oxidativo.	21
Figura 5. Esquema dos grupos de estirpes utilizados neste estudo.....	25
Figura 6. Posição filogenética das estirpes das categorias Clínicas e Associadas ao Homem entre estirpes de diferentes populações definidas de <i>S. cerevisiae</i>	32
Figura 7. Análise populacional de 100 estirpes de <i>S. cerevisiae</i> das categorias Clínicas, Associadas ao Homem e estirpes de populações definidas	34
Figura 8. Plaqueamento por gotas de <i>S. cerevisiae</i> em placas YPD, exemplo representativo da classificação dos diferentes tipos de crescimento no ensaio da temperatura máxima de crescimento.....	36
Figura 9. Temperatura máxima de crescimento das estirpes de <i>C. glabrata</i> e <i>S. cerevisiae</i> testadas em meio YPD sólido.....	37
Figura 10. Temperatura máxima de crescimento das estirpes das categorias Associadas ao Homem e Clínicas.....	38
Figura 11. Observação microscópica de colônias de <i>S. cerevisiae</i> , com ampliação 100X para observação do comprimento das pseudo-hifas.....	40
Figura 12. Observação microscópica de colônias de <i>S. cerevisiae</i> , com ampliação 100X para observação do desenvolvimento das pseudo-hifas.....	41
Figura 13. Comprimento das pseudo-hifas 14 dias após inoculação em meio SLAD das estirpes das categorias Clínicas, Associadas ao Homem e populações conhecidas	41
Figura 14. Comprimento das pseudo-hifas 14 dias após inoculação em meio SLAD das estirpes das categorias Associadas ao Homem e Clínicas	42
Figura 15. Desenvolvimento de pseudo-hifas após 14 dias de incubação em meio SLAD das estirpes das categorias Clínicas, Associadas ao Homem e populações conhecidas.....	43
Figura 16. Tempo de crescimento das pseudo-hifas das estirpes das categorias Clínicas, Associadas ao Homem e populações conhecidas.....	44
Figura 17. Tempo de crescimento das pseudo-hifas das categorias Associadas ao Homem e Clínicas	45
Figura 18. Gráficos violino da resistência em mM ao sulfato de cobre nas estirpes dos diferentes grupos e populações após três dias de incubação.....	47

Figura 19. Gráficos violino da resistência ao sulfato de cobre em mM das estirpes do grupo Associadas ao Homem e Clínicas após três dias de incubação.....	48
Figura 20. A: Ensaio de viabilidade de tolerância ao stress oxidativo com 1,5 mM de H ₂ O ₂ das estirpes das categorias Clínicas, Associadas ao Homem e populações conhecidas. B: Análise estatística one-way Anova Comparações múltiplas com correção Bonferroni.....	51
Figura 21. A: Ensaio de viabilidade de tolerância ao stress oxidativo com 2 mM de H ₂ O ₂ das estirpes das categorias Clínicas, Associadas ao Homem e populações conhecidas. B: Análise estatística one-way Anova Comparações múltiplas com correção Bonferroni.....	52
Figura 22. Presença de ROS intracelulares após exposição a 2 mM de H ₂ O ₂ em estirpes de viabilidade baixa, média e elevada.....	53

Índice de Tabelas

Tabela 1. Estudos de caso de infeções causadas por <i>S. cerevisiae</i> datados entre 1989 e 2019, apresentando os fatores de risco dos indivíduos que adquiriram infeção, o tipo de infeção e a possível causa da aquisição.	9
Tabela 2. Estirpes cujas sequências foram obtidas por sequenciação de novo do genoma completo para este estudo.	23
Tabela 3. Estirpes utilizadas análise genómica e fenotípica deste estudo e sua respetiva origem geográfica e ecológica, classificação por sequenciação do genoma completo (WGS), número de heterozigotias e número de acesso no NCBI.	26
Tabela 4. Estirpes mosaico analisadas neste estudo, 23 estirpes da categoria “Clínicas” e duas estirpes da categoria “Associadas ao Homem”. Origem ancestral de cada estirpe inferida através da análise populacional.	35

Abreviaturas

PYCC	do inglês <i>Portuguese Yeast Culture Collection</i>
MO	do inglês <i>Mediterranean Oaks</i>
YPD	do inglês <i>Yeast extract Peptone Dextrose</i>
YMA	do inglês <i>Yeast Malt Agar</i>
SLAD	do inglês <i>Synthetic Low Ammonia Dextrose Medium</i>
DO	Densidade ótica
YNB	do inglês <i>Yeast Nitrogen Base</i>
Rpm	rotações por minuto
CuSO ₄	sulfato de cobre
H ₂ O ₂	água oxigenada
ROS	do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>
CFUs	do inglês <i>Colony Forming Unit</i>
VIH	vírus da imunodeficiência humana
Q.	<i>Quercus</i>
WGS	do inglês <i>Whole Genome Sequencing</i>
GRAS	do inglês <i>Generally Recognized As Safe</i>
IFN γ	interferão-gama
TNF α	fator de necrose tumoral alfa

1.Introdução

1.1 *Saccharomyces cerevisiae*: a espécie e o seu nicho ecológico

O género *Saccharomyces* possui atualmente sete espécies naturais distintas (*S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, *S. arboricola*, *S. eubayanus* e *S. uvarum*) e duas espécies originadas a partir da pressão seletiva de ambientes fermentativos criados pelo Homem (*S.pastorianus* e *S.bayanus*) (Sampaio & Gonçalves, 2017). Este género está presente em diversos nichos que se podem diferenciar entre nichos naturais ou antropogénicos, de entre os quais podemos destacar como nichos naturais os ambientes associados a árvores do género *Quercus* na Europa, Rússia e América do Norte (casca da árvore, exsudados, bolotas, folhas e solo circundante) e do género *Nothofagus* na América do Sul. Como nichos antropogénicos podemos salientar as vinhas, adegas, fábricas de cerveja e destilarias (Hittinger, 2013).

Desde a Pré-História, que existem evidências da interação entre o Homem e a espécie *S. cerevisiae* através da transformação de açúcares em etanol para o fabrico de bebidas e alimentos fermentados, produzidos para fins nutritivos, para a preservação dos alimentos, cerimónias religiosas ou para tratamentos medicinais. Estas técnicas biotecnológicas evoluíram durante o período Neolítico há cerca de 7000 a.C., com a sedentarização do homem e início do desenvolvimento agrícola. Muitos agricultores começaram a criar animais e a cultivar plantas de forma a obterem fontes de nutrientes mais estáveis e, desta forma, selecionaram e promoveram a domesticação de plantas e animais. Atualmente pensa-se que, simultaneamente, ocorreu a domesticação de microrganismos, nomeadamente de leveduras como *S. cerevisiae*. Análises químicas de vasos do período Neolítico comprovaram que estes continham líquidos muito semelhantes a bebidas fermentadas. Achados arqueológicos de escrituras da dinastia Shang na China, datados de 1200-1000 a.C., fazem referência à existência de bebidas fermentadas a partir de frutos e de arroz. Células de leveduras foram encontradas em resíduos alimentares conservados em túmulos egípcios, que datam 3000 a.C. (Hittinger, 2013; Samuel, 1996). Análises moleculares de jarros egípcios, utilizados no armazenamento de bebidas fermentadas, datados de 3150 a.C., permitiram identificar a presença da espécie *S. cerevisiae* (Cavaliere et al, 2003; Gibbons & Rinker, 2016).

Desde há milénios que existe uma estreita interação entre o Homem e *S. cerevisiae* por via do consumo de alimentos e bebidas fermentados por este microrganismo. Este é também um dos principais organismos-modelo eucariotas, pelo que o conhecimento aprofundado desta espécie permite-nos estudar com pormenor mecanismos de biologia celular e molecular assim como de genómica evolutiva. Uma das principais vantagens de *S. cerevisiae*, que justifica ter sido o primeiro genoma eucariótico a ser sequenciado, é o facto de possuir um genoma de pequenas dimensões com 12Mb (Hittinger, 2013; Taylor et al., 1993). Esta levedura ascomiceta é amplamente utilizada na biotecnologia e na alimentação, como por exemplo, na produção de

bebidas e alimentos fermentados como o vinho, cerveja, saquê, café e pão. Contudo, é também utilizada na indústria farmacêutica para a produção de suplementos probióticos. Deste modo, *S. cerevisiae* com a sua utilidade centenária a nível biotecnológico, alimentar e farmacológico, sempre foi considerado como sendo um microrganismo GRAS, pertencente ao nível de biossegurança 1 (BSL1), ou seja, microrganismo que, com elevada probabilidade, não causa risco ao Homem ou a animais (Marsit et al., 2017; Muller et al., 2012; OMS, 2004).

1.2 Populações selvagens e domesticadas

No seu meio natural, os microrganismos estão perante condições abióticas desafiantes, existindo uma maior competição entre as estirpes pela obtenção de nutrientes, que estão distribuídos de forma dispersa. Isto contrasta com os ambientes antropogénicos nos quais são fornecidas todas as condições necessárias para o seu desenvolvimento. Assim, nos ambientes industriais existe uma facilidade na adaptação do genoma destas estirpes, nomeadamente em *S. cerevisiae* que apresenta uma elevada plasticidade genómica (Gibbons & Rinker, 2016).

A utilização desta levedura na indústria de bebidas e alimentos fermentados ao longo do tempo levou a uma domesticação das estirpes especializando-as na produção de cada um dos produtos da indústria fermentativa e farmacêutica, fornecendo-lhes características selecionadas pelo Homem que melhoram o paladar, os aromas, a cor ou da digestibilidade. Estas características designam-se por assinaturas de domesticação e são originadas devido ao facto das estirpes desenvolverem linhagens em nichos criados pelo Homem, sem contacto com as estirpes dos nichos naturais (Gallone et al., 2016). Por conseguinte, *S. cerevisiae* desenvolveu a capacidade de crescer em condições extremas constituídas por variados stresses como pressão osmótica, elevada concentração de etanol ou *stress* oxidativo.

Em consequência da adaptação a novos nichos ambientais, as estirpes sofrem alterações em regiões específicas do seu genoma que se refletem não só a nível genotípico, como no caso das poliploidias, duplicação genómica e perda ou aquisição de genes, como também a nível fenotípico com o aumento da resistência a elevadas concentrações de compostos como o sulfato de cobre, cloreto de sódio e tolerância a elevadas ou baixas temperaturas (Purugganan & Fuller, 2009; Legras et al., 2018).

Através da análise do genoma completo é possível distinguir diferentes populações dentro da espécie *S. cerevisiae*. Na generalidade, as populações parecem agrupar-se de acordo com a geografia e os substratos de onde são isoladas. Podemos dividir as populações de *S. cerevisiae* em populações selvagens, isoladas de nichos ambientais não humanos, ou em populações domesticadas, isoladas de ambientes criados pelo Homem, principalmente industriais. De entre as diversas populações selvagens podemos destacar a dos Carvalhos Mediterrânicos, utilizada neste estudo, associada a nichos relacionados com carvalhos no Sul da

Europa. Esta população está descrita como sendo a potencial ancestral da população do Vinho. Para além da população dos Carvalhos Mediterrânicos já foram descritas outras populações selvagens como a da América do Norte e Japão e a do Brasil (Sampaio & Gonçalves, 2017) .

As estirpes de populações domesticadas apresentam uma elevada diversidade genómica e fenotípica devido às diversas condições de *stress* a que estão expostas, selecionando estirpes com genomas que lhes fornecem uma melhor adaptação que os seus parentais.

As populações domesticadas pelo homem variam entre a população do Vinho, do Pão e da Cerveja, utilizadas na análise fenotípica deste estudo, entre outras, como a população do Saquê. A população do Vinho está dispersa mundialmente, partindo da Europa, passando pela América ou Oceânia. Corresponde a uma população que apresenta diversos traços de domesticação, associados à resistência a compostos (ou situações ambientais) e relacionados com a cultura da vinha e a produção de vinho, tais como a tolerância ao sulfato de cobre, traduzida no aumento do número de cópias dos genes CUP, ou da seleção de características favoráveis à atividade metabólica durante a fermentação do vinho. A população do Pão resulta da mistura por recombinação de várias populações iniciais, tendo ancestralidade nas populações da Cerveja, do Vinho e do Saquê e compreende estirpes com uma ploidia superior a 2n. A população da Cerveja apresenta também uma ploidia superior a 2n e assinaturas de domesticação resultantes da adaptação aos ambientes fermentativos das cervejarias, como é o caso da inativação de genes responsáveis pelos sabores fenólicos (PAD1, FDC1), que são indesejáveis na cerveja (Sampaio & Gonçalves, 2017).

Em suma, *S. cerevisiae* é uma levedura que apresenta uma grande diversidade intraespecífica podendo-se distinguir populações selvagens de domesticadas. Estas últimas apresentam traços de domesticação que lhes permitem estar mais bem adaptadas a ambientes associados ao homem que por sua vez podem estar associados a uma adaptação a novos nichos ambientais como o corpo humano, tornando-se microrganismos comensais.

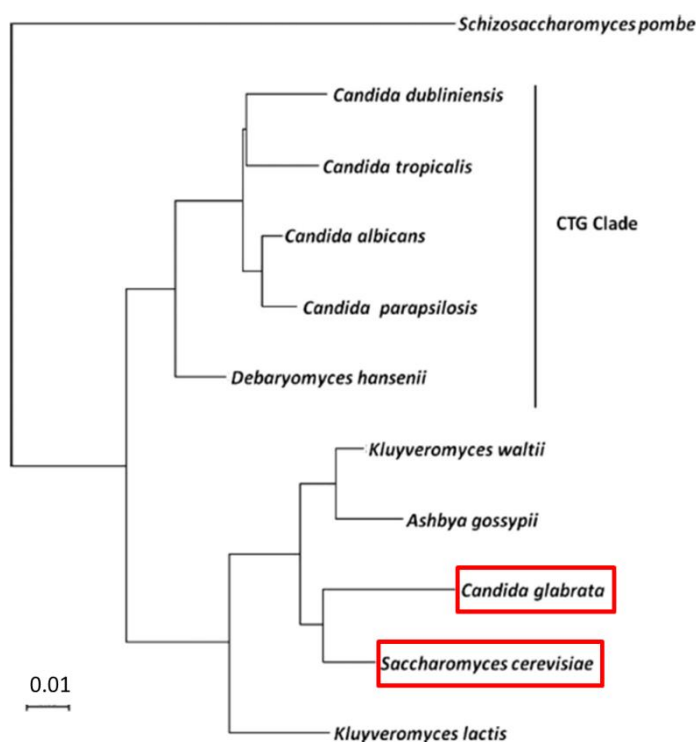
1.3 Recombinação inter-linhagens e estirpes mosaico

S. cerevisiae é uma levedura sexuada, sendo possível o cruzamento, e conseqüentemente a recombinação, entre estirpes de diferentes linhagens o que inclui, por exemplo, representantes de diferentes populações. Não obstante a recombinação inter-linhagens, a migração parece também ser um fenómeno natural dentro desta espécie, que põe em contacto genótipos distintos. Estes dois eventos, em conjunto, contribuem para a ocorrência de “estirpes mosaico”, ou seja, estirpes cujo genoma resulta da recombinação entre estirpes de linhagens ou de populações diferentes. As estirpes mosaico parecem estar mais bem adaptadas a ambientes ricos em açúcares, sendo mais frequentemente isoladas de nichos colonizados por populações domesticadas (Sampaio & Gonçalves, 2017). Por outro lado, já foram descritos em *S. cerevisiae* vários casos de transferência horizontal de genes a partir de outras espécies do género *Saccharomyces* ou mesmo a partir de espécies de

outros gêneros, o que contribui para a diversidade genética. Não menos importante é a ocorrência de hibridação entre *S. cerevisiae* e outras espécies do mesmo gênero (Wei et al., 2007; Pontes et al., 2019).

1.4 *Candida glabrata*: uma levedura oportunista filogeneticamente próxima de *S. cerevisiae*

Candida glabrata foi descrita em 1957 como sendo um microrganismo patogénico emergente (Wickerham, 1957). Décadas mais tarde, verificou-se um crescente aumento no número de infeções causadas por agentes patogénicos de origem fúngica, devido a diversos fatores como o aumento da população envelhecida, utilização de cateteres intravenosos, tratamentos com antibióticos e quimioterapia e o aumento de indivíduos imunossuprimidos, entre os quais pacientes transplantados (Ho & Haynes, 2015). Este microrganismo é um causador frequente de infeções oportunistas como vaginite, pneumonia ou fungémia. As infeções fúngicas invasivas são causadas na sua maioria por *Candida* spp., com maior incidência sobre *C.*



albicans, seguindo-se *C. glabrata*, um microrganismo comensal no sistema gastrointestinal humano (Pfaller & Diekema, 2007; Ahmad et al., 2014). *C. glabrata* é uma levedura filogeneticamente mais próxima de *S. cerevisiae* do que de outras espécies de *Candida*, como *C. albicans*, como podemos observar na Figura 1 (Ho & Haynes, 2015).

C. glabrata não pertence ao clado CTG, que corresponde a um grupo de espécies cujo codão CUG codifica uma serina em vez de uma leucina (Santos et al., 2011), ao qual pertencem a maioria das espécies oportunistas do gênero *Candida* (Gabaldón et al., 2016). *C. glabrata* e *S. cerevisiae* partilham um clado com um ancestral comum, distinto do clado CTG. Consequentemente existem genes ortólogos de *S. cerevisiae* em *C. glabrata* e

Figura 1. Filogenia baseada em sequências 18S rDNA de 11 ascomicetas, de entre os quais cinco espécies do género *Candida*. *Candida glabrata* é mais próxima de *S. cerevisiae* do que de outras espécies do género *Candida* (Ho & Haynes, 2015).

uma semelhança na ordem dos genes. No entanto *C. glabrata* passou por um processo de perda de genes

relativamente ao ancestral comum com *S. cerevisiae*, consequência provável da adaptação ao corpo humano com agente patogénico oportunista (Dujon et al., 2004).

O estudo de estirpes pertencentes à espécie de *C. glabrata* permite-nos fazer uma comparação entre as suas características fenotípicas e as de *S. cerevisiae*, investigando a tendência emergente de *S. cerevisiae* como agente patogénico oportunista.

1.5 *S. cerevisiae* como microrganismo patogénico oportunista

1.5.1 Colonização de novos nichos e ocorrência de infeções oportunistas

S. cerevisiae, para além de colonizar nichos como os carvalhos ou as vinhas, tem a capacidade de colonizar o corpo humano (Phadke et al., 2018). O comensalismo no corpo humano ocorre principalmente no sistema gastro-intestinal, urogenital e respiratório. O fato de ser um microrganismo comensal no corpo humano permite, que em ocasiões de fragilidade do sistema imunitário ou rutura de barreiras físicas, se possa tornar um microrganismo oportunista.

Os microrganismos oportunistas afetam principalmente hospedeiros que se encontram temporariamente ou permanentemente vulneráveis. Os grupos de risco correspondem aos indivíduos cujo sistema imunitário não possui a capacidade de eliminar os invasores devido a diversos fatores, como a utilização de medicação imunossupressora (pacientes transplantados), pacientes que passam por tratamentos como a quimioterapia, indivíduos com doenças imunossupressoras, como o vírus da imunodeficiência humana, bebés prematuros, entre outros. No entanto, já foram descritos casos de infeção em indivíduos saudáveis, alguns dos quais clinicamente graves, com o isolamento de *S. cerevisiae* de diferentes amostras do sistema gastrointestinal e genital feminino, pele e orofaringe.

Atualmente, com o aumento da esperança média de vida e com novas tecnologias aplicadas à medicina, que auxiliam no tratamento de doenças crónicas anteriormente fatais, tem ocorrido um acréscimo da percentagem de população com algum tipo de imunossupressão, sendo deste modo, as doenças oportunistas cada vez mais frequentes na nossa sociedade (Phadke et al., 2018; de Llanos, Fernández-Espinar, & Querol, 2006). O número crescente de estudos de caso de infeções causadas por *S. cerevisiae* levou a que este microrganismo passasse a ser considerado um patogénico oportunista emergente (Wei et al., 2007).

Na literatura já foram descritos diversos tipos de infeções causadas por *S. cerevisiae*, sendo mais prevalentes as infeções urinárias, vaginites, fungémias, peritonites e abscessos na epiderme (Elkhihal et al., 2015). As infeções podem ocorrer através da ingestão da levedura, com posterior passagem do sistema gastrointestinal

para a corrente sanguínea, causando uma infecção sistêmica; da contaminação de cateteres ou pela suplementação de probióticos via intravenosa (Muller et al., 2012).

Um estudo, no qual foram isoladas estirpes a partir de probióticos, demonstrou que estas estirpes causavam infecções sistêmicas em murinos, revelando que estas podem possuir patogenicidade. Adicionalmente, verificaram que a estirpe de *S. cerevisiae* utilizada possuía a capacidade de colonizar órgãos como os rins, o baço ou o cérebro, assim como de causar infecções sistêmicas após a imunossupressão de diferentes estirpes de murino. Murinos infetados com a estirpe virulenta apresentaram uma resposta serológica três vezes mais intensa do que murinos inoculados com uma estirpe não virulenta (Hernández-Haro et al., 2015).

A patogenicidade não depende de nenhum traço particular, na estirpe causadora da infecção, mas sim de múltiplas características que simultaneamente permitem à levedura penetrar no organismo hospedeiro, multiplicar-se, alojar-se nos tecidos e fluidos e conseqüentemente causar infecção. Este conjunto de mecanismos de virulência, pode derivar da emergência de fenótipos que têm por base características relacionadas com a domesticação e a adaptação a condições de *stress*, relacionadas originalmente com ambientes antropogénicos, as quais funcionam também como fatores de virulência.

1.5.2 Probiótico baseado em *Saccharomyces boulardii* corresponde a *S. cerevisiae*?

O termo probiótico, cuja etimologia se refere a “A favor da vida”, foi utilizado por Fuller em 1989 como correspondendo a um suplemento alimentar com microrganismos vivos não patogénicos, cujo efeito benéfico para hospedeiro, se traduz no equilíbrio do microbiota intestinal (Fuller, 1989). Atualmente, segundo a Organização Mundial da Saúde, probióticos são “microrganismos vivos que administrados nas quantidades adequadas conferem benefícios na saúde do hospedeiro” (FAO & WHO, 2002).

A utilização destes suplementos a nível terapêutico justifica-se pela necessidade fortalecer o microbiota intestinal permitindo a recolonização do intestino por parte de populações típicas. Os probióticos são prescritos para auxiliar no tratamento de diarreia associada a antibioterapia, na prevenção de diarreia causada por *Clostridium difficile*, como profilaxia de infecções que originam a diarreia do viajante, entre outros distúrbios gastrointestinais (Marteau et al., 2001). Os probióticos correspondem na sua maioria a bactérias lácticas e à levedura *Saccharomyces boulardii*, denominação típica das embalagens comerciais de probióticos.

Durante vários anos, questões taxonómicas relativamente à relação entre *S. boulardii* e *S. cerevisiae* não permitiram clarificar se se tratava da mesma espécie ou de espécies próximas. De facto, vários autores como Dubin et al. (1996) consideraram serem espécies distintas, tendo como argumentos o facto de *S. boulardii* não utilizar galactose como fonte de carbono e de não produzir ascósporos. No entanto, autores como Kühle

& Jespersen (2003) propuseram que *S. boulardii* é sinônimo de *S. cerevisiae* tendo como base características bioquímicas e a análise das sequências nucleotídicas dos domínios D1/D2 do rDNA 26S e das regiões ITS1-5.8S rDNA ITS2. Na análise das sequências, verificaram que os domínios D1/D2 são idênticos em *S. boulardii* e *S. cerevisiae* ($\leq 0.5\%$ divergência) e que a região ITS1-5.8S rDNA ITS2 é muito semelhante (Figura 2), apresentando apenas divergências existentes entre estirpes da mesma espécie ($> 99\%$ semelhança).

Para além destas evidências, a capacidade de assimilar galactose assim como a de produzir ascósporos é variável dentro da espécie *S. cerevisiae* (Kurtzman, Fell, & Boekhout, 2011; Naumova et al., 2003), não sendo, por este motivo, características que permitam distinguir entre espécies do género *Saccharomyces*.

Neste estudo, *S. boulardii* é considerado como pertencente à espécie *S. cerevisiae*, sendo utilizada a nomenclatura *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, nomenclatura utilizada em estudos recentes como Appel-da-silva et al. (2017); Landaburu et al. (2019) e Ghorbani-choboghlo et al. (2019), para referir estirpes de *S. cerevisiae* utilizadas em probióticos, anteriormente designadas por *S. boulardii*.

