

EDVALDO ANTONIO RIBEIRO ROSA

(Farmacêutico)

**Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e
análise numérica de leveduras isoladas da cavidade
oral de humanos.**

*Este exemplar foi revisado/de
corrigido conforme resolução
CCPG/036/83 17/10/97
Hof*

**Tese apresentada ao curso de Pós-
Graduação em Odontologia - Área de
Biologia e Patologia Buco-Dental,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba,
Universidade Estadual de Campinas -
UNICAMP, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.**

Piracicaba

1997

R71e

32067/BC

EDVALDO ANTONIO RIBEIRO ROSA

(Farmacêutico)

**Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e
análise numérica de leveduras isoladas da cavidade
oral de humanos.**

**Tese apresentada ao curso de Pós-
Graduação em Odontologia - Área de
Biologia e Patologia Buco-Dental,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba,
Universidade Estadual de Campinas -
UNICAMP, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.**

Orientador: Prof. Dr. José Francisco Höfling

Piracicaba

1997



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	TIUNICAMP
	RJA 2
V.	Ex.
TOMBO BC	32067
PROC.	25/1/97
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	738,11,00
DATA	15/11/97
N.º CPD	

CM-00102557-9

Ficha Catalográfica Elaborada pela Biblioteca da FOP/UNICAMP

R71e

Rosa, Edvaldo Antonio Ribeiro.

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e análise numérica de leveduras isoladas da cavidade oral de humanos / Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa. - Piracicaba : [s.n.], 1997.

109f. : il.

Orientador : José Francisco Höfling.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Candida. 2. Eletroforese. 3. Análise numérica - Processamento de dados. 4. Análise de Clusters. I. Höfling, José Francisco. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

19.CDD - 616.015

Índices para o Catálogo Sistemático

1. Fungo

616.015



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de **Mestrado**, em sessão pública realizada em 14/10/97, considerou o candidato aprovado.

1. José Francisco Hofling

Handwritten signature of José Francisco Hofling, consisting of stylized initials and a surname.

2. Luiz Eduardo Gutierrez

Handwritten signature of Luiz Eduardo Gutierrez, written in a cursive script.

3. Fernando Carlos Pagnocca

Handwritten signature of Fernando Carlos Pagnocca, written in a cursive script.

Dedico esse trabalho,

Aos meus pais, Elço e Maria,

que não mediram esforços para me educarem e me prepararem para a vida.

Ao amigo Juan Sebastianes,

que mostrou-me o maravilhoso mundo da Ciência.

Ao meu orientador, Kiko,

que num primeiro momento acreditou em meu potencial, e que com o passar do tempo tornou-se um grande amigo.

À minha esposa Meire,

pelo fato de estar sempre ao meu lado, dispensando amor e carinho, necessários à manutenção da serenidade, mesmo nos momentos de dificuldade.

Dedico, de forma especial, essa obra à todos aqueles pesquisadores que corajosamente, arriscaram as próprias vidas, na intenção de se compreender e controlar as doenças infecciosas.

AGRADECIMENTOS.

Agradeço respeitosamente à todos que me ajudaram na execução desse trabalho de Tese.

Aos Professores Doutores **Luiz E. Gutierrez** (ESALQ-USP) e **Fernando C. Pagnocca** (UNESP-R. Claro), por terem aceitado avaliar este trabalho de Tese.

Ao Prof. Dr. **Carlos R. H. Fortinguerra** (FOP-UNICAMP), pela prontidão no atendimento junto à Coordenadoria do Curso de Pós-Graduação.

Aos Professores Doutores **Sérgio R. P. Line e Celso P. da Costa** (FOP-UNICAMP), pela inestimável colaboração.

Aos Professores Doutores **Luis C. Spolidorio e Denise M. P. Spolidorio** (UNESP-Araraquara), pela constante amizade e solidariedade.

Ao Prof. Dr. **Luis H. Gomes** (ESALQ-USP), pela disposição em auxiliar nosso laboratório, nos procedimentos de Análise Numérica.

Ao Prof. Dr. **Antonio O. C. Jorge** (UNESP-S.J.Campos) pela disposição em fornecer-nos as amostras empregadas nesse trabalho.

Aos colegas de turma, Professores **Paulo E. C. Peres, Ricardo Colleta, Simone Portela e Mário O. Bertochi**, pela solidariedade e ajuda.

Aos colegas de laboratório, Professores **Sérgio L. A. Rochelle, Janaína A. O. Rodrigues, Cristina C. Rodrigues e Ana Maria Sell**, pela amizade contraída durante o decorrer do nosso convívio.

Aos Professores **Cássio V. Pereira, Daniella Moreira e Alessandra S. Campos**, amigos inestimáveis, cuja ajuda jamais poderei retribuir à altura.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da FOP, Senhoras **Wilma C. Ferraz e Elza M. Tomazini**, e ao Senhor **Anderson L. Teixeira**, pela colaboração, sem a qual esse trabalho tornar-se-ia muito mais difícil.

Aos técnicos do Centro de Processamento de Dados da FOP, Senhores **José M. T. Favarin, Marco A. Romano, Marco A. Rapetti, Emílio C. Salles e Luis H. A. dos Santos**, pela amizade e colaboração.

Aos técnicos do Laboratório de Isótopos Estáveis, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (USP), Senhores **Edmar J. Mazzi, Geraldo de Arruda e José A. Bonassi**, pelo fornecimento de nitrogênio líquido.

Ao Senhor **Francisco C. B. Maia**, pelo capricho na impressão dos exemplares dessa Tese.

À **Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP** e ao curso de **Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental**, por fornecerem os subsídios necessários a execussão desse trabalho de Tese.

À **Fundação André Tosello**, pelo fornecimento das linhagens-tipo empregadas nesse trabalho.

À **CAPES**, pelo apoio financeiro destinado à esse trabalho.

ÍNDICE.

Resumo	01
Introdução	03
Revisão da literatura	05
Material e métodos	36
Características das cepas utilizadas	36
Manutenção das amostras	37
Padronização da extração das proteínas intracelulares	37
Extração com pérolas de vidro	38
Extração pelo ácido tricloroacético	39
Extração por sonicação	40
Extração direta pelo tampão de amostra	40
Extração por criofratura celular	41
Elektroforese em gel de poliacrilamida	41
Análise numérica dos perfis protéicos de <i>Candida</i> em SDS-PAGE	42
Elektroforese das amostras de levedura	43
Densitometria de detecção de picos	44
Construção da matriz de similaridade	44
Construção do fenograma de similaridade	44
Resultados	46
Características gerais dos perfis protéicos da SDS-PAGE	52
Densitometria de detecção de picos	62

Agrupamento das linhagens	62
Variações intra e intergenéricas	64
Discussão	69
Conclusões	81
Summary	83
Apêndice	85
Linhagens empregadas	85
Meios de cultura	86
Soluções para eletroforese	87
Referências bibliográficas	92

LISTA DE FIGURAS.

Quadro 01. Relação das espécies e variedades de leveduras bucais utilizadas nos experimentos	36
Figura 01. Porcentagens comparativas da extração de proteínas intracelulares de <i>Candida albicans</i> , obtidas por tratamentos diversos	46
Figura 02. Perfil eletroforético de proteínas de <i>Candida albicans</i> extraídas por tratamentos diversos	47
Figura 03. Perfil eletroforético de proteínas de <i>Candida albicans</i> extraídas por tratamentos diversos	47
Figura 04. Porcentagens comparativas da extração de proteínas intracelulares de <i>Candida krusei</i> , obtidas por tratamentos diversos	48
Figura 05. Perfil eletroforético de proteínas de <i>Candida krusei</i> extraídas por tratamentos diversos	48
Figura 06. Porcentagens comparativas da extração de proteínas intracelulares de <i>Candida parapsilosis</i> , obtidas por tratamentos diversos	49
Figura 07. Perfil eletroforético de proteínas de <i>Candida parapsilosis</i> extraídas por tratamentos diversos	49

- Figura 08.** Porcentagens comparativas da extração de proteínas intracelulares de *Candida tropicalis*, obtidas por tratamentos diversos **50**
- Figura 09.** Perfil eletroforético de proteínas de *Candida tropicalis* extraídas por tratamentos diversos **50**
- Figura 10.** Porcentagens comparativas da extração de proteínas intracelulares de *Candida guilliermondii*, obtidas por tratamentos diversos **51**
- Figura 11.** Perfil eletroforético de proteínas de *Candida guilliermondii* extraídas por tratamentos diversos **51**
- Figura 12.** Perfil eletroforético dos extratos protéicos de linhagens de *Candida albicans* **52**
- Figura 13.** Perfil eletroforético dos extratos protéicos de linhagens de *Candida guilliermondii* e *Candida parapsilosis* **53**
- Figura 14.** Perfil eletroforético dos extratos protéicos de linhagens de *Candida krusei* e *Candida tropicalis* **53**
- Figura 15.** Densitograma do perfil eletroforético dos padrões de massa molecular (repetição 01) **54**
- Figura 16.** Densitograma do perfil eletroforético dos padrões de massa molecular (repetição 02) **54**

- Figura 17.** Densitograma do perfil eletroforético dos padrões de massa molecular (repetição 03) **54**
- Figura 18.** Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem CBS 1171 (*S. cerevisiae* - repetição 01) **55**
- Figura 19.** Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem CBS 1171 (*S. cerevisiae* - repetição 02) **55**
- Figura 20.** Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem CBS 1171 (*S. cerevisiae* - repetição 03) **55**
- Figura 21.** Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem F 72 (*C. albicans*) **56**
- Figura 22.** Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem E 37 (*C. albicans*) **56**
- Figura 23.** Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem 97 a (*C. albicans*) **56**
- Figura 24.** Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem 17 b (*C. albicans*) **57**
- Figura 25.** Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem CBS 562 (*C. albicans*) **57**

- Figura 26.** Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem FCF 152 (*C. guilliermondii*) **58**
- Figura 27.** Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem FCF 405 (*C. guilliermondii*) **58**
- Figura 28.** Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem CBS 566 (*C. guilliermondii*) **58**
- Figura 29.** Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem 21 c (*C. parapsilosis*) **59**
- Figura 30.** Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem 7 a (*C. parapsilosis*) **59**
- Figura 31.** Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem CBS 604 (*C. parapsilosis*) **59**
- Figura 32.** Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem 4 c (*C. krusei*) **60**
- Figura 33.** Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem 1M 90 (*C. krusei*) **60**
- Figura 34.** Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem CBS 573 (*C. krusei*) **60**

- Figura 35.** Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem 1 b (*C. tropicalis*) **61**
- Figura 36.** Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem FCF 430 (*C. tropicalis*) **61**
- Figura 37.** Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem CBS 94 (*C. tropicalis*) **61**
- Figura 38.** Matriz de dados binários representativos dos Rfs de cada banda eletroforética **65**
- Figura 39.** Matriz de dados binários representativos dos Rfs de cada banda eletroforética **66**
- Figura 40.** Matriz de similaridade entre as linhagens de leveduras **67**
- Figura 41.** Fenograma de similaridade entre as linhagens de leveduras **68**

LISTA DE ABREVIÇÕES, SIGLAS E UNIDADES.

μg = micrograma;

μL = microlitro;

$^{\circ}\text{C}$ = escala Célsius de temperatura;

^{35}S = radioisótopo 35 do enxofre;

5S e **18S** = sub-unidades ribossômicas de índice de sedimentação 5 e 18, respectivamente;

6PG = 6-fosfogluconato desidrogenase;

ACO = aconitase;

ALP = fosfatase alcalina;

B & G ou **B** = método de extração de Bruneau e Guinet;

C.a. = *Candida albicans*;

C.g. = *Candida guilliermondii*;

C.k. = *Candida krusei*;

C.p. = *Candida parapsilosis*;

C.t. = *Candida tropicalis*;

CBS = Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Netherlands;

CO₂ = dióxido de carbono;

DNA = ácido desoxirribonucléico (do inglês: deoxiribonucleic acid);

Eco R1 = endonuclease de restrição para o sítio 5'-G/AATTC-3';

EST = esterase;

g = grama (unidade de massa);

g = gravidade (unidade de força centrífuga);

G6P = glicose-6-fosfato desidrogenase;

GOT = transaminase oxalacético glutâmica;

HCl = ácido clorídrico;

IDH = isocitrato desidrogenase;

In = em (do inglês: in)

IPO = indofenol oxidase;

kDa = kilodalton;

KOH = hidróxido de potássio;

LAP = leucina aminopeptidase;

M = molar;

MCL = meio completo para leveduras;

MDH = malato desidrogenase;

MM = massa molecular;

mRNA = ácido ribonucléico mensageiro (do inglês: messenger ribonucleic acid)

Msp 1 = endonuclease de restrição para o sítio 5'-C/CGG-3';

mg = miligrama;

mL = mililitro;

mm = milímetro;

mM = milimolar;

mRNA = ácido ribonucléico mensageiro (do inglês: messenger ribonucleic acid);

NL ou **N** = método de extração por criofratura celular;

NTSYS™ = Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System;

O₂ = oxigênio molecular;

PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida (do inglês: polyacrylamide gel electrophoresis);

PEP = fenilalanileucina peptidase;

PGM = fosfoglucomutase;

pH = potencial hidrogeniônico;

PV ou **P** = método de extração por pérolas de vidro;

RAPD = polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (do inglês: random amplified polymorphic DNA);

Rf = mobilidade eletroforética relativa;

RNA = ácido ribonucléico (do inglês: ribonucleic acid);

rpm = rotações por minuto

S.c. = *Saccharomyces cerevisiae*;

SDS = dodecilssulfato de sódio (do inglês: sodium dodecyl sulfate);

S_{sm} = coeficiente de similaridade cofenética "simple matching";

SAHN = desempenho sequencial de aglomeração hierárquica de grupos (do inglês: Sequential, Agglomerative, Hierarchical, and Nested)

SOD = superóxido dismutase;

SON ou **S** = método de extração por sonicação;

TCA ou **T** = método de extração por ácido tricloroacético;

Tris = tris (hidroximetil) aminometano [do inglês: tris (hydroxymethyl) aminomethane];

UPGMA = agrupamento pareado sem peso com significado aritmético (do inglês: unweighted pair group method with arithmetic mean);

v/v = volume por volume;

W = watts;

YPD = meio extrato de levedura-peptona-glucose (do inglês: yeast peptone dextrose).

RESUMO.

O emprego de diferentes metodologias na extração de proteínas intracelulares de leveduras isoladas da cavidade oral de humanos, para aplicação em SDS-PAGE, foi avaliado. As proteínas foram obtidas por disrupção com pérolas de vidro, pela ação do ácido tricloroacético, por sonicação, por um tampão de amostra e por criofatura celular através do uso de nitrogênio líquido, e posteriormente aplicadas em SDS-PAGE. Os perfis individuais foram analisados por densitometria de integralização de área e mostraram que a extração por criofatura e sonicação apresentaram os melhores resultados, seguidos pelos métodos de extração por tampão de amostra e pérolas de vidro. O ácido tricloroacético não se demonstrou satisfatório na obtenção de proteínas separáveis por SDS-PAGE.

As proteínas intracelulares totais das espécies *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida guilliermondii*, obtidas pelo método de criofatura celular, foram submetidas à SDS-PAGE, em sistema descontínuo, e analisadas por densitometria. Os valores relativos de migração (Rfs) foram convertidos em dados binários e forneceram, após processamento computadorizado, as similaridades fenéticas entre as diferentes linhagens de uma mesma espécie e entre as diferentes espécies do gênero. Os resultados obtidos permitiram, ainda, agrupar as diferentes linhagens e espécies em função de suas similaridades fenéticas, gerando "clusters" compostos por linhagens de uma mesma espécie. Esse resultado sugere que a análise numérica de características baseadas em

eletroforegramas de proteínas intracelulares totais de leveduras orais, é um recurso importante na identificação e discriminação de isolados clínicos e nos estudos com ênfase em Taxonomia, Sistemática e biodiversidade.

INTRODUÇÃO.

Com o advento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS), bem como do aumento do emprego de medicações imunossupressoras, tem-se observado uma elevação na relevância do papel das leveduras, sobretudo das do gênero *Candida*, como colonizadoras e potentes patógenos das superfícies moles do meio intrabucal (GREENSPAN, 1994; LYNCH, 1994).

Procedimentos cromatográficos permitem a separação de misturas de compostos, possibilitando a caracterização dos mesmos. Nesse sentido, a eletroforese, um método cromatográfico baseado na separação através do estabelecimento de um campo elétrico, que permite a separação dos diferentes componentes da mistura em função de suas diferentes massas moleculares, estruturas moleculares ou cargas elétricas. Diferentes variações da eletroforese têm permitido a caracterização de leveduras através da análise de substâncias de naturezas diversas, tais como cromossomos (ASAKURA et al., 1991; MONOD et al., 1990), fragmentos de DNA (SCHERER & STEVENS, 1987), isoenzimas (LEHMANN et al., 1989b), glicoproteínas (CASANOVA & CHAFFIN, 1991) e proteínas totais desnaturadas (SHEN et al., 1988; BRUNEAU & GUINET, 1989; MAIDEN & TANNER, 1991). Referente à essa última técnica, sabe-se que a mesma tem sido empregada satisfatoriamente na caracterização de bactérias (TANNER et al., 1986; COSTAS et al., 1989a; HOLMES et al., 1990; PALOMARI, 1992) e de leveduras (VANCANNEYT et al., 1991; VANCANNEYT et al., 1992; GOMES,

1995). Os perfis eletroforéticos resultantes da separação das proteínas, podem ser plotados numa matriz de dados binários, que com auxílio de sistemas computadorizados, fornecem resultados comparativos, na forma de matrizes ou fenogramas de similaridade (KERSTERS, 1985), os quais permitem avaliar os diferentes graus de similaridade fenética entre linhagens de uma mesma espécie.

Com base nos dados da literatura e objetivando contribuir para os estudos de identificação e caracterização de células leveduriformes isoladas da cavidade oral, nos propusemos a : a) padronizar uma metodologia de extração de proteínas intracelulares de células totais de leveduras da cavidade oral; b) secundariamente, fazer a análise fenética de 12 (doze) isolados de leveduras orais do gênero *Candida*, a saber: *C. albicans* (4 isolados), *C. krusei* (2 isolados), *C. parapsilosis* (2 isolados), *C. tropicalis* (2 isolados) e *C. guilliermondii* (2 isolados), através da técnica de eletroforese de proteínas desnaturadas em gel de poliacrilamida em sistema descontínuo (SDS-PAGE).

REVISÃO DE LITERATURA.

Apesar da preponderância das disciplinas fisiológicas na pesquisa e na teoria, a SISTEMÁTICA continua sendo muito importante para a BIOLOGIA, estabelecendo uma imagem a mais completa possível da grande diversidade dos organismos, compreendendo ao mesmo tempo as relações formais entre eles e o reconhecimento das leis biológicas gerais (WEBERLING & SCHWANTES, 1986). Desse modo, deve-se procurar conhecer e obter todos os dados sobre a forma e o tipo de vida, sua distribuição, variabilidade e, todas as suas demais qualidades, para que se reconheça quais são os iguais e quais os não-iguais, organizando-os num sistema claro.

A determinação entre os limites dos grupos de organismos (espécies ou grupos de nível superior ou inferior), é chamada de TAXONOMIA. As unidades sistemáticas são diferenciadas umas das outras e determinadas, conforme a sua categoria, de "taxon" ou "taxa" (taxons). É tarefa da taxonomia, estabelecer com maior exatidão possível, as diferenças e delimitações entre os grupos de organismos, o que se torna mais difícil à medida que aumenta o número de organismos pesquisados e, tendo-se em vista também, que quem classifica deve conhecer todo o conjunto e as suas características individuais. Os níveis hierárquicos do sistema são importantes para se compreenderem as diversas categorias. As diferenças ou semelhanças devem ser o mais constante possível num certo grupo de organismos, para que a sistemática tenha valor e exiba um grau de parentesco

natural mais próximo. Para que ocorra uma denominação única e internacional, os organismos recebem nomes científicos (latinos ou latinizados), cuja organização e aplicação é regulamentada pelo Código Internacional de Nomenclatura, destacando-se as regras do exemplar-tipo ("type strain"), da prevalência do nome mais antigo, da combinação binária do gênero e da espécie, seguido do autor e da regra da prioridade, no caso de outros autores (SNEATH, 1984).

Reed & Nagodawithana (1991)(cf. ALMEIDA, 1991), salientam que o termo sistemática é utilizado em sentido amplo, como sinônimo de taxonomia. O termo taxonomia vem do grego "taxis" (arranjo) e "nomos" (lei) e é um ramo da sistemática que inclui a classificação, identificação e a nomenclatura dos seres vivos. Foi Copeland (cf. WHITTAKER, 1989), entre 1940 e 1950, quem propôs a classificação dos seres vivos em 4 Reinos: Micota ou Monera; Proctista; Plantae e, Animalia. Contudo, como o sistema de classificação também apresenta limitações, principalmente na forma de nutrição, nos limites entre os animais e plantas unicelulares e, no agrupamento de outros seres em um único Reino, como o Proctista, houve a necessidade de se aprimorar mais ainda o sistema de classificação, surgindo então o sistema de cinco Reinos. Dessa forma, os cinco Reinos propostos, são os seguintes: Reino Monera; Reino Protista; Reino Plantae; Reino Fungi; Reino Animalia. O Reino dos fungos tem relação com o dos animais e plantas superiores, existindo uma linha mais definida de separação entre os fungos inferiores e os protistas, através dos estudos de Simpson e outros autores, ao final da década de 50. Esse novo tratamento classificatório dos seres vivos, trouxe um grande

aumento no número de “taxa”, representando melhor o que ocorria sob o ponto de vista das relações entre os organismos e suas maneiras de nutrição (fotossíntese, absorção e ingestão). Apesar disso, essa classificação em cinco reinos, também tem as suas limitações, como a dificuldade em se distinguir a linha separatória entre a organização dos unicelulares, dos multicelulares e, dos multinucleados.

WHITTAKER (1989), apresenta os novos conceitos sobre os reinos dos organismos vivos, que podem ser classificados de maneira diferente que o dos dois reinos até aqui então existentes (animal e vegetal), levando-se em conta as novas relações evolucionárias. Salienta que existem ainda muitas limitações a esse sistema de classificação. Essas limitações, por exemplo, podem ser vistas na classificação dos protistas, dos moneranos e dos flagelados, em relação aos fungos superiores e, também, nos próprios fungos, que mais recentemente foram separados das plantas em virtude de suas diferentes origens, diferentes direções evolutivas, organizações e adaptações, principalmente frente à sua nutrição primária.

Os fungos filamentosos, os cogumelos e as leveduras fazem parte dos Mycobionta, com aproximadamente 70.000 espécies (CARLILE & WATKINSON, 1994), apresentando núcleos (eucariontes) mas não plastídeos (heterotróficos). Produzem esporos e corpos de frutificação tendo como substâncias de reserva o glicogênio e lipídeos. A parede celular é rígida e constituída de quitina, celulose, ou ambas, sendo o corpo vegetativo formado de filamentos ramificados (raramente não ramificados), com crescimento apical e chamados de hifas. Quando se agrupam, as hifas formam os micélios.

Vivem em todos os climas da Terra e necessitam de compostos de carbono, nitrogênio, enxôfre, fósforo e íons metálicos, além de temperaturas entre -10°C e $+60^{\circ}\text{C}$, umidade, e pH situado entre 3.5 e 6.5. As quantidades de luz, CO_2 e O_2 podem influenciar na formação de esporos, nos corpos de frutificação e da multiplicação vegetativa. São saprófitas, parasitas obrigatórios ou facultativos.

Os fungos são originários de seres unicelulares, alguns dos quais flagelados e, mesmo que alguns autores achem que derivam das algas e das plantas, apresentam uma organização bem diferente destas, sobretudo nos fungos superiores que apresentam micélio e diferenças reprodutivas das plantas superiores, que são diplóides. É provável que os fungos apresentem correlações estruturais convergentes com as algas, como por exemplo o ciclo de vida e, também com as bactérias miceliais (actinomicetos), o que tem atrapalhado a correta classificação de alguns gêneros.

