

PRISCILLA DE LAET SANT'ANA MARIANO

***DIFERENTES PROCESSOS DE ARMAZENAMENTO
DE LEVEDURAS; ESTUDOS SOBRE A VARIABILIDADE
FENOTÍPICA E GENOTÍPICA***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de **Doutor** em Biologia Buco-Dental, Área de Microbiologia e Imunologia.

Piracicaba

2006

PRISCILLA DE LAET SANT'ANA MARIANO

Farmacêutica-bioquímica

***DIFERENTES PROCESSOS DE ARMAZENAMENTO
DE LEVEDURAS; ESTUDOS SOBRE A VARIABILIDADE
FENOTÍPICA E GENOTÍPICA***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de **Doutor** em Biologia Buco-Dental, Área de Microbiologia e Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. José Francisco Höfling

Banca examinadora:

Profa. Dra. Aline Aparecida Pizzirani Kleiner

Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior

Profa. Dra. Regina Célia Candido

Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo

Piracicaba

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

M337d	<p>Mariano, Priscilla de Laet Sant’Ana. Diferentes processos de armazenamento de leveduras; estudos sobre a variabilidade Fenotípica e Genotípica. / Priscilla de Laet Sant’Ana Mariano. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2006.</p> <p style="text-align: center;">Orientador: José Francisco Höfling. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p style="text-align: center;">1. Leveduras (Fungos). 2. Fenótipo. 3. Genótipo. 4. Criopreservação. I. Höfling, José Francisco. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">(mg/fop)</p>
-------	--

Título em inglês: Different procedures for yeast stock collection; Phenotype and Genotype diversity study

Palavras-chave em inglês (*Keywords*): 1. Yeast fungi. 2. Phenotype. 3. Genotype. 4. Cryopreservation

Área de concentração: Microbiologia e Imunologia

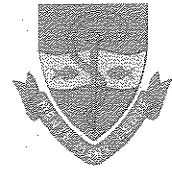
Titulação: Doutor e Biologia Buco-Dental

Banca examinadora: José Francisco Höfling, Aline Aparecida Pizzirani Kleiner, Jacks Jorge Júnior, Regina Célia Candido, Ricardo Antunes de Azevedo

Data da defesa: 17/02/2006



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 17 de Fevereiro de 2006, considerou a candidata PRISCILLA DE LAET SANT'ANA MARIANO aprovada.

PROF. DR. JOSE FRANCISCO HOFLING

PROF. DR. RICARDO ANTUNES DE AZEVEDO

PROF. DR. REGINA CÉLIA CANDIDO

PROF. DR. ALINE APARECIDA PIZZIRANI KLEINER

PROF. DR. JACKS JORGE JUNIOR

*Dedico este trabalho ao meu esposo
André, de quem recebi apoio e incentivo
durante esta etapa; pela abnegação,
companheirismo e, sobretudo, amor.*

AGRADECIMENTOS

A DEUS

O autor da vida

"... e a fidelidade do Senhor subsiste para sempre" Sl 117:2

AOS MEUS PAIS

Francisco e Neuza

Pelo amor incondicional e dedicação dispensada em toda a minha vida. Vocês me deram a base sólida, sobre a qual eu construo hoje, dia a dia, quem eu sou.

AOS MEUS IRMÃOS

Maria, João, Lídia, Euna, Rita de Cássia, Gorete, Elizabeth e Gentil Roberto.

Que sempre me incentivaram desde o início da minha caminhada em busca dos meus ideais.

Ao meu sogro José Pedro e minha sogra Vanice pelo interesse e incentivo que sempre demonstraram em relação ao meu trabalho.

Ao Prof. Dr. José Francisco Höfling, pela oportunidade concedida, pela orientação e apoio que sempre dispensou, imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Aos Profs. Drs. Reginaldo Bruno Gonçalves e Renata de Oliveira Mattos-Graner, pelos ensinamentos e apoio concedido em diversas ocasiões.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do Prof. Dr. Thales Rocha De Mattos Filho (Diretor), pelo acolhimento.

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Ferreira Caria, coordenador do curso de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental da FOP/Unicamp.

Aos Membros da banca examinadora, Profs. Drs. Aline Aparecida Pizzirani Kleiner, Jacks Jorge Júnior, Regina Célia Candido, Ricardo Antunes de Azevedo por aceitarem avaliar este trabalho, enriquecendo-o com conhecimento e experiência.

Aos colegas da Pós-Graduação Alessandra Castro Alves, Daniel Saito, Gustavo Alberto Obando Pereda, Iriana Carla Junqueira Zanin, Letizia Monteiro de Barros, Marlise Inêz Klein, Paula Cristina Anibal, Rafael Nobrega Stipp, Regianne Umeko Kamiya, Rita de Cássia Mardegan, Ruchele Dias Nogueira e Vivian Fernandes Furletti, com os quais compartilhei muitos momentos durante esta trajetória.

Aos funcionários do laboratório de Microbiologia e Imunologia da FOP, Wilma, Anderson e Flávia, pela colaboração que sempre prestaram com solicitude e disposição.

À Capes, pelo apoio financeiro instituído pela concessão da bolsa de doutoramento.

À Fapesp, pelo financiamento do projeto de pesquisa (processo n. 03/09539-1).

A todas as pessoas que participaram, contribuindo para a realização deste trabalho, direta ou indiretamente, meu agradecimento.

*“Tudo tem a sua ocasião própria, e há tempo para todo propósito debaixo do céu.
Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar, e tempo de arrancar o que
se plantou;
tempo de matar, e tempo de curar; tempo de derribar, e tempo de edificar;
tempo de chorar, e tempo de rir; tempo de prantear, e tempo de dançar;
tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar, e tempo de
abster-se de abraçar;
tempo de buscar, e tempo de perder; tempo de guardar, e tempo de deitar fora;
tempo de rasgar, e tempo de coser; tempo de estar calado, e tempo de falar;
tempo de amar, e tempo de odiar; tempo de guerra, e tempo de paz”.*

(Ec 3 1-8)

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS E TABELAS	1
LISTA DE FIGURAS	3
LISTA DE ABREVIATURAS	5
RESUMO	7
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 <i>A importância do armazenamento de leveduras em laboratório</i>	19
2.2 <i>Características morfológicas e bioquímicas das leveduras</i>	20
2.3 <i>Técnicas moleculares aplicadas a leveduras</i>	23
2.4 <i>Secreção de enzimas proteolíticas</i>	27
2.5 <i>Técnicas de manutenção e armazenamento de leveduras</i>	29
3 PROPOSIÇÃO	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 <i>Amostras</i>	43
4.2 <i>Métodos de manutenção de culturas</i>	43
4.3 <i>Reativação das amostras</i>	46
4.4 <i>Viabilidade celular com azul de metileno</i>	46
4.5 <i>Avaliação das amostras através de testes fenotípicos</i>	47
4.6 <i>Caracterização molecular por Randomly Amplified Polymorphic DNA - RAPD</i>	51
5 RESULTADOS	57
5.1 <i>Testes fenotípicos e extração de DNA para RAPD no tempo 'zero' de armazenamento</i>	59
5.2 <i>Reativação das cepas e análise da viabilidade celular</i>	61
5.3 <i>Testes fenotípicos para cada intervalo de tempo nos diferentes métodos de armazenamento</i>	62

5.4 <i>Perfil genotípico por RAPD</i>	70
6 DISCUSSÃO	75
7 CONCLUSÕES	99
REFERÊNCIAS	103
ANEXO 1	113
ANEXO 2	115
ANEXO 3	117
ANEXO 4	119

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1.	Relação de cepas padrão utilizadas no estudo.	43
Quadro 2.	Medidas de atividade enzimática para fosfolipase e proteinase.	50
Quadro 3.	Ensaio com produção de clamidoconídios com mais de 48 horas de incubação para <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i> .	64
Quadro 4.	Relação de ensaios de atividade de proteinases de cepas conservadas em diferentes métodos, com resultados diferentes em relação ao tempo zero de armazenamento.	67
Quadro 5.	Relação de ensaios de atividade de fosfolipases de cepas conservadas em diferentes métodos, com resultados diferentes em relação ao tempo zero de armazenamento.	68
Tabela 1.	Perfil fenotípico das amostras de leveduras quanto à assimilação e à fermentação de carboidratos. Resultados de testes feitos no tempo 'zero' de armazenamento em comparação com dados obtidos dos registros do Banco CBS (<i>CBS database</i>).	59
Tabela 2.	Perfil fenotípico das amostras de leveduras no tempo 'zero' de armazenamento, para os testes de CHROMagar Candida [®] , Microcultivo, Tubo germinativo, crescimento em 45°C e produção de enzimas proteolíticas e crescimento em caldo hipertônico.	60
Tabela 3.	Viabilidade celular em azul de metileno para amostras de leveduras armazenadas em diferentes métodos de conservação. Média das seis espécies estudadas.	62
Tabela 4.	Índices de atividade enzimática para fosfolipase e proteinase testados em diferentes períodos de tempo de armazenamento das amostras, sob diferentes condições.	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Gel de qualidade de DNA.	61
Figura 2.	Cultivos de leveduras em CHROMagar Candida®.	63
Figura 3.	Cultivo de 48 horas de <i>C. albicans</i> em CHROMagar Candida®.	63
Figura 4.	Placa de SDA com cultivo de três espécies de leveduras incubada à 45°C.	63
Figura 5.	Micromorfologia vista em cultivo em Ágar Fubá das seis amostras de leveduras estudadas.	65
Figura 6.	Assimilação de carboidratos.	66
Figura 7.	Fermentação de carboidratos.	66
Figura 8.	Teste de fosfolipase e proteinase.	68
Figura 9.	Perfis eletroforéticos dos padrões de RAPD de <i>C. utilis</i> (CBS 5609), <i>C. parapsilosis</i> (CBS 604) e <i>C. tropicalis</i> (CBS 94), antes e após manutenção laboratorial por cinco diferentes métodos.	72
Figura 10.	Perfis eletroforéticos dos padrões de RAPD de <i>C. albicans</i> (CBS 562), <i>C. dubliniensis</i> (CBS 7987) e <i>K. marxianus</i> (IZ 1339), antes e após manutenção laboratorial por cinco diferentes métodos.	73

LISTA DE ABREVIATURAS

BHI	– <i>Brain Heart Infusion</i>
BSA	– Albumina de soro bovino
CBS	– <i>Centraal Bureau voor Schimmelcultures</i>
dATP	– Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	– Desoxicitosina trifosfato
dGTP	– Desoxiguanosina trifosfato
DNA	– Ácido desoxirribonucléico
dNTP	– Desoxinucleosídeo
dTTP	– Desoxitimina trifosfato
DO	– Densidade óptica
EDTA	– Ácido etilenodiaminotetracético
Kb	– kilobase
M	– Molar
MgCl ₂	– Cloreto de Magnésio
min.	– Minuto
mM	– Milimolar
µg	– Micrograma
µL	– Microlitro
µM	– Micromol
NaCl	– Cloreto de sódio
ng	– Nanograma
nm	– Nanômetro
pb	– Pares de bases
PCR	– Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	– <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
pmol	– Picomol
PZ	– Zona de atividade enzimática

RAPD	– Polimorfismo do DNA amplificado ao acaso (<i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i>)
RFLP	– <i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RNA	– Ácido ribonucléico
SDA	– Sabouraud Dextrose ágar
SAP	– Família de genes que codificam as isoenzimas <i>Saps</i>
<i>Saps</i>	– Enzimas Aspartil Proteinases Secretadas (<i>Secreted Aspartic Proteinases</i>)
Taq DNA polimerase	– Enzima DNA polimerase de <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	– Tampão Tris-borato-EDTA
TE	– Tampão Tris-EDTA
UFC	– Unidade formadora de colônia
YM	– Extrato de malte e levedura (<i>Yeast Extract–Malt Extract</i>)
YPD	– Extrato de levedura, peptone e dextrose (<i>Yeast-Extract Peptone Dextrose</i>)
zp	– Zona de precipitação

RESUMO

A preservação de microrganismos é um importante recurso para a manutenção e conservação de espécies microbianas em laboratórios clínicos, técnicos e de pesquisa. Diferentes métodos de armazenamento de espécies de leveduras em laboratório foram descritos, objetivando principalmente, melhores resultados quanto à manutenção da viabilidade e das propriedades celulares por tempos prolongados. Métodos ideais de armazenamento de leveduras e outros microrganismos necessitam promover a sobrevivência das células, bem como a pureza da cultura e a estabilidade de suas características. Alguns pesquisadores, no entanto, têm mencionado a ocorrência de alterações fenotípicas e/ou genotípicas em amostras mantidas em laboratório, as quais podem influenciar estudos, tipagem e a aplicabilidade destes organismos nos diversos setores. Há, portanto, uma necessidade de estudos adicionais que avaliem a estabilidade das propriedades das amostras de leveduras após serem mantidas em laboratório por diferentes métodos. Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a influência de métodos de manutenção laboratorial de leveduras sobre as suas características morfológicas e bioquímicas. Para isso, foram testadas seis cepas padrão de leveduras do gênero *Candida*, sendo quatro espécies de interesse médico e duas de interesse industrial, submetidas a cinco diferentes métodos de armazenamento, a saber: transferências seriadas em meio sólido, óleo mineral, água destilada, congelamento em glicerol a -70°C e liofilização. As amostras foram caracterizadas fenotipicamente antes de serem armazenadas, e após o armazenamento em diferentes intervalos de tempos por um período de 18 meses. Foram avaliadas as características das colônias em meio CHROMagar *Candida*[®], micromorfologia em ágar fubá, assimilação e fermentação de carboidratos, produção de proteinases e fosfolipases, teste de crescimento a 45°C e crescimento em meio hipertônico. O DNA das amostras foi extraído nos tempos zero, 06, 12 e 18 meses, para análise genotípica por *Randomly Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), utilizando-se dois diferentes *primers* para cada cepa. Os resultados obtidos mostraram que todos os métodos de conservação avaliados permitiram a manutenção da viabilidade das amostras durante todo o período analisado (18 meses). A exceção ocorreu com a amostra de *Candida dubliniensis* que

perdeu sua viabilidade em óleo mineral após 12 meses de conservação. Não foram observadas alterações fenotípicas nos resultados dos testes morfológicos e bioquímicos, após a preservação laboratorial através de todos os métodos utilizados no estudo. Entretanto, variações não estáveis foram observadas para algumas amostras nos testes de produção de fosfolipases e proteinases, e para o crescimento em meio hipertônico. Tais variações não estavam relacionadas com uma condição específica de manutenção da cepa e o resultado alterado foi reversível em testes subsequentes. Alterações no padrão de RAPD não foram detectadas em pelo menos duas reações independentes para cada um dos *primers* testados. Os resultados obtidos demonstram que os métodos de conservação aplicados neste estudo permitem a manutenção da estabilidade das características fenotípicas e genotípicas relacionadas aos testes aplicados, em amostras de leveduras preservadas durante o período avaliado. Desta forma, a aplicabilidade do ponto de vista técnico ou de pesquisa não é inviabilizada para amostras preservadas por estes métodos. Cepas destinadas ao uso em finalidades específicas devem ser testadas individualmente quanto ao método de conservação mais indicado.

ABSTRACT

The maintenance of microorganisms is useful to preserve microbial species in clinical, technical and research laboratories. Different methods to yeast stocking are available in order to obtain long time viability and stability of cell properties. The best methods to store microorganisms need to provide the cell survival as well as purity and stability of their properties. Some researches, however, have mentioned phenotypic and/or genotypic changes in laboratorial samples, which may influence yeast typing, studies and the applications of those organisms in different areas. Therefore, additional studies are needed to evaluate the yeast samples properties stability after stocking through different methods. The aim of this study was to evaluate the influence of the yeast storage methods in terms of their morphological and biochemistry characteristics. *Candida* spp. standard strains, four of medical importance and two industrial species were evaluated. Those strains were submitted to five storage methods: serial transferences in agar medium, mineral oil, distilled water, freeze with glycerol at -70°C and freeze-drying. The samples were characterized with phenotypic techniques before being stocked, and after that in different periods of time up to 18 months. It was tested the characteristics of the colonies in CHROMagar Candida® medium, micromorphology in corn meal agar, carbohydrates assimilation and fermentation, phospholipases and proteinases production in solid medium, growth test in 45°C and growth test in hypertonic medium. In addition, the DNA extraction of all samples was carried out in time zero, 6, 12 and 18 months, in order to posterior genotypic analyses by Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) using two different primers for each strain. The results showed that all yeast preservation methods tested were able to maintain the viability of the samples during the period of the study, except the strain *Candida dubliniensis* stocked in mineral oil, which not survived after 12 months in these conditions. It was not observed phenotypic alterations in the results of morphological and biochemistry tests after laboratorial preservation with all used methods. However, some non stable variations were observed in phospholipase and proteinase production and in the hypertonic growth for some samples. Such variations were not related to one specific maintenance method and the altered result could be

reversible in subsequent tests. Changes in the RAPD pattern were not detected in, at least, two independent reactions for both tested primers. The results showed that the maintenance methods applied in this study were able to preserve the stability of the phenotypic and genotypic characteristics, in all yeast samples stocked during the analyzed period of time. Therefore, the technical and research applicability of the samples are not unfeasible when they are preserved with those methods. Strains designated to use for specific purposes must be tested individually, in order to select the best preservation method.

1. INTRODUÇÃO

Organismos pertencentes ao Reino Fungi, incluindo os cogumelos e os fungos microscópicos, participam amplamente do universo que circunda o cotidiano dos seres humanos. Nas últimas décadas, houve um progressivo aumento na incidência das infecções fúngicas, acompanhado de um número crescente de espécies patogênicas. Muitas destas espécies eram conhecidas, até então, como saprófitas e colonizadoras do ambiente, sem características infecciosas, que passaram a ser considerados patógenos oportunistas. Adicionalmente, infecções por espécies de fungos podem apresentar diferentes níveis de acometimento do organismo, desde superficiais, até sistêmicas e invasivas, apresentando um número cada vez maior de manifestações clínicas (Hazen, 1995; Coleman *et al.*, 1998). Alguns fatores estão relacionados com o aparecimento desses fenômenos. Dentre eles o surgimento da AIDS, o uso difundido de antibioticoterapia de largo espectro de ação, o desenvolvimento de maior suporte de vida a pacientes imunocomprometidos transformando-os em alvo fácil de infecções oportunistas, como os portadores de câncer e transplantados, entre outros (Hazen, 1995). Com o crescimento da frequência de infecções fúngicas causadas por leveduras, principalmente do gênero *Candida*, estes organismos se tornaram alvo de muitas pesquisas com diversas finalidades, sendo mantidos e manipulados em laboratórios científicos. Tais fatos, conseqüentemente, trouxeram a necessidade de se aplicar métodos de manutenção destas culturas visando sua disponibilidade em condições adequadas para vários fins científicos, por períodos indefinidos e prolongados.

De outro lado, o conhecimento sobre a genética foi muito ampliado através do estudo dos fungos o que contribuiu para a importância destes organismos até os dias de hoje. Através do uso de tecnologia de DNA recombinante, se conseguiu realizar o melhoramento genético de muitos fungos de importância industrial, aumentando seu valor biotecnológico. Atualmente, fungos são utilizados em muitos processos industriais, tais como produção de hormônios, medicamentos, enzimas, vitaminas, polissacarídeos, álcool, pigmentos, lipídios e glicolipídios, além de participarem de forma substancial do setor alimentício, como os cogumelos e fermentos (Strijkert, 1987; Russo *et al.*, 1995; Adrio & Demain, 2003).

As inúmeras pesquisas que envolvem leveduras e sua utilização em diversos processos, desde pesquisas clínicas com espécies patogênicas até a aplicação biotecnológica, ampliaram as exigências por cepas que possam ser depositadas em coleções, aumentando a demanda pela manutenção de microrganismos em culturas. Dentro deste contexto, a capacidade de manter esses microrganismos viáveis por vários anos, preservando suas características morfológicas e fisiológicas originais, se tornou indispensável para os laboratórios que visam sua utilização para diversas finalidades, seja em estudos retrospectivos e prospectivos, na aplicação industrial e em biotecnologia, ou outras áreas relacionadas (Kawamura *et al.*, 1995).

A interrupção do processo biológico natural se tornou o alvo dos esquemas de preservação de culturas puras que têm sido experimentados, utilizando-se principalmente a água e a temperatura. (McLellan & Day, 1995). Atualmente, muitas são as técnicas empregadas para manutenção e conservação de culturas de microrganismos. Cada tipo de microrganismo apresenta determinadas exigências nutricionais e ambientais. Desta forma, são necessárias técnicas e condições de armazenamento específicas para cada grupo, como é o caso dos fungos, mais especificamente das leveduras. Para a escolha da mais adequada, deve-se levar em conta a finalidade desta manutenção, o custo, a disponibilidade de material e espaço, além da eficácia de tal método na manutenção, não só da viabilidade do microrganismo, como também da suas características orgânicas (Kirsop & Snell, 1984; Hawksworth, 1985; Abadias *et al.*, 2001).

Há indícios na literatura, de que leveduras armazenadas por longos períodos sofrem alterações em suas características fisiológicas. Estudos, com diferentes espécies e condições, mostraram como a forma de armazenamento pode afetar a expressão de características próprias de algumas espécies de leveduras (Brummer *et al.*, 1990; Girão *et al.*, 2004). A manutenção da atividade de *C. sake*, no controle biológico de fungos patogênicos a alguns tipos de plantas, mostrou alterações nestas características, após estocagem sob condições específicas (Abadias *et al.*, 2001). Adicionalmente, foi comprovado que a secreção de micotoxinas, por uma espécie de *Penicillium*, pode ser afetada pelas condições de armazenamento da cepa, indicando que enzimas ligadas ao

metabolismo, virulência e outras, ligadas a diferentes funções, podem também ter sua produção e secreção alteradas, durante o processo de estocagem (Santos *et al.*, 2002).

Várias propriedades morfológicas, fisiológicas e bioquímicas das leveduras são amplamente aplicadas em metodologias para diferentes finalidades, desde a identificação de espécies, tipagem e classificação destes organismos, detecção de atividades enzimáticas, fatores de virulência, até propriedades bioquímicas voltadas à produção de metabólitos aplicados em diferentes processos. A escolha do método de armazenamento que melhor assegura a manutenção de tais características depende do objetivo que se pretende alcançar e qual o uso que se fará do repertório de espécies mantidas em laboratório. A obtenção de dados que venham a ampliar o conhecimento sobre a variabilidade fenotípica e genotípica de células leveduriformes, submetidas à conservação a curto, médio e longo prazo, deverão contribuir na decisão sobre a escolha de métodos de armazenamento, que tenham influência direta na expressão morfológica, cultural, bioquímica e genética desses organismos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. A importância do armazenamento de leveduras em laboratório

No século V a.C., Hipócrates descreveu a manifestação clínica do que conhecemos como "sapinho" ou monilíase, causada pela infecção da mucosa oral por leveduras do gênero *Candida*. Essa foi, portanto, a primeira descrição de uma infecção por levedura. Apesar disso, a detecção microscópica das células leveduriformes somente veio ocorrer mais tarde, sendo caracterizado o principal agente etiológico da monilíase, a *Candida albicans*, que tem sido demonstrada como a espécie mais freqüente de levedura causadora de diferentes doenças infecciosas. Em 1963, cerca de cinco espécies de *Candida* de importância médica foram descritas, *C. albicans*, *C. stellatoidea* (considerada hoje, sinônimo de *C. albicans*), *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. guilliermondii*. Hoje, já se tem conhecimento de mais de 20 espécies de *Candida* patogênicas ou potencialmente patogênicas, causadoras de infecções, muitas vezes graves, principalmente em pacientes hospitalizados, imunocomprometidos e/ou com doenças de bases severas (Hazen, 1995; Coleman *et al*, 1998).

Inicialmente, os relatos publicados de casos clínicos de candidíase eram relacionados a infecções superficiais, particularmente de mucosas de trato gastrointestinal e genitais. Depois de 1870, foram descritas manifestações intestinais e o primeiro caso de infecção pulmonar por *Candida*. Desde então, infecções disseminadas envolvendo diversos órgãos e sistemas têm sido descritas na literatura (Hazen, 1995). As leveduras do gênero *Candida* colonizam a cavidade bucal de aproximadamente 40% da população adulta considerada oralmente saudável, sendo a espécie *albicans* responsável por aproximadamente 95% do total de isolados, embora outras espécies têm se tornado comuns, especialmente após a pandemia da Aids (Candido *et al*, 1995; Leung *et al*, 2000).

Com o crescimento da freqüência de infecções fúngicas causadas por leveduras, principalmente do gênero *Candida*, estes organismos se tornaram alvo de muitas pesquisas com diversas finalidades, sendo mantidos e manipulados em laboratórios científicos. Isso, conseqüentemente, trouxe a necessidade de se aplicar métodos de manutenção destas culturas visando sua disponibilidade em condições adequadas para vários fins científicos, por períodos indefinidos e prolongados.

Da mesma forma, algumas espécies de leveduras são também muito utilizadas na indústria e biotecnologia, em diversos processos fermentativos, como no caso da fermentação da cana de açúcar na produção de álcool, na produção de vinho e outros produtos derivados da fermentação, além da produção de hormônios e medicamentos. A manutenção de culturas desses organismos implica não só na manutenção da viabilidade dos organismos, mas é de fundamental importância a preservação de suas características metabólicas, com recuperação rápida de sua taxa de crescimento e reprodução, para fins industriais, de estudos e pesquisas (Hawksworth, 1985; Kawamura *et al.*, 1995).

