

MALASSEZIA spp. (CRYPTOCOCCACEAE) IDENTIFICAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS CONSERVADAS NA COLEÇÃO DE FUNGOS DE INTERESSE MÉDICO DO INPA DO ANO DE 2006

Antônio Carlos Pereira de Oliveira¹; José Augusto Almendros de Oliveira²; Ana Claudia Alves Cortez³

¹Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; ²Orientador CPCS /INPA; ³Colaborador Bolsista PCI/MCT/INPA

1. Introdução

O gênero *Malassezia* compreende fungos leveduriformes lipofílicos e lipodependentes que sofreram mudanças em sua classificação taxonômica, com a introdução de novas espécies: *M. globosa*, *M. obtusa*, e *M. restricta*, além das espécies *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis* e *M. slooffiae* (Scholttfeldt *et al.*, 2002). Essas mudanças foram motivo para que os estudiosos deste gênero reavaliassem os procedimentos utilizados para sua identificação como suas características morfológicas, seu desenvolvimento em relação às temperaturas e necessidades nutricionais (Mayser *et al.*, 1997). A importância de todas as leveduras consideradas parte da biota humana, vem aumentando desde que elas passaram a ser reconhecidas como importantes patógenos em pacientes com algum tipo de imunodepressão. Com o aumento da frequência de infecções causadas por leveduras, estes organismos tornaram-se alvo de pesquisas com diversas finalidades, sendo mantidos e manipulados em laboratórios científicos (Kawamura *et al.*, 1995).

Conseqüentemente houve a necessidade de se aplicar métodos de manutenção destas leveduras visando sua disponibilidade em condições adequadas para vários fins científicos, por períodos indefinidos e prolongados (Hawksworth, 1985). Como são organismos unicelulares, as leveduras podem ser manipuladas em laboratórios de forma semelhante às bactérias, mas com exigências nutricionais e ambientais mais simples (Hoffmann, 1999). Algumas técnicas têm sido descritas promovendo a sobrevivência das células bem como a pureza das culturas e a estabilidade de suas características. O método de armazenamento por criopreservação foi o escolhido para aplicação no presente estudo objetivando identificar e verificar a viabilidade das amostras conservadas na Coleção de Fungos de Interesse Médico do INPA.

2. Material e Métodos **Criopreservação**

Foram selecionadas 80 amostras conservadas na Coleção de Fungos de Interesse Médico do INPA do ano de 2006. As mesmas foram repicadas em meio de cultivo agar Saboraud bile de boi e óleo de oliva, para a descontaminação e foram repicadas em microtubos contendo miçangas e meio de cultivo líquido para a criopreservação. Os microtubos foram armazenados em caixas de papelão específicas e acondicionadas em freezer a -70° C e de lá foram retirados duas vezes ao ano para verificação da viabilidade do método (Oliveira *et al.*, 2006).

Identificação das amostras

As amostras purificadas foram repicadas em meio de cultivo MDixon e após o crescimento foram repicadas em agar Saboraud dextrose para a identificação da única espécie lipofílica não-lipodependente (*Malassezia pachydermatis*). Em seguida foi realizado o teste da catalase para identificar mais um representante do gênero sendo o único a apresentar reação negativa a catalase (*Malassezia restricta*). O terceiro teste bioquímico realizado foi a prova de assimilação dos tweens em diferentes concentrações. Após o preparo de 5mL de suspensão fungica foi retirado 1 mL desta suspensão e colocada em placa de petri e homogeneizado junto a 9 mL de agar Saboraud dextrose após a solidificação desta placa foram furados cinco poços, onde foram gotejados 5µL de tween 20, 40, 60 e 80 nas concentrações de 0.1%, 0.5%, 1%, 5% e 10%. As placas foram incubadas por sete dias em estufa a 32° C e devido a hidrosolubilidade deste reagente, foi observado o surgimento de um halo em torno de cada poço, o que nos permitiu a visualização da assimilação ou não dos tweens pelas amostras (Guillot *et al.*, 1998). O último teste realizado foi a coloração de Gram, para a visualização do tipo de brotamento de *M. obtusa* e *M. globosa*, que não nos permitiu a diferenciação pelo teste de assimilação aos tweens devido ambas apresentarem semelhante assimilação a esse reagente (Guého *et al.*, 1996).

3. Resultados e Discussão

Foram identificadas 53 amostras de *Malassezia pachydermatis*, 6 *M. furfur*, 11 *M. slooffiae* 5 *M. globosa*, 3 *M. obtusa*, 1 *M. restricta* e 2 *M. sympodialis*. De um total de 80 amostras selecionadas podemos observar que houve predominância da espécie *M. pachydermatis* (66%) identificadas seguida de *M. slooffiae* (8%) e *M. furfur* (3%).

Em trabalho realizado por Oliveira *et al* (2008), foi observado proporções semelhantes de *M. pachydermatis* com (39), *M. furfur* que neste trabalho aparece como a terceira espécie mais identificada, no trabalho de 2008 aparece em segundo lugar com 21 amostras. Em relação a *M. slooffiae* foi observado 11 amostras enquanto em 2008, 20 foram identificadas.