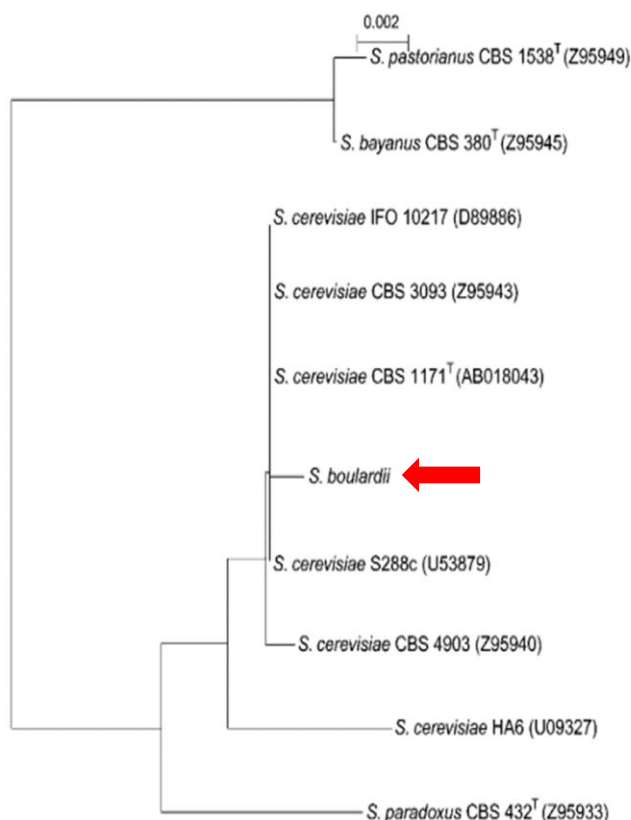


Figura 2. Árvore filogenética *Neighbor-joining* das regiões ITS1-5.8S-ITS2 de estirpes *S. boulardii* e outras espécies de *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. pastorianus*, *S. bayanus*). A barra representa 0,2% de divergência na sequência nucleotídica (Kühle and Jespersen 2003).

1.5.3 Estudos de caso e impacto na saúde humana

Apesar de não causar um impacto na sociedade como o de outros agentes fúngicos, como *Candida* ou *Cryptococcus*, *S. cerevisiae* é presentemente considerado um microrganismo patogénico oportunista emergente. Isto pode dever-se ao facto de existirem cada vez mais indivíduos com fatores de risco predisponentes a adquirir infeção.

Uma melhoria nas técnicas de deteção de *S. cerevisiae*, assim com um aumento no conhecimento da existência de infeções causadas por esta levedura, por parte dos profissionais de saúde, permitiria uma maior eficácia no diagnóstico que, por sua vez, evitaria uma classificação clínica equivocada da espécie *S. cerevisiae* pelo género *Candida*. No entanto, apesar de uma importância clínica crescente das infeções causadas por *S. cerevisiae*, não estão ainda implementados nos laboratórios médicos protocolos eficazes de diagnóstico desta levedura.

Em 2005, Enache-Angoulvant & Hennequin fizeram um levantamento de 92 casos de infeção invasiva causada por *S. cerevisiae* e verificaram que suplementos probióticos desta levedura originaram mais de metade dos casos de fungémia descritos. Esta levedura está implicada em diversos tipos de infeções humanas como fungémia, pneumonia, endocardite, peritonite e constitui mais de 5% das infeções vaginais (Skovgaard, 2007).

No estudo do programa nacional de vigilância de doenças invasivas por leveduras raras, efetuado na Dinamarca no período de 2004 a 2012, a incidência de isolados de *S. cerevisiae* variou entre 50% em hospitais na Dinamarca, 7,4% em Paris e 20% no instituto do cancro nos EUA (Arendrup et al., 2014). Numa revisão da literatura contendo 60 casos de infeção por *S. cerevisiae*, Aticia et al. (2017) concluiu que o maior fator de risco de infeção correspondia à ingestão de probióticos com *S. cerevisiae* var. *boulardii*. Destes casos, 93% estavam relacionados com a utilização de um cateter venoso central (CVC) e cerca de 88% incluíam um tratamento com antibióticos de largo espectro.

Deste modo, são de seguida apresentados alguns dos estudos de caso descritos na literatura sendo, na sua maioria, infeções causadas em indivíduos imunocomprometidos, indivíduos cateterizados e com suplementação probiótica (Tabela 1). Contudo está representado um caso num indivíduo imunocompetente

Tabela 1. Estudos de caso de infecções causadas por *S. cerevisiae* datados entre 1989 e 2019, apresentando os fatores de risco dos indivíduos que adquiriram infecção, o tipo de infecção e a possível causa da aquisição.

Paciente	Fatores de risco	Ano	Tipo de infecção	Causa da infecção	Referência
Homem 40 anos	Diabetes tipo II	2015	Infeção urinária	-	(Elkhihal et al. 2015)
Mulher 51 anos	Tratamento imunossupressor com esteroides; Tratamento com antibióticos;	1998	Fungémia Estado febril	Ingestão de probiótico	(Bassetti & Frei, 1998)
Mulher 81 anos	Diarreia associada a <i>Clostridium difficile</i> ; Tratamento oral com probiótico	2019	Fungémia	Ingestão de probiótico	(Landaburu et al., 2019)
Homem 88 anos	Unidade cuidados intensivos (UCI) Urosepsis, Tratamento com antibióticos	2017	Fungémia	Ingestão de probiótico	(Erganis et al., 2017)
Mulher 38 anos	Pneumonia (UCI) Tratamento com antibióticos	2017	Fungémia	Ingestão de probiótico	(Erganis et al., 2017)
Criança de 8 anos	UCI, cirurgia pediátrica; Cateter venoso central; Doença pulmonar crónica	2017	Estado febril Fungémia (sangue recolhido do CVC)	Ingestão de probiótico via sonda de gastrostomia	(Aticia et al., 2017)
Homem 56 anos	Enxerto aórtico-bifemoral; Lanceamento de cisto nos enxerto; Aterosclerose	2002	Fungémia (morte)	Infeção no enxerto	(Smith et al., 2002)
Bebé 8 meses	Leucemia mieloide aguda; Quimioterapia; Cateter venoso central	2000	Estado febril Fungémia (sangue do CVC)	Ingestão de probiótico	(Cesaro et al., 2000)
Mulher 60 anos	Fístula esófago-pleural	1991	Fluido da pleura	-	(Glenn M. et al., 1991)
Homem 39 anos	VIH Pneumonia Hepatite B	1989	Pulmão	-	(Tawfik, Papasian, & Potter, 1989)
Homem 59 anos	VIH Candidíase oral	1999	Esofagite fúngica	-	(Fracp et al., 1999)
Mulher 39 anos Imunocompetente	Fractura no humero	2016	Osteomielite	Contacto da levedura com fratura exposta	(Seng et al., 2016)
Indivíduo 77 anos	Choque séptico	2017	Fungémia Urina	-	(Maleb et al., 2017)
3 Pacientes (72, 74 e 76 anos)	UCI Sonda nasogástrica	2003	Fungémia	Surto na UC Ingestão de probiótico	(Munõz et al., 2005)
Recém-nascido	Cardiopatia congénita CVC	2000	Fungémia	Ingestão de probiótico	(Perapoch et al., 2000)
Mulher 51 anos	Leucemia mieloide aguda Cateter Hickman	2007	Pápula eritematosa	-	(Williams et al., 2007)

1.5.4 Diagnóstico e terapêutica

S. cerevisiae é considerada como sendo uma levedura causadora de infecções invasivas raras, pela ESCMID (*European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*) que recentemente publicou um documento com linhas de orientação (*guidelines*) para o diagnóstico deste tipo de infecções (Arendrup et al., 2014).

Devido à pouca incidência de infecções originadas por *S. cerevisiae*, ainda não foram feitos ensaios clínicos sólidos que nos forneçam informações exatas a cerca dos melhores tratamentos para uma cura rápida e eficaz destas infecções. Em face desta situação, as recomendações existentes derivam da experiência clínica de estudos de caso publicados até ao momento. Para além de não terem sido desenvolvidos estudos sobre a terapêutica, também ainda não existem marcadores específicos para o diagnóstico deste tipo de infecções.

S. cerevisiae é frequentemente diagnosticada como sendo uma levedura do género *Candida* devido às semelhanças na morfologia das células, sendo o diagnóstico feito por cultura e microscopia.

A existência de valores substancialmente superiores de β -1-3-D-glucano nos sobrenadantes de culturas de *S. cerevisiae*, relativamente aos do género *Candida*, pode ser um dos métodos futuramente utilizados no diagnóstico. Num estudo para a caracterização da concentração mínima inibitória (CMI) de antifúngicos verificou-se que os valores de suscetibilidade entre *Candida glabrata* e *S. cerevisiae* são semelhantes (Arendrup et al., 2014). Enache-Angoulvant & Hennequin, 2005, através da análise de um conjunto de estudos de caso, constataram que clinicamente não é possível distinguir entre uma infeção causada por *Candida* e *S. cerevisiae*. Por outro lado, devido aos avanços na tecnologia para a identificação de microrganismos a nível molecular atualmente é possível distinguir inequivocamente *S. cerevisiae* de diferentes espécies do género *Candida*.

1.6 Fatores que contribuem para a emergência de *S. cerevisiae* como agente patogénico oportunista

1.6.1 Fatores fenotípicos

A patogenicidade de *S. cerevisiae* depende de um conjunto de fatores de virulência, descritos como sendo atributos que permitem uma melhor adaptação e sobrevivência no hospedeiro humano. Os fatores associados à virulência de *S. cerevisiae* variam entre a capacidade de crescimento a elevadas temperaturas (> 39°C), a capacidade de adesão e penetração nos tecidos do hospedeiro, através da produção de pseudo-hifas, a tolerância a concentrações elevadas de sulfato de cobre no meio, a resistência a radicais livres de oxigênio e a capacidade de manter a integridade da parede celular. A maioria dos fatores de virulência deriva de assinaturas de domesticação adquiridas pela seleção artificial em ambientes antropogénicos como adegas ou padarias (Phadke et al., 2018; Muller et al., 2012).

Dos fatores fenotípicos referidos anteriormente, podemos salientar o crescimento a elevadas temperaturas, que permite à levedura sobreviver no interior do hospedeiro em situações febris, cujas temperaturas podem atingir os 40°C. A temperatura é uma característica poligénica, determinante em isolados clínicos de *S. cerevisiae*. A capacidade de sobreviver a 42°C corresponde a um traço de virulência descrito na literatura como sendo relevante na distinção entre estirpes clínicas e não clínicas. A febre é uma reação do corpo humano que origina um aumento da temperatura corporal acima do limite normal como resposta ao estímulo da infeção. Em muitos casos, o aumento de temperatura é suficiente para eliminar microrganismos invasores, pelo que, leveduras com a capacidade de sobreviver nestas temperaturas apresentam uma vantagem adaptativa face as estirpes com ausência deste atributo fenotípico (Steinmetz et al., 2002; McCusker, Clemons, A., & Davis, 1994). A capacidade de crescer a elevadas temperaturas é um fator importante na virulência, no entanto, são necessários fatores adjuvantes da patogenicidade para que ocorra uma infeção (Anoop et al. , 2015).

Por outro lado, a tolerância ao sulfato de cobre pode permitir uma melhor adaptação das estirpes ao corpo humano, tornando-as potencialmente causadoras de infeção. Metais como o cobre representam micronutrientes essenciais nos sistemas biológicos, participando no metabolismo celular como co-fatores essenciais de enzimas. No entanto, concentrações elevadas de cobre podem exercer efeitos negativos, como a criação de radicais livres de oxigênio, interação com as membranas celulares, degradando-as, o impedimento da ligação de outros metais aos seus ligandos, a oxidação de proteínas e originar danos no DNA e RNA (Adamo et al., 2012). A resistência a elevadas concentrações de cobre em estirpes clínicas observada por Strobe et al., (2015) sugere que este traço fenotípico é uma vantagem na sobrevivência no hospedeiro. Durante a fagocitose inúmeras reações são ativadas dentro do fagossoma de modo a tornar o ambiente mais

hostil à célula invasora, tais como a diminuição do pH e a produção de radicais livres de oxigénio e de azoto. Para além de participar no metabolismo celular, o cobre é recrutado para dentro do fagossoma pelos macrófagos através da ativação do IFN γ e TNF α , levando ao aumento da sua concentração, até atingir níveis tóxicos para os microrganismos fagocitados. Os macrófagos utilizam desta forma o ião cobre como um mecanismo de defesa, pelo aumento da sua concentração intracelular e pelo facto do cobre interagir com outras moléculas originando radicais livres de oxigénio, o que amplifica a toxicidade intracelular.

Assim, observando a interação entre a presença de cobre e a produção de ROS nos sistemas biológicos, na defesa do hospedeiro, podemos inferir que pode existir alguma relação entre a tolerância de leveduras oportunistas a elevadas concentrações de cobre e a exposição ao *stress* oxidativo (Stafford et al., 2013; Festa & Thiele, 2012).

A tolerância a elevadas concentrações de cobre é um fator que permite a sobrevivência das estirpes patogénicas dentro do hospedeiro, atuando como um mecanismo de defesa face à resposta do sistema imunitário. Todavia o contacto de *S. cerevisiae* com este metal não se restringe à resposta imunitária ou à sua utilização como micronutriente, pois estirpes da população do Vinho estão expostas a sulfato de cobre, que é utilizado nas vinhas devido ao seu efeito antifúngico (Samanovic et al., 2012). Deste modo, esta característica pode ser considerada como sendo um traço de domesticação obtido devido à pressão antropogénica relacionada com a produção de vinho e que, posteriormente, permitiu uma melhor adaptação das estirpes oportunistas ao corpo humano.

Muitas espécies de leveduras incluindo *S. cerevisiae* são dimórficas, isto é, possuem a capacidade de se desenvolver sob uma forma unicelular ou apresentar uma morfologia multicelular através de pseudo-hifas. Em adição ao crescimento unicelular, são desenvolvidas células alongadas dispostas em cadeias ramificadas, que se disseminam pelo redor da célula e penetram no meio de cultura ou tecido circundante. As pseudo-hifas formadas por *S. cerevisiae* diferem das hifas desenvolvidas pela maioria dos restantes fungos, pois não possuem uma estrutura tubular alongada existente nas verdadeiras hifas. Estas estruturas formam-se perante condições de *stress* nutritivo, e como resposta a este défice as células prolongam-se de forma a tentar alcançar novas fontes de nutrientes. Este mecanismo permite a sobrevivência, perante uma situação de escassez nutritiva, dada a imobilidade das células de *S. cerevisiae*. No meio natural a aquisição desta característica pode ser benéfica ao permitir a adesão a plantas em redor dos carvalhos, pois a composição da sua seiva possui quantidades baixas de fontes de azoto.

Em células diploides, a indução deste tipo de estruturas celulares deve-se principalmente à carência de fontes de azoto no meio de crescimento, designando-se de pseudo-hifas. Em células haploides, a resposta é semelhante, sendo que a carência de fontes de carbono parece também desencadear o desenvolvimento destas estruturas, designando-se de crescimento invasivo haploide. Para além de limitações nutritivas, de

azoto e carbono, outros fatores estão descritos como estimuladores da produção de pseudo-hifas e crescimento invasivo, como a presença de determinados álcoois, como o álcool fenético e triptofol.

As pseudo-hifas são consideradas um fator de virulência, pois permitem à levedura penetrar e disseminar-se nos tecidos do hospedeiro. Ao se fixarem, as células aumentam a probabilidade de se multiplicar, podendo criar biofilmes. Esta estratégia auxilia no impedimento da eliminação das leveduras pelos macrófagos, o que favorece o processo de infecção. (Anoop et al., 2015; Lenhart, Meeks, & Murphy, 2019; Binder et al., 2015).

O oxigénio molecular não danifica células, no entanto, ao ser reduzido, no metabolismo celular ou por vias exógenas como radiação UV, drogas químicas, toxinas ambientais ou por macrófagos, pode causar danos nocivos nas células. Os mecanismos de redução do oxigénio molecular, originam radicais livres de oxigénio (ROS) como H_2O_2 ou O_2^- que por sua vez podem originar $^{\bullet}OH$. Os ROS são muito reativos e causam danos nos sistemas biológicos através da peroxidação de lípidos, destabilização das membranas, alterações no DNA e oxidação de proteínas.

No entanto, os ROS existem naturalmente nos sistemas biológicos. Em *S. cerevisiae*, os ROS endógenos são produzidos na sua maioria como consequência da cadeia transportadora de eletrões (O_2 como aceitador final de e^-), sem repercussões negativas. Os ROS apenas causam danos quando as condições celulares originam *stress* oxidativo. O *stress* oxidativo, corresponde a situações nas quais a quantidade de ROS existente na célula é superior à capacidade dos mecanismos antioxidantes de os eliminarem, causando um desequilíbrio na concentração de ROS intracelular.

Várias populações de *S. cerevisiae* estão expostas a *stress* oxidativo exógeno nos seus nichos, como é o caso das estirpes da população do Vinho, que devido à suplementação de sulfato de cobre nas vinhas, ficam expostas a uma maior quantidade de ROS, visto que o cobre induz a sua produção. Por outro lado, estirpes da população do Pão devido às condições necessárias para a produção do pão, relacionadas com a temperatura e secagem das leveduras, também estão expostas a ROS no seu nicho ambiental.

Como defesa perante o ataque dos ROS, *S. cerevisiae* utiliza mecanismos antioxidantes, alguns dos quais através de enzimas como superóxido dismutases que convertem O_2^- em H_2O_2 e catalases que convertem o H_2O_2 em H_2O , por outro lado, ativa mecanismos de reparação das estruturas celulares afetadas (Morano, Grant, & Moye-rowley, 2012; Salmon et al., 2004; Hohmann, 2003).

São vários os reagentes utilizados para gerar *stress* oxidativo em ensaios laboratoriais, sendo a H_2O_2 o mais amplamente encontrado na literatura. A H_2O_2 é difusível, conseguindo entrar passivamente nas células de levedura, interagir com os diferentes compartimentos celulares e reagir com as moléculas reativas aí existentes. As concentrações descritas na literatura como tendo um efeito tóxico em *S. cerevisiae* variam entre 0,05 mM e os 5 mM (Hohmann, 2003).

A tolerância ao *stress* oxidativo é um fator que permite a sobrevivência do invasor no hospedeiro. Destaca-se o facto de os macrófagos do sistema imunitário inato possuírem a capacidade de produzir ROS, O_2^- , e

radicais livres azoto, °NO, como mecanismo de defesa contra invasores. Os ROS, juntamente com outras moléculas, como o cobre, tornam os fagossomas extremamente tóxicos.

Em estudos realizados com células de sangue humanas, estirpes de *S. cerevisiae* de origem clínica sobreviveram melhor na presença de peróxido de hidrogénio relativamente a estirpes de origens não clínicas, aproximando-se do comportamento observado em patogénicos oportunistas como *C. albicans* (Anoop et al., 2015; Nathan & Shiloh, 2000).

1.6.2 Fatores genotípicos

Diversos fatores genotípicos associados à transição de *S. cerevisiae* para microrganismo patogénico oportunista têm sido descritos na literatura. No entanto, ainda não existem dados exatos que nos permitam distinguir genotipicamente, de uma forma clara e precisa, estirpes oportunistas de não-oportunistas. Existe um conjunto variado de fatores publicados como sendo potenciais mecanismos de virulência genotípicos. Foram selecionados alguns destes fatores, mencionados de seguida.

A alteração do número de cópias de um gene é um mecanismo que altera a transcrição e tradução do gene, e que resulta de fenómenos de adaptação do microrganismo ao ambiente circundante. Por permitir uma adaptação rápida a novos nichos ambientais, está muitas vezes associado a fenómenos de domesticação (Kondrashov, 2012; Gibbons & Rinker, 2016). Em *S. cerevisiae*, o aumento do número de cópias do gene *FLO11* é um fator de relevo na virulência, pois codifica uma proteína de membrana de superfície relevante na floculação e produção de pseudo-hifas (Muller et al., 2012). Strobe et al. (2015) observou uma associação entre o número de cópias do gene *CUP1* e aproximadamente 50% do fenótipo de resistência ao sulfato de cobre em *S. cerevisiae*. Pérez-torrado et al. (2015) verificou um aumento do número de cópias dos genes *IMD2* e *IMD3*, ambos associados à biossíntese de GTP's, em estirpes de origem clínica. Estes últimos genes parecem estar associados à patogenicidade pois estão envolvidos na reparação de danos no DNA, causados pelos mecanismos de defesa dos macrófagos.

A transferência horizontal de genes corresponde a um mecanismo descrito como sendo uma outra forma de adaptação a novos nichos ambientais, por parte de microrganismos como leveduras. Esta estratégia evolutiva permite a transferência de informação genética entre microrganismos de espécies diferentes. A transferência horizontal de genes em estirpes domesticadas dá-nos a indicação de que existe uma interação entre diferentes espécies nos ambientes fermentativos criados pelo homem (Gibbons & Rinker, 2016). *YJM-GNAT*, um gene cuja função em bactérias é conferir resistência a antibióticos aminoglicosídeos, parece ter sido transferido horizontalmente a partir de bactérias (*Enterococcus faecium*) para *S. cerevisiae* (Wei et al. 2007).

Segundo Strobe et al. (2015) a introgressão do gene PDR5 está apenas presente em estirpes mosaico de origem clínica. Adicionalmente, verificou uma associação entre este transportador e a resistência ao cetoconazol, um inibidor da síntese do ergosterol (Anoop et al., 2015).

A interação entre *S. cerevisiae* e o hospedeiro humano ainda é pouco conhecida. Os genes necessários ao ciclo glicolítico são induzidos na presença de macrófagos e existe um aumento na expressão de aminoácidos no contacto com o sangue (Hernández-Haro et al., 2015).

O gene *PGU1* codifica uma pectinase, que é induzida durante o crescimento invasivo, que degrada a parede celular. A expressão do *PGU1* é regulada pelo fator de transcrição Ste12p, que por sua vez também atua sobre o *FLO11*. O gene *VRP1* codifica uma proteína de ligação à actina, essencial para a polarização da célula e envolvida na formação de pseudo-hifas (De Llanos et al., 2004). A interação entre Vrp1p e End3p, uma proteína necessária na organização do citoesqueleto e na formação da parede celular, parece estar envolvida na capacidade de crescer a elevadas temperaturas (De Llanos et al., 2004).

Zhu et al (2016) defenderam que variações na ploidia verificadas em estirpes clínicas podem estar associadas à sua transição para a patogenicidade. Aneuploidia e alterações na ploidia são fatores genéticos associados à adaptação a novos nichos ecológicos, nomeadamente nichos que apresentam condições de *stress* ambiental. Neste mesmo estudo, verificou um número significativo de estirpes oportunistas com uma ploidia superior a 2n (32%) e um elevado número das estirpes aneuploides (35%), num total de 144 estirpes. No entanto, é de destacar que 81% das estirpes poliploides ou aneuploides pertenciam à população do Pão e apresentavam uma mutação no gene *NDC80*, sugerindo que este poderia ser um dos motivos para a ocorrência destes acontecimentos genómicos.

Os genes *Skn7* e *YAP1* estão descritos como sendo essenciais na resposta de *S. cerevisiae* ao *stress* oxidativo (Morgan et al., 1997). Outros genes podem estar envolvidos na tolerância a ROS como o *TSA2* e *GPX2* que após exposição a neutrófilos ativam diversos mecanismos celulares (Pérez-Torrado & Querol, 2016), tal como se pode observar na Figura 3.

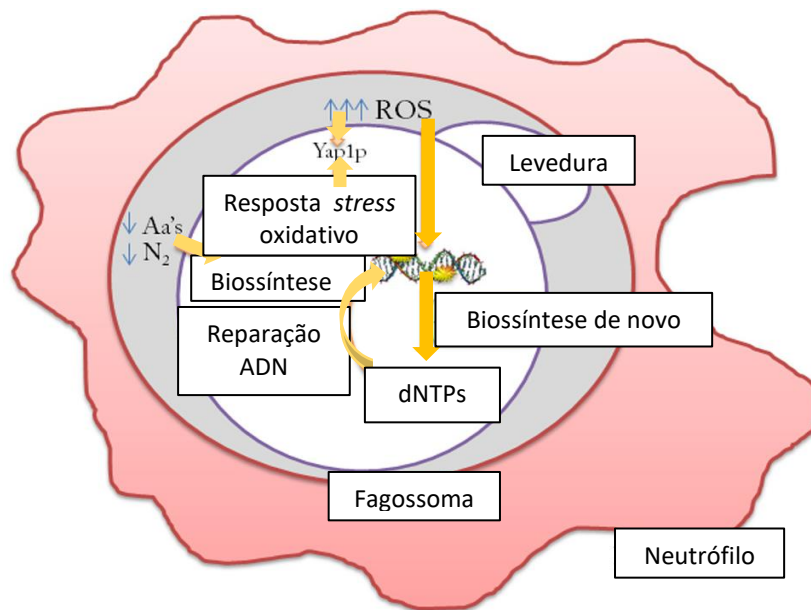


Figura 3. Mecanismos de sobrevivência de *S. cerevisiae* após fagocitose por macrófago (adaptado de Pérez-Torrado & Querol, 2016). Após a fagocitose, para resistir ao ataque do sistema imunitário *S. cerevisiae* direciona fontes de azoto para dentro do fagossoma para auxiliar na biossíntese de aminoácidos. Por outro lado, pela presença dos ROS intracelulares há uma ativação do fator de transcrição Yap1 necessário à tolerância ao stress oxidativo. Os ROS gerados pelos neutrófilos vão atuar na levedura danificando a parede celular e o DNA. Como resposta a levedura ativa mecanismos de reparação de DNA e biossíntese de dNTP's.