Na natureza, a decomposição e morte de materiais biológicos são inerentes aos seres vivos. As estruturas e funções dos organismos irão mudar e se perder com o tempo. Obviamente, isso ocorre em culturas mantidas em laboratório, ou quando tais organismos são manipulados. Tentativas de interromper o processo biológico natural tem sido o alvo de muitos pesquisadores. Muitos esquemas de preservação de culturas puras foram experimentados, utilizando-se principalmente a água e a temperatura. Mais de 40 anos se passaram, no entanto, desde a primeira demonstração de uma efetiva criopreservação de espermatozoides. A partir de então, o potencial de estocagem de células vivas, por longos períodos, rapidamente se tornou alvo de estudos em diversas áreas, para preservação de muitos tipos de organelas, células, tecidos e órgãos (McLellan & Day, 1995).

2.2. Características morfológicas e bioquímicas das leveduras

Muitas características fenotípicas das leveduras são freqüentemente utilizadas em laboratório para a identificação destes organismos ao nível de espécies e subespécies. O perfil bioquímico e as qualidades enzimáticas, fermentativas e metabólicas dos microrganismos são amplamente estudados e aplicados para diferentes finalidades e processos, em diferentes áreas de pesquisa e também no âmbito industrial (Jones, 1990; Buckholz & Gleeson, 1991; Milan *et al.*, 1997; Takagi *et al.*, 1997; Ghannoum, 2000; Suga *et al.*, 2000).

As técnicas fenotípicas comumente empregadas em laboratórios para caracterização de leveduras têm como base principal a análise do perfil morfológico e

bioquímico destes organismos (Sandven, 1990; Freydiere *et al.*, 2001). A observação de estruturas microscópicas, os testes de avaliação da atividade enzimática e da capacidade de assimilação e fermentação de substratos, compõem um conjunto de metodologias, com as quais pode-se identificar uma espécie, definir o comportamento da cepa em diferentes condições e assim definir as diversas características de uma amostra de levedura (Milan *et al.*, 1997; Jones, 1990). Os métodos disponíveis para a identificação de espécies de *Candida* são numerosos, e a escolha de um deles é determinada pelo nível de identificação requerida, aspectos clínicos, número total de amostras examinadas rotineiramente e recursos disponíveis no laboratório (Williams & Lewis, 2000). Além da identificação e caracterização, estes testes permitem avaliar o potencial de virulência, de produção de enzimas e de metabólitos.

A maioria das leveduras crescem bem em temperaturas entre 30 e 37°C, quando cultivadas em meios de cultura artificiais (Bezjak & Chandy, 1989). Entre as espécies do gênero *Candida*, as temperaturas de incubação que permitem crescimento satisfatório podem variar entre 20 e 38°C, sendo ideal entre 25 e 28°C (Odds, 1988). A capacidade de crescimento em temperaturas elevadas é característica de algumas espécies, sendo uma das provas utilizadas para diferenciação entre a *Candida albicans* e *C. dubliniensis* as quais compartilham diversas características morfológicas e fisiológicas, o que dificulta a identificação diferencial entre estas duas espécies (Sullivan *et al.*, 1995; Sullivan & Coleman, 1998). Foi demonstrado que, *C. dubliniensis* é sensível a elevadas temperaturas e não é capaz de crescer quando incubada a 42 ou 45°C. Esta tem sido, portanto, uma prova útil para identificação presuntiva desta espécie, embora seja um teste que requer provas complementares, devido à existência de algumas cepas de *C. albicans* que podem também apresentar comportamento semelhante (Gales *et al.*, 1999; Tintelnot *et al.*, 2000; Mariano *et al.*, 2003). Bezjak & Chandy (1989), analisando espécies do gênero *Candida* quanto à capacidade de crescimento a 45°C, verificaram que 76% dos isolados inoculados em placas de Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) cresceram a 45°C. Dentre as espécies estudadas, *C. albicans* e *C. krusei* foram as que obtiveram maior índice de crescimento, 99 e 100%, respectivamente. A espécie mais sensível foi *C. parapsilosis*, com apenas 19% das amostras com crescimento positivo. Sendo assim, a avaliação de

crescimento a 45°C pode ser um fator que auxilia na caracterização desses microrganismos.

A caracterização morfológica das leveduras se dá pelo cultivo em ágar fubá com Tween 80, o que permite a visualização ao microscópio, de estruturas características das leveduras como os blastoconídios, pseudo-micélio, micélio e clamidoconídios. A presença destas estruturas e o seu arranjo e forma podem fornecer indícios da espécie que se está procurando identificar. A observação destas características pode também, servir como meio de detecção de alterações morfológicas nas leveduras (Jones, 1990; Milan *et al.*, 1997).

A formação de tubo germinativo é um fenômeno que ocorre em algumas espécies do gênero *Candida* e reflete a capacidade da cepa de filantar em determinadas condições, característica denominada de pleomorfismo. Também constitui um método laboratorial para a identificação de *C. albicans*, com 95% de positividade entre os isolados desta espécie (Perry & Miller, 1988; Williams & Lewis, 2000). Este teste envolve a indução de crescimento de hifas (tubos germinativos) em leveduras, incubadas em soro por 2-4 horas a 37°C. Esta característica também é apresentada por *C. dubliniensis* (Sullivan & Coleman, 1998), enquanto raros isolados de *C. tropicalis* podem produzir tubos germinativos atípicos (Martin, 1979). Alguns estudos avaliaram a capacidade de *C. albicans* de produzir hifas nos tecidos infectados comparando esta produção com a resposta tissular e a adesão ao epitélio. A produção de filamentos por leveduras é considerada uma característica relacionada com a adesão nos tecidos humanos, constituindo um fator de virulência da cepa (Asleson *et al.*, 2001).

Quanto aos caracteres relativos a capacidade de assimilação e fermentação de substratos, muitas espécies de leveduras apresentam habilidade fermentativa e oxidativa, enquanto outras são estritamente oxidativas. A espécie que fermenta um determinado carboidrato, obrigatoriamente deve assimilá-lo, entretanto, ela pode assimilar e não fermentar o mesmo carboidrato. A capacidade de assimilar carboidratos e substratos que fornecem nitrogênio, e a capacidade fermentativa constituem características muito empregadas em testes para definitiva identificação de leveduras de interesse médico, pois permitem a diferenciação entre as espécies (Jones, 1990; Sandven, 1990; Milan *et al.*,

1997). Adicionalmente, leveduras com elevada capacidade fermentativa de diferentes carboidratos são amplamente utilizadas em processos industriais na produção de diversos produtos, tais como o etanol, bebidas e pães (Ferreira da Silva *et al.*, 1992; Hirasawa *et al.*, 2001).

Além da assimilação e fermentação, existem outras características que podem ser exploradas na identificação e tipagem das espécies de leveduras, como a produção da enzima urease, que se traduz na capacidade de algumas leveduras de hidrolisar a uréia, a resistência a cicloeximida, a capacidade de crescimento em elevadas concentrações de cloreto de sódio, entre outras (Lacaz, 1980; Alves *et al.*, 2002). A utilização de meios cromogênicos, como o CHROMagar Candida®, permite a diferenciação de espécies de leveduras pelo contraste das colorações das colônias sobre o ágar. O mecanismo de ação deste meio se baseia em enzimas espécie-específicas e substratos cromogênicos, sendo eficaz na identificação presuntiva de algumas espécies de *Candida*, com elevado nível de sensibilidade e especificidade. As espécies *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* podem ser identificadas com a utilização deste meio, por apresentarem colônias características, verde claro, azul escuro e rosa, respectivamente (Baumgartner *et al.*, 1996; Bernal *et al.*, 1996; Koehler *et al.*, 1999). Alguns isolados de *C. dubliniensis* podem crescer como colônias de cor verde escuro quando cultivadas neste meio, embora alguns isolados apresentam colônias de cor semelhante a *C. albicans* (Sullivan & Coleman, 1998; Tintelnot *et al.*, 2000).

2.3. Técnicas moleculares aplicadas a leveduras

A identificação e a classificação de leveduras dão-se, principalmente, pelo emprego de métodos fenotípicos convencionais, baseados nas características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas das células (Sandven, 1990; Freydiere *et al.*, 2001). Muito destes métodos são trabalhosos e exigem maior tempo, apresentando algumas dificuldades. Estes métodos podem sofrer influências pelo tempo de armazenamento das amostras e estar sujeitos a variações na expressão das características, bem como das condições de realização, tais como: tamanho do inóculo utilizado, condição de incubação, etc. Métodos moleculares, os quais se baseiam no

estudo do DNA e na caracterização genotípica dos microrganismos, constituem grande avanço para a caracterização das espécies de diferentes grupos de patógenos, permitindo também a avaliação da variabilidade intra-específica entre amostras, sendo importante recurso para os laboratórios de microbiologia e pesquisa. Tais métodos oferecem vantagens por apresentarem maior estabilidade dos caracteres ao longo do tempo, alta reprodutibilidade e objetividade na interpretação dos resultados (Magee *et al.*, 1992; Pfaller, 1995). A disponibilidade de técnicas moleculares tornou-se mais acessível nos últimos anos e têm sido extensivamente aplicadas para a classificação e a caracterização genética de leveduras de fermentação de vinhos, em particular *Saccharomyces cerevisiae*. Algumas destas metodologias foram também empregadas para identificação e tipagem de leveduras isoladas de leite fermentado e queijos (Andrighetto *et al.*, 2000).

Como *C. albicans* é a espécie mais comumente isolada de sítios do organismo humano, estando relacionada tanto com colonização como com infecção, muitos métodos moleculares tem sido utilizados para a tipagem desta espécie. Com a crescente importância de espécies não-*albicans* nas últimas décadas, os mesmos procedimentos estão sendo também aplicados com sucesso para outras espécies. Provas tais como a cariotipagem, *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso (*Randomly Amplified Polymorphic DNA* - RAPD), hibridização do DNA com sondas de seqüências repetidas e eletroforese de enzima *multilocus* (MLEE) são as mais difundidas. Estas técnicas são aplicadas em diferentes estudos e servem de base para a compreensão dos padrões de distribuição e comportamento dos microrganismos, como por exemplo: cepas que são substituídas por outras em infecções recorrentes; colonização de diferentes sítios no mesmo indivíduo saudável por cepas não relacionadas; ocorrência de diferentes espécies ou diferentes cepas da mesma espécie num mesmo local no organismo; transferência de cepas de um indivíduo para outro; existência de regiões geográficas para cepas específicas; ocorrência de microevoluções em cepas comensais e substituições de cepas em infecções recorrentes (Pujol *et al.*, 1997).

Entre as técnicas moleculares correntemente em uso, destaca-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - Polimerase Chain Reaction). Trata-se de uma poderosa técnica, que envolve a síntese *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de

DNA, na presença da enzima Taq DNA polimerase, (Saiki *et al.*, 1988). Os métodos fundamentados na reação em cadeia da polimerase têm sido os mais largamente utilizados para a genotipagem de *Candida* spp, e dentre suas vantagens estão, sua aplicação universal e a relativa rapidez e simplicidade da técnica, enquanto seu poder discriminatório mantém-se comparável aos métodos mais complexos (Van Belkum *et al.*, 1994).

O RAPD, técnica baseada na PCR, tem sido bastante difundida na tipagem molecular, identificação de microrganismos, estudos epidemiológicos, entre outros. Através da utilização de pequenos oligonucleotídeos, em geral com 10 bases e com seqüência aleatória, amplificados por PCR, pode-se identificar padrões genéticos diferenciados dentro de uma mesma espécie. O AP-PCR é uma variação desta técnica, onde também se utiliza *primers* arbitrários, em geral, com maior número de bases, entre 10 e 20 (Welsh & McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990; Power, 1996). A heterogeneidade genômica de *C. parapsilosis*, comumente acessada através da eletrocariotipagem por PFGE (Carruba *et al.*, 1991), também é possível de ser realizada por RAPD com resultados muito semelhantes, conforme indicado por Lott *et al.* (1993). Um conjunto de amostras de *C. parapsilosis*, fisiologicamente homogêneas, foi dividida em três grupos distintos e cepas de *C. albicans* não relacionadas mostraram, através desta técnica, padrões distintos. Pequenas diferenças entre padrões genotípicos obtidos por RAPD, sugestivos de mutações em cepas armazenadas por longos períodos, também foram detectadas (Lehmann *et al.*, 1992). Por ser uma técnica fácil e confiável, a análise de fragmentos de RAPD pode ser útil na obtenção de caracteres genotípicos para taxonomia, na confirmação da identificação de isolados armazenados, tipagem de espécies de *Candida* em investigações epidemiológicas e para uso na identificação rápida de fungos patogênicos. Muitas são as vantagens deste método. Nenhum conhecimento prévio da seqüência do DNA a ser analisado é necessário, a técnica pode ser aplicada a qualquer microrganismo, além de ser de rápida e de fácil execução (Power, 1996).

Uma metodologia que permite a identificação de subespécies de *Candida* spp. inclui a análise, mediada por PCR, de *loci* genômicos que abrigam números variáveis de regiões repetidas. Foi demonstrado que a análise de múltiplos *loci* contendo regiões

repetidas pode ser útil para tipagem molecular em *C. albicans*. Regiões com seqüências variáveis são formadas por elementos repetitivos, os quais se caracterizam por seqüências curtas de nucleotídeos de 1 a 8 bases, conhecidas como *microsatelites*. Polimorfismos nestas seqüências podem ser localizados utilizando-se oligonucleotídeos com motivos repetidos como sondas moleculares ou através de PCR de um *locus* específico, os quais amplificam as regiões variáveis (Metzgar *et al.*, 1998).

Além destes, outros métodos de avaliação molecular de microrganismos podem ser bastante úteis. A hibridização, freqüentemente utilizada, permite o reconhecimento de genes específicos no DNA de diferentes organismos. Fitas simples de ácidos nucléicos complementares se alinham especificamente, formando complexos estáveis de fita dupla. Através deste método é possível a identificação de várias espécies de fungos com elevada especificidade e rapidez (Melo *et al.*, 1998).

A comparação direta entre seqüência de nucleotídeos, pode ser um método objetivo para resolução de problemas de taxonomia e identificação do gênero *Candida*. Os genes ribossômicos constituem os marcadores evolutivos mais consistentes para uso neste tipo de abordagem, sendo ideal para comparações desde espécie até filos e reinos, por serem conservados e funcionalmente equivalentes em todos os organismos. Nesta metodologia, se faz necessário a utilização da técnica de PCR, que amplifica os genes ribossômicos (Odds, 1988; Murray *et al.*, 1995).

A Eletroforese em Campo Pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* – PFGE) é uma técnica que tem fornecido importante informação taxonômica e epidemiológica, por permitir a separação de grandes fragmentos de DNA pela aplicação de um campo elétrico variável (Schwartz & Cantor, 1984). Esta metodologia possibilita a realização da cariotipagem, a qual se baseia na análise de cromossomos intactos de leveduras e outros organismos (Chu *et al.*, 1986). A cariotipagem eletroforética realizada com PFGE foi utilizada recentemente por diversos pesquisadores na investigação epidemiológica de surtos de fungemias, infecções em cateter, entre outros casos (Branchini *et al.*, 1995; Cameron *et al.*, 1999; Römling & Tümmler, 2000; Shin *et al.*, 2001). Com o avanço das metodologias, é possível a realização de estudos assertivos no campo da microbiologia, desde a identificação de espécies e genótipos distintos, até avaliações taxonômicas.

2.4. Secreção de enzimas proteolíticas

A invasão das células do hospedeiro por micróbios requer a penetração e o dano à camada externa do envelope celular. A patogenicidade do gênero *Candida* envolve mecanismos ainda não totalmente esclarecidos. Entretanto, sabe-se que um dos mecanismos está relacionado à invasão das células dos tecidos do hospedeiro por estes microrganismos. Este processo é mediado por meios físicos e enzimáticos, ou ainda, pela combinação de ambos (Ibrahim *et al.*, 1998). Os fosfolipídios e proteínas representam a maior parte dos constituintes do envelope da célula hospedeira. Portanto, enzimas capazes de hidrolisar tais classes de compostos químicos, como as fosfolipases e proteinases, estão envolvidas no processo de ruptura da membrana celular que ocorre durante o processo de lesão celular pelo microrganismo invasor. O processo de colonização, de infecção, e de defesa contra os mecanismos imunológicos do hospedeiro, inclui a secreção de um repertório de enzimas, entre elas as proteinases aspartil secretoras (Saps), as fosfolipases, lipases, entre outras, as quais desempenham um papel importante na patogenicidade destes fungos (Hube & Naglik, 2001; Niewerth & Korting, 2001). Neste sentido, Shimizu *et al.*, (1996) avaliaram a produção simultânea de quatro enzimas: hialuronidase, condroitina sulfatase, proteinases e fosfolipases, por espécies de *Candida* e sua relação com a virulência em ratos. A maioria das cepas de *C. albicans* (73%) foram produtoras dos quatro tipos enzimáticos, as quais apresentaram maior virulência em ratos. Cepas que apresentaram perda da capacidade de produção de proteinases foram menos virulentas do que as que deixaram de produzir apenas as fosfolipases.

O termo fosfolipase se refere a um grupo heterogêneo de enzimas que compartilham a habilidade de hidrolisar uma ou mais ligações do tipo éster em glicerofosfolipídios. Embora todas as fosfolipases têm como substrato fosfolipídios, cada enzima tem a habilidade de clivar uma ligação "éster" específica. Através da clivagem de fosfolipídios, as fosfolipases desestabilizam a membrana, resultando na lise celular. Conseqüentemente, as fosfolipases tem sido incluídas dentre os fatores de virulência relacionados ao dano celular no hospedeiro (Ghannoum, 2000).

Price *et al.* (1982) descreveram um método prático para detecção de fosfolipases produzida por *C. albicans*, no qual se adiciona gema de ovo ao Ágar Sabouraud Dextrose. Isolados fosfolipase ativos hidrolisam os fosfolipídios, presentes em grande quantidade na gema do ovo, formando uma zona de precipitação ao redor das colônias que crescem sobre o ágar. Segundo alguns autores, a capacidade de produzir fosfolipases, por uma importante característica de patogenicidade, pode ser explorada como um critério para biotipagem de *C. albicans* (Williamson *et al.*, 1986; Candido *et al.*, 2000). A produção de fosfolipase, por isolados de *C. albicans*, apresenta quantidades variáveis. Avaliando 41 isolados de *Candida* spp., Samaranayake *et al.* (1984) constataram que 79% de cepas de *C. albicans* produziam esta enzima, enquanto que as cepas de *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* não a produziam. Estudos avaliando a produção desta enzima entre amostras de *C. albicans* demonstraram resultados que variaram entre 52 e 100% das amostras positivas (Shimizu, 1989; Hannula *et al.*, 2000; Penha *et al.*, 2000).

As proteinases produzidas por *C. albicans* podem ser secretadas, ou apresentarem-se associadas à membrana da célula, na forma de proteinase aspartil, a qual é expressa na maioria das espécies patogênicas do gênero *Candida*. Dentre as hidrolases secretadas por cepas de *Candida* patogênicas, as proteinases aspartil secretadas (Sap) exercem um importante papel. As proteínas Sap são codificadas por uma família de 10 genes denominados de *SAP*. Estas enzimas degradam proteínas relacionadas às defesas estrutural e imunológica do hospedeiro, facilitando assim a penetração no organismo, se opondo ao seu sistema de defesa (Hube & Naglik, 2001). Muitas espécies de *Candida* patogênicas apresentam os genes *SAP*, as quais produzem atividade de proteinase extracelular *in vitro* (Naglik *et al.*, 2003; Hamal, 2004). Pichová *et al.* (2001) isolaram proteinases de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. lusitaniae*.

A indução da secreção de proteinases é feita com meios enriquecidos com proteínas, como a albumina, isentos de fontes de nitrogênio simples (Ruchel *et al.*, 1982). A frequência na produção de proteinases por cepas de *C. albicans* pode variar bastante. Penha *et al.* (2000), analisando amostras dessa levedura proveniente da cavidade oral, verificaram que 100% eram proteinases positivas. Chakrabarti *et al.* (1991), trabalhando

com amostras provenientes de diversos sítios anatômicos, observaram que a atividade enzimática de cepas de *C. albicans* para produção de proteinases variava de 44,4% a 84,6%, dependendo do sítio de origem. Foi sugerido que a análise enzimática com a finalidade de biotipagem de *C. albicans*, pode ser feita através de estudos com proteinases e fosfolipases, associadas a métodos moleculares de genotipagem (Price *et al.*, 1982; Williamson *et al.*, 1986; Candido *et al.*, 2000).

2.5. Técnicas de manutenção e armazenamento de leveduras

Como são organismos unicelulares, as leveduras podem ser manipuladas em laboratório de forma semelhante à maioria das bactérias, mas com exigências nutricionais e ambientais normalmente mais simples. Em geral, leveduras são microrganismos fáceis de manter, estocar, cultivar e isolar a partir de diferentes habitats. Embora elas sejam tolerantes a condições desfavoráveis, muitos métodos de manutenção, comumente utilizados, resultam em baixos níveis de sobrevivência e instabilidade das suas propriedades fisiológicas e bioquímicas. A estocagem de leveduras também apresenta algumas particularidades, como a transição entre forma leveduriforme e micelial, no pleomorfismo, além de risco de contaminação. Embora não se tenha pleno conhecimento dos fatores que afetam a sobrevivência das leveduras estocadas, a baixa viabilidade celular pode estar relacionada, em parte, ao grande tamanho das células em relação às células bacterianas e a ausência de esporos de resistência dos tipos encontrados nos fungos superiores. Entretanto, alguns métodos elementares podem ser utilizados no dia a dia de um laboratório de forma simples, tomando-se certas precauções, o que torna possível o alcance de altas taxas de sobrevivência, para manutenção destes microrganismos. (Spencer & Spencer, 1996; Kirsop & Snell, 1984).

Coleções de leveduras, originalmente eram mantidas pela transferência seriada de meios de cultura velhos para meios novos. Este método, embora simples, é trabalhoso e consome um tempo relativamente grande, além de ser economicamente inadequado. No entanto, ele pode ser ainda muito útil para culturas não muito numerosas, destinadas ao uso constante. Ao longo dos anos, vários métodos de preservação têm sido desenvolvidos

visando à eliminação dos problemas encontrados em transferências seriadas. O principal objetivo que se busca com tais métodos, é a extensão do tempo de sobrevivência das cepas mantidas armazenadas. Métodos que tem apresentado maior sucesso são aqueles que reduzem o metabolismo a ponto de induzir latência artificial. Isso pode ser conseguido através da desidratação, crescendo os fungos em meios fracos, incubando-se em baixas temperaturas ou pelo crescimento em baixa tensão de oxigênio (Gentles & Scott, 1979; Kirsop & Snell, 1984).

A escolha da técnica a ser empregada deve ser definida, seguindo-se alguns parâmetros. Para curtos períodos de manutenção, quando se pretende o uso diário, meios enriquecidos e de formulação indefinida, como o meio extrato de levedura-peptona-dextrose (YEPD) e o ágar extrato de malte, são comumente utilizados. Para períodos longos de preservação, como em coleções de culturas, onde o acesso imediato é menos importante, devem-se buscar métodos que promovem melhor manutenção das características das espécies e das cepas, quando este é o objetivo primário (Spencer & Spencer, 1996).

O processo de liofilização de microrganismos envolve seu congelamento prévio a baixíssimas temperaturas seguido da secagem da amostra a vácuo. Tanto o congelamento como a liofilização são técnicas freqüentemente utilizadas para preservação e estocagem de material biológico. Para se obter bons resultados com a liofilização, alguns fatores devem ser observados, como a escolha do meio de crescimento da cultura inicial, do meio de reativação e a temperatura de pré-congelamento, entre outros (Rose, 1970). Este processo é bastante agressivo e apresenta alguns efeitos indesejáveis, tais como a desnaturação de proteínas e o decréscimo da viabilidade de diversos tipos celulares. Para se prevenir e reduzir estes efeitos adversos, substâncias protetoras tais como leite desnatado, sacarose, glicerol, dimetil sulfoxido, entre outras, são comumente adicionados às amostras antes de serem congeladas ou liofilizadas (Diniz-Mendes *et al.*, 1999). O dissacarídeo trealose foi mencionado como uma substância que apresenta um papel de reserva de carboidrato e como protetor da membrana citoplasmática contra secagem, congelamento e tensão de calor. Este carboidrato tem sido utilizado com sucesso na preservação de diferentes tipos celulares ao serem submetidos a tratamentos em baixas

temperaturas. Hirasawa *et al.* (2001) demonstraram que o índice de tolerância ao congelamento entre leveduras de panificação aumentou quando estas foram saturadas com trealose exógena. Como é um crioprotetor natural que pode ser encontrado intracelularmente em muitas espécies de organismos, tais como leveduras e esporos de fungos, algumas cepas de leveduras apresentam produção de níveis elevados de trealose e, portanto, são naturalmente tolerantes ao congelamento. Esta característica é explorada na produção de produtos de panificação congelados, em que se utilizam fermentos tolerantes ao congelamento (Hino *et al.*, 1990; Leslie *et al.*, 1995; Takagi *et al.*, 1997).

Quando se objetiva armazenar leveduras por longos períodos, sugere-se a liofilização, o congelamento com meio adicionado de glicerol em freezer a -70°C e o uso do nitrogênio líquido. O congelamento em meio adicionado de glicerol é um método que tem sido bastante difundido, sendo considerado equivalente à liofilização e à manutenção em nitrogênio líquido, permitindo longos períodos de armazenagem. O glicerol funciona como crioprotetor e deve ser adicionado de forma a se chegar a concentrações finais que podem variar entre 15 e 50% (Spencer & Spencer, 1996). Crespo *et al.* (2000), avaliaram diferentes métodos para preservação de células de *Malassezia* spp., sendo que o congelamento a -80°C foi o único método que proporcionou sucesso na manutenção de todas as espécies. Para preservação e estocagem de *Haemophilus influenzae* o congelamento se mostrou um bom método, tanto a -20°C como a -70°C , sendo que a adição de glicerol ao leite desnatado aumentou a recuperação dos microrganismos (Saab *et al.*, 2001).