Cooper (cf. LENNETTE et al., 1987), ao discorrer sobre a classificação e nomenclatura dos fungos, salienta que esse últimos diferenciam-se das bactérias pelo fato de apresentarem paredes celulares formadas lentamente e compostas por polímeros de polissacarídeos, como por exemplo a glucana, a manana, a celulose e a quitina. Não existem nos fungos os ácidos teicóico e murâmico, comuns na parede celular das bactérias. Além disso, os fungos se reproduzem sexuadamente e assexuadamente, formando conídios ou esporangiósporos. O estado de desenvolvimento induzido por recombinação sexual chama-se estado teleomórfico ou perfeito e, provê uma base de classificação para os fungos pertencentes aos Zygomycetos, Ascomycetos e Basidiomycetos. O reconhecimento do estado teleomórfico

tem importância taxonômica, porque o potencial morfológico completo de uma espécie fúngica só pode ser devidamente apreciado quando se conhecem seus estados sexual e assexuado, isoladamente. Os gêneros cujas espécies não apresentam ciclo sexual definido são denominados Deuteromicetos, e a maioria dos fungos de importância médica enquadram-se nesse grupo.

HALL (1969), ao avaliar os procedimentos utilizados na taxonomia molecular dos fungos, relata que na década compreendida entre 1960 e 1970, houve um grande aumento no interesse do uso de análises bioquímicas na identificação e classificação desses microrganismos, além de animais e plantas. Qualquer classificação biológica, segundo o autor, deve atender a um conveniente arranjo dos organismos, baseado nas relações genéticas (classificação natural). Contudo, algumas vezes a classificação se baseia nas relações entre caracteres, o que pode somente levar em consideração os aspectos de maior conveniência (classificação artificial), mesmo que estas não possuam grande significado genético. Assim sendo, a classificação dos fungos se baseia principalmente nos achados morfológicos relacionados com a hifa vegetativa, a reprodução sexuada ou assexuada, a coloração ou o formato ou a septação dos esporos, sendo que alguns desses aspectos são fundamentais, enquanto que outros não os são. O uso de caracteres morfológicos para classificar os fungos, com o objetivo de identificar os níveis de espécie, é tradicional, firmemente enraizado e vigorosamente defendido. Contudo, ele apresenta alguns casos de valor limitado, em virtude de uma necessidade diagnóstica maior.

JOLY (1954) refere-se à Pasteur como o introdutor dos estudos que forneceram os melhores conhecimentos sobre as leveduras e que Hansen, em 1896, foi quem começou a dar um cunho marcante à sistemática das leveduras, baseando-se em trabalhos realizados por mais de 30 anos. Büchner mais tarde, prestou uma valiosa colaboração, ao descrever a zimase alcoólica e, em 1909, Guilliermond começou a esboçar a linha filogenética das leveduras, fundamentando suas opiniões no estudo morfológico que realizou das mesmas. Cita ainda, que Stelling-Dekker dividiu-as em dois grupos (famílias), baseando-se na formação ou não de micélios e, mais tarde, Guilliermond acrescentou outra divisão, baseando-se nas suas linhas de descendência. Continua o autor, que estudos posteriores realizados por Winge & Laustsen e ainda por Guilliermond em 1940, acrescentaram novas relações entre os seres desses grupos, especialmente entre as leveduras e os basidiomicetos, relacionando-os finalmente com os fungos. Foi por volta de 1938, que Jelinek (cf. JOLY, 1954) demonstrou serem as reações sorológicas um recurso fundamental para se classificarem as leveduras, justificando que os microrganismos apresentam grande variabilidade e inconstância de caracteres celulares, fatores de erros na sistemática morfológica.

Dentre os métodos utilizados para o estudo das leveduras em relação ao seu isolamento, saliente-se que elas são facilmente cultivadas em meios de cultura que contenham agar e glicose e com pH entre 4.0 e 4.5, mesmo que o material esteja contaminado com bactérias. Todavia, o seu isolamento de meios muito ácidos não é recomendado, principalmente se o material for de origem animal, porque elas podem não se desenvolver muito

bem (ROCHELLE, 1996). No caso do isolamento de *Candida*, pode-se acrescentar ao meio de cultura alguns antibióticos, como a penicilina, a estreptomicina ou cloranfenicol, para se evitar o desenvolvimento bacteriano, ou ainda da cicloheximida, para restringir o desenvolvimento de bolores contaminantes. Os estudos sobre a fisiologia dessas leveduras, sobretudo a partir da década de 40, além de terem sido realizados em pequena escala, apresentam grande variabilidade, o que fez com que alguns pesquisadores discordassem da validade taxonômica de alguns testes utilizados. Muitos desses estudos foram feitos para se verificar a habilidade dessas leveduras em utilizar alguns carboidratos produzindo gás, ou de se usarem pentoses, compostos nitrogenados, vitaminas, produção de compostos como a riboflavina e ácido fólico, que apresentam interesse industrial, ou ainda de enzimas, gorduras, ésteres, esteróis, etc. A *Candida albicans*, a levedura patogênica de maior interesse médico, pode ser identificada rapidamente através de seu isolamento em agar-farinha de milho ou de batata, onde produz blastósporos com clamidósporos terminais típicos, ou ainda através da inoculação em animais ou técnicas sorológicas. Podem ser preservadas por diversos meses, recobrando-as com óleo mineral à temperatura ambiente, uma vez que poucos autores recomendam a sua liofilização, especialmente da *C. albicans*, que pode apresentar alterações fisiológicas, incluindo-se aí sua menor viabilidade.

No que concerne à citologia das leveduras, LENNETE et al. (1987) ressaltam que a composição química de suas paredes celulares tem sido estudada, demonstrando muito bem que nas bactérias e em certos

fungos, as diferenças nessa composição, especialmente de aminoácidos e de carboidratos, traz importantes auxílios para sua taxonomia. A parede celular da maior parte das leveduras é constituída de manana, quitina e glucana, sendo que todas as espécies do gênero *Candida*, apresentam esses três componentes. Continuam os autores, ressaltando que os trabalhos sobre a formação de pseudomicélios, mostraram - ao que parece - que estes resultam de uma aparente quebra na sua manutenção sulfidrílica interna, enquanto que a formação dos clamidósporos, dos filamentos e da película no meio de cultura, dependem de alterações metabólicas internas das leveduras.

Quanto à antibiose, SKINNER & FLETCHER (1960), relatam que o uso de muitos antibióticos que eliminam as bactérias do intestino, boca e vagina, não eliminam as leveduras, contribuindo portanto para o seu desenvolvimento posterior pela ausência de competição. Foi descrita uma grande variedade de colônias rugosas de *Candida albicans* na flora de pacientes tratados com antibacterianos, que mostraram-se também susceptíveis a outras drogas, ditas antifúngicas ou antimicóticas. A habilidade que algumas estirpes apresentam de se desenvolver em meios contendo esses agentes inibidores é conhecida como "resistência à antifúngicos", e pode ser empregada como meio discriminador de linhagens, como preconizado por CANDIDO et al. (1996), sob a denominação "antifungotipagem".

Num estudo revisivo, ESTEVES et al. (1977) citam que Lodder e Kreger van Rij (1952) e Kreger van Rij (1969) classificaram o gênero *Candida* Berkout (1923), como pertencendo à família *Cryptococcaceae*, subfamília

Cryptococcoideae. A sinonímia do gênero é muito extensa sendo que o número de espécies incluídas no gênero tem variado muito, de acordo com os critérios de classificação. Prosseguem os autores, citando que Langeron & Guerra em 1938, referiram-se à 18 espécies, bem definidas pelas propriedades bioquímicas, e distribuídas em 5 grupos e que em 1952, Vanbreuseghem assinalou a tendência para considerar esses grupos como espécies e, as 18 espécies, como variedades. No entanto, na mesma data, Lodder e Kreger van Rij (cf. ESTEVES et al., 1977) registraram 30 espécies e 6 variedades, enquanto que Van Uden e Buckley (1970)(cf. ESTEVES et al., 1977), descreveram 81 espécies. Esses autores caracterizaram ainda o gênero dessas leveduras, pela presença de células arredondadas, ovais, cilíndricas ou alongadas, por vezes de forma irregular e, que se reproduziam por gemulação multipolar, apresentando ainda pseudomicélio diferenciado em pseudohifas e blastósporos. Algumas vezes, exibem ainda micélio verdadeiro, com possibilidade de formação de clamidósporos e de produção de polissacarídeos extracelulares com reação positiva para o iodo e fermentação alcoólica em muitas espécies. Essas leveduras não formam artrósporos nem ascósporos, teliósporos ou balistósporos e não produzem pigmentos carotenóides.

Hurley (cf. SKINNER et al., 1980), salienta que a posição taxonômica do fungo esteve em grande confusão, até 1923, quando Berkout sugeriu o nome genérico de *Candida*, que passou a distinguir as monílias médicas, daquelas leveduras das frutas e de outros vegetais, classificados até então no gênero *Monilia*. Todavia, além da confusão taxonômica, também

houve uma confusão com as doenças provocadas por esses fungos, sendo que o termo monilíase, paulatinamente foi sendo substituído por candidose. Além disso, existiam muitas relações taxonômicas entre as leveduras desse gênero e as do extinto gênero *Torulopsis*. ALMEIDA (1991), salienta que o gênero *Candida* apresentava até aquela data 196 espécies, sendo a espécie *C. albicans* uma das mais estudadas em virtude de sua patogenicidade, que tanto é maior quanto maior a sua capacidade em produzir fosfolipase, hialuronidase, proteinase e condroitin-sulfatase.

Em 1960, SKINNER & FLETCHER, realizaram uma revisão geral sobre as leveduras do gênero *Candida*, segundo os aspectos de sua nomenclatura, taxonomia, ecologia, métodos de estudo (isolamento, identificação e preservação das culturas) e a fisiologia (produtos metabólicos e nutrição, citologia e antibiose). Salientaram que o nome *Candida*, foi proposto por Roger, em 1953, para ser conservado (*nomem conservandum*), muito embora o nome de *Syringospora* tivesse a prioridade e fosse utilizado por alguns pesquisadores anteriormente. A partir desse momento, o nome foi mundialmente oficializado e aceito pelos pesquisadores. De acordo com LACAZ et al. (1980), foi no IX Congresso Internacional de Botânica, em 1959, que a denominação *Candida* foi aceita como *nomem conservandum*. O termo *Monilia*, que ainda hoje é utilizado por alguns autores, até mesmo como sinônimo dessas leveduras, é reservado para se referir ao estágio imperfeito de certos fungos ascomicetos, mas, por volta da década de 50 haviam dificuldades para se separarem as leveduras do gênero *Candida*, dos outros gêneros, *Cryptococcus* e *Torulopsis*, em virtude da formação do

pseudomicélio no primeiro gênero e, da perda da sua capacidade de produção sob certas condições, nos dois últimos gêneros. Antes da década de 60, haviam muitas controvérsias sobre a classificação correta das leveduras, fazendo com que os pesquisadores holandeses, procurassem simplificar a sua identificação, através de testes de fermentação da lactose e testes sorológicos.

Em 1954, JOLY baseou seu trabalho de tese, nos preceitos de Kreger van Rij e Lodder, que em seu livro sobre as leveduras, de 1952, fundamentavam a identificação sistemática das leveduras em função de seus caracteres fisiológicos, morfológicos e culturais. Como aspectos fisiológicos importantes, destacam a formação de película em meio líquido (é um caráter de aerobiose), o zimograma dos hidratos de carbono, o auxanograma dos açúcares, o auxanograma do nitrogênio, a produção de compostos amiláceos, a produção de ésteres, a produção de pigmentos carotenóides, a produção de ácidos, o desdobramento de gorduras (característico da *Candida lipolytica*), a coagulação e peptonização do leite (característico da *Candida tropicalis* e da *Candida pseudotropicalis*).

De acôrdo com Van der Walt (in SKINNER et al., 1980), os critérios para a delimitação das espécies (especiação) das leveduras, mudou muito com o passar dos anos, desde os tempos de Guilliermond em 1912, quando os taxonomistas começaram a demarcar as taxa. Segundo o autor, essa delimitação baseou-se nos seguintes critérios: 1) discontinuidade fenotípica (baseia-se nas diferenças morfológicas, propriedades fenotípicas e propriedades fermentativas e assimilatórias), 2) infertilidade (baseia-se na

capacidade de uma levedura poder hibridizar-se ou, então, o seu híbrido possuir fertilidade reduzida), 3) análise dos ácidos nucléicos (baseia-se na análise dos ácidos nucléicos das bases do DNA ou na homologia do DNA-RNA), 4) taxonomia prática (baseia-se em estabelecer critérios práticos para poder diferenciar uma espécie da outra). Essas técnicas podem contribuir em mais de 80% dos casos, para a correta classificação taxonômica das leveduras.

CORREA (1984) retoma o fato das leveduras do gênero *Candida* Berkout (1923), pertencerem à divisão Deuteromycota, sub-divisão Deuteromycotina, classe Blastomycetes e família *Cryptococcaceae* (Ainsworth, 1973; Von Arx, 1974), e continua relatando que segundo os estudos de Scherwitz et al. (1978), verificou-se que os componentes intracelulares dessas leveduras são idênticos aos encontrados em outras. Suas estruturas são uninucleares com um único nucléolo, apresentando envelope nuclear constituído por um par de membranas. Os vacúolos existentes são delimitados por uma única membrana. O retículo endoplasmático liso, mitocôndrias e ribossomos, são organelas constantes no citoplasma.

Os trabalhos de BARTNICKI-GARCIA (1968), sobre a química da parede celular e o seu papel na morfogênese e taxonomia dos fungos, trouxeram novas luzes para a sua identificação. Salienta o autor, que a parede celular se constitui numa versátil residência para a levedura pois ela se expande continuamente através de seu crescimento, sendo extensivamente remodelada durante o desenvolvimento. Através da manipulação da construção de sua parede celular, os fungos podem adquirir uma grande

variabilidade nas suas características morfológicas, conseguindo dessa forma realizar várias funções, como por exemplo o crescimento vegetativo, a colonização do substrato, a reprodução, a dispersão, a sobrevivência, a penetração no hospedeiro, etc. Desse modo, o desenvolvimento morfológico dos fungos, depende da morfogênese da parede celular e está fortemente relacionado com a taxonomia. A parede celular é composta de 80 a 90% de polissacarídeos e o restante, de proteínas e lipídeos, existindo alguns exemplos onde a percentagem desses polissacáridos atinge 40% ou menos, embora sejam raros. Também podem estar presentes pigmentos como a melanina, polifosfato, íons inorgânicos, ácidos nucléicos, etc. Fisicamente essa parede apresenta um emaranhado de microfibrilas, cimentadas ou ligadas a uma matriz amorfa. Quitina e celulose fazem parte desse esqueleto na maior parte dos fungos, existindo ainda aqueles que usam glucanas não celulósicas. Esses cimentos são compostos basicamente de glucanas, mananas, galactanas, heteropolissacarídeos, e outras substâncias. As técnicas de difração de raios-X e de espectroscopia de infra-vermelho, são as mais indicadas para se identificar os polímeros (quitina e celulose) da parede celular dos fungos. A composição desses polímeros é muito importante para a taxonomia porque alguns pesquisadores, já conseguiram dividir por exemplo, os *Phycomycetos* aquáticos, em duas taxa. O advento de métodos mecânicos que conseguem obter extratos mais puros da parede celular das leveduras, e de outras técnicas como a cromatografia em papel, trouxe um grande avanço no refinamento analítico das técnicas de taxonomia, provocando conseqüentemente uma nova classificação.

Estudos mais recentes, conduzidos por PONTON & JONES (1986), envolveram o emprego da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e "Western blot" para pesquisar a presença de glicoproteínas de parede características das fases leveduriforme e micelial de *C. albicans* sorotipo A (HASENCLEVER & MITCHELL, 1961). Uma glicoproteína de alta massa molecular (235.000 Da) e outra de 19.000 Da foram observadas no extrato de células colhidas na fase micelial mas não foram identificadas em extratos de células leveduriformes, demonstrando assim existirem diferenças químico-estruturais entre as células nos dois momentos do dimorfismo. CASANOVA & CHAFFIN (1991), trabalhando com a técnica de "Western blot" para glicoproteínas extraídas de paredes de células íntegras e rompidas, também concluíram que a composição da parede celular dessas leveduras é determinante na interação fungo-epitélio.

No que diz respeito aos estudos sorológicos para a caracterização de leveduras do gênero *Candida*, em 1955, TSUCHIYA et al. realizaram a análise antigênica por aglutinação em lâmina, de sete espécies do gênero *Candida*. Foi avaliada a termoestabilidade e termolabilidade desses antígenos. Os autores observaram a ocorrência de nove classes de antígenos termoestáveis e de três classes de antígenos termolábeis, entre as sete espécies estudadas. *Candida albicans* e *Candida tropicalis* foram diferenciadas pelos antígenos termoestáveis, porém não foram diferenciadas antigenicamente.

Segundo KEMP & SOLOTOROVSKY (1963), foi Benham, em 1935, quem primeiro sugeriu a existência de um grupo de antígenos e que

mostrou a dificuldade em se diagnosticar por aglutinação, devida a reatividade cruzada entre as diferentes espécies. Ela demonstrou a inespecificidade, devido às reações cruzadas, para *Candida*, *Torulopsis*, *Saccharomyces* e *Hansenula*. Citaram também, que Hasenclever e Mitchell (1961a) demonstraram a existência de dois grupos antigênicos em *Candida albicans*. Um tendo estrutura antigênica idêntica à *Candida tropicalis*, denominado sorotipo A, e outro idêntico à *Candida stellatoidea*, o sorotipo B. Esses fatos sugeriu haver uma relação antigênica entre *Candida tropicalis* e *Candida stellatoidea*. Em outro trabalho publicado em 1961, HASENCLEVER & MITCHELL, utilizando-se de ratos e de coelhos, como modelos experimentais, observaram a igual letalidade para os sorotipos A e B de *Candida albicans* e uma provável menor virulência para as espécies *Candida tropicalis* e *Candida stellatoidea*.

GORDON et al. (1967) citam que Benham em 1935, também descobriu que células de *Torulopsis glabrata* possuíam antígenos em comum com *Candida albicans*, e baseando-se nos estudos anteriores de Hasenclever & Mitchell (1960) e nos de Tsuchiya, Fukazawa & Kawakita (1961), os quais avaliaram as relações antigênicas entre *Torulopsis glabrata* e várias espécies de *Candida* e sugeriram um protocolo para a diferenciação, por imunofluorescência, entre *Candida albicans* (sorotipo A e B), *Candida tropicalis* e *Candida stellatoidea*. GORDON et al. (1967) enfatizam que os estudos com aglutinação, realizados por Hasenclever (1965), indicam que *Candida albicans* sorotipo A e *Candida tropicalis* apresentam grande similaridade antigênica, mas que pelos estudos de Tsuchiya, Fukazawa, Miyazaki & Kawakita (1955) e

pelos de Kemp & Solotorovsky (1964), é possível fazer-se a distinção sorológica entre ambas as espécies. Citam que, Kaplan & Kaufman (1961) e Gordon (1962) estabeleceram que é possível diferenciar *Candida tropicalis* de *Candida albicans* e de *Candida stellatoidea*, através do uso de anticorpos fluorescentes, provavelmente pelo fato da parede celular de *Candida albicans* ter pelo menos um polissacarídeo antigênico a mais que a *Candida tropicalis*, fato esse posteriormente relatado por Müller & Bürger's, em 1965.

Estudos conduzidos por vários pesquisadores e compilados por TASCHDJAN et al. (1972), mostram a possibilidade de detecção de antígenos citoplasmáticos via testes de imunoprecipitação, aglutinação e imunofluorescência indireta. Em contrapartida, a detecção positiva de precipitinas contra mananas de parede celular, pode não ser de grande importância, pois também encontra-se elevada no soro de indivíduos normais.

ESTEVES et al. (1977) relembra os trabalhos de Tsuchiya et al. (1961); Akiba et al. (1961); Miyake et al. (1961); Mikamo et al. (1961); Fukasawa et al. (1968), que procuraram determinar a estrutura antigênica das diferentes espécies; os de Hasenclever (1961) e (1963), que visaram relacionar a constituição antigênica e a patogenicidade e, os de Biguet et al. (1961) e (1965) e os de Van Ky et al. (1963) e (1969), que se orientaram na investigação da atividade enzimática dos complexos antígeno-anticorpo dessas leveduras.

Estudos recentes conduzidos por PONTON et al. (1993), demonstraram que antígenos das duas fases morfológicas da *Candida albicans*, o blastosporo e o tubo germinativo, são sempre observáveis nos

tecidos infectados, sendo usados numa grande variedade de testes sorológicos para atender necessidades diagnósticas. Contudo a maioria dos testes usados na sorologia da *Candida* carece de especificidade. Antígenos expressos, especificamente, na superfície da parede do tubo germinativo podem ser empregados na pesquisa taxonômica das espécies, se empregados anticorpos monoclonais purificados.

Com o passar dos anos, várias técnicas foram desenvolvidas com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre a taxonomia dos fungos e leveduras. Dentre elas, destacam-se os trabalhos de SPENCER & GORIN (1969), que realizaram um estudo sobre a sistemática das leveduras do gênero *Candida* Berkout, através dos espectros de ressonância magnética protônica de suas mananas e do conteúdo de monoses de seus polissacarídeos. Esses espectros foram depois comparados com os espectros obtidos de outros fungos, tentando-se descobrir eventuais similaridades. Concluíram finalmente, que a técnica de ressonância magnética protônica, apesar de ser menos fidedigna do que as outras técnicas bioquímicas que podem ser empregadas, podem trazer algumas informações adicionais mais detalhadas sobre a estrutura dos polissacarídeos em solução nos extratos brutos desses microrganismos.

ODDS & TRUJILLO-GONZALES (1974), estudaram os níveis de fosfatase ácida presentes nas leveduras do gênero *Candida*, e suas implicações com a taxonomia e identificação desses microrganismos, especialmente das espécies mais patogênicas para os seres humanos. Através de ensaios quantitativos para a enzima extraída de células intactas de

7 espécies do gênero e de outras leveduras e fungos de gêneros diferentes, encontraram muitas diferenças e poucas similaridades entre as atividades dessa enzima. Os níveis dessa enzima, foram estudados em células intactas dessas leveduras em pH 2.0, mostrando diferenças estatísticas suficientes para separá-las de alguma forma. Desse modo, os autores puderam identificar as espécies *C. guilliermondii* e *C. pseudotropicalis*, complementando os estudos e métodos de identificação morfológica e fisiológica para as leveduras das espécies *C. krusei* e *C. lambica*. A fosfatase ácida da *C. albicans*, é uma manoproteína localizada provavelmente na superfície da célula leveduriforme, semelhante ao que ocorre com a *Sacharomyces cerevisiae*. Os resultados ainda indicaram que nessa levedura, o máximo de atividade enzimática ocorreu em sua fase estacionária de crescimento. Em termos de níveis mais altos de atividade enzimática, encontraram, de maneira decrescente, as seguintes leveduras: *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida albicans*, *Torulopsis glabrata*, *Candida stellatoidea*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* e finalmente a *Candida pseudotropicalis*.

Vários pesquisadores (SHECHTER, 1973; HALL, 1973; VANCANNEYT, 1991) têm utilizado a análise das proteínas, na taxonomia dos fungos, tendo em vista que cada enzima é codificada por uma sequência de aminoácidos controlados por um gene. Ao se comparar a estrutura de uma enzima, está-se comparando indiretamente, a própria estrutura do material genético que está sendo expresso, avaliando-se dessa forma as relações fenético-taxonômicas dos grupos. As proteínas podem ser analisadas por

diversos métodos, incluindo-se dentre eles a determinação de sua estrutura primária (composição de aminoácidos, a sequência dos aminoácidos e os padrões digitais dos peptídeos), pela eletroforese, pela cromatografia e por outras técnicas baseadas em suas propriedades físicas, imunológicas ou catalíticas. Dentre as técnicas que se utilizam de suas propriedades físicas, a que vem sendo mais utilizada é a eletroforese em suporte de gel. O tipo, número e a sequência dos aminoácidos, determina o tamanho da proteína, seu formato e suas cargas elétricas totais, o que em resumo, determina sua mobilidade eletroforética. Extratos brutos são fracionados eletroforicamente no gel, que é depois corado para detectar os sítios de localização das proteínas ou das enzimas particulares. Os padrões são comparados visualmente. Pequenas diferenças nas sequências dos aminoácidos, podem provocar grandes diferenças na mobilidade das proteínas. Por outro lado, proteínas com mobilidade similar, podem ter tamanhos diferentes, inclusive diferenças de cargas elétricas ou na composição dos aminoácidos. Assim sendo, padrões eletroforéticos similares, podem ser produzidos por proteínas diferentes, causando dessa forma um grande impacto na taxonomia dos fungos.