1.7 Objetivos do estudo

Este estudo tem como objetivo contribuir para elucidar as origens evolutivas e os mecanismos de virulência das estirpes oportunistas de *S. cerevisiae*.

Deste modo, procurou-se fazer uma análise das características fenotípicas descritas na literatura como correspondendo a potenciais fatores de virulência. Para tal, realizaram-se ensaios laboratoriais comparando estirpes de origem clínica com um grupo de estirpes não-clínicas representantes de diferentes populações já conhecidas da espécie. Foram investigados fatores capazes de diferenciar as estirpes oportunistas das restantes, não causadoras de infeção.

Por outro lado, a nível genómico, procurou-se verificar através de uma análise filogenética a que populações pertencem as estirpes de origem clínica em estudo. Elaborou-se uma análise populacional para averiguar qual a ancestralidade populacional de estirpes de origem clínica, tendo em atenção a possibilidade de ter ocorrido recombinação entre estirpes de populações distintas.

Por fim procurou-se fazer uma análise global comparando todos os fatores observados anteriormente, fenotípicos e genotípicos, tendo em vista verificar a existência ou não de características que possam diferenciar as estirpes de origem clínica das estirpes não clínicas.

2. Materiais e Métodos

2.1 Estirpes de leveduras e seu armazenamento

2.1.1 Culturas de estirpes utilizadas no estudo

Na análise fenotípica foram testadas estirpes clínicas, estirpes comensais associadas a humanos e aves, estirpes representativas de populações domesticadas e estirpes de uma população selvagem. Das 70 estirpes de leveduras utilizadas neste estudo, 53 de *Saccharomyces cerevisiae* e duas de *Candida glabrata* pertencem à coleção de culturas PYCC (FCT-UNL); duas de *S. cerevisiae* e quatro de *C. glabrata* foram fornecidas pela Professora Doutora Teresa Gonçalves, da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra; três de *S. cerevisiae* pertencentes à população da Guiana Francesa e duas isoladas a partir de suplementos probióticos foram fornecidas pelo Professor Doutor Gianni Liti, da Universidade Côte d'Azur, CNRS, Nice, França; duas de *S. cerevisiae* e uma de *C. glabrata* foram fornecidas por Professora Sofia Costa de Oliveira, da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (FMUP) e uma estirpe de *S. cerevisiae* foi isolada a partir de um suplemento probiótico (Ultralevur, Merck) durante este estudo.

2.1.2 Seleção de estirpes para análise fenotípica.

Nos ensaios fenotípicos foram selecionadas dez estirpes de cada uma das seguintes populações: Carvalhos Mediterrânicos (MO), Vinho, Pão; e sete estirpes da população da Cerveja, de modo a estudar representantes de populações domesticadas e de uma população selvagem. Foram estudadas nove estirpes de origens associadas ao Homem (fezes e probióticos) e 17 estirpes de origens clínicas (sangue, expectoração, entre outros). No grupo das estirpes de origem clínica, 35,3% (n=6) foram isoladas a partir de doentes com VIH positivo; 23,5% (n=4) isoladas de exsudados vaginais; 17,6% (n=3) isoladas de expectoração/pulmões; 11,8% (n=2) isolados da língua e 11,8% (n=2) isolados de outros substratos (urina, abscesso na epiderme). No grupo das estirpes de origem associadas ao Homem, 66,7% (n=6) foram isoladas de fezes, 22,2% (n=2) isoladas de cápsulas de suplementos probióticos e 11,1% (n=1) corresponde à estirpe de referência de *Saccharomyces boulardii* isolada da fruta líchia. Para além das estirpes da espécie *S. cerevisiae*, foram estudadas cinco estirpes clínicas e uma ambiental de *C. glabrata*, espécie de levedura filogeneticamente próxima de *S. cerevisiae* causadora frequente de infeções oportunistas (Roetzer, Gabaldón, & Schüller, 2011)

2.1.3 Seleção de estirpes para análise do genoma

No estudo da análise filogenética e populacional foram selecionadas 100 estirpes representativas da diversidade populacional de *S. cerevisiae*, 49 correspondendo a estirpes clínicas, 16 a estirpes associadas ao Homem e 35 pertencem a populações descritas previamente. Nas estirpes de origem clínica é de destacar que 19% foram isoladas de exsudados vaginais; 13,8% foram isoladas de pacientes com VIH+; 10,3% foram

isoladas do sangue; 8,6% são provenientes de expetoração/lavado broncoalveolar e os restantes 48,3% são de origens diversas como abscessos na epiderme, pulmão, língua, entre outros. Do grupo das estirpes de origens associadas ao homem, 70,6% foram isoladas de fezes e 29,4% correspondem a suplementos probióticos. Todas as estirpes assim como os seus substratos de isolamento, origem geográfica e classificação filogenética encontram-se na Tabela 3.

2.1.4 Manutenção das estirpes

A manutenção das estirpes a curto prazo foi feita por plaqueamento das culturas puras em meio YMA sólido e colocação numa estufa a 4°C. A manutenção a longo prazo foi efetuada por criopreservação com 20% de glicerol a -80°C, com exceção da estirpe de referência laboratorial S288c conservada com 20% glicerol em azoto líquido.

2.2 Ensaio fenotípicos

2.2.1 Temperatura máxima de crescimento

Neste ensaio foi feito um pré-inóculo em 1,5 mL de meio rico YPD líquido *overnight* a 25°C. De seguida, foi medida a densidade ótica a 640 nm no espectrofotómetro (Amersham Biosciences Ultrospec 3100 Pro UV/Visible Spectrophotometer). As culturas foram suspensas em 100 µL de água desmineralizada esterilizada numa concentração correspondente à $DO_{640nm} \sim 0,3$. Desta suspensão, 5 µL foram inoculados (inoculação pelo método das gotas) em placas de YPD (1% extrato de levedura (w/v), 2% peptona (w/v), 2% glucose (w/v), 2% agar (w/v)). Depois de três dias de incubação nas temperaturas de 30°C e 37°C, as placas foram fotografadas. As estirpes que cresceram na temperatura de 37°C foram testadas a 40°C e 42°C, fazendo em paralelo um crescimento a 30°C, como controlo positivo, adaptado de de Llanos et al., 2006. A análise dos resultados foi feita graficamente através do *software* Graphpad prism 6.

2.2.2 Produção de pseudo-hifas

Para pesquisa da produção de pseudo-hifas foi seguido um protocolo adaptado de Gimeno et al., 1992, tendo sido preparado um pré-inóculo em 1,5 mL de meio YNB líquido com 1% glucose, *overnight* a 25°C. Seguidamente, centrifugou-se o pré-inóculo durante 3 min a 16,200 x g (Haeraeus Pico 17 microcentrifuge ThermoFisher) com descarte do sobrenadante. Efetuaram-se duas lavagens sucessivas com água destilada esterilizada e o *pellet* final foi ressuscitado em 500 µL de água destilada esterilizada de forma a se obter uma $DO_{640nm} \sim 0,3$. Inoculou-se 5 µL da suspensão por plaqueamento por gotas em placas com meio SLAD (1X YNB sem aminoácidos e sem sulfato de amónia, 2% glucose, 0,05 mM de sulfato de amónia, 2% agar). As

placas foram incubadas a 30°C durante 21 dias e fotografadas no microscópio de contraste de fase (Olympus modelo BX50) do 1º ao 14º dia e no 21º dia através do *software* analySIS getIT (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH). As placas de petri foram colocadas diretamente na platina e observadas com ampliação de 100X em campo claro.

2.2.3 Resistência ao sulfato de cobre

A resistência ao sulfato de cobre, foi testada em placas de YPD suplementadas com concentrações crescentes de CuSO₄ (2mM, 4mM, 6mM, 8mM, 10mM e 12mM), a partir de uma solução *stock* de 500 mM CuSO₄ esterilizada por filtração.

Para a realização do ensaio foi feito um pré-inóculo em 1,5 mL YPD a 25°C *overnight*. Após medida a DO₆₀₀ do pré-inóculo, a cultura foi inoculada com DO~0,1 em YPD e colocada a incubar a 30°C com uma agitação de 180 rpm até atingir DO₆₀₀ ~0,3/0,4, de forma a garantir que a cultura se encontrava na fase exponencial. Seguidamente as culturas foram diluídas (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴) e 5 µL foram inoculados (inoculação pelo método das gotas) nas placas suplementadas com CuSO₄, paralelamente com uma placa controlo com meio YPD sem nenhum suplemento. Todas as placas foram incubadas a 30°C e fotografadas após 3 dias. A representação gráfica dos resultados tipo violino foi feita com o software ggplot 3.1.1 na linguagem de programação RStudio.

2.2.4 Ensaio de tolerância ao *stress* oxidativo

Para testar a tolerância ao *stress* oxidativo as culturas foram expostas a concentrações de 1,5 mM e 2mM de H₂O₂, uma espécie reativa de oxigénio (ROS). Como representado na Figura 4, para cada estirpe foi feito um pré-inóculo em 1,5 mL YPD *overnight* a 25°C. As culturas foram inoculadas em 7,5mL de meio YPD (tubos *falcon* de 15mL) com uma DO₆₄₀ ~0,1 até atingirem a fase exponencial (DO₆₄₀ ~ 0,3/0,4) e incubadas a 30°C com uma agitação de 180 rpm. Adicionou-se H₂O₂ ao meio líquido YPD para obter uma solução com a concentração de 1,5mM ou 2mM, imediatamente antes da sua utilização (adaptado de Blevins, Carey, & Albà, 2019). A partir do mesmo inóculo inicial, fez-se um segundo inóculo com uma concentração equivalente a 3000 células/mL (número de células contável em placa YPD sólido) em 10 mL de YPD com adição de H₂O₂ e um controlo em 10mL de YPD sem suplemento. Tanto os tubos de teste como o controlo foram incubados durante 30 min a 30°C. Após a incubação, 100 µL as culturas foram plaqueados por espalhamento em placas de YMA. Os controlos foram plaqueados nas diluições 10⁰ e 10⁻¹, as culturas tratadas com H₂O₂ foram plaqueadas sem diluição. Para parar o crescimento celular, os tubos com as culturas foram colocados em

gelo durante o procedimento de espalhamento. As placas foram colocadas a 30°C durante 2 dias para posterior contagem de colônias e medição da viabilidade celular.

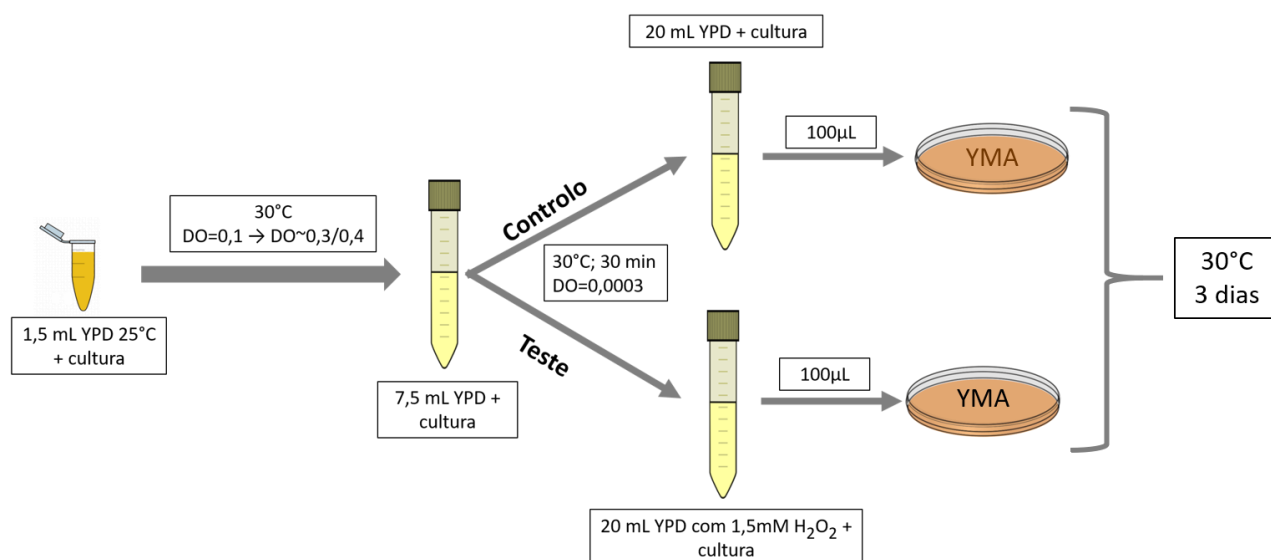


Figura 4. Esquema representativo do protocolo utilizado no ensaio de tolerância ao *stress* oxidativo.

2.2.4.1 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi medida através da contagem das unidades formadoras de colônias (CFUs) nas placas controlo, correspondentes a 100% do crescimento, e nas placas com o inóculo de células tratadas com H₂O₂. A percentagem de sobrevivência foi calculada através da razão entre as CFUs das células tratadas e das células controlo (Kwolek-Mirek & Zadrag-Tecza, 2014). Para cada estirpe foi feito um duplicado ou triplicado nos casos em que a variabilidade entre os duplicados correspondia a mais do que 15%, em experiências independentes. Os resultados foram representados graficamente através do *software* Graphpad prism 6 e efetuada uma análise estatística One-way ANOVA com comparações múltiplas e correção Bonferroni, P ≤ 0.0001, IC de 95%.

2.2.5 Presença de ROS intracelulares

Após a realização do ensaio anterior 2.2.4.1, a presença de ROS intracelulares foi testada com o intuito de verificar se existem diferenças entre as estirpes com tendência a possuírem uma maior viabilidade celular na presença de H₂O₂ e as estirpes mais sensíveis. Foi utilizada a sonda fluorescente, 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFH-DA) que permite detetar os ROS existentes no meio intracelular. Esta sonda sob a forma H₂DCFH-DA não apresenta fluorescência e atravessa a membrana celular. No interior da célula, a sonda é hidrolisada passando a H₂DCFH, o que impossibilita a sua saída do meio

intracelular. Esta molécula pode ser oxidada por ROS originando a sua forma fluorescente DCF (Karlsson et al., 2010).

Na realização deste ensaio foi efetuado um pré-inóculo em 20mL de YNB com 2% de glucose, que foi incubado a 30°C *overnight* com agitação de 150 rpm. De seguida, foram medidas as densidades óticas a 600nm e as culturas foram diluídas para obter uma $DO \sim 0,3$ em 20mL de YNB 2% glucose, obtendo-se assim um inóculo para a experiência. Para cada estirpe foram efetuados 2 inóculos iniciais, a um foi a adicionada H_2O_2 com uma concentração final de 2mM e o outro correspondeu ao controlo, sem adição de nenhum reagente, sendo este o T=0 horas do ensaio. No T0 foram medidas as DO_{600nm} , assim como no T=2H, para posteriormente se proceder à correção da fluorescência com a densidade ótica das culturas. Depois de homogeneizar o reagente, foram distribuídos 2 mL de cultura com H_2O_2 para um tubo de 25 ml e 2mL de cultura controlo para outro tubo. Foram adicionados 10 μM da sonda 2'7'-diclorofluoresceína diacetato a cada tubo, seguindo-se uma incubação a 30°C, 150rpm durante 2H no escuro. Após a incubação, as culturas foram centrifugadas 3min a 10000 rpm, os *pellets* foram lavados e ressuspensos em 2mL de H_2O . A fluorescência das amostras foi medida no fluorímetro (Fluorolog 3, HORIBA Scientific) com $\lambda_{ex} = 490$ nm e $\lambda_{em} = 522$ nm e correção para a densidade celular da cultura no momento da medição (T=2H), tal como descrito em van Leeuwen et al., 2011. Os dados obtidos foram analisados com o *software* ORIGIN v.9.0, os e os gráficos foram elaborados com o *software* Graphpad prism v. 6.

2.3 Análise do genoma completo

2.3.1 Extração de DNA para sequenciação do genoma completo

O DNA de 14 estirpes de origem clínica e 6 estirpes de substratos associados ao Homem (Tabela 2) foi extraído com o Kit *Fungal/Bacterial DNA Mini Prep* (Zymo Research), a partir de um pré-inóculo em 20 mL de YPD, incubado a 30°C *overnight*, 160 rpm. Este kit permite uma extração eficiente de DNA em leveduras de difícil lise como *S. cerevisiae*, através de lise mecânica, sem utilização de desnaturantes orgânicos ou proteinases. Após a extração, o DNA foi quantificado (ng/ μL) por espectrofotometria (NanoDrop 1000 spectrophotometer) com o *software* ND1000 versão 3.8.1. Foram verificados os rácios de pureza 260/280 e 260/230 que deveriam ser superiores a 1.75, caso contrário o DNA poderia estar contaminado com proteínas, fenóis ou composto que absorvam nos comprimentos de onda de 280 nm ou 230 nm, respetivamente. Para as estirpes cujos rácios de pureza não se encontravam dentro dos valores necessários para a sequenciação do genoma, procedeu-se à diálise do DNA. As amostras foram colocadas sobre papel de filtro de 0,025 μm à superfície de água esterilizada sem DNase e RNase numa caixa de petri estéril durante 30 min. Durante o período de diálise as impurezas foram filtradas. Após a diálise, o DNA foi novamente medido no

espectrofotómetro NanDrop, tendo sido obtidos os níveis de pureza necessários, prosseguindo-se para a quantificação através do fluorímetro *Qubit 2.0 fluorometer (Invitrogen Life Technologies)* que permite uma quantificação ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de elevada precisão e sensibilidade.

Tabela 2. Estirpes cujas sequências foram obtidas por sequenciação de novo do genoma completo para este estudo. Estirpes da categoria “Clínica” assinaladas a azul e estirpes da categoria “Associada ao Homem” assinaladas a amarelo.

Estirpe	Origem geográfica	Origem ecológica
YPO 107	Coimbra, Portugal	Exsudado vaginal (2003)
CBS 2919	Noruega	Expetoração
YPO 542	Coimbra, Portugal	Exsudado vaginal (2005)
PYCC 8024	Washington D.C.	Língua
PYCC 5516	Reino Unido	Paciente HIV+
PYCC 5519	Reino Unido	Paciente HIV+
PYCC 3507	Desconhecido	Paciente HIV+
PYCC 3508	Desconhecido	Doença pulmonar crónica
PYCC 5517	Reino Unido	Paciente VIH+
PYCC 5518	Reino Unido	Paciente VIH+
PYCC 5520	Reino Unido	Paciente VIH+
PYCC 5521	Reino Unido	Paciente VIH+
NRRL Y-468	Wickerham	Exsudado vaginal
OLO41	Porto, Portugal	Urina
UL 250	Estirpe comercial	<i>S. cerevisiae var. bouldarii</i> de cápsula Ultralevur 250
YJS 5881	Bruxelas, Bélgica	Isolado de <i>S. cerevisiae var. bouldarii</i> (cápsula perenterol)
UL G84F88I90	Vietname	Estirpe de referência Biocodex - <i>S. bouldarii</i> isolado a partir da fruta lichia
CEY 619	Guiana Francesa	Fezes
HE012	Guiana Francesa	Fezes
HE004	Guiana Francesa	Fezes

2.3.2 Sequenciação do genoma completo e mapeamento das *reads*

O DNA foi sequenciado através da tecnologia Illumina MiSeq partir de bibliotecas de DNA Nextera, tendo-se obtido *Paired-end reads* com 250 pb.

Os restantes genomas utilizados neste estudo foram sequenciados previamente no laboratório ou obtidos a partir da base de dados pública NCBI-SRA.

As *reads* de cada estirpe foram mapeadas contra o genoma de referência de *Saccharomyces cerevisiae* (REF64.1.1.fasta) com o *software* BWA v.1.0 (Li & Durbin, 2009), desenhado para o alinhamento de *reads* de sequenciação Illumina, com qualidade das bases superior a 40. Para a realização da análise filogenética duas

das estirpes de origem associadas ao Homem (YJM 248 e YJM 1078) foram mapeadas contra um genoma combinado de referência de *S.cerevisiae* e *S. paradoxus* (Combined_Scerevisae.R64.1.1_Spar.fasta), por corresponderem a estirpes híbridas entre estas duas espécies como descrito por Pontes (Pontes et al., 2019), sendo posteriormente apenas utilizada a parte correspondente a *S. cerevisiae* na análise.

2.3.3 Análise filogenética

Do conjunto das 100 estirpes utilizadas na análise do genoma, 20 correspondem a genomas sequenciados de novo para este estudo (Tabela 2) e os restantes 80 genomas foram retirados da base de dados pública NCBI-SRA (Tabela 3).

Em primeiro lugar, foi verificado o número de heterozigotias das sequências resultantes do mapeamento das *reads*. Posteriormente, as sequências correspondentes aos diferentes cromossomas de cada estirpe foram extraídas para ficheiros independentes. De seguida, as sequências foram editadas de modo a possuírem o mesmo número de pares de bases, foram substituídas as bases ambíguas e de baixa qualidade por N's, obtendo alelos de alta confiança em pelo menos 85% das estirpes. Procedeu-se a extração dos SNP's (single-nucleotide polymorphism), que correspondem a variações na sequência de DNA com pelo menos 1% de frequência numa população, sendo utilizados como assinaturas genéticas permitindo distinguir populações (Karki et al., 2015). Os SNPs dos 16 cromossomas foram concatenados num único ficheiro FASTA, o qual foi utilizado para realizar a análise filogenética. A análise foi efetuada com um total de 100 sequências e 2710908 SNP's através do método Maximum Likelihood com IQ-Tree v.1.6.7, utilizando o modelo TVM+F+ASC+G4 (Nguyen et al., 2015). Foi feita uma análise de *bootstrap* > 95% com 1000 replicados (Hoang et al., 2018). A filogenia foi visualizada e editada através do programa MEGA versão 6 e da ferramenta ITOL v.4 (Letunic & Bork, 2019).

2.3.4 Análise populacional

A análise populacional permite-nos investigar as origens evolutivas das estirpes mosaico clínicas estudadas neste trabalho. As *Genotype Likelihoods* (GL) foram estimadas com o programa ANGSD versão 0.930 (Korneliussen, Albrechtsen, & Nielsen, 2014) com os parâmetros GL 2 e doGLf2. De seguida foram estimadas as proporções das populações ancestrais de cada estirpe através do programa NGSadmix versão x32 (Skotte, Korneliussen, & Albrechtsen, 2013), com o K variando de 1 a 11. O melhor k, sendo que k corresponde ao número de subpopulações que originam uma população (Verity & Nichols, 2016), correspondeu ao k= 5. A análise gráfica foi efetuada com o *software* Rstudio.

3.Resultados e Discussão

3.1 Divisão das estirpes por análise genómica ou por grupos ecológicos/tecnológicos

As estirpes utilizadas neste estudo foram divididas em dois grupos, representados na Figura 5.

Um grupo correspondente a populações previamente descritas na literatura, através de análises genómicas, como é o caso dos representantes da população do Vinho, Pão, Cerveja e Carvalhos Mediterrânicos. E um segundo grupo definido com base na origem ecológica e patogenicidade das estirpes, designado de ecológico/tecnológico. Este último foi subdividido em duas categorias: “Clínicas” (estirpes que causaram doença) e “Associadas ao Homem” (estirpes isoladas a partir de suplementos probióticos e de fezes humanas, sem indicação de terem causado doença). Os diferentes grupos estão representados esquematicamente na Figura 5 e as estirpes utilizadas nas análises genómicas e fenotípicas apresentadas na Tabela 3.