Foi demonstrado que, a utilização da liofilização para armazenamento de leveduras pode ser de grande utilidade, pois geralmente esses organismos se mantêm inalterados morfológicamente e fisiologicamente e fiéis às propriedades industriais, embora outros autores tenham citado que mudanças genéticas podem ocorrer (Souzu, 1973; Kirsop & Snell, 1984). Muitas cepas de fungos podem ser preservadas com tal técnica por até 23 anos, porém, seu procedimento é mais complicado em relação às outras técnicas. No processo de liofilização, é essencial que se dê atenção ao emprego do meio adequado, sendo que alguns autores sugerem o "skim milk" (leite desnatado) para proteção das culturas (Ellis & Roberson, 1968; Qiangqiang *et al.*, 1998). O meio com leite

desnatado pode ser utilizado como agente protetor e também na re-hidratação das células, com significativa melhora dos resultados. A melhor sobrevivência e a manutenção das propriedades como agente biocontrolador em *C. sake*, num estudo que utilizou diferentes agentes protetores e meios de reidratação na liofilização das cepas, foi obtida utilizando-se 10% de lactose e 10% de leite desnatado como protetores, e as taxas de sobrevivência foram também superiores quando uma solução a 10% de leite desnatado foi utilizada na reidratação (Abadias *et al.*, 2001). Células de algumas espécies de leveduras liofilizadas, que originalmente cresceram em meios líquidos, apresentaram maiores níveis de manutenção da viabilidade, do que as que cresceram em meios sólidos equivalentes (Rose, 1970). Antheunisse (1973) avaliou a viabilidade de diversas espécies de microrganismos liofilizados, incluindo bactérias e fungos, mantidos em coleção de cultura por 6 anos. Dos 30 gêneros de bactérias estudados, 18 deles tiveram taxa de sobrevivência entre 80-100% das culturas. Leveduras mostraram, em geral, maior resistência. De 11 gêneros testados, 80-100% das culturas de 9 gêneros sobreviveram em 6 anos.

Para manutenção de leveduras por períodos medianos de tempo, são sugeridos a estocagem em meio inclinado sob óleo mineral, ou impregnação em papel de filtro, seguida de secagem do mesmo. A secagem sem congelamento pode também ser um recurso muito útil. O método mais simples é a secagem em papel de filtro, porém com restrições para alguns gêneros de microrganismos (Antheunisse *et al.*, 1981). A secagem em sílica gel pode ser considerada uma técnica mais conveniente e menos onerosa em relação à liofilização, com bons resultados. Gentles & Scott (1979), alcançaram 95% de sucesso utilizando a técnica da secagem em sílica gel para conservação de 42 espécies de fungos por até cinco anos.

A adição de óleo mineral ao cultivo em meios convencionais, crescido em temperaturas normais de incubação, proporciona uma atmosfera com baixos níveis de oxigênio. Este método está sujeito a alguns problemas encontrados nas transferências seriadas, e apresentam a desvantagem de serem facilmente contaminados. (Kirsop & Snell, 1984). Mendes da Silva *et al.* (1994), avaliaram o índice de sobrevivência e alterações morfológicas de 70 cepas do fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* mantidos por 69 anos, inicialmente através de subcultivos sucessivos e posteriormente, sob óleo mineral

em temperatura ambiente. Apenas 26% das cepas continuavam viáveis e a manutenção em óleo mineral foi mais curta, cerca de 9 a 10 anos. As cepas mostraram mudança da micromorfologia, e algumas delas não foram capazes de completar o dimorfismo entre levedura e micélio, quando incubadas em temperatura ambiente. Neste sentido, Lima *et al.* (2004) avaliaram o dimorfismo "levedura-micélio" de fungos patogênicos após estocagem em óleo mineral. *Blatomyces dermatitidis* e *P. brasiliensis* foram incapazes de completar o processo de dimorfismo, mesmo após passagem *in vivo*. Sendo esta característica de diferenciação morfológica importante na patogênese de infecções causadas por tais espécies, houve possível alteração na capacidade de virulência das cepas.

Nos dias atuais, é comum se fazer o armazenamento de fungos utilizando-se água destilada esterilizada. Esta técnica tem se difundido, demonstrando sucesso no seu emprego para alguns tipos de fungos (Baldasserini & Mungelluzzi, 1965; Rodrigues *et al.*, 1992). Qiangqiang *et al.* (1998) compararam este procedimento com a liofilização para armazenamento de diferentes espécies de fungos, dentre 78 isolados em 12 anos de preservação. Espécies de *Candida*, *Penicillium* e *Aspergillus* apresentaram 100% de viabilidade após 12 anos em ambos os métodos. Para McGinnis *et al.* (1974), a taxa de sobrevivência alcançou 93% entre espécies de fungos miceliais e leveduras, para períodos entre 12 e 60 meses. O armazenamento em água destilada esterilizada, além de ser um procedimento rápido e relativamente fácil, também é menos oneroso e produz bons resultados. Benedek (1963) descreveu método similar utilizando-se solução salina ao invés de água, obtendo também bons resultados quanto à manutenção da viabilidade celular. Algumas condições devem ser observadas nesse procedimento, tais como, evitar a evaporação da água vedando bem os frascos, cuidar para que sejam usadas culturas ativas, em fase de esporulação, e que o inóculo seja denso o bastante para garantir melhores índices de sobrevivência (McGinnis *et al.*, 1974; Qiangqiang *et al.*, 1998). Com este método, espécies de *Candida* têm apresentado sobrevivência após 4 anos ou mais, em temperatura ambiente. Uma grande variedade de espécies foi, então, submetida a este tipo de manutenção, com relatos de sobrevivência de até 20 anos. Dados publicados em estudo com 1583 isolados de leveduras, mantidas por longos períodos em água destilada, mostraram que espécies do gênero *Candida* apresentam elevados índices de sobrevivência,

entre 88 e 100%, em períodos superiores a 10 anos de armazenamento. Exceção foi apresentada pela espécie *C. krusei*, que mostrou índices de 92% após armazenamento num período entre 1 e 3 anos, caindo para 20% de sobrevivência após 10 anos. Para outras espécies, a porcentagem de sobrevivência após 10 anos foi de 80%, e para *Saccharomyces cerevisiae* foi de apenas 20%, quando empregado este método (Odds, 1991).

Como são vários os métodos de armazenamento que se destinam à preservação de uma infinidade de grupos de microrganismos, quando se deseja a manutenção de uma dada característica específica, variações na forma de armazenamento devem ser testadas para a obtenção de melhores resultados. Técnicas de transformação genética de diferentes organismos para manipulação e clonagem de cepas têm sido amplamente utilizadas. Com o objetivo de manter a habilidade de cepas de *Schizosaccharomyces pombe* e de *Saccharomyces cerevisiae* para transformação, Suga *et al.*, (2000) desenvolveram um método de criopreservação destes organismos utilizando sorbitol como protetor ao invés de glicerol ou dimetil sulfoxido, conseguindo células competentes por até 9 meses. Girão *et al.*, (2004) concluíram que o meio utilizado na preservação de *Malassezia pachydermatis* pode interferir na habilidade das cepas em hidrolisar a uréia após meses de armazenamento, sendo que o ágar Dixon acrescido de glicerol é o mais recomendado para este fim. A manutenção de leveduras fermentadoras utilizadas em processos de panificação pode ser melhorada aumentando sua capacidade de armazenar trealose, ou fornecendo trealose exógena, que pode ser utilizada como crioprotetor em massas de pão congeladas (Hino *et al.*, 1990; Takagi *et al.*, 1997; Hirasawa *et al.*, 2001).

É mencionado na literatura que o método de escolha para o armazenamento de cepas de microrganismos tem influência direta na expressão de suas propriedades fisiológicas e bioquímicas, e pode, inclusive, promover alterações genéticas (Kirsop & Snell, 1984; Abadias *et al.*, 2001). A manutenção das características morfológicas e fisiológicas das cepas, bem como a preservação de suas propriedades, são atualmente alvos de preocupação por parte dos pesquisadores, ao se empregar o armazenamento de cepas para diferentes finalidades, desde coleções de culturas, pesquisas, estudos taxonômicos e uso industrial. Entretanto, informações científicas precisas neste sentido

ainda são escassas. Santos *et al.* (2002) estudaram a influencia da técnica de preservação de *Penicillium expansum* em relação à produção de micotoxinas. Para uma das micotoxinas estudadas, a citrinina, a produção se mostrou estável, enquanto que para a outra substância, a patulina, melhores resultados foram obtidos com estocagem em sílica gel e liofilização. Mutantes do fungo dimórfico *B. dermatitidis* com virulência atenuada foram obtidos após transferências seriadas *in vitro* a 37°C (Brass *et al.*, 1982).

Pesquisas semelhantes, que visam detectar a variabilidade fenotípica e genotípica de leveduras do gênero *Candida*, em relação ao método de armazenamento se justificam, visando contribuir para direcionar e subsidiar cientificamente os laboratórios que necessitam manter coleções de culturas destes microrganismos. Neste sentido, esta pesquisa tem a finalidade de comparar métodos de armazenamento de algumas espécies de leveduras, principalmente do gênero *Candida*, não somente quanto à manutenção da viabilidade celular, que são aspectos já parcialmente descritos na literatura, mas também analisar várias características celulares e culturais, que envolvem seu reconhecimento, desde a micromorfologia, até o comportamento bioquímico e secreção de enzimas relacionadas à virulência, entre outras características. Concomitantemente, estudos serão feitos, sobre a variabilidade genotípica dessas amostras, sendo tais características de fundamental importância no processo de identificação e caracterização destes microrganismos.

3. PROPOSIÇÃO

O Presente estudo tem como propósito:

1. Verificar a manutenção da viabilidade e pureza de culturas de seis espécies de leveduras após armazenamento por cinco diferentes métodos de conservação laboratorial de microrganismos.

2. Avaliar a influência destes métodos de manutenção laboratorial sobre as características morfológicas e bioquímicas das leveduras através de testes fenotípicos.

3. Avaliar a ocorrência de variações genotípicas no padrão do Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso (*Random Amplified Polymorphic DNA – RAPD*) das amostras de leveduras após conservação laboratorial pelos cinco diferentes métodos escolhidos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostras

Para se estudar as características morfológicas e bioquímicas das amostras armazenadas sob diferentes condições de manutenção, foram utilizadas cepas padrão de seis espécies de leveduras (Quadro 1).

Quadro 1

Relação de cepas padrão utilizadas no estudo

Espécie	Código da cepa
<i>Candida utilis</i>	CBS 5609
<i>Candida parapsilosis</i>	CBS 604
<i>Candida tropicalis</i>	CBS 94
<i>Candida albicans</i>	CBS 562
<i>Candida dubliniensis</i>	CBS 7987
<i>Kluyveromyces marxianus</i> (fase anamorfa: <i>C. kefir</i>)	IZ 1339

*Cepas CBS são provenientes do banco internacional de microrganismos 'Centraalbureau voor Schimmelcultures'; a cepa IZ é proveniente do Banco de microrganismos do Instituto Zimotécnico (Esalq-USP).

4.2. Métodos de manutenção de culturas

Antes de serem armazenadas (período considerado neste estudo como tempo "zero" de armazenamento), as amostras foram submetidas aos testes fenotípicos descritos no item 4.5, e o seu DNA foi extraído e conservado a -20°C. Os resultados dos testes foram registrados para posterior comparação com os resultados dos mesmos testes, sob as mesmas condições, obtidos após o armazenamento, de acordo com os diferentes métodos de conservação selecionados. Após o término dos ensaios, as amostras foram armazenadas segundo os métodos de manutenção descritos abaixo. Todas as amostras foram estocadas em duplicata para cada método de conservação, com exceção do YPD-glicerol que foi feita quadruplicata e liofilização com 6 ampolas para cada cepa.

4.2.1. Manutenção em ágar com transferências seriadas.

As amostras foram semeadas na superfície do meio Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) em tubo inclinado, com auxílio de alça de platina. Após crescimento por 48 horas a 30°C os tubos foram mantidos sob refrigeração a uma temperatura entre 4 e 8°C, com transferências para meios novos realizadas em intervalos de 30 dias. Ao final de cada período, foi efetuada a bateria de testes morfológicos e bioquímicos adotada para o estudo, repicando-se as amostra para placas de Petri contendo SDA.

4.2.2. Manutenção em óleo mineral.

Para este método de armazenamento, os isolados foram cultivados sobre ágar inclinado (Meio Completo para Leveduras – Anexo 1), em tubos com tampa de rosca. As amostras foram incubadas em estufa a 30°C por 48 horas e, após crescimento, os cultivos foram submersos em óleo mineral e acondicionados sob refrigeração (4 a 8°C). As reativações ocorreram a cada período de 3 meses, tomando-se uma alçada do cultivo em óleo mineral e repicando-se a levedura em placa de Petri contendo SDA (48 horas – 30°C), acondicionando-se novamente o tubo original sob refrigeração.

4.2.3. Armazenamento em água destilada.

Após crescimento em SDA, cerca de 8 a 10 colônias de cada amostra de levedura foram suspensas em água destilada esterilizada em tubos de ensaio com tampa de rosca. Após vedação do frasco com Para-Film®, estes foram armazenados em temperatura ambiente. Os testes morfológicos e bioquímicos foram feitos em intervalos de 3 meses, tomando-se uma alçada da suspensão e semeando-a em SDA (48 horas – 30°C), após o que, o tubo com a suspensão era devolvido ao local de armazenamento até a próxima reativação.

4.2.4. Congelamento em freezer a -70°C.

As amostras foram cultivadas em caldo YPD (Anexo 1), sob agitação a 30°C, *overnight*. Após crescimento, 0,8 mL do caldo da cultura (aprox. 10^7 cél/mL) foi transferida para tubos *Eppendorf* de 1,5mL, adicionando-se 0,2 mL de glicerol a 80%, os quais foram armazenados em freezer a - 70°C, em duplicata. A concentração final de glicerol obtida foi de 16% (Spencer & Spencer, 1996). A cada intervalo de 06 meses, as amostras foram subcultivadas para a verificação do comportamento das amostras frente aos testes propostos. Para tanto, um raspado da superfície do meio, ainda congelado, foi retirado e transferido para placa contendo SDA, incubando-a a 30°C por 48 horas.

4.2.5. Liofilização

A liofilização das células leveduriformes foi feita pela técnica de pré-congelamento utilizando-se o aparelho Jouan LP3 (Jouan Inc., Winchester, VA). As amostras foram cultivadas em caldo YM (Anexo 1) a 30°C por 48 horas. A suspensão celular foi preparada adicionando-se leite desnatado a 20% como crioprotetor. Foram misturados volumes iguais do inóculo em meio de cultura e de leite desnatado. Ampolas de vidro boro-silicato de 10mm de diâmetro e 14cm de comprimento, previamente preparadas e esterilizadas, foram inoculadas com cerca de seis gotas da suspensão (0,2mL), utilizando-se pipetas Pasteur esterilizadas. Com o auxílio de um maçarico, foi feita uma constrição na ampola para facilitar o fechamento a vácuo após a liofilização. As amostras foram congeladas em freezer -70°C *overnight*. Imediatamente após serem retiradas do freezer as ampolas foram posicionadas no liofilizador em funcionamento, sendo a liofilização processada por cerca de 6 horas. Após este período as ampolas foram seladas a vácuo com maçarico e depois retiradas do liofilizador e armazenadas em caixas de papelão em temperatura ambiente (Muro & Luchi, 1989; Spencer & Spencer, 1996).

Foram confeccionadas 6 ampolas de cada amostra liofilizada. A cada 6 meses, um exemplar de cada amostra foi revitalizada em caldo YPD e submetida aos testes descritos no estudo.

4.3. Reativação das amostras

Após cada intervalo de tempo previamente programado para os diferentes métodos de armazenamento, as amostras foram revitalizadas pelo cultivo em meio SDA através da técnica de esgotamento e incubadas em estufa a 30°C por 48 horas. As amostras que apresentaram déficit de crescimento ou ausência total de crescimento foram cultivadas em meio líquido BHI, por 24 a 48 horas e recultivadas em SDA. Foram considerados viáveis os isolados com presença de crescimento sobre a superfície do ágar e que apresentaram células leveduriformes características na microscopia (coloração de gram).

Após crescimento os isolados foram submetidos a dois repiques em SDA previamente aos testes fenotípicos descritos no item 4.5.

4.4. Viabilidade celular com Azul de metileno

Testes de viabilidade celular foram levados a efeito nos intervalos dos processos de manutenção das amostras através da contagem de células viáveis com azul de metileno. Um caldo da cultura ou suspensões preparadas em água destilada ou meio de cultura esterilizados foram corados com solução de azul de metileno a 0,01% e visualizadas em Câmara de Neubauer. Esta foi posicionada em microscópio ótico para contagem das células viáveis. As células que apareciam com a cor azul pela absorção do corante eram consideradas inviáveis e as que não absorviam o corante eram consideradas viáveis. De cada amostra contava-se um total de 500 células entre viáveis e inviáveis obtendo-se o resultado em porcentagem.

4.5. Avaliação das amostras através de testes fenotípicos

Todas as amostras foram submetidas aos testes fenotípicos que compõem o estudo, antes do armazenamento pelos diferentes métodos escolhidos e a cada intervalo definido para os cinco diferentes sistemas de manutenção de leveduras, como se segue:

4.5.1 Cultivo em meio CHROMagar Candida®

Após a reativação das amostras, estas foram semeadas em placas contendo CHROMagar Candida®, meio seletivo cromogênico. Neste meio algumas espécies do gênero *Candida* produzem colônias com coloração diferenciada, o que permite sua identificação presuntiva (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*). Foi possível também, através do cultivo neste meio, a confirmação da ausência de contaminação, pois possíveis contaminações seriam visíveis, indicadas pela presença de colônias de coloração e aspectos diferentes numa mesma amostra cultivada (Baumgartner *et al.*, 1996; Koehler *et al.*, 1999).

4.5.2. Formação do tubo germinativo

Com a finalidade de visualizar a formação do tubo germinativo pelas espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis*, foi preparada uma cultura de 24 horas das amostras a serem testadas. Uma alçada da cultura foi suspensa em 200 µL de soro humano estéril, previamente pipetado em um tubo "eppendorf" de 1,5mL. Este foi incubado em Banho-Maria a 37°C por 2 a 3 horas. Após este período de incubação, uma gota da suspensão foi colocada sobre lâmina de vidro, cobrindo-se com lamínula e examinada ao microscópio óptico (objetiva 40x). A presença de tubo germinativo foi caracterizada como positiva, pela formação de um prolongamento das células leveduriformes, formando uma estrutura semelhante a um 'tubo' de duas a três vezes maior do que a célula mãe, sem constrição na base da célula.

4.5.3. Produção de clamidoconídios e pseudo-hifas

Para a realização deste teste, foi utilizado o meio Ágar-Fubá com Tween 80. O meio foi preparado e autoclavado conforme especificado no Anexo 1 e acondicionado sob refrigeração a 5°C. No dia do experimento, o meio foi fundido e distribuído em placas de petri 90x15mm, descartáveis. Após solidificação, foram feitas três estrias sob o ágar com o auxílio de agulha de níquel-cromo para semeadura microbiológica. O cultivo foi coberto com lamínula esterilizada e as placas cobertas com papel alumínio e incubadas a temperatura ambiente, durante 48 a 96 horas. As placas foram analisadas em microscópio óptico, dentro deste período, em intervalos regulares de 24 horas. Foram observadas as estruturas características de leveduras do gênero *Candida*, a saber: blastoconídios, clamidoconídios, hifas e pseudo-hifas.

4.5.4. Fermentação de carboidratos

Foi utilizado o meio básico para fermentação, com indicador de pH púrpura de bromocresol (Anexo 1). Cada tubo com o meio continha um tubo de "Durhan" invertido, para a detecção da formação de gás. Foram usados os açúcares glicose, sacarose, galactose, maltose e lactose. Cada açúcar foi adicionado separadamente a porções do meio posteriormente distribuído em tubos de ensaio, de forma que cada amostra de levedura foi testada com cada um dos açúcares individualmente. Foi preparado um inóculo com a amostra da levedura, tomando-se uma porção do cultivo em SDA e suspendendo-o em água destilada esterilizada. O inóculo foi padronizado de acordo com a turvação do tubo número 5 da 'Escala de McFarland'. Aos tubos contendo 4mL do meio para fermentação, foram adicionados 200µL do inóculo anteriormente preparado. Os ensaios foram incubados a 30°C por até duas semanas ou até definição da identificação, com leituras seqüenciais a cada 24 horas. Os critérios para a leitura foram baseados na alteração de pH do meio, com mudança de coloração e produção de gás, visível pela formação de bolhas nos tubos de "Durhan" invertidos.

4.5.5. Assimilação de carboidratos

Para a prova de assimilação de carboidratos, foi preparado o "meio C", meio sólido de composição definida, isento de fontes de carbono (Anexo 1). Foi utilizado um cultivo da amostra de 24 a 48 horas a 30°C em SDA, para se preparar um inóculo em água destilada esterilizada, de acordo com o padrão de turvação do tubo número 5 da 'Escala de McFarland'. Este inóculo foi misturado ao meio C fundido, com temperatura estabilizada em 50°C em Banho-Maria, e posteriormente, distribuído em placas de petri 150x15mm, esterilizadas. Após a solidificação, pequenas porções de 10 carboidratos em pó foram distribuídos sobre a superfície do ágar, em pontos equidistantes numerados de 1 a 10, correspondentes aos seguintes carboidratos: 1 – glicose, 2 – sacarose, 3 – galactose, 4 – rafnose, 5 – xilose, 6 – trealose, 7 – maltose, 8 – lactose, 9 – melibiose e 10 – manitol. As placas foram incubadas a 30°C por 72 horas. As leituras foram feitas a cada 24 horas. A assimilação positiva do açúcar pela levedura foi evidenciada pela formação de halo de turvação no ágar, em volta do respectivo açúcar. A ausência do halo indicou que a levedura não foi capaz de crescer utilizando-se de tal açúcar como única fonte de Carbono e, portanto, a assimilação foi negativa.

No Anexo 4, estão descritas as características bioquímicas quanto à fermentação e assimilação das principais espécies de leveduras, que servem de base para a análise dos resultados.

4.5.6. Prova de termotolerância a 45°C

Para a caracterização das espécies segundo a capacidade de crescimento sob temperatura de 45°C, uma colônia de cada isolado foi tomada de um cultivo em SDA e semeado em outra placa com mesmo meio, em forma de estrias descontínuas. Esta semeadura foi feita em duplicata incubando-se uma placa a 45°C e outra a 37°C. A leitura foi realizada após 48 horas de incubação, analisando-se a presença ou não de crescimento, registrando-se os resultados como crescimento ausente, parcial ou completo.

4.5.7. Detecção de enzimas proteolíticas - proteinases e fosfolipases

As amostras foram inoculadas em frascos contendo 4 mL de meio YPD e incubadas a 30°C durante 18 horas. Decorrido o tempo de incubação, 1.5mL do cultivo da levedura foram transferidos para tubos *Eppendorf* e centrifugados a 3.000 rpm por 5 minutos. Os sedimentos obtidos deste procedimento, foram ressuspensos em solução salina (NaCl 0,9%) e centrifugados por mais duas vezes nas mesmas condições, para remoção dos resíduos de meio de cultivo. As concentrações das suspensões das cepas foram padronizadas em espectrofotômetro Genesys 10uv (Spectrom Unicam, Rochester, NY) em absorbância de 1,2 (+/-0,05), o que corresponde a uma concentração de aproximadamente 1×10^7 UFC/mL, para as amostras testadas. Volumes de 5µL desta suspensão foram adicionados com o auxílio de uma micropipeta, em pontos equidistantes, respectivamente, sobre os meios Ágar Fosfolipase e Ágar Proteinase (Anexo 1). Os testes foram feitos em duplicata. As placas contendo 4 inóculos de diferentes cepas para detecção de proteinase foram incubadas a 37°C durante 7 dias (Ruchel *et al.*, 1982) e para fosfolipase por 4 dias sob a mesma temperatura (Price *et al.*, 1982). A presença da enzima fosfolipase foi observada pela formação de uma zona opaca ao redor da colônia de levedura e a zona de atividade enzimática (PZ) foi medida dividindo-se o diâmetro da colônia pelo diâmetro da colônia mais a zona de precipitação (zp). PZ foi codificada com um dígito de valores iguais a zero, 1 ou 2 (Quadro 2). A presença da enzima proteinase foi observada pela formação de um halo transparente ao redor da colônia de levedura, e a zona de atividade enzimática (PZ) foi medida conforme descrito acima para fosfolipase.

Quadro 2

Medidas de atividade enzimática para fosfolipase e proteinase

Valores de PZ	Atividade enzimática	Código/Índice
PZ = 1	Negativa	0
$PZ \geq 0,64 < 1$	Positiva - Moderada	1
$PZ \leq 0,63$	Positiva - Elevada	2

*Medida da atividade enzimática proposta por Price *et al.* (1982). A zona de atividade enzimática (PZ) é calculada, dividindo-se o diâmetro da colônia pelo diâmetro da colônia mais zona de precipitação.