A utilização da eletroforese de algumas proteínas com qualidades catalíticas específicas, denominadas isoenzimas (ou isozimas) é um método eficiente para o estudo da estrutura genética de populações de eucariontes (LEWONTIN, 1974; NEI, 1975; AYALA, 1976; NEVO et al., 1980; RATTAZZI et al., 1983, SELANDER & WHITTAM, 1983) e tem sido empregada na taxonomia e pesquisa epidemiológica de leveduras (YAMAZAKY & KOMAGATA, 1981;

LEHMANN et al., 1989; CAUGANT & SANDVEN, 1993). Isoenzimas são, segundo DIXON & WEBB (1979), múltiplas formas de uma enzima ocorrendo numa única espécie. Isso decorre da presença de vários locus gênicos, codificando diferentes versões de uma enzima, ou da existência de múltiplos alelos num único locus gênico (HARRIS, 1975), e nesse último caso, cada enzima recebe a denominação de aloenzima ou alozima (PRAKASH et al., 1969).

As isoenzimas podem ser detectadas através de eletroforese em gel (zimograma), em geral, de amido, com posterior tratamento com substrato e reativo de cor. O aparecimento de bandas contrastantes com o "background" do gel, indica a presença das múltiplas formas da enzima, o que facilita a análise genética dos espécimes em estudo. Inúmeras metodologias foram desenvolvidas para a detecção de bandas de isoenzimas, com variações do suporte, tampões de gel e de cuba, soluções reveladoras, etc. (SHAW & PRASAD, 1969; BAPTIST et al., 1969; HARRIS & HOPKINSON, 1976; O'MALLEY et al., 1980; VALLEJOS, 1983; MARTY et al., 1984; SELANDER et al., 1986; ALFENAS et al., 1991; BALLVE et al., 1995). LEHMANN et al. (1989a) trabalhando com *Candida albicans*, *Candida stellatoidea*, *Candida tropicalis* e *Candida paratropicalis*, isoladas a partir de diversos focos infecciosos, pesquisaram o polimorfismo para fosfatase alcalina (ALP), malato desidrogenase (MDH), superóxido dismutase (SOD) e esterases (EST), e obtiveram resultados peculiares para cada espécie estudada.

Em outro estudo, que buscou a caracterização de *Candida albicans*, CAUGANT & SANDVEN (1993) trabalhando com 98 isolados obtidos

a partir de pacientes de hospitais noruegueses, pesquisaram o polimorfismo isoenzimático para malato desidrogenase (MDH), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6P), fenilalanileucina peptidase (PEP), superóxido dismutase (SOD, também, chamada de indofenol oxidase - IPO), isocitrato desidrogenase (IDH), leucina aminopeptidase (LAP), aconitase (ACO), fosfoglucomutase (PGM), 6-fosfogluconato desidrogenase (6PG) e transaminase oxalacético glutâmica (GOT) e puderam observar as variações polimórficas para essas enzimas dentro daquela população intraespecífica de leveduras.

SHECHTER et al. (1966) desenvolveram um estudo comparativo sobre eletroforese de proteínas de fungos dermatófitos de diferentes espécies (*Microsporum gypseum*, *M. canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *T. rubrum* e *Epidermophyton floccosum*), onde avaliaram os perfis eletroforéticos das proteínas extraídas das células miceliais e de proteínas obtidas no filtrado dessas culturas, demonstrando que a técnica permitia a diferenciação dos isolados em gêneros, e a diferenciação das espécies de um mesmo gênero. Propuseram, os autores, que a eletroforese de proteínas daria bons resultados na avaliação taxonômica de isolados desses gêneros estudados. Poucos anos mais tarde, HALL et al. (1969) desenvolveram estudos taxonômicos empregando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, para a identificação de proteínas de fungos do gênero *Phytophthora*, conseguindo encontrar variações entre as bandas obtidas de espécies diferentes. Vários outros autores descobriram que os padrões de proteínas, variam menos nas espécies que entre as espécies, de tal forma que

passam a produzir ao menos uma banda protéica característica e reconhecida para cada espécie em particular.

Alguns autores têm alertado para a necessidade do desenvolvimento e padronização de todas as etapas das eletroforeses de proteínas totais em géis de poliacrilamida, visando o incremento da resolução, sensibilidade, reprodutibilidade, e redução de custos dessa técnica (AMES, 1974; BRUNEAU & GUINET, 1989; GOMES, 1995; ROCHELLE, 1996; ROSA et al., 1997; HÖFLING et al., 1997). Além disso, GLYNN & REID (1969) e SHECHTER (1973) já haviam demonstrado, que diferentes composições nutricionais dos meios de cultivo, variações na temperatura de incubação e a idade das culturas, podem influir diretamente na síntese de proteínas, o que gera uma inconstância nos perfis eletroforéticos. Recentemente, ROCHELLE (1996) demonstrou que a variação na composição dos nutrientes de alguns meios de cultura, influenciam na obtenção de proteínas intracelulares de células leveduriformes, com consequência direta na obtenção dos perfis eletroforéticos em SDS-PAGE e na análise numérica de linhagens de *Candida sp.* ROSA et al. (1997) e HÖFLING et al. (1997) mostraram que diferentes métodos de extração produzem perfis eletroforéticos sujeitos a perda de bandas proteicas com consequente variabilidade artificial. Concomitantemente, GOMES (1995) aponta para o fato de colorações a base de prata serem mais sensíveis que outras colorações, aumentando a quantidade de bandas e a possibilidade de observação de polimorfismo entre as amostras submetidas à eletroforese de proteínas totais. Em adição, VANCANNEYT et al. (1991) relataram que para a obtenção de um padrão de

bandeamento bem definido e reprodutível, faz-se necessária a extração das proteínas quando as células encontram-se em fase de crescimento logarítmico, pois células em fase estacionária de crescimento, fornecem perfis protéicos mais difusos, com degradação de proteínas de maiores massas moleculares e um acúmulo de proteínas degradadas e peptídios na região de menores massas moleculares, do eletroforegrama.

Variações da técnica original de eletroforese de proteínas totais permitiram o estudo das variabilidades intra e inter específicas de isolados de leveduras do gênero *Candida*. LEE et al. (1986), propuseram um sistema de caracterização de isolados de *C. albicans* baseado na separação eletroforética das proteínas totais, seguida da transferência para uma membrana de nitrocelulose onde as proteínas foram reveladas através da combinação com conjugados de anticorpos policlonais-fosfatase alcalina, que fornecem complexos corados (técnica denominada "Western blot"). Os autores observaram a ocorrência de 16 sorotipos distintos dentre 190 isolados. Esses mesmos isolados foram submetidos à técnica de aglutinação desenvolvida por HASENCLEVER & MITCHELL (1961) e produziram apenas 2 grupos de sorotipos, demonstrando de tal forma, a maior capacidade do procedimento eletroforético, na diferenciação de isolados de uma mesma espécie. Um segundo experimento foi conduzido, com a separação das proteínas dos isolados por SDS-PAGE e posterior coloração com Coomassie-blue. Os resultados foram idênticos aos do primeiro experimento, com a obtenção de 16 tipos eletroforéticos.

Outra variação da técnica foi desenvolvida por SHEN et al. (1988), que introduziram a técnica de análise dos perfis de proteínas radiomarcadas com [³⁵ S] metionina, na identificação diferencial de sete espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondi*, *C. kefyr*, *C. lipolytica* e *C. lusitaniae*), duas espécies de *Torulopsis* (*T. glabrata* e *T. candida*), uma espécie de *Trichosporon* (*T. beigeli*) e uma espécie de *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*), obtendo resultados promissores. A técnica foi desenvolvida a partir do crescimento das culturas em meios *metionina-free*, aos quais foi acrescentado metionina marcada com radioisótopo 35 de enxofre. As células incorporam esse aminoácido radiomarcado em suas cadeias polipeptídicas. Faz-se a extração de proteínas intracelulares, que são, à seguir, separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida. Terminada a separação, os géis são desidratados e autoradiografados com filmes para raios-X por 12 horas, à -70⁰C. Os padrões obtidos, segundo os autores, possibilitou a caracterização dos gêneros e das espécies das leveduras.

Visando uma aplicação da eletroforese no entendimento da biodiversidade do meio intrabucal, MAIDEN & TANNER (1991), trabalhando com amostras de leveduras isoladas da cavidade oral, utilizaram-se da eletroforese em gel de poliacrilamida, seguida da coloração pela prata, para suas identificações. Obtiveram padrões de bandas protéicas cujas massas moleculares variaram entre 29 e 116 kDa (kilodaltons), suficientes para a análise diferencial entre as leveduras. Esses autores ressaltaram a alta

especificidade da técnica, somada à rápida obtenção de um grande número de dados com significância classificatória.

Em uma publicação de 1991, VANCANNEYT et al. propuseram a utilização da eletroforese de proteínas totais de diversos gêneros e espécies de leveduras de importância médica e industrial, com a finalidade de promover a diferenciação e caracterização das mesmas. Os autores ressaltam a importância e necessidade da inclusão de linhagens-tipo ("type-strains") em experimentos dessa natureza, com a finalidade de caracterizar os grupos correspondentes e correlacionados, no momento da construção de fenogramas de similaridade, bem como estabeleceram critérios de reprodutibilidade para a avaliação conduzida em diferentes géis. Concluíram que a eletroforese de proteínas totais em sistema desnaturante (SDS-PAGE) e descontínuo (LAEMMLI, 1970) pode ser uma ferramenta útil e conveniente na taxonomia de leveduras e pode ser empregada como procedimento de rotina na identificação de isolados, uma vez que uma base de dados de eletroforegramas-referência seja construída.

Em 1992, esse mesmo grupo de pesquisadores (VANCANNEYT et al., 1992) publicou outro trabalho justificando a aplicação da eletroforese de proteínas intracelulares totais, na identificação e classificação de leveduras. Os autores, após eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), submeteram os géis, com seus respectivos "slots", à densitometria de varredura, com posterior obtenção de matrizes de correlação e confecção de fenogramas protéicos. Seus resultados confirmaram o êxito da metodologia, para a caracterização de leveduras dos gêneros *Cystofilobasidium*,

Filobasidium, *Filobasidiella*, *Kondoa*, *Leucosporidium* e *Rhodosporidium*, com seus característicos “fingerprints”.

MACDONELL & COLWELL (1985), discorrendo sobre o emprego da Taxonomia Numérica na Sistemática Microbiana, citam que foi na virada do século, que os métodos quantitativos começaram a ser aplicados à Taxonomia. Porém o uso das análises numéricas só se tornou popular com o surgimento do computador. Os autores citam as publicações de Sneath (1957) e Michener e Sokal (1957) como sendo as pioneiras no emprego desse novo recurso. Segundo uma estimativa dos autores, até 1985 já haviam sido publicados cerca de 3000 trabalhos sobre Taxonomia Numérica de microrganismos.

A Taxonomia Numérica baseada em similaridades fenéticas teve suas regras fundamentais publicadas por SNEATH & SOKAL, em 1973: a) Deve-se comparar a maior quantidade possível de caracteres, em testes com grande número de amostras; b) Toda característica deve ser considerada como tendo igual importância (critério Andansoniano); c) A similaridade global é considerada como sendo função da soma das similaridades individuais.

O emprego da eletroforese associada ao processamento das informações via computador, contribuiu reduzindo o tempo da análise e a possibilidade de erros nos cálculos, além de permitir a análise de um grande número de amostras simultaneamente. Dentre os diversos tipos de análise numérica, a análise de “clusters” (grupos) formados a partir das combinações entre as linhagens através de coeficientes de similaridade, tem sido empregada, com resultados satisfatórios, em estudos de Sistemática de

bactérias (TANNER, 1986; COSTAS et al., 1987), fungos filamentosos (JONES & NOBLE, 1982) e leveduras (SHECHTER et al., 1972; VANCANNEYT et al., 1991; VANCANNEYT et al., 1992; GOMES, 1995; ROCHELLE, 1996).

Em um grande número de casos, é agora sabido que eletroforegramas unidimensionais de proteínas celulares totais discriminam, tanto quanto, as informações derivadas de dados de hibridação DNA-DNA (KERSTERS & DE LEY, 1975; IZARD et al., 1981; CATO et al., 1982; OWEN & JACKMAN, 1982; FERRAGUT et al., 1983 e KERSTERS, 1985). Linhagens bacterianas com 90-100% de sequências homólogas de DNA, geralmente apresentam padrões protéicos quase idênticos e linhagens com pelo menos 70% de homologia de bases de DNA tendem a ter perfis protéicos similares. Essas observações são, de acordo com KERSTERS (1985), os maiores pilares nos quais a aplicação da eletroforese de proteínas em Sistemática Microbiana esta embasada. A comparação dos padrões eletroforéticos é uma técnica com resolução taxonômica satisfatória, que é aplicável ao nível de espécies, subespécies ou biotipos.

Num estudo sobre métodos de caracterização de leveduras, GOMES (1995) concluiu que a técnica de SDS-PAGE e a técnica de análise genética baseada em marcadores RAPD (polimorfismo do DNA amplificado ao acaso) são as que fornecem resultados mais confiáveis, quando da avaliação de linhagens com pouca diversidade, e que é necessária a utilização de mais de um método, pois as limitações de um podem ser compensadas pelo outro.

A análise numérica baseada nos eletroforegramas de proteínas normalmente não permitem deduções válidas no que concerne às relações

genéticas entre os "clusters" eletroforéticos (KERSTERS, 1985), pois proteínas, mesmo sendo produtos da expressão gênica, estão sujeitas à interferências durante as fases de transcrição, "splicing" do mRNA, tradução e de organização de suas estruturas terciárias e quaternárias. Porém permitem a análise dos graus de similaridade, baseadas em caracteres estáveis, uma vez que se respeite a padronização dos quesitos de reprodutibilidade. VANCANNEYT et al. (1991) defendem que a atribuição dos pesos dados as similaridades, pelos perfis eletroforéticos de proteínas, permitem determinar se duas espécies são estreitamente relacionadas ou não, e que são necessários métodos que avaliem moléculas menos sujeitas a interferência de fatores pós-transcricionais (ácidos nucléicos), quando deseja-se determinar características evolutivas, mutacionais ou que identifiquem um indivíduo ou linhagem ("fingerprints"). Contudo, continuam os autores, a eletroforese de proteínas permite reduzir a quantidade de análises de material genético, quando um pequeno número de amostras de leveduras é observado em "clusters" eletroforéticos.

Segundo SHECHTER (1973), o mérito fundamental da análise taxonômico-numérica a partir de dados eletroforéticos é sua capacidade dinâmica de incorporar novos caracteres bioquímicos e taxa adicionais, em perfeita concordância com as classificações existentes. O contínuo acúmulo de novas características eletroforéticas através de técnicas de análise de isoenzimas, focalização isoeletrica, eletroforeses bidimensionais e imuno eletroforese associado ao estudo de um maior número de linhagens de

várias espécies de *Candida*, certamente serão eficientemente acomodados através da Taxonomia Numérica.

Modernas metodologias empregadas no estudo sistemático de leveduras, envolvem o conhecimento das moléculas de ácidos nucléicos e apontam para a possibilidade da compreensão das relações fenéticas, genéticas e, até mesmo filogenéticas estabelecidas por esses microrganismos. OLSEN (1990), realizou uma importante revisão sobre os métodos quimiotaxonômicos utilizados na classificação das leveduras, verificando que eles se preocupam essencialmente com a elucidação de suas composições químicas, ou então com as composições químicas de seus produtos. A análise dos produtos de fermentação e dos sistemas enzimáticos e a sua regulação celular, podem revelar novas características únicas ou comuns aos diversos grupos de organismos. Os avanços nos equipamentos analíticos, como na cromatografia e na eletroforese e outras técnicas físicas e químicas, têm muito contribuído para os avanços da quimiotaxonomia. Dentre essas técnicas, o autor cita as de análise da composição do DNA; os métodos de mapeamento e tipagem do DNA; as de homologia DNA-DNA; os estudos de homologia do RNA ribossômico com o DNA; os métodos de sequenciamento dos aminoácidos das enzimas; os de análise dos polipeptídeos das cadeias protéicas das células leveduriformes; o espectro dos citocromos e, finalmente, as técnicas que analisam os polissacarídeos capsulares.

Em 1987, SCHERER & STEVENS, propuseram um método de análise do DNA de diferentes espécies de *Candida*, para estudos epidemiológicos e taxonômicos. Esses autores desenvolveram toda a técnica

de extração do DNA, digestão do genoma por endonucleases de restrição (no caso, a *Eco R1*) e eletroforese, resultando em vários trechos de DNA digerido, o que produziu um "fingerprint" de padrões eletroforéticos, das leveduras. Citam ainda que, o uso do polimorfismo do DNA oferece muitas possíveis vantagens, como um grande número de variantes polimórficas, e a possibilidade de grande variabilidade para um determinado locus. Já em 1988, MAGEE et al. publicaram uma detalhada revisão sobre métodos de Genética e Biologia Molecular, para serem empregados na manipulação ou identificação de *Candida albicans*.

Alternativamente, MASON et al. (1987) trabalhando com clonagem do gene da actina, de diferentes espécies de *Candida* de importância médica, observaram grande polimorfismo genético entre as espécies. Os autores, demonstraram assim, que a técnica por eles empregada - denominada "Southern Blot" - poderia ser empregada, como ferramenta molecular, na diferenciação de espécies de leveduras, uma vez que fornecia grande polimorfismo de bandas, em nível interespecífico. Esse polimorfismo pode ser incrementado, empregando-se um maior número de enzimas de restrição e de sondas de DNA. VASQUEZ et al. (1991) avaliaram a possibilidade de utilização da eletroforese em campo pulsado (SCHARTZ & CANTOR, 1984), e da construção de mapas de restrição (CARLE et al., 1986), na caracterização de diferentes cepas de *Candida albicans*. Os autores observaram que a eletroforese em campo pulsado possibilita a análise de fragmentos de DNA de grande massa molecular, tais como cromossomos, facilitando, inclusive, a cariotipagem de leveduras. O emprego dessa técnica

permitiu a observação de 23 diferentes padrões eletroforéticos, em 35 amostras de *Candida albicans*. A utilização de mapas de restrição, empregando-se as enzimas de restrição *Eco R1* e *Msp 1*, permitiu a caracterização de 17 diferentes tipos de *Candida albicans*, dentre as mesmas 35 amostras.

Estudos enfatizando a pesquisa da filogenia de espécies patogênicas de *Candida* e de outros gêneros de leveduras, foram levados a termo por BARNES et al. (1991), através da análise dos RNA ribossômicos, sabidamente moléculas que sofrem poucas alterações estruturais, durante o processo evolutivo. Salientaram também que o método de classificação das leveduras, de acordo com sua forma sexuada, tem trazido muitas confusões para a taxonomia dos fungos, fazendo com que novas propostas tenham sido formuladas para evitar o emprego dessas características sexuais. Têm-se proposto, segundo os autores, especialmente os procedimentos que se baseiam em técnicas de manipulação do RNA ribossômico, que em alguns fungos é 5S e, em outros, como no caso das *Candida*, é 18S.

MATERIAL E MÉTODOS.

1. Características das cepas utilizadas:

No presente trabalho, foram utilizadas doze isolados de leveduras do gênero *Candida*, isoladas da cavidade bucal de pacientes atendidos na Clínica Odontológica, no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (FOS.J.Campos), gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Antonio Olavo Cardoso Jorge, conforme mostra o quadro 1:

QUADRO 1 - Relação das espécies e variedades de leveduras bucais utilizadas nos experimentos

AMOSTRAS	ABREVIÇÃO	SETOR DE ORIGEM	CÓDIGO DO SETOR DE ORIGEM
<i>Candida albicans</i>	C.a.	FOS.J.Campos	97-a
<i>Candida albicans</i>	C.a.	FOS.J.Campos	F-72
<i>Candida albicans</i>	C.a.	FOS.J.Campos	E-37
<i>Candida albicans</i>	C.a.	FOS.J.Campos	17-b
<i>Candida guilliermondii</i>	C.g.	FOS.J.Campos	FCF-405
<i>Candida guilliermondii</i>	C.g.	FOS.J.Campos	FCF-152
<i>Candida parapsilosis</i>	C.p.	FOS.J.Campos	21-c
<i>Candida parapsilosis</i>	C.p.	FOS.J.Campos	7-a
<i>Candida krusei</i>	C.k.	FOS.J.Campos	IM-90
<i>Candida krusei</i>	C.k.	FOS.J.Campos	4-c
<i>Candida tropicalis</i>	C.t.	FOS.J.Campos	1-b
<i>Candida tropicalis</i>	C.t.	FOS.J.Campos	FCF-430

2. Manutenção das amostras:

As amostras foram mantidas durante toda a realização do estudo em duas coleções:

2.1. Na primeira, as amostras foram inoculadas em meio completo para leveduras (M.C.L.), de acordo com o estabelecido por NEDER (1992), contendo uma mistura de peptona e extrato de levedura, em tubos de ensaio (13X100mm) com tampão de algodão hidrófilo e levadas à estufa a 37°C durante 24-72 horas para o desenvolvimento celular. Após o crescimento, os tubos da coleção foram mantidos à temperatura ambiente durante 30 dias, sendo posteriormente renovados à medida do necessário.

2.2. Na outra coleção as amostras foram mantidas em tubos de ensaio (13X100mm) com tampão de algodão hidrófilo contendo meio completo de leveduras (M.C.L.), e recobertas com óleo mineral estéril, à temperatura ambiente. As cepas assim conservadas, eram substituídas a cada 6 meses. Periodicamente, foi feitos nos dois casos, o reconhecimento da morfologia celular e colonial (aspectos macro e microscópicos) como controle da variabilidade celular e de contaminantes.

3. Padronização da extração das proteínas de componentes intracelulares:

Amostras de cultura mantidas conforme o item 2.2, foram inoculadas em frascos com 50 mL de meio YPD (extrato de levedura 1%, bacto-peptona 2% e glicose 2%)(CASANOVA & CHAFFIN, 1991; ASAKURA et

al., 1991) e mantidos em Incubadora “Shaker” (Nova Técnica Instrumentos e Equipamentos de Laboratório Ltda) a 37°C, com velocidade rotacional de 150 rpm, por 18 horas. Decorrido o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas a 3000 g , por 5 minutos (Centrífuga 215 - Fanen Ind. e Com.), de acordo com WALTERS & BLOBEL (1986). Os sedimentos obtidos foram ressuspensos em água destilada gelada (WOONTNER & JAEHNING, 1990) duas vezes, para remoção de restos de meio de cultivo e de possíveis produtos metabólicos extracelulares, sendo centrifugados novamente a 3000g, por 5 minutos.

Os sedimentos obtidos foram fracionados em alíquotas de 200mg, às quais foram submetidas aos diferentes processos de extração:

3.1. Extração com Pérolas de Vidro:

Foi utilizada a metodologia empregada por ANTONSSON et al. (1994). Aos sedimentos obtidos e descritos no ítem 3, acrescentou-se um igual volume de pérolas de vidro previamente tratadas com solução de ácido clorídrico 1:1 e lavadas sucessivamente em água recém destilada. As misturas foram deixadas em banho de gelo por 5 minutos, e logo após, agitadas 4 vezes em vórtex por 30 segundos, com intervalos de 1 minuto (as misturas foram mantidas em banho de gelo, durante os intervalos). Os lisados foram centrifugados à 1500 g, por 5 minutos em centrífuga Centrimicro 242 (Fanen Ind. Com. de Equipam. para Laboratórios). Às alíquotas de 100 µL do sobrenadante acrescentaram-se 100 µL de tampão dissociante preconizado por ALFENAS et al. (1991), constituído de Glicerol, 20%; Tris-HCl 0,61M pH

6,8, 10%; Azul de Bromofenol, 2,5mg%; 2-Mercaptoetanol, 2% e SDS, 2%. As misturas foram mantidas em banho de água fervente por 10 minutos, resfriadas, centrifugadas a 12000 g por 1 minuto e os sobrenadantes congelados a -75°C , até o momento do uso.

3.2. Extração pelo Ácido Tricloroacético:

Foi empregada a técnica desenvolvida por WRIGHT et al. (1989). Os 200mg de células de leveduras foram transferidos para tubos de Eppendorf, nos quais adicionaram-se 200 μL de solução de ácido tricloroacético 20%. Essa mistura foi incubada, em gelo, por 60 minutos. Após centrifugação (12000 g/5 minutos), as células foram recolhidas, sendo o sobrenadante descartado e o "pellet" ressuscitado em 1 mL de etanol absoluto, previamente mantido a -20°C . Essa mistura permaneceu em contato por 30 minutos (em gelo). As células foram novamente centrifugadas e a precipitação com etanol foi repetida mais duas vezes.