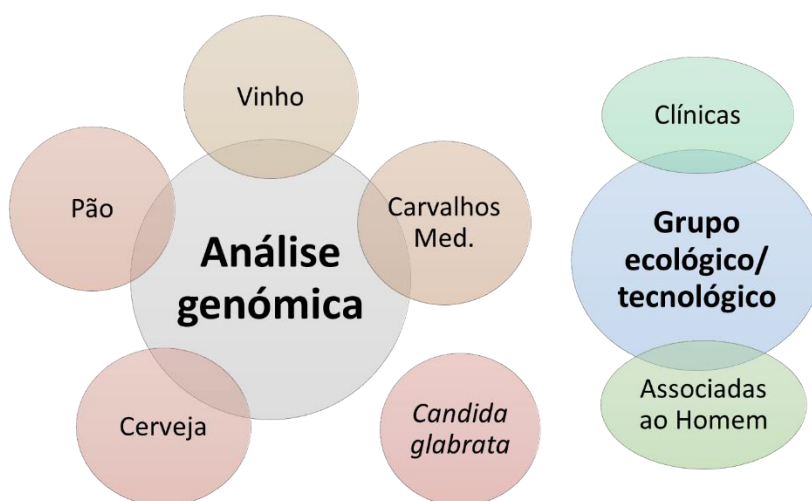


Figura 5. Esquema dos grupos utilizados neste estudo. Análise genómica (esquerda) com as populações do Pão, Vinho, Carvalhos Mediterrânicos e Cerveja. As estirpes da espécie *Candida glabrata* são consideradas separadamente. Grupo definido como ecológico/tecnológico (direita) onde se enquadram as estirpes Clínicas e as estirpes Associadas ao Homem.

Tabela 3. Estirpes utilizadas análise genómica e fenotípica (assinaladas a amarelo) deste estudo e sua respetiva origem geográfica e ecológica, classificação por sequenciação do genoma completo (WGS), número de heterozigotias e número de acesso no NCBI.

Estirpes	Outras designações	Origem geográfica	Origem ecológica	Clades WGS	Heterozigotias	Nº Acesso
Estirpes Associadas ao Homem						
YJM 248	CBS 2910, PYCC 8034	Portugal	Fezes	Vinho	2115	SRR800768
YJM 1078	PYCC 8028	Portugal	Fezes	Vinho	2063	SRR800854
CBS 2909	PYCC 2613	Portugal	Fezes	Vinho	2964	SAMEA3895045
UL 250	-	Estirpe comercial	Ultralevur 250	Vinho	3895	Este estudo
YJS 5881	Perentol	Bruxelas, Bélgica	Isolado <i>S. boulardii</i> (cápsula perenterol)	Vinho	4078	SAMEA3895708
UL G84F88I90	YJS 5879	Vietname	Estirpe de referência Biocodex - <i>S. boulardii</i> , fruta lichia	Vinho	4181	SAMEA3895706
SJ5L17	-	Áustria	Probiótico	Vinho	6964	SAMEA3895107
SJ5L18	-	Áustria	Probiótico	Vinho	3841	SAMEA3895108
CEY 619	-	Guiana Francesa	Fezes	Guiana Francesa	11164	SAMEA3895293
HE012	-	Guiana Francesa	Fezes	Guiana Francesa	9994	SAMEA3895267
HE004	-	Guiana Francesa	Fezes	Guiana Francesa	12801	SAMEA3895259
HE006	-	Guiana Francesa		Guiana Francesa	10260	SAMEA3895261
HE015	-	Guiana Francesa		Guiana Francesa	3203	SAMEA3895269
NCYC_2966	-	Nottingham, Reino Unido	Fezes	Mosaico	43148	SAMEA3895723
YJS 5829	SC 32 F. Dromer IP	França	Fezes	Mosaico	25297	SAMEA3895678
YJS 5882	malade 98 3312	Amiens, France	Fezes	Pão	74677	SAMEA3895709

Estirpes	Outras designações	Origem geográfica	Origem ecológica	Clades WGS	Heterozigotias	Nº Acesso
Estirpes Clínicas						
YPO 107	-	Coimbra, Portugal	Exsudado vaginal (2003)	Vinho	4035	Este estudo
PYCC 6727	YJM 244, CBS 1227	Roménia	Abcesso na epiderme (unha infetada de criança de 4 anos)	Vinho	1303	SAMEA3895038
PYCC 6728	CBS 1489	Itália - Pavia	Pulmão com tuberculose	Vinho	1550	SAMEA3895182
OLO41	-	Porto, Portugal	Urina	Vinho	9435	Este estudo
YJM 975	-	Itália	Exsudado vaginal	Vinho	2096	SRR800790
YJM 978	-	Itália	Exsudado vaginal	Vinho	2236	SRR800791
YJM 981_b	-	Itália	Exsudado vaginal	Vinho	1888	SRR800792
YJM 1450	-	Newcastle, Reino Unido	Clínica	Vinho	2811	SRR800841
YJM 1526	-	-	Garganta (clínica)	Vinho	2016	SRR800847
2698	-	Hospital, Barcelona, Espanha	Faringe	Vinho	4010	SAMEA3895434
YJS 5874	malade 139287/11_2_1	Paris, França H2	Sangue (isolado terapêutico)	Vinho	4124	SAMEA3895702
YJS 5868	malade 6441	Paris, França H6	Sangue (isolado terapêutico)	Vinho	4256	SAMEA3895696
YJS 5866	malade 6442	Paris, França H6	Catéter (isolado terapêutico)	Vinho	4208	SAMEA3895694
YJS 5871	malade 1124/150017	Paris, França H2	Fezes (isolado terapêutico)	Vinho	4117	SAMEA3895699
YPO 542	-	Coimbra, Portugal	Exsudado vaginal (2005)	Pão	41705	Este estudo
CBS 2919	NRRL YB-3916; PYCC 8027	Noruega	Expetoração	Pão	45769	Este estudo
PYCC 3507	NRRL Y-492	-	Exsudado vaginal	Pão	28000	Este estudo
PYCC 5517	941082	Reino Unido	Paciente com VIH+	Pão	64526	Este estudo
PYCC 5518	940557	Reino Unido	Paciente VIH+	Pão	55606	Este estudo
PYCC 5521	940915	Reino Unido	Paciente VIH+	Pão	61138	Este estudo

Estirpes	Outras designações	Origem geográfica	Origem ecológica	Clades WGS	Heterozigotias	Nº Acesso
NRRL Y-468	-	Wickerham	Exsudado vaginal	Pão	48718	Este estudo
NCYC_2925	-	Noruega	Expectoração	Pão	44985	SAMEA3895428
CBS 1464	-	Áustria	Unha infetada de criança de 4 anos, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Pão	2783	SAMEA3895004
YJS 5826	SC 29 F. Dromer IP	França	Exsudado vaginal	Pão	44238	SAMEA3895677
NCYC_2780	-	Bélgica	Exsudado vaginal	Pão	65921	SAMEA3895432
CBS 9562	-	Grécia	Exsudado vaginal	Pão	73763	SAMN04549049
PYCC 8024	NRRL-Y-960	Washington D.C.	Língua	Mosaico	39503	Este estudo
PYCC 3509	NRRL Y-961; YJM 1307	DC, EUA	Língua	Mosaico	4408	SRR800810
PYCC 5516	-	Reino Unido	Paciente VIH+	Mosaico	46801	Este estudo
PYCC 5519	-	Reino Unido	Paciente VIH+	Mosaico	56681	Este estudo
PYCC 3508	NRRL Y-502	-	Pulmão (doença crónica pulmonar)	Mosaico	21256	Este estudo
PYCC 5520	940610	Reino Unido	Paciente VIH+	Mosaico	46943	Este estudo
YJM 320_b	CBS 7837	CA, EUA	Sangue	Mosaico	2918	SRR800771
YJM 555	-	CA, EUA	Clínica	Mosaico	6258	SRR800781
YJM 1083	NRRL Y-10988	NC, EUA	Clínica	Mosaico	2970	SRR800855
YJM 1199	-	MI, EUA	Clínica	Mosaico	3419	SRR800800
YJM 1208	-	MI, EUA	Clínica	Mosaico	3820	SRR800802
YJM 145_b	-	EUA	Pulmão, paciente VIH +	Mosaico	2486	SAMEA3894911
2720	-	Hospital, Valência, Espanha	Sangue	Mosaico	53131	SAMEA3895435
YJM 653_1b	-	EUA	Lavado broncoalveolar	Mosaico	2882	SAMEA3894922
YJM 428_1b	-	California, EUA	Paracenteis fluid	Mosaico	2500	SAMEA3894917
PB13	-	Holanda	Expetoração	Mosaico	41079	SAMEA3895689
NCYC_2798	-	Alemanha	Isolado clínico, paciente VIH+	Mosaico	56993	SAMEA3895515
YJM 280_b	-	EUA	Fluido peritonial	Mosaico	3154	SAMEA3894912

Estirpes	Outras designações	Origem geográfica	Origem ecológica	Clades WGS	Heterozigotias	Nº Acesso
CBS 7835	-	EUA	Fluido peritoneal	Mosaico	47500	SAMN04549043
CBS 7840	-	EUA	Fluido Ascítico	Mosaico	30360	SAMN04549048
GSY 725	-	-	Sangue (criança de três anos que ingeriu cápsulas probióticas)	Mosaico	18055	SAMN04549054
YJM 436	-	-	Boca (clínica)	Mosaico	2640	SAMEA3894919
YJM 789	-	-	Clínica (pulmão)	Mosaico	2239	SAMN04549018
Populações definidas						
S288c	CBS 8803	-	Estirpe de referência laboratorial	Referência	-	-
Pyr4b	DBQ 26	Halkidiki, Grécia	<i>Quercus pubescens</i>	MO	6908	PRJEB7601
DBVPG 10158	-	Lucciolabella Siena, Itália 2012	<i>Quercus cerris</i> (solo)	MO	1947	Este estudo
ZP 1008	-	Eja, Melres, Douro, Portugal	<i>Q. faginea</i>	MO	1608	PRJNA264372
ZP 736	-	Caratão, Abrantes, Portugal	Figo putrefacto	MO	2279	PRJEB7601
ZP 1236	-	Mêda, Guarda, Portugal	Vinha (solo)	MO	1453	Este estudo
ZP 860	-	Parque Natural Alconorales , Espanha	<i>Q. ilex</i>	MO	2170	PRJEB7601
ZP 742	-	Caratão, Abrantes, Portugal	Figo putrefacto	MO	2162	PRJEB7601
EXF 7200		Montenegro	<i>Q. rubor</i>	MO	3001	PRJNA264372
PYCC 4226	-	-	Levedura do pão comercial	Pão	28451	ERS1108635
Platinum	-	-	Levedura do pão comercial	Pão	42934	ERS1108633
AP13.1	-	-	Levedura do pão	Pão	58023	PRJEB24932
PYCC 4086	-	Portugal	Excrementos de galinha	Pão	51572	-
UL 32	-	Lampedusa, Sicília, Itália	Cloaca de Rabirruivo-de-testa-branca (<i>Phoenicurus phoenicurus</i>)	Pão	36705	Este estudo
C202A	-	Crimeia	Cloaca de Galinhola (<i>Scolopax rusticola</i>)	Pão	35709	Este estudo

Estirpes	Outras designações	Origem geográfica	Origem ecológica	Clades WGS	Heterozigotias	Nº Acesso
Challenge Red	-	-	Estirpe comercial <i>starter culture</i>	Vinho	5128	Este estudo
Uvaferm vrb	-	-	Levedura comercial (vinho branco e tinto)	Vinho	1618	PRJEB19382
Lalvin W15	-	-	Levedura comercial (vinho tinto)	Vinho	1392	PRJEB19382
DBVPG 1373	-	Holanda	Solo	Vinho	1711	SGRP2
PYCC 4588	-	Alentejo, Portugal	Mosto de vinho de Jerez	Vinho - PDM	3533	Este estudo
PYCC 6726	-	Espanha	Vinho Jerez	Vinho - PDM	3991	PRJEB19382
TUM 513	-	-	Califórnia <i>Ale</i>	Cerveja - Alemã	35916	ERS1108618
TUM 338	-	-	Cerveja Altbier <i>Ale</i>	Cerveja - Alemã	38010	ERS1108623
PYCC 4455	-	Roterdão	Levedura do pão <i>Ale</i>	Cerveja - Alemã	24005	Este estudo
TUM 503	-	-	Califórnia <i>Ale</i>	Cerveja-Inglesa	32056	ERS1108626
FostersO	-	-	Levedura da cerveja comercial <i>Ale</i>	Cerveja-Inglesa	35976	ERS1108627
CBS 1585	-	Nakazawa, Japão	Saqué moto	SAKE	2966	ERS1108638
TUM 521	-	Costa Rica	Cultura comercial de vinho de milho	SAKE	1764	Este estudo
TUM 518	-	Costa Rica	Cultura comercial de vinho de Banana	SAKE	1436	Este estudo
CBS 1598	-	Japão	Saqué moto	SAKE	3374	ERS1108639
ZP 530	-	Campeã, Portugal	<i>Castanea sativa</i>	NA & JP	3183	PRJEB7601
ZP 781	-	Japão	<i>Q. serrata</i>	NA & JP	2889	PRJEB7601
YJM 1434	-	Pensilvânia, EUA	Carvalho	NA & JP	3319	PRJNA189919
SDO3s1	-	EUA	Carvalho	NA & JP	2965	PRJEB7601
CEY 651	-	Guiana Francesa	Frutos	Guiana Francesa	12416	SAMEA3895439
CEY 650	-	Guiana Francesa	<i>Agouti paca</i> (RO)	Guiana Francesa	11656	SAMEA3895438
<i>Candida glabrata</i>						
YPO 467	-	Coimbra, Portugal	Urina (2004)	/	-	-
YPO 552	-	Coimbra, Portugal	Expectoração (2005)	/	-	-
YPO 610	-	Coimbra, Portugal	Exsudado vaginal (2005)	/	-	-
YP0907	-	Coimbra, Portugal	Sonda vesical (2006)	/	-	-
A127	-	Porto, Portugal	Hemocultura	/	-	-
ZP 1118	-	Guarda, Portugal	Solo de <i>Q. faginea</i>	/	-	-

3.2 Análise Filogenética

Um dos objetivos deste estudo consistiu em compreender as origens evolutivas das estirpes oportunistas de *S. cerevisiae*. Deste modo, foi efetuada uma análise filogenética que envolveu 100 sequências do genoma completo (Tabela 3). Foram incluídos genomas sequenciados durante este estudo, genomas sequenciados previamente no laboratório e genomas retirados de bases de dados públicas. Analisaram-se estirpes Clínicas, estirpes Associadas ao Homem, populações domesticadas do Vinho, Cerveja, Pão e Saquê e populações selvagens dos Carvalhos Mediterrânicos (MO), Norte América e Japão e Guiana Francesa. Através desta análise, foi possível inferir quais são os grupos filogenéticos em que se agrupam as estirpes das categorias “Clínicas” e “Associadas ao Homem”.

Ao analisar a Figura 6, verifica-se que as estirpes de origem clínica estão agrupadas em três locais da filogenia, enquadrando-se dentro das populações do Pão e do Vinho, sendo que as restantes são estirpes mosaico. Assim, conclui-se que estirpes de origem clínica agrupam-se apenas dentro de populações domesticadas de *S. cerevisiae* ou então resultam da recombinação entre populações diferentes, originando mosaicos. Cerca de 47% das estirpes da categoria Clínicas são mosaicos, 28,6% agrupam-se na população do Vinho e 24,5% pertencem à população do Pão. Do mesmo modo, é possível aferir que nas estirpes mosaico da categoria Clínicas existe um grupo de estirpes filogeneticamente mais semelhantes entre si (exemplo: YJM789 e CBS7835). As populações onde se enquadram as estirpes da categoria Clínicas são ambas domesticadas, sugerindo que os traços de domesticação adquiridos por estas estirpes facilitam a ocorrência destas como agentes de infeções oportunistas.

As estirpes da categoria Associadas ao Homem agrupam-se na população da Guiana Francesa e na população do Vinho, com apenas um representante na população do Pão. É de notar que as estirpes Associadas ao Homem isoladas a partir de probióticos se agrupam na sua totalidade dentro da população do Vinho. Do mesmo modo, podemos verificar que estas estirpes probióticas são filogeneticamente muito semelhantes entre si, agrupando-se quase na sua totalidade num sub-clade dentro da população do Vinho. Apesar de na literatura estarem documentadas associações entre a ocorrência de infeções sistémicas e a ingestão de probióticos, verifica-se que estirpes não probióticas também estão associadas a este tipo de infeção como representado na Tabela 3. Através da análise da Tabela 3, não é possível verificar qualquer associação entre o tipo de infeção e a população a que pertencem as estirpes.

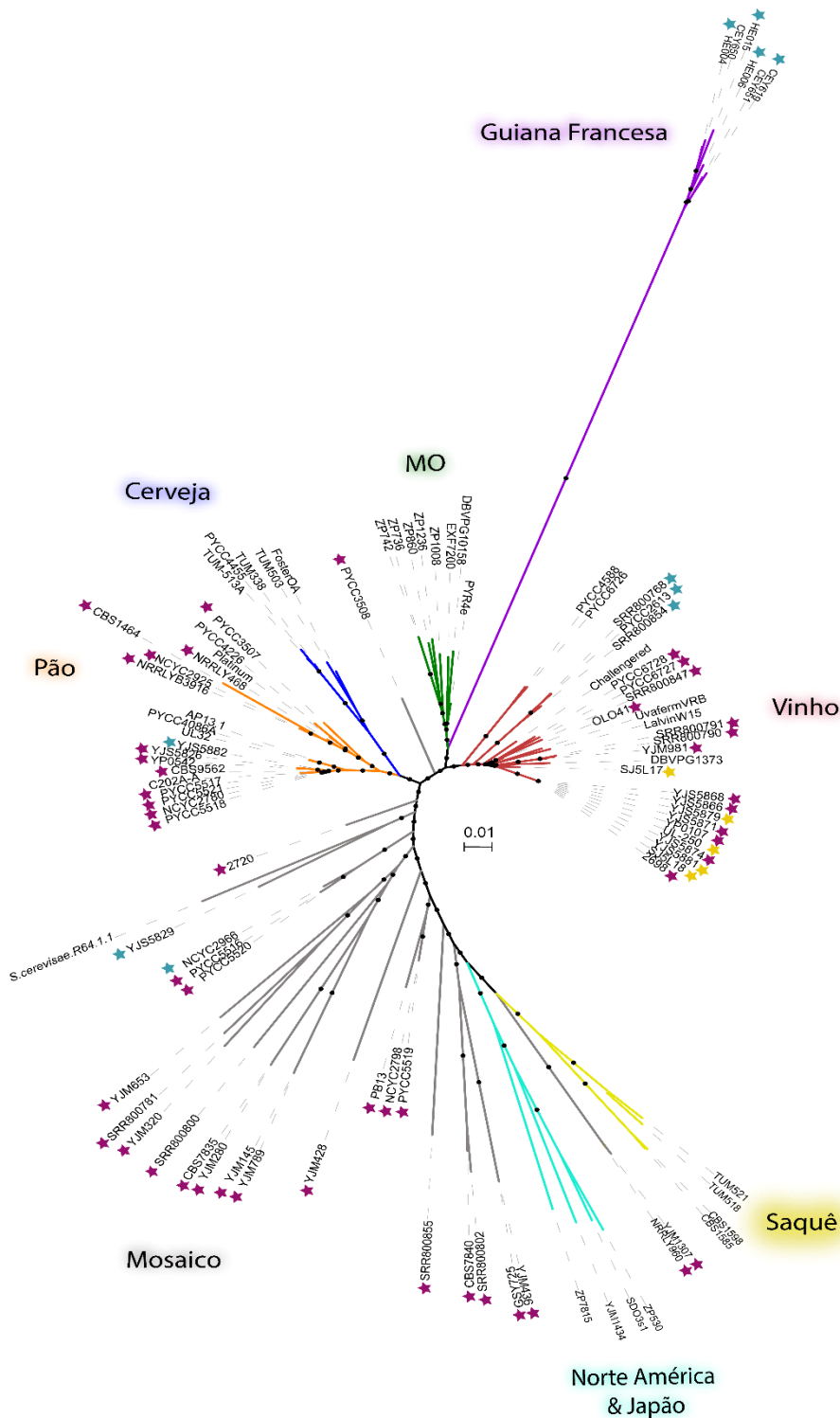


Figura 6. Posição filogenética das estirpes das categorias Clínicas e Associadas ao Homem entre estirpes de diferentes populações definidas de *S. cerevisiae*. Filogenia de 100 seqüências do genoma completo, inferida com 2710908 SNP's obtida através de uma análise de Maximum Likelihood. O comprimento dos ramos corresponde ao número espectável de substituições por local, e os pontos a negro suportam valores de bootstrap > 95% (1000 replicados). As estirpes Clínicas estão representadas com uma estrela de cor roxa, as estirpes Associadas ao Homem com uma estrela azul e os probióticos com uma estrela amarela.

Através desta análise, concluímos que as estirpes Clínicas se agrupam exclusivamente em populações domesticadas, não se agrupando em nenhuma população selvagem. Sugerindo que adaptações associadas à domesticação podem permitir uma melhor adaptação ao corpo humano e conseqüentemente serem fatores que contribuem para a transição para a patogenicidade.

3.3 Análise populacional

A análise filogenética efetuada suscitou a questão de qual a ancestralidade das estirpes mosaico. Para esclarecer este problema, foi efetuada uma análise populacional de forma a inferir quais as proporções de ancestralidade de cada estirpe (Figura 7 e Tabela 4). Nesta análise foram estudadas as mesmas 100 estirpes de *S. cerevisiae* utilizadas na filogenia (Tabela 3).

k corresponde ao número de subpopulações que originam uma população (Verity & Nichols, 2016). Nesta análise foi definido o melhor k, como sendo o k=5, pois foram utilizadas cinco populações distintas (Cerveja e Pão, Guiana Francesa, MO, Saquê e Norte América e Japão, Vinho). Comparando este k com os restantes k testados nesta análise, observou-se que o k selecionado, k=5, apresenta resultados que estão de acordo com os conhecimentos prévios a cerca destas estirpes e populações publicados na literatura.

Em concordância com a análise filogenética anterior, nesta análise verificamos que 47% das estirpes Clínicas são mosaicos e que as restantes estirpes se agrupam nas populações do Vinho e do Pão. As estirpes Associadas ao Homem pertencem na sua maioria à população da Guiana Francesa e à população do Vinho.