4.5.8. Crescimento em caldo Sabouraud Hipertônico (NaCl 6,5%)

A capacidade de crescimento em meio contendo concentrações elevadas de cloreto de sódio (6,5%) foi avaliada preparando-se um inóculo em água destilada esterilizada, de acordo com o padrão de turvação do tubo número 0,5 da 'Escala de McFarland'. Um volume de 40µL deste inóculo foi adicionado a um tubo contendo 2 mL do caldo Sabouraud preparado com a adição de 6,5% de NaCl. Os tubos foram incubados em estufa a 30°C por até 96 horas e as leituras feitas a cada 24 horas. Após as 96 horas de incubação, os tubos com ausência de turvação, eram considerados negativos para este teste (Alves *et al.*, 2002).

4.6. Caracterização molecular por 'Randomly Amplified polymorphic DNA' - RAPD

A técnica de RAPD foi empregada na determinação do perfil molecular das amostras, comparando-se os perfis de uma mesma cepa, submetida aos vários métodos de conservação propostos. Para isso, o DNA das amostras foi extraído em duplicata, antes do armazenamento por cinco diferentes métodos de conservação e a cada seis meses de intervalo após o armazenamento, por um período total de 18 meses. O DNA obtido foi armazenado em freezer -20°C e posteriormente utilizado para realização do RAPD com a finalidade de confirmar a estabilidade genotípica e a manutenção dos padrões RAPD obtidos após armazenamento das cepas. Adicionalmente, nos tempos zero, 6, 12 e 18 meses, foi armazenado em freezer a -20°C um precipitado de células de cada amostra em duplicata. Estas células foram armazenadas para futuras extrações adicionais de DNA em caso de perda da qualidade ou necessidade de confirmação dos resultados.

4.6.1. Extração do DNA

Para a extração de DNA das células de leveduras foi empregada a técnica descrita por Doyle & Doyle (1990), com adaptações. As amostras foram inoculadas em frascos com 3 mL de meio YPD, e incubadas a 30°C por 18 horas. Após esse período,

1,5mL da cultura foi transferido para tubos de centrifugação de 1,5mL e centrifugadas (HAWK 15/5 Refrigerated Sanyo MSE) a 10.000 rpm por 5 minutos. Os sedimentos obtidos foram posteriormente lavados por duas vezes, com água destilada esterilizada. Em seguida foi iniciado o processo de extração do DNA.

Ao precipitado de células, foram adicionados 700 µL de tampão de extração, contendo Proteinase K a 100µg/mL (Anexo 2), homogeneizando-se em vórtex. Os tubos foram incubados em Banho Maria a 65°C por 60 minutos, sendo que a cada 15 minutos, as amostras foram homogeneizadas por inversão manual. A seguir, foram acrescentados 600µL de solução de clorofórmio/álcool isoamílico na proporção de 24:1, homogeneizados até formar uma emulsão, e submetidos à centrifugação a 12.000 rpm por 7 minutos. Em seguida, a fase aquosa que ficou na superfície foi transferida para um novo tubo (1,5mL) adicionado de 200 µL de tampão de extração sem proteinase K e 650 µL de solução de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1). Esta mistura foi homogeneizada e centrifugada a 12.000 rpm por 7 minutos.

Novamente, a fase aquosa foi transferida para outro tubo (1,5mL) e foi adicionada de 650 µL de solução de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1), seguida de centrifugação a 12.000 rpm por 7 minutos. O sobrenadante foi retirado e transferido para novo tubo (1,5mL). O DNA obtido foi precipitado com 500 µL de isopropanol, homogeneizado e centrifugado por 4 minutos a 12.000 rpm. A superfície do precipitado foi lavada com 300 µL de etanol a 70% e o tubo mantido em estufa a 37°C para secar por 6 horas. Decorrido este tempo, o DNA foi ressuspensão com 30µL de solução de TE (Anexo 3) com 10 µg/mL de RNase (Sigma), mantendo-se esta solução por 30 minutos em Banho Maria a 37°C para eliminar a contaminação com RNA. Após este período os tubos contendo as soluções de DNA foram armazenados em freezer a -20°C até o momento do uso.

4.6.2. Qualidade e padronização do DNA extraído

Para determinar a qualidade da solução de DNA obtida após a extração, este foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose a 1%. Foram utilizados 3µL de cada solução de DNA extraído, adicionados de 2µL de tampão de corrida azul em um gel de agarose (Invitrogen™) a 1%. Foi utilizado em cada eletroforese um padrão de peso molecular de 1Kb como referência. Após eletroforese em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) pH 8,0 (Anexo 3), por 1 hora a 60V, o gel foi corado com brometo de etídio, visualizado e fotografado em transiluminador ultravioleta. Pela observação da presença e intensidade da banda formada pelo DNA presente na solução, foi possível confirmar a existência de quantidade suficiente do mesmo para se empregar na reação de RAPD. Amostras com bandas muito intensas indicando quantidade maior de DNA foram diluídas para se obter concentrações aproximadas de DNA entre as amostras, afim de não interferir na reação de RAPD.

4.6.3. *Primers* utilizados no estudo

Nas reações de RAPD, foram testados inicialmente 7 *primers* arbitrários: 1) AP-3 – 5'TCACGATGCA3', (Sanz *et al.* 1998); 2); M2 – 5'CTTGATTGCC3', (Melo *et al.* 1998); 3) B-14 – 5'GATCAAGTCC3', (Bauer *et al.* 1993); 4) RP4-2 – 5'CACATGCTTC3', (Lehmann *et al.* 1992); 5) R108 – 5'GTATTGCCCT3', (Novak *et al.* 2004); 6) OPA-02 – 5'TGCCGAGCTG e 7) OPA-09 – 5'GGGTAACGCC3' (Pinto *et al.* 2004).

Foram selecionados dois *primers* com melhor definição de bandas para cada espécie, os quais foram empregados nas reações de RAPD no tempo zero, seis, doze e 18 meses de armazenamento, conforme o número de bandas e o poder discriminatório intra-específico de cada *primer* para cada espécie.

4.6.4. Randomly Amplified Polymorphic DNA – RAPD

A reação de RAPD foi padronizada com base nos estudos de Saarela *et al.* (1996) e Sansinforiano *et al.* (2001), na qual, cerca de 300ng de DNA foram adicionados a uma mistura de reagentes contendo solução tampão (10x Reaction Buffer Taq DNA Polymerase), 3,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP – dATP, dCTP, dGTP e dTPT (100 mM de dNTP Set, PCR Grade Invitrogen™), 1,5 μM de *primer*, 5 U Taq DNA Polymerase (Invitrogen™).

Em seguida, essa mistura de reagentes foi submetida ao termociclador convencional (GeneAmp PCR System 2400 – Perkin Elmer), de acordo com a seguinte programação: desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto, seguida de 40 ciclos com desnaturação a 94°C por 1 minuto, hibridização do *primer* a 40°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, concluindo com extensão a 72°C por 5 minutos. Os produtos resultantes da amplificação por RAPD foram conservados a -20°C até a determinação dos perfis moleculares por eletroforese em gel de agarose.

4.6.5. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos resultantes de RAPD foram analisados em eletroforese, em géis de agarose (Invitrogen™) preparado na concentração de 1%. A eletroforese foi processada a 96V por 200 minutos em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) pH 8,0 (Anexo 3). Em cada gel foi incluído um padrão de peso molecular de 100pb (DNA Ladder – invitrogen™). Após o término da separação eletroforética, os géis foram corados com brometo de etídio 0,5 μg/mL e as bandas formadas foram observadas com o auxílio de um transiluminador ultravioleta (Pharmacia LKB – Macro Vue).

4.6.6. Análise dos padrões eletroforéticos

Os géis obtidos, como resultado da eletroforese dos produtos de RAPD, foram fotografados em equipamento Image Master-VDS (Pharmacia Biotech) e as imagens analisadas, comparando-se o padrão de bandas obtido no DNA extraído no tempo zero de armazenamento com o padrão fornecido pelas amostras após 6, 12 e 18 meses, em cada método de manutenção. A análise foi feita considerando-se o número de bandas obtido e observados os perfis quanto ao aparecimento e desaparecimento das bandas ao se utilizar como referência para cada espécie o perfil demonstrado com o DNA extraído antes do armazenamento (tempo "zero").

5. RESULTADOS

5.1. Testes fenotípicos e extração de DNA para RAPD no tempo "zero" de armazenamento

Todos os dados obtidos com os testes fenotípicos no tempo "zero" foram registrados para posterior comparação dos resultados com os testes realizados após o armazenamento das amostras. As Tabelas 1 e 2 expressam esses resultados para cada uma das seis espécies incluídas no estudo.

Tabela 1

Perfil fenotípico das amostras de leveduras quanto à assimilação e à fermentação de carboidratos. Resultados de testes feitos no tempo "zero" de armazenamento em comparação com dados obtidos dos registros do Banco CBS (*CBS database*)

Amostras		Assimilação de Carboidratos										Fermentação de Carboidratos				
		G	S	Ga	R	X	T	M	L	Me	Ma	G	S	Ga	M	L
<i>C. utilis</i>	T0	+	+	-	+	+	+	+	-	-	wd	+	+	-	-	-
	CBS	+	+	-	+	+	+	+	-	-	wd	+	+	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	T0	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	
	CBS	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	wd	wd	-	-
<i>C. tropicalis</i>	T0	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	
	CBS	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	
<i>C. albicans</i>	T0	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	
	CBS	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	wd	+	?
<i>C. dubliniensis</i>	T0	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	
	CBS	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	wd	+	-
<i>K. marxianus</i>	T0	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	
	CBS 1089*	+	+	+	+	+	wd	-	-	-	-	+	+	wd	-	-

T0: Tempo "zero"; G: Glicose; S: Sacarose; Ga: Galactose; R: Rafnose; X: Xilose; T: Trealose; M: Maltose; L: Lactose; Me: Melibiose; Ma: Manitol; wd: weak-delayed (positivo fraco e tardio); +: positivo; -: negativo; ?: não testado.

* Por falta de dados da cepa IZ 1339, utilizamos como parâmetro os dados do *CBS database* referentes à cepa CBS 1089, da mesma espécie.

Tabela 2

Perfil fenotípico das amostras de leveduras no tempo "zero" de armazenamento, para os testes de CHROMagar Candida[®], Microcultivo, Tubo germinativo, crescimento em 45°C e produção de enzimas proteolíticas e crescimento em caldo hipertônico.

Cepa	Colônia em CH	Microcultivo	TG	Cresc. 45°C	Fosfolipase		Proteinase		NaCl 6,5%
					PZ	Índice	PZ	Índice	
<i>C. utilis</i>	Púrpura	PH raras e rudimentares	-	-	1	0	1	0	++
<i>C. parapsilosis</i>	Branca	Presença de PH, característico	-	-	1	0	1	0	++
<i>C. tropicalis</i>	Azul	Presença de PH, característico	-	+	1	0	0,33	2	++
<i>C. albicans</i>	Verde claro	Clamidoconídios e PH	++	+	0,49	2	0,19	2	+
<i>C. dubliniensis</i>	Verde claro	Clamidoconídios e PH	++	-	1	0	0,19	2	-
<i>K. marxianus</i>	Bege	Presença de PH, característico	-	++	1	0	0,24	2	-

CH: CHROMagar Candida[®]; PH: Pseudo-hifas; PZ: Zona de atividade enzimática; TG: Tubo germinativo; Índice: índice de atividade enzimática: 0 = negativa, 1 = positiva-moderada e 2 = positiva-elevada (Quadro 2 – Material e Métodos); ++: fortemente positivo; +: positivo; -: negativo.

5.1.1. Extração de DNA tempo "zero"

Todas as amostras tiveram seu DNA extraído em duplicata, no tempo "zero", antes de submetidas aos diferentes métodos de conservação celular. Após a extração, foram feitas eletroforeses em gel de agarose com o DNA extraído para controle de qualidade da extração. Através deste gel, a presença de DNA foi confirmada pela formação de uma banda visível após coloração com brometo de etídio (Figura 1). O gel de qualidade permitiu que se aproximasse as quantidades de DNA entre as amostras com o intuito de evitar possíveis alterações oriundas da utilização de concentrações de DNA muito diferentes nos testes de RAPD. A solução de DNA obtida foi estocada em tubos 'ependorf' a uma temperatura de -20°C para posterior utilização na reação de RAPD.

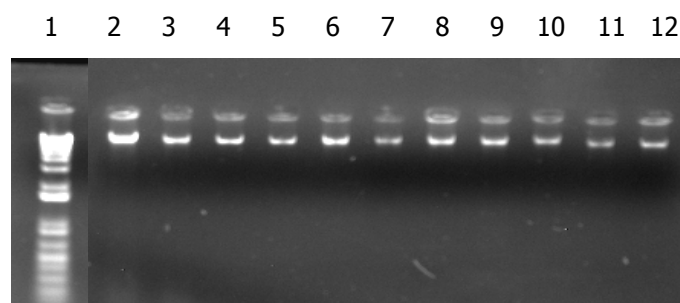


Figura 1 – Gel de qualidade de DNA. Canaleta 1: padrão de peso molecular 1Kb. Canaletas 2 a 12: amostras de solução de DNA após extração. O aparecimento de banda visível indica a presença de DNA na amostra.

5.2. Reativação das cepas e análise da viabilidade celular

Todas as seis espécies armazenadas em diferentes condições de manutenção foram reativadas a intervalos de tempo regulares de acordo com o método de armazenamento, como se segue:

- 1 - Armazenamento em SDA – Transferências seriadas (SDA-TS): 1 mês
- 2 - Armazenamento em água (A): 3 meses
- 3 - Armazenamento em SDA sob óleo mineral (SDA-O): 3 meses
- 4 – Congelamento YPD-glicerol 16% a -70°C (C): 6 meses
- 5 – Liofilização (L): 6 meses

O crescimento do repique em SDA a partir da amostra armazenada foi positivo para todas as cepas testadas nos 5 métodos de armazenamento em cada repetição. A exceção ocorreu para a cepa CBS 7987 (*C. dubliniensis*), armazenada em SDA sob óleo mineral, que não apresentou crescimento em SDA no mês 12. Para reativá-la, foi adicionado caldo BHI à cultura, incubando-a em estufa a 30°C por 48 horas, obtendo-se assim crescimento positivo. Embora este procedimento possibilitou a recuperação da amostra, esta foi inutilizada para os testes posteriores e a cepa foi armazenada

novamente em novos tubos, o que interrompeu a continuação das análises. Os resultados da avaliação da viabilidade celular em azul de metileno a 0,01% estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3

Viabilidade celular em azul de metileno para amostras de leveduras armazenadas em diferentes métodos de conservação. Média das seis espécies estudadas

	SDA-TS		Água		SDA-O		Liofilização		-70°C	
Período (meses)	9	18	9	18	9	18	6	18	6	18
% média de células viáveis entre as 6 espécies	91	90	98,3	96,6	96	88,6*	97	92	91	87

SDA-TS: Transferências seriadas em meio SDA; SDA-O: Manutenção em SDA sob óleo mineral.

*Exceto CBS 7987 – *C. dubliniensis*, cuja % de células viáveis foi inferior a 50% e o crescimento inicial em SDA foi negativo na reativação com 12 meses de conservação.

5.3. Testes fenotípicos para cada intervalo de tempo nos diferentes métodos de armazenamento

5.3.1. CHROMagar Candida®

Havendo crescimento das amostras em SDA, foram feitos os cultivos em CHROMagar Candida® para atestar a pureza e a manutenção das características das colônias. Todas as amostras em todos os sistemas de conservação, ao serem reativadas, mostraram-se puras quando cultivadas neste meio, não apresentando vestígios de contaminação bacteriana ou por outra espécie de levedura. Foi possível verificar que as leveduras estudadas mantiveram suas características, como coloração e textura das colônias, não sofrendo alterações visíveis nestes aspectos durante todo o período em que permaneceram armazenadas. O aspecto do cultivo de todas as amostras estudadas

apresentou-se sempre com colônias cremosas e brilhantes e a coloração obtida para cada espécie está demonstrada nas Figuras 2 e 3.

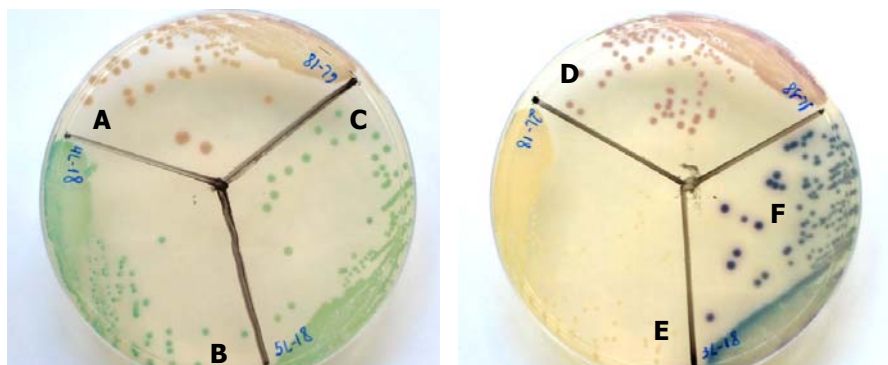


Figura 2 – Cultivos de leveduras em CHROMagar Candida®. Relação de espécies com a coloração das colônias: A: bege – *K. marxianus* IZ 1339, B e C: verdes – *C. albicans* CBS 562 e *C. dubliniensis* CBS 7987, D: púrpura – *C. utilis* CBS 5609, E: branca – *C. parapsilosis* CBS 604 e F: azul – *C. tropicalis* CBS 94.

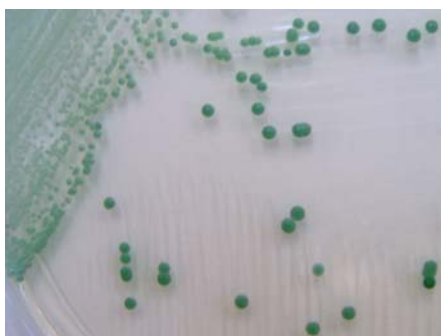


Figura 3 – Cultivo de 48 horas de *C. albicans* em CHROMagar Candida®. Colônias verdes cremosas e homogêneas.

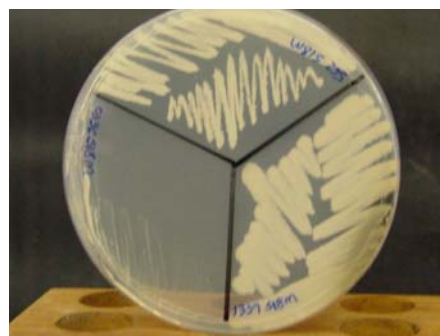


Figura 4 – Placa de SDA com cultivo de três espécies de leveduras, incubada à 45°C.

5.3.2. Teste de crescimento em 45°C

No teste de crescimento em temperatura de 45°C, todas as espécies analisadas, armazenadas por cinco técnicas de conservação, não sofreram alterações nos seus resultados, permanecendo o mesmo perfil observado no teste inicial (tempo "zero"). A Figura 4 demonstra uma placa com cultivo de três espécies de levedura após incubação a 45°C por 48 horas.

5.3.3. Micromorfologia e formação de tubo germinativo

A prova do microcultivo mostrou características estáveis quanto à produção e arranjo de blastoconídios e pseudo-hifas, para todas as espécies após serem armazenadas nos diferentes métodos de preservação, com leituras em 48 horas de incubação (Figura 5). Os perfis morfológicos das cepas CBS 7987 (*C. dubliniensis*) e CBS 562 (*C. albicans*) não foram alterados, porém, a produção de clamidoconídios, característica destas duas espécies, foi mais lenta em alguns ensaios. Ambas as espécies apresentaram produção abundante desta estrutura no teste realizado no tempo "zero". Após o armazenamento, os ensaios relacionados no quadro abaixo tiveram a produção de clamidoconídios escassa com positividade depois de 72 ou 96 horas de incubação.

Quadro 3

Ensaio com produção de clamidoconídios com mais de 48 horas de incubação para *C. albicans* e *C. dubliniensis*

Cepa	Produção de clamidoconídio com 72 ou 96 horas
CBS 562 <i>C. albicans</i>	- SDA - Transferência seriada / 11 meses - Água / 15 meses - SDA - Óleo / 15 meses - Liofilização / 12 meses
CBS 7987 <i>C. dubliniensis</i>	- SDA - Transferência seriada / 6, 11, 12 e 15 meses - Água / 6, 12 e 15 meses - Liofilização / 12 e 18 meses - Congelamento / 18 meses

Tanto *C. albicans* como *C. dubliniensis* apresentaram formação positiva de tubo germinativo em soro humano em todos os testes realizados neste período, com leituras realizadas entre 2 horas e 2 horas e 30' de incubação. As demais espécies foram sempre negativas para este teste.

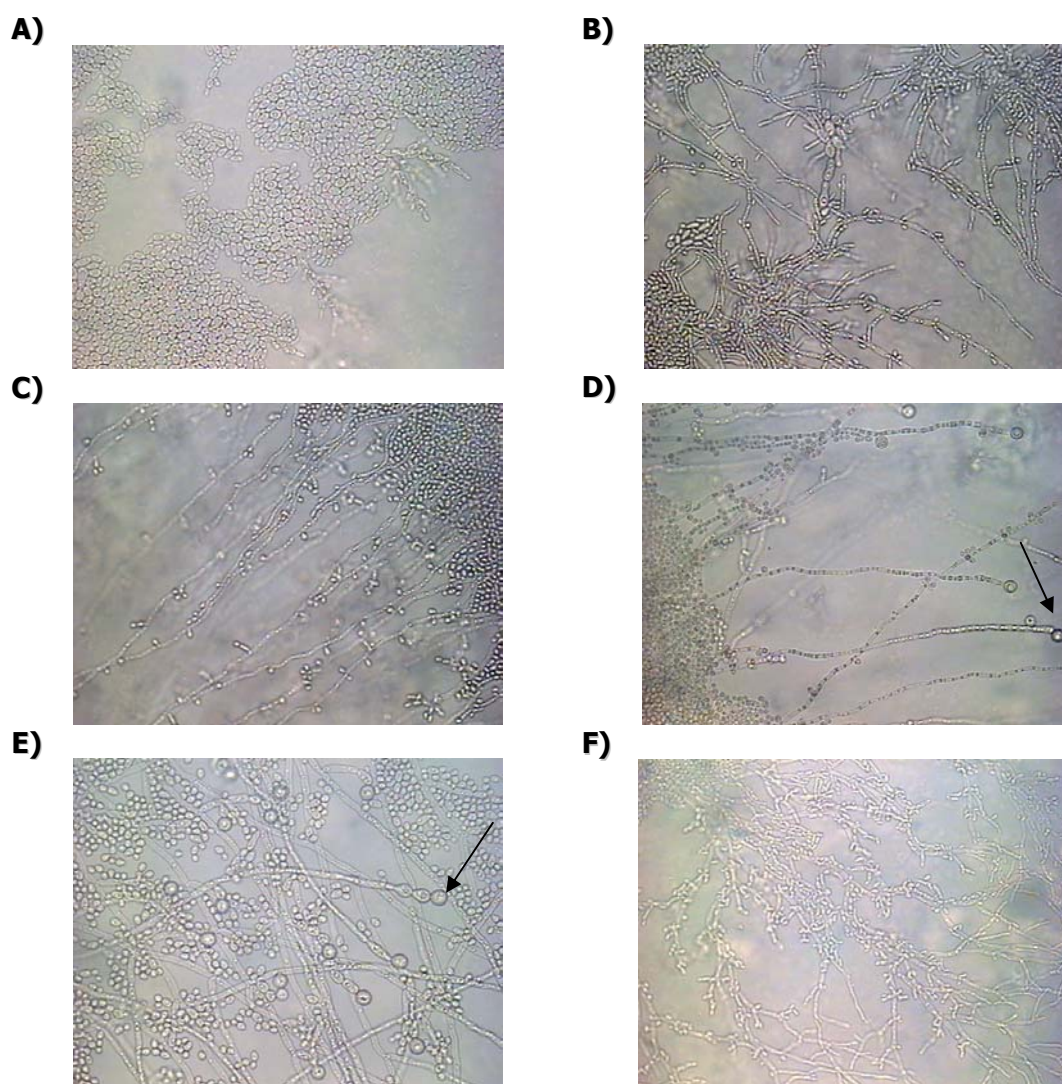


Figura 5 – Micromorfologia vista em cultivo em Ágar Fubá das seis amostras de leveduras estudadas. A: CBS 5609 *C. utilis*, B: CBS 604 *C. parapsilosis*, C: CBS 94 *C. tropicalis*, D: CBS 562 *C. albicans*, E: CBS 7987 *C. dubliniensis* e F: IZ 1339 *K. marxianus* (*C. kefir*). Observar clamidoconídios indicados pelas setas.

5.3.4. Assimilação e fermentação de carboidratos

O perfil de assimilação e fermentação de carboidratos não apresentaram modificações nos seus resultados após armazenamento pelos 5 métodos testados, considerando-se todas as amostras estudadas, durante o período analisado (Figuras 6 e 7). Em alguns ensaios, foi observado que a assimilação ou a fermentação de determinados carboidratos por algumas amostras apresentou-se mais lenta, não comprometendo, entretanto, o resultado final.



Figura 6 – Assimilação de carboidratos. A presença de halo de turvação no ponto onde foi adicionado o carboidrato indica assimilação positiva do mesmo.

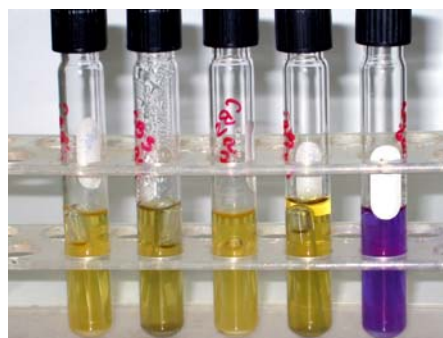


Figura 7 – Fermentação de carboidratos. Reação positiva evidenciada pela mudança de coloração do meio de roxo para amarelo e formação de bolhas de gás.

