

***Malassezia* sp. (CRYPTOCOCCACEAE): IDENTIFICAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS CONSERVADAS NA COLEÇÃO DE FUNGOS DE INTERESSE MÉDICO DO INPA DO ANO DE 2005**

Antônio Carlos Pereira de OLIVEIRA¹; Ana Cláudia Alves CORTEZ²; José Augusto Almendros de OLIVEIRA³

¹Bolsista PIBIC/INPA; ²Orientador CPCS /INPA; ³Co-orientador CPCS/ INPA

1. Introdução

As leveduras *Malassezia*, são agentes fúngicos associados a quadros patológicos em infecções, como a Pitiríase versicolor observada com elevada incidência na região Amazônica, ou ainda a outras dermatoses (Guého *et al.*, 1998). Segundo Aspiroz *et al.*, (1997), este gênero apresenta a seguinte classificação taxonômica: Reino *Fungi*, Filo *Deuteromycotina*, Classe *Blastomycetes*, Ordem *Cryptococcales*, Família *Cryptococcaceae*, Gênero *Malassezia*. Embora as espécies desse gênero sejam semelhantes entre si, elas podem ser diferenciadas por meio de critérios morfofisiológicos (Gupta, 2000). A importância de identificar essas leveduras vem aumentando, a partir do conhecimento de sua alta patogenicidade em pacientes com algum tipo de imunodepressão (Zaitz *et al.*, 2000). Atualmente, existem onze espécies descritas, *M. pachydermatis*, *M. furfur*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. sympodialis*, *M. slooffiae*, *M. restricta*, *M. japônica*, *M. nana*, *M. yamatoensis* e *M. dermatis*. Todas essas espécies são lipo-dependentes, com exceção de *M. pachydermatis*. Os fungos ao contrário das bactérias são seres que apresentam uma velocidade de crescimento muito lento nos diversos meios de cultivo e muitas vezes a contaminação por bactérias ou por outros fungos prejudica a conservação das colônias. As técnicas existentes para a manutenção de fungos em micotecas, geralmente são trabalhosas, dispendiosas e muitas vezes ineficientes. O desenvolvimento de novas formas de preservação de fungos por períodos prolongados se faz necessário para a realização de estudos prospectivos envolvendo sua biologia e epidemiologia. Métodos ideais de conservação de leveduras objetivam manter a sobrevivência das células, bem como a pureza da cultura e a estabilidade de suas características (Mariano, 2006).

O objetivo desse trabalho foi identificar e criopreservar as amostras mantidas na Coleção de Fungos de Interesse Médico do INPA coletadas em 2005 e verificar a viabilidade das mesmas, assim como a viabilidade das amostras do ano de 2004, criopreservadas em 2007.

2. Material e métodos

Foram selecionadas 59 amostras da Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do INPA obtidas durante o ano de 2005 e inoculadas em meio de cultivo sólido contendo bile e óleo de oliva, em MDixon, além de meio sólido acrescido de cloranfenicol e cicloheximida. Este último permite o desenvolvimento de *M. pachydermatis*, por não apresentar na sua constituição qualquer fonte de lipídios. Testes físico-químicos foram realizados, como prova da catalase, provas de assimilação de tweens em diversas concentrações, e tintoriais como a coloração de Gram. Para a criopreservação foi realizada inoculação em meio de cultivo sólido contendo bile e óleo de oliva, com a finalidade de promover a purificação das colônias. Posteriormente, foram levadas aos microtubos para serem congeladas a -70°C. A viabilidade das amostras criopreservadas de 2004 foi testada 12 e 24 meses após congelamento, e as amostras de 2005, em 3, 6 e 9 meses de congelamento.

3. Resultados e discussão

Das 59 amostras selecionadas foram identificadas: *M. pachydermatis* 25(43.37%), *M. slooffiae* 13(22.03%), *M. globosa* 7(11.86%), *M. furfur* 5(8.47%), *M. obtusa* 5(8.47%) e *M. sympodialis* 4(6.70%). Observou-se a predominância de *M. pachydermatis*, única espécie não lipo-dependente, ou seja, não necessita de ácidos graxos de cadeias longas para se desenvolver, condição necessária para qualquer uma das outras espécies. Das espécies lipodependentes, *M. slooffiae* e *M. globosa* apresentaram maior incidência conforme Figura 1. Em estudo realizado com amostras do ano de 2004, Oliveira *et al.* (2008) observaram proporções semelhantes (*M. pachydermatis* 35%, *M. slooffiae* 18% e *M. globosa* 12%). Souza *et al.* (2007) verificou *M. furfur* com maior predominância (52%), *M. pachydermatis* (25%) *M. slooffiae* (10%). Pode-se observar nos anos de 2004 e 2005 proporcionalidades semelhantes, entre as espécies mais incidentes. Nesse estudo, *M. furfur* apresentou incidência de 8,47%, enquanto em 2004 foram verificados 19%. Essa foi a única espécie a apresentar variância em relação a outros trabalhos.