Após a última centrifugação, os "pellets" foram secos por filtração sob vácuo e ressuscitados em tampão dissociante de WRIGHT et al. (1989) (Tris-HCl 100mM pH 7, 10% de glicerol, 4% de SDS, 5% de 2-mercaptoetanol e 0,02% de Azul de bromofenol), em banho de água fervente, por 5 minutos. Os resíduos celulares foram removidos (centrifugação a 12000 g, por 1 minuto), sendo os sobrenadantes coletados e armazenados à -75°C , até o momento do uso.

3.3. Extração por Sonicação:

A extração por sonicação foi feita de acordo com VANCANNEYT et al. (1992), com modificações. Os 200 mg de células de leveduras foram suspensos em 1.8 mL de tampão dissociante de VANCANNEYT et al. (1992) (Tris 0,75g, 2-mercaptoetanol 5mL, glicerol 10mL, e água destilada qsp 100mL) e submetidos à sonicação em 50W por 10 minutos, com sonicador Lab-Line Ultratip (Lab-Line Instruments, Inc.), em banho de gelo. Depois de sonicadas, as amostras foram centrifugadas a 12000 g, por 5 minutos. Ao sobrenadante adicionou-se 0,2 mL de solução dissociante (10% de SDS) e submeteu-se ao aquecimento por 10 minutos, em água fervente. As amostras foram resfriadas e centrifugadas a 12000 g, por 1 minuto. O sobrenadante resultante foi armazenado a -75°C, até o momento de uso.

3.4. Extração Direta pelo Tampão de Amostra:

Empregou-se a técnica desenvolvida por BRUNEAU & GUINET (1989) com modificações no meio de cultivo. Aos 200mg de células de leveduras foram adicionados 500 µL de tampão de amostra (Tris 5mM; 2-mercaptoetanol 2,5%; SDS 1,5% e azul de bromofenol 0,025%). Essas misturas foram aquecidas por 10 minutos, em banho de água fervente e centrifugadas a 2500 rpm, por 5 minutos, em centrífuga Excelsa Baby (Fanen Ind. Com.). O sobrenadante foi coletado e armazenado a -75°C, até o momento de uso.

3.5. Extração por Criofatura Celular:

Aos 200 mg de células de leveduras, acrescentou-se 500 µL de água destilada, os quais foram transferidos para gral de porcelana, adicionando-se, a seguir, pequenos volumes de nitrogênio líquido (GOMES, 1995). Após a completa evaporação do nitrogênio, o material resultante foi submetido à trituração, por aproximadamente 3 minutos, e os lisados, centrifugados a 13500 rpm por 3 minutos. Ao sobrenadante, adicionaram-se 50 µL de tampão de amostra (ALFENAS et al., 1991) para cada 50 µL de extrato (v/v), aquecendo as misturas em banho de água fervente por 10 minutos. Posteriormente, centrifugou-se a 12000 g por 1 minuto mantendo-se o sobrenadante a -75°C, até momento de uso.

4. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE):

Os extratos intracelulares obtidos das culturas de leveduras, descritos no item 3 foram submetidos à técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) em sistema descontínuo, de acordo com LAEMMLI (1970), em cuba de acrílico descrita por STUDIER (1973), de dimensões 180X160 mm, com placas de vidro de 140X130 mm e espaçadores de 1,5 mm. Utilizou-se o gel empilhador ("stacking gel") a 4,5% e o gel separador ("running gel") a 12,5%, em sistema de tampão Tris 0,025M, glicina 0,192M e SDS 0,1% , com pH 8,9.

Foram introduzidos 50 μ L dos extratos tratados com tampões de amostra nos poços superiores dos géis empilhadores e estabeleceu-se inicialmente, uma voltagem de 75 volts durante os primeiros 20 minutos de corrida. Decorrido esse tempo, elevou-se a voltagem para 125 volts, que foi mantida até o término da corrida eletroforética. Os géis foram então fixados em solução de ácido sulfossalicílico (12,5 %), por 20 minutos, lavados com água destilada e corados com solução 0,025% de Azul de Coomassie G-250, por 12 horas, sendo posteriormente descorados por lavagens sucessivas com solução de ácido acético 10% e metanol 25%, em água destilada.

Depois de descorados os géis foram analisados por densitometria de integralização de área em densitômetro modelo GS-700 e software Molecular Analyses (Bio-Rad Instruments, Inc.). Os valores médios de cada extração, expressos na forma de medida da área total do "slot", foram comparados entre si, atribuindo-se à maior média o valor de 100%, e às demais, as respectivas porcentagens relativas.

5. Análise numérica dos perfis eletroforéticos de proteínas intracelulares de *Candida*, obtidos por SDS-PAGE.

Para o estabelecimento dos graus de similaridade entre as diferentes linhagens, utilizaram-se os extratos de proteínas totais obtidas pelo método de criofratura celular (método escolhido como padrão) e empregaram-se os extratos protéicos das cinco linhagens-tipo, representativas das espécies - *Candida albicans*, CBS-562; *Candida krusei*, CBS-573; *Candida tropicalis*,

CBS-94; *Candida parapsilosis*, CBS-604 e *Candida guilliermondii*, CBS-566 - (VANCANNEYT et al., 1991), além do extrato da linhagem-tipo de *Saccharomyces cerevisiae* (CBS-1171 neotype), como uma referência extragenérica (COSTAS et al., 1989b; HOLMES et al., 1990, BRUNEAU & GUINET, 1989) ao lado de padrões de massa molecular (Bio-Rad Laboratories), para avaliação de reprodutibilidade (COSTAS et al., 1989a; COSTAS et al., 1989b)

As condições de cultivo e técnicas de extração são as mesmas descritas no item 3 e no sub-ítem 3.5. Foi realizada a determinação da concentração protéica dos extratos obtidos através do método espectrofotométrico de BRADFORD (1976), que conforme trabalhos conclusivos de EZE & DUMBROFF (1982), mostrou-se muito sensível. As concentrações protéicas foram acertadas para 800 µg/mL (AMES, 1974). Os extratos protéicos foram desnaturados com tampão de amostra proposto por ALFENAS et al. (1991), na proporção de 50 µL de tampão para 50 µL de extrato, em banho de água fervente por 10 minutos, e seguidos de separação por centrifugação à 12000g, por um minuto. Os sobrenadantes das amostras e das linhagens-tipo, assim tratadas, foram conservados a -75°C, até o momento de uso.

5.1. Eletroforese das proteínas:

As corridas eletroforéticas foram conduzidas em suporte descontínuo de gel de poliacrilamida, coradas e descoradas conforme descrição constante no item 4.

5.2. Densitometria de detecção de picos:

Após a descoloração dos géis, os mesmos foram secos em papel de filtro e interpostos entre duas folhas de filme para transparência. Esse conjunto foi levado a um "twin-scanner" (Scan Jet 4C e adaptador para transparência HP 4C, Hewlett Packard Co.) onde suas imagens positivas e as densitometrias de detecção de picos foram processadas através do software SigmaGel (Jandel Co.) que forneceu os gráficos densitométricos de cada "slot".

5.3. Construção da matriz de similaridade:

As bandas protéicas, representadas nos traçados densitométricos como picos gráficos, tiveram suas distâncias de migração convertidas em valores numéricos em relação a linha distal de migração do azul de bromofenol (valores Rf). Esses valores receberam representações 1(um) e 0 (zero), respectivamente para a presença e ausência das bandas, numa comparação entre os "slots". O conjunto dessas informações gerou uma matriz de dados binários que foi plotada no sistema computacional NTSYS versão 1.70 (Applied Biostatistics, Inc.), empregando-se o programa QUALITATIVE e o coeficiente de similaridade SM (Simple Matching Coefficient), que gerou a matriz de similaridade das amostras.

5.4. Construção do fenograma de similaridade:

Utilizando o mesmo sistema computacional, a matriz de similaridade foi transferida para o programa SAHN onde através do método de agrupamento UPGMA (FARRIS, 1969; SNEATH & JOHNSON, 1972; SNEATH

& SOKAL, 1973), gerou-se o fenograma que possibilitou a avaliação dos graus de similaridade fenética existente entre as amostras.

RESULTADOS.

Os gráficos das densitometrias de integralização de área podem ser vistos nas figuras 1, 4, 6, 8, e 10, e os perfis eletroforéticos dos extratos intracelulares das amostras, submetidas aos diferentes processos extrativos (item 3.2) nas figuras 2, 3, 5, 7, 9 e 11, respectivamente.

O método de extração pelo ácido tricloroacético (**TCA**) não apresentou formação de bandas de migração eletroforética, para nenhuma das amostras analisadas, com uma taxa percentual de extração de 0%.

As cepas de leveduras da espécie *Candida albicans* (Fig 01) apresentaram médias de extração de proteínas de componentes intracelulares de 78,40% para o método de pérolas de vidro (**PV**), 92,35% para o método de BRUNEAU & GUINET (1989) (**B&G**), 91,34% para o método de criofratura com nitrogênio líquido (**NL**) e 78,88% para o método de sonicação (**SON**).

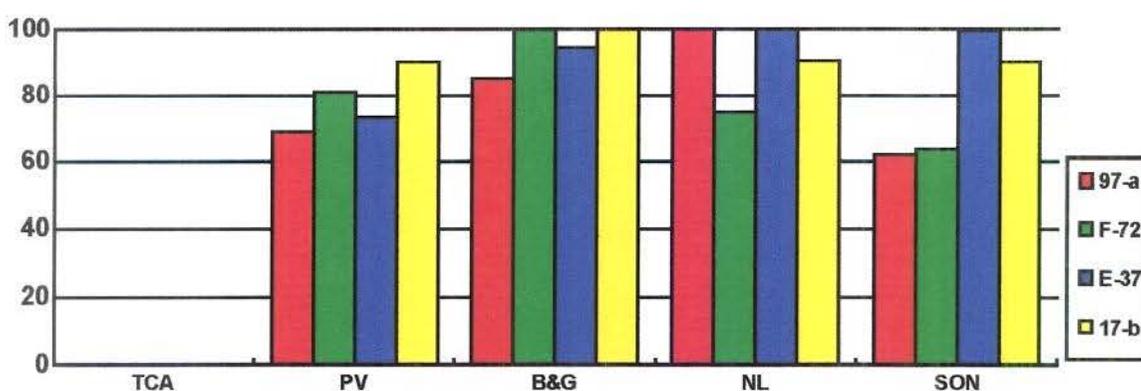


Figura 01: Porcentagens comparativas da extração de proteínas intracelulares de *Candida albicans*, obtidas por tratamentos diversos.

Médias percentuais de extração : 0,00% para TCA, 78,40% para PV, 92,35% para B&G, 91,34% para NL e 78,88% para SON.

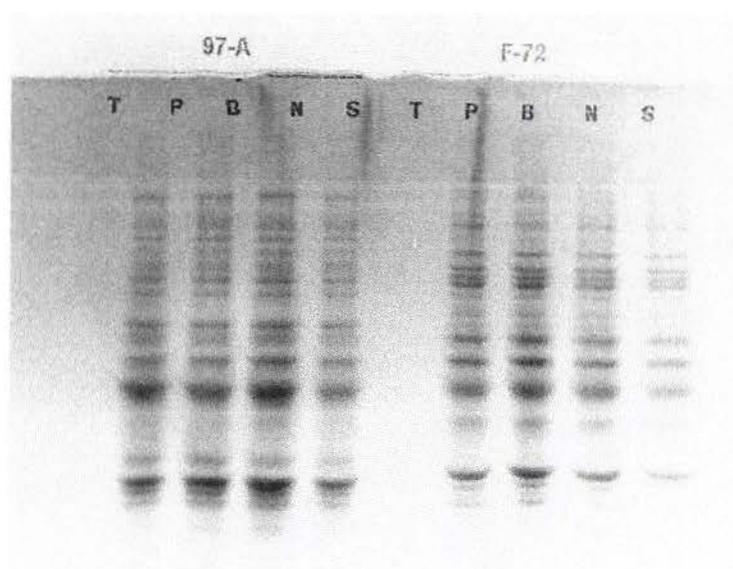


Figura 02: Perfil eletroforético de proteínas de *Candida albicans* extraídas por tratamentos diversos.

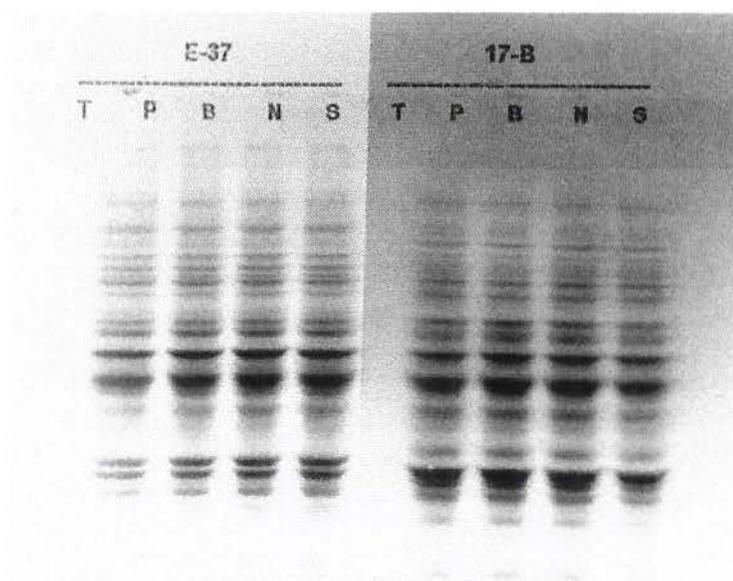


Figura 03: Perfil eletroforético de proteínas de *Candida albicans* extraídas por tratamentos diversos.

As cepas de leveduras da espécie *Candida krusei* (Fig. 04) apresentaram médias de extração de proteínas de componentes intracelulares de 86,75% para o método de **PV**, 96,33% para o método de **B&G**, 100% para o método de **NL** e 86,57% para o método de **SON**.

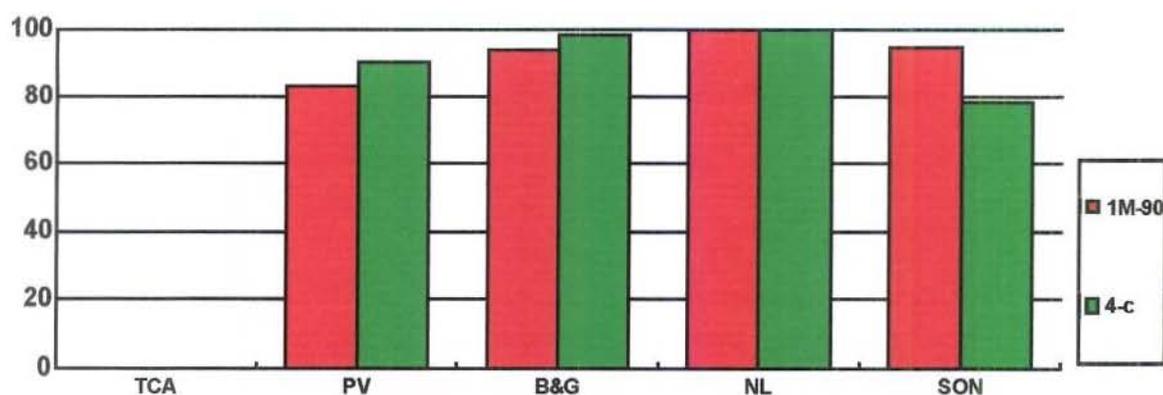


Figura 04 : Porcentagens comparativas da extração de proteínas de *Candida krusei*, obtidas por tratamentos diversos. Médias percentuais de extração: 0,00% para **TCA**, 86,75% para **PV**, 96,33% para **B&G**, 100% para **NL** e 86,57% para **SON**.

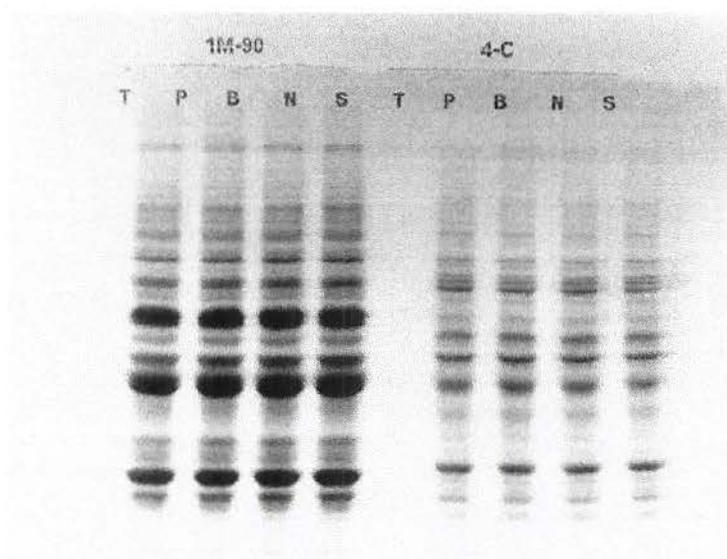


Figura 05: Perfil eletroforético de proteínas de *Candida krusei* extraídas por tratamentos diversos.

As cepas de leveduras da espécie *Candida parapsilosis* (Fig. 06) apresentaram médias de extração de proteínas de componentes intracelulares de 21,60% para o método de **PV**, 98,00% para o método de **B&G**, 65,98% para o método de **NL** e 81,66% para o método de **SON**.

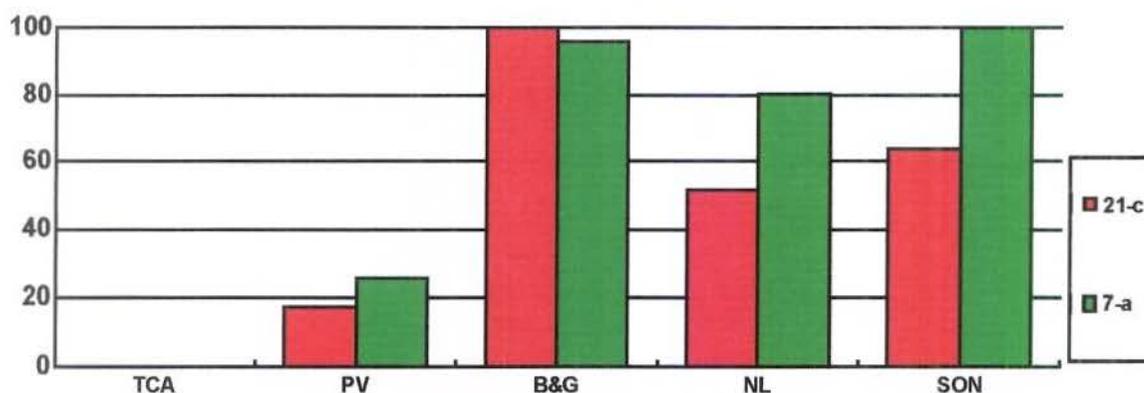


Figura 06: Porcentagens comparativas de extração de proteínas de *Candida parapsilosis*, obtidas por tratamentos diversos. Médias percentuais de extração: 0,00% para **TCA**, 21,60% para **PV**, 98,00% para **B&G**, 65,98% para **NL** e 81,66% para **SON**.

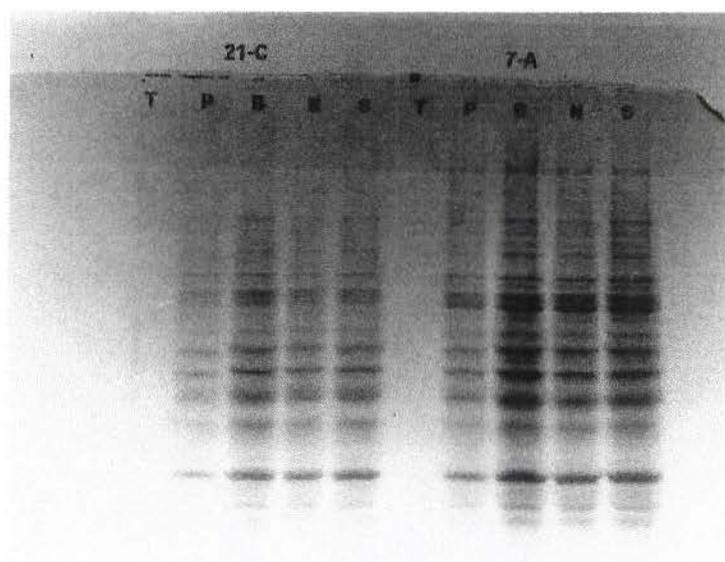


Figura 07: Perfil eletroforético de proteínas de *Candida parapsilosis* extraídas por tratamentos diversos.

As cepas de leveduras da espécie *Candida tropicalis* (Fig. 08) apresentaram médias de extração de proteínas de componentes intracelulares de 55,51% para o método de **PV**, 83,76% para o método de **B&G**, 56,74% para o método de **NL** e 79,81% para o método de **SON**.

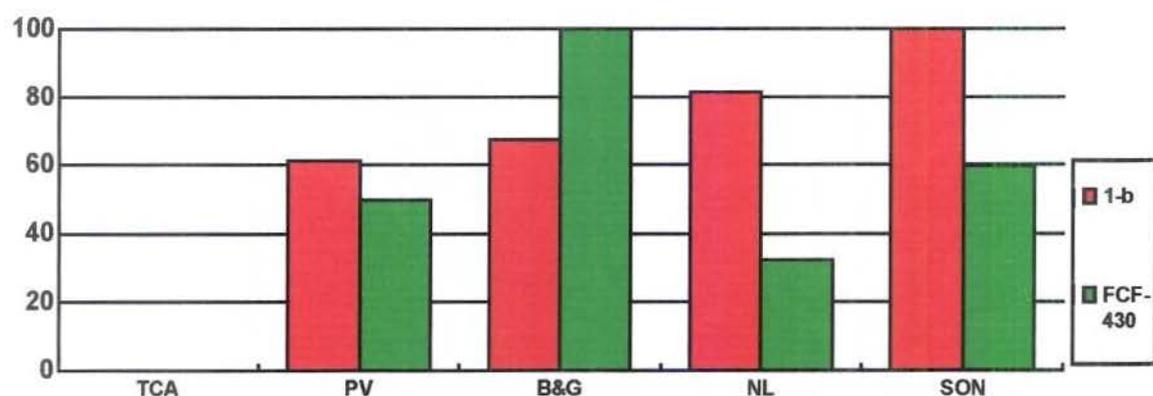


Figura 08: Porcentagens comparativas de extração de proteínas de *Candida tropicalis*, obtidas por tratamentos diversos. Médias percentuais de extração: 0,00% para TCA, 55,51% para PV, 83,76% para B&G, 56,74% para NL e 79,81% para SON.

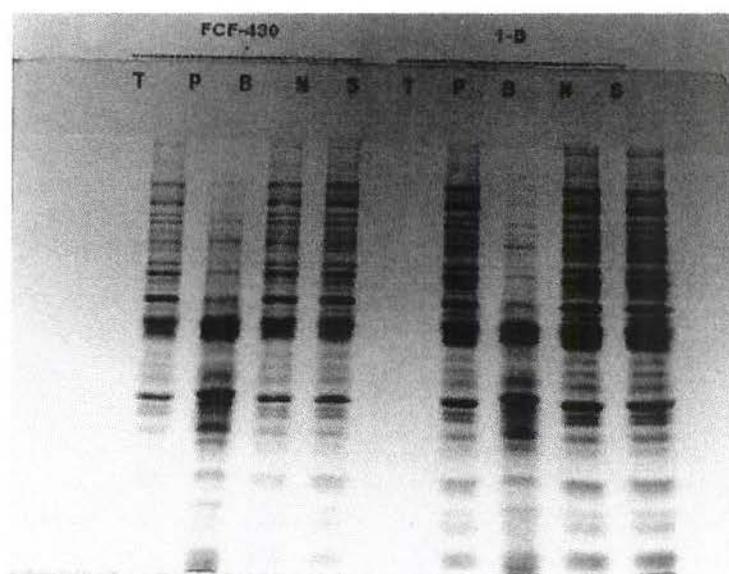


Figura 09: Perfil eletroforético de proteínas de *Candida tropicalis* extraídas por tratamentos diversos.