Analisando as estirpes mosaico, verificamos que a maioria resulta da recombinação entre três populações. A maior parte do genoma provém da população do Saquê, seguindo-se uma elevada proporção proveniente da população do Vinho e uma pequena proporção da população do Pão, está presente em oito estirpes (Tabela 4). O programa não distinguiu entre a população do Saquê e Norte América e Japão, correspondendo as duas populações à mesma cor. No entanto podemos inferir que nos mosaicos a cor azul se refere à população do Saquê, tendo em conta outros estudos em que foram utilizadas as mesmas estirpes (Peter et al., 2018; Zhu et al., 2016; Strobe et al., 2015)

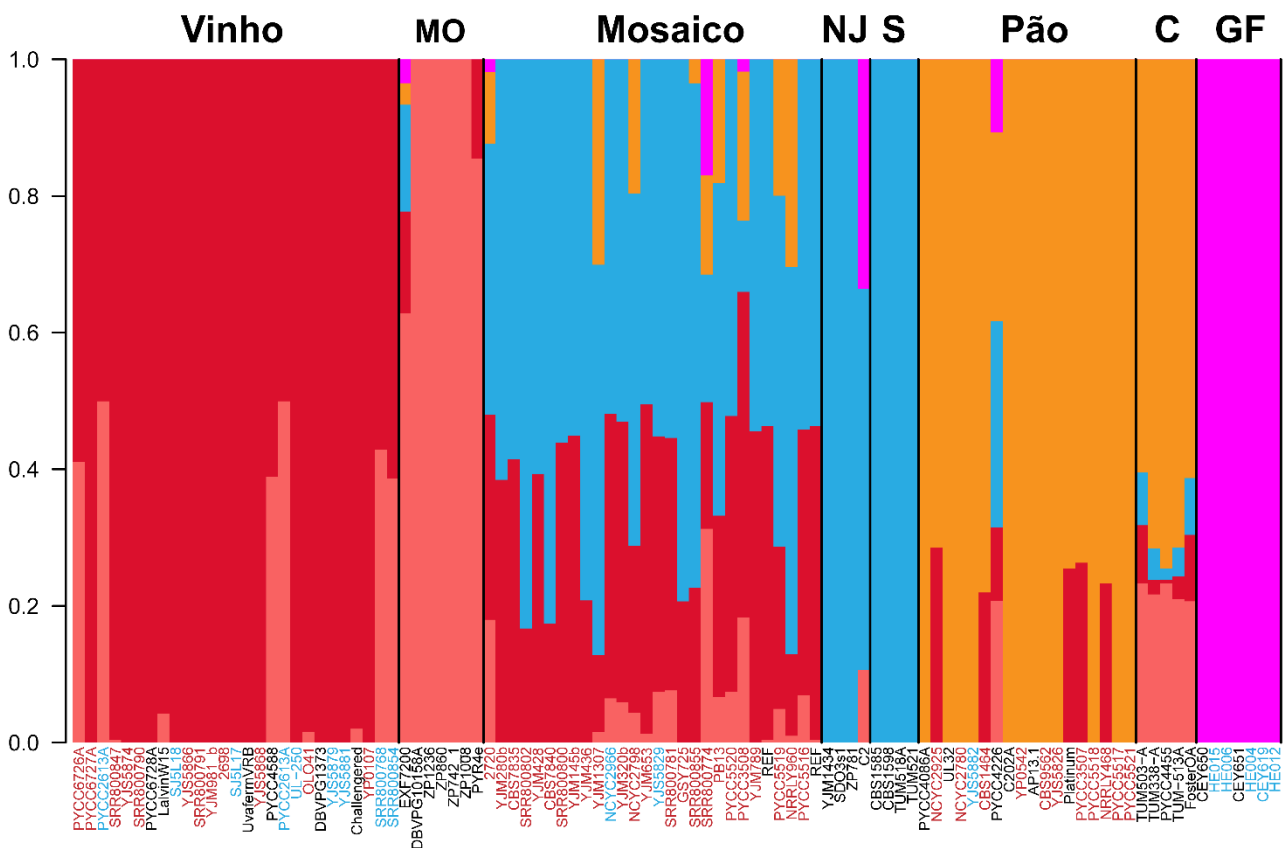


Figura 7. Análise populacional de 100 estirpes de *S. cerevisiae* das categorias Clínicas, Associadas ao Homem e estirpes de populações definidas. Foi utilizado o *software* Angsd. Cada coluna representa uma estirpe individual com a proporção da sua ancestralidade de acordo com k=5 populações. O vermelho corresponde à população do Vinho, o vermelho mais claro à população dos carvalhos Mediterrânicos (MO), o azul às populações do Norte América e Japão (NJ) e Saquê (S), a laranja a população do Pão e a rosa a população da Guiana Francesa. O C representa a população da Cerveja. As estirpes indicadas a vermelho representam as da categoria Clínicas, com a cor azul as estirpes da categoria Associadas ao Homem e a preto as estirpes das populações definidas.

Tabela 4. Estirpes mosaico analisadas neste estudo, 23 estirpes da categoria “Clínicas” e duas estirpes da categoria “Associadas ao Homem”. Origem ancestral de cada estirpe inferida através da análise populacional. Estirpes com realce a azul correspondem a estirpes analisadas nos ensaios fenotípicos.

Estirpes mosaico	Populações filogenéticas			
Clínicas				
NRRL-Y-960	Vinho	Saquê	Pão	
YJM 1307	Vinho	Saquê		
PYCC 5516	Vinho	Saquê		
PYCC 5519	Vinho	Saquê	Pão	
PYCC 3508	Vinho	Saquê		
PYCC 5520	Vinho	Saquê		
YJM 320_b	Vinho	Saquê		
YJM 555	Vinho	Saquê		
YJM 1083	Vinho	Saquê	Pão	
YJM 1199	Vinho	Saquê		
YJM 1208	Vinho	Saquê		
YJM 145_b	Vinho	Saquê		
2720	Vinho	Saquê	Pão	Guiana Francesa
YJM 653_1b	Vinho	Saquê		
YJM 428_1b	Vinho	Saquê		
PB13	Vinho	Saquê	Pão	
NCYC_2798	Vinho	Saquê	Pão	
YJM 280_b	Vinho	Saquê		
CBS 7835	Vinho	Saquê		
CBS 7840	Vinho	Saquê		
GSY 725	Vinho	Saquê		
YJM 436	Vinho	Saquê		
YJM 789	Vinho	Saquê		
Associadas ao Homem				
NCYC_2966	Vinho	Saquê	Pão	
YJS 5829	Vinho	Saquê		

Em suma, nesta análise populacional são confirmados os resultados da análise filogenética e verificamos que as estirpes Clínicas pertencem a populações domesticadas, ou resultam da recombinação entre populações domesticadas. Assim, ou pertencem à população do Vinho, ou do Pão, ou resultam da recombinação da população do Vinho com Saquê e Pão, originando estirpes mosaicos. Estes dados corroboram a hipótese das estirpes domesticadas estarem mais bem adaptadas a serem agentes causadores de infecções oportunistas, visto que as estirpes mosaico da categoria Clínicas resultam da recombinação de genomas (quase na sua maioria) de populações domesticadas.

3.4 Caracterização fenotípica

As análises filogenética e populacional demonstraram que as estirpes Clínicas pertencem a diferentes populações. Neste sub-capítulo descreve-se a caracterização fenotípica dirigida a aspetos relevantes para a virulência, e teve como objetivo procurar descobrir se estirpes da categoria Clínicas, mas de diferentes populações, apresentavam características fenotípicas também distintas. Neste estudo foram efetuados quatro ensaios fenotípicos: investigação da temperatura máxima de crescimento; ocorrência da produção de pseudo-hifas; resistência ao sulfato de cobre e tolerância à presença de ROS.

3.4.1 Temperatura máxima de crescimento

A temperatura máxima de crescimento permite-nos investigar para cada estirpe qual a sua tolerância a elevadas temperaturas ($\geq 37^{\circ}\text{C}$) e posteriormente proceder a uma análise comparativa desta característica fenotípica entre as diferentes populações.

Cada estirpe foi classificada de acordo com a sua temperatura máxima de crescimento e com o seu tipo de crescimento, tal como exemplificado a seguir: ausente (Figura 8.1), muito fraco (Figura 8.2), fraco (Figura 8.3) e forte (Figura 8.4). O crescimento forte corresponde a colónias cuja morfologia e crescimento, após incubação sob o fator de *stress* de temperatura, se apresentam semelhantes aos seus controlos. Pelo contrário, o crescimento muito fraco corresponde a colónias que demonstram não estar bem adaptadas à temperatura testada, apresentando diferenças a nível de crescimento e morfologia comparativamente com o controlo.

O aumento da temperatura é um dos mecanismos de defesa do corpo humano como resposta a infeções, nomeadamente pela entrada de microrganismos invasores. Considera-se a existência de febre quando existem temperaturas corporais em regra acima dos $37,5^{\circ}\text{C}$ (Henker & Carlson, 2007). Microrganismos causadores de infeção desenvolveram adaptações que se expressam na capacidade de sobreviver a temperaturas superiores às temperaturas do hospedeiro. Neste ensaio foi testada a capacidade das estirpes Clínicas e não clínicas de crescerem num intervalo de temperaturas dos 30°C aos 42°C . Os resultados globais deste ensaio estão representados na Figura 8 e gráfico da Figura 9.

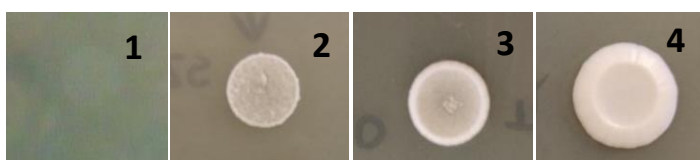


Figura 8. Plaqueamento por gotas de *S. cerevisiae* em placas YPD, exemplo representativo da classificação dos diferentes tipos de crescimento no ensaio da temperatura máxima de crescimento. 1: Ausência de crescimento, 2: crescimento muito fraco, 3: crescimento fraco, 4: crescimento forte.

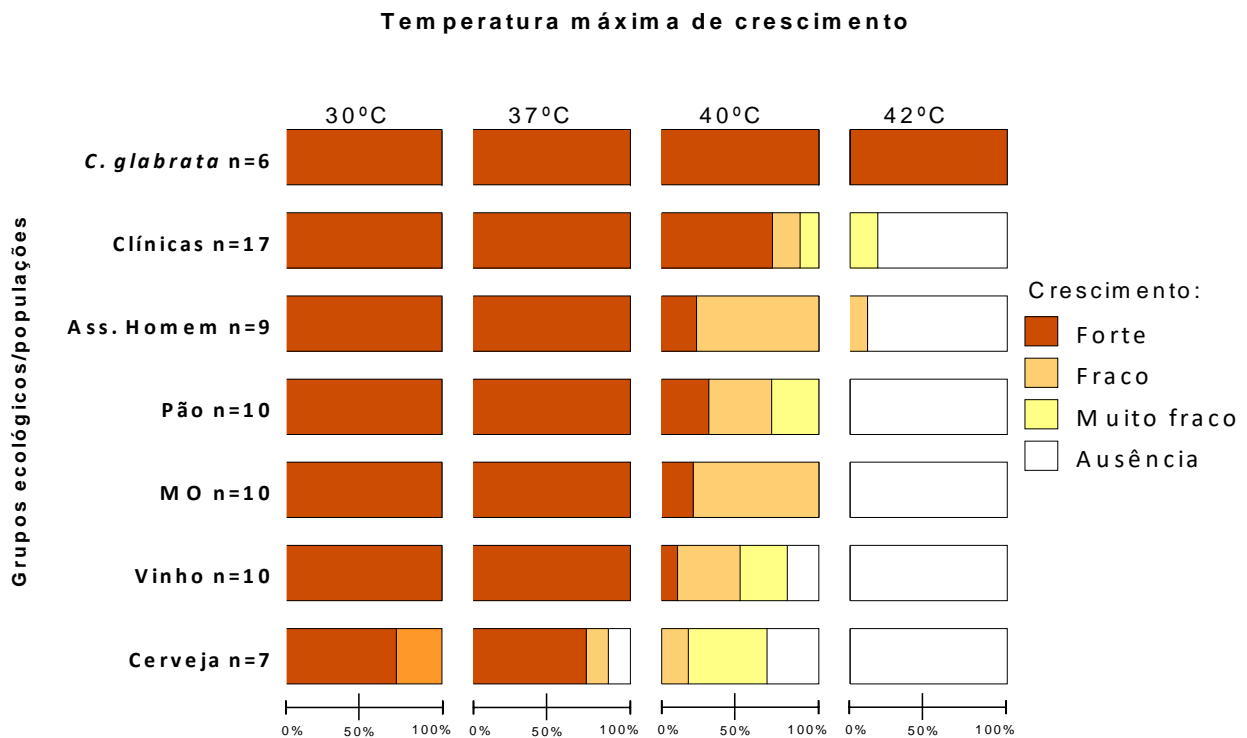


Figura 9. Temperatura máxima de crescimento das estirpes de *C. glabrata* e *S. cerevisiae* testadas em meio YPD sólido. Nas colunas do gráfico estão representadas as quatro temperaturas testadas (30°C, 37°C, 40°C e 42°C), as linhas representam as diferentes populações/grupos ecológicos. As diferentes cores simbolizam o tipo de crescimento de cada estirpe, através de um gradiente no qual o tom mais escuro representa um crescimento forte e o tom mais claro (branco) a ausência de crescimento. A área de cada cor corresponde à percentagem de estirpes dessa população que cresceram nesse tipo de crescimento.

A temperatura de 30°C correspondeu à temperatura de controlo onde todas as estirpes cresceram. Para investigar a tolerância a elevadas temperaturas foram testadas as temperaturas de 37°C, de 40°C e 42°C por corresponder a uma temperatura limitante e associada à virulência de *S. cerevisiae*.

As estirpes da espécie *C. glabrata* apresentam um crescimento normal em todas as temperaturas testadas dos 30°C aos 42°C.

O crescimento a 37°C não permite diferenciar as estirpes das diferentes populações pelo facto de todas apresentarem um crescimento forte, com excepção da população da Cerveja.

A temperatura de 40°C é a temperatura a partir da qual começamos a observar muita variabilidade entre as diferentes populações. Cerca de 70% das estirpes do grupo Clínicas apresentam um crescimento forte nesta temperatura, existindo uma pequena proporção de cinco estirpes com crescimento fraco ou muito fraco. As estirpes do grupo Associadas ao Homem e das populações do Pão e MO crescem na sua totalidade, no

entanto apresentam mais de 50% dos indivíduos com um crescimento fraco ou muito fraco. As populações do Vinho e Cerveja são as que apresentam uma maior dificuldade em crescer a elevadas temperaturas com algumas das estirpes sem crescimento a 40°C.

A 42°C é baixa a percentagem de estirpes que conseguem sobreviver, sendo que dentro da espécie de *S. cerevisiae* apenas crescem estirpes pertencentes ao grupo das estirpes Clínicas com três estirpes de crescimento muito fraco, e ao grupo das estirpes Associadas ao Homem com uma estirpe de crescimento fraco. O estudo da temperatura máxima de crescimento das estirpes da categoria Clínicas e Associadas ao Homem, diferenciando-as em populações está representado na Figura 10.

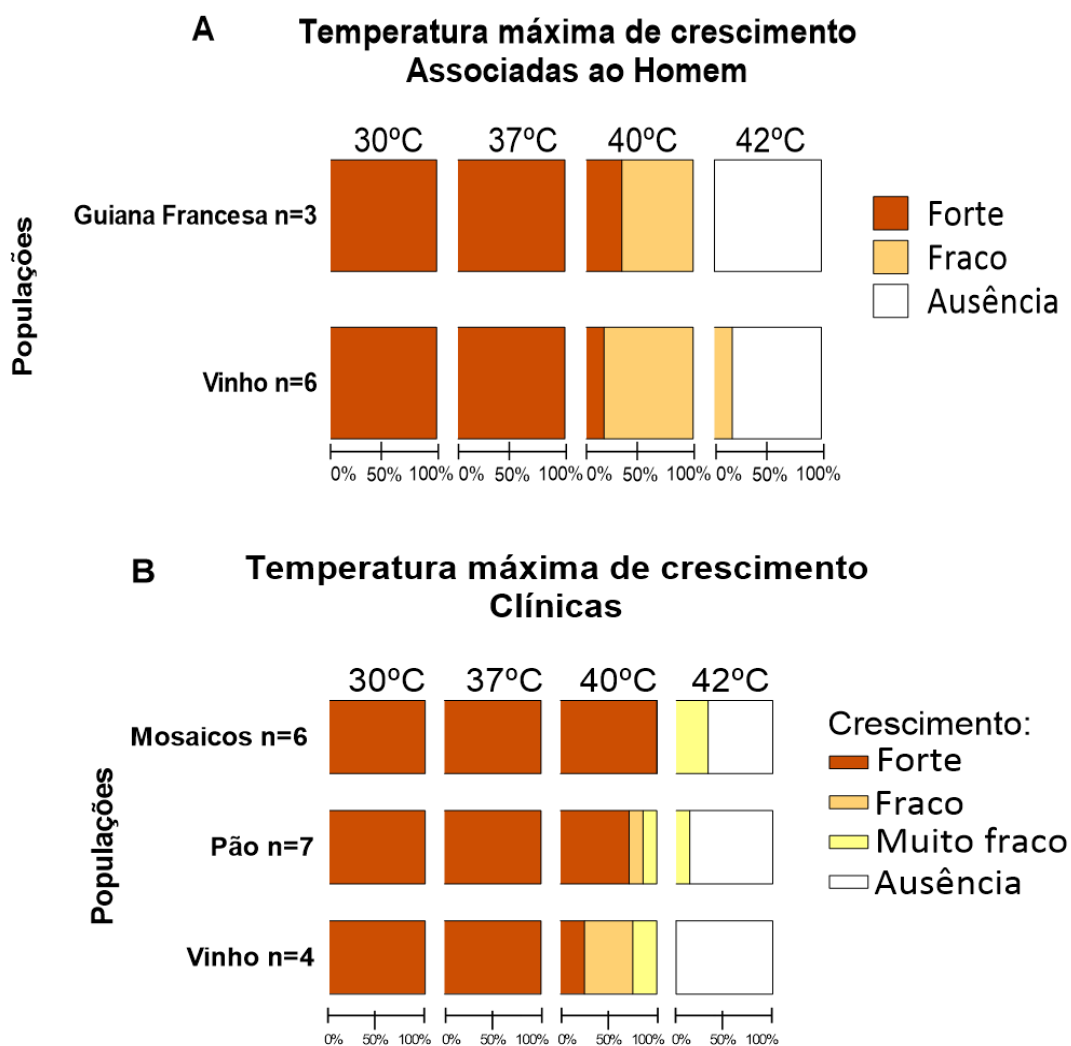


Figura 10. A: Temperatura máxima de crescimento das estirpes da categoria Associadas ao Homem. Neste grupo estão presentes estirpes da população da Guiana Francesa e do Vinho. Estão representadas as quatro temperaturas testadas; B: Temperatura máxima de crescimento das estirpes Clínicas. Código de cores semelhante ao da Figura 9.

Uma observação mais detalhada dos resultados dos grupos das estirpes Associadas ao Homem e Clínicas podem ser observados na Figura 10A e 10B respetivamente.

No grupo de estirpes Associadas ao Homem, nas temperaturas de 30°C e 37°C o crescimento é forte. A 40°C todas as estirpes conseguiram sobreviver, apesar da maioria apresentar um crescimento fraco. Verificamos que dentro do grupo das estirpes Associadas ao Homem, a única estirpe que sobrevive na temperatura de 42°C pertence à população do Vinho. Numa análise mais aprofundada do comportamento das estirpes, verificamos que as estirpes pertencentes à população do Vinho da categoria Clínicas são mais sensíveis a elevadas temperaturas, assemelhando-se com as estirpes da população do Vinho do grupo das populações definidas. No grupo das estirpes Clínicas, as pertencentes à população do Pão são mais tolerantes à temperatura de 40°C, relativamente às estirpes da população do Pão do grupo das populações definidas, representadas na Figura 9. Podemos realçar que dentro do grupo das estirpes Clínicas, as que estão mais bem adaptadas a elevadas temperaturas são as estirpes mosaico, uma vez que possuem um crescimento forte a 40°C e 33,3% de indivíduos a crescer a 42°C.

As estirpes de *C. glabrata* parecem estar mais bem adaptadas a temperaturas elevadas com destaque para os 40°C e 42°C, onde se pode observar diferenças acentuadas entre este grupo e as estirpes de *S. cerevisiae*. O grupo mais bem adaptado a temperaturas elevadas dentro da espécie *S. cerevisiae*, e conseqüentemente mais semelhante a *C. glabrata*, é o grupo das estirpes Clínicas. Neste grupo, a totalidade das estirpes crescem a 40°C, com 76,5% destas a apresentar um crescimento forte, sendo que na temperatura de 42°C crescem 17,6% das estirpes. As estirpes mais bem adaptadas a elevadas temperaturas depois das estirpes Clínicas são as do grupo das estirpes Associadas ao Homem e a estirpes da população do Pão.

Estes resultados estão de acordo com o estudo publicado por de Llanos et al. (2006), cujos isolados clínicos crescem melhor que os isolados derivados de outras origens a 40°C. Esta característica fenotípica é um fator de virulência que permite a sobrevivência dentro do hospedeiro numa situação febril. Estes resultados demonstram que as estirpes Clínicas estão mais bem adaptadas a tolerar temperaturas elevadas, o que lhes fornece uma vantagem adaptativa face a estirpes de outras populações como a da Cerveja, Vinho ou MO. Dentro do grupo das estirpes Clínicas verificamos que as mais tolerantes a elevadas temperaturas são as estirpes mosaico. Por outro lado, apesar das estirpes Associadas ao Homem e as estirpes da população do Pão apresentarem uma adaptação a elevadas temperaturas inferior à das estirpes da categoria Clínicas, possuem a capacidade de sobreviver na sua totalidade, estando mais bem adaptadas a desenvolver comportamentos oportunistas do que as restantes populações.

3.4.2 Produção de pseudo-hifas

A produção de pseudo-hifas constitui uma vantagem evolutiva na adaptação a novos nichos ambientais pois permitem alcançar nutrientes mais distantes e permitem a adesão aos tecidos do hospedeiro. A adesão é um mecanismo de defesa face à resposta imunitária dos macrófagos (Phadke et al., 2018). Deste modo, estirpes que possuem esta capacidade possivelmente estarão mais bem adaptadas para causar infeção. Através da inoculação das leveduras no meio sólido SLAD, foi possível identificar se as estirpes produziam pseudo-hifas e definir parâmetros como o comprimento, que se classifica em comprimento curto $<150\mu\text{m}$ (Figura 11B), comprimento médio $150\mu\text{m}-300\mu\text{m}$ (Figura 11C) e comprimento longo $> 300\mu\text{m}$ (Figura 11D).

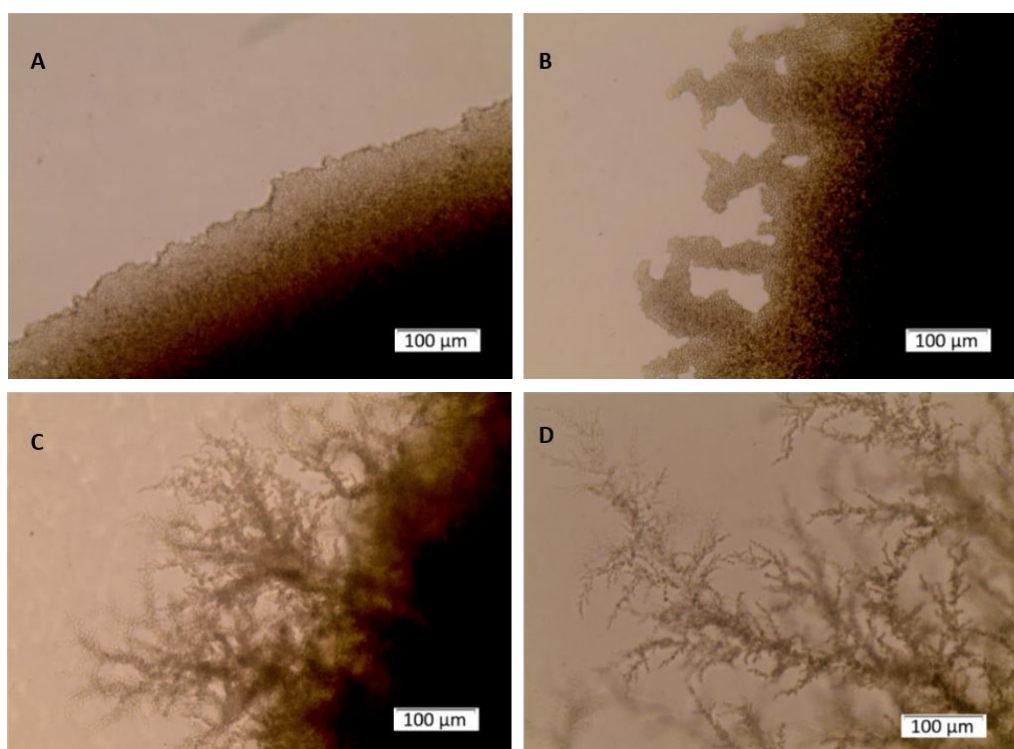


Figura 11. Observação microscópica de colónias de *S. cerevisiae*, com ampliação 100X em campo claro, - exemplo da classificação dos tipos de comprimentos de pseudo-hifas. A: ausência de pseudo-hifas, B: pseudo-hifas curtas, C: pseudo-hifas médias, D: pseudo-hifas longas.

Para além do comprimento, foi definido o tipo de desenvolvimento das pseudo-hifas, podendo distinguir desenvolvimento fraco (Figura 12A) no qual se conseguem observar com clareza as células de cada pseudo-hifa, desenvolvimento médio (Figura 12B) e desenvolvimento elevado (Figura 12C) onde não é possível diferenciar as diferentes células da pseudo-hifa, estando estas mais pequenas e num maior número. Definidos os parâmetros do comprimento e desenvolvimento das pseudo-hifas foi testado o tempo de crescimento apresentado na Figura 16.