5.3.5. Produção de proteinases e fosfolipases:

A maioria das espécies analisadas apresentou pequenas variações no perfil de produção de enzimas proteolíticas (proteinases e fosfolipases) com o decorrer do tempo de conservação, para pelo menos uma classe de enzimas. Tais alterações foram detectadas em testes isolados, que em geral não se mantinham estáveis, voltando a apresentar resultados iguais ao tempo “zero” em testes subsequentes (Quadros 4 e 5). A cepa que apresentou maior número de ensaios com alterações foi a CBS 604 (*C. parapsilosis*) para proteinase. Para esta cepa, dentre todos os ensaios de produção de proteinase executados, 41% apresentaram resultados diferentes com relação ao

apresentado no tempo "zero" (Tabela 4). Um modelo de teste de atividade enzimática para fosfolipases e proteinases está expresso na Figura 8.

Quadro 4

Relação de ensaios de atividade de **proteinases** de cepas conservadas em diferentes métodos, com resultados diferentes em relação ao tempo "zero" de armazenamento

	PZ Tempo "zero" (índice de PZ)	Testes com variações em relação ao tempo "zero"		
		Método de conservação	Tempo (meses)	Valores de PZ (índice*)
<i>C. utilis</i> CBS 5609	PZ=1 (0)	–	–	–
<i>C. parapsilosis</i> CBS 604	PZ=1 (0)	SDA-TS	1 m	0,26 (2)
			2 m	0,22(2)
			3 m	0,35 (2)
			4 m	0,53 (2)
			7 m	0,34 (2)
			8 m	0,27 (2)
		Água	9 m	0,33 (2)
			10 m	0,31 (2)
			14 m	0,3 (2)
		SDA-O	9 m	0,36 (2)
			12 m	0,3 (2)
			18 m	0,53 (2)
Liofilização Congelamento	3 m	0,36 (2)		
	9 m	0,3 (2)		
			12 m	0,28 (2)
			6 m	0,32 (2)
			6 m	0,33 (2)
			6 m	0,33 (2)
<i>C. tropicalis</i> CBS 94	PZ=0,33 (2)	SDA-TS	3 m	0,66 (1)
			5 m	0,75 (1)
<i>C. albicans</i> CBS 562	PZ = 0,19 (2)	–	–	–
<i>C. dubliniensis</i> CBS 7987	PZ = 0,19 (2)	–	–	–
<i>K. marxianus</i> IZ 1339	PZ = 0,24 (2)	SDA-TS	15 m	1 (0)
			6 m	1 (0)
		Água	15 m	1 (0)
			15 m	1 (0)
		SDA-O	15 m	1 (0)
			18 m	1 (0)
		Liofilização Congelamento	18 m	1 (0)
12 m	1 (0)			
			18 m	1 (0)

*PZ: Zona de atividade enzimática; índice 0: atividade enzimática negativa; 1: atividade positiva – média; 2: atividade positiva – elevada (ver Quadro 2 – Material e Métodos).

Quadro 5

Relação de ensaios de atividade de **fosfolipases** de cepas conservadas em diferentes métodos, com resultados diferentes em relação ao tempo "zero" de armazenamento

	PZ Tempo "zero" (índice de PZ)	Testes com variações em relação ao tempo "zero"		
		Método de conservação	Tempo (meses)	Valores de PZ (índice*)
<i>C. utilis</i> CBS 5609	PZ=1 (0)	–	–	–
<i>C. parapsilosis</i> CBS 604	PZ=1 (0)	SDA-TS	4 m	0,75 (1)
			5 m	0,82 (1)
<i>C. tropicalis</i> CBS 94	PZ=1 (0)	SDA-TS	1 m	0,71 (1)
			2 m	0,72 (1)
			4 m	0,8 (1)
			5 m	0,76 (1)
<i>C. albicans</i> CBS 562	PZ = 0,49 (2)	SDA-TS	1 m	1 (0)
			2 m	0,71 (1)
		SDA-O Liofilização	6 m	0,66 (1)
			6 m	0,8 (1)
<i>C. dubliniensis</i> CBS 7987	PZ = 1 (0)	–	–	–
<i>K. marxianus</i> IZ 1339	PZ = 1 (0)	–	–	–

* índice 0: atividade enzimática negativa; 1: atividade positiva-moderada; 2: atividade positiva-elevada (ver Quadro 2 – Material e Métodos).

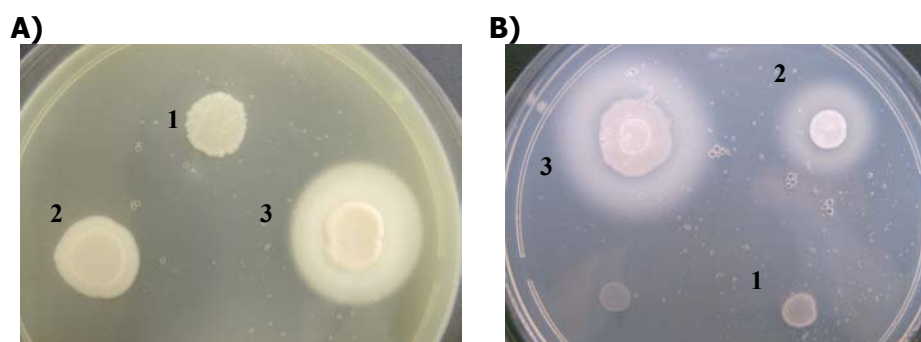


Figura 8 – Teste de fosfolipase (A) e proteinase (B). 1 – negativa; 2 – positiva-moderada e 3 – positiva-elevada.

Tabela 4

Índices de atividade enzimática para fosfolipase e proteinase testados em diferentes períodos de tempo de armazenamento das amostras, sob diferentes condições

<i>C. utilis</i> CBS 5609	n. de testes realizados no período	N. de resultados enquadrados por índice de atividade enzimática					
		Fostolipase			Proteinase		
		índice 0	índice 1	índice 2	índice 0	índice 1	índice 2
SDA-TS	19	19	0	0	19	0	0
Água	7	7	0	0	7	0	0
SDA-O	7	7	0	0	7	0	0
Liofilização	4	4	0	0	4	0	0
-70°C	4	4	0	0	4	0	0
<i>C. parapsilosis</i> CBS 604							
SDA-TS	19	17	2	0	10	0	9
Água	7	7	0	0	4	0	3
SDA-O	7	7	0	0	4	0	3
Liofilização	4	4	0	0	3	0	1
-70°C	4	4	0	0	3	0	1
<i>C. tropicalis</i> CBS 94							
SDA-TS	19	15	4	0	0	2	17
Água	7	7	0	0	0	0	7
SDA-O	7	7	0	0	0	0	7
Liofilização	4	4	0	0	0	0	4
-70°C	4	4	0	0	0	0	4
<i>C. albicans</i> CBS 562							
SDA-TS	19	1	2	16	0	0	19
Água	7	0	0	7	0	0	7
SDA-O	7	0	1	6	0	0	7
Liofilização	4	0	1	3	0	0	4
-70°C	4	0	0	4	0	0	4
<i>C. dubliniensis</i> CBS 7987							
SDA-TS	19	19	0	0	0	0	19
Água	7	7	0	0	0	0	7
SDA-O	5	5	0	0	0	0	5
Liofilização	4	4	0	0	0	0	4
-70°C	4	4	0	0	0	0	4
<i>K. marxianus</i> IZ 1339							
SDA-TS	19	19	0	0	1	0	18
Água	7	7	0	0	2	0	5
SDA-O	7	7	0	0	1	0	6
Liofilização	4	4	0	0	1	0	3
-70°C	4	4	0	0	2	0	2

5.3.6. Crescimento em Caldo Sabouraud Hipertônico (NaCl 6,5%)

Para este teste, as cepas CBS 604 (*C. parapsilosis*) CBS 94 (*C. tropicalis*) e CBS 7987 (*C. dubliniensis*) e IZ 1339 (*K. marxianus*) não apresentaram alterações em seu perfil obtido no tempo "zero" de armazenamento, em nenhum dos testes para todos os métodos de conservação empregados. A cepa 5609 (*C. utilis*), que no primeiro teste apresentou crescimento positivo, não cresceu neste meio nos seguintes ensaios: SDA-TS – 11 meses; Água – 12 meses e SDA-O – 12 meses. Estas alterações ocorreram em ensaios isolados, sendo que a cepa readquiriu sua capacidade de crescer no meio hipertônico nos ensaios subsequentes. Para a cepa CBS 562 (*C. albicans*) a habilidade de crescer em meio hipertônico foi perdida em ensaios feitos para amostras de todos os métodos de conservação. No meio SDA-TS e na Água as amostras começaram a ser negativas para este teste com 12 meses de conservação e para SDA-O com 9 meses, sendo que para estes três métodos não houve retomada de crescimento nos ensaios subsequentes até 18 meses de armazenamento, quando foram finalizados os testes. Para as amostras liofilizadas, o crescimento em meio hipertônico foi negativo no ensaio do mês 12 e retomada a positividade no ensaio seguinte (mês 18). Com relação às amostras congeladas, os ensaios foram negativos para o mês 6 e 12, retomando a capacidade de crescimento no mês 18.

5.4. Perfil genotípico por RAPD

Sete *primers* foram testados em reações de RAPD com todas as seis espécies incluídas no estudo. De acordo com o perfil e o número de bandas obtidos (entre 8 e 10 bandas), dois *primers* com melhor padrão e melhor poder discriminatório foram escolhidos para cada cepa, como se segue:

CBS 5609 – *primers* AP3 e OPA-02

CBS 604 – *primers* AP3 e OPA-09

CBS 94 – *primers* AP3 e RP4-2

CBS 562 – *primers* AP3 e OPA-09

CBS 7987 – *primers* R108 e OPA-09

IZ 1339 – *primers* R108 e OPA-02

Após escolhidos os *primers*, foram feitas as reações de RAPD com DNA extraído de cada cepa no tempo “zero” e a cada seis meses para cada método de armazenamento. Todas as amplificações por RAPD foram repetidas pelo menos por duas vezes para atestar sua reprodutibilidade. As bandas mais intensas obtidas em cada padrão foram reprodutíveis, mesmo com diferentes extrações de DNA de uma mesma amostra. Porém, diferenças foram observadas em algumas bandas de baixa densidade. Entretanto, em análises comparativas, somente as bandas de maior densidade são utilizadas. Cada *primer* gerou entre 7 e 14 bandas de maior densidade, com uma média de 9 bandas para cada padrão obtido entre as seis espécies analisadas.

As Figuras 9 e 10 demonstram os padrões observados das espécies testadas, após eletroforese em gel de agarose com um dos *primers* testados. Os perfis de RAPD obtidos com DNA extraído nos tempos 6, 12 e 18 meses não apresentaram diferenças entre si ou quando comparados com o perfil de RAPD obtido com DNA do tempo “zero” em todas as espécies testadas com dois *primers* diferentes. Este resultado se manteve em pelo menos duas reações de RAPD independentes.

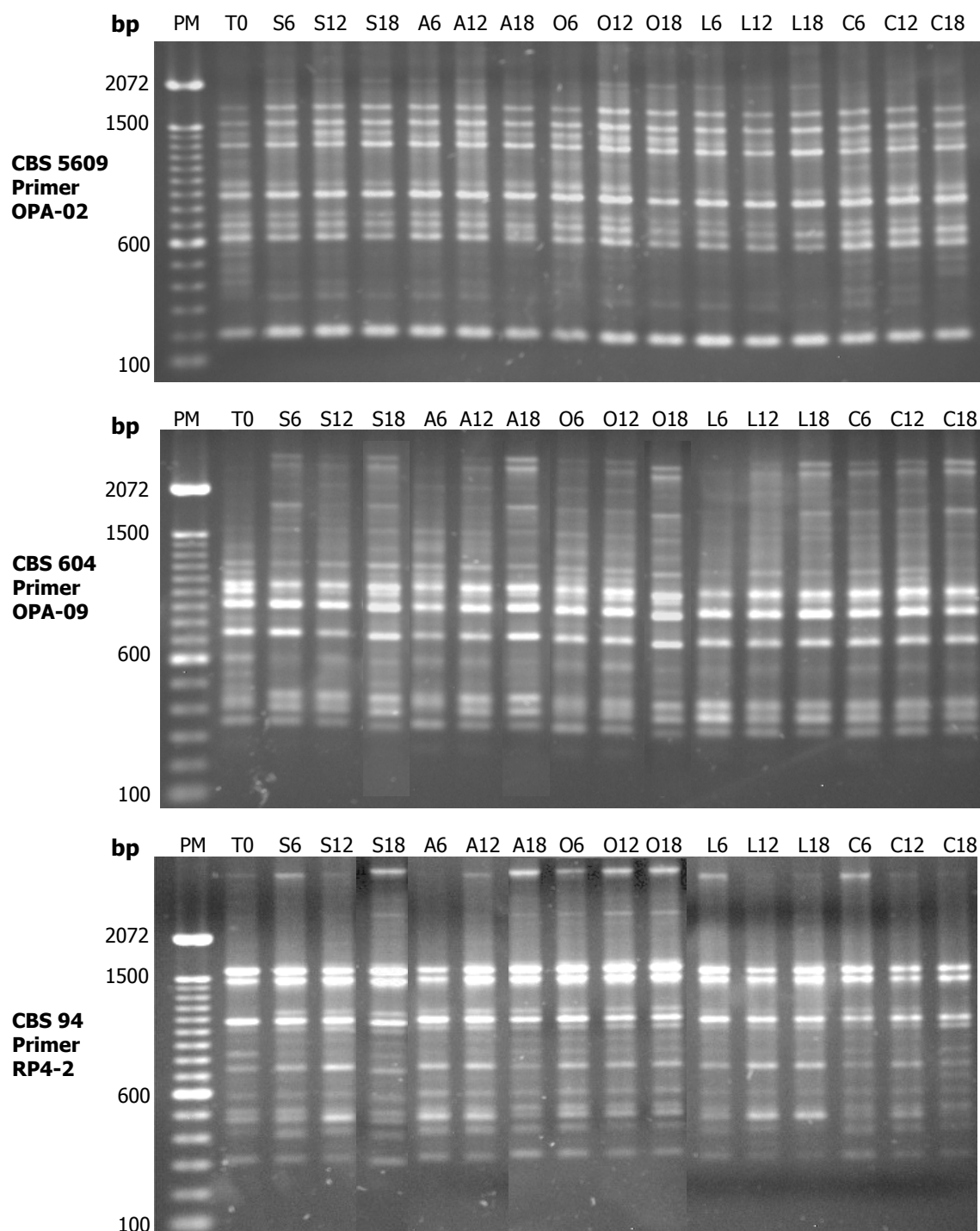


Figura 9 – Perfis eletroforéticos dos padrões de RAPD de *C. utilis* (CBS 5609), *C. parapsilosis* (CBS 604) e *C. tropicalis* (CBS 94), antes e após manutenção laboratorial por cinco diferentes métodos. PM: padrão de peso molecular 100bp (DNA Ladder – Pharmacia Biotech); T0: tempo “zero” de armazenamento; S: SDA-transferências seriadas; A: água; O: óleo; L: liofilização; C: congelamento. Os números 6, 12 e 18 indicam o tempo de armazenamento em meses.

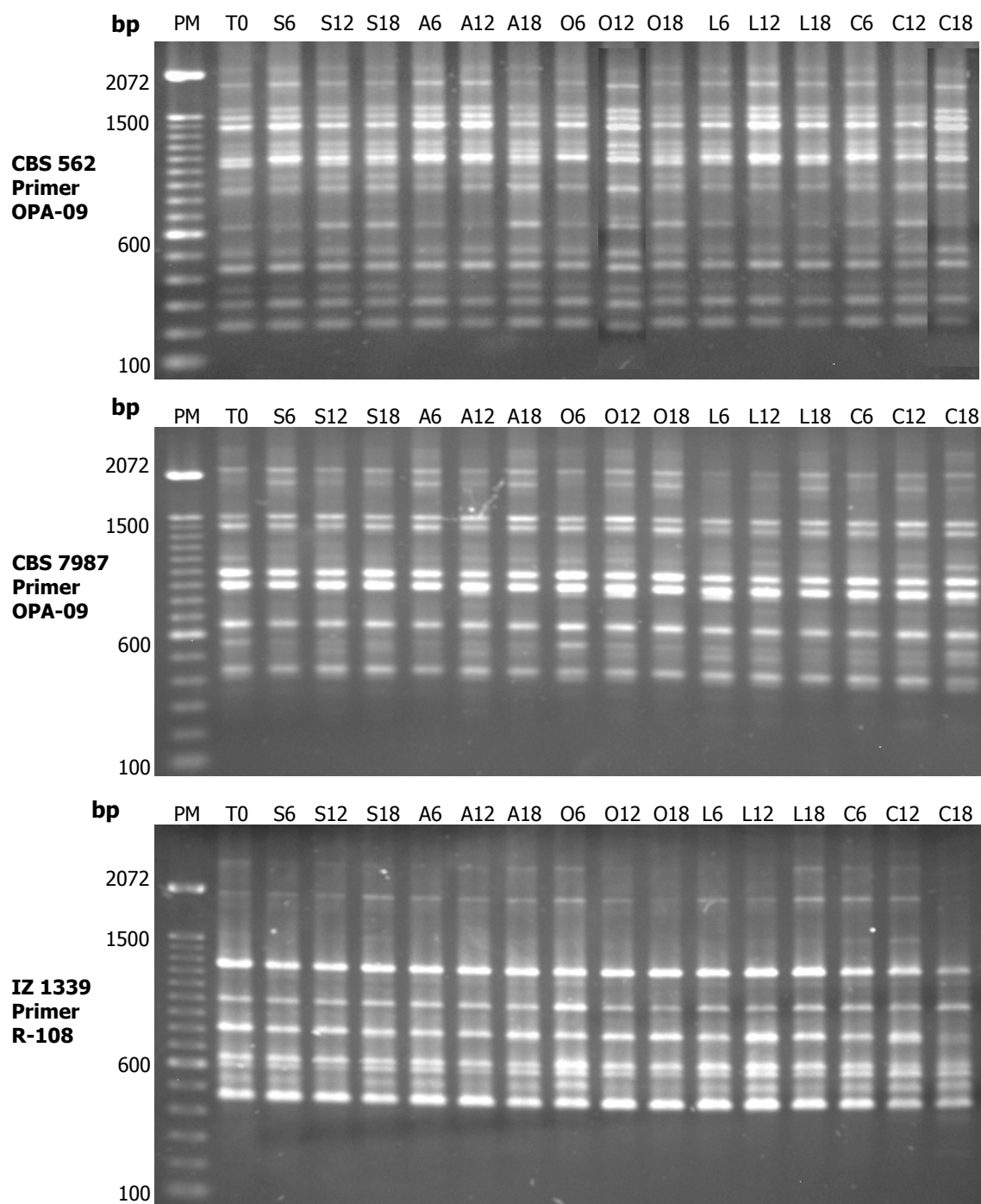


Figura 10 – Perfis eletroforéticos dos padrões de RAPD de *C. albicans* (CBS 562), *C. dubliniensis* (CBS 7987) e *K. marxianus* (IZ 1339), antes e após manutenção laboratorial por cinco diferentes métodos. PM: padrão de peso molecular 100bp (DNA Ladder – Pharmacia Biotech); T0: tempo "zero" de armazenamento; S: SDA-transferências seriadas; A: água; O: óleo; L: liofilização; C: congelamento. Os números 6, 12 e 18 indicam o tempo de armazenamento em meses.

6. DISCUSSÃO

Diversos métodos vêm sendo empregados para conservação de fungos apresentando cada um deles, vantagens e desvantagens. Importantes características podem ser perdidas, dependendo do método de preservação aplicado. Tais perdas justificam a tentativa de selecionar e implementar os métodos de conservação de microrganismos, especialmente para cepas industriais e de laboratórios de pesquisa. Na escolha de um método para preservação de um determinado grupamento de fungos, deve ser levada em consideração a capacidade de manutenção das características fenotípicas, genotípicas e patogênicas das cepas estocadas. Assim, o emprego de sistemas adequados de conservação de microrganismos, que permitam o manuseio de amostras fenotípica e genotipicamente estáveis, deve fazer parte da preocupação de cientistas e pesquisadores da área. (Kirsop & Snell, 1984; Ferreira da Silva *et al.*, 1992; Santos *et al.*, 2002; Girão *et al.*, 2004).

No presente estudo, foi avaliada a viabilidade e as características fenotípicas de seis espécies de leveduras armazenadas em cinco métodos de preservação freqüentemente utilizados. As espécies foram escolhidas com base na disponibilidade em nosso laboratório e de acordo com suas propriedades. Além disso, o comportamento das seis espécies escolhidas em relação a sua conservação laboratorial pode servir de base para estudos com outras espécies, com objetivos específicos. As cepas de *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis* fazem parte de um grupo de leveduras patogênicas que são citadas na literatura como participantes comuns em diversos processos infecciosos e, portanto, são amplamente estudadas justificando a necessidade de serem mantidas em laboratório (Hazen, 1995; Coleman *et al.*, 1998). Já as espécies *C. utilis* e *Kluyveromyces marxianus* (fase anamorfa *Candida kefyr*) são de importância industrial. *C. utilis* (antigamente classificada como *Torulopsis utilis*) é a levedura conhecida como "Fermento" de Torula. Esta levedura é importante porque pode utilizar as pentoses da polpa de madeira processada, utilizada na indústria de papel. A espécie *K. marxianus* é uma levedura útil na indústria de laticínios, conhecida como o "fermento" do soro, que pode utilizar o açúcar do leite, ou lactose como substrato. (Stone, 1998; Revillion, 2003).

O período analisado foi de 18 meses para cada uma das técnicas empregadas. Para este período, os resultados obtidos demonstraram que dentre os cinco métodos testados, foi possível manter a viabilidade das espécies estudadas em quatro deles. Embora, para a maioria das espécies incluídas no estudo, o método de conservação em Sabouraud Dextrose ágar sob óleo mineral foi bastante satisfatório em manter a viabilidade das amostras, a cepa CBS 7987 (*C. dubliniensis*) perdeu sua viabilidade em ambos os tubos armazenados em duplicata, após 12 meses de conservação neste meio. A baixa viabilidade celular de cepas preservadas sob óleo mineral pode estar relacionada à características genéticas e/ou à variações nos atributos das células preservadas e na técnica empregada. Um fator determinante na queda da viabilidade é o uso de inóculo proveniente de culturas velhas e a profundidade da camada de óleo mineral sobre a cultura (Mendes da Silva *et al.*, 1994). Em nossa pesquisa, foram utilizados inóculos de culturas novas, com no máximo 48 horas de crescimento, e a profundidade da camada de óleo mineral, embora não foi precisamente medida, não apresentou variações significativas entre as amostras. Todos os tubos tinham a mesma altura e diâmetro, contendo a mesma quantidade de meio em cada um e, portanto, quantidades aproximadas de óleo mineral, sendo observado o quesito da total cobertura da cultura pelo óleo. Os tubos com óleo mineral foram mantidos sob refrigeração (entre 4 e 8°C), o que pode contribuir para aumentar o tempo de sobrevivência pois, a temperatura mais baixa diminui os níveis metabólicos da levedura diminuindo o acúmulo de produtos tóxicos.

A baixa viabilidade da amostra de *C. dubliniensis* encontrada em nosso estudo, pode estar relacionada com fatores da própria cepa. Em razão disso foi possível confirmar que o armazenamento em óleo não permite que se mantenha a viabilidade satisfatória em períodos prolongados para todas as espécies, a exemplo de *C. dubliniensis*. Pesquisas demonstram que diferentes espécies dentro de um mesmo gênero de leveduras podem apresentar comportamento diferenciado com relação às condições de manutenção laboratorial (Kirsop & Snell, 1984; Odds, 1991; Girão *et al.*, 2004) Portanto, a transferência das amostras para tubos novos em intervalos menores deve ser considerada, sendo que 12 meses parece ser um tempo satisfatório. Kirsop & Snell (1984) estimaram o tempo e preservação de leveduras sob óleo mineral em 2 anos. Mendes da Silva *et al.* (1994) encontraram uma baixa porcentagem (26%) de viabilidade entre cepas de

Paracoccidioides brasiliensis armazenadas sob óleo mineral por mais de 10 anos. Tais resultados sugerem que, tempos prolongados de manutenção para este tipo de processo, devem ser evitados.

Com relação aos outros métodos de armazenamento testados nesta pesquisa, a viabilidade celular das amostras demonstrou resultados condizentes com a literatura. Tanto as transferências seriadas, como a manutenção em água, o congelamento e a liofilização, mostraram ser métodos eficientes no armazenamento das diferentes espécies de leveduras. Os métodos que proporcionaram maior e menor porcentagem de células viáveis aos 18 meses de conservação foram respectivamente, a água com 96% e as transferências seriadas com 88% (contagem em azul de metileno). No entanto, em todos os métodos foi possível a reativação da amostra pelo crescimento em SDA. Ou seja, obtivemos 100% de sobrevivência das culturas armazenadas pelas técnicas de conservação acima citadas. A transferência seriada em meios sólidos é bastante simples e barata. Porém, apresenta como desvantagens a necessidade de recursos econômicos e de mão de obra para os constantes subcultivos, além de ter sido mencionada a ocorrência de variações nas propriedades fisiológicas e morfológicas das cepas, e a possibilidade da ocorrência de seleção de mutantes (Kirsop & Snell, 1984; Hawksworth, 1985; Ferreira da Silva *et al.*, 1992).