As cepas de leveduras da espécie *Candida guilliermondii* (figura 10) apresentaram médias de extração de proteínas de componentes intracelulares de 67,09% para o método de **PV**, 73,55% para o método de **B&G**, 96,70% para o método de **NL** e 82,20% para o método de **SON**.

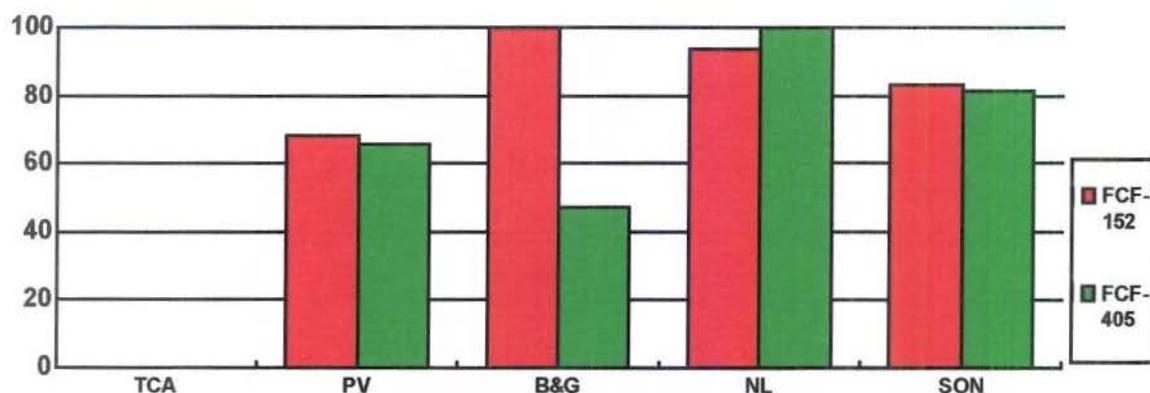


Figura 10: Porcentagens comparativas de extração de proteínas de *Candida guilliermondii*, obtidas por tratamentos diversos.

Médias percentuais de extração: 0,00% para **TCA**, 67,09% para **PV**, 73,55% para **B&G**, 96,70% para **NL** e 82,20% para **SON**.

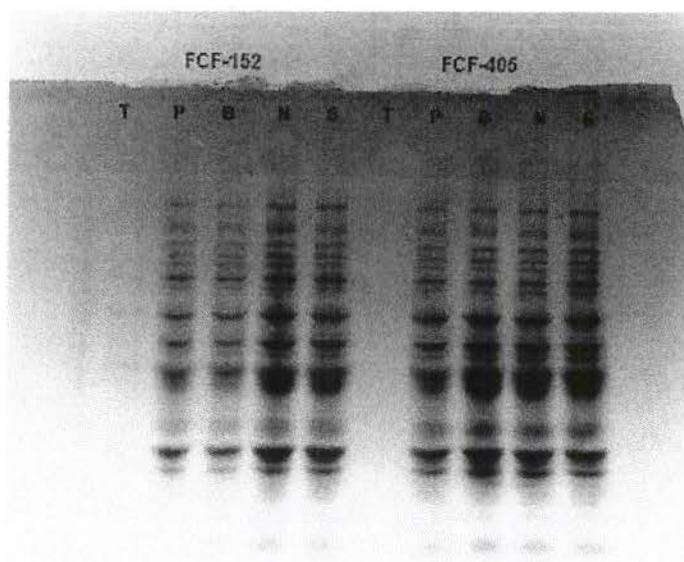


Figura 11: Perfil eletroforético de proteínas de *Candida guilliermondii* extraídas por tratamentos diversos.

Características gerais dos perfis protéicos da SDS-PAGE:

A eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida, dos extratos protéicos das 12 linhagens, obtidos pelo método de criofratura celular, permitiram a observação de perfis contendo aproximadamente 30-35 bandas eletroforéticas com massas moleculares de 45-200 kDa. Os perfis estão ilustrados nas figuras 12, 13 e 14. Os perfis protéicos das linhagens foram muito similares entre si, com as respectivas linhagens-padrão e com a linhagem de *Saccharomyces cerevisiae*. Diferenças qualitativas entre as espécies, principalmente entre as proteínas de massas moleculares superiores a 66,2 kDa e as bandas comuns ao gênero, em proteínas de massas moleculares 66,2 e 200 kDa foram observadas. Variações intraespecíficas puderam ser observadas em toda a extensão dos "slots" das respectivas linhagens, quando comparadas.

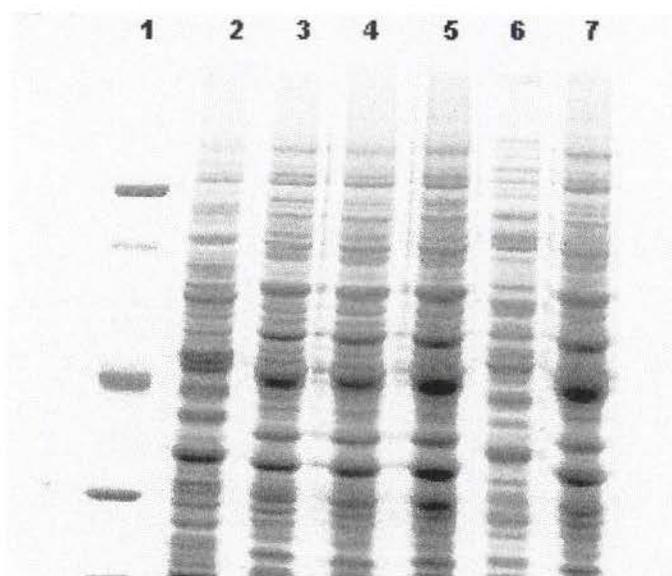


Figura 12: Perfil eletroforético dos extratos protéicos de linhagens de *Candida albicans*. 1) Marcadores de massa molecular (miosina 200 kDa, β galactosidase 116,25 kDa, fosforilase b 97,4 kDa e albumina de soro 66,2 kDa) , 2) CBS1171, 3) F72, 4) E37, 5) 97a, 6) 17b e 7) CBS562.

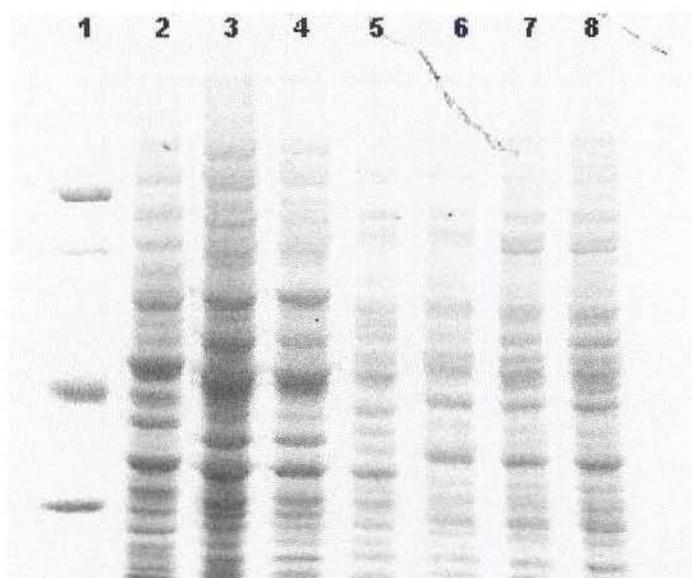


Figura 13: Perfil eletroforético dos extratos protéicos de linhagens de *Candida guilliermondii* e *Candida parapsilosis*. 1) Marcadores de massa molecular (miosina 200 kDa, β galactosidase 116,25 kDa, fosforilase b 97,4 kDa e albumina de soro 66,2 kDa) , 2) CBS1171, 3) FCF152, 4) FCF405, 5) CBS566, 6) 21c, 7) 7a e 8) CBS604.

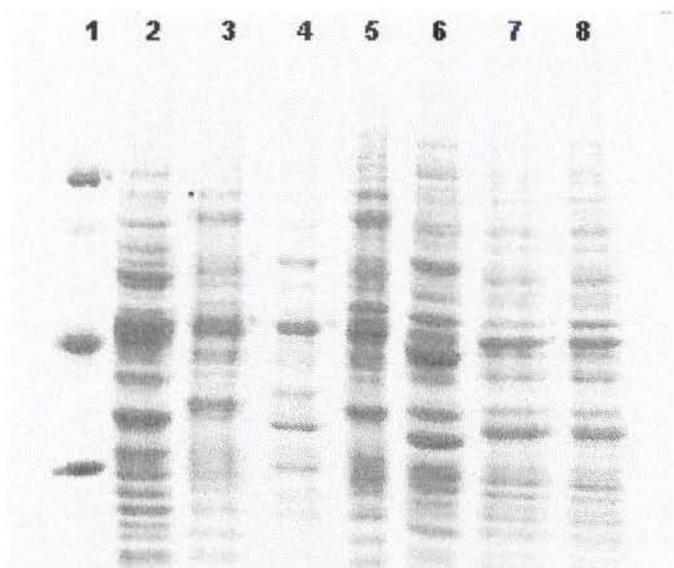


Figura 14: Perfil eletroforético dos extratos protéicos de linhagens de *Candida krusei* e *Candida tropicalis*. 1) Marcadores de massa molecular (miosina 200 kDa, β galactosidase 116,25 kDa, fosforilase b 97,4 kDa e albumina de soro 66,2 kDa) , 2) CBS1171, 3) 4c, 4) 1M90, 5) CBS573, 6) 1b, 7) FCF430 e 8) CBS94.

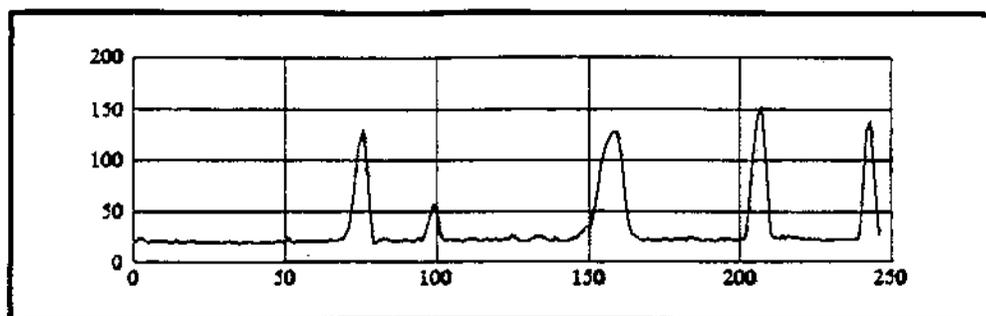


Figura 15: Densitograma do perfil eletroforético dos padrões de massa molecular (repetição 01): miosina, 200 kDa; β galactosidase, 116.25 kDa; fosforilase b, 97.4 kDa; albumina de soro, 66.2 kDa; ovalbumina, 45 kDa.

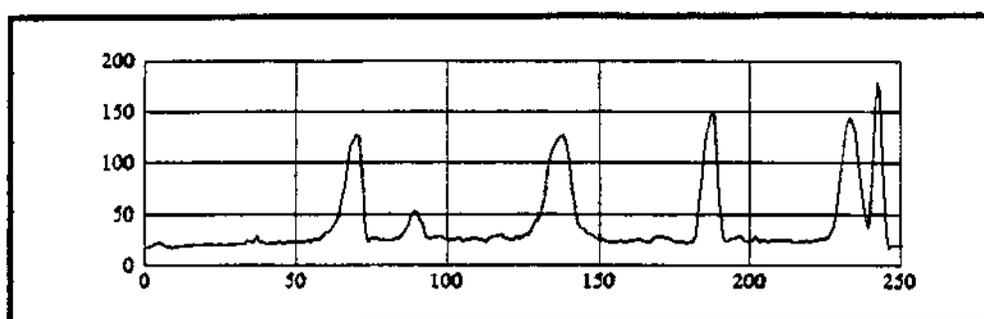


Figura 16: Densitograma do perfil eletroforético dos padrões de massa molecular (repetição 02): miosina, 200 kDa; β galactosidase, 116.25 kDa; fosforilase b, 97.4 kDa; albumina de soro, 66.2 kDa; ovalbumina, 45 kDa.

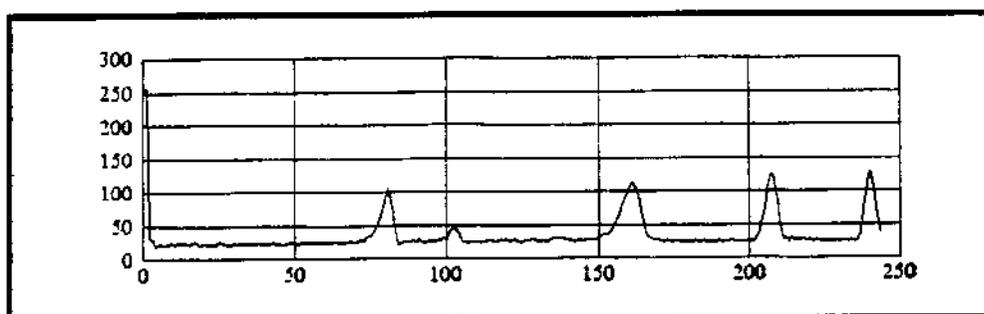


Figura 17: Densitograma do perfil eletroforético dos padrões de massa molecular (repetição 03): miosina, 200 kDa; β galactosidase, 116.25 kDa; fosforilase b, 97.4 kDa; albumina de soro, 66.2 kDa; ovalbumina, 45 kDa.

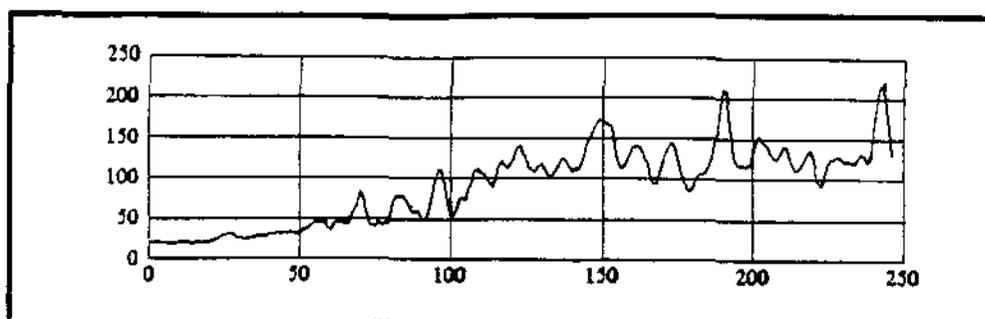


Figura 18: Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem CBS1171 (*S. cerevisiae* - repetição 01).

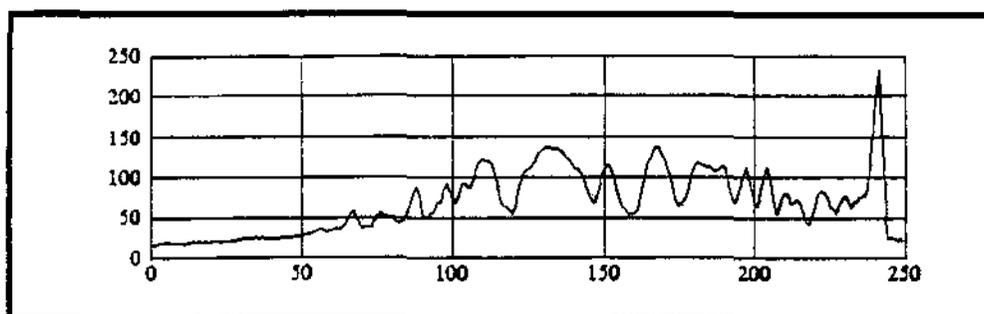


Figura 19: Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem CBS1171 (*S. cerevisiae* - repetição 02).

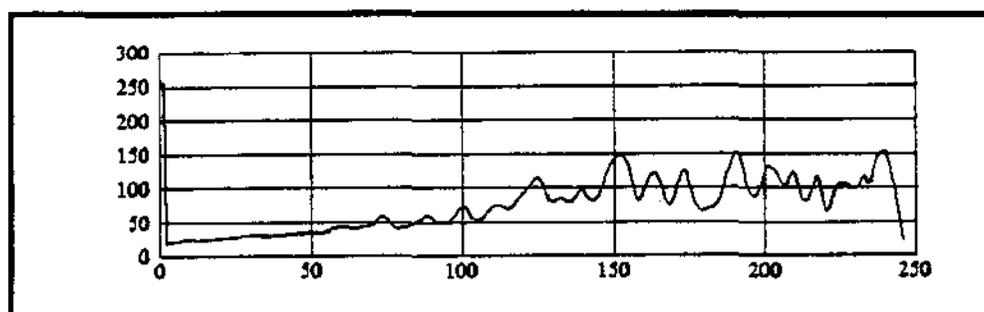


Figura 20: Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem CBS1171 (*S. cerevisiae* - repetição 03).

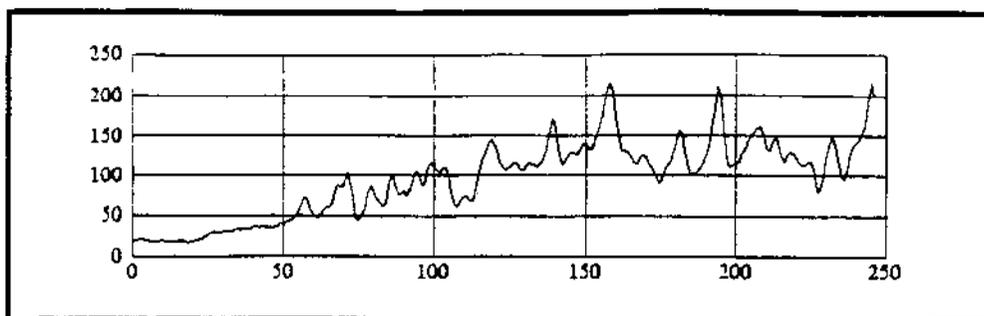


Figura 21: Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem F72 (*C. albicans*).

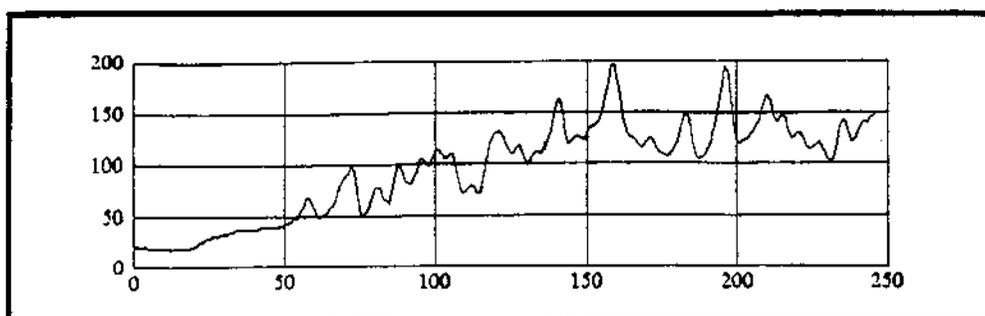


Figura 22: Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem E37 (*C. albicans*).

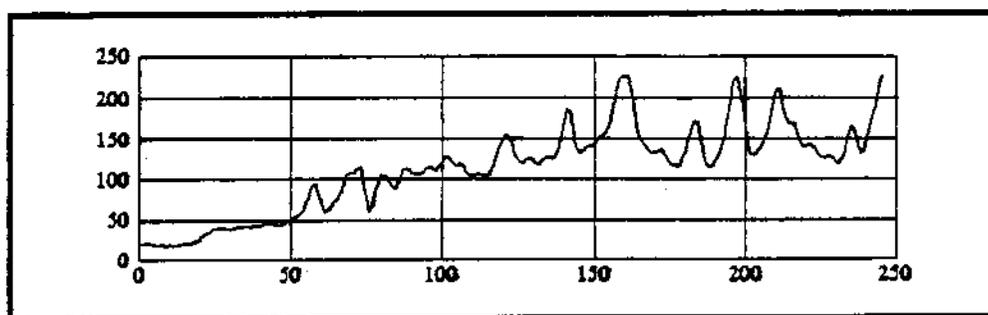


Figura 23: Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem 97a (*C. albicans*).

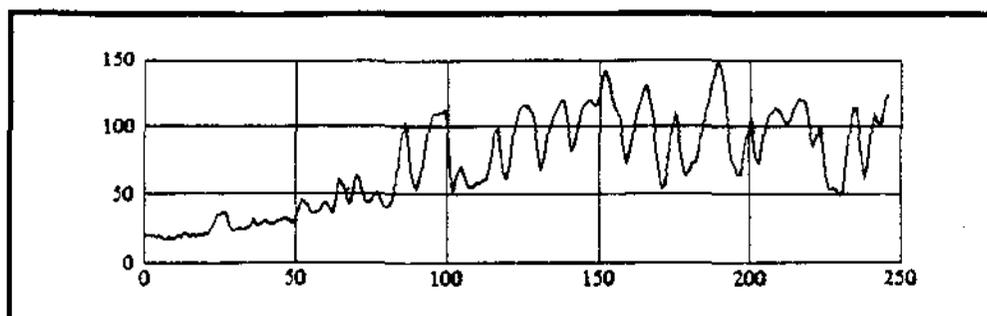


Figura 24: Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem 17b (*C. albicans*).

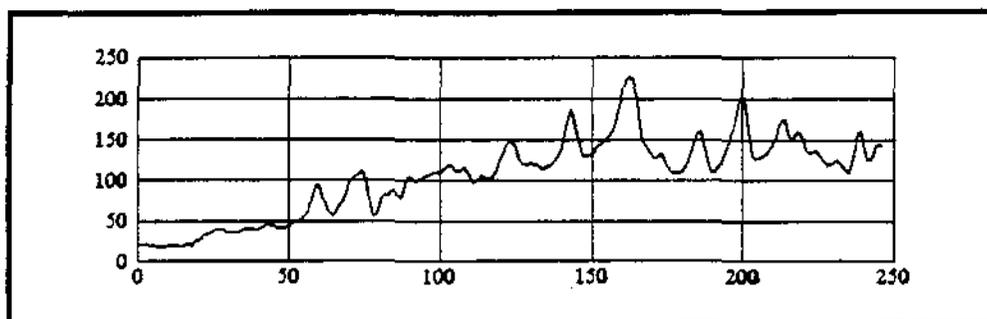


Figura 25: Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem CBS562 (*C. albicans*).

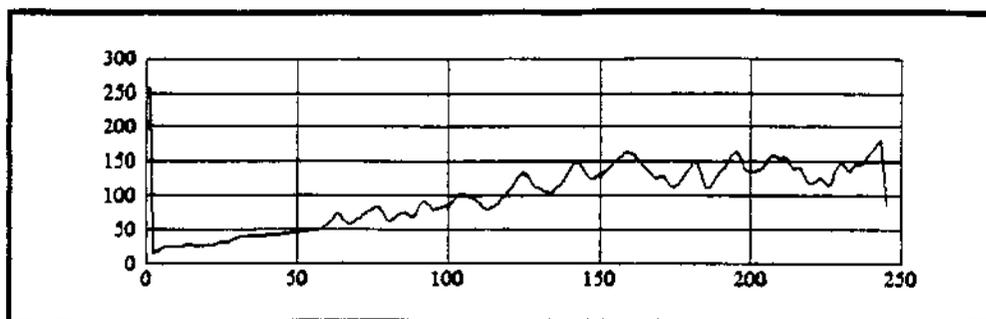


Figura 26: Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem FCF152 (*C. guilliermondii*).

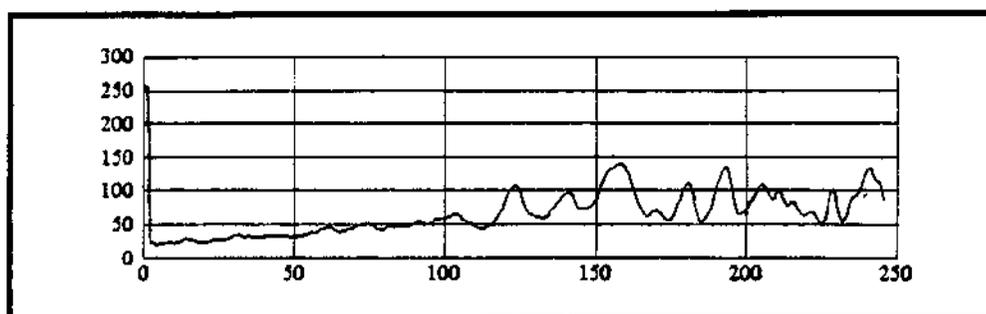


Figura 27: Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem FCF405 (*C. guilliermondii*).