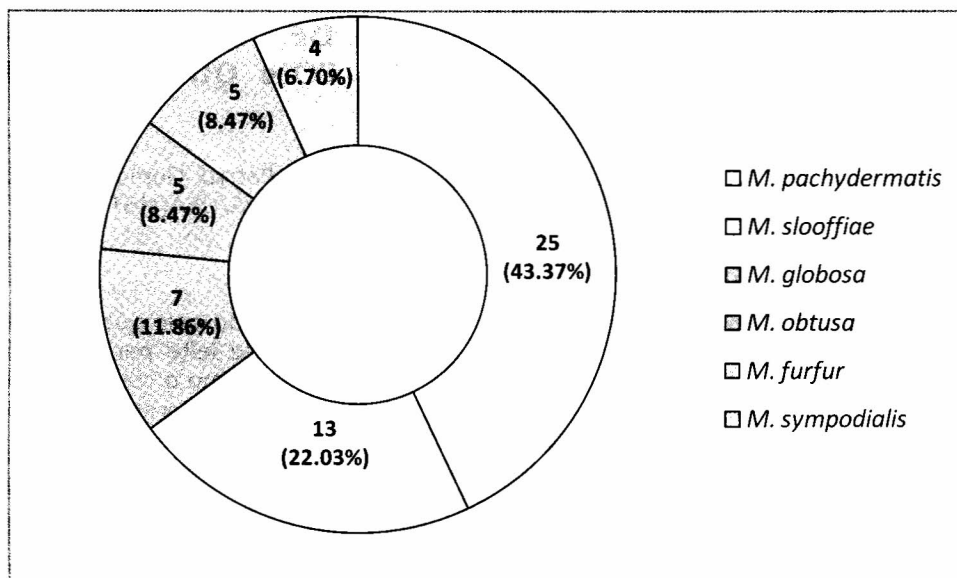


Figura 1: Espécies de *Malassezia* as coleção de Microrganismos de Interesse Médico do INPA identificadas no ano de 2005.

A criopreservação sem a utilização de substância criopreservativa se mostrou eficaz com todas as amostras utilizadas nesse trabalho. No trabalho realizado por Oliveira *et al* (2008) as amostras também se mostraram viáveis após 9 meses de congeladas.

4. Conclusão

A identificação de *Malassezia* em nível de espécie, trará a possibilidade de desenvolvimento de novos tratamentos para o combate específico de determinada espécie, uma vez que em pacientes imunocomprometidos, O agente se mostra resistente a determinadas drogas antifúngicas. A criopreservação sem a utilização de substância criopreservativa se constituiu em modificação de técnica de conservação de microrganismo por tempo prolongado, já existente, e que se apresentou viável sua aplicabilidade por ter permitido a recuperação de todas as amostras testadas.

5. Referências

- Aspiroz, M.C.; Moreno, L.A. e Rubio, M.C. 1997. Taxonomy of *Malassezia furfur*; state of *Revista Iberoamericana de Micologia*. 14(4): p. 147-9;
- Guého, E.; Boekhout, T.; Ashbee, H.R.; Guillot, J.; Van Belkum, A.; Faergmann, J.; 1998 The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. *Medical Mycology*, 36(1):220-229;
- Gupta, A.K.; Kohli, Y.; e Summerbell, R.C. 2000. Molecular differentiation of seven *Malassezia* species. *Journal Clinic of Microbiology*., 38(5):1869 – 875;
- Mariano, P.L.S. 2006. *Diferentes Processos de armazenamento de leveduras: estudos sobre a variabilidade fenotípica e genotípica*. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, Campinas, São Paulo. 119pp.
- Oliveira, A.C.P; Cortez, A.C.A; Oliveira, J.A.A. 2008. Identificação e Criopreservação das espécies de *Malassezia* spp. mantidas na coleção de microrganismos de interesse médico do INPA. *In XVII Jornada de Iniciação Científica*. 203-4;
- Souza, V.C; Oliveira, J.A.A; Cortez, A.C.A. 2007. Identificação das espécies de *Malassezia* spp. mantidas na coleção de microrganismos de Interesse Médico – INPA. *In XVI Jornada de Iniciação Científica*. 359-60
- Zaitz, C; Ligia, R.B.R; Souza, V.M. 2000. Dermatoses associadas às leveduras do gênero *Malassezia*. *Anais brasileiros de dermatologia*. 75(2) 75-6.