

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Cyniclomyces guttulatus*
(ROBIN) VAN DER WALT E SCOTT (1971) DE CÃES PROCEDENTES
DA BARRA DA TIJUCA, RIO DE JANEIRO, RJ

TÁSSIA TORRES FURTADO

Seropédica, RJ

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Cyniclomyces guttulatus*
(ROBIN) VAN DER WALT E SCOTT (1971) DE CÃES PROCEDENTES
DA BARRA DA TIJUCA, RIO DE JANEIRO, RJ

TASSIA TORRES FURTADO

Sob a orientação do Professor

Dr. Carlos Wilson Gomes Lopes

Coorientador

Dr. Douglas McIntosh

Dissertação submetida como requisito para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ

2015

636.70896969

F992i

T

Furtado, Tassia Torres, 1985-

Isolamento e caracterização de *Cyniclomyces guttulatus* (Robin) Van Der Walt e Scott (1971) de cães procedentes da Barra da Tijuca, Rio de Janeiro, RJ / Tassia Torres Furtado. - 2015.

60 f.: il.

Orientador: Carlos Wilson Gomes Lopes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2015.

Bibliografia: f. 38-46.

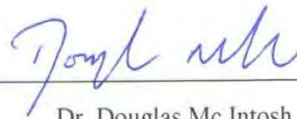
1. Cão - Microbiologia - Teses. 2. Coelho - Microbiologia - Teses. 3. Leveduras (Fungos) - Teses. 4. Microorganismos patogênicos - Teses. I. Lopes, Carlos Wilson Gomes, 1947- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

TASSIA TORRES FURTADO

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

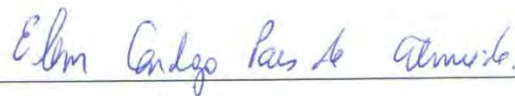
DISSERTAÇÃO APROVADA EM : 27/02/2015



Dr. Douglas Mc Intosh PhD - UFRRJ



Dr. Sergian Vianna Cardozo DSc - UNIGRANRIO



Dra. Elan Cardozo Paes de Almeida DSc - UFF

BIOGRAFIA

Tassia Torres Furtado, nasceu em 27 de maio de 1985. Em 2002 concluiu o técnico em biotecnologia pelo Instituto de Tecnologia ORT. Ingressou na Universidade Santa Úrsula (USU) em 2003 se formando em 2006 no curso de Ciências Biológicas. Especialista em Ensino de Ciências pelo Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ) em 2011. No mesmo ano ingressou no quadro de técnicos administrativos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), no Departamento de Parasitologia Animal do Instituto de Veterinária. Em 2013, ingressou no Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias desta IFES.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, que permitiu que chegasse até aqui para concluir mais uma etapa da minha formação. Depois, a todos aqueles que contribuíram para que este trabalho se realizasse, a saber:

Ao Prof. Dr. **Carlos Wilson Gomes Lopes**, pela orientação neste trabalho, pela amizade, pelo incentivo à continuidade dos estudos e principalmente por acreditar em mim;

Ao professor e coorientador Dr. **Douglas McIntosh**, pelos ensinamentos e suporte em todos os momentos da realização desse trabalho;

Ao Dr. **Gilberto Flausino** pela amizade, ensinamento e apoio técnico ao longo do trabalho;

A toda equipe da Clínica **CTI Veterinário**, em especial ao Dr. **Paulo Daniel Sant'Anna Leal**, pelas amostras cedidas para realização do trabalho;

A todos, **Professores e Técnicos Administrativos**, do DPA/IV, desta IFES;

A todos os professores do CPGCV/IV desta IFES e aos colegas do curso com os quais dividi os momentos durante esse trabalho;

Aos amigos do Laboratório de Coccídios e Coccidioses (LCC), DPA/Anexo 1 do IV, pela amizade e apoio;

Aos amigos do Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular (LabBioMol) pelo companheirismo e paciência durante a realização do trabalho;

Aos meus amigos pessoais que entenderam a minha ausência em alguns momentos e escutavam com toda paciência do mundo o discurso sobre meu trabalho;

A minha família em especial minha mãe **Rejane Torres Furtado** e minha irmã **Thais Torres Furtado**, por todo apoio ao longo dessa caminhada;

A esta **IFES**, da qual faço parte, a **seus servidores e**, a **todos** que, de alguma forma, contribuíram para o meu desenvolvimento pessoal, os meus sinceros agradecimentos.

A todos, o meu muito obrigado!

LISTA DE TABELAS

	Págs.
Tabela 1. Amostras de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> de Cães utilizadas no estudo	15
Tabela 2. Origem, fonte e grupo ("sequence type") das culturas de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> isoladas de coelhos e cobaios	16
Tabela 3. Fermentação dos carboidratos para culturas de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> isolados de Cão e Coelho.....	22
Tabela 4. Padrão de fermentação para as leveduras da microbiota de cães	23
Tabela 5. Comparação dos padrões de bandas dos fragmentos de restrição de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> isoladas de cães e das leveduras presentes na microbiota de cães, gerados usando as enzimas <i>DdeI</i> , <i>HaeIII</i> e <i>MspI</i>	25
Tabela 6. Comparação das diferenças de nucleotídeos para a sequência de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> de coelho depositada no GenBank (JQ689012) para os amplicons gene 26S rDNA com os três grupos (Sequence Types) identificados nas amostras de coelho utilizadas neste estudo	29
Tabela 7. Comparação da sequência de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> do cão CF3 (Tequila) com o grupo ST2	30
Tabela 8. Comparação das diferenças de nucleotídeos entre <i>Cyniclomyces guttulatus</i> dos cães estudados comparados com ST1 and ST2 identificados em <i>C. guttulatus</i> de coelhos	31
Tabela 9. Comparação de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> dos cães classificados como grupo ST3 com a sequência FJ755179 (Cão isolado na Noruega)	31
Tabela 10. Comparação de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> dos Cães CF2, CF3, CL1 e CL2 com a sequência FJ755179 (Cão isolado na Noruega)	32