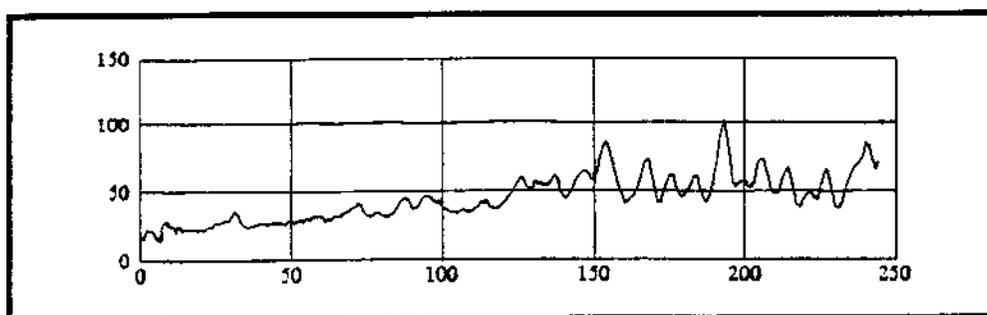


Figura 28: Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem CBS566 (*C. guilliermondii*).

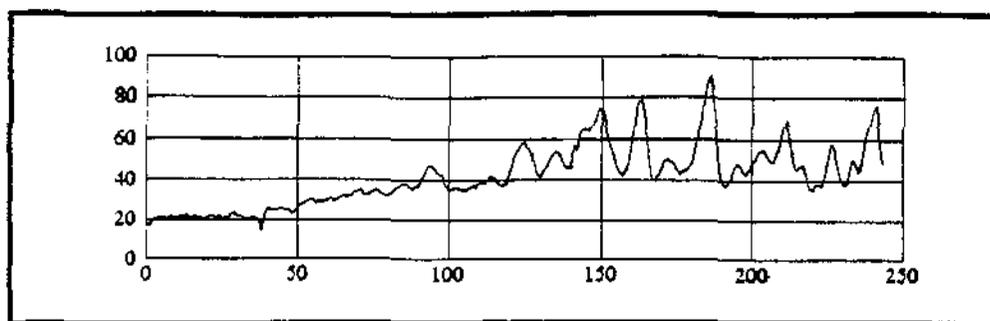


Figura 29: Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem 21C (*C. parapsilosis*).

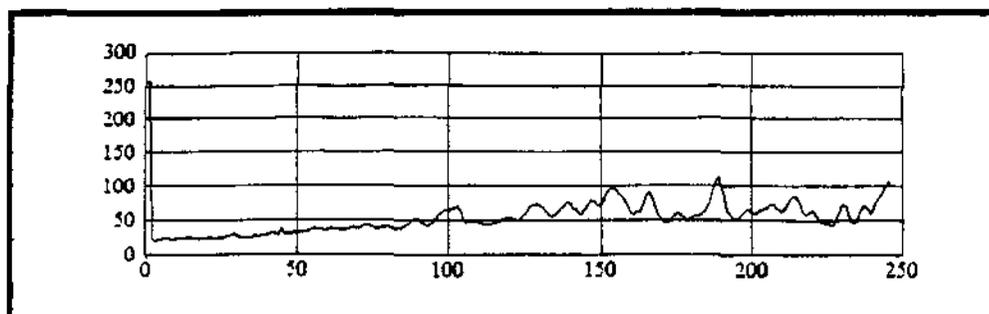


Figura 30: Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem 7a (*C. parapsilosis*).

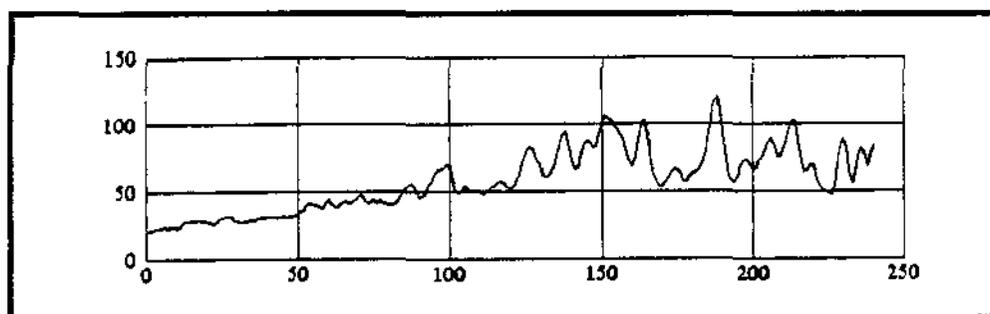


Figura 31: Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem CBS604 (*C. parapsilosis*).

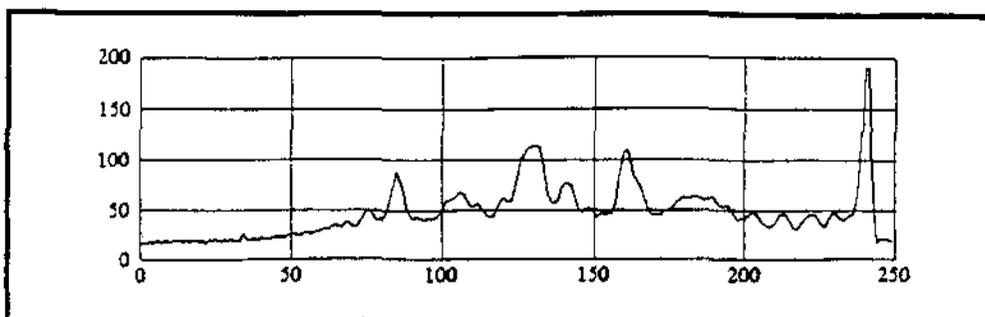


Figura 32: Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem 4c (*C. krusei*).

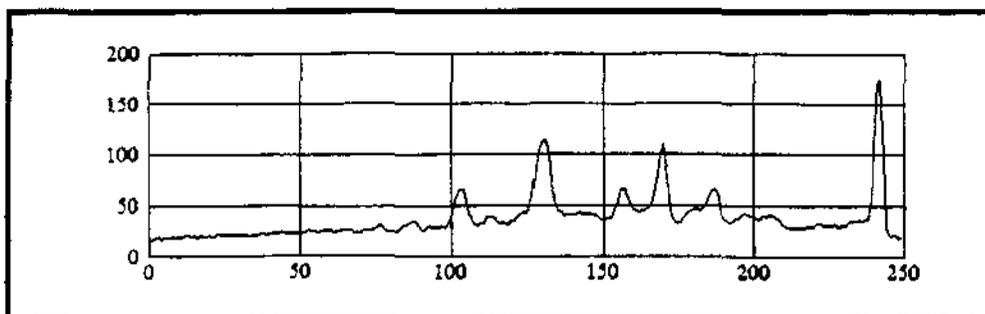


Figura 33: Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem 1M90 (*C. krusei*).

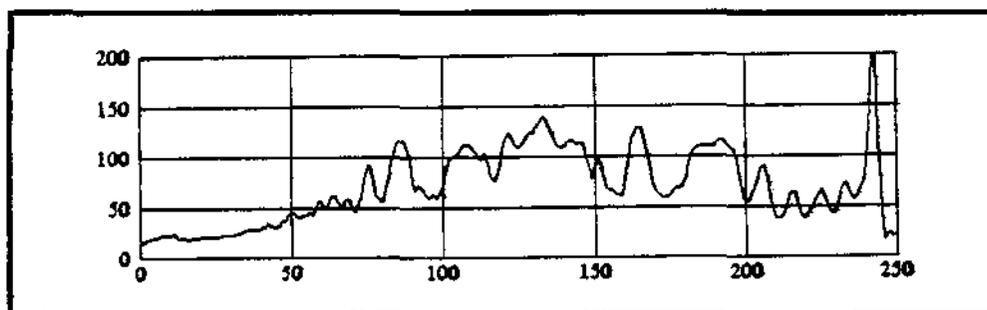


Figura 34: Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem CBS573 (*C. krusei*).

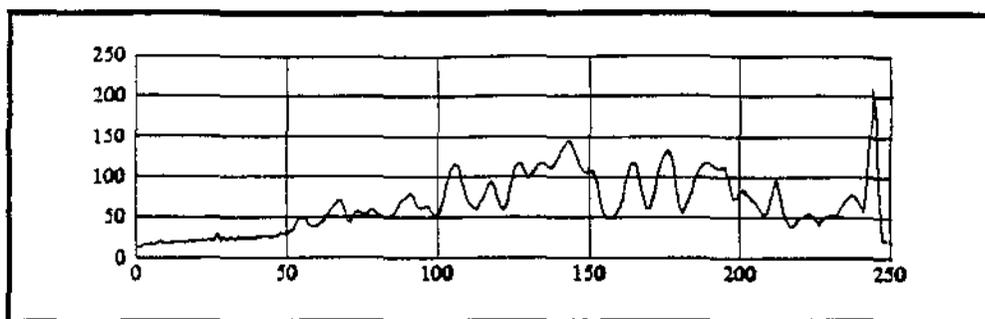


Figura 35: Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem 1b (*C. tropicalis*).

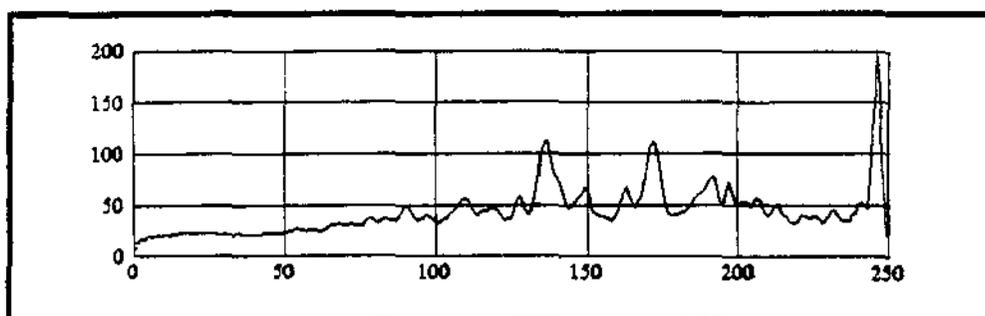


Figura 36: Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem FCF430 (*C. tropicalis*).

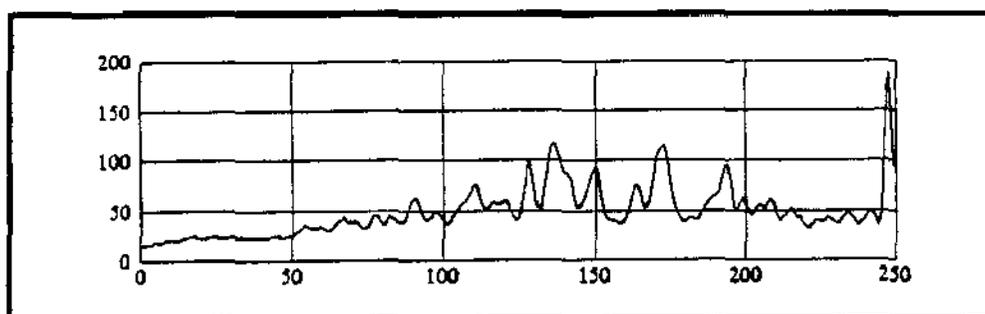


Figura 37: Densitograma do perfil eletroforético das proteínas da linhagem CBS94 (*C. tropicalis*).

Densitometria de detecção de picos:

As figuras 15, 16 e 17 representam os traçados densitográficos dos perfis eletroforéticos dos padrões de massa molecular, obtidos após a aquisição da imagem positiva dos géis de SDS-PAGE, e mostram a ocorrência de 5 picos densitográficos, representando as cinco proteínas que compõem o "kit". As figuras 18, 19 e 20 representam os traçados densitográficos dos perfis eletroforéticos das repetições com a linhagem CBS 1171, de *S. cerevisiae*.

Nas figuras 21-37 pode-se observar os traçados densitográficos dos perfis eletroforéticos dos extratos protéicos das linhagens de *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, obtidos após a aquisição da imagem positiva dos géis de SDS-PAGE.

Reprodutibilidade:

Os padrões protéicos das linhagens analisadas, nos diferentes géis, foram reprodutíveis. Extratos protéicos de *Saccharomyces cerevisiae* (CBS-1171) e padrões de massa molecular foram aplicados em todos géis fornecendo valores médios de similaridade ou coeficientes cofenéticos (S_{sm}) \geq 0,893 e 1,000, respectivamente.

Agrupamento das linhagens:

Após a densitometria óptica, as bandas eletroforéticas foram convertidas em valores numéricos (Rfs) que puderam ser analisados dois a dois na matriz de dados binários mostrada na figuras 38 e 39. O uso do

coeficiente SM (Simple Matching) possibilitou a construção de uma matriz de similaridade (figura 40) onde encontram-se disponíveis os valores de similaridade entre as linhagens analisadas. Através do método de agrupamento UPGMA obtiveram-se 7 “clusters” cujos coeficientes cofenéticos infraespecíficos mínimos (S_{sm}) foram maiores que 0,800, como segue:

Cluster I: contém as três repetições dos padrões de massa molecular, com um $S_{sm} = 1,000$.

Cluster II: contém as três repetições da linhagem CBS1171 de *Saccharomyces cerevisiae* com um $S_{sm} \geq 0,893$.

Cluster III: consiste de cinco linhagens de *Candida albicans* (F72, E37, 97a, 17b e a linhagem-tipo CBS562) agrupadas com $S_{sm} \geq 0,829$.

Cluster IV: contém três linhagens de *Candida krusei* (4c, 1M90 e a linhagem-tipo CBS572) com $S_{sm} \geq 0,868$.

Cluster V: esse cluster contém três linhagens de *Candida tropicalis* (1b, FCF430 e a linhagem-tipo CBS94) agrupadas com $S_{sm} \geq 0,922$.

Cluster VI: contém as três linhagens de *Candida guilliermondii* (FCF152, FCF405 e a linhagem-tipo CBS566) agrupadas com $S_{sm} \geq 0,858$.

Cluster VII: foram agrupadas três linhagens de *Candida parapsilosis* (21c, 7a e a linhagem-tipo CBS604) com $S_{sm} \geq 0,830$.

A figura 41 apresenta um fenograma representativo das relações protéico-eletroforéticas das dezessete linhagens utilizadas nesse estudo. Esse fenograma foi construído empregando-se o método de agrupamento UPGMA e mostra a diferenciação entre linhagens e espécies, segundo seus respectivos coeficientes cofenéticos médios.

Variações intra e intergenéricas:

Das espécies analisadas, *Candida albicans* (cluster III) foi a que apresentou maior índice de variabilidade infraespecífica com a linhagem 17b apresentando menor relação com as demais ($S_{sm} = 0,829$), porém esse "cluster" pode ser isolado dos demais com um coeficiente cofenético de 0,514.

A espécie *Candida krusei* (cluster IV) apresentou correlação com *Saccharomyces cerevisiae* (CBS1171) com S_{sm} igual a 0,684 e ambos agruparam-se com as demais com um valor máximo para S_{sm} de 0,617.

Candida guilliermondii (cluster VI) e *Candida parapsilosis* (cluster VII) obtiveram um valor S_{sm} de 0,744, e agruparam-se com *Candida tropicalis* (cluster V) com coeficiente cofenético de 0,649.

Os padrões de massa molecular correlacionaram-se com as linhagens em estudo com 0,460 de valor S_{sm} .

C. krusei			C. tropicalis			C. guilliermondii			C. parapsilosis			Rf
4c	1M90	CBS	1b	FCF	CBS	FCF	FCF	CBS	21c	7a	CBS	
		572		430	94	152	405	566			604	
0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0.21
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.23
0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0.24
1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0.26
1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.27
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0.28
1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0.30
0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0.31
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.32
0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0.33
1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.35
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.36
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.38
0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0.39
1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0.40
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.41
0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0.42
1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0.45
1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0.48
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.50
1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0.52
1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0.55
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.58
1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0.61
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.65
0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0.68
1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0.70
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.73
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0.76
1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0.78
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.81
0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0.83
1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0.85
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.88
0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0.90
1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0.92
0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0.95
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0.97
1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.98

Figura 39: Matriz de dados binários representativos dos Rfs de cada banda eletroforética.

Massa Molecular			S. cerevisiae			C. albicans				Rf	
MM1	MM2	MM3	CBS	CBS	CBS	F72	E37	97a	17b		CBS
			1171	1171	1171						562
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.21
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0.23
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.24
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.26
0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0.27
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0.28
1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0.30
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.31
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0.32
1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.33
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0.35
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.36
0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0.38
0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0.39
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0.40
1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.41
0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0.42
0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0.45
0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0.48
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0.50
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0.52
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0.55
0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0.58
0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0.61
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0.65
1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0.68
0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0.70
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0.73
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0.76
0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0.78
0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0.81
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0.83
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0.85
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0.88
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0.90
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0.92
0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0.95
0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0.97
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.98

Figura 38: Matriz de dados binários representativos dos Rfs de cada banda eletroforética.

MM1	1.000
MM2	1.000 1.000
MM3	1.000 1.000 1.000
CBS1171	0.474 0.474 0.474 1.000
CBS1171	0.474 0.474 0.474 0.895 1.000
CBS1171	0.526 0.526 0.526 0.947 0.895 1.000
F72	0.421 0.421 0.421 0.579 0.526 0.526 1.000
E37	0.421 0.421 0.421 0.579 0.526 0.526 1.000 1.000
97a	0.474 0.474 0.474 0.579 0.526 0.526 0.947 0.947 1.000
17b	0.368 0.368 0.368 0.684 0.632 0.632 0.842 0.842 0.800 1.000
CBS562	0.421 0.421 0.421 0.684 0.579 0.632 0.842 0.842 0.842 0.842 1.000
4c	0.421 0.421 0.421 0.684 0.789 0.737 0.474 0.474 0.474 0.526 0.526 1.000
1M90	0.526 0.526 0.526 0.579 0.684 0.632 0.526 0.526 0.526 0.526 0.579 0.895 1.000
CBS572	0.368 0.368 0.368 0.632 0.737 0.684 0.421 0.421 0.421 0.474 0.474 0.947 0.842 1.000
1b	0.500 0.500 0.500 0.658 0.658 0.658 0.447 0.447 0.500 0.500 0.500 0.553 0.658 0.553 1.000
FCF430	0.553 0.553 0.553 0.605 0.605 0.605 0.447 0.447 0.500 0.447 0.500 0.500 0.553 0.500 0.895 1.000
CBS94	0.500 0.500 0.500 0.658 0.658 0.658 0.447 0.447 0.500 0.500 0.500 0.553 0.605 0.553 0.947 0.947 1.000
FCF152	0.579 0.579 0.579 0.737 0.684 0.684 0.474 0.474 0.526 0.526 0.579 0.526 0.526 0.579 0.658 0.658 0.711 1.000
FCF405	0.605 0.605 0.605 0.711 0.658 0.658 0.500 0.500 0.553 0.553 0.605 0.500 0.553 0.553 0.684 0.684 0.737 0.974 1.000
CBS566	0.526 0.526 0.526 0.737 0.737 0.684 0.526 0.526 0.526 0.579 0.579 0.526 0.526 0.579 0.605 0.605 0.658 0.842 0.868 1.000
21c	0.474 0.474 0.474 0.632 0.632 0.632 0.421 0.421 0.421 0.526 0.579 0.579 0.579 0.632 0.605 0.605 0.658 0.789 0.763 0.684 1.000
7a	0.421 0.421 0.421 0.632 0.684 0.632 0.421 0.421 0.474 0.579 0.579 0.632 0.579 0.684 0.658 0.658 0.711 0.789 0.763 0.684 0.842 1.000
CBS604	0.395 0.395 0.395 0.605 0.658 0.605 0.447 0.447 0.395 0.605 0.553 0.605 0.553 0.658 0.579 0.579 0.632 0.763 0.737 0.711 0.816 0.921 1.000

Figura 40: Matriz de similaridade entre as linhagens de leveduras.

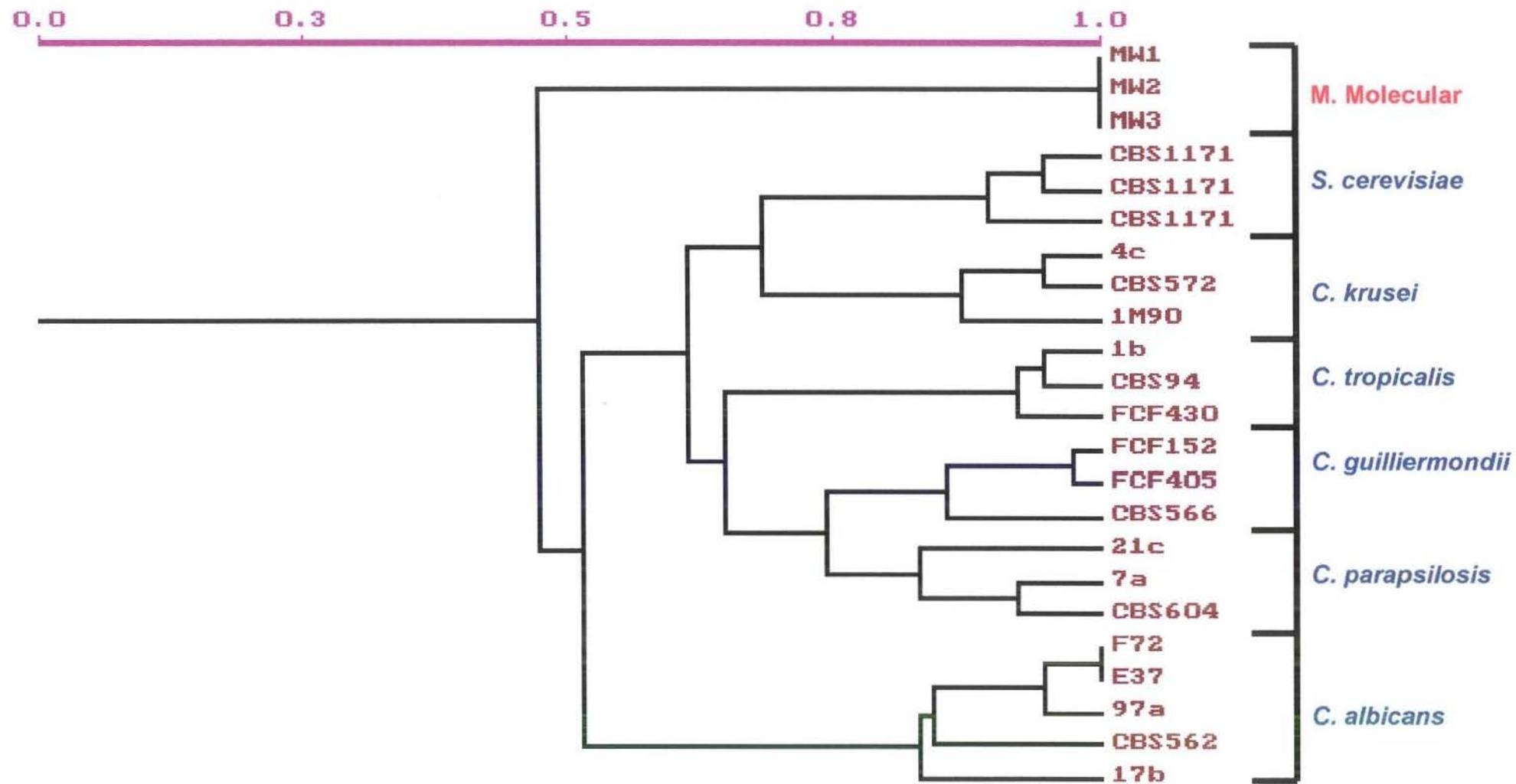


Figura 41: Fenograma de similaridade entre diferentes linhagens analisadas

DISCUSSÃO.