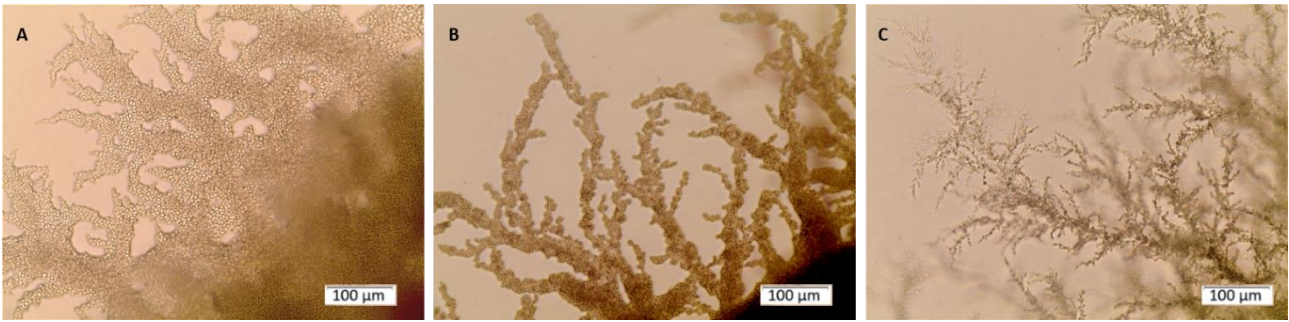


Figura 12. Observação microscópica de colónias de *S. cerevisiae*, com ampliação 100X em campo claro,- exemplo da classificação dos tipos de desenvolvimento das pseudo-hifas. A: desenvolvimento fraco, B: desenvolvimento médio, D: desenvolvimento elevado.

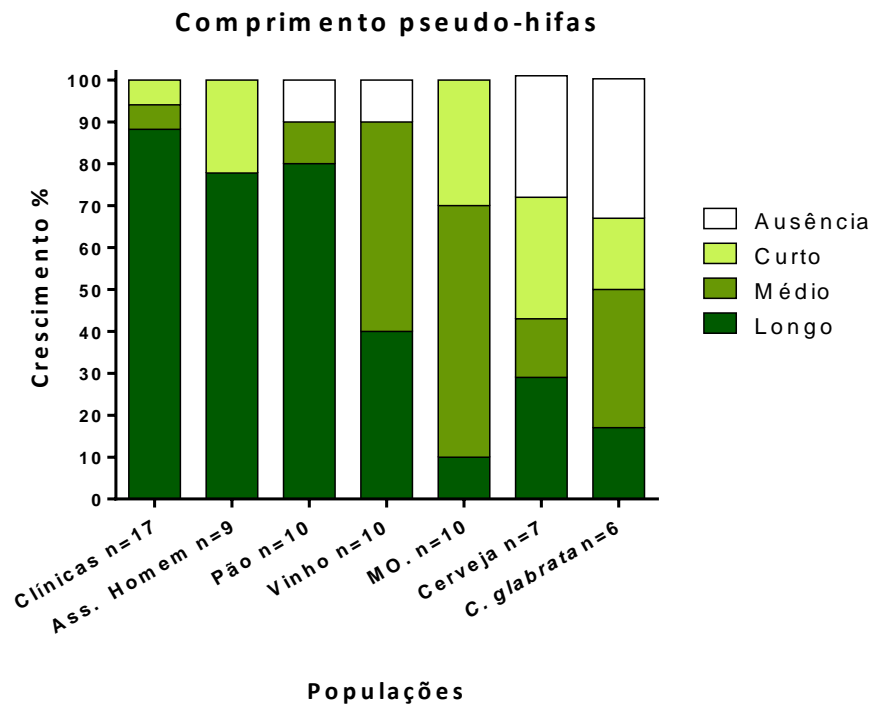


Figura 13. Crescimento de pseudo-hifas 14 dias após inoculação em meio SLAD incubado à temperatura de 30°C. O gradiente de cores representa o comprimento das pseudo-hifas formadas por cada população/grupo ecológico, o tom verde-escuro corresponde a um comprimento longo e o tom verde-claro a pseudo-hifas curtas. A percentagem de crescimento corresponde ao número de estirpes dessa população que apresentam pseudo-hifas com o comprimento longo, médio ou curto e a ausência de produção.

Todas as estirpes dos grupos Clínicas e Associadas ao Homem, assim como a população dos MO produzem pseudo-hifas. O grupo das estirpes Clínicas é o único que apresenta pseudo-hifas longas em mais de 80% das estirpes, seguindo-se a categoria das estirpes Associadas ao Homem e das estirpes da população Pão. As

populações do Vinho, MO e Cerveja produzem na sua maioria pseudo-hifas de comprimento médio ou curto. *C. glabrata* apresenta resultados semelhantes aos da população da Cerveja, no entanto, uma das suas maiores características de virulência é o fato desta espécie conseguir transitar entre a forma levediforme e filamentosa. Este resultado pode ser explicado ao fato do meio utilizado ser específico para a formação de pseudo-hifas em *S. cerevisiae* e não no género *Candida*. Por outro lado, em placas de YMA com culturas de *C. glabrata* crescidas a 25°C, utilizadas para manter a cultura por curtos períodos de tempo a 4°C, foi possível observar a produção de pseudo-hifas longas e bem desenvolvidas. Em consequência do meio de cultura utilizado, específico para a espécie *S. cerevisiae*, não foi possível retirar conclusões a cerca da produção de pseudo-hifas na espécie *C. glabrata*, e consequentemente não é possível comparar os resultados entre as duas espécies em estudo.

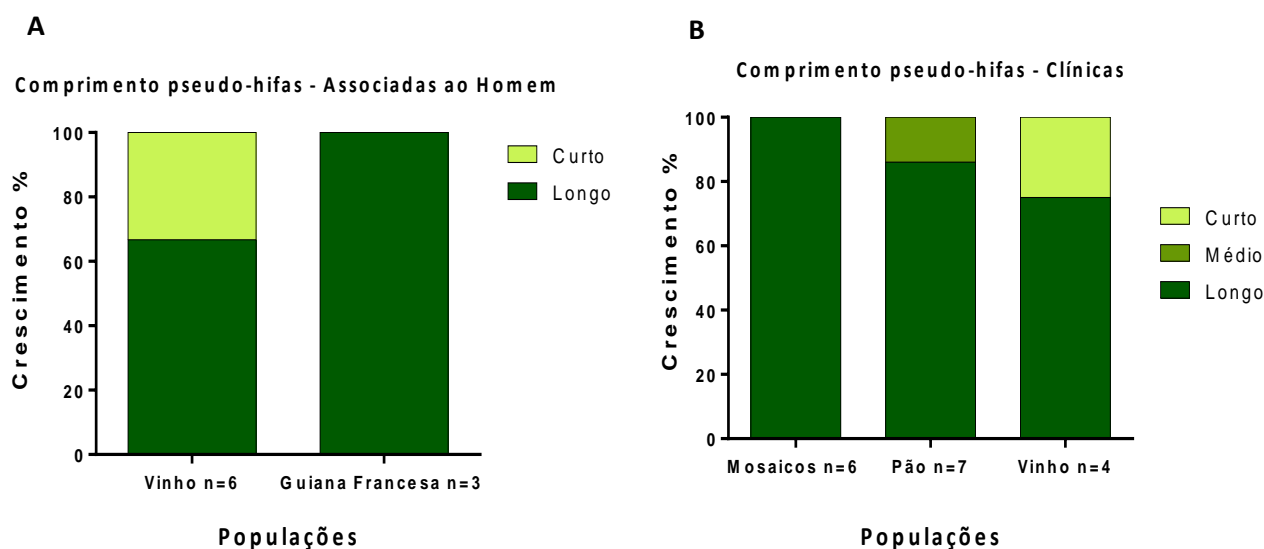


Figura 14. Crescimento de pseudo-hifas 14 dias após inoculação em meio SLAD das estirpes das categorias Associadas ao Homem (A) e Clínicas (B). O gradiente de cores é semelhante ao da Figura 11. A percentagem de crescimento corresponde ao número de estirpes dessa população que apresentam pseudo-hifas com o comprimento longo, médio ou curto e a ausência de produção.

Na categoria das estirpes Associadas ao Homem, Figura 14A, verificamos que as estirpes pertencentes à população da Guiana Francesa possuem na sua totalidade pseudo-hifas longas ao contrário das que pertencem à população do Vinho, nas quais cerca de 30% apresenta um crescimento curto. Observando as estirpes da categoria Clínicas, podemos verificar que todas as estirpes mosaico possuem pseudo-hifas longas, seguindo-se das estirpes que se agrupam na população do Pão. As estirpes da categoria Clínicas que se agrupam na população do Vinho apresentam um resultado semelhante ao observado nas estirpes da categoria Associadas ao Homem que se agrupam na mesma população, o Vinho. Podemos inferir que neste fator fenotípico, as estirpes da categoria Clínicas que se agrupam na população do Pão se assemelham com as estirpes da população do Pão, representadas na Figura 13.

Com base nestes resultados, podemos afirmar que na produção de pseudo-hifas, as estirpes da categoria Clínicas são as mais bem adaptadas, seguindo-se das estirpes da categoria Associadas ao Homem. Neste fator fenotípico podemos ainda fazer uma associação entre a semelhança de resultados deste grupo de estirpes e a população domesticada do Pão, comparativamente com as restantes populações.

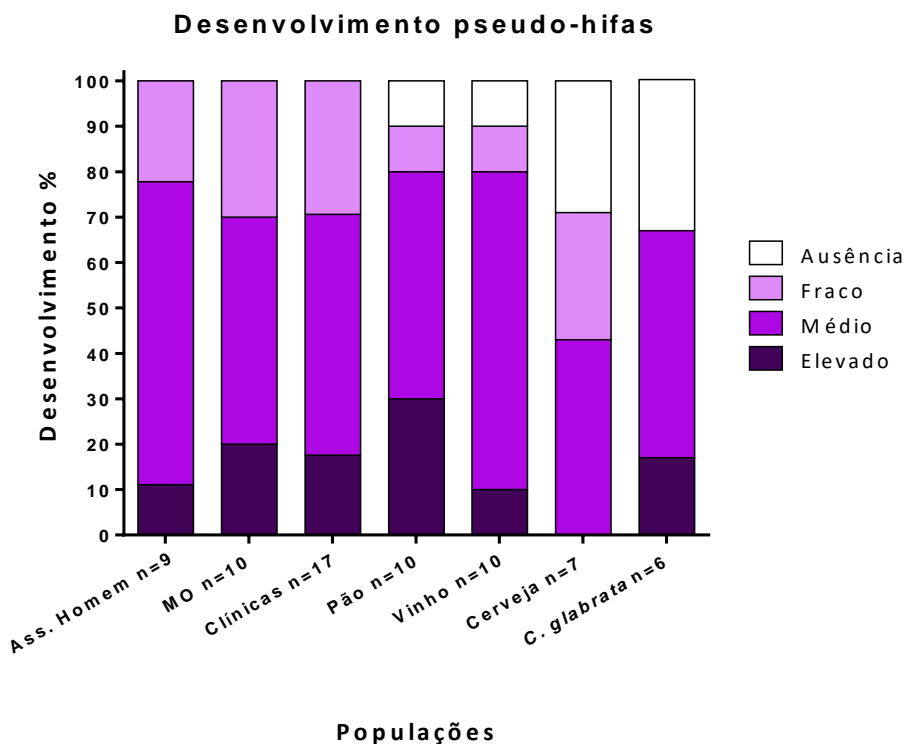


Figura 15 Desenvolvimento de pseudo-hifas após 14 dias de incubação em meio SLAD à temperatura de 30°C; gradiente de cores representativo das diferentes classificações com o tom mais escuro correspondendo ao desenvolvimento elevado (Figura 10D) e o tom mais claro ao desenvolvimento fraco (Figura 10B). O desenvolvimento (%) representa a percentagem de estirpes dessa população que apresentam essa classificação (fraco, médio, elevado).

Na Figura 15 podemos observar que a maioria das estirpes dos diferentes grupos e populações apresentam um desenvolvimento médio. As estirpes da população do Pão parecem ser das populações mais bem adaptadas na produção de pseudo-hifas, com uma percentagem de 30% de desenvolvimento elevado. As estirpes Clínicas, Associadas ao Homem e MO apresentam perfis bastante semelhantes. Deste modo, não se diferenciam de uma forma relevante das estirpes das restantes populações.

Cerca de 65% das estirpes da espécie *C. glabrata* apresentam pseudo-hifas de desenvolvimento médio ou elevado, no entanto 35% não produzem pseudo-hifas. Este resultado deve-se ao fato do meio utilizado ser o meio SLAD, mesmo meio utilizado para a análise do comprimento das pseudo-hifas.

Com os resultados desta análise podemos inferir que apesar da variabilidade entre o desenvolvimento fraco e o elevado, esta variabilidade é verificada em todas as populações, não existindo diferenças que possam diferenciar os grupos estudados.

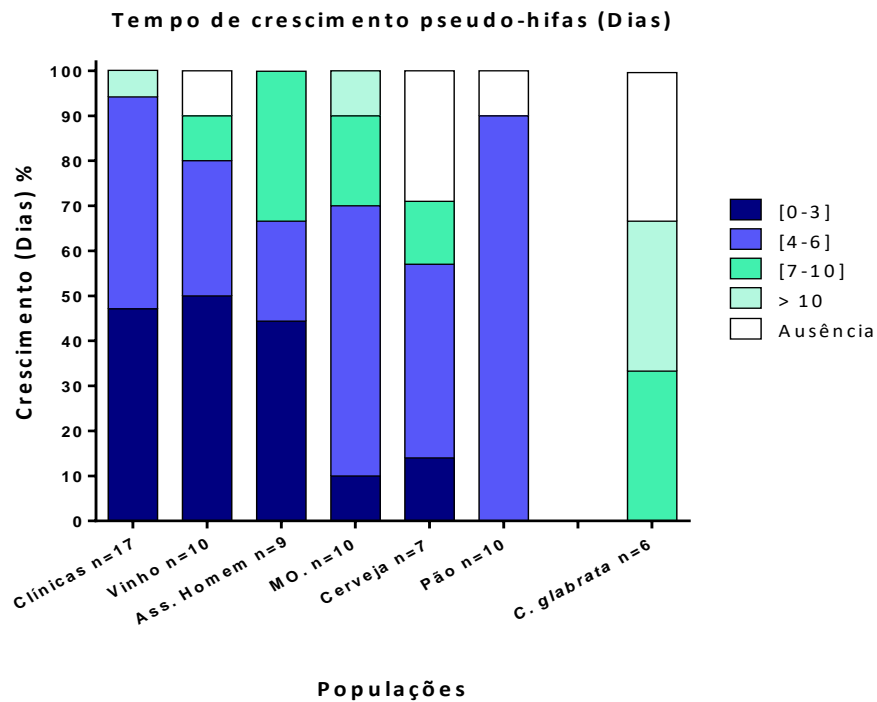


Figura 16. Tempo de crescimento das pseudo-hifas correspondente ao número de dias a partir dos quais foi possível visualizar a presença de pseudo-hifas em meio SLAD à temperatura de 30°C. Quanto mais claro for o gradiente de cor menor é o número de dias registados até ao crescimento. Azul-escuro corresponde ao crescimento até aos três dias inclusive, o azul-claro representa o crescimento acima dos dez dias, tendo em conta que a experiência terminou ao final de 21 dias de incubação.

O tempo de crescimento define-se como o tempo necessário para que as estirpes consigam desenvolver pseudo-hifas. Quanto mais rápida for a produção de pseudo-hifas, maior será a probabilidade da levedura fixar-se no hospedeiro e impedir a sua eliminação pelo sistema imunitário. Cerca de 47% das estirpes da categoria Clínicas e 50% da população do Vinho conseguem desenvolver pseudo-hifas entre os zero e os três dias, correspondendo aos dois grupos mais rápidos no desenvolvimento desta característica. Segue-se o grupo das estirpes Associadas ao Homem com 44% das estirpes a desenvolverem pseudo-hifas, entre os zero e os três dias.

Os grupos das estirpes Clínicas, Associadas ao Homem e a população do Vinho destacam-se das restantes populações, pelo fato de se desenvolverem com maior rapidez. Dentro dos três grupos com uma melhor *fitness* (Clínicas, Associadas ao Homem e população do Vinho), salienta-se a categoria das estirpes Clínicas

pelo fato de apresentarem 47% das estirpes com crescimento até aos três dias, possuírem 47% com crescimento dos 4 aos 6 dias e somando 96% do grupo a crescer relativamente mais rápido que os restantes grupos. Enquanto que no comprimento das pseudo-hifas das estirpes Clínicas e Associadas ao Homem se aproximavam mais da população domesticada do Pão, a nível de tempo de crescimento podemos observar que se assemelham mais com a população domesticada do Vinho. As estirpes de *C. glabrata* devido ao meio de cultura utilizado, ou não produzem pseudo-hifas ou necessitam de pelo menos sete dias até serem visíveis ao microscópio.

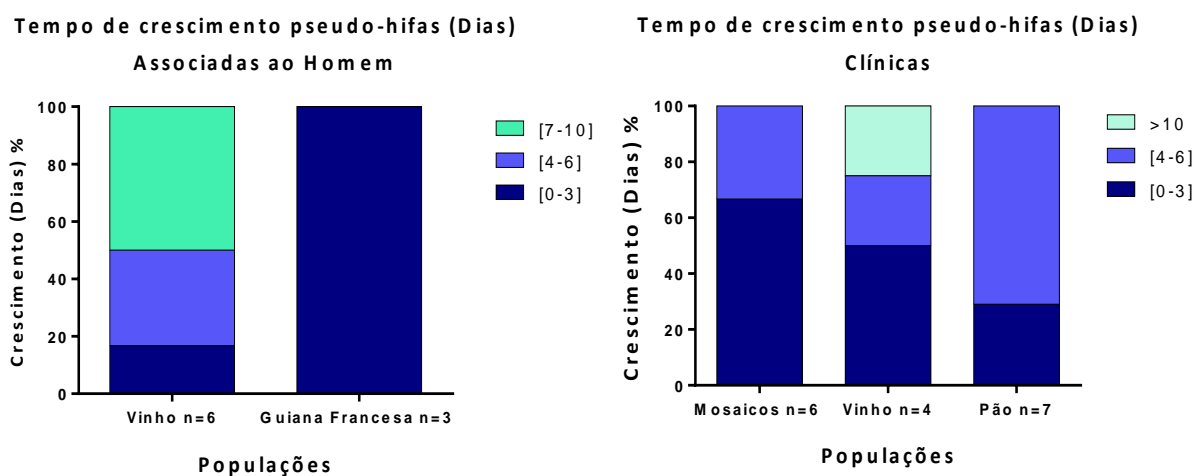


Figura 17. Tempo de crescimento das pseudo-hifas das categorias Associadas ao Homem (A) e Clínicas (B). Número de dias a partir dos quais foi possível visualizar a presença de pseudo-hifas. Código de cores semelhante ao da Figura 16. A experiência terminou ao final de 21 dias de incubação.

As estirpes da categoria Associadas ao Homem, Figura 17A, que se agrupam na população da Guiana Francesa desenvolvem-se com rapidez, com a totalidade das estirpes a produzir pseudo-hifas até aos três dias de incubação. Pelo contrário, as estirpes deste grupo que pertencem à população do Vinho apresentam maior dificuldade em desenvolver pseudo-hifas, apresentando cerca de metade com crescimento dos sete aos dez dias. As estirpes da população do Vinho da categoria Clínicas, Figura 17B, apresentam um crescimento mais célere comparativamente com as estirpes da população Vinho da categoria Associadas ao Homem. Nesta análise, as estirpes mosaico da categoria Clínicas destacam-se de todas as restantes, pelo fato das pseudo-hifas crescerem em mais de 60% das estirpes até aos três dias de incubação.

No ensaio do comprimento das pseudo-hifas, assim como no ensaio do tempo de crescimento, foi possível verificar que as estirpes pertencentes à população do Vinho não se encontram tão bem adaptadas à produção de pseudo-hifas, relativamente às estirpes da população do Pão e as estirpes mosaico na categoria Clínicas.

A produção de pseudo-hifas está descrita como sendo uma das principais características associadas à virulência em *S. cerevisiae*, à semelhança de *C. glabrata*. No gênero *Candida*, a capacidade de transitar entre o estado levediforme e de pseudo-hifas permite-lhe uma melhor disseminação e posterior fixação nos tecidos do hospedeiro. Ao contrário do que é referido por de Llanos et al. (2006), para além das estirpes Clínicas, as estirpes de origens não-clínica também possuem a capacidade de produzir pseudo-hifas. Segundo estes autores, apenas uma pequena percentagem de estirpes não clínicas conseguem produzir pseudo-hifas, o que não se observou neste estudo. Os resultados obtidos são semelhantes aos de Anoop et al., 2015, que demonstrou, em condições laboratoriais idênticas a esta análise, que a capacidade de produzir pseudo-hifas, não é uma característica exclusiva de estirpes Clínicas, mas sim uma característica da espécie. Contudo, nesta análise adiciona-se a evidência que o grupo das estirpes Clínicas diferencia-se na produção de pseudo-hifas longas num curto período de tempo.

3.4.3 Ensaio de resistência ao Sulfato de Cobre

Cada estirpe foi classificada de acordo com a concentração máxima de sulfato de cobre (CuSO_4) à qual sobreviveu, usando um protocolo experimental adaptado de Fay et al. (2004).

A resistência à presença de elevadas concentrações de sulfato de cobre é uma característica fenotípica adjuvante da virulência em *S. cerevisiae*. Por um lado, o cobre é essencial nos sistemas biológicos, por outro, um aumento excessivo da sua concentração é tóxico para as células de leveduras. Como já referido anteriormente, o cobre é utilizado pelos macrófagos para tornar o fagossoma mais hostil e simultaneamente participa em reações redox que originam ROS. Deste modo, leveduras com mecanismos que lhes permitam sobreviver na presença de elevadas concentrações de cobre, estão mais bem adaptadas à sobrevivência dentro do hospedeiro humano em ocasiões de infeção. Para investigar a resistência das estirpes Clínicas e das populações definidas a este composto, as culturas foram crescidas em meio rico e expostas posteriormente a concentrações crescentes de sulfato de cobre em meio sólido. A Figura 18 representa a concentração máxima que cada estirpe tolerou após três dias de incubação.

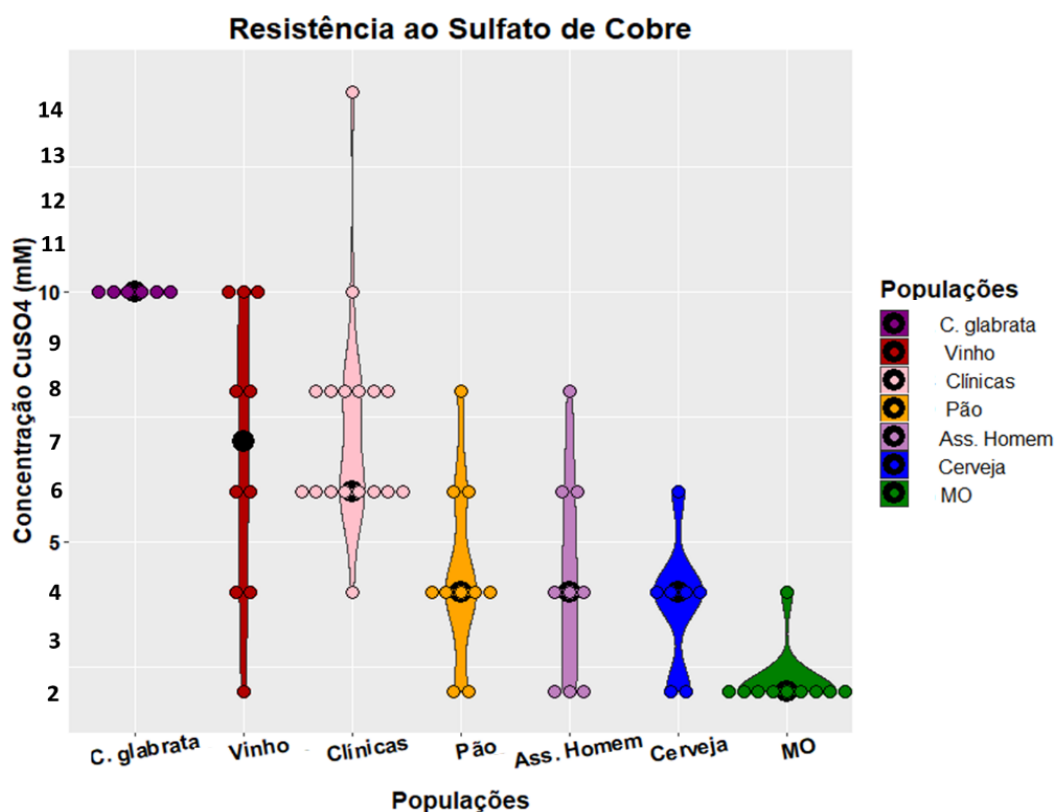


Figura 18. Gráficos violino da resistência em mM ao sulfato de cobre nas estirpes dos diferentes grupos e populações após três dias de incubação. Cada círculo colorido representa uma estirpe e o círculo negro corresponde à mediana da respectiva população. As populações estão dispostas na ordem decrescente da sua resistência.