O tempo de avaliação de nossas amostras foi relativamente curto quando comparado com outros trabalhos publicados, entretanto, a observação das culturas armazenadas durante 18 meses nos permitiu confirmar aspectos já mencionados na literatura. A técnica de transferências seriadas pode ser aplicada para culturas não muito numerosas, mantidas sob refrigeração. Embora o intervalo entre os repiques praticado nesta pesquisa foi de 1 mês, há a possibilidade de utilização de intervalos maiores, entre três e quatro meses entre os repiques, sem que se perca a viabilidade. Segundo Ferreira da Silva *et al.* (1992), a recuperação celular pode ser feita em até 10 meses sem transferências para meios novos. As culturas mantidas em óleo mineral que ainda estavam viáveis depois de transcorridos os 18 meses avaliados nesta pesquisa, passaram a apresentar um aspecto diferenciado com o passar do tempo. Algumas modificações no aspecto destas culturas foram observadas como, escurecimento da camada de células

sobre o ágar (mudança da coloração das colônias de bege ou branca para marrom), escurecimento do ágar e aspecto envelhecido da cultura. Estes aspectos, no entanto, não são observados em culturas jovens, de repiques recentes.

Entre as amostras preservadas em água destilada, não foi observada nenhuma alteração nas suspensões ou indícios de contaminação em todo o período do estudo. Considerando que a viabilidade celular foi satisfatória aos 18 meses de armazenamento para todas as espécies, a preservação de leveduras em água se mostra eficaz para este período, sendo provável que esta técnica seja igualmente útil para períodos maiores de preservação, conforme indicado por outros autores. Num período avaliado entre 12 e 60 meses, McGinnis *et al.* (1974) obtiveram um índice de 93% de sobrevivência de culturas de fungos, incluindo leveduras, mantidos em água destilada. Entretanto, este método não proporcionou sucesso na manutenção de leveduras do gênero *Malassezia*, devido ao fato deste grupo de microrganismos ter como características, exigências nutricionais incomuns, como a necessidade de suprimento de lipídeos no meio (Crespo *et al.*, 2000). Para Rodrigues *et al.* (1992), os melhores resultados de viabilidade entre diferentes microrganismos armazenados em água foram obtidos pelo grupo das leveduras (cerca de 100%), após um período de 24 meses. Já Odds (1991) mencionou uma taxa de sobrevivência de 96% após 10 anos de armazenamento de leveduras em água destilada.

Para se avaliar o período limite de armazenamento pelas técnicas de liofilização e congelamento, seria necessário estender o estudo por mais alguns anos. Avaliações futuras poderão ser feitas para melhor se estimar o tempo de preservação destes organismos por estes métodos. Na literatura, tais técnicas de conservação de culturas de microrganismos são mencionadas como sendo úteis em manutenções por períodos prolongados. Apesar do processo inicial ser agressivo para a célula, a utilização de crioprotetores pode permitir um armazenamento por vários anos, mantendo-se a estabilidade da amostra (Spencer & Spencer, 1996; Diniz-Mendes *et al.*, 1999). Dentre 18 amostras de fungos avaliadas quanto a viabilidade depois de mantidas por processo de liofilização, 10 permaneceram viáveis durante 34 anos (Ashcar *et al.*, 1988). Outros autores também reportaram bons resultados para armazenamento de fungos por liofilização. Num estudo avaliando a viabilidade de microrganismos liofilizados, dentre as

18 espécies de fungos analisadas, 13 apresentaram sobrevivência em mais de 80% das culturas, após um período de cinco a seis anos (Antheunisse, 1973). Qiangqiang *et al.* (1998) encontraram valores semelhantes, com 87,2% de sobrevivência entre diferentes espécies de fungos liofilizados e 89,7% para fungos armazenados em água, após 12 anos de conservação.

A ocorrência de modificações fenotípicas em amostras de microrganismos, após armazenamento das células, tem sido reportada na literatura. Para Mendes da Silva *et al.* (1994), os riscos de variações morfológicas e fisiológicas aumentam quando o inóculo consiste de células velhas, nas quais o acúmulo de produtos resultantes do metabolismo pode estimular processos mutagênicos. Alterações morfológicas em cepas de *P. brasiliensis*, após armazenados em meio sólido sob óleo mineral, foram observadas por alguns autores. Fungos dimórficos, que mudam sua morfologia de levedura para hifa em diferentes temperaturas, como *P. brasiliensis* e *Blastomyces dermatitidis*, podem perder sua habilidade de completar o processo de dimorfismo após longos períodos de conservação por esta técnica, mesmo após passagem "in vivo" (Mendes da Silva *et al.*, 1994; Lima *et al.*, 2004). Ferreira da Silva *et al.* (1992) detectaram pequenas reduções no rendimento da produção de etanol por leveduras fermentadoras após armazenamento em 4 diferentes métodos. Girão *et al.* (2004) encontraram diferenças na positividade da prova da urease por *Malassezia paquydermatis*, após 9 meses de preservação em dois tipos de meio. Por outro lado, Ashcar *et al.* (1988), avaliando culturas de fungos após processo de liofilização por 34 anos, observaram que, das 18 culturas liofilizadas, 10 permaneceram viáveis, conservando suas características morfológicas e fisiológicas compatíveis com as descrições padrões, e as culturas de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Sporothrix schenckii* conservaram a sua patogenicidade, verificada através de inoculações experimentais.

No presente estudo, foi analisado o comportamento das leveduras frente a diferentes provas fenotípicas em testes repetidos sistematicamente. Na literatura atual, não foram encontrados trabalhos similares que abordassem uma ampla avaliação de várias características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas das amostras. Atualmente, muitas pesquisas são realizadas com ênfase na conservação de microrganismos em

laboratório, para finalidades diversas, sejam elas estudos retrospectivos, prospectivos, inoculações em animais, estudos epidemiológicos, entre outras finalidades. A proposta desta pesquisa foi também, avaliar possíveis alterações no perfil fenotípico das leveduras armazenadas, através de testes comumente utilizados para sua identificação, tipagem, caracterização, e na avaliação da produção de enzimas e fatores de virulência. Tais metodologias são, muitas vezes, aplicadas em cepas armazenadas em laboratório.

Para a avaliação dos caracteres morfológicos, foram empregados os testes de micromorfologia e análise visual das colônias. Todas as amostras permaneceram com suas características estáveis, tanto macro, como microscopicamente. As características coloniais das amostras permaneceram inalteradas em todos os ensaios. A utilização de substratos presentes no meio cromogêncio CHROMagar Candida® também não foi alterada em nenhum momento, sendo que todos os ensaios com este meio mantiveram os resultados iguais ao perfil inicial. Isto demonstra que os métodos de conservação empregados são compatíveis com a manutenção das características morfológicas estudadas.

Uma propriedade distinta de *C. albicans* é a sua habilidade em produzir clamidoconídios, compartilhada apenas com sua espécie mais próxima *C. dubliniensis*. Tal característica é amplamente empregada na identificação destas espécies. A produção destas estruturas pelas espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis*, se tornou mais lenta e escassa em alguns ensaios realizados nesta pesquisa, positivando apenas após 72 ou 96 horas, quando inicialmente este tempo foi de 48 horas. Em um dos ensaios não houve produção deste tipo celular mesmo após 96 horas, porém ao ser repetido o teste voltou a positivar, ainda que lentamente (96 horas). Não houve, portanto, prejuízo na capacidade de produção de clamidoconídios e sim na velocidade e na quantidade desta produção após estímulo. Clamidoconídios são células arredondadas, com dupla parede e ricas em RNA, consideradas como esporos de resistência e formadas em situações específicas, nas terminações das hifas ou pseudo-hifas. Estas formações podem ser induzidas em meios pobres em nutrientes, como é o caso do ágar-fubá, em situações de disponibilidade limitada de oxigênio, em temperaturas inferiores à faixa ótima de crescimento. (Odds, 1988; Nobile *et al.*, 2003). Os testes de microcultivo que apresentaram produção de clamidoconídios mais lenta ocorreram para amostras conservadas em todos os métodos de

armazenamento, no entanto, em ensaios subseqüentes, a cepa voltava ao perfil original. Esta ocorrência não prejudicou a caracterização da amostra nos respectivos períodos em questão. A produção de clamidoconídios é um processo morfogenético regulado por genes que respondem a sinais ambientais. Por razões desconhecidas, em algum momento, uma amostra de levedura pode responder mais demoradamente a um estímulo externo para apresentar uma determinada característica fenotípica (Nobile *et al.*, 2003; Staib & Morschhauser, 2005). Desta forma, a habilidade em produzir clamidoconídios pode ser empregada na caracterização de amostras de leveduras armazenadas, repetindo-se as leituras diariamente, até pelo menos 96 horas. A revitalização das cepas com dois ou três repiques antes dos testes pode também contribuir para a diminuição de possíveis resultados falsos negativos.

A formação de tubo germinativo por *C. albicans* e *C. dubliniensis* é, na verdade, o início do processo de filamentação da levedura, que altera seu estado morfológico quando cultivada em células de tecido ou soro a 37°C. Em nosso estudo, a habilidade de formação desta estrutura pelas espécies acima mencionadas não foi comprometida após armazenamento das cepas em nenhum dos métodos de conservação avaliados. Esse dado demonstra que tal característica aparentemente não sofre influência direta do modo como a amostra é armazenada, sendo um mecanismo muito bem regulado pela célula, envolvido com a sua patogenicidade. A conversão da fase de levedura para hifa, *in vitro*, parece ser controlada por substâncias produzidas pela própria levedura e pode sofrer influências de fatores como concentração de componentes nutricionais, tensão de oxigênio, pH e concentração de células na cultura. Entretanto, a liberação destas substâncias reguladoras não é influenciada por processos como liofilização, ou aquecimento (Hazen & Cutler 1979; Hanaoka *et al.*, 2005).

Outra análise fenotípica realizada nesta pesquisa foi baseada na capacidade de crescimento das leveduras a 45°C. Nenhum ensaio de crescimento a 45°C mostrou resultados alterados em relação aos perfis obtidos nos testes iniciais. Todas as amostras intolerantes a esta temperatura, conforme o esperado, permaneceram com esta característica estável. As espécies tolerantes também não perderam esta habilidade, o que nos permite observar que os mecanismos envolvidos na adaptação das células a

elevações de temperatura não foram perdidos. Tais mecanismos podem ser decorrentes de expressões genéticas estáveis e bem reguladas pela célula. Por exemplo, a composição lipídica da membrana plasmática e a composição citocrômica de frações mitocondriais, em leveduras termofílicas, foram diferentes do que o observado para outros grupos, mostrando que as propriedades das membranas biológicas interferem na habilidade dos microrganismos em crescer e se reproduzir em diferentes ambientes térmicos, como demonstram Arthur & Watson (1976). Condições ambientais sob as quais são mantidas as cepas podem não ter tanta influência sob estas características, mesmo que o armazenamento das culturas representa um fator de estresse para as células. Para *Saccharomyces cerevisiae*, a produção de uma proteína de choque-térmico representa um importante fator para a termotolerância desta levedura, a qual é altamente conservada (Lindquist & Kim, 1996).

Foi observado em nosso estudo que, em geral, o perfil de assimilação e fermentação de carboidratos pelas leveduras avaliadas, se mostrou bastante estável, não se alterando após conservação laboratorial das amostras pelos cinco diferentes métodos. Entretanto, em alguns ensaios, a assimilação de determinados carboidratos apresentou-se mais lenta, porém positivando com até 96 horas de incubação. Estes testes, ao serem repetidos voltaram a apresentar resposta mais rápida na assimilação dos mesmos carboidratos, confirmando a positividade do teste. Estas observações confirmam que, embora passível de ser influenciada pelas condições em que são mantidas as cepas, a utilização de açúcares como fonte de carbono não parece ser instável. O padrão de utilização de carboidratos são os métodos mais amplamente utilizados para uma definitiva identificação de leveduras de interesse clínico. O teste verifica a capacidade de um isolado em utilizar um carboidrato específico ou de fermentá-lo, sendo a única fonte de carbono disponível. Ausência de crescimento indica a ausência de enzimas para a utilização do carboidrato testado (Sandiven, 1990). O perfil de utilização de carboidratos pode ser variável dentro de uma mesma espécie, talvez em decorrência de mutações perpetuadas por uma cepa. O estado fisiológico de uma levedura depende, em grande parte, das condições do ambiente. A expressão de grupos enzimáticos pode ser influenciada pela presença ou ausência de oxigênio. Adicionalmente, a fonte de carbono ou energia pode

também ser utilizada para promover modificações metabólicas na célula (Kärenlampi *et al.*, 1981).

Neste estudo, foi avaliado o crescimento das leveduras em meio líquido contendo elevadas concentrações de NaCl (6,5%). No teste inicial, a amostra de *C. utilis* apresentou-se com crescimento positivo em caldo hipertônico, mudando para negativo em alguns testes. Nos ensaios que se seguiram o perfil da cepa voltou ao normal em todos os casos. *C. albicans* também perdeu a tolerância ao NaCl a partir de um dado momento durante o armazenamento. Para as amostras conservadas pelos métodos de SDA-TS, Água e SDA-O, não houve retorno ao estado inicial de crescimento positivo, pelo menos até o último teste realizado aos 18 meses de armazenamento. Por outro lado, as amostras liofilizadas ou congeladas voltaram a apresentar crescimento positivo posteriormente. Tais observações sugerem que esta característica em *C. albicans* pode ser variável ou é menos estável do que se observa para *C. parapsilosis*, e *C. tropicalis*, que não perderam a capacidade de crescimento em NaCl 6,5% durante todo estudo. É interessante notar que várias repetições foram feitas para se confirmar a negatividade do crescimento de *C. albicans* neste meio.

A tolerância a elevadas concentrações de sal (NaCl) tem sido amplamente estudada nas últimas décadas. Algumas espécies de leveduras encontradas na água do mar foram reportadas por apresentar elevados índices de sobrevivência em meio contendo NaCl. A espécie *Debaryomyces hansenii* foi a menos afetada pela presença de sal no meio, chegando a apresentar atividade detectável em medições de crescimento, respiração e fermentação em meio contendo até 24% desta substância (Norkrans & Kylin, 1969). O crescimento de leveduras em presença de NaCl, e a manutenção de suas propriedades fermentativas nestas condições é uma das grandes preocupações da indústria de alimentos fermentados contendo altas quantidades de sal, como o molho de soja. *Zigosaccharomyces rouxii* é uma importante espécie de levedura utilizada na fabricação deste tipo de produto, nos quais o crescimento de células de *Saccharomyces cerevisiae* é inibido (Tomita *et al.*, 2000). A capacidade de tolerância de um microrganismo a meios hipertônicos deve-se a diferentes mecanismos mediados por vários genes. Estão envolvidos neste processo, genes codificadores de enzimas do metabolismo de

carboidratos e produção de energia, do metabolismo de aminoácidos e também de proteínas estruturais da bomba de efluxão de íons sódio, entre outros (Hirasawa *et al.*, 2005). Por ser um mecanismo complexo, muitas variantes podem ocorrer na célula, sob influência do meio, modificando a expressão destes genes, ou até mesmo mutações espontâneas na célula podem alterar permanentemente o perfil da cepa com relação à tolerância ao NaCl.

Com relação à produção de enzimas proteinases e fosfolipases, os resultados obtidos nesta investigação mostraram padrões diferentes de atividade enzimática entre as espécies avaliadas. Estes dados indicam que a secreção destas enzimas é variável entre as espécies de *Candida*, confirmando o que já foi demonstrado por outros autores. A atividade de fosfolipase para 41 isolados orais de *Candida* spp. foi determinada por Samaranayake *et al.* (1984). Setenta e nove por cento de *C. albicans* foram produtoras de fosfolipase enquanto *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* não produziram a enzima. Dentre cepas de *C. albicans* isoladas de lesões bucais, a fosfolipase e a proteinase foram detectadas em 83,3% e 66,7%, respectivamente, enquanto que *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* produziram somente proteinase (Candido *et al.*, 2000).

Entretanto, uma variabilidade na expressão desta propriedade para o teste em ágar foi observada numa mesma cepa em testes repetidos ao longo do estudo. *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* apresentaram testes com variações no padrão enzimático de fosfolipases e proteinases, enquanto que *C. albicans* e *K. marxianus*, somente em uma das classes de enzimas avaliadas. Algumas cepas mostraram maior variabilidade em relação a outras. Houve espécies com alterações em ensaios de apenas um método de conservação, e também espécies com variabilidade detectada em vários ensaios para diferentes métodos de conservação. A espécie que mais apresentou variabilidade foi *C. parapsilosis* para o teste da proteinase (41%), com ocorrências em todas as condições de armazenamento as quais foi submetida.

De outro lado, a atividade enzimática de *C. dubliniensis* e *C. utilis* não se alterou durante o estudo para nenhuma classe de enzimas. A espécie *C. albicans* apresentou atividade notadamente constante para proteinase, embora para fosfolipase houveram testes com variações, principalmente no grau de atividade. Williamson *et al.*

(1986) observaram que em repetidas culturas os isolados positivos ou negativos para fosfolipase permaneceram com o mesmo perfil, embora variações no grau de atividade dos isolados positivos foi observada. Samaranayake *et al.* (1984) afirmaram que o grau de atividade de fosfolipase (valores de Pz) em isolados individuais foram notadamente constantes, embora uma ampla variação foi encontrada entre amostras diferentes.

Ao contrário do que afirmaram os autores acima citados, nesta pesquisa foi encontrada uma variação não só apenas no grau de atividade, mas também cepas positivas apresentaram atividade negativa em alguns testes e vice-versa. Os resultados obtidos mostraram cepas com teste negativo antes de serem submetidas às cinco condições de armazenamento, que passaram a apresentar atividade enzimática positiva em ensaios posteriores, como foi o caso da CBS 604 (*C. parapsilosis*) para proteinase e para fosfolipase. Esta variação mostra que a cepa é produtora das enzimas, porém no ensaio realizado no teste inicial não as produziu, ou o teste não detectou sua produção. Por serem amostras padrão, depositadas em coleções de culturas, as cepas incluídas neste estudo já estavam sob condições laboratoriais por longos períodos, e mesmo em nosso laboratório elas já estavam mantidas em ágar antes dos experimentos. Esses achados sugerem que a secreção de enzimas proteolíticas pode ser variável para uma mesma cepa em ensaios repetidos do teste em ágar, provavelmente após serem mantidas em laboratório por longos períodos, independentemente das condições de armazenamento. Tais variações foram observadas em amostras armazenadas em todos os métodos de conservação, mostrando que estas ocorrências não refletem uma reação da cepa a uma condição de armazenamento específica.

Entre as cepas estudadas, as variações encontradas não foram constantes, mostrando que tais resultados não refletem uma alteração permanente da produção de enzimas, mas sim sugerem mudanças comportamentais, decorrentes de alterações na expressão desta característica, por influência de fatores ambientais ainda não esclarecidos. Alguns trabalhos demonstraram que a atividade enzimática pode variar em função de fatores tais como o sítio de origem, a presença ou não de lesões e o estado imunológico do paciente; além de influências do pH e da concentração de açúcares no meio (Price *et al.*, 1982; Samaranayake *et al.*, 1984; Chakrabarti *et al.*, 1991; Wu *et al.*, 1996; Penha *et*

al., 2000). Adicionalmente, a manutenção em laboratório por longos períodos poderia influenciar negativamente a expressão de fatores de virulência, como é o caso da produção de enzimas proteolíticas, uma vez que a cepa não tem a necessidade de causar dano tecidual. No entanto, a adição de peptídeos com 8 ou mais resíduos de aminoácidos em culturas de *Candida* spp, é um fator que estimula a produção de proteinases (Lerner & Goldman, 1993). Em um modelo de candidíase oral *in vitro* a expressão dos diferentes genes (*SAP*) que codificam as proteinases de *C. albicans* foi se modificando com o decorrer do tempo de infecção, com uma progressão associada ao aumento do dano tecidual, mostrando que a secreção destas enzimas está associada com a virulência ocorrendo uma regulação diferencial e temporal da expressão dos genes *SAP* durante a infecção (Schaller *et al.*, 1998). No entanto, os mecanismos precisos que controlam a regulação da indução de proteinases ainda não estão totalmente esclarecidos.

De modo geral, considerando-se todos os testes fenotípicos avaliados, os resultados do presente trabalho demonstram que algumas variações no comportamento fenotípico em amostras de leveduras armazenadas podem ocorrer. Porém, não estão relacionadas com uma influência direta de um método específico de preservação da célula, e sim, denota mudanças fisiológicas na cepa, mediadas por mecanismos ainda não totalmente esclarecidos. Provavelmente, estas mudanças comportamentais são resultado da latência metabólica, induzida em leveduras conservadas em diferentes condições, como por exemplo, sob refrigeração. Quando células de leveduras são cultivadas a 25°C e então transferidas para 4°C, o crescimento celular se torna bastante lento. Entretanto, a habilidade de formar colônias pode ser mantida por mais de um ano, quando estas células, em fase estacionária de crescimento, são estocadas em 4°C (Murata *et al.*, 2005).

Nesta pesquisa, pequenas alterações foram observadas, em diferentes testes fenotípicos e em vários ensaios. Na maioria dos casos as alterações não foram estáveis, ocorrendo o retorno da levedura ao seu estado original, registrado antes do armazenamento. Estas alterações, provavelmente, não são resultantes de mudanças genéticas estáveis, mas sim, da expressão genética das células. Um dos fatores que podem contribuir para isso é o estresse envolvido no processo de conservação. A mais óbvia situação de estresse é a diminuição da temperatura ambiente, que ocorre durante o

processo de conservação ou durante o armazenamento. Dentre os métodos de preservação estudados, as amostras ficaram expostas por diferentes períodos, a baixas temperaturas. A regulação genética envolvida na adaptação celular ao meio caracteriza-se de forma peculiar para cada processo dentro da célula, envolvendo diversos genes, mecanismos e inúmeras proteínas. Para se ter um real entendimento da resposta de cada microrganismo frente ao estresse gerado durante o processo e o período de armazenamento muitos estudos específicos deveriam ser feitos, de modo que seria impossível em pouco tempo, compreender todos os mecanismos fisiológicos celulares, peculiares a cada cepa ou espécie de interesse. Baixa de nutrientes, acúmulo de produtos tóxicos resultantes do metabolismo, efeitos da diminuição da umidade em processos de secagem, são fatores que desencadeiam mudanças na expressão gênica da célula e influem na resposta fisiológica imediata e em longo prazo. A título de exemplificação, foi comprovado que choques extremos de temperatura podem proporcionar um efeito diferente se comparado com a manutenção constante em uma baixa temperatura. A resposta celular que ocorre na transição entre 25 e 4°C é diferente da que ocorre em cultura contínua à 4°C (Homma *et al.*, 2003; Murata *et al.*, 2005).

Muitos estudos têm focado a regulação da expressão gênica e a resposta celular de microrganismos em situações de estresse por baixas temperaturas ou outras condições (Thieringer *et al.*, 1998; Aguilar *et al.*, 1999; Fernandes, 2005). Murata *et al.* (2005) reportaram que quando uma cultura de *S. cerevisiae* é transferida de 25°C para 4°C, genes envolvidos na biossíntese de trealose e glicogênio foram induzidos, sugerindo que o acúmulo de carboidratos de reserva pode ser necessário para a tolerância ao resfriamento e preservação de energia. O aumento da expressão de fosfolípidios, manoproteínas e proteínas de choque térmico é consistente com a manutenção da membrana e o aumento da permeabilidade da parede celular. A indução de proteínas de choque térmico e glutatona a 4°C podem ser requeridas para a revitalização da atividade enzimática, e para a desintoxicação de produtos de metabolismo do oxigênio. Estes genes com tais funções podem promover a habilidade para a tolerância ao resfriamento e para a adaptação da célula.

Tais alterações na expressão gênica da célula exposta a condições desfavoráveis podem contribuir para as alterações transitórias no perfil morfológico, fisiológico e bioquímico das leveduras, manifestadas sob a forma de comportamento diferenciado em testes fenotípicos. Em geral, as alterações observadas não ocorreram em testes relacionados a funções essenciais da célula como é o caso da utilização de carboidratos como única fonte de carbono e não comprometeram a identificação da espécie. Portanto, não foi possível concluir qual a técnica de preservação que maiores influências exerceram sobre a fisiologia da célula, considerando as provas fenotípicas realizadas.

Foi comprovado que mudanças ambientais podem interferir na expressão de proteínas em *C. albicans* (Calcedo *et al.*, 2001). Uma vez que a expressão genética da célula se volta para a adaptação frente às mudanças nas condições ambientais e para a sobrevivência da cepa, outros sistemas de genes se tornam secundários e deixam de ser expressos, como um mecanismo de compensação e de economia. Assim genes que regulam a atividade de enzimas ligadas a mecanismos de virulência, se tornam secundários para a cepa que está armazenada em laboratório e não está parasitando um hospedeiro. As variações observadas nesta investigação ocorreram para a produção de clamidoconídios, crescimento em meio com NaCl 6,5% e para o teste de atividade enzimática de proteinases e fosfolipases em ágar. Deste modo, testes morfológicos e de utilização de carboidratos, ou de adaptação à temperatura de incubação elevadas foram os que não apresentaram alterações no padrão da cepa. Frente a tais considerações, podemos sugerir que, é possível a realização de estudos retrospectivos que envolvam as provas acima, utilizando-se de cepas armazenadas, desde que obedecidos alguns critérios, como utilização de culturas novas, reativar a cepa com dois ou três repiques antes de submetê-las aos testes e observar a manutenção das mesmas condições todas as vezes que o ensaio for repetido.