Alguns métodos de extração de proteínas de componentes intracelulares de leveduras têm sido empregados, caracterizando principalmente a diversidade desses organismos (HITZERMAN et al, 1983; BRUNEAU & GUINET, 1989; MOLE & LANE, 1987; TAKIZAWA et al., 1987; WRIGHT et al., 1989; SISSONS et al., 1989, WOONTNER & JAEHNING, 1990; VANCANEYT et al., 1992; ANTONSSON et al., 1994; WATANABE et al., 1994). WRIGHT et al. (1989) trabalhando com células leveduriformes, relataram a eficácia da utilização do ácido tricloroacético como extrator de proteínas intracelulares e inativador de enzimas celulares, as quais poderiam potencialmente degradar ou modificar outras proteínas durante a fase de extração, apresentando assim um perfil protéico-eletroforético alterado. Esse método, para esses autores, apresenta vantagens, tais como a revelação de uma maior quantidade de bandas no gel e facilidade de observação das mesmas, quando comparado com a metodologia empregada por HITZERMAN et al. (1983), que baseava-se na extração direta de proteínas, a partir de células de leveduras tratadas por um tampão extrator (tampão de amostra), em ebulição. Os resultados obtidos em nossas investigações, empregando-se essa mesma metodologia na extração de proteínas intracelulares podem ser observados nas figuras 1-11. Esses resultados revelaram uma menor obtenção de proteínas e não se mostraram satisfatórios para a aplicação em SDS-PAGE, para leveduras do gênero *Candida*, obtidas da cavidade bucal. Segundo SHECHTER (1973), a obtenção de dados provenientes de

eletroforese de células leveduriformes estão - ou podem estar - na dependência das condições de conservação, idade e estágio morfológico das culturas. Nesse sentido as condições de cultivo, de manutenção das amostras, somado às características químicas e estruturais das células leveduriformes utilizadas, quando comparadas, podem ser fatores decisivos para a extração dos componentes intracelulares. Esse método, quando comparado aos demais utilizados nessa pesquisa (pérolas de vidro, sonicação, criofatura celular e tampão de amostra), mostrou-se menos satisfatório e quando submetido à eletroforese não revelou a presença de um número de bandas características dessas espécies.

A extração direta de proteínas intracelulares pela ação de um tampão de amostra, à base de 2-mercaptoetanol e SDS, para fins de eletroforese, foi empregada por MOLE & LANE (1987) para a caracterização de *Escherichia coli*, e por HITZERMAN et al. (1983), para células leveduriformes. Nessa linha de investigação, BRUNEAU & GUINET (1989) desenvolveram um tampão de amostra que pretendia tornar simples e rápida a extração de proteínas intracelulares de leveduras, e que permitisse uma boa reprodutibilidade dos padrões eletroforéticos das amostras em estudo. Seguindo a metodologia empregada por esses autores, salvo para o meio de cultivo, obtivemos resultados satisfatórios tanto na quantidade de proteína extraída, quanto na visualização e quantidade de bandas eletroforéticas nos géis. Os resultados obtidos, conforme mostram as figuras 1, 4, 6, 8 e 10, mostraram índices satisfatórios de extração de proteínas, com média de extração de 81,88%. As amostras de *C. tropicalis*, entretanto, apresentaram um

número de bandas ligeiramente reduzido, quando comparadas com as outras espécies estudadas. Esses resultados, estão em concordância com os trabalhos de BRUNEAU & GUINET (1989) e sugerem ser essa metodologia, passível de utilização em estudos dessa natureza, embora devam-se procurar técnicas que propiciem a obtenção, de um maior número de bandas nos géis.

A extração de proteínas de componentes intracelulares de leveduras, por disrupção celular com pérolas de vidro é descrita por vários autores (TAKIZAWA et al., 1987; WOONTNER & JAEHNING, 1990; ANTONSSON et al., 1994; WATANABE et al., 1994). Os resultados obtidos por ANTONSSON et al. (1994), trabalhando com *Saccharomyces cerevisiae*, revelaram ser essa técnica, um recurso importante em estudos de identificação e caracterização de espécies de leveduras, com base no perfil eletroforético. Os resultados apresentados nessa pesquisa, utilizando-se método semelhante, demonstraram que o índice de extração teve média de 61,87%, indicando que essa técnica extrativa forneceu uma quantidade de proteínas inferior àquelas onde empregou-se nitrogênio líquido, sonicação ou uso direto do tampão de amostra, como métodos alternativos. Esse fato pode estar relacionado, em princípio, às diferenças estruturais entre as células leveduriformes empregadas, ou seja, espécies diferentes e talvez à uma possível heterogeneidade no contato entre as células de leveduras com as pérolas de vidro, resultando numa ruptura parcial do número de células, o que sugere a necessidade, ainda, de uma melhor padronização dessa técnica, no que diz respeito ao tipo de material a ser usado, equipamentos, temperatura

de extração, tempo de permanência em contato com as pérolas de vidro, etc., para a aplicação em SDS-PAGE.

O uso de ondas de ultrassom, foi descrito por SISSONS et al. (1989) para *Staphylococcus sp* e por VANCANNEYT et al. (1992) para leveduras. Com base na metodologia estabelecida por esses últimos autores, obtivemos resultados que revelaram perfis eletroforéticos com bandas bem definidas e nítidas, para todas as amostras estudadas. Como pode ser observado nas figuras 1, 4, 6, 8 e 10, obteve-se média de extração de 82,15%, valor esse superior àqueles obtidos nos procedimentos anteriores. Tal resultado indica que esse método - na ausência de outro mais eficiente - se apresenta como uma alternativa importante na extração de proteínas de componentes intracelulares, a serem empregadas em análises dos perfis eletroforéticos, revelados através de bandas protéicas em gel de poliacrilamida.

A extração de proteínas de componentes intracelulares de leveduras através da criofatura celular pelo nitrogênio líquido (item 3.2.5.), pode ser observada nas figuras 1, 4, 6, 8 e 10, com média de obtenção de proteínas de 88,79%. Essa técnica permitiu a obtenção de uma maior quantidade de proteínas intracelulares, dentre todas as técnicas avaliadas, além de revelar os melhores perfis eletroforéticos para essas mesmas proteínas, talvez devido ao congelamento homogêneo de toda a massa de células. O emprego do nitrogênio líquido como agente congelante foi um recurso primeiramente descrito por HWANG (1966), e posteriormente empregado por SOLTIS et al. (1980), NEALE et al. (1984) e GOMES (1995), e

revela que, além de facilitar a disrupção das células, também pode proteger as proteínas da ação de proteases, responsáveis pela degradação de muitas delas no momento da extração (comum às outras metodologias), devido as baixas temperaturas envolvidas. Tais resultados sugerem ser esse método de extração o mais indicado para a aplicação em estudos dos padrões eletroforéticos das espécies aqui estudadas.

A análise dos perfis eletroforéticos de proteínas de bactérias associada às técnicas estatísticas computadorizadas, têm permitido a identificação, classificação e até mesmo a reclassificação de inúmeras linhagens, espécies e mesmo gêneros (COSTAS et al., 1989a; COSTAS et al., 1989b; HOLMES et al., 1990; TANNER, 1986; TANNER et al., 1986). Nas pesquisas com leveduras, envolvendo essa área de atuação, esse procedimento vem sendo empregado, com sucesso semelhante (MAIDEN & TANNER, 1991; VANCANNEYT et al., 1991; VANCANNEYT et al., 1992; GOMES, 1995).

A reprodutibilidade dos perfis eletroforéticos nos diferentes géis - expressa nas figuras 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 41 - foi testada através da inclusão de padrões de massa molecular, associada da inclusão do extrato protéico de uma levedura de um gênero não correlacionado (COSTAS et al., 1989; BRUNEAU & GUINET, 1989) e forneceu coeficientes cofenéticos de agrupamento $S_{SM} \geq 0.890$ para as três repetições de *S. cerevisiae* e $S_{SM} = 1,000$ para as três repetições do padrão de massa molecular. Em uma das primeiras publicações sobre Taxonomia Numérica, SNEATH & JOHNSON (1972) relataram que a reprodutibilidade de um teste de caracterização

fenética deve ser igual ou superior à 80% ($S_{SM} \geq 0,800$), para que os resultados possam estar dentro dos limites de confiabilidade. Um critério mais rigoroso foi proposto por AVISE (1975), que alterava esses valores mínimos de reprodutibilidade para 85% ($S \geq 0,850$). Os resultados de reprodutibilidade dos diferentes géis, mostraram-se superiores aos preconizados pelos autores acima, o que vêm a justificar a confiabilidade da técnica de SDS-PAGE de proteínas intracelulares totais.

Conforme pode ser observado nas figuras 38 e 39, o polimorfismo protéico observado nas bandas com massas moleculares superiores à 97,4 kDa, demonstraram que essas proteínas são espécie-específicas, uma vez que as mesmas praticamente não se repetem nas diferentes espécies. De forma análoga pode-se observar que as proteínas de massas moleculares compreendidas entre 45 e 97,4 kDa, repetem-se na maioria das espécies, sugerindo que essas proteínas possam ser representativas do gênero ou de uma instância maior (família, ordem, etc.).

A literatura relata que outros pesquisadores já observaram o fato de determinadas regiões do eletroforegrama apresentarem bandas constantes em diferentes espécies de um mesmo gênero, e outras regiões onde a presença de bandas protéicas varia, consideravelmente, entre as espécies (SIMONSON & SHKLAIR, 1972; TANNER, 1986; BRUNEAU & GUINET, 1989; COSTAS, 1995). Segundo esses autores, essa característica poderia ser útil na caracterização de gênero e espécies, tornando a eletroforese de proteínas em suporte de poliácridamida, uma técnica que permite a discriminação de diferentes espécies, em função do polimorfismo das bandas. Nossos

resultados experimentais vem de encontro à essas considerações, ressaltando uma vez mais, a importância da necessidade da padronização dos procedimentos de extração de proteínas, que podem interferir no bandeamento eletroforético, e a inclusão de artifícios que permitam a avaliação da reprodutibilidade dos diferentes géis eletroforéticos.

Os dados obtidos a partir dos agrupamentos das linhagens de *Candida* estudadas, com base na padronização de uma metodologia de extração de proteínas intracelulares, na padronização da técnica de SDS-PAGE e na análise dos perfis eletroforéticos, demonstraram alto grau de concordância com a classificação interespecífica estabelecida por métodos convencionais, demonstrando a capacidade dessa técnica em classificar isolados de leveduras orais. Alternativamente, os isolados de cada espécie forneceram perfis reprodutíveis idênticos ou muito similares, quando comparados, indicando que esses perfis eletroforéticos obtidos por SDS-PAGE são características taxonômicas relativamente estáveis. Como pode ser observado na figura 41, o emprego de linhagens-tipo permitiu a identificação dos "clusters" em nível de espécie, já que as amostras agruparam-se com suas respectivas linhagens-tipo com coeficientes cofenéticos maiores que 0,800, valor considerado limítrofe no agrupamento intraespecífico entre amostras e linhagens-tipo (MENDONÇA-HAGLER & HAGLER, 1991; VANCANNEYT, 1992). Esse resultado, em conformidade com os critérios estabelecidos pela literatura, vêm, uma vez mais, reafirmar o valor da SDS-PAGE de proteínas totais na identificação de amostras confrontadas com linhagens-tipo.

Em relação às composições dos "clusters", a técnica de eletroforese de proteínas totais permitiu o arranjo dos isolados em grupos distintos, com coeficientes de similaridade $S_{SM} \geq 0,829$ para *C. albicans*, $S_{SM} \geq 0,830$ para *C. parapsilosis*, $S_{SM} \geq 0,858$ para *C. guilliermondii*, $S_{SM} \geq 0,922$ para *C. tropicalis*, $S_{SM} \geq 0,868$ para *C. krusei* e $S_{SM} \geq 0,893$ para *S. cerevisiae*. Todos incluindo suas respectivas linhagens-tipo. Nos textos de SNEATH (1984) e MENDONÇA-HAGLER & HAGLER (1991), os autores preconizam que os valores S_{SM} mínimos que suportam o agrupamento de amostras dentro de uma mesma espécie, não devem ser menores que 0,800, ou seja, não devem apresentar menos de 80% de similaridade fenotípica. Os resultados obtidos apresentaram-se maiores que os valores mínimos propostos pela literatura, o que vem a sugerir que a técnica de SDS-PAGE permite um efetivo agrupamento de amostras de leveduras orais, numa mesma espécie, quando for procedente. Em um estudo sistemático VANCANNEYT et al. (1991) agruparam, através de SDS-PAGE, seis linhagens de *C. albicans* com $S_{SM} \geq 0,950$, cinco linhagens de *C. tropicalis* com $S_{SM} \geq 0,880$ e oito de *C. krusei* com $S_{SM} \geq 0,920$. Os "clusters" de *C. albicans* e *C. tropicalis* relacionaram-se com $S_{SM} = 0,840$, e a *C. krusei* ligou-se a esse grupo com $S_{SM} = 0,760$. Embora os valores dos coeficientes cofenéticos encontrados por esses autores sejam mais altos que aqueles encontrados por nós, tal fato pode ser explicado uma vez que esses autores trabalharam com amostras de maior diversidade, resultando num fenograma com distâncias interespecíficas menores e coeficientes cofenéticos de valores mais reduzidos. Pode-se observar que a inclusão de organismos de outros gêneros, interfere na

construção das árvores dos fenogramas, causando um aumento nos valores de similaridade intraespecífica. Isso sugere que a similaridade fenética entre isolados de uma mesma espécie pode ser influenciada pela quantidade de amostras empregadas num estudo sistemático, e pela diversidade inerente à natureza das mesmas.

SHECHTER et al. (1972), por meio de eletroforese de proteínas ácidas e básicas não desnaturadas, e coeficiente de associação de Jaccard (S_j), que exclui as combinações negativas, obtiveram um fenograma no qual as espécies *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* combinaram-se com 40% de similaridade. A espécie *C. guilliermondii* agrupou-se a esse primeiro "cluster" com 32% de similaridade e a *C. tropicalis* foi a última a juntar-se, com aproximadamente 25% de similaridade. Com esses resultados, os autores concluíram que *C. krusei* e *C. parapsilosis* são as espécies mais aparentadas, seguidas pela *C. albicans*, *C. guilliermondii* e *C. tropicalis*. Esses resultados, aparentemente divergentes daqueles obtidos em nossos estudos, demonstraram que as mesmas proteínas quando submetidas à diferentes sistemas eletroforéticos, comportam-se de maneiras diversas, alterando parcialmente a reprodutibilidade. Isso parece claro no texto de KERSTERS (1985), o qual demonstrou que a informação taxonômica está diretamente associada à técnica eletroforética, dependente - principalmente - das condições de preparo da amostra protéica e do princípio da separação eletroforética, além de outros fatores. Sob condições não desnaturantes, ribossomos, membranas e ácidos nucléicos ligados à proteínas são normalmente removidos a partir do extrato final, por centrifugação em altas

velocidades. A migração de proteínas preparadas nessas condições não-desnaturantes se dá em função das massas moleculares e das cargas elétricas das moléculas protéicas, enquanto que a migração dessas mesmas proteínas, quando preparadas em meio desnaturante na presença de dodecilssulfato de sódio (SDS), se verifica somente com base nas diferenças entre as massas moleculares. Como a massa molecular de proteínas homólogas é uma característica mais conservada que suas cargas elétricas totais ou seus pontos isoeletricos, perfis eletroforéticos baseados na separação somente pelas massas moleculares (SDS-PAGE) devem teoricamente detectar maiores relações taxonômicas que aqueles baseados em parâmetros de carga elétrica e de massa molecular. Essa observação reforça a idéia de que experimentos de cunho sistemático, baseados na eletroforese de proteínas totais desnaturadas extraídas de leveduras, estão sujeitos a uma menor interferência de fatores intrínsecos, e são portanto, mais reprodutíveis.

A proximidade taxonômica detectada entre *C. krusei* e *S. cerevisiae* formando um grupo com $S_{SM} = 0,684$, estando isoladas das demais com $S_{SM} = 0,617$, se mostrou, aparentemente pouco esperado. Resultado similar, no entanto, foi relatado por BARNES et al. (1991), trabalhando com análise comparativa de sub-unidades ribossômicas 18S. Os autores demonstraram que essas duas leveduras, além de *Torulopsis (Candida) glabrata*, descenderiam de um ancestral comum que teria se distanciado do grupo composto pelas outras espécies de *Candida sp.* Essa origem comum pode exercer influência na expressão de proteínas citoplasmáticas que

justificariam, de tal forma, os resultados obtidos em nossas investigações. As leveduras pertencentes às espécies *S. cerevisiae* e *C. albicans* já foram, no passado, agrupadas juntas como ascomicetos, dentro da família *Saccharomycetaceae* por meio de critérios fisiológicos, e recentes análises filogenéticas das sequências 18S de rRNA suportam essa relação (HENDRIKS et al., 1989), o que vem a confirmar que os dados que obtivemos com a metodologia empregada, se apresentam como um recurso importante, em estudos dessa natureza.

A análise do perfis protéicos através de SDS-PAGE é um instrumento que favorece a compreensão das relações existentes entre leveduras orais, uma vez que esse método apresenta boa reprodutibilidade e permite a obtenção de grande número de informações úteis para a análise numérica. Ainda, permite a caracterização e classificação de isolados e se apresenta como uma técnica relativamente simples, de baixo custo operacional e de alta praticabilidade.

Os dados apresentados nessa pesquisa demonstraram, de modo geral, a importância de uma padronização da técnica de extração de proteínas intracelulares totais de linhagens de leveduras isoladas da cavidade oral, como pré-condição para aplicação em SDS-PAGE. Os dados obtidos pela análise numérica mostraram ainda que os graus de similaridade fenética existente entre as linhagens estudadas, expressos na forma de um fenograma de similaridade, são dependentes de estágios anteriores, que implicam na utilização de uma metodologia de extração de proteínas adequada e que forneça condições satisfatórias para a obtenção de um perfil protéico fidedigno

e de alta reprodutibilidade. Esses fatores em conjunto, sem dúvida, permitirão contribuir de maneira segura nos estudos de Sistemática, relações de afinidade fenética entre leveduras normalmente encontradas na cavidade bucal e biodiversidade.

Esses resultados preliminares abrem possibilidades de estudos com uma maior quantidade de linhagens isoladas de diversos ecossistemas bucais, de indivíduos estudados isoladamente ou de populações mais abrangentes, devidamente classificadas segundo suas classes sócio-econômicas, faixas etárias, etc., alvos de nossas futuras investigações.

CONCLUSÕES.

Os dados obtidos nessa pesquisa, permitiram concluir que:

1. O uso de ácido tricloroacético (TCA) como método de extração de proteínas de componentes intracelulares foi insatisfatório para a aplicação em SDS-PAGE no estudo de leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal.

2. A metodologia de extração de proteínas de componentes intracelulares de leveduras pelo uso de ultrassom, foi satisfatória para fins de aplicação em SDS-PAGE, para as amostras estudadas. Esse método, porém, quando comparado ao do nitrogênio líquido, é ainda inferior.

3. A técnica de extração de proteínas intracelulares totais baseada no congelamento pelo nitrogênio líquido se mostrou a mais adequada para aplicação em SDS-PAGE, com leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade oral de humanos.

4. A técnica de SDS-PAGE de proteínas intracelulares totais forneceu um padrão de bandeamento reprodutível, com potencial de expressão de bandas espécie-específicas e gênero-específicas, úteis na identificação e caracterização de leveduras orais.

5. Os procedimentos de SDS-PAGE aliados a análise numérica dos dados, permitiram o agrupamento dos isolados em "clusters" representativos das espécies de *Candida*, para aplicação em estudos de

identificação de isolados clínicos, levantamentos epidemiológicos, biodiversidade e na sistemática.

SUMMARY.

This work aimed to evaluate distinct methodologies for whole-cell proteins extraction of yeasts isolated from oral cavity, for application in polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Such proteins were obtained by disruption with glass beads, trichloroacetic acid action, loading sample buffer action, sonication and cellular cryofracture by liquid nitrogen and applied in polyacrylamide gel electrophoresis. The profiles were analysed by area integralization densitometry and showed that the best electrophoretic profile for proteins were obtained by cellular cryofracture and sonication. Glass beads and loading sample buffer showed less satisfactory results and the trichloroacetic acid method was not able to disclose applicable proteins bands to be used in studies of relationships of *Candida* species. The experimental results let to the observation that the species studied by using liquid nitrogen (cellular cryofracture method) showed the best electrophoretic profiles when compared to other methodologies.

At the second part of this work, the whole-cell proteins were obtained by cellular cryofracture, separated by SDS-PAGE in a discontinuous gel system and analysed by densitometry of peaks detection. The migration distance values (Rfs) were converted in binominal data that after computer-process, gave the phenetic similarities among the different strains within the same species and among the different species within the same genera. The results obtained allowed to cluster the different strains and species by their phenetic similarities, giving clusters composed

uniquely by specimen of the same species. This result suggests that the numerical analysis of characteristics based on electrophoregrams of whole-cell proteins of oral yeasts is a tool with great discriminatory potential in studies of identification, systematics and biodiversity.

APÊNDICE.

1. Linhagens empregadas.

As linhagens de *Candida* oriundas da cavidade oral foram conseguidas junto ao Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (UNESP), com o Prof. Dr. Antonio Olavo Cardoso Jorge.

Candida albicans: F.72, 97.a, 17.b, e E.37

Candida krusei: 4.c, e 1M.90

Candida tropicalis: FCF.430, e 1.b

Candida parapsilosis: 21.c, e 7.a

Candida guilliermondii: FCF.152, e FCF.405

As linhagens-tipo empregadas na investigação foram obtidas junto à Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, em Campinas, S.P.

Candida albicans: CBS.562

Candida krusei: CBS.573

Candida tropicalis: CBS.94

Candida parapsilosis: CBS.604

Candida guilliermondii: CBS.566

Saccharomyces cerevisiae: CBS.1171(neotype)

2. Meios de cultura.

2.1. Meio completo para leveduras (MCL)

peptona.....	10 g
extrato de levedura.....	10 g
glucose.....	20 g
fosfato bibásico de potássio.....	0.5 g
ágar.....	20 g
água destilada.....	qsp 1000 mL

Adicionar todos os componentes da formulação à água, em ebulição. Uma vez dissolvidos os componentes, fracionar alíquotas de 10 mL, em tubos de cultura e autoclavar a 120 °C, sob 1 atm, por 20 minutos. Inclinar os tubos enquanto o meio estiver liquefeito.

2.2. Yeast peptone dextrose (YPD)

extrato de levedura.....	10 g
peptona.....	20 g
glucose.....	20 g
água destilada.....	qsp 1000 mL

Adicionar todos os componentes da formulação à água, sob agitação. Uma vez dissolvidos os componentes, fracionar alíquotas de 50 mL, em frascos de Erlenmeyer e autoclavar a 120 °C, sob 1 atm, por 20 minutos.

3. Soluções para eletroforese.

3.1. Componentes acrílicos: acrilamida/Bis (30% T; 2,6% C)

acrilamida.....73 g

Bisacrilamida.....2 g

Adicionar os componentes a 250 mL de água destilada e agitar até completa dissolução. Filtrar e armazenar em frasco âmbar, em refrigerador.

3.2. Tampão do gel separador (running gel)

Tris.....45,75 g

Dissolver o Tris em 60 mL de água destilada previamente aquecida. Após o resfriamento, titular com HCl concentrado até pH 8,9. Completar o volume até 100 mL. Armazenar em frasco âmbar e temperatura ambiente.

3.3. Tampão do gel concentrador (stacking gel)

Tris.....7,475 g

Dissolver o Tris em 50 mL de água destilada previamente aquecida. Após o resfriamento, titular com HCl concentrado até pH 6,8. Completar o volume até 100 mL. Armazenar em frasco âmbar e temperatura ambiente.

3.4. SDS 10%

SDS.....10 g

Dissolver o SDS em qsp 100 mL de água destilada, sem muita agitação. Armazenar em temperatura ambiente.

3.5. Persulfato de amônia 10%

persulfato de amônia.....0,1 g

Dissolver o persulfato em qsp 1 mL de água destilada. Preparar no momento do uso.

3.6. Solução de ácido tricloroacético 20%

ácido tricloroacético.....20 g

Dissolver o ácido tricloroacético em qsp 100 mL de água destilada.

3.7. Tampão de tanque, pH8,9

Tris.....6,32 g

glicina.....3,99 g

SDS 10%.....10 mL

água destilada.....qsp 1000 mL

Dissolver os componentes da formulação no momento do uso.

3.8. Gel concentrador 4,5%

Tris-HCl pH 6,8.....1,5 mL

solução de acrilamida.....2,25 mL

persulfato de amônia 10%.....50 μ L

TEMED.....10 μ L

SDS 10%.....200 μ L

água destilada.....11,15 mL

Formulação suficiente para dois géis de 140x160x0,75 mm.

3.9. Gel separador

Tris-HCl pH 8,9.....3 mL

solução de acrilamida.....12.5 mL

persulfato de amônia 10%.....100 μ L

TEMED.....10 μ L

SDS 10%.....200 μ L

água destilada.....14,3 mL

Formulação suficiente para dois géis de 140x160x0,75 mm.