LISTA DE QUADROS

	Págs.
Quadro 1. Comparação do perfil molecular de <i>C. guttulatus</i> para o gene 26s rDNA (Domínio D1-D2) com diferentes enzimas no programa NebCutter 2.0 (New England Biolabs)	24

LISTA DE FIGURAS

	Págs.
Figura 1. Borda de colônias de <i>Cyniclomyces guttulatus</i> em meio YPGA e visualizadas por microscopia ótica invertida (A). Obj. 10X; e células de <i>C. guttulatus</i> em caldo YPG. Azul de Algodão. Obj. 40X (B).....	21
Figura 2. Fermentação de carboidratos com <i>Cyniclomyces guttulatus</i> , isolados de coelho. Tubos com coloração amarela apresentam fermentação	22
Figura 3. Gel de Agarose 1,5% TAE 1x corado com brometo de etídio do PCR para as leveduras presentes na microbiota de cães: 1- Controle Negativo (água dentro), 2- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (cepa A), 3- <i>S. cerevisiae</i> (cepa B), 4- <i>S. cerevisiae</i> (cepa C), 5- <i>Candida albicans</i> (cepa A), 6- <i>C. albicans</i> (cepa B), 7- <i>Candida parapsilosis</i> (cepa A), 8- <i>C. parapsilosis</i> (cepa B), 9- <i>Candida tropicalis</i> (cepa A), 10- <i>C. tropicalis</i> (cepa B), 11- <i>Rhodotorula</i> sp. (cepa A), 12- <i>Rhodotorula</i> sp. (cepa B), 13- CL1, 14-CL2, 15-CF1, 16-CF2, 17-CF3, 18- CF4, 19- Controle Negativo (água fora), 20- Marcador 100pb (New England Biolabs)	23
Figura 4. Padrão de bandas das leveduras presentes em cães e cortadas com a enzima <i>DdeI</i> . 1- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 2 - <i>Candida albicans</i> , 3 - <i>Candida tropicalis</i> , 4 - <i>C. albicans</i> , 5 - <i>Rhodotorula</i> sp., 6 - <i>Malassezia pachydermatis</i> , 7- <i>Kazachstania</i> sp., 8- <i>Cyniclomyces guttulatus</i> Coelho (R2), 9 - <i>C. guttulatus</i> Cão (Husky), 10-Marcador 50pb Thermo Scientific, 11- sem amostra, 12- Marcador 50pb Thermo Scientific, 13 - <i>C. guttulatus</i> R9, 14 - <i>C. guttulatus</i> CF4, 15-Levedura X, 16 - <i>C. guttulatus</i> CF3, 17 - <i>C. guttulatus</i> CF2, 18-CF1, 19- <i>C. guttulatus</i> CL1, 20 - <i>C. guttulatus</i> CL2	26
Figura 5. Padrão de bandas das leveduras presentes em cães e cortadas com a enzima <i>Hae III</i> . 1-Marcador 50pb Thermo Scientific, 2 - <i>Cyniclomyces guttulatus</i> Cão (Husky), 3- <i>C. guttulatus</i> Coelho (R2), 4 - <i>Kazachstania</i> sp., 5- <i>Malassezia pachydermatis</i> , 6- <i>Rhodotorula</i> sp., 7- <i>Candida albicans</i> , 8 - <i>Candida tropicalis</i> , 9 - <i>C. albicans</i> , 10 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 12 - Marcador 50pb Thermo Scientific, 13 - <i>C. guttulatus</i> R9, 14 - <i>C. guttulatus</i> CF4, 15-Levedura X, 16- <i>C. guttulatus</i> CF3, 17 - <i>C. guttulatus</i> CF2, 18 - <i>C. guttulatus</i> CF1, 19 - <i>C. guttulatus</i> CL1, 20 - <i>C. guttulatus</i> CL2	27

Figura 6. Perfil molecular das leveduras presentes em cães e cortadas com a enzima *MspI*. 1-Marcador 50pb Thermo Scientific, 2 - *Cyniclomyces guttulatus* Cão (Husky), 3 - *C. guttulatus* Coelho (R2), 4- *Kazachstania* sp., 5 - *Malassezia pachydermatis*, 6- *Rhodotorula* spp., 7 - *Candida albicans*, 8 - *Candida tropicalis*, 9 - *C. albicans*, 10 - *Saccharomyces cereviseae*, 11- *C. guttulatus* CL1, 12 - *C. guttulatus* CL2, 13 - *C. guttulatus* CF1, 14 - *C. guttulatus* CF2, 15 - *C. guttulatus* CF3, 16 - Levedura X, 17 - *C. guttulatus* CF4, 18 - *C. guttulatus* R9, 19-Marcador 50pb Thermo Scientific 27

LISTA DE ANEXOS

	Págs.
Anexo 8.1 Declaração do CTIVeterinário	48
Anexo 8.2 FURTADO T.T., FLAUSINO G., LEAL P.D. DE S., FERREIRA J.P., MCINTOSH D., FLAUSINO W., TEIXEIRA FILHO W.L., PAES-DE-ALMEIDA E.C. & LOPES C.W.G. Diagnóstico de colangite associado à mucocele da vesícula biliar por <i>Cyniclomyces guttulatus</i> em cães - Relato de casos. Revista Brasileira de Medicina Veterinária , v.5, n. 1, p. 1-6, 2013	49
Anexo 8.3 FLAUSINO, G.; FURTADO, T.T.; McINTOSH, D.; TEIXEIRA FILHO, W.L. Differential diagnosis between endogenous stages of <i>Cyniclomyces guttulatus</i> (Robin) Van Der Walt and Scott, 1971 and <i>Eimeria caviae</i> Sheather, 1924 from Guinea pig <i>Cavia porcellus</i> Linnaeus Coccidia , v. 1, n. 1, p. 21-24, 2013	56

LISTA DE ABREVIACOES E EQUIPAMENTOS

ANVISA - Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

DNA - cido desoxirribonucleico.