As estirpes da espécie *C. glabrata* são as mais resistentes, tolerando 10 mM de CuSO₄, não existindo variabilidade de resistência ao sulfato de cobre dentro das estirpes do grupo. Pelo contrário, a população do Vinho, apesar de ser a mais resistente, dentro da espécie *S. cerevisiae*, com uma mediana de aproximadamente 7 mM, é muito variável entre as diferentes estirpes, possuindo estirpes com resistência de 2 mM e outras tolerando 10 mM. As estirpes da categoria Clínicas possuem a estirpe mais resistente do estudo, tolerando 14 mM de sulfato de cobre e o grupo tem uma mediana elevada de 6mM. As populações do Pão e da categoria Associadas ao Homem possuem ambas uma resistência média. Sendo a população da Cerveja e dos MO as mais sensíveis à presença deste metal.

Estes resultados sugerem que as estirpes da categoria Clínicas se aproximam bastante da população domesticada do Vinho, mesmo tendo em conta a variabilidade de resultados das diferentes estirpes, dentro da população. É de notar que a população do Vinho é a mais resistente, o que seria expectável tendo em conta que o sulfato de cobre é utilizado como um suplemento antifúngico nas vinhas. Assim, esta população de leveduras que se encontra sob este tipo de *stress* no seu nicho ambiental, adquiriu mecanismos de defesa

genotípicos e fenotípicos de modo a garantir a sua sobrevivência. No grupo das estirpes Associadas ao Homem, verificamos que o seu padrão é semelhante ao da população do Pão, indicando que se aproximam mais da população do Pão do que das restantes.



Figura 19. Gráficos violino da resistência ao sulfato de cobre em mM das estirpes do grupo Associadas ao Homem (A) subdivididas em população da Guiana Francesa e Vinho, e Clínicas (B) subdivididas em grupo mosaico, Pão e Vinho, após três dias de incubação.

Nas estirpes da categoria Associadas ao Homem, que se sub-dividem na população da Guiana Francesa e na população do Vinho, verificamos que as pertencentes à população do Vinho são as mais resistentes ao sulfato de cobre (Figura 19A), com uma mediana elevada de 6 mM. O que está de acordo com os resultados obtidos no estudo reportado na Figura 18, no qual a população do Vinho corresponde à mais resistente dentro de *S. cerevisiae*.

Nas estirpes da categoria Clínicas, que se sub-dividem na população do Pão, população do Vinho e estirpes mosaico, observamos que as estirpes mosaico são as mais resistentes ao sulfato de cobre (Figura 19B). A estirpe mais resistente deste estudo é um mosaico da categoria Clínicas.

Estes resultados evidenciam que dentro da categoria das estirpes Clínicas, as estirpes mosaico para além de serem as mais bem adaptadas a elevadas temperaturas, são as que possuem uma maior resistência ao sulfato de cobre.

Assim, este ensaio permitiu verificar que a população do Vinho é a mais resistente ao sulfato de cobre e que as estirpes da categoria Clínicas se aproximam do grupo do Vinho. Por outro lado, verificou-se que, entre as estirpes da categoria Clínicas, as estirpes mosaico são as mais resistentes. Strobe et al. (2015) verificou uma associação entre o fenótipo de elevada resistência ao cobre e as estirpes da categoria Clínicas, comparativamente com estirpes de populações conhecidas. Os resultados obtidos nesta análise estão de acordo com o estudo de Strobe et. al (2015), na medida em que as estirpes da categoria Clínicas possuem uma elevada resistência ao sulfato de cobre, relativamente às populações conhecidas. Por conseguinte, as estirpes mosaico da categoria Clínicas e as estirpes da população do Vinho são as mais resistentes ao sulfato de cobre.

3.4.4 Tolerância ao *stress* oxidativo

3.4.4.1 Ensaio de viabilidade

O *stress* oxidativo corresponde à produção de ROS nos sistemas biológicos em quantidades superiores às que os mecanismos antioxidantes conseguem eliminar. A acumulação de ROS é prejudicial às células, impedindo-as de se multiplicar ou desencadeando morte celular. Um dos diversos métodos utilizados pelos macrófagos, tendo em vista a eliminação dos microrganismos invasores, consiste na formação de ROS em elevadas concentrações dentro dos fagossomas. Diversos microrganismos oportunistas desenvolveram estratégias para tolerar a presença destes radicais livres, de modo a sobreviver durante longos períodos de tempo dentro do corpo humano, potenciando o aparecimento de infeções.

Na literatura estão descritas diversas concentrações para testar a tolerância ao *stress* oxidativo na espécie *S. cerevisiae*. As concentrações de Spencer et. al (2014), inferiores a 0,5mM, são as mais frequentemente encontradas na literatura. Deste modo, esta concentração foi testada, contudo não foi possível fazer comparações de viabilidade, dado que todas as estirpes sobreviveram quase na sua totalidade. Por conseguinte, foram efetuados ensaios com concentrações gradualmente mais altas, tendo sido escolhidas as concentrações de 1,5 mM e 2mM de H₂O₂, que estão de acordo com as utilizadas por Miyazaki, Nevo, & Grishkan (2003). Assim, neste ensaio, as células de levedura Clínicas e não clínicas foram expostas à presença de H₂O₂ em duas concentrações - 1,5 mM e 2 mM - para testar a sua viabilidade celular após exposição ao *stress*.

Na Figura 20A, observamos que a estirpe S288c, que corresponde à estirpe de referência laboratorial, é mais sensível à presença de ROS comparativamente com as restantes, tendo uma viabilidade de aproximadamente 20%. Pelo contrário, todas as estirpes de *C. glabrata* parecem estar muito bem adaptadas à presença de ROS,

sendo que em alguns casos parece existir uma estimulação do crescimento celular na presença deste agente tóxico. Nas estirpes dos restantes grupos/populações podemos observar que a viabilidade celular varia na sua maioria entre os 40% e 80%. Considerando como uma viabilidade baixa <50%, média entre os 50% e 65% e elevada > 65%. Verificamos que nas populações do Vinho, MO e grupo de estirpes Associadas ao Homem existem representantes das três classes (viabilidade baixa, média e elevada).

Analisando as estirpes Clínicas, verificamos que todas apresentaram uma viabilidade média ou elevada. É necessário destacar que, com exceção da população do Pão, observou-se variabilidade entre as diferentes réplicas de cada estirpe. Esta variabilidade pode ser explicada pelo fato do reagente utilizado, H_2O_2 , ser bastante reativo, principalmente quando diluído.

Pelo fato das estirpes da população do Vinho estarem, no seu nicho ambiental, em contacto com o sulfato de cobre, que origina ROS, estas estirpes podem possuir mecanismos de defesa mais eficazes perante a presença de *stress* oxidativo. No entanto, esta hipótese não se verificou. Apesar de existirem estirpes do Vinho com tolerâncias mais elevadas aos ROS não podemos evidenciar uma associação entre esta característica fenotípica e a resistência ao sulfato de cobre. Em relação às estirpes Clínicas, de fato, existem estirpes com tolerâncias muito elevadas acima dos 70%, sendo a estirpe de *S. cerevisiae* mais tolerante deste estudo, incluída neste grupo, com 88% de viabilidade.

Após a análise estatística ANOVA verificou-se que não existem diferenças significativas entre as estirpes Clínicas e as restantes populações, assim como não existem diferenças entre as populações, Figura 20B. São apenas estatisticamente significativas as diferenças entre a estirpe de referência e os restantes grupos, assim como as diferenças entre as estirpes de *C. glabrata* e a população do Pão, grupo de estirpes Clínicas e grupo de estirpes Associadas ao Homem, Figura 20B.

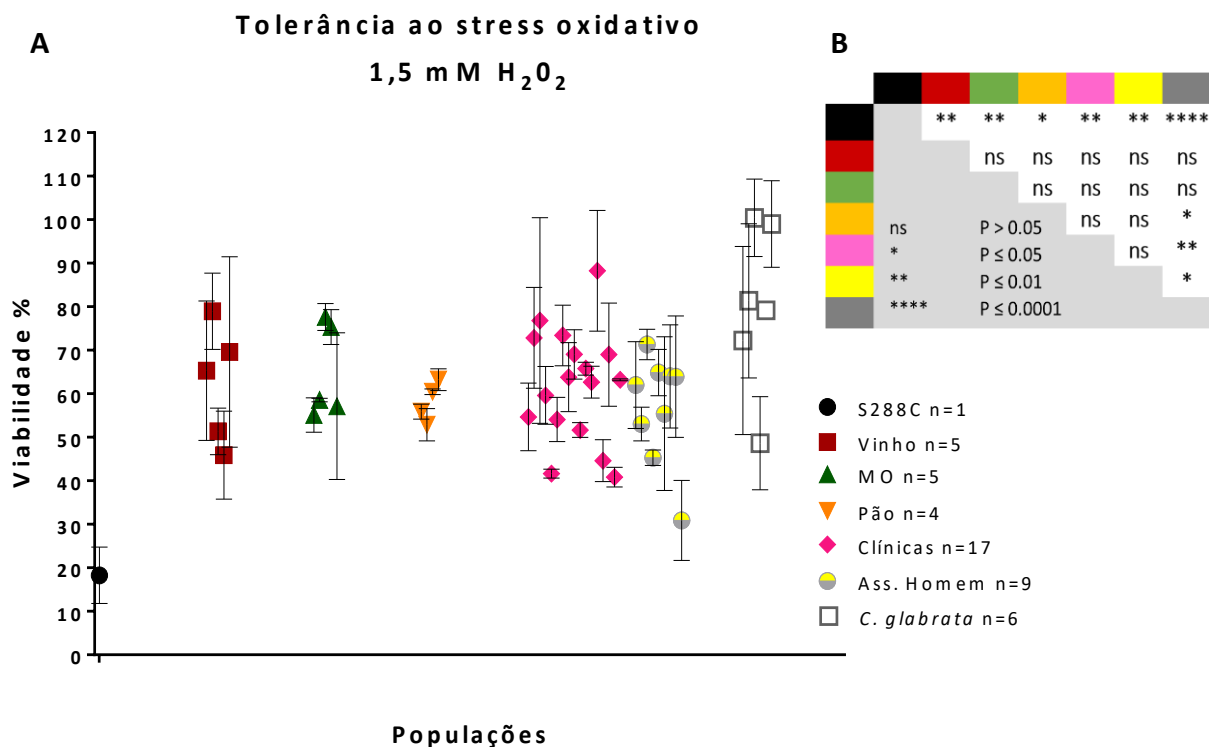


Figura 20. A: Ensaio de viabilidade de tolerância ao *stress* oxidativo com 1,5 mM de H₂O₂. Cada símbolo colorido representa um grupo/população, o círculo preto corresponde à estirpe de referência laboratorial S288c. B: Análise estatística one-way Anova Comparações múltiplas com correção Bonferroni, P ≤ 0.0001, IC de 95%

Pela inexistência de evidência estatística significativa (p>0,05) ao testar a concentração de 1,5 mM de H₂O₂, foi de seguida testada uma concentração superior de 2 mM de H₂O₂ (Figura 21A) para verificar a possível existência de populações tolerantes ao stress oxidativo, ou seja que mantivessem a mesma viabilidade com o aumento da concentração, comparativamente com outras populações que diminuiriam a sua viabilidade. Esta hipótese não se verificou, visto que todas as populações baixaram a sua viabilidade proporcionalmente com o aumento da concentração de H₂O₂. Verificou-se ainda, que o aumento da concentração parece ter estimulado mais o crescimento das estirpes de *C. glabrata*, apoiando os resultados observados na concentração anterior de 1,5 mM.

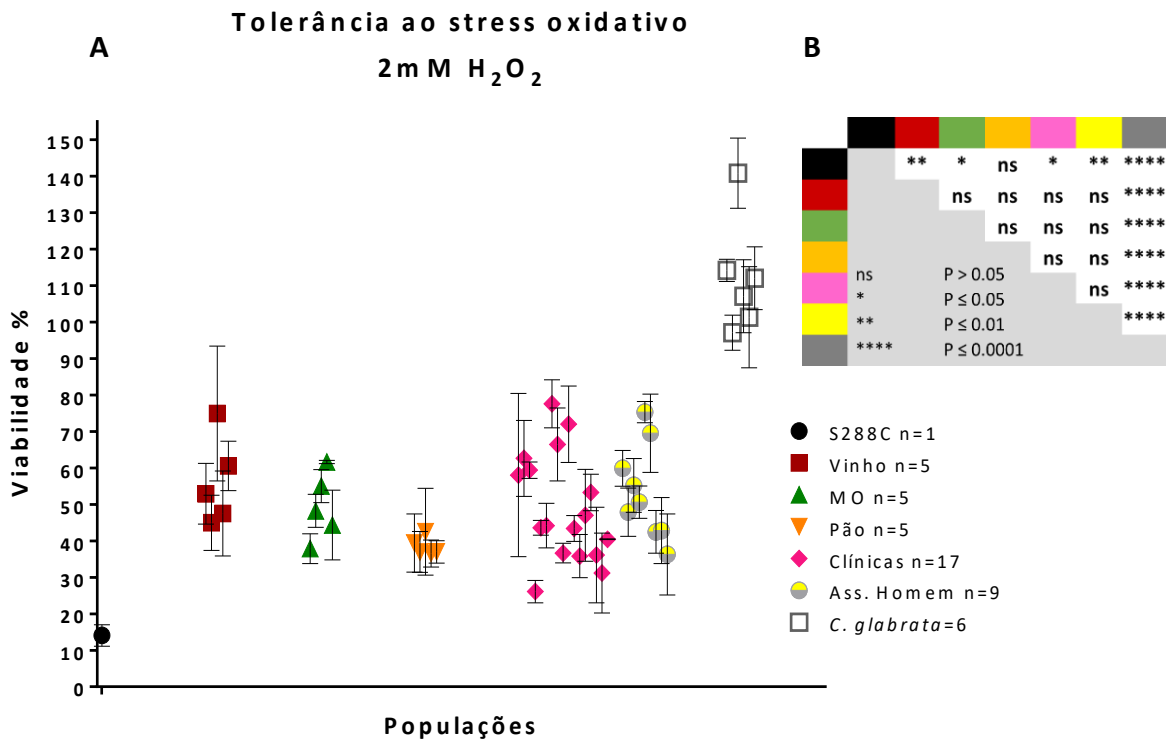


Figura 21. A: Ensaio de viabilidade de tolerância ao *stress* oxidativo com 2 mM de H₂O₂. Cada símbolo colorido representam um grupo/população, círculo preto corresponde à estirpe de referência laboratorial S288c. B: Análise estatística one-way Anova Comparações múltiplas com correção Bonferroni, P ≤ 0.0001, IC de 95%

Este ensaio de viabilidade de *stress* oxidativo não demonstrou a tendência para as estirpes Clínicas serem mais tolerantes à presença de ROS, relativamente com estirpes de outras populações, ao contrário do que está descrito na literatura por Diezmann & Dietrich (2009). No entanto, podemos inferir que a capacidade de sobreviver com viabilidades médias e elevadas é uma característica da espécie e não de um grupo ou população. Deste modo, a espécie, está mais bem adaptada a transitar dos seus nichos ambientais para o corpo humano, tornando-se comensal, podendo causar infeções oportunistas.

3.4.4.1 Presença de ROS intracelulares

As estirpes utilizadas neste ensaio foram selecionadas tendo em conta os resultados obtidos no ensaio de viabilidade anterior. Foram selecionadas três estirpes com viabilidade baixa <40 % (S288c, CBS 2919, PYCC 4893), duas estirpes com uma viabilidade média de 50% a 62% (Lalvin W15, PYRR 4b), três estirpes de viabilidade elevada > 74% (PYCC 3509, Uvaferm VRB, HE004) e duas estirpes de *C. glabrata* (YPO 610, YPO 467).

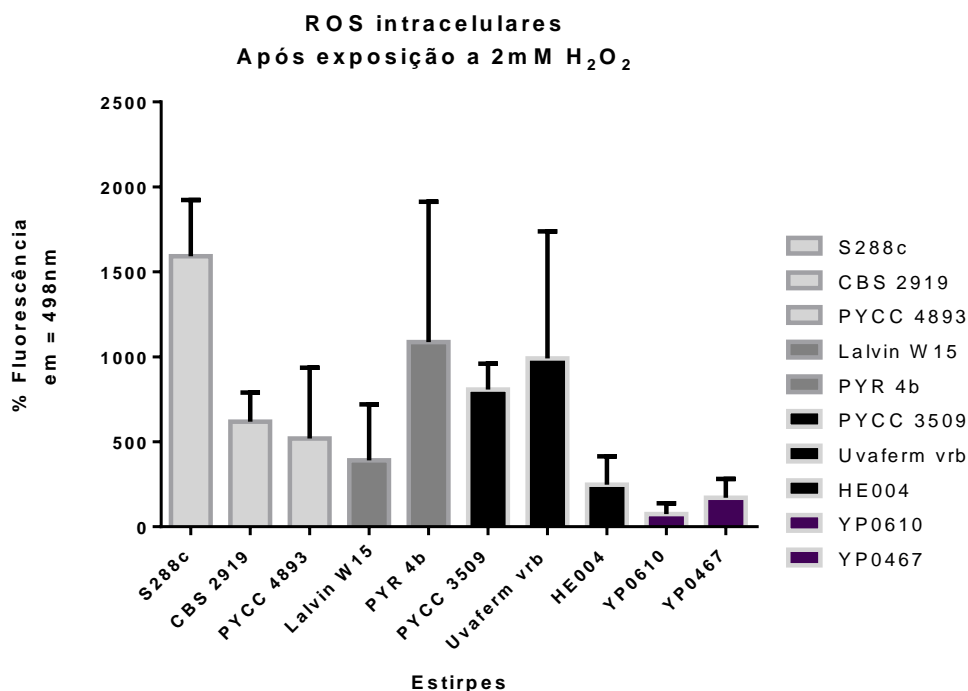


Figura 22. Presença de ROS intracelulares após exposição a 2 mM de H₂O₂ em estirpes de baixa viabilidade – cinzento claro (S288c, CBS 2919, PYCC 4893), viabilidade média - cinzento (Lalvin W15, PYR 4b), viabilidade alta – preto (PYCC 3509, Uvaferm vrb, HE004) e *C. glabrata* – roxo (YPO610, YPO 467). A fluorescência emitida está em unidades arbitrárias e é proporcional à quantidade de ROS intracelulares.

A concentração selecionada para expor as células foi de 2mM de H₂O₂ dado que nesta concentração a diferença de viabilidades entre as estirpes mais sensíveis e mais tolerantes é mais acentuada do que com 1,5 mM de H₂O₂.

Colocou-se a hipótese de que as estirpes mais sensíveis, por possuírem uma viabilidade baixa, não conseguiriam eliminar os ROS do meio intracelular de uma forma eficaz. Deste modo, deveriam emitir elevados níveis de fluorescência, correspondentes a uma elevada quantidade de ROS intracelulares. Por outro lado, estirpes com elevada viabilidade deveriam emitir um sinal baixo de fluorescência pelo fato de

possuírem mecanismos eficazes para a eliminação dos ROS e desta forma sobreviver perante este fator de *stress*.

Contudo, como observamos na Figura 22, ao testar estirpes com viabilidade baixa ao *stress* oxidativo (sensíveis) assim como de viabilidade média e elevada, demonstrou-se que esta hipótese não tem validade, por existirem estirpes sensíveis com menos ROS intracelulares, CBS 2919 e PYCC 4893, comparativamente com estirpes tolerantes como a PYCC 3509.

Os resultados observados neste ensaio estão de acordo com os resultados obtidos no ensaio de viabilidade celular, na medida em que as estirpes da categoria Clínicas não possuem uma maior tolerância aos ROS, nem mecanismos mais eficazes de eliminação dos ROS intracelulares. Este resultado poderá ser explicado pelo fato dos mecanismos ativados perante situações de *stress* oxidativo, serem diversos genotípica e fenotipicamente. Dependendo do mecanismo ativado, deverá variar a quantidade de ROS intracelulares.

4.Considerações Finais

Atualmente existem diversos estudos que descrevem os mecanismos de ação e os fatores de virulência de fungos que causam infecção em humanos, como espécies do género *Candida*, *Aspergillus* ou *Cryptococcus*. Contudo, existem poucos estudos que incluam uma perspectiva clínica e evolutiva no que diz respeito a infecções oportunistas provocadas pela espécie *S. cerevisiae*.

Assim, esta dissertação teve como objetivo aumentar o conhecimento sobre infecções oportunistas causadas por *S. cerevisiae*, explorando a sua estrutura populacional assim como a investigação dos mecanismos de virulência a nível do fenótipo.

Através das análises populacional e filogenética podemos concluir que as estirpes Clínicas se agrupam apenas em populações domesticadas já conhecidas, ou correspondem a estirpes mosaico, que resultam da recombinação entre populações domesticadas. Salienta-se que nenhuma estirpe Clínica cujo genoma tenha sido sequenciado se agrupa em populações selvagens.

No entanto, as estirpes Clínicas apenas se agrupam nas populações domesticadas do Vinho e do Pão. Sugerindo que estas duas populações possuem características favoráveis à ocorrência de patogenicidade oportunista. Deste modo, fatores como o fenótipo de resistência ao sulfato de cobre na população do Vinho ou o melhor desenvolvimento de pseudo-hifas na população do Pão, sugerem que a pressão seletiva efetuada pelos ambientes criados pelo Homem originou traços de domesticação, que conferem uma adaptação evolutiva na transição do comensalismo inócuo à ocorrência da patogenicidade oportunista. Assim, estirpes das populações do Vinho e Pão possuem uma maior probabilidade de causar infecções oportunistas relativamente a estirpes de outras populações da espécie *S. cerevisiae*, nomeadamente estirpes selvagens.

Na sua generalidade, as estirpes da categoria Clínicas parecem estar mais bem adaptadas relativamente às estirpes das populações conhecidas na ocorrência da patogenicidade, pela sua tolerância a elevadas temperaturas (77% possuem crescimento forte a 40°C), pela produção de pseudo-hifas longas (80%) num curto período de tempo e pela elevada resistência ao sulfato de cobre.

Por outro lado, cerca e 47% das estirpes da categoria Clínicas são estirpes mosaico, o que sugere que a recombinação entre populações é benéfica na transição para a patogenicidade. As estirpes mosaico abrangidas neste estudo resultam, na sua maioria, da recombinação entre as populações do Saquê, Vinho e Pão, correspondendo todas estas a populações domesticadas. Com estes resultados podemos concluir que a recombinação originou estirpes que adquiriram traços de domesticação das diferentes populações, facultando uma vantagem adaptativa na transição para agentes causadores de infecções oportunistas.

A nível do fenótipo, as estirpes mosaico destacam-se dentro do grupo das estirpes Clínicas pela maior tolerância a elevadas temperaturas e resistência ao sulfato de cobre.

A ingestão contínua de suplementos probióticos, nos quais o número de células viáveis ingeridas diariamente é de aproximadamente 10^7 - 10^8 células, está associada à ocorrência de infeções especialmente em indivíduos imunocomprometidos (Hernández-Haro et al., 2015). Deste modo, a prescrição destes suplementos neste grupo de indivíduos deve ser feita com precaução (Arendrup et al., 2014).

Concluindo, as estirpes Clínicas pertencem na sua totalidade a populações domesticadas. Os traços de domesticação fornecem uma vantagem adaptativa comparativamente com estirpes de populações selvagens na colonização e infeção de Humanos. As populações de *S. cerevisiae* que parecem estar mais adaptadas à transição para a patogenicidade oportunista são as das populações do Vinho e do Pão. No entanto, as estirpes mais virulentas, ou seja, as que possuem diversos fatores em simultâneo que as tornam mais aptas a causar infeções, são as estirpes mosaico da categoria Clínicas. Estas últimas são as mais tolerantes a elevadas temperaturas, produzem pseudo-hifas longas num curto período de tempo e resistem a elevadas concentrações de sulfato de cobre. Estes resultados sugerem que a recombinação entre indivíduos de certas populações é benéfica para a emergência da patogenicidade. Por conseguinte, a domesticação de estirpes da espécie *S. cerevisiae*, devido à sua adaptação a nichos sujeitos a condições extremas, mais facilmente transitam para a colonização do corpo humano, contribuindo para a ocorrência desta espécie como um microrganismo patogénico oportunista.

5. Perspectivas Futuras

Para prosseguir este trabalho seria importante realizar estudos de associação entre características fenotípicas e genotípicas. Por exemplo, através da investigação do número de cópias do gene como o CUP1 (associado à resistência ao sulfato de cobre), assim como do gene FLO11 (envolvido na produção de pseudo-hifas), ou da investigação do gene IMD3 (importante na reparação do DNA, sendo essencial na defesa à presença de ROS). Por outro lado, seria relevante investigar quais as concentrações mínimas inibitórias a antifúngicos, pelo fato de ainda não existirem dados exatos a cerca das dosagens no tratamento de infecções pela espécie *S. cerevisiae*.