Podemos observar que houve inversão entre as duas espécies mais identificadas, *M. furfur* e *M. slooffiae* contudo *Malassezia pachydermatis* permanece como a espécie mais identificada em ambos os trabalhos. No estudo realizado pelos mesmos autores com amostras do ano de 2005, também foi identificado que *M. pachydermatis* ainda é a espécie mais prevalentes, seguida por *M. slooffiae* e *M. globosa*.

Em trabalho realizado por Moreira *et al* (2008), em alunos de uma escola de ensino fundamental da cidade de Manaus, observou-se que a micose superficial pitiríase versicolor tendo como agente causador a *Malassezia* spp., foi a mais diagnosticada. Evidenciando que esse agente é freqüente em regiões tropicais, de clima quente e úmido

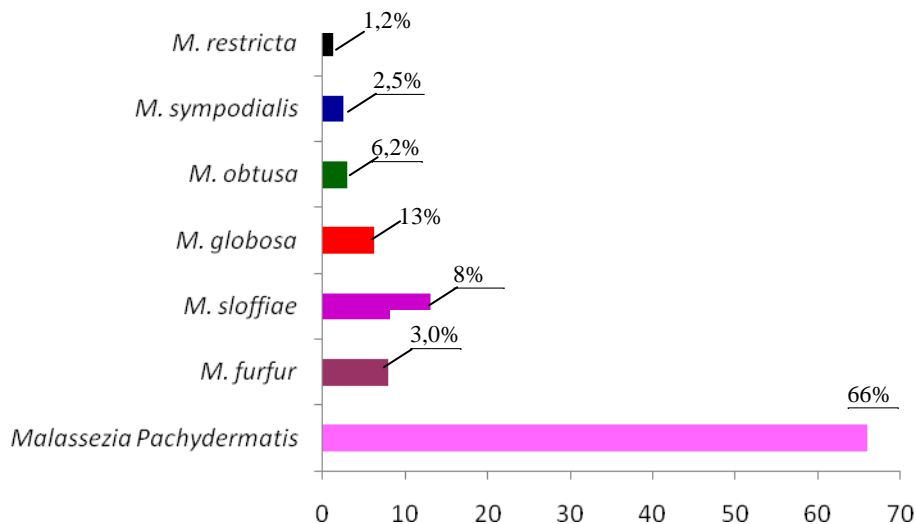


Gráfico I: Identificação de amostras de *Malassezia*

Em relação a criopreservação sem a utilização de substâncias criopreservativas obteve-se 100% de viabilidades entre as amostras do ano de 2004, 2005 e 2006. Na bibliografia existente não foram encontrados trabalhos utilizando esta técnica de preservação de amostras do gênero *Malassezia*, impossibilitando a comparação com outros autores.

4. Conclusão

A identificação de *Malassezia* em nível de espécie trará a possibilidade de desenvolvimento de novos tratamentos para o combate específico, uma vez que em pacientes imunocomprometidos, esse gênero se mostra resistente a determinadas drogas antifúngicas.

A criopreservação sem utilização de criopreservantes se constituiu em uma modificação da técnica, já existente, que utiliza meio de cultivo Salton (com criopreservante) e apresentou-se viável de aplicabilidade, por ter permitido a recuperação de todas as amostras testadas.

5. Referências

- Guého, E.; Midgley, G.; Guillot, J.; 1996. the genus *Malassezia* with description of four new species . *Antonie van Leeuwenhoek*, 69(4): 337-55;
- Guillot, J.; Breugnot, C.; de Barros, M.; Chermette, R. 1998. Usefulness of Dixon's medium quantitative culture of *Malassezia* species from canine skin. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 10. 382-4;
- Hawksworth DL. 1985 Fungos culture collections as a biotechnological resource. *Biotechnologia Gentica Engenharia Revista*. 3; 417-40;
- Hoffmann P. 1999. Cryopreservation off funhi. *Journal de Microbiologia e biotechnologia* (7); 92-4.
- Kawamura S, Murakami Y, Kimura K. 1995. Cryopreservation and freeze-drying protocols. Freeze-drying of yeast. *Methods Mol Biol*. 38: 31-7;
- Mayser \, P.; Haze, P.; Papavassilis, C.; Pickel, M.; Gruender K.; Guého, E.; 1997. Differentiation of *Malassezia* species: selective of Cremphor EL, catoe oil and ricinoleic acid for *M. furfur*. *British Journsl of Dermstology*. 137(2) 208-13;
- Moreira, J.; Cortez, A.C.A.; Oliveira J.A.A. 2008. Micoses superficiais em Alunos de Escola de Ensino Fundamental Professor Djalma Batista da Cunha. *IN XVII jornada de Iniciação Científica*. 336-34;
- Oliveira, A.C.P; Cortez, A.C.A; Oliveira, J.A.A. 2008. Identificação e Criopreservacao das espécies de *Malassezia* spp. Mantidas na coleção de microrganismos de interesse medico do INPA. *IN XVII Jornada de Iniciação Científica*. 203-4.3;
- Scholtfeldt, F.S; Tramontin, S.W, Nappi, B>P, Santos, J.I; 2002. Reclasseificação Taxonômica de species do gênero *Malassezia*: revisão da literature sobre implicações clinico laboratoriais. *Journal brasileiro de patologia e medicina laboratorial*. 38(3). 199-204.