3.10. Solução fixadora

ácido sulfosalicílico.....12,5 g

água destilada.....qsp 100 mL

3.11. Solução descorante

metanol.....45 mL

ácido acético.....10 mL

água destilada.....45 mL

3.12. Solução corante

Coomassie blue G 250.....100 mg
solução descorante.....100 mL

3.13. Tampão extrator de BRUNEAU & GUINET (1989)

2-mercaptoetanol.....2.5 mL
SDS.....1,5 g
azul de bromofenol.....0,025 g
glicerol.....5 mL
Tris 5 mM.....qsp 100 mL

3.14. Tampão extrator de ALFENAS et al. (1991)

2-mercaptoetanol.....2 mL
SDS.....2 g
azul de bromofenol.....0,025 g
glicerol.....5 mL
Tris-HCl pH 6.8.....qsp 100 mL

3.15. Tampão extrator de VANCANNEYT et al. (1991)

2-mercaptoetanol.....5 mL
azul de bromofenol.....0,025 g
glicerol.....10 mL
Tris.....0,75g

água destilada.....qsp 100 mL

3.16. Tampão extrator de WRIGHT et al. (1989)

2-mercaptoetanol.....5 mL

SDS.....4 g

azul de bromofenol.....0,02 g

glicerol.....10 mL

Tris-HCl 100 mM.....qsp 100 mL

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ALFENAS, A. C.; *et al.* **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1991. 245p.
2. ALMEIDA, N. Q. **Influência da produção de hialuronidase, protease, condroitin-sulfatase e fosfolipase por algumas espécies de *Candida* sobre a patogenicidade de camundongos.** Tese (Livre-docência) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos-UNESP, 1991. 111p.
3. AMES, G. F. L. Resolution of bacterial proteins by polyacrylamide gel electrophoresis on slabs. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, 249: 634-644, 1974.
4. ANTONSSON, B. *et al.* Protein kinase C in yeast. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, 269: 16821-16828, 1994.
5. ASAKURA, K. *et al.* Electrophoretic karyotypes of clinically isolated yeasts *Candida albicans* and *C. glabrata*. **J. gen. Microbiol.** Cambridge, 137: 2531-2538, 1991.
6. AVISE, J. C. Systematic value of electrophoretic data. **Syst. Zool.**, Washington, 23: 465-481, 1975.

* De acordo com a Nb-6023, de agosto de 1989, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos nomes dos periódicos, bem como das respectivas cidades de origem estão em acordo com a World List of Scientific Periodicals (1900-1960), de 1965, e com o Ulrich's International Periodicals Directory (1987-1988), de 1989.

7. AYALA, F. J. **Molecular evolution**. Sinauer Associates, Sunderland, Massachussets, 1976. 315p.
8. BALLVE, R. M. L. *et al.* Methodology for starch gel electrophoresis and protocols for isozymes of 32 plant genera. **Brazil. J. Genetics**, Ribeirão Preto, 18: 491-502,1995.
9. BAPTIST, J. N.; SHAW, C. R.; MANDEL, M. Zone electrophoresis of enzymes in bacterial taxonomy. **J. Bact.**, Washington 99: 180-188, 1969.
10. BARNS, S. M. *et al.* Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives. **J. Bact.**, Washington, 173: 2250-2255, 1991.
11. BARTNICKI-GARCIA, S. Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. **A. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, 22: 87-108, 1968.
12. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analyt. Biochem.**, Orlando, 72: 248-254, 1976.
13. BRUNEAU, S. & GUINET, R. Rapid identification of medically important yeasts by electrophoretic protein patterns. **FEMS Microbiol. Lt.**, Amsterdam, 58: 329-334, 1989.
14. CANDIDO, R.C. *et al.* *Candida albicans*: biotyping by susceptibility to antimycotics. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, 27: 83-86, 1996.

15. CARLE, G. F.; FRANK, M. & ORSON, M. V. Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of electric field. **Science**, Washington, 232: 65-68, 1986.
16. CARLILE, M. J. & WATKINSON, S. C. **The fungi**. London: Academic Press Limited, 1994. 482p.
17. CASANOVA, M. & CHAFFIN, W. L. Cell wall glycoproteins of *Candida albicans* as released by different methods. **J. gen. Microbiol.**, Cambridge, 137: 1045-1051, 1991.
18. CATO, E. P. *et al.* Electrophoretic study of *Clostridium* species. **J. clin. Microbiol.**, Washington, 15: 688-702, 1982.
19. CAUGANT, D. A. & SANDVEN, P. Epidemiological analysis of *Candida albicans* strains by multilocus enzyme electrophoresis. **J. clin. Microbiol.**, Washington, 31: 215-220, 1993.
20. CORREA, B. **Avaliação da eficácia do método de fluorescência (solução de diacetato de fluoresceína e brometo de etídio) no estudo da viabilidade de amostras de leveduras não encapsuladas (*Candida albicans*) e capsuladas (*Cryptococcus neoformans*)**. Tese (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo-USP, 1984. 115p.

21. COSTAS, M. The analysis of bacterial proteins by SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *In*: HOWARD, J. & WHITCOMBE, D.M. **Methods in molecular biology: Diagnostic bacteriology protocols**. Vol.46. 1995. Totowa: Humana Press, p. 27-40.
22. COSTAS, M.; HOLMES, B. & SLOSS, L. L. Numerical analysis of electrophoretic protein patterns of *Providencia rustigianii* strains from human diarrhoea and other sources. **J. appl. Bact.**, Reading, 63: 319-328, 1987.
23. _____; _____; WOOD, A. C. & ON, S. L. W. Numerical analysis of electrophoretic patterns of *Providencia rettgeri* from human faeces, urine and other specimens. **J. appl. Bact.**, Reading, 67: 441-452, 1989a.
24. _____; SLOSS, L. L.; OWEN, R. J. & GASTON, M. A. Evaluation of numerical analysis of SDS-PAGE of protein patterns for typing *Enterobacter cloacae*. **Epidemiol. Inf.**, London, 103: 265-274, 1989b.
25. DIXON, M. & WEBB, E. C. **Enzymes**. 3ed. New York: Academic Press Limited, 1979. 1116p.
26. ESTEVES, J. A. L.; CABRITA, J. D. & NOBRE, G. N. **Micologia médica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1977. 115p.

27. EZE, J. M. O. & DUMBROFF, E. B. A comparison of the Bradford and Lowry methods for the analysis of protein in chlorophyllous tissue. **Can. J. Bot.**, Ottawa, 60: 1046-1049, 1982.
28. FARRIS, J. S. On the cophenetic correlation coefficient. **Syst. Zool.**, Washington, 18: 279-285, 1969.
29. FERRAGUT, C.; IZARD, D.; GAVINI, F.; KERSTERS, K.; DE LEY, J. & LECLERC, H. *Klebsiella trevisanii*: a new species from water and soil. **Int. J. syst. Bact.**, Washington, 33: 133-142, 1983.
30. GLYNN, A. N. & REID, J. Electrophoretic patterns of soluble fungal proteins and their possible use as taxonomic criteria in the genus *Fusarium*. **Can. J. Bot.**, Ottawa, 47: 1823-1831, 1969.
31. GOMES, L. H. **Avaliação de quatro métodos para a caracterização de leveduras**. Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"-USP, 1995. 89p.
32. GORDON, M. A.; ELLIOTT, J. C. & HAWKINS, T. W. Identification of *Candida albicans*, other *Candida* species and *Torulopsis glabrata* by means of immunofluorescence. **Sabouraudia**, Oxfordshire, 5: 323-328, 1967.
33. GREENSPAN, D. Treatment of oral candidiasis in HIV infection. **Oral Surg.**, St Louis, 78: 211-215, 1994.
34. HALL, R. Molecular approaches to taxonomy of fungi. **Bot. Rev.**, Lancaster, 35: 285-304, 1969.

35. HALL, R.; ZENTMYER, G. A. & ERWIN, D. C. Approach to taxonomy of *Phytophthora* through acrylamide gel-electrophoresis of proteins. **Phytopathology**, Lancaster, 59: 770-774, 1969.
36. HARRIS, H. **Isoenzymes**. vol. 4. New York: Academic Press Limited, 1975. 131p.
37. HARRIS, H. & HOPKINSON, D. A. **Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics**. Amsterdam: North-Holland Publ. Co., 1976. 215p.
38. HASENCLEVER, H. F. & MITCHELL, W. O. Antigenic studies of *Candida*: Antigenic relation of *Candida albicans* Group A and Group B to *Candida stellatoidea* and *Candida tropicalis*. **J. Bact.**, Washington, 82: 547-577, 1961.
39. HENDRICKS, L. *et al.* The nucleotide sequence of the small ribosomal subunit RNA of the yeast *Candida albicans* and the evolutionary position of the fungi among the eukaryotes. **System. appl. Microbiol.**, Stuttgart 12: 223-229, 1989.
40. HITZERMAN, R. A. *et al.* Expression of hepatitis B surface antigen in yeast. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, 11: 2745-2763, 1983.
41. HÖFLING, J. F. *et al.* Avaliação de diferentes metodologias para extração de proteínas intracelulares de leveduras do gênero *Candida*. **Rev. Ciênc. Tecnol.**, Piracicaba, (*in press*), 1997.

42. HOLMES, B.; COSTAS, M. & SLOSS, L. L. Numerical analysis of SDS-PAGE protein patterns of *Serratia marcescens*: a comparison with other typing methods. **Epidemiol. Inf.**, London, 105: 107-117, 1990.
43. HWANG, S. W. Long-term preservation of fungus cultures with liquid nitrogen refrigeration. **Appl. Microbiol.**, Baltimore, 14: 784-788, 1966.
44. IZARD, D. *et al.* *Klebsiella terrigena*: a new species from soil and water. **Int. J. syst. Bact.**, Washington, 31: 116-127, 1981.
45. JOLY, S. **Levantamento de leveduras ocorridas em frutos maduros: sua posição sistemática.** Tese (Doutoramento) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"-USP, 1954. 154p.
46. JONES, M. G. & NOBLE, W. C. An electrophoretic study of enzymes as a tool in the taxonomy of the dermatophytes. **J. gen. Microbiol.**, Cambridge, 120: 1101-1107, 1982.
47. KEMP, G. & SOLOTOROVSKY, L. Localization of antigens in mechanically disrupted cells of certain species of the genera *Candida* and *Torulopsis*. **J. Immun.**, Baltimore, 93: 305-314, 1963.
48. KERSTERS, K. Numerical methods in the classification of bacteria by protein electrophoresis. *In*: GOODFELLOW, M.; JONES, D. & PRIEST, F. G. **Computer-assisted bacterial systematics.** London: Academic Press Limited, 1985. p. 337-368.

49. KERSTERS, K. & DE LEY, J. Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic proteins patterns. **J. gen. Microbiol.**, Cambridge, 87: 333-342, 1975.
50. LACAZ, C. S. *et al.* Ecologia das leveduras do gênero *Candida*. In: LACAZ, C. S. **Candidíases**. São Paulo: E.P.U. – Edusp, 1980. p. 47-54.
51. LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. **Nature**, London, 227: 680-685, 1970.
52. LEE, W.; BURNIE, J. & MATTHEWS, R. Fingerprinting *Candida albicans*. **J. Immun. Meth.**, Amsterdam, 93: 177-182, 1986.
53. LEHMANN, P. F.; HSIAO, C. B. & SALKIN, I. F. Proteins and electrophoresis profiles of selected *Candida* species. **J. clin. Microbiol.**, Washington, 27:400-404, 1989a.
54. _____ *et al.* Isoenzyme biotypes of *Candida* species. **J. clin. Microbiol.**, Washington, 27: 2514-2521, 1989b.
55. LENNETTE, E. H. *et al.* **Manual de microbiologia clínica**. 4 ed. Buenos Aires: Méd. Panamericana, 1987. 228p.
56. LEWONTIN, R. C. **The genetic basis of evolutionary change**. Columbia University Press, New York, 1974.

57. LYNCH, D. P. Oral candidiasis. History, classification, and clinical presentation. **Oral Surg.**, St. Louis, 78: 189-193, 1994.
58. MACDONELL, M. T. & COLWELL, R. R. The contribution of numerical taxonomy to the systematics of Gram-negative bacteria. *In*: GOODFELLOW, M.; JONES, D. & PRIEST, F. G. **Computer-assisted bacterial systematics**. London: Academic Press Limited, 1985, p. 107-136.
59. MAGEE, P. T.; RIKKENINK, E. H. A. & MAGEE, B. B. Methods for the genetics and molecular biology of *Candida albicans*. **Analyt. Biochem.**, Orlando, 175: 361-372, 1988.
60. MAIDEN, M. F. J. & TANNER, A. Identification of oral yeasts by polyacrylamide gel electrophoresis. **Oral microbiol. Immun.**, Copenhagen, 6: 187-190, 1991.
61. MARTY, L. T.; O'MALLEY, D. M. & GURIES, R. P. **A manual for starch gel electrophoresis: New wave edition**. Staff Paper Series # 20. Madison: College of Agriculture and Life Sciences, University of Wisconsin, 1984. 25p.
62. MASON, M. M.; LASKER, B. A. & RIGGSBY, W. B. Molecular probe for identification of medically important *Candida* species and *Torulopsis glabrata*. **J. clin. Microbiol.**, Washington, 25: 563-566, 1987.

63. MENDONÇA-HAGLER, L. C. M. & HAGLER, A. N. Taxonomia de microrganismos. *In*: ROITMAN, I.; TRAVASSOS, C. R. & AZEVEDO, J. L. **Tratado de microbiologia**. vol 2. São Paulo: Ed. Manole Ltda, 1991, p. 107-122.
64. MOLE, S. E. & LANE, D. P. Production of monoclonal antibodies against fusion proteins produced in *E. coli*. *In*: GLOVER, D. M. **DNA cloning III: A practical approach**. Oxford: IRL Press. 1987, p. 113-139.
65. MONOD, M. *et al.* The identification of pathogenic yeast strains by electrophoretic analysis of their chromosomes. **J. Med. Microbiol.**, Harlow, 32: 123-129, 1990.
66. NEALE, D. B.; WEBER, J. C. & ADAMS, W. T. Inheritance of needle tissue isoenzymes in Douglas-fir. **Can. J. Genet. Cytol.**, Ottawa, 26: 459-468, 1984.
67. NEDER, R. N. **Microbiologia. Manual de laboratório**. São Paulo: Livraria Nobel, 1992. 138p.
68. NEI, M. **Molecular polymorfism and evolution**. Amsterdam: North-Holland Publ. Co. 1975. 318p.
69. NEVO, E.; BEILES, A. & BEN-SHLOMO, R. The evolutionary significance of genetic diversity: Ecologic, demographic and life history correlates. **Lect. Notes Biomath.** 53: 13-213, 1980.

70. NICKERSON, W. J. Symposium on biochemical bases of morphogenesis in fungi IV. Molecular bases of form in yeasts. **Bact. Rev.**, Baltimore, 27: 305-324, 1963.
71. O'MALLEY, D.; WHEELER, N. C. & GURIES, R. P. **A manual for starch gel electrophoresis.** Staff Paper Series # 11. Madison: College of Agriculture and Life Sciences, University of Wisconsin, 1980. 20p.
72. ODDS, F. C. **Candida and candidosis.** Baltimore: Baltimore Univ. Press, 1988. 352p.
73. _____ & TRUJILLO-GONZALES, A. Acid phosphatase levels in the genus *Candida* and their application to the taxonomy and identification of pathogenic *Candida* species. **Sabouraudia**, Oxfordshire, 12: 287-294, 1974.
74. OLSEN, I. Chemotaxonomy of yeasts. **Acta odont. scand.**, Oslo, 48: 19-25, 1990.
75. OWEN, R. J. & JACKMAN, P. J. H. The similarities between *Pseudomonas paucimobilis* and allied bacteria derived from analysis of deoxyribonucleic acids and electrophoretic protein patterns. **J. gen. Microbiol.**, Cambridge, 128: 2945-2954, 1982.

76. PALOMARI, D. M. **Caracterização de amostras de espécies de *Streptococcus* orais. Eletroforese em gel de poliacrilamida de proteínas intracelulares.** Tese (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, 1992. 90p.
77. PONTON, J. & JONES, J. M. Analysis of cell wall extracts of *Candida albicans* by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and western blot techniques. **Infect. Immun.**, Washington, 53: 565-572, 1986.
78. _____ *et al.* Characterization of *Candida albicans* cell wall antigens with monoclonal antibodies. **Infect. Immun.**, Washington, 61: 4842-4847, 1993.
79. PRAKASH, S.; LEWONTIN, R. C. & HUBBY, J. L. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. IV patterns of genetic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudobscura*. **Genetics**, Princetown, 61: 841-858, 1969.
80. RATAZZI, M. C.; SCANDALIOS, J. G. & WHITT, G. S. **Isozymes: Current topics in biology and medical research.** Vol.10. Genetic and evolution. New York: Alan R. Liss Inc., 1983. 89p.

81. ROCHELLE, S. L. A. **Influência do meio de cultura na extração de proteínas intracelulares de leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade oral para aplicação em PAGE-SDS.** Tese (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, 1996. 152p.
82. ROSA, E. A. R. *et al.* A survey of methodologies for proteins extraction from intracellular components of *Candida* cells. **J. dent. Res.**, Washington, 76 (abstracts): 978, 1997.
83. SAXENA, A.; HAMMER, C. F. & CIHLAR, R. L. Analysis of mannans of two relatively avirulent mutant strains of *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, Washington, 57: 413-419, 1989.
84. SCHERER, S. & STEVENS, D. A. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. **J. clin. Microbiol.**, Washington, 25: 675-679, 1987.
85. SCHWARTZ, D. C. & CANTOR, C. R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, Cambridge, 37: 67-75, 1984.
86. SELANDER, R. K. & WHITTAM, T. S. Protein polymorphism and the genetic structure of populations. In: NEI, M. & KOEHN, R. K. **Evolution of genes and proteins.** Sinauer Associates, Sunderland, Massachussets, 1983.

87. SELANDER, R. K. *et al.* Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **Appl. Environm. Microbiol.**, Washington, 51: 873-884, 1986.
88. SHAW, C. R. & PRASAD, R. Starch gel electrophoresis of enzymes - A compilation of recipes. **Biochem. Genetics**, New York, 4: 297-320, 1969.
89. SHECHTER, Y. Symposium on the use of electrophoresis in the taxonomy of algae and fungi. I V. Electrophoresis and taxonomy of medically important fungi. **Bull. Torrey bot. Club**, New York, 100: 277-287, 1973.
90. _____.; LANDAU, J. W. & DABROWA, N. Comparative electrophoresis and numeral taxonomy of some *Candida* species. **Mycologia**, Lancaster, 64: 841-853, 1972.
91. _____. *et al.* Comparative disc electrophoretic studies of proteins from dermatophytes. **Sabouraudia**, Oxfordshire, 5: 144-149, 1966.
92. SHEN, H. D. *et al.* Differential identification of *Candida* species and other yeasts by analysis of [³⁵S] - metionine labeled polypeptide profiles. **Analyt. Biochem.**, Orlando, 175: 548-551, 1988.
93. SIMONSON, L. G. & SHKLAIR, I. L. Gel electrophoresis of intracellular components of some cariogenic streptococci. **J. dent. Res.**, Washington, 51: 488-491, 1972.

94. SISSONS, C. H.; HANCOCK, E. M.; PERINPANAYAGAM, H. E. R. & CUTRESS, T. W. A procedure for urease and protein extraction from staphylococci. **J. appl. Bact.**, Reading, 67: 433-440, 1989.
95. SKINNER, C. E. & FLETCHER, D. W. A review of the genus *Candida*. **Bact. Rev.**, Washington, 24:397-416, 1960.
96. SKINNER, F. A.; PASSMORE, S. M. & DAVENPORT, R. R. **Biology and activities of yeasts**. The Society for Applied Bacteriology, Symposium series n° 9. London: Academic Press Limited, 1980. 460p.
97. SNEATH, P. H. A. Bacterial classification II - Numerical Taxonomy. *In*: KRIEG, N. R. & HOLT, J. G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**, vol I. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984, p. 5-7.
98. _____ & JOHNSON, R. The influence on numerical taxonomic similarities of errors in microbiological tests. **J. gen. Microbiol.**, Cambridge, 72: 377-392, 1972.
99. SNEATH, P. H. A. & SOKAL, R. Q. **Numerical taxonomy**. San Francisco: Freeman, 1973. 482p.
100. SOLTIS, D. E.; HAUFLER, C. H. & GASTONY, G. J. Detecting enzyme variation in the fern genus *Bommeria* : an analysis of methodology. **Syst. Bot.**, New York, 5: 30-38, 1980.

101. SPENCER, J. F. T. & GORIN, P. A. J. Systematics of the genus *Candida* Berkhout: proton magnetic resonance spectras of the mannans and mannose-containing polysaccharides as an aid in classification. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, 35: 33-44, 1969.
102. STUDIER, F. W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slabs gels. **J. molec. Biol.**, London, 79: 237-248, 1973.
103. TAKIZAWA, N. *et al.* DNA polimerase A and its stimulative factor of baker's yeast: Purification and characterization. **J. Biochem.**, Tokyo, 102: 741-753, 1987.
104. TANNER, A. C. R. Characterization of *Wolinnella* spp, *Campylobacter concisus*, *Bacterioides gracilis*, and *Eikenella corrodens* by polyacrylamide gel electrophoresis. **J. clin. Microbiol.**, Washington, 24: 562-565, 1986.
105. TANNER, A. C. R. *et al.* *Bacteroides forsythus* sp nov., a slow-growing, fusiform *Bacteroides* sp from the human oral cavity. **Int. J. syst. Bact.**, Washington, 36: 213-221, 1986.
106. TASCHDJAN, C. L. *et al.* Serodiagnosis of *Candida* infections. **Am. J. Clin. Path.**, Baltimore, 57: 195-205, 1972.
107. TSUCHIYA, T. *et al.* Studies on the classification of the genus *Candida*. **Japan. J. exp. Med.**, Tokyo, 25: 75-83, 1955.

108. VALLEJOS, E. Enzyme activity staining. *In*: TANKSLEY, S. D. & ORTON, T. J. **Isozymes in plant and breeding**. Part A. Amsterdam: Elsevier Science Publ. , 1983. p. 469-515.
109. VANCANNEYT, M. *et al.* Differentiation of yeast species based on electrophoretic whole-cell protein patterns. **Syst. appl. Microbiol.**, Stuttgart, 14: 23-32, 1991.
110. VANCANNEYT, M. *et al.* The application of whole-cell protein electrophoresis for the classification and identification of basidiomycetous yeast species. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, 61: 69-78, 1992.
111. VAZQUEZ, J. A. *et al.* Comparison of restriction enzyme analyses and pulsed field gradient gel electrophoresis as typing systems for *Candida albicans*. **J. clin. Microbiol.**, Washington, 29: 962-967, 1991.
112. WALTERS, M. G. & BLOBEL, G. Secretory protein translocation in a yeast cell-free system can occur posttranslationally and requires ATP hydrolysis. **J. Cell. Biol.**, New York, 102: 1543-1550, 1986.
113. WATANABE, M.; CHEN, C. Y. & LEVIN, D. E. *Saccharomyces cerevisiae* PKC 1 encodes a protein kinase C (PKC) homolog with a substrate specificity similar to that of mammalian PKC. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, 269: 16829-16836, 1994.

114. WEBERLING, F. & SCHWANTES, H. O. **Taxonomia vegetal**. São Paulo: E.P.U./EDUSP, 1986. 162p.
115. WHITTAKER, R. H. New concepts of kingdoms of organisms. **Science**, Washington, 163: 150-160, 1989.
116. WOONTNER, M. & JAEHNING, J. A. Accurate initiation by RNA polimerase II in a whole cell extract from *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, 265: 8979-8982, 1990.
117. WRIGHT, A. P. H.; BRUNS, M. & HARTLEY, B. S. Extraction and rapid inactivation of proteins from *Saccharomyces cerevisiae* by trichloroacetic acid precipitation. **Yeast**, Sussex, 5 : 51-53, 1989.
118. YAMAZAKY, M. & KOMAGATA, K. Taxonomic significance of electrophoretic comparison of enzymes in the genera *Rhodotorula* and *Rhodospiridium*. **Int. J. syst. Bact.**, Washington, 31: 361-381, 1981.