O estudo da interação entre *S. cerevisiae* e o hospedeiro é um tema de investigação pertinente. A nível global, é necessário desenvolver técnicas de diagnóstico mais rápidas e eficazes na deteção desta levedura, em casos de infeção. Por exemplo através da deteção de proteínas específicas que provoquem imunidade como sugerido por Hernández-Haro et al. (2015). A capacidade de testar com precisão a virulência de estirpes de *S. cerevisiae*, permitiria prevenir a exposição de grupos de risco a estirpes mais virulentas, melhorar o diagnóstico e os tratamentos (Anoop et al., 2015).

6.Referências Bibliográficas

- Adamo, G. M., Brocca, S., Passolunghi, S., Salvato, B., & Lotti, M.** (2012). Laboratory evolution of copper tolerant yeast strains. *Microbial Cell Factories*, *11*(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-1>
- Ahmad, K. M., Kokošar, J., Guo, X., Gu, Z., Ishchuk, O. P., & Piškur, J.** (2014). Genome structure and dynamics of the yeast pathogen *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Research*, *14*(4), 529–535. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12145>
- Anoop, V., Rotaru, S., Shwed, P. S., Tayabali, A. F., & Arvanitakis, G.** (2015). Review of current methods for characterizing virulence and pathogenicity potential of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains towards humans. *FEMS Yeast Research*, *15*(6), 1–12. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov057>
- Appel-da-silva, M. C., Narvaez, G. A., Perez, L. R. R., Drehmer, L., & Lewgoy, J.** (2017). Medical Mycology Case Reports *Saccharomyces cerevisiae* var . *boulardii* fungemia following probiotic treatment. *Medical Mycology Case Reports*, *18*(July), 15–17. <https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2017.07.007>
- Arendrup, M. C., Boekhout, T., Akova, M., Meis, J. F., Cornely, O. A., Lortholary, O., Arıkan-Akdagli, Sevtap Cuenca-Estrella, Manuel, Dannaoui, Eric, van Diepeningen, Anne D., Groll, Andreas H., Guarro, Josep, Guinea, Jesús, Hope, William, Lackner, Michaela, Lass-Flörl, Cornelia, Lagrou, Katrien, Lanternier, Fanny, Meletiadis, Joseph, Munoz, Patricia, Pagano, Livio, Richardson, Malcolm D., Roilides, Emmanuel, Tortorano, Anna Maria, Ullmann, Andrew J.**(2014). ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. *Clinical Microbiology and Infection*, *20*(S3), 76–98. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12360>
- Atıcia, S., Soysala, A., Ceritb, K. K., Yılmazc, Ş., Aksuc, B., Kıyanb, G., & Bakır, M.** (2017). Catheter-related *Saccharomyces cerevisiae* Fungemia Following *Saccharomyces boulardii* Probiotic Treatment: In a child in intensive care unit and review of the literature review of the literature. *Medical Mycology Case Reports Journal*, *15*(February), 33–35. <https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2017.02.002>
- Bassetti, S., & Frei, R.** (1998). Fungemia with *Saccharomyces cerevisiae* after Treatment with *Saccharomyces boulardii*. *THE AMERICAN JOURNAL OF MEDICINE*, *105*.
- Binder, B. J., Sundstrom, J. F., Gardner, J. M., Jiranek, V., Oliver, S. G.**(2015). Quantifying Two-Dimensional Filamentous and Invasive Growth Spatial Patterns in Yeast Colonies. *PLoS ONE*, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004070>
- Blevins, W. R., Carey, L. B., & Albà, M. M.** (2019). Transcriptomics data of 11 species of yeast identically grown in rich media and oxidative stress conditions. *BMC Research Notes*, *12*(1), 10–13. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4286-0>

- Cavaliere, D., McGovern, P. E., Hartl, D. L., Mortimer, R., & Polsinelli, M.** (2003). Evidence for *S. cerevisiae* Fermentation in Ancient Wine. *Journal of Molecular Evolution*, 226–232. <https://doi.org/10.1007/s00239-003-0031-2>
- Cesaro, S., Chinello, P., Rossi, L., & Zanesco, L.** (2000). *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in a neutropenic patient treated with *Saccharomyces boulardii*. *Supportive Care in Cancer*, 8(6), 504–505. <https://doi.org/10.1007/s005209900123>
- de Llanos, R., Fernández-Espinar, M. T., & Querol, A.** (2006). A comparison of clinical and food *Saccharomyces cerevisiae* isolates on the basis of potential virulence factors. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 90(3), 221–231. <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9077-7>
- de Llanos, R., Querol, A., Planes, A. M., & Fernández-Espinar, M. T.** (2004). Molecular characterization of clinical *Saccharomyces cerevisiae* isolates and their association with non-clinical strains. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(4), 427–435. <https://doi.org/10.1078/0723202041438473>
- Diezmann, S., & Dietrich, F. S.** (2009). *Saccharomyces cerevisiae* : Population Divergence and Resistance to Oxidative Stress in Clinical , Domesticated and Wild Isolates. *PLoS ONE*, 4(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005317>
- Dubin, G., Chernak, E., Friedman, H. M., & McFarland, L. V.** (1996). *Saccharomyces boulardii* Is Not *Saccharomyces cerevisiae*. *Clinical Infectious Diseases*, 22, 200–201.
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, Montigny, Jacky De, Blanchin, Sylvie, Beckerich, Jean-marie, Beyne, Emmanuelle, Bleykasten, Claudine, Babour, Anna, Boyer, Jeanne, Cattolico, Laurence, Confanioleri, Fabrice, Daruvar, Antoine De, Despons, Laurence, Fabre, Emmanuelle** (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature*, 430, 35–44.
- Elkhihal, B., Elhalimi, M., Ghfir, B., Mostachi, A., Lyagoubi, M., & Aoufi, S.** (2015). Infection urinaire à *Saccharomyces cerevisiae*: Levure émergente? *Journal de Mycologie Médicale*, 25(4), 303–305. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2015.09.004>
- Enache-Angoulvant, A., & Hennequin, C.** (2005). Invasive *Saccharomyces* Infection: A Comprehensive Review. *Clinical Infectious Diseases*, 41(11), 1559–1568. <https://doi.org/10.1086/497832>
- Erganis, S., Dizbay, M., Kalkanci, A., & Aydog, M.** (2017). *Saccharomyces cerevisiae* fungemia after probiotic treatment in an intensive care unit patient. *Journal de Mycologie Médicale*, 218–221. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.09.003>
- FAO, & WHO** (2002). *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food: Report of a Joint FAO/WHO Working Group.* London Ontario, April 30 and May 1.

- Fay, J. C., McCullough, H. L., Sniegowski, P. D., & Eisen, M. B.** (2004). Population genetic variation in gene expression is associated with phenotypic variation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biology*, 5(4), 1–14.
- Festa, R. A., & Thiele, D. J.** (2012). Copper at the Front Line of the Host-Pathogen Battle. *PLoS Pathogens*, 8(9), 9–12. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002887>
- Fracp, P. K. M., Mbchb, F. M. D., Mrcp, K. N. T. M., & Frcpa, J. W. T.** (1999). *Saccharomyces cerevisiae* oesophagitis in an HIV-infected patient. *International Journal of STD & AIDS*, 821–822.
- Fuller, R.** (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66(365–378), 365–378.
- Gabaldón, T., Naranjo-Ortíz, M. A., & Marcet-Houben, M.** (2016). Evolutionary genomics of yeast pathogens in the Saccharomycotina. *FEMS Yeast Research*, 16(6), 1–10. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow064>
- Gallone, B., Steensels, J., Prah, T., Soriaga, L., Saels, V., Herrera-Malaver, B., Merlevede, Adriaan, Roncoroni, Miguel, Voordeckers, Karin, Miraglia, Loren, Teiling, Clotilde, Steffy, Brian, Taylor, Maryann, Schwartz, Ariel, Richardson, Toby, White, Christopher, Baele, Guy, Maere, Steven, Verstrepen, Kevin J.** (2016). Domestication and Divergence of *Saccharomyces cerevisiae* Beer Yeasts. *Cell*, 166(6), 1397–1410.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.020>
- Ghorbani-choboghlo, H., Nikaein, D., Khosravi, A., Rahmani, R., & Farahnejad, Z.** (2019). Effect of microencapsulation on *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* viability in the gastrointestinal tract and level of some blood biochemical factors in wistar rats. *IRAN. J. MICROBIOL*, 11(2), 160–165.
- Gibbons, J. G., & Rinker, D. C.** (2016). The Genomics of Microbial Domestication in the Fermented Food Environment. *Curr Opin Genet Dev*, 2015, 33(8), 839–841. <https://doi.org/10.1038/nbt.3301.Mammalian>
- Gimeno, C. J., Ljungdahl, P., Styles, C. A., & Fink, G. R.** (1992). Unipolar Cell Divisions in the Yeast *S. cerevisiae* Lead to Filamentous Growth : Regulation by Starvation and RAS. *Cell*, 66, 1077–1090.
- Glenn M., C., Marcantonio, E. R., & G. Wells, R.** (1991) *Saccharomyces cerevisiae* Empyema in a Patient with Esophago-Pleural Fistula Complicating Variceal Sclerotherapy, 99 CHEST 1518–1519. The American College of Chest Physicians. <https://doi.org/10.1378/chest.99.6.1518>
- Henker, R., & Carlson, K. K.** (2007). Ferver: Applying research to bedside practice. *AACN Advanced Critical Care*, 18(1), 32–44.
- Hernández-Haro, C., Llopis, S., Molina, M., Monteoliva, L., & Gil, C.** (2015). Immunoproteomic profiling of *Saccharomyces cerevisiae* systemic infection in a murine model. *Journal of Proteomics*, 112, 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.08.008>
- Hittinger, C. T.** (2013). *Saccharomyces* diversity and evolution: A budding model genus. *Trends in Genetics*, 29(5), 309–317. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.01.002>

- Ho, H. L., & Haynes, K.** (2015). *Candida glabrata*: New tools and technologies-expanding the toolkit. *FEMS Yeast Research*, 15(6), 1–14. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov066>
- Hoang, D. T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B. Q., & Vinh, L. S.** (2018). UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. *Molecular Biology and Evolution*, 35(2), 518–522. <https://doi.org/10.5281/zenodo.854445>
- Hohmann, S.** (2003). *Yeast Stress Response*. S. Hohmann & W. H. Mager, Eds., *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 1). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Karki, R., Pandya, D., Elston, R. C., & Ferlini, C.** (2015). Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. *BMC Medical Genomics*, 8(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12920-015-0115-z>
- Karlsson, M., Kurz, T., Brunk, U. T., Nilsson, S. E., & Frennesson, C. I.** (2010). What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show? *Biochemical Journal*, 428(2), 183–190. <https://doi.org/10.1042/BJ20100208>
- Kondrashov, F. A.** (2012). Gene duplication as a mechanism of genomic adaptation to a changing environment. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1749), 5048–5057. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.1108>
- Korneliusson, T. S., Albrechtsen, A., & Nielsen, R.** (2014). ANGSD: Analysis of Next Generation Sequencing Data. *BMC Bioinformatics*, 15(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12859-014-0356-4>
- Kühle, A. V. D. A., & Jespersen, L.** (2003). The Taxonomic Position of *Saccharomyces boulardii* as Evaluated by Sequence Analysis of the D1 / D2 Domain of 26S rDNA , the ITS1-5 . 8S rDNA-ITS2 Region and the Mitochondrial Cytochrome- c Oxidase II Gene. *System. Appl. Microbiol.*, 571, 564–571.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., & Boekhout, T.** (Eds.). (2011). Key to Species, Summary of Species Characteristics, Glossary of Terms Used in This Book, Index to Taxa by Genus and Species, References. In *The Yeasts: A Taxonomic Study* (5th ed., p. 262). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-52149-1.00165-8>
- Kwolek-Mirek, M., & Zadrag-Tecza, R.** (2014). Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS Yeast Research*, 14(7), 1068–1079. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12202>
- Landaburu, M., López, G. A., Relloso, S., Zarlenga, L., Vinante, M., & Mujica, T. M.** (2019). Fungemia following *Saccharomyces cerevisiae* var . *boulardii* probiotic treatment in an elderly patient. *Revista Argentina de Microbiología*, 10–13. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.04.002>
- Legras, J. L., Galeote, V., Bigey, F., Camarasa, C., Marsit, S., Nidelet, T., Sanchez, Isabelle, Couloux, Arnaud, Guy, Julie, Franco-Duarte, Ricardo, Marcet-Houben, Marina, Gabaldon, Toni, Schuller, Dorit, Sampaio, Jose Paulo, Dequin, Sylvie.** (2018). Adaptation of *S. cerevisiae* to fermented food environments reveals remarkable genome plasticity and the footprints of domestication. *Molecular Biology and Evolution*,

35(7), 1712–1727. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy066>

- Lenhart, B. A., Meeks, B., & Murphy, H. A.** (2019). Variation in filamentous growth and response to quorum-sensing compounds in environmental isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, *9*(5), 1533–1544. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400080>
- Letunic, I., & Bork, P.** (2019). Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Research*, *2*–5. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz239>
- Li, H., & Durbin, R.** (2009). Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, *26*(5), 589–595. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp698>
- Maleb, A., Sebbar, E., Frikh, M., Boubker, S., Moussaoui, A., Mekkaoui, A. El, Khannoussi, W, Kharrasse, G, Belefquih, B, Lemnouer, A, Ismaili, Z, Elouennass, M** (2017). Infection invasive à *Saccharomyces cerevisiae* : le premier cas rapporté au Maroc *Saccharomyces cerevisiae* invasive infection : The first reported case in Morocco. *Journal de Mycologie Médicale*, *1*–5. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.01.008>
- Marsit, S., Leducq, J. B., Durand, É., Marchant, A., Filteau, M., & Landry, C. R.** (2017). Evolutionary biology through the lens of budding yeast comparative genomics. *Nature Reviews Genetics*, *18*(10), 581–598. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.49>
- Marteau, P. R., Vrese, M. de, Cellier, C. J., & Schrezenmeir, J.** (2001). Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics 1–3. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *73*, 430–436.
- McCusker, J. H., Clemons, K. V., A., D. S., & Davis, and R. W.** (1994). Genetic Characterization of Pathogenic *Saccharomyces cerevisiae* Isolates John. *Genetics Society of America*.
- Miyazaki, S., Nevo, E., & Grishkan, I.** (2003). Oxidative Stress Responses in Yeast Strains , *Saccharomyces cerevisiae* , from “ Evolution Canyon ”, Israel. *Monatshefte Für Chemie / Chemical Monthly*, *1480*, 1465–1480. <https://doi.org/10.1007/s00706-003-0072-7>
- Morano, K. A., Grant, C. M., & Moye-rowley, W. S.** (2012). The Response to Heat Shock and Oxidative Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *CELL SIGNALING & DEVELOPMENT*, *190*(April), 1157–1195. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.128033>
- Morgan, B. A., Banks, G. R., Mark Toone, W., Raitt, D., Kuge, S., & Johnston, L. H.** (1997). The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal*, *16*(5), 1035–1044. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.5.1035>
- Muller, L. A. H., Lucas, J. E., Georgianna, D. R., & McCusker, J. H.** (2012). GENOME-WIDE ASSOCIATION ANALYSIS OF CLINICAL VERSUS NON-CLINICAL ORIGIN PROVIDES INSIGHTS INTO *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* PATHOGENESIS. *Mol Ecol*, *20*(19), 4085–4097. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05225.x>.GENOME-WIDE

- Munõz, P., Bouza, E., Cuenca-Estrella, M., Eiros, J. M., Pérez, M. J., Sánchez-Somolinos, M., Rincon, C. Hortal, J. Peláez, and T. (2005).** *Saccharomyces cerevisiae* Fungemia : An Emerging Infectious Disease. *Clinical Infectious Diseases*, (July). <https://doi.org/10.1086/429916>
- Nathan, C., & Shiloh, M. U. (2000).** Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16), 8841–8848. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.8841>
- Naumova, E. S., Korshunova, I. V., Jespersen, L., & Naumov, G. I. (2003).** Molecular genetic identification of *Saccharomyces sensu stricto* strains from African sorghum beer. *FEMS Yeast Research*, 3(2), 177–184. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(02\)00191-5](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(02)00191-5)
- Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., Von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015).** IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- OMS (2004).** *Terceira edição Manual de segurança biológica em laboratório Terceira edição*. Genebra.
- Perapoch, J., Planes, A. M., Querol, A., López, V., Tormo, R., Fernández, Salcedo, S.. Fungemia with *Saccharomyces cerevisiae* in Two Newborns , Only One of Whom Had Been Treated with Ultra-Levura. *Clin Microbiol Infect*, 468–470.
- Pérez-torrado, R., Llopis, S., Perrone, B., & Gómez-pastor, R. (2015).** Comparative Genomic Analysis Reveals a Critical Role of De Novo Nucleotide Biosynthesis for *Saccharomyces cerevisiae* Virulence. *PLOS ONE*, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122382>
- Pérez-Torrado, R., & Querol, A. (2016).** Opportunistic strains of *Saccharomyces cerevisiae*: A potential risk sold in food products. *Frontiers in Microbiology*, 6(JAN), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01522>
- Peter, J., De Chiara, M., Friedrich, A., Yue, J. X., Pflieger, D., Bergström, A., Sigwalt, Anastasie, Barre, Benjamin, Freel, Kelle, Llored, Agnès, Cruaud, Corinne, Labadie, Karine, Aury, Jean Marc, Istace, Benjamin, Lebrigand, Kevin, Barbry, Pascal, Engelen, Stefan, Lemainque, Arnaud, Wincker, Patrick, Liti, Gianni, Schacherer, Joseph (2018).** Genome evolution across 1,011 *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Nature*, 556(7701), 339–344. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0030-5>
- Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2007).** Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(1), 133–163. <https://doi.org/10.1128/CMR.00029-06>
- Phadke, S. S., Maclean, C. J., Zhao, S. Y., Mueller, E. A., Michelotti, L. A., Norman, K. L., Kumar, Anuj, James, T. Y. (2018).** Genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* genes contributing to opportunistic pathogenicity in an invertebrate model host. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8(1), 63–78. <https://doi.org/10.1534/g3.117.300245>

- Pontes, A., Čadež, N., Gonçalves, P., & Sampaio, J. P.** (2019). A Quasi-Domesticated Relic Hybrid Population of *Saccharomyces cerevisiae* × *S. Paradoxus* Adapted to Olive Brine. *Frontiers in Genetics*, *10*(MAY), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00449>
- Purugganan, M. D., & Fuller, D. Q.** (2009). The nature of selection during plant domestication. *Nature*, *457*(7231), 843–848. <https://doi.org/10.1038/nature07895>
- Roetzer, A., Gabaldón, T., & Schüller, C.** (2011). From *Saccharomyces cerevisiae* to *Candida glabrata* in a few easy steps: Important adaptations for an opportunistic pathogen. *FEMS Microbiology Letters*, *314*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02102.x>
- Salmon, T. B., Evert, B. A., Song, B., & Doetsch, P. W.** (2004). Biological consequences of oxidative stress-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, *32*(12), 3712–3723. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh696>
- Samanovic, M. I., Ding, C., Thiele, D. J., & Darwin, K. H.** (2012). Copper in microbial pathogenesis: Meddling with the metal. *Cell Host and Microbe*, *11*(2), 106–115. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.01.009>
- Sampaio, J. P., & Gonçalves, P.** (2017). Biogeography and Ecology of the Genus *Saccharomyces*. *Yeasts in Natural Ecosystems: Ecology*, 131–153. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-61575-2>
- Samuel, D.** (1996). Investigation of Ancient Egyptian Baking and Brewing Methods. *Science*, *273*(5274), 488–490. Retrieved from <https://www-jstor-org.ep.fjernadgang.kb.dk/stable/pdf/2890514.pdf?refreqid=excelsior%3A1edd7986865d682ef8458d7e15baa3a6>
- Santos, M. A. S., Gomes, A. C., Santos, M. C., Carreto, L. C., & Moura, G. R.** (2011). The genetic code of the fungal CTG clade. *Comptes Rendus - Biologies*, *334*(8–9), 607–611. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2011.05.008>
- Seng, P., Cerlier, A., Cassagne, C., & Coulange, M.** (2016). *Saccharomyces cerevisiae* osteomyelitis in an immunocompetent baker. *IDCases*, *5*, 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2016.05.002>
- Skotte, L., Korneliusen, T. S., & Albrechtsen, A.** (2013). Estimating individual admixture proportions from next generation sequencing data. *Genetics*, *195*(3), 693–702. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.154138>
- Skovgaard, N.** (2007). New trends in emerging pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, *120*(3), 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.046>
- Smith, D., Metzgar, D., Wills, C., & Fierer, J.** (2002). Fatal *Saccharomyces cerevisiae* Aortic Graft Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, *40*(7), 2691–2692. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.7.2691>
- Spencer, J., Phister, T. G., Smart, K. A., & Greetham, D.** (2014). Tolerance of pentose utilising yeast to hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *BMC Research Notes*, *7*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-151>

- Stafford, S. L., Bokil, N. J., Achard, M. E. S., Kapetanovic, R., Schembri, M. A., McEwan, A. G., & Sweet, M. J.** (2013). Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: emerging roles for zinc and copper. *Bioscience Reports*, 33(4), 541–554. <https://doi.org/10.1042/BSR20130014>
- Steinmetz, L. M., Sinha, H., & Richards, D. R.** (2002). Dissecting the architecture of a quantitative trait locus in yeast. *Nature*, 416(March).
- Strope, P. K., Skelly, D. A., Kozmin, S. G., Mahadevan, G., Stone, E. A., Magwene, P. M., Dietrich, Fred S. McCusker, J. H.** (2015). The 100-genomes strains, an *S. cerevisiae* resource that illuminates its natural phenotypic and genotypic variation and emergence as an opportunistic pathogen. *Genome Research*, 25(5), 762–774. <https://doi.org/10.1101/gr.185538.114>
- Tawfik, O. W., Papasian, C. J., & Potter, L. M.** (1989). *Saccharomyces cerevisiae* Pneumonia in a Patient with Acquired Immune Deficiency Syndrome. *Journal of CI*, 27(7), 1689–1691.
- Taylor, J. W., Bowman, B. H., Berbee, M. L., White, T. J., Biology, S., & Dec, N.** (1993). Fungal Model Organisms : Phylogenetics of *Saccharomyces* , *Aspergillus* , and *Neurospora*. *Systematic Biology*, 42(4), 440–457.
- van Leeuwen, J. S., Vredenburg, G., Dragovic, S., Tjong, T. F. J., Vos, J. C., & Vermeulen, N. P. E.** (2011). Metabolism related toxicity of diclofenac in yeast as model system. *Toxicology Letters*, 200(3), 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.11.010>
- Verity, R., & Nichols, R. A.** (2016). *Estimating the number of subpopulations (K) in structured populations*. *Genetics* (Vol. 203). <https://doi.org/10.1534/genetics.115.180992>
- Wei, W., McCusker, J. H., Hyman, R. W., Jones, T., Ning, Y., Cao, Z., Gu, Zhenglong, Bruno, Dan, Miranda, Molly, Nguyen, Michelle, Wilhelmy, Julie, Komp, Caridad, Tamse, Raquel, Wang, Xiaojing, Jia, Peilin, Luedi, Philippe, Oefner, Peter J, David, Lior, Dietrich, Fred S, Li, Yixue, Davis, Ronald W, Steinmetz, Lars M** (2007). Genome sequencing and comparative analysis of *Saccharomyces cerevisiae* strain YJM789. *PNAS*, 104(31), 12825–12830. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701291104>
- Wickerham, L. J.** (1957). APPARENT INCREASE IN FREQUENCY OF INFECTIONS INVOLVING TORULOPSIS GLABRATA PROCEDURE FOR ITS IDENTIFICATION. *Journal of the American Medical Association*, 165(1). <https://doi.org/10.1001/jama.1957.72980190007010b>
- Williams, J. S., Mufti, G. J., Powell, S., Salisbury, J. R., & Higgins, E. M.** (2007). *Saccharomyces cerevisiae* emboli in an immunocompromised patient with relapsed acute myeloid leukaemia. *Clinical and Experimental Dermatology*, 395–397. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2007.02375.x>
- Zhu, Y. O., Sherlock, G., & Petrov, D. A.** (2016). Whole Genome Analysis of 132 Clinical *Saccharomyces cerevisiae* Strains Reveals Extensive Ploidy Variation. *G3, Genes|Genomes|Genetics; Genes|Genomes|Genetics*, 6(8), 2421–2434. <https://doi.org/10.1534/g3.116.029397>