Com isso, é possível sugerir que, os cinco métodos analisados, de conservação laboratorial de leveduras, são aplicáveis para as principais espécies, tanto de interesse clínico como industrial. Não foi possível detectar alterações significativas nos resultados dos testes fenotípicos analisados, que pudessem comprometer a identificação das

amostras ou sua caracterização fenotípica. No entanto, a biotipagem através da avaliação do perfil de secreção e enzimas extracelulares deve ser evitada em cepas armazenadas por longos períodos, pois alterações podem ocorrer, mesmo que não sejam estáveis.

A caracterização e a biotipagem de espécies de leveduras envolvendo provas fenotípicas é, em geral, laboriosa e consome tempo. Tais provas são baseadas em caracteres morfológicos e bioquímicos das células, as quais podem sofrer influências de variações no tamanho do inóculo ou nas condições de incubação (Coleman *et al.*, 1998; Melo *et al.*, 1998). Métodos moleculares apresentam vantagens em vários aspectos em relação a provas fenotípicas, dependendo do objetivo da pesquisa. Estes métodos têm sido utilizados de forma difundida para caracterização de leveduras. Alguns, porém, implicam em dificuldades na sua execução, necessitando de equipamentos especializados, consumindo tempo excessivo, além de envolverem elevados custos para o laboratório. O RAPD é umas das técnicas moleculares que evita alguns destes problemas. Tal técnica tem sido cada vez mais utilizada para tipagem e identificação em microbiologia, sendo algumas vantagens mencionadas como: facilidade e rapidez na execução, não requer sondas marcadas, e não é necessário o conhecimento prévio do DNA a ser analisado (Williams *et al.*, 1990; Lehmann *et al.*, 1992; Power, 1996).

Diferentes procedimentos de monitoramento genético detectam diferentes tipos de mudanças moleculares, tais como rearranjo cromossômico, repetidas expansões ou contrações, substituições de bases, etc. Estabelecer a eficácia do monitoramento destas modificações por diferentes métodos seria de grande valia, em estudos retrospectivos ou de seguimento. Foi sugerido recentemente que o RAPD poderia ser um método adequado para detectar flexibilidade do genoma em *C. albicans* (Pujol *et al.*, 1997). A definição de padrões de RAPD para tipagem depende, em grande parte, da escolha correta dos *primers* e da região genômica a ser analisada (Waltimo *et al.*, 2001). Segundo Pujol *et al.* (1997), a técnica de RAPD tem como características a capacidade de agrupar isolados aparentemente não relacionados (ex.: obtidos de indivíduos não relacionados de uma mesma região), e de discriminar diferenças entre isolados altamente relacionados (ex.: isolados de infecções recorrente no mesmo indivíduo).

Em nosso laboratório, já havia sido padronizada a técnica de RAPD, a qual foi escolhida para a análise genotípica das amostras, considerando as vantagens que ela apresenta na sua execução. O perfil de RAPD foi obtido para todas as amostras incluídas neste estudo antes do armazenamento em diferentes condições e posteriormente, a cada seis meses. Assim, cada amostra teve seu DNA extraído no tempo zero e em três tempos após a conservação: 6, 12 e 18 meses, para cada uma das cinco técnicas de preservação, totalizando 16 reações de RAPD com dois *primers* diferentes. Nenhum perfil de RAPD foi diferente, considerando-se ambos os *primers* testados. Adicionalmente, diferentes extrações de DNA a partir de um mesmo isolado do mesmo período, em reações de amplificação independentes, mantiveram os mesmos padrões de RAPD, sugerindo a ausência de variações genéticas.

Na literatura atual existem diversos trabalhos que descrevem o emprego da técnica de RAPD para diferentes estudos com leveduras. Análises de padrões de RAPD podem ser úteis na obtenção de caracteres para tipagem de espécies de *Candida* em investigações epidemiológicas e também para uma rápida identificação de fungos patogênicos e não patogênicos (Mello *et al.*, 1998; Andrighetto *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2004). Adicionalmente, esta técnica tem sido aplicada para outras finalidades, em estudos diversos. Novak *et al.* (2004) a utilizaram para a caracterização de mutantes de *C. albicans* com variações na morfologia de colônias e seus híbridos. Jain *et al.* (2001) mostraram que o padrão de RAPD pode ser útil na diferenciação entre isolados sensíveis e resistentes ao fluconazol. Zeng *et al.* (1996) utilizaram a tipagem molecular por RAPD para avaliação da relação entre espécies de leveduras obtidas de uma coleção de culturas, mostrando haver elevada heterogeneidade entre elas. Waltimo *et al.* (2001) empregaram a análise fenotípica combinada com análise genotípica por RAPD para a tipagem de cepas de *C. albicans* isoladas de infecção de canal dentário. A combinação de três métodos fenotípicos promoveu uma boa diferenciação das 37 cepas analisadas em três principais fenótipos, enquanto que a genotipagem por RAPD gerou 10 e 12 genótipos com dois *primers* diferentes.

Entretanto, parecem escassas as informações quanto à aplicabilidade desta metodologia na detecção de microevoluções em microrganismos *in vitro* ou *in vivo*. Poucos

são os dados disponíveis em análises de cepas armazenadas, e nenhum estudo foi encontrado que demonstrasse modificações genéticas entre amostras de *Candida* spp. antes e depois de preservadas em laboratório. Técnicas de tipagem molecular de *C. albicans* foram comparadas por Pujol *et al.* (1997). Estes autores demonstraram que a capacidade discriminatória entre cepas altamente relacionadas, a base para o monitoramento de microevoluções e substituição de cepas, foi diferente comparando-se a análise por RAPD, MLEE, hibridização com sonda Ca3 e sonda CARE2. Todos os métodos apontaram como idênticos, pares de isolados de uma mesma cepa com variações fenotípicas. Entretanto, os três métodos mostraram capacidade discriminatória distinta para isolados não idênticos, porém, altamente relacionados. Métodos baseados no padrão de hibridização gerado com seqüências moderadamente repetitivas foram os mais discriminatórios para a identificação de mudanças microevolucionárias entre isolados de mesma origem.

Nosso estudo parece ser a primeira tentativa de observação de variações genéticas por RAPD, em amostras de leveduras preservadas em diferentes condições laboratoriais. Não foi possível detectar microevoluções nas cepas armazenadas, embora um estudo sugere que isso é possível *in vivo*. Metzgar *et al.* (1998) avaliaram alterações genéticas, *in vivo*, no perfil de cepas de *C. albicans* isoladas no pré e pós tratamento com fluconazol. Durante o curso do tratamento, as cepas que colonizavam os pacientes apresentaram uma das três ocorrências: permaneceram idênticas, foram substituídas por cepas claramente diferentes, ou ainda, sofreram pequenas modificações, observadas tanto pela análise de fragmentos de RAPD como por análise das seqüências de microsátélites. Neste mesmo estudo, uma avaliação *in vitro* mostrou que os *loci* microsatelite utilizados para a análise permaneceram estáveis mesmo após oito semanas em cultivos sucessivos, sugerindo que o ambiente *in vivo* pode desestabilizar estes *loci* ou que modificações nas seqüências microsatelite representavam, na verdade, substituição clonal da cepa por um genótipo raro presente na população original.

O estudo que mais se aproxima da presente investigação é o de Franzot *et al.* (1998), os quais demonstraram a ocorrência de microevolução *in vitro* em isolados de uma única cepa padrão de *Cryptococcus neoformans*, que apresentou alterações fenotípicas

após serem mantidos em diferentes condições laboratoriais. Estes dados sugerem que esta cepa pode sofrer modificações sob diferentes condições laboratoriais no decorrer do tempo. As alterações genéticas nesta cepa foram detectáveis através de técnica de cariotipagem, confirmando evidências de que *C. neoformans* é uma espécie com maior tendência em sofrer variações genéticas *in vitro* e *in vivo* (Fries *et al.*, 1996; Sullivan *et al.*, 1996).

A não ocorrência de alterações genéticas detectáveis por RADP na presente pesquisa já era esperada. Vários fatores contribuem para esta observação. Modificações fenotípicas podem ser decorrentes de alterações genéticas. Prováveis variações no genoma podem ser detectadas em cepas com morfologia alterada de colônias, por exemplo (Franzot, *et al.*, 1998; Pesti, *et al.*, 2001; Novak *et al.*, 2004). Contudo, não observamos alterações fenotípicas constantes, nem no aspecto morfológico, nem bioquímico das amostras, que poderiam sugerir que houvesse ocorrido variação genética. As pequenas modificações observadas nos resultados de alguns testes fenotípicos analisados neste estudo não foram estáveis, levando-se a inferir que não eram oriundas de alterações genéticas. A ocorrência de mutações pontuais, como, por exemplo, substituições de bases, não são facilmente detectáveis pela maioria das técnicas moleculares mais utilizadas, incluindo o RAPD, pela própria característica aleatória do método. Somente um sequenciamento de todo o genoma poderia com precisão, avaliar estas mutações, o que não seria possível de ser realizado neste trabalho.

Um amplo estudo de variações fenotípicas e genotípicas em mutantes de *C. albicans* foi publicado por Rustchenko-Bulgac *et al.* (1990; 1991; 1993). Estes pesquisadores demonstraram a ocorrência de variações na morfologia e na pigmentação de colônias, na habilidade para germinar e na habilidade de crescimento em diferentes temperaturas, em mutantes espontâneos e induzidos. Tais mudanças fenotípicas estavam geralmente acompanhadas de alterações cromossômicas, evidenciadas por cariotipagem eletroforética. Variações espontâneas ou induzidas na morfologia de colônias em cepas de *C. albicans* mantidas em laboratório tem sido reportada por diversos autores (Slutsky *et al.*, 1985; Gallagher *et al.*, 1992). Embora parece ser relativamente comum a ocorrência de variações em cepas laboratoriais, nosso estudo mostrou uma elevada estabilidade entre

os isolados estudados, após manutenção laboratorial. As alterações detectadas nas provas de produção de enzimas e crescimento em caldo NaCl 6,5% não foram estáveis e não estavam relacionadas com mudanças no perfil genotípico por RAPD.

Mais estudos são necessários para se avaliar a capacidade dos métodos moleculares disponíveis na detecção de microevoluções. Pesti *et al.*, (2001) demonstraram variações nos padrões de RAPD para mutantes morfológicos induzidos a partir de uma cepa padrão de *C. albicans*. Em nosso estudo, a utilização de outros *primers* e o emprego de mais de uma técnica, como a associação de RAPD, análise de seqüências microsatelites e cariotipagem, poderia aumentar a sensibilidade da investigação, e ampliar os dados a esse respeito. Outra observação deve ser feita com relação à utilização do RAPD. Apesar de ser uma metodologia bastante difundida, devido a sua aplicabilidade em diferentes pesquisas, a escolha dos *primers* tem influência direta nos resultados (Waltimo *et al.*, 2001). Apesar de nesta pesquisa terem sido testados sete *primers* diferentes, vários outros podem ser testados neste sentido, buscando-se aqueles com afinidade para seqüências de regiões menos conservadas no genoma. Porém, esta investigação implicaria em um novo estudo.

As condições de armazenamento testadas em nosso estudo promovem, em maior ou menor grau, a latência metabólica das cepas. Com isso, existe uma maior probabilidade de que, como o crescimento e a reprodução celular estão lentos ou estacionados, a ocorrência de variações genéticas seja minimizada. Esse, na verdade, é o objetivo que se procura ao aplicar um método de preservação de culturas: manter a estabilidade das células sem, contudo, perder a viabilidade. Teoricamente, os métodos menos susceptíveis a variações seriam a manutenção em água, o congelamento ou a liofilização. O congelamento e a liofilização parecem ser mais agressivos, no entanto a aplicação correta da técnica e o uso de crioprotetores adequados, comprovadamente, diminui os danos do processo de congelamento, descongelamento e secagem, permitindo longos períodos de manutenção da viabilidade, de acordo com dados da literatura. Por outro lado, a manutenção em óleo e as transferências seriadas permitem que ocorra atividade metabólica, ainda que reduzida, o que poderia implicar em maior susceptibilidade a modificações no genoma das amostras. Diferenças nos índices de

alterações fenotípicas entre os métodos de armazenamento analisados não foram observados. Análises estatísticas não são aplicáveis nos resultados deste estudo, uma vez que o número de repetições dos testes fenotípicos para cada método de armazenamento foi pequeno e variável.

Com base nestes resultados, pode-se inferir que estudos retrospectivos, que envolvam a análise da morfologia, do bioquimismo e dos padrões genéticos por RAPD, podem ser executados em amostras mantidas em laboratório por um dos cinco métodos testados em condições padronizadas. Características fenotípicas relacionadas a funções essenciais para a sobrevivência das células, como a utilização de carboidratos e habilidade de crescer em temperaturas elevadas, e o padrão morfológico, aparentemente são menos susceptíveis a variações com o tempo, ao contrário da produção de enzimas proteolíticas e da habilidade em crescer em meio hipertônico. Com relação a estes últimos caracteres, sugere-se, portanto, evitar a sua utilização para a caracterização de cepas armazenadas por períodos muito extensos, considerando-se a metodologia e as condições empregadas nesta pesquisa.

Alguns princípios básicos devem ser observados ao se trabalhar com cepas mantidas em laboratório: em transferências seriadas e culturas em SDA com óleo mineral, repicar sempre várias colônias ou uma massa de células a fim de evitar seleção de mutantes; armazenar os tubos com as culturas em geladeira e preferir congelamento a temperaturas mais baixas (-70°C). Adicionalmente, medidas como a reativação com meios adequados, dois ou três repiques prévios aos testes fenotípicos, padronização das condições de manutenção e conhecimento a cerca de espécies com exigências especiais ou características peculiares devem ser observadas. Os cinco métodos testados neste estudo são mencionados na literatura como sendo úteis na manutenção de leveduras e outras espécies de microrganismos. Tais técnicas, desde que corretamente empregadas fornecem bons resultados tanto na manutenção da viabilidade das culturas como em sua estabilidade. Todavia, o método ideal para se manter uma dada espécie de levedura deve ser escolhido com base na disponibilidade de recursos do laboratório, no tempo de conservação requerido e na utilização que se fará das amostras. Finalidades específicas devem ser avaliadas individualmente, quando se deseja a manutenção de uma dada

característica da cepa que será empregada num estudo específico ou num processo industrial ou biotecnológico (Brummer *et al.*, 1990; Ferreira da Silva *et al.*, 1992; Suga *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2002).

Assim, é possível a utilização de leveduras do gênero *Candida* conservadas em laboratório, por qualquer um dos cinco métodos avaliados neste estudo, para finalidade técnica ou de pesquisa, desde que padronizadas as condições de conservação. No entanto, cepas que serão utilizadas para finalidades específicas devem ser testadas individualmente quanto ao método de conservação mais indicado.

7. CONCLUSÕES

Sob as condições experimentais deste trabalho, considerando os resultados obtidos, foi possível concluir que:

1. Os cinco métodos avaliados para a conservação de leveduras permitem a manutenção da viabilidade das espécies estudadas por pelo menos 18 meses, com exceção de *C. dubliniensis* em óleo mineral.
2. Não ocorrem variações estáveis nos padrões fenotípicos testados em cepas mantidas nas condições laboratoriais estudadas.
3. Não há diferenças na manutenção das propriedades fenotípicas e genotípicas das amostras estudadas entre os métodos de armazenamento testados.
4. O padrão de produção de enzimas fosfolipases e proteinases em ágar por espécies de *Candida* é susceptível a variações, porém não estáveis, em cepas mantidas em laboratório por períodos prolongados, independente do método de armazenamento.
5. O padrão de RAPD, obtido com os *primers* utilizados neste estudo, não se altera em amostras de leveduras do gênero *Candida*, após a conservação pelos métodos testados.

REFERÊNCIAS*

- Abadias M, Teixidó N, Usall J, Benabarre A, Viñas I. Viability, efficacy, and storage stability of freeze-dried biocontrol agent *Candida sake* using different protective and rehydration media. **J Food Prot.** 2001; 64: 856-61.
- Adrio JL, Demain AL. Fungal biotechnology. **Int Microbiol.** 2003; 6(3): 191-9.
- Aguilar PS, Lopez P, Mendoza D. Transcriptional control of the low-temperature-inducible *des* gene, encoding the D5 desaturase of *Bacillus subtilis*. **J Bacteriol.** 1999; 181(22): 7028-33.
- Alves SH, Milan EP, de Laet Sant'Ana P, Oliveira LO, Santurio JM, Colombo AL. Hypertonic sabouraud broth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 2002; 43(1): 85-6.
- Andrighetto C, Psomas E, Tzanetakis N, Suzzi G, Lombardi A. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. **Lett Appl Microbiol.** 2000; 30: 5-9.
- Antheunisse J. Viability of lyophilized microorganisms after storage. **Antonie van Leeuwenhoek.** 1973; 39: 243-8.
- Antheunisse J, de Bruin-Tol W, van der Pol-Van Soest ME. Survival of microorganismos after drying and storage. **Antonie van Leeuwenhoek.** 1981; 47: 539-45.
- Arthur H, Watson K. Thermal adaptation in yeast: growth temperatures, membrane lipid, and cytochrome composition of psychrophilic, mesophilic, and thermophilic yeasts. **J Bacteriol.** 1976; 128(1): 56-68.
- Ashcar H, Paula CR, Petrocini VR. Manutenção de fungos por processo de liofilização após período prolongado de tempo – 34 anos. **Rev Microbiol.** 1988; 19(4): 422-4.
- Asleson CM, Bensen ES, Gale CA, Melms AS, Kurischko C, Berman J. *Candida albicans* *INT1*-induced filamentation in *Saccharomyces cerevisiae* depends on Sla2p. **Mol Cell Biol.** 2001; 21(4): 1272-84.
- Baldasserini G, Mungelluzzi C. The use of distilled water for the maintenance in culture of dermatophytes and yeast. **Mycopathol Mycol Appl.** 1965; 27(1): 110-2.
- Bauer D, Müller H, Reich J, Riedel H, Ahrenkiel V, Warthoe P, et al. Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). **Nucleic Acids Res.** 1993; 21(18): 4272-80.

*De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

- Baumgartner C, Freydiere A, Gille Y. Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using Albicans ID and CHROMagar Candida plates. **J Clin Microbiol.** 1996; 34: 454-6.
- Benedek, T. On Castellani's water culture and Benedek's Mycotheca in Chloralactophenol. **Mycopathol Mycol Appl.** 1963; XVII(3): 255-60.
- Bernal S, Mazuelos EM, Garcia M, Aller AI, Martínez MA, Gutiérrez MJ. Evaluation of CHROMagar Candida medium for the isolation and presuntive identification of species of *Candida* of clinical importance. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 1996; 24: 201-4.
- Bezjak V, Chandy R. Growth of fresh human isolates of some *Candida* species at 45°C. **J Med Vet Mycology.** 1989; 27: 197-200.
- Branchini ML, Geiger DC, Fischman O, Pignatari AC. Molecular typing of *Candida albicans* strains isolated from nosocomial candidemia. **Rev Inst Med Trop.** 1995; 37(6): 483-7.
- Brass C, Volkmann CM, Philpott DE, Klein HP, Halde CJ, Stevens DA. Spontaneous mutant of *Blastomyces dermatitidis* attenuated in virulence for mice. **Sabouraudia** 1982; 20(2): 145-58.
- Brummer E, Restrepo A, Hanson LH, Stevens DA. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*: the influence of *in vitro* passage and storage. **Mycopathologia** 1990; 109: 13-7.
- Bulkholz RG, Gleeson MA. Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. **Biotechnology** 1991; 9(11): 1067-72.
- Calcedo R, Lariño E, Calvo E, Rementeria A, Sevilla MJ, Pontón J, *et al.* Differences in the *Candida albicans* antigenic expression after heat shock and infection. **Rev Iberoam Micol.** 2001; 18: 6-11.
- Cameron RJ, Ferguson JK, O'Brien MW. Pulsed-field gel electrophoresis is a useful tool in the monitoring of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic outbreaks in the intensive care unit. **Anaesth Intensive Care.** 1999; 27(50): 447-51.
- Candido RC, Azevedo RVP, Ito II. Yeasts: the prevalence in the oral cavity of individuals with or without denture. **Rev Odontol.** 1995; 7(1): 27-33.
- Candido RC, Azevedo RVP, Komesu MC. Enzymotyping of species of the genus *Candida* isolated from the oral cavity. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2000; 33(5): 437-442.
- Carruba G, Pontieri E, De Bernardis F, Martino P, Cassone A. DNA fingerprinting and electrophoretic karyotype of environmental and clinical isolates of *Candida parapsilosis*. **J Clin Microbiol.** 1991; 29(5): 916-22.
- Chakrabarti A, Kayak T, Talmar P. *In vitro* proteinase production by *Candida* species. **Mycopathologia** 1991; 114(3): 163-8.

- Chu G, Vollrath D, Davis RW. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. **Science** 1986; 234(4778): 1582-5.
- Coleman DC, Rinaldi MG, Haynes KA, Rex JH, Summerbell RC, Anaissie EJ, *et al.* Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. **Medical Mycology**. 1998; 36(suppl 1): 156-65.
- Crespo MJ, Abarca ML, Cabañes FJ. Evaluation of different preservation and storage methods for *Malassezia* spp. **J Clin Microbiol**. 2000; 38(10): 3872-5.
- Diniz-Mendes L, Bernardes E, de Araújo PS, Panek AD, Paschoalin VMF. Preservation of frozen yeast cells by trehalose. **Biothechnol Bioengin**. 1999; 65(5): 572-8.
- Doyle JJ, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 1990; 12: 13-15.
- Ellis JJ, Roberson JA. Viability of fungus cultures preserved by lyophilization. **Mycologia** 1968; 60: 296-7.
- Ferreira da Silva L, Kamiya NF, Oliveira MS, Alterthum F. Comparison of preservation methods applied to yeasts used for ethanol production in Brazil. **Rev. Microbiol**. 1992; 23(3): 177-82.
- Fernandes PMB. How does yeast respond to pressure? **Braz J Med Biol Res**. 2005; 38: 1239-45.
- Franzot SP, Mukherjee J, Cherniak R, Chen LC, Hamdan JS, Casadevall A. Microevolution of a standard strain of *Cryptococcus neoformans* resulting in differences in virulence and other phenotypes. **Infect Immun**. 1998; 66(1): 89-97.
- Freydiere AM, Guinet R, Boiron P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. **Med Mycol**. 2001; 39: 9-33.
- Fries BC, Chen F, Currie BP, Casadevall A. Karyotype instability in *Cryptococcus neoformans* infection. **J. Clin. Microbiol**. 1996; 34:1531-4.
- Gales AC, Pfaller MA, Houston AK, Joly S, Sullivan DJ, Coleman DC, *et al.* Identification of *Candida dubliniensis* based on temperature and utilization of xilose and α -methyl-D-glucoside as determined with the API 20C AUX and Vitek YBC systems. **J Clin Microbiol**. 1999; 37(12): 3804-8.
- Gallagher PJ, Bennet DE, Henman MC, Russel RJ, Flint SR, Shanley DB. *et al.* Reduced azole susceptibility of oral isolates of *Candida albicans* from HIV-positive patients and a derivative exhibiting colony morphology variation. **J Gen Microbiol**. 1992; 138: 1901-11.
- Gentles JC, Scott E. The preservation of medically important fungi. **Sabouraudia** 1979; 17: 415-8.
- Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clin Microbiol Rev**. 2000; 13(1): 122-43.

- Girão MD, Prado MR, Brilhante RSN, Cordeiro RA, Monteiro AJ, Sidrim JJC, *et al.* Viability of *Malassezia pachydermatis* strains maintained in various storage mediums. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2004; 37(3): 229-33.
- Hamal P, Dosntál J, Raclavsky V, Krylová M, Pichová I, Hrusková-Heidingsfeldová. Secreted aspartate proteinases, a virulence factor of *Candida* spp.: occurrence among clinical isolates. **Folia Microbiol.** 2004; 49(4): 491-6.
- Hanaoka N, Umeyama T, Ueno K, Ueda K, Beppu T, Fugo H. *et al.* A putative dual-specific protein phosphatase encoded by YVH1 controls growth, filamentation and virulence in *Candida albicans*. **Microbiology** 2005; 151(Pt 7): 2223-32.
- Hannula J, Saarela M, Dogan B, Paatsama J, Koukila-Kahkola P, Pirinen S, *et al.* Comparison of virulence factors of oral *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates in healthy people and patients with chronic candidosis. **Oral Microbiol Immunol.** 2000; 5(4): 238-44.
- Hawksworth DL. Fungus culture collections as a biotechnological resource. **Biotechnol Genet Eng Rev.** 1985; 3: 417-40.
- Hazen KC, Cutler JE. Autoregulation of germ tube formation by *Candida albicans*. **Infect Immun.** 1979; 24(3): 661-6.
- Hazen KC. New and emerging yeast pathogens. **Clin Microbiol Rev** 1995; 8: 462-78.
- Hino A, Mihara K, Nakashima K, Takano H. Trehalose levels and survival ratio of freeze-tolerant versus freeze-sensitive yeasts. **Appl Environ Microbiol.** 1990; 56(5): 1386-91.
- Hirasawa R, Yokoigawa K, Isobe Y, Kawai H. Improving the freeze tolerance of bakers' yeast by loading with trehalose. **Biosci Biotechnol Biochem.** 2001; 65(3): 522-6.
- Hirasawa T, Nakakura Y, Yoshikawa K, Ashitani K, Nagahisa K, Furusawa C, *et al.* Comparative analysis of transcriptional responses to saline stress in the laboratory and brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae* with DNA microarray. **Appl Microbiol Biotechnol.** 2005: 1-12.
- Homma T, Iwahashi H, Komatsu Y. Yeast gene expression during growth at low temperature. **Cryobiology** 2003; 46(3): 230-7.
- Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiology** 2001; 147: 1997-2005.
- Ibrahim AS, Filler SG, Sanglard D, Edwards Jr. JE, Hube B. Secreted aspartyl proteinases and interactions of *Candida albicans* with human endothelial cells. **Infect Immun.** 1998; 66(6): 3003-5.
- Jain P, Khan ZK, Bhattacharya E, Ranade SA. Variation in random amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles specofoc to fluconazole-resistant and -sensitive strains of *Candida albicans*. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 2001; 41: 113-9.