RFLP - polimorfismo de comprimento dos fragmentos gerados por enzimas de restrio

PCR - Reao em cadeia da polimerase.

CEUA - Comit de tica no Uso de Animais

LQEPV - Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária

IFES - Instituio Federal de Ensino Superior

LabBioMol - Laboratório Multitusurio de Biologia Molecular

YPG - Extrato de Levedura, peptona e glicose

YPGA - Extrato de Levedura, peptona, glicose e ágar

mg - Miligrama

kg - Kilograma.

RNA - cido ribonucleico.

g - Grama.

LCC - Laboratório de Coccidios e Coccidioses.

UFRRJ - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

DPA - Departamento de Parasitologia Animal

IV - Instituto de Veterinária

dL - Decilitro.

PBS - Soluo fisiológica fosfatada tamponada.

pH - Potencial de hidrognio

μ L - Microlitro

μ g - micrograma

ng - nanogramas

a. Mini Beadbeater-16, Biospec, Bartlesville, OK, EUA.

b. Fotodocumentador GelDoc EQ, BioRad, EUA.

c. Sequenciador de DNA automático 3500 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, EUA.

d. Termociclador TGradiente, Biometra, RU.

SUMÁRIO

	Págs.
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 AS LEVEDURAS NO CONTEXTO ATUAL	2
2.2 LEVEDURAS PATOGÊNICAS E OPORTUNISTAS	3
2.3 MORFOLOGIA E SISTEMÁTICA	4
2.3.1 Morfofisiologia	4
2.3.2 Sistemática	5
2.4 DIAGNÓSTICO	6
2.4.1 Exame microscópico direto	6
2.4.2 Cultura	6
2.4.3 Isolamento	6
2.4.3.1 Estoque de Leveduras	7
2.4.4 Molecular	7
2.5 PATOGENICIDADE E OPORTUNISMO PARA ANIMAIS E HUMANOS.	8
2.5.1 <i>Candida</i> e outros leveduriformes	8
2.5.2 <i>Cyniclomyces guttulatus</i>	9
2.5.2.1 Em coelhos e cobaios	10
2.5.2.2 Em cães	11
2.5.3 Diagnóstico Diferencial	11
2.6 HISTÓRICO DE SUA POSSÍVEL PATOGENICIDADE OU INFECÇÃO INTERCORRENTE	12
2.7 MARCADORES MOLECULARES DE IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS	13
2.7.1 PCR	13
2.7.2 FLP	13
2.7.3 PCR-RFLP	13
2.7.4 Gene 26S rDNA	14
2.7.5 Sequenciamento	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	15

	Págs
3.1 PROCEDÊNCIA DAS AMOSTRAS	15
3.2 AVALIAÇÃO LABORATORIAL	16
3.2.1 Identificação Morfológica e Isolamento das amostras de <i>Cyniclomyces guttullatus</i>	17
3.2.2 Preparação de Culturas Estoque	17
3.2.3 Identificação Bioquímica - Zimograma	17
3.2.4 Identificação Molecular	18
3.2.4.1 Extração de DNA	18
3.2.4.2 PCR do gene 26S rDNA	18
3.2.4.3 PCR - RFLP (gene 26s rDNA região D1-D2)	19
3.2.4.4 Sequenciamento	20
4 RESULTADOS	21
4.1 MORFOLOGIA E DESENVOLVIMENTO DE <i>Cyniclomyces guttullatus</i>	21
4.2 PCR	23
4.3 PCR-RFLP (gene 26s rDNA região D1-D2)	24
4.4 SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS ISOLADAS	28
4.4.1 Análise das sequências de coelhos	28
4.4.2 Análise das sequências de cães	30
5 DISCUSSÃO	33
6 CONCLUSÕES	37
6.1 MORFOLOGIA E DESENVOLVIMENTO DE <i>Cyniclomyces guttullatus</i>	37
6.2 PCR-RFLP (Gene 26s rDNA região do domínio D1/D2)	37
6.3 SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS ISOLADAS	37
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
8 ANEXOS	47

ABSTRACT

FURTADO, Tassia Torres. **Isolation and characterization of *Cyniclomyces guttulatus* (Robin) Van Der Walt & Scott (1971) from dogs of Barra da Tijuca, Rio de Janeiro, RJ.** 2015, 60p. Dissertation in Veterinary Science. Instituto de Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2015.

The ascomycete yeast *C.guttulatus*, has long been recognized as a component of the normal microflora of rabbits and other herbivores. More recently, a possible association between this yeast and gastro-intestinal illness in dogs has been reported by researchers in Europe, EUA, Japan and Brazil. The current study combined morpho-phenotypic and molecular (PCR-RFLP and nucleotide sequencing), methods to examine *C.guttulatus* cultures recovered from Brazilian rabbits (15 isolates) and dogs (7 isolates), with the objectives of developing a means for the differential identification of *C. guttulatus* and to improve existing knowledge of the biology of this organism. Microscopic and macroscopic examination of isolated colonies in combination with zymogram analysis (carbohydrate fermentation tests), was unable to provide a definitive identification for the suspect cultures. *In silico* restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of virtual PCR amplicons (corresponding to the D1-D2 domain of the gene encoding 26S ribosomal RNA of *C.guttulatus* and other yeast species known to be associated with dogs), indicated that digestion with the restriction enzymes *DdeI*, *HaeIII* and *MspI* would allow the differential identification of *C. guttulatus*. *In vitro* restriction analysis of PCR amplicons confirmed the predictions of the *in silico* analysis and demonstrated that differential identification of *C.guttulatus* could be made using only two enzymes (*DdeI* and *MspI*). Sequencing of D1-D2 amplicons demonstrated the presence of substantial nucleotide variation within the cultures examined and divided them into three groups, denominated sequence types (ST's). Two of these groups were closely related to each other. The third sequence type showed extensive nucleotide variation and may represent a novel species or subspecies within the genus *Cyniclomyces*.

Key words: *Cyniclomyces guttulatus*, isolation, characterization, dogs, Barra da Tijuca, Rio de Janeiro.

RESUMO

FURTADO, Tassia Torres. **Isolamento e caracterização de *Cyniclomyces guttulatus* (Robin) Van Der Walt & Scott (1971) de cães procedentes da Barra da Tijuca, Rio de Janeiro, RJ.** 2015, 60p. Dissertação em Ciência Veterinária. Instituto de Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2015.

A levedura, *Cyniclomyces guttulatus* é um ascomiceto e tem sido reconhecida como um componente da microbiota natural de coelhos e outros herbívoros. Mais recentemente, uma possível associação entre esta levedura e doenças gastrintestinais em cães tem sido relatada por pesquisadores na Europa, EUA, Japão e Brasil. O presente estudo combinou métodos de análises morfológica e molecular (PCR-RFLP e sequenciamento de nucleotídeos), para examinar culturas de *C. guttulatus* recuperados de coelhos brasileiros (15 isolados) e cães (7 isolados), com o objetivo de desenvolvimento de um método para a identificação diferencial de *C. guttulatus* e melhorar o conhecimento existente sobre a biologia desse organismo. O exame microscópico e macroscópico das colônias isoladas em combinação com análise do zimograma (testes de fermentação de carboidratos), não foi capaz de fornecer uma identificação definitiva para as culturas suspeitas. As análises *in silico* de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) de produtos de PCR virtuais (correspondentes ao domínio D1/D2 do gene 26S RNA ribossomal de *C. guttulatus* e outras espécies de levedura conhecidas como associadas a cães), indicou que a digestão com as enzimas de restrição *DdeI*, *HaeIII* e *MspI* permitiria a identificação diferencial de *C. guttulatus*. As análises das digestões *in vitro* de produtos de PCR confirmaram as previsões das análises *in silico* e demonstrou que a identificação diferencial de *C. guttulatus* poderia ser feita usando apenas duas enzimas (*DdeI* e *MspI*). O sequenciamento dos produtos de PCR do domínio D1/D2 demonstraram a presença de variações substanciais de nucleotídeos nas culturas analisadas e estas foram divididas em três grupos, denominados de sequências tipos (ST's). Dois destes grupos estavam estreitamente relacionados uns aos outros. O terceiro tipo de sequência mostrou grande variação de nucleotídeos e pode representar uma nova espécie ou subespécie dentro do gênero *Cyniclomyces*.

Palavras chave: *Cyniclomyces guttulatus*, isolamento, caracterização, cães, Barra da Tijuca, Rio de Janeiro.

1 INTRODUÇÃO

As leveduras incluem os fungos predominantemente unicelulares que se reproduzem assexuadamente por brotamento e sexuadamente pela produção de ascósporos e basidiósporos. De acordo com as condições ambientais podem aparecer na forma filamentosa e produzir micélio ou pseudomicélio.

As leveduras têm sido encontradas em diversos sítios biológicos de homens e animais, em uma relação comensal com esses hospedeiros. Contudo, qualquer alteração desse equilíbrio pode modificar essa relação harmônica e estabelecer outra, do tipo parasitário, levando a infecções de diferentes graus de patogenicidade (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

A levedura, *Cyniclomyces guttulatus* (Robin) Van Der Walt & Scott (1971) pertence ao filo Ascomycota (ascomicetos), classe Saccharomycetes, ordem Saccharomycetales e família Saccharomycetaceae. Os ascomicetos são fungos que produzem esporos (ascósporos) em esporângios específicos chamados ascos. É um grupo monofilético com cerca de 32.000 espécies, ao qual pertencem a maioria das formas anamórficas e as leveduras. *Cyniclomyces guttulatus* ocorre naturalmente no trato digestivo de coelhos, porquinhos-da-índia, chinchilas, ratos e camundongos (ZIERDT et al., 1988). Poucos são os estudos encontrados sobre esta levedura, possivelmente pela dificuldade no seu isolamento e manutenção, resultante da demanda nutricional e elevada concentração de CO₂ necessária para o seu crescimento. (FLAUSINO; BARONI, 2009). Doenças associadas a este microrganismo são raras, porém em uma associação oportunista com doenças inflamatórias do trato digestivo pode ser observada em cães. Seu diagnóstico baseia-se no isolamento e identificação morfológica da levedura em fezes ou vísceras sob microscopia óptica e testes bioquímicos, porém estes não são conclusivos. Testes moleculares vêm sendo cada vez mais utilizados para identificação e diagnóstico de espécies assim como, são uma ferramenta indispensável na análise filogenética de leveduras (KURTZMAN; ROBNETT, 1998).

As dificuldades associadas ao cultivo desta levedura tornam essencial o desenvolvimento de métodos de detecção que dispensem, não só o cultivo, mas também o desenvolvimento da levedura.

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo desenvolver um método molecular para dar suporte na identificação e caracterização desta levedura em amostras procedentes de cães, saudáveis e/ou doentes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AS LEVEDURAS NO CONTEXTO ATUAL

A diversidade microbiana dos fungos é enorme (PEREIRA JR et al., 2008). Comporta mais de 100.000 espécies (MALAJOVICH, 2012). Os fungos destacam-se pela sua capacidade de atacar tecidos vegetais através da secreção de enzimas que degradam biopolímeros tais como polissacarídeos, lignina e proteínas. Além dos produtos de seu metabolismo secundário. Historicamente, o potencial metabólico dos microrganismos, como os fungos, inseriu-se naturalmente em aspectos fundamentais da vida humana. Assim, fungos unicelulares, as leveduras, apresentam peculiaridades metabólicas que permitiram o seu uso de forma empírica na produção do pão e do vinho, alimentos simbólicos na história da humanidade (PEREIRA JR et al., 2008).

São um grupo de microrganismos eucarióticos integrado no Reino *Fungi*, domínio *Eukarya*, caracterizado por um crescimento vegetativo predominantemente unicelular e pela possibilidade de formação de estruturas sexuadas não encerradas em corpos frutíferos (KURTZMAN et al., 1998). São predominantemente unicelulares dentro de um grupo filético classificadas dentro de Ascomicetos e Basidiomicetos (KURTZMAN et al., 2011). São caracteristicamente esféricas ou ovais e estão distribuídas amplamente no ambiente, assim como os fungos filamentosos (TORTORA et al., 2005).

A maioria das leveduras é classificada como ascomiceto; geralmente são maiores que células bacterianas, podendo ser distinguidas microscopicamente dessas por suas dimensões e pela presença de estruturas internas, tal como o núcleo. São capazes de utilizar diferentes fontes de carbono e de energia tais como glicose, galactose, sacarose, entre outros. A seleção por determinado nutriente poderá determinar a diversidade de espécies (PHAFF et al., 1978).

São capazes de crescimento anaeróbio facultativo e podem utilizar o oxigênio ou um componente orgânico como aceptor final de elétrons, sendo este de grande importância, uma vez que permite que os fungos sobrevivam em vários ambientes. (TORTORA et al., 2005).

Uma única espécie de levedura, *Saccharomyces cerevisiae*, tem sido o centro da investigação científica e tornou-se um sinônimo de levedura. Esse panorama tem mudado progressivamente e já é reconhecida a grande diversidade deste grupo de microrganismos (KURTZMAN; FELL, 1998; BARNETT et al., 2003). Outras espécies de leveduras começam a ganhar destaque no mundo científico e tornam-se alvo de atenção por diferentes razões, como por exemplo: *Kluyveromyces lactis*, pela possibilidade de produção da lactase; *Pichia pastoris*, pela sua capacidade de produção de proteína heterólogas; e leveduras com relevância clínica, como são os casos de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* (FLORES et al., 2000) e *C. guttulatus* (FLAUSINO et al., 2012, FURTADO et al., 2013, MANDIGERS et al., 2014).

As leveduras têm sido isoladas de ambientes muito diversos: terrestres, aquáticos e aéreos. São encontradas em diversos sítios biológicos de homens e animais, em uma relação comensal com esses hospedeiros. Contudo, qualquer rompimento desse equilíbrio pode modificar essa relação harmônica e estabelecer outra, do tipo parasitário, que leva a infecções

de diferentes gravidades (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010), podendo causar micoses superficiais e profundas em humanos e em diversos animais, sendo assim, considerado como um grupo de microrganismos oportunistas.

Tradicionalmente a identificação de leveduras tem sido baseada na observação das características morfológicas e nas provas bioquímicas de fermentação de carboidratos (zimograma) e a utilização de fontes de carbono e nitrogênio (auxograma). A morfologia das leveduras, não apresenta muita diversidade e, portanto, nem sempre é um parâmetro suficiente para sua identificação.

A incidência de infecções causadas por leveduras tem crescido nos últimos anos, podendo levar ao agravamento no quadro de pacientes imunossuprimidos e com isso a necessidade de uma maior eficiência e aprimoramento no diagnóstico de leveduras que quando não diagnosticadas corretamente acarretam erros no tratamento. Atualmente, pode-se evidenciar uma mudança marcante no perfil epidemiológico das doenças causadas por leveduras (leveduroses) ao serem relatados casos de infecções por espécies emergentes (MACEDO et al., 2009; FISHER et al., 2012; TLAMÇANI; ER-RAMI, 2013). Estas leveduras ditas emergentes apresentam a habilidade de passar da condição de comensal a patógenas. Esta habilidade vai depender de condições favoráveis no hospedeiro, principalmente imunossupressão que fez com que houvesse um aumento considerável na frequência de infecções fúngicas sistêmicas nos últimos anos (TLAMÇANI; ER-RAMI, 2013) e também de fatores de virulência da levedura, incluindo a secreção de enzimas hidrolíticas como proteases, fosfolipases, produção de biofilme entre outros (KANTARCIOGLU; YUCEL, 2002). Para se obter um tratamento eficaz, é essencial ter conhecimento de qual é a espécie responsável pela infecção, assim como da sua sensibilidade aos fármacos (FALAGAS et al., 2010).

É importante salientar que conhecer os microrganismos que vivem como sapróbios em homens e animais é essencial, visto que, havendo um desequilíbrio no binômio parasita-hospedeiro, eles podem tornar-se agentes responsáveis por infecções e nesses casos, faz-se necessária a diferenciação entre um ser patogênico ou apenas constituinte da microbiota. (SIDRIM; ROCHA, 2004).

2.2 LEVEDURAS PATOGÊNICAS E OPORTUNISTAS

Os fungos são conhecidos na humanidade há vários séculos, tanto por seus benefícios quanto pelos problemas que causam. Muitas doenças humanas, de animais e plantas (micoses) são causadas por fungos. Em humanos e animais os fungos podem causar alergias respiratórias e cutâneas leves ou intensas, dependendo da suscetibilidade e pré-disposição do indivíduo (MORAES et al., 2010). As leveduras são fungos capazes de colonizar o homem e animais e, frente à perda do equilíbrio parasita-hospedeiro, podem causar diversos quadros infecciosos com formas clínicas localizadas ou disseminadas. (ANVISA, 2010).

O aumento das infecções causadas por agentes fúngicos nos últimos anos estão relacionadas com o aumento da sobrevivência de pacientes imunocomprometidos que são os mais suscetíveis às micoses. Com o aumento da sobrevivência desses pacientes, mais suscetíveis ao desenvolvimento de infecções oportunistas, as infecções fúngicas adquiriram grande importância mundial (MATTEI, 2013). Ocorreu um acentuado aumento no número de infecções graves causadas por fungos tradicionalmente considerados não patogênicos.

As infecções causadas por estes organismos ocorrem em pacientes com deficiência de defesa do sistema imunológico, portadores de neoplasia, AIDS, ou que receberam tratamento

imunossupressor, ou rupturas das barreiras normais, ou ainda alterações da flora normal. Além disso, muitas drogas antimicrobianas já enfrentam resistência de algumas cepas presentes nos ambientes hospitalares, o que compromete a eficácia do tratamento e do controle das infecções (ALMEIDA et al., 1988; FLEMMING et al., 2002).

Segundo a ANVISA (2010), a grande preocupação dos micologistas, que antes se preocupavam apenas com a detecção de fungos patogênicos, hoje em dia também devem se preocupar com os fungos considerados sapróbios, oportunistas e potencialmente patogênicos.

Os fungos de interesse médico e médico veterinário são agentes etiológicos de micoses e apresentam-se sob três tipos morfológicos: Leveduras - em sua maioria unicelulares; Bolores ou fungos filamentosos que são multicelulares e fungos dimórficos que de acordo com a temperatura e em alguns casos do teor de CO₂, e condições nutricionais podem apresentar sob ambas as formas (ANVISA, 2004).

Fungos oportunistas são fungos sapróbios que se tornam patogênicos dependendo do estado do hospedeiro. As leveduras oportunistas normalmente estão presentes em humanos e animais saudáveis e crescem nas superfícies externas e internas do corpo. Quando uma fraqueza dos sistemas de defesa acontece, eles mudam suas características e mostram um comportamento parasitário, invasivo. Sendo assim, são necessários maiores estudos sobre a microbiota natural de fungos não só em animais como também em humanos para que se tenha o conhecimento dos microrganismos que vivem como comensais, podendo vir a se tornar patogênicos.

Entre os agentes infecciosos causadores de infecções oportunistas estão assinalados fungos leveduriformes pertencentes aos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, *Rhodotorula* e *Trichosporon*, além do gênero dimórfico *Sporothrix*.

2.3 MORFOLOGIA E SISTEMÁTICA

A taxonomia dos fungos é tradicionalmente baseada em caracteres morfológicos e fenotípicos. Mas, com o desenvolvimento de técnicas moleculares, novos caracteres foram adicionados como auxílio na identificação das espécies fúngicas. Dentre essas técnicas, podemos citar: técnicas baseadas em PCR (RAPD, RFLP, AFLP), sequenciamento de DNA, isoenzimas e cromatografia (TLC, HPLC, CG, espectrometria de massa) (MORAES et al., 2010).

Macroscopicamente, os fungos podem ser divididos em dois grandes grupos: os bolores, que apresentam uma colônia filamentosa, e as leveduras, que apresentam em geral, uma colônia cremosa. São características importantes no estudo macroscópico, o tipo de colônia, velocidade de crescimento e formação de pigmentos (MORAES et al., 2010).

2.3.1 Morfofisiologia

Leveduras são organismos unicelulares, embora existam espécies que podem ser multicelulares formando pseudo-hifas. O tamanho das leveduras pode variar de acordo com a espécie. A maioria se reproduz assexuadamente por brotamento (TORTORA et al., 2005).

As colônias se apresentam esféricas ou ovais e de consistência pastosa ou cremosa, apresentando crescimento limitado. Nos fungos filamentosos, há uma maior variedade de formas de colônias, por exemplo, quanto à textura podem ser aveludadas, cremosas, mucóides, cotonosas, serosas, camurças, granuladas, membranosas ou coriáceas, verrucosas ou pulverulentas (TORTORA et al., 2005).

As leveduras podem ser definidas como fungos cuja reprodução predominante é de forma assexuada, resultado de brotamento ou fissão, e que não fazem seus estados sexuais dentro ou em cima de um corpo de frutificação. Assim podemos dividi-las em leveduras de brotamento e leveduras de fissão.

As leveduras de brotamento, como no gênero *Saccharomyces*, dividem-se formando células desiguais. No brotamento, a célula parental forma uma protuberância (broto) na sua superfície externa. À medida que o broto se alonga, o núcleo da célula parental se divide, e um dos núcleos migra para o broto. O material da parede celular é então sintetizado entre o broto e a célula parental, e o broto acaba se separando. Algumas leveduras produzem brotos que não se separam uns dos outros; esses brotos formam uma pequena cadeia de células denominada pseudo-hifa (TORTORA et al., 2005).

As leveduras de fissão, como *Schizosaccharomyces*, dividem-se produzindo duas novas células iguais. Durante a fissão binária, as células parentais se alongam, seus núcleos se dividem, e duas células-filhas são produzidas. O aumento do número de células de leveduras em meio sólido produz uma colônia similar às colônias de bactérias (TORTORA et al., 2005).

2.3.2 Sistemática

Nos últimos anos, a introdução de novas abordagens filogenéticas e de novas técnicas moleculares, particularmente a análise de sequências nucleotídicas do DNA (tais como DNA ribossomal), tem contribuído significativamente para a alteração dos conceitos tradicionais sobre a classificação e a sistemática dos fungos (SILVA, 2010). Segundo Rangel (2012), podemos dividir os fungos em quatro filos, do Reino Fungi, a saber: Zigomicetos, Basidiomicetos, Ascomicetos e Deuteromicetos.

Os Zigomicetos são os fungos mais simples, contêm hifas cenocíticas com numerosos núcleos haploides. A reprodução pode ser sexuada pela formação de zigosporos e assexuada com a produção de esporos, os esporangiosporos, no interior de esporângios. Cada esporo libertado pode dar origem a um novo micélio. A classe dos Zygomycetes contém fungos de interesse médico, encontrados nas ordens Mucolares e Entomophthorales (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008)

Os basidiomicetos podem ser distinguidos de todos os outros fungos por possuírem basídeo, uma estrutura reprodutiva microscópica em forma de clava onde ocorre a cariogamia e meiose (PELCZAR; JOSEPH, 1997). Apresentam hifas septadas e compreendem o grupo dos cogumelos comestíveis. Estes fungos produzem um tipo de esporos sexuais, os basidiósporos, suportados por uma estrutura característica, com forma de dedos, o basídeo, produzido na extremidade distal de uma hifa binucleada que é típico de cada espécie. A classe Teliomycetes contém a espécie patogênica mais importante, *Cryptococcus neoformans* (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). A maior parte dos fungos basidiomicetos são saprófitos e decompõem matéria orgânica.

Os Ascomicetos são denominados fungos superiores pois apresentam uma estrutura um pouco mais complexa que os outros fungos. Apresentam um micélio constituído por hifas septadas. Estão incluídos nesse grupo os leveduriformes miceliais e os fungos dimórficos. Apresentam como principal característica o asco que é uma estrutura em forma de bolsa onde são produzidos os ascósporos, esporos sexuais, com forma, número e cor variáveis para cada espécie (RANGEL, 2012). Reproduzem-se assexuadamente por intermédio de conidiósporos. Neste filo estão inclusos 80% das espécies patogênicas e oportunistas. Os ascomicetos desempenham um papel ecológico importante na degradação de moléculas

animais e vegetais resistentes como a celulose, a lignina e o colágeno (PELCZAR; JOSEPH, 1997).

Deuteromicetos compreende o grupo de fungos que não tem ligação com os Ascomicetos e os Basidiomicetos. Foram designados muito tempo de fungos imperfeitos, assim designados por não terem, ou não ter sido ainda observada, uma fase sexuada de reprodução (SILVA, 2010). A grande maioria dos fungos desse grupo tem habitat no solo e são os principais componentes da microbiota atmosférica.

2.4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico é realizado através do exame direto, (técnicas de coloração) e isolamento em meios de cultura apropriados (análise morfológica). Podem ainda ser feitas provas bioquímicas incluindo teste de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio e fermentação de carboidratos. Técnicas de biologia molecular também têm sido utilizadas no diagnóstico de fungos e leveduras, porém apesar de confiáveis são pouco aplicados na rotina laboratorial de microbiologia.

2.4.1 Exame microscópico direto

A observação de um fungo na amostra biológica tem grande valor diagnóstico pois demonstra a invasão do fungo no tecido e permite uma informação imediata ao médico, a qual pode ser crucial para determinar a terapia apropriada ao paciente (ANVISA, 2004).

A caracterização de uma levedura à microscopia se faz pelo achado de numerosas estruturas redondas ou ovaladas (denominadas de blastoconídios), unicelulares, algumas apresentando brotamento, associadas ou não as formas em pseudomicélio e hifas verdadeiras. Este achado indica apenas que o microrganismo é uma levedura, sem, no entanto, indicar a espécie. Achados macroscópicos, como a pigmentação também pode orientar quanto ao gênero ou espécie fúngica (SIDRIM; MOREIRA, 1999; CRESPO et al., 2000).

2.4.2 Cultura

Muitas vezes, o exame microscópico da amostra é suficiente para medidas de controle da infecção, outras vezes somente o isolamento e identificação do fungo pode orientar a conduta clínica. O profissional de laboratório deve tentar identificar todas as culturas positivas e emitir o resultado mais acurado possível. A identificação dos fungos, de modo ideal, deve contemplar o gênero e a espécie; porém, muitas vezes, isso não é possível, pelo grau de dificuldade e complexidade do exame (ANVISA, 2004).

Colônias de levedura obtidas de amostra biológica, só devem ser identificadas, quando estiverem puras, ou seja, sem contaminação bacteriana ou em mistura de espécies. Para tanto, deve ser realizado o plaqueamento de cada colônia morfológicamente distinta e confirmada sua pureza, por microscopia (ANVISA, 2004).

2.4.3 Isolamento

O isolamento de um fungo em meio de cultura não significa, necessariamente, que ele é o agente etiológico da infecção. A presença de fungos na microbiota de pacientes, por exemplo *Candida* sp. e no meio ambiente, por exemplo *Aspergillus* sp., pode resultar em

cultura positiva. Isto explica o grande número de culturas positivas para fungos, a partir de uma amostra biológica (ANVISA, 2010).

O isolamento é uma etapa indispensável na identificação de fungos e leveduras. É feito concomitantemente ao exame de microscópico direto. Para isso são preparados meios de cultivo (sólido e líquidos) que após semeados são incubados entre 35 e 37°C. Também podem ser preparados meio mais seletivos com a adição de antibióticos como: penicilina, estreptomicina, gentamicina ou cloranfenicol assim inibindo o crescimento de bactérias. Com o auxílio do isolamento deve ser feita a identificação da espécie.

2.4.3.1 Estoque de Leveduras

Diante da necessidade de desenvolvimento biotecnológico e científico, a preservação e a manutenção de materiais biológicos vêm ganhando destaque no cenário mundial (SOLA et al., 2012). É de fundamental importância para estudos retrospectivos e prospectivos, que enfoquem sua biologia, etiologia e aspectos epidemiológicos. Entretanto, para uma satisfatória análise fenotípica e genotípica, a longo prazo, é necessária a escolha adequada do método de preservação (BRILHANTE, 2002).

No que tange à estocagem, conservação e manutenção de amostras independentes da origem o que inclui células humanas, animais e vegetais, bactérias, vírus, fungos e material genético (DNA/RNA), há o propósito de diagnóstico e pesquisa, ampliando a aplicação laboratorial. Por consequência, não se aplica para a conservação de amostras biológicas uma fórmula singular, ideal ou universal que determine a eficiência de sua estocagem e preservação por longos períodos (COSTA et al., 2009). Diversos métodos vêm sendo empregados para preservação de fungos, porém, em virtude da biodiversidade destes microrganismos, não existe uma técnica padrão que seja capaz de preservá-los de forma adequada e generalizada (LIMA; BORBA, 2001).

De acordo com Sola (2012), para as leveduras os métodos de curto prazo como a repicagem periódica podem conservar as mesmas de um a três meses. Para uma conservação de médio prazo (até 7 anos) pode-se usar a conservação em óleo mineral ou congelamento comum que garante uma viabilidade de até 2 anos.

2.4.4 Biologia Molecular

Estudos relacionados a biologia molecular têm levado ao desenvolvimento de técnicas para caracterização, identificação e classificação de microrganismos (GUERRA et al., 2001; KURTZMAN, 2014).

Até recentemente, o diagnóstico de leveduras tem-se baseado essencialmente em caracteres morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, mas não é raro surgirem dificuldades na identificação de alguns isolados devido à variabilidade natural das espécies. O impacto crescente da aplicação de técnicas moleculares, quer na elucidação das relações filogenéticas entre diferentes grupos de organismos, quer no desenvolvimento de novos métodos de identificação e detecção dos mesmos, tem resultado numa explosão de trabalhos científicos e de aplicações comerciais que têm procurado no diagnóstico molecular alternativas à identificação e detecção fenotípica tradicional dos agentes causadores de doenças infecciosas (SILVA, 2010, KURTZMAN, 2014).

O diagnóstico molecular é considerado mais rápido, sensível, específico e de fácil execução do que os métodos convencionais, o que o torna fundamental quando há urgência no

diagnóstico. No entanto, estes métodos requerem normalmente tecnologias mais sofisticadas, sendo também por este motivo mais dispendioso, por isso sua utilização na rotina laboratorial ainda é limitada a apenas alguns laboratórios de diagnóstico (SILVA, 2010).

Têm sido descritas várias aplicações moleculares para o diagnóstico e monitoramento de infecções fúngicas, bem como para a tipagem dos isolados em estudos epidemiológicos. Estas aplicações utilizadas na detecção, identificação e tipagem de fungos patogênicos são, na sua maior parte, baseadas na amplificação de fragmentos de DNA por PCR ("Polymerase Chain Reaction"; Reação e Cadeia da Polimerase) (SILVA, 2010).

2.5 PATOGENICIDADE E OPORTUNISMO PARA ANIMAIS E HUMANOS

Fungos são seres dispersos no meio ambiente, em vegetais, ar atmosférico, solo e água e, embora sejam estimados em 250 mil espécies, menos de 150 foram descritos como patógenos aos seres humanos (ANVISA, 2010) e animais.

Leveduras são capazes de colonizar o homens e animais e frente à perda do equilíbrio parasita-hospedeiro, podem causar diversos quadros infecciosos com formas clínicas localizadas ou disseminadas (ANVISA, 2010).

Qualquer infecção de origem fúngica é chamada de micose. As micoses geralmente são infecções crônicas (de longa duração) e são classificadas em cinco grupos de acordo com o grau de envolvimento no tecido e o modo de entrada no hospedeiro: sistêmica, subcutânea, cutânea, superficial ou oportunista. (TORTORA, 2005). Um patógeno oportunista geralmente é inofensivo em seu habitat normal, mas pode se tornar patogênico em um indivíduo (humano ou animal) imunossuprimido.

2.5.1 *Candida* e outros leveduriformes

As candidoses ou candidíases são as infecções causadas por leveduras do gênero *Candida*, em especial *C. albicans* acometendo homens e animais. É uma infecção oportunista com incidência mundial. Outras espécies de *Candida*, tais como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, também são citadas como agentes de infecções. As infecções por *Candida* sp. em animais são pouco frequentes. No entanto, nos últimos anos, tem sido observado um aumento considerável de relatos de infecções por essas leveduras, com diferentes manifestações clínicas e acometendo variadas espécies animais (DUARTE et al., 2001; PRESSLER et al., 2003; MORETTI et al., 2004). O potencial patogênico das espécies de *Candida*, podem se manifestar em decorrência de um desequilíbrio entre parasita-hospedeiro, resultante de alterações nos mecanismos de defesa do portador ou por comprometimento das barreiras anatômicas de proteção (MUELLER et al., 2002; MORETTI et al., 2004; SIDRIM; ROCHA, 2004).

A criptococose é uma zoonose oportunista, causada por uma levedura capsulada do gênero *Cryptococcus*, sendo encontrados em solo, frutos e vegetais em decomposição, apresentando como reservatório as fezes das aves, principalmente pombos, e raramente morcegos (OLIVEIRA et al., 2008). É uma doença subaguda ou crônica no homem, causando comprometimento pulmonar, sistêmico e, principalmente, do sistema nervoso central. Também já foi diagnosticada em cães e gatos com localização pulmonar, nervosa e mucosa, em vacas com envolvimento do tecido mamário e linfonodos adjacentes, e em equinos com localização nasal e respiratória.

A esporotricose é uma doença subaguda ou crônica que acomete cães e gatos e até o homem e tem como agente etiológico *Sporothrix