- Jones JM. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. ***Clin Microbiol Rev.*** 1990; 3: 32-45.
- Kärenlampi SO, Marin E, Hänninen OOP. Effect of carbon source on the accumulation of cytochrome P-450 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. ***Biochem J.*** 1981; 194: 407-13.
- Kawamura S, Murakami Y, Miyamoto Y, Kimura K. Cryopreservation and freeze-drying protocols. Freeze-drying of yeasts. ***Methods Mol Biol.*** 1995; 38: 31-7.
- Kirsop BE, Snell JJS. ***Maintenance of Microorganisms, A Manual of Laboratory Methods.*** London: Academic Press Inc.; 1984.
- Koehler AP, Chu KC, Houg ET, Cheng AF. Simple, reliable, and cost-effective yeast identification scheme for the clinical laboratory. ***J Clin Microbiol.*** 1999; 37: 422-6.
- Lacaz CS. ***Candidiasis.*** São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1980.
- Lehmann PF, Lin D, Lasker BA. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using Random Amplified Polymorphic DNA. ***J Clin Microbiol.*** 1992; 30(12): 3249-54.
- Leslie SB, Israeli E, Lighthart b, Crowe JH, Crowe L. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. ***Appl Env Microbiol.*** 1995; 61(10): 6592-7.
- Leung WK, *et al.* Oral colonization, phenotypic, and genotypic profiles of *Candida* species in irradiated, dentate, xerostomic nasopharyngeal carcinoma survivors. ***J Clin Microbiol.*** 2000; 38: 2219-26.
- Lima RF, Brito MMS, Schäffer GMV, Lima OC, Borba CM. Evaluation of the *in vitro* and *in vivo* dimorphism of *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis* and *Paracoccidioides brasiliensis* isolates after preservation in mineral oil. ***Can J Microbiol.*** 2004; 50: 445-9.
- Lindquist S, Kim G. Heat-shock protein 104 expression is sufficient for thermotolerance in yeast. ***Proc Natl Acad Sci USA.*** 1996; 93(11): 5301-6.
- Lott TJ, Kuykendall RJ, Welbel SF, Pramanik A, Lasker BA. Genomic heterogeneity in the yeast *Candida parapsilosis*. ***Curr Genet.*** 1993; 23: 463-7.
- Magee PT, Bowdin L, Staudiner J. Comparison of molecular typing methods for *Candida albicans*. ***J Clin Microbiol.*** 1992; 30: 2674-9.
- Mariano P de L, Milan EP, da Matta DA, Colombo AL. *Candida dubliniensis* identification in Brazilian yeast stock collection. ***Mem Inst Oswaldo Cruz.*** 2003; 98(4): 533-8.
- Martin MV. Germ-tube positive *Candida tropicalis*. ***Am J Clin Pathol.*** 1979; 71: 130-1.
- McLellan MR, Day JG. Cryopreservation and freeze-drying protocols. Introduction. ***Methods Mol Biol.*** 1995; 38: 1-5.

- McGinnis MR, Padhye AA, Ajello L. Storage of stock cultures of filamentous fungi, yeasts, and some aerobic actinomycetes in sterile distilled water. **Appl Microbiol.** 1974; 28(2): 218-22.
- Melo ASA, Almeida LP, Colombo AL, Briones MRS. Evolutionary distances and identification of *Candida* species in clinical isolates by Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD). **Mycopathologia** 1998; 142: 57-66.
- Mendes da Silva AM, Borba CM, Oliveira PC. Viability and morphological alterations of *Paracoccidioides brasiliensis* strains preserved under mineral oil for long periods of time. **Mycoses** 1994; 37:165-9.
- Metzgar D, van Belkum A, Field D, Haubrich R, Wills C. Random Amplification of Polymorphic DNA and microsatellite genotyping of pre- and posttreatment isolates of *Candida* spp. from human immunodeficiency virus-infected patients on different fluconazole regimens. **J Clin Microbiol.** 1998; 36(8): 2308-13.
- Milan EP, Malheiros ES, Fishman O, Colombo AL. Evaluation of Auxacolor system for the identification of clinical yeast isolates. **Mycopathologia** 1997; 137: 153-7.
- Murata Y, Homma T, Kitagawa E, Momose Y, Sato MS, Odani M, *et al.* Genome-wide expression analysis of yeast response during exposure to 4°C. **Extremophiles** 2005.
- Muro MA, Luchi MR. **Preservação de microrganismos.** Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello"; 1989.
- Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. **Manual of clinical microbiology.** Washington D.C.: 6th Edition, ASM Press; 1995.
- Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiol Mol Biol Rev.** 2003; 67(3): 400-28.
- Niewerth M, Korting HC. Phospholipases of *Candida albicans*. **Mycoses** 2001; 44: 9-10.
- Nobile CJ, Bruno VM, Richard ML, Davis DA, Mitchell AP. Genetic control of chlamydospore formation in *Candida albicans*. **Microbiol.** 2003; 149: 3629-37.
- Norkrans B, Kylin A. Regulation of the potassium to sodium ratio and of the osmotic potential in relation to salt tolerance in yeast. **J Bacteriol.** 1969; 100(2): 836-45.
- Novak A, Vágvölgyi C, Emödy L, Pesti M. Characterization of *Candida albicans* colony morphological mutants and their hybrids by means of RAPD-PCR, isoenzyme analysis and pathogenicity analysis. **Folia Microbiol.** 2004; 49(5): 527-33.
- Odds FC. **Candida and candidosis.** London: 2nd Edition, Baillière Tindall; 1988.
- Odds FC. Long term laboratory preservation of pathogenic yeasts in water. **J Med Vet Mycol.** 1991; 29: 413-5.

- Penha JL, Birman EG, Silveira FRX, Paula CR. Frequency and enzymatic activity (proteinase and phospholipase) of *Candida albicans* from edentulous patients, with and without denture stomatitis. **Pesq Odont Bras.** 2000; 14(2): 119-22.
- Perry JL, Miller GR. Umbelliferyl-labelled galactosamine as an aid in identification of *Candida albicans*. **J Clin Microbiol.** 1988; 25: 2424-5.
- Pesti M, Vagvolgyi CS, Papp T, Nagy A, Novak A. Variation of isoenzyme and RAPD patterns in *Candida albicans* morphological mutants with altered colony ultrastructure. **Acta Biol Hung.** 2001; 52(2-3): 289-98.
- Pfaller MA. Epidemiology of fungal infections: the promise of molecular typing. **Clin Infect Dis.** 1995; 20: 1535-9.
- Pichová I, Pavlicková L, Dostál J, Dolejši E, Hrusková-Heidingsfeldová O, Weber J, et al. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. **Eur J Biochem.** 2001; 268: 2669-77.
- Pinto MP, Resende MA, Koga-Ito CY, Tendler M. Genetic variability analysis among clinical *Candida* spp. isolates using Random amplified polymorphic DNA. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2004; 99(2): 147-52.
- Power EGM. RAPD typing in microbiology: a technical review. **J Hosp Infect.** 1996; 34: 247-65.
- Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia** 1982; 20: 7-14.
- Pujol C, Joly S, Lockhart SR, Noel S, Tibayrenc M, Soll DR. Parity among Randomly amplified polymorphic DNA method, multilocus enzyme electrophoresis and southern blot hybridization with the moderately repetitive DNA probe Ca3 for fingerprinting *Candida albicans*. **J Clin Microbiol.** 1997; 35(9): 2348-58.
- Qiangqiang Z, Jiajun W, Li L. Storage of fungi using sterile distilled water or lyophilization: comparison after 12 years. **Mycoses** 1998; 41(5-6): 255-7.
- Revillion JPP, Brandelli A, Ayub MAZ. Production of yeast extract from whey using *Kluyveromyces marxianus*. **Braz Arch Biol Technol.** 2003; 46(1): 121-7.
- Rodrigues EG, Lírio VS, Lacaz CS. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. **Rev Inst Med Trop.** 1992; 34(2): 159-65.
- Römmling U, Tümmler. Achieving 100% typeability of *Pseudomonas aeruginosa* by pulsed-field gel electrophoresis. **J Clin Microbiol.** 2000; 38(1): 464-5.
- Rose D. Some Factors Influencing the survival of freeze dried yeast cultures. **J Appl Bact.** 1970; 33: 228-2.
- Ruchel R, Tegeler R, Trost M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. **Sabouraudia** 1982; 20: 233-44.

- Russo S, Berkovitz Siman-Tov R, Poli G. Yeasts: from genetics to biotechnology. **J Environ Pathol Toxicol Oncol.** 1995; 14: 133-57.
- Rustchenko-Bulgac EP, Sherman F, Hicks JB. Chromosomal rearrangements associated with morphological mutants provide a means for genetic variation of *Candida albicans*. **J Bacteriol.** 1990; 172(3): 1276-83.
- Rustchenko-Bulgac EP. Variations of *Candida albicans* electrophoretic karyotypes. **J Bacteriol.** 1991; 173(20): 6586-96.
- Rustchenko-Bulgac EP, Howard DH. Multiple chromosomal and phenotypic changes in spontaneous mutants of *Candida albicans*. **J Gen Microbiol.** 1993; 139: 1195-207.
- Saab OCA, Castillo MC, Holgado APR, Nader OM. A comparative study of preservation and storage of *Haemophilus influenzae*. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2001; 96(4): 583-6.
- Saarela M, Hannula J, Matto J, Asikainen S, Alaluusua S. Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Arch Oral Biol.** 1996; 41: 821-6.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science** 1988; 239: 487-91.
- Samaranayake LP, Raeside JM, MacFarlane TW. Factors effecting the phospholipase activity of *Candida albicans* in vitro. **Sabouraudia** 1984; 11: 201-7.
- Sandven P. Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. **Acta Odontol Scand.** 1990; 48: 27-36.
- Sansinforiano ME, Rabasco A, Martínez-Trancón M, Parejo JC, Mendoz MH, Padilla JA. Optimización de las condiciones RAPD-PCR en *Candida* spp. y *Cryptococcus* spp. **Rev Iberoam Micol.** 2001; 18: 65-9.
- Santos IM, Abrunhosa L, Venâncio A, Lima N. The effect of culture preservation techniques on patulin and citrinin production by *Penicillium expansum* Link. **Lett Appl Microbiol.** 2002; 35: 272-5.
- Sanz P, Josebe Unzaga M, Gallego L, Pujana I, Lopez-Otsoa F, Ezpeleta C, et al. Genetic typing by PCR of isolates of *C. albicans* obtained in a resuscitation unit. **Enferm Infecc Microbiol Clin.** 1998; 16(1): 9-13.
- Schaller M, Schäfer W, Korting HC, Hube B. Differential expression of secreted aspartyl proteinases in a model of human oral candidosis and in patient samples from the oral cavity. **Mol Microbiol.** 1998; 29(2): 605-15.
- Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeasts chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell** 1984, 37: 67-75.
- Shimizu MT. Enzimas histolísticas produzidas por leveduras do gênero *Candida*. **Rev Microbiol.** 1989; 19(4): 442-5.

- Shimizu MT, Almeida NQ, Fantinato V, Unterkircher CS. Studies on hyaluronidase, chondroitin sulphatase, proteinase and phospholipase secreted by *Candida* species. ***Mycoses*** 1996; 39: 161-7.
- Shin JH, Shin DH, Song JW, Kee SJ, Suh SP, Ryang DW. Electrophoretic karyotype analysis of sequential *Candida parapsilosis* isolates from patients with persistent or recurrent fungemia. ***J Clin Microbiol.*** 2001; 39(4): 1258-63.
- Slutsky B, Buffo J, Soll DR. High frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. ***Science*** 1985; 230: 666-9.
- Souzu H. Proceedings: The phospholipid degradation and cellular death caused by freeze-thawing or freeze-drying of yeast. ***Cryobiology.*** 1973; 10(5): 427-31.
- Spencer JF, Spencer DM. Maintenance and culture of yeasts. ***Methods Mol Biol.*** 1996; 53:5-15.
- Staib P, Morchhauser J. Differential expression of the NRG1 repressor controls species-specific regulation of chlamydospore development in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. ***Mol Microbiol.*** 2005; 55(2): 637-52.
- Stone CW. Yeast products in the feed industry. A practical guide for feed professionals. Diamond V Mills, Inc. Cedar Rapids, Iowa[®], 1998. Disponível em: URL: <http://www.diamondv.com/articles/booklet.html> (2005 Nov. 20).
- Strijkert PJ. Impact of fungal molecular genetics on biotechnology. ***Antonie Van Leeuwenhoek*** 1987; 53: 357-361.
- Suga M, Isobe M, Hatakeyama T. Cryopreservation of competent intact yeast cells for efficient electroporation. ***Yeast*** 2000; 16: 889-96.
- Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov. phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV infected individuals. ***Microbiol.*** 1995; 141: 1507-21.
- Sullivan, D., K. Haynes, G. Moran, D. Shanley, D. Coleman. Persistence, replacement, and microevolution of *Cryptococcus neoformans* strains in recurrent meningitis in AIDS patients. ***J. Clin. Microbiol.*** 1996; 34:1739-44.
- Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: Characteristics and identification. ***J Clin Microbiol.*** 1998; 36: 329-34.
- Takagi H, Iwamoto F, Nakamori S. Isolation of freeze-tolerant laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae* from praline-analogue-resistant mutants. ***Appl Microbiol Biotechnol.*** 1997; 47: 405-11.
- Thieringer HA, Jones PG, Inouye M. Cold shock and adaptation. ***Bioassays.*** 1998; 20(1): 49-57.

- Tintelnot K, Haase G, Seibold M, Bergmann F, Staemmler M, Franz T, *et al.* Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*. **J Clin Microbiol.** 2000; 38: 1599-608.
- Tomita M, Yamamoto S, Yamaguchi K, Ohigashi h, Yagi T, Kohata K *et al.* Theasaponin E₁ destroys the salt tolerance of yeasts. **J Biosci Bioeng.** 2000; 90(6): 637-42.
- Van Belkum A, Melchers W, de Pauw BE, Scherer S, Quint W, Meis JF. Genotypic characterization of sequential *Candida albicans* isolates from fluconazole-treated neutropenic patients. **J Infect Dis.** 1994; 169: 1062-70.
- Waltimo TMT, Dassanayake RS, Orstavik D, Haapasalo MPP, Samaranayake LP. Phenotypes and randomly amplified polymorphic DNA profiles of *Candida albicans* isolates from root canal infections in a Finnish population. **Oral Microbiol Immunol.** 2001; 16: 106-12.
- Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res.** 1990; 18(24): 7213-18.
- Williams AG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.** 1990; 18: 6531-35.
- Williams DW, Lewis MAO. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. **Oral Dis.** 2000; 6(1): 3-11.
- Williamson MI, Samaranayake LP, MacFarlane TW. Phospholipase activity as a criterion for biotyping *Candida albicans*. **J Med Vet Mycol.** 1986; 24: 415-7.
- Wu T, Samaranayake LP, Cao BY, Wang J. In-vitro proteinase production by oral *Candida albicans* isolates from individuals with and without HIV infection and its attenuation by antimycotic agents. **J Med Microbiol.** 1996; 44(4): 311-6.
- Zeng S, Wu LC, Lehmann PF. Random amplified polymorphic DNA analysis of culture collection strains of *Candida* species. **J Med Vet Mycol.** 1996; 34: 293-7.

ANEXO 1

Meios de cultura

1. Ágar fosfolipase

Peptona	10g
Glicose	30g
Cloreto de Sódio	57,3g
Cloreto de Cálcio	0,55g
Ágar bacteriológico	20g
Água destilada	q.s.p. 1000mL
Emulsão de ovo a 50% (Egg Yolk enrichment – Laborclin)	100mL

Misturar todos os itens acima, exceto a emulsão de ovo e autoclavar por 15 minutos a 121°C. Após autoclavação, adicionar a emulsão de ovo quando o meio atingir uma temperatura de 45°C. Distribuir em placas de Petri 90x15 mm.

2. Ágar Fubá

Fubá	6,25g
Água	150ml
Ágar Bacteriológico	1,9g
Tween 80	1,5ml

Aquecer o fubá e a água em banho maria a 60°C durante 1 hora. Filtrar o fubá em gaze até que a solução fique limpa. Acrescentar o água e o Tween 80. Distribuir 15ml do meio em tubos (20x200mm) para armazenar. Autoclavar o meio durante 15 minutos à 120°C.

3. Ágar proteinase

Albumina de Soro Bovino (BSA – Fração V)	2g
Yeast Nitrogen Base (w/o amino acids ammonium sulfate)	1,45g
Glucose	20g
Ágar bacteriológico	20g
Água destilada	q.s.p. 1000mL

Autoclavar por 15 minutos a 121°C, a glucose, o ágar e 900 ml de água destilada. Quando o meio atingir uma temperatura aproximada de 45°C, acrescentar BSA e YNB dissolvidos nos 100 ml de água restantes, previamente esterilizados por filtração em membrana de 0,22µm. Distribuir em placas de Petri 90x15 mm.

4. Meio de assimilação de Carbono (meio C)

(NH ₄) ₂ SO ₄ (Sulfato de amônio)	5g
KH ₂ PO ₄ (Fosfato de Potássio Monobásico)	1g
Mg SO ₄ ·7H ₂ O (Sulfato de Magnésio)	0,3g
Ágar Bacteriológico	16,5g
Água destilada	q.s.p. 1000mL

Dissolver o ágar na água e acrescentar as demais substâncias. Fundir o meio no microondas até que fique homogêneo. Distribuir 20ml de meio por tubo (20x200mm). Autoclavar os tubos por 15 minutos à 120°C.

5. Meio base para Fermentação

Extrato de levedura	0,5g
Peptona	0,5g
Água Destilada	100ml
Açúcar (Glicose, Sacarose, Lactose, Galactose, Maltose)	1g

Misturar as substâncias colocando os açúcares separadamente em tubos individuais, identificando cada tubo com o nome do açúcar correspondente. (pH=7,2)

Indicador concentrado:

Púrpura de bromocresol	1,6g
Álcool	100ml

Em 100ml de meio adicionar 0,1ml de indicador concentrado e esterilizar em vapor fluyente por 1 hora, em dois dias.

6. Meio Completo para Leveduras

Peptona	10g
Extrato de levedura	10g
Fosfato dibásico de potássio	0,5g
Glicose	20g
Ágar bacteriológico	20g
Água destilada	q.s.p. 1000mL

Dissolver as substâncias na água destilada e autoclavar por 15 minutos a 121°C.

7. YPD – Yeast-Extract Peptone Dextrose

Extrato de levedura	10g
Peptona	10g
Glicose	20g
Água destilada	q.s.p. 1000mL

Dissolver as substâncias na água destilada. Aquecer em microondas para homogeneizar, sem deixar ferver. Autoclavar por 15 minutos a 121°C.

8. YM – Extrato de Malte e Levedura

Extrato de malte	3g
Extrato de levedura	3g
Peptona	5g
Glicose	10g
Água destilada	q.s.p. 1000mL

Dissolver as substâncias em 600mL de água e completar o volume até 1000mL de solução. Dispensar em tubos com tampa de rosca, autoclavar 15 minutos a 121°C.

ANEXO 2

Soluções utilizadas para extração de DNA e soluções estoque

1. Tampão de extração de DNA (para 12 amostras)

NaCl 1,4M	3,36 mL de 5M
Tris – HCl, pH 8,0, 100mM	1,2mL de 1M
EDTA, pH 8,0, 0,2mM	0,48 mL de 500 mM
Polivinilpirrolidona (PVP-40), 1%	120mg
CTAB, 2%	2,4mL de 10%
Proteinase K, 100 µg/mL	60µL de 20mg/mL
Beta-Mercaptoetanol, 0,2%	24µL
Água Milli-Q	4,476mL

Misturar todos os reagentes em recipiente previamente esterilizado.

2. Tampão de extração de DNA sem proteinase K (para 12 amostras)

NaCl 1,4M	3,36 mL de 5M
Tris – HCl, pH 8,0, 100mM	1,2mL de 1M
EDTA, pH 8,0, 0,2mM	0,48 mL de 0,5 M
Polivinilpirrolidona (PVP-40), 1%	120mg
CTAB, 2%	2,4mL de 10%
Beta-Mercaptoetanol, 0,2%	24µL
Água Milli-Q	4,476mL

Misturar todos os reagentes em recipiente previamente esterilizado.

3. Cloreto de sódio 1,4M

NaCl (Synth)	8,18g
Água destilada	q.s.p. 100mL

Dispensar o sal em balão volumétrico e o volume final foi completar com água até o volume de 100mL. Autoclavar a 121°C, durante 15 minutos e estocar à temperatura ambiente.

4. EDTA 0,5M pH 8,0

EDTA (Gibco BRL)	186,1g
Água destilada	q.s.p. 1000mL

Dissolver o EDTA (em agitador magnético) em 700mL de água destilada, acrescentando NaOH em pastilhas até que o EDTA esteja dissolvido. Ajustar o pH para 8,0 com HCl ou NaOH. Completar o volume para 1000mL. Autoclavar a solução a 121°C durante 15 minutos e estocar à temperatura ambiente.

5. Tampão TE (Tris-EDTA) 0,01M, pH 8,0

(Utilizada para diluição de *primers* e DNA obtido na extração)

Tris HCl 1M, pH 8,0	5mL
EDTA 0,5M, pH 8,0	1mL
Água destilada	q.s.p. 500mL

Misturar os reagentes e completar com água destilada até atingir o volume final de 500mL. Acertar o pH final para 8,0 adicionando NaOH concentrado.

6. Tris 1M pH 7,5

Trizma base (Gibco BRL)	121,14g
Água destilada	q.s.p. 500mL

Adicionar o trizma base 300mL de água destilada e ajustar o pH para 7,5 com NaOH ou HCl. Completar o volume para 500mL e autoclavar a solução a 121°C durante 15 minutos.

ANEXO 3

Soluções utilizadas para RAPD e eletroforese

1. Brometo de Etídio

(utilizado para corar o gel de agarose)

Brometo de Etídio 10mg/mL	20 μ L
Água destilada	400mL

Misturar os reagentes. Concentração final da solução: 0,5 μ g/mL.

2. Corante azul (Loading buffer ou tampão de corrida)

Bromofenol Blue	0,125g
Xilene Cyanol	0,125g
Glicerol	15mL
Água destilada	q.s.p. 50mL

Adicionar 20mL de água destilada aos 15 mL de glicerol e misturar os solutos. Completar com água até atingir o volume final de 50mL.

3. Tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) 5X

Tris HCL	54g
Ácido Bórico	27,5g
EDTA (0,5M, pH 8,0)	20mL
Água destilada	q.s.p. 1000mL

Misturar 20mL de EDTA com 500mL de água destilada e dissolver os outros reagentes. Adicionar a água até completar o volume de 1 litro. Acertar o pH final para 8,0 adicionando HCl.

Solução trabalho:

TBE 1x – Utilizada para preparar o gel de agarose e preencher a cuba eletroforética

Diluir o tampão TBE 5x pela relação: $C_f \times V_f = C_i \times V_i$

ANEXO 4 – Características fenotípicas de algumas leveduras do género *Candida* e *Saccharomyces*

Espécie	Ph	Assimilação														Fermentação							
		Gli	Sac	Gal	Raf	Xil	Cel	Tre	Man	Mal	Lac	Ino	Mel	Rib	Mez	Ram	KNO3	Gli	Sac	Lac	Mal	Gal	
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	V	V	-	-	+	-	-	-	+	(+)
<i>Candida stellatoidea*</i>	+	+	-	+	-	-	V	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	V
<i>Candida tropicalis</i>	+	+	+	+	-	V	+	+	+	-	-	-	-	V	+	-	-	+	-	-	-	+	+
<i>Candida parapsilosis</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	V	-	-	+	-	-	-	-	V
<i>Candida guilliermondii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	V	-	+	(+)	-	-	-	(+)
<i>Candida krusei</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Candida glabrata</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida lusitanae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	NC	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	V	+
<i>Candida rugosa</i>	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	NC	NC	NC	NC	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida norvegencis</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	V
<i>Candida pseudotropicalis**</i>	+	+	+	+	V	+	V	d	-	V	-	-	-	d	-	-	-	+	+	-	V	-	d
<i>Candida utilis</i>	+	+	+	+	+	+	+	V	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	R	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	NC	-	-	-	-	-	-	-	+	+

* Considerada atualmente sinónimo de *C. albicans*, variedade sacarose -.

** mesmo que *Candida kefir* ou *Kluiveromyces marxianus Van der Walt*

Legenda – M: morfologia; Ph: pseudo-hifa; Gli: glicose; Sac: sacarose; Gal: galactose; Raf: rafnose; Xil: xilose; Cel: celubiose; Ter: trealose; Mal: maltose; Lac: lactose; Ino: inositol; Mel: melibiose; Rib: ribitol; Mez: melezitose; Ram: ramnose; Man: manitol; KNO₃: nitrato de potássio; R: pseudo-hifas raramente presentes; +: assimilação ou fermentação positiva; -: assimilação ou fermentação negativa; (+): assimilação ou fermentação positiva com reação fraca; V: assimilação ou fermentação variável; NC: nada consta, d: 'delayed' (tardio).

Adaptado de: Lacaz, 1980 e Sandiven, 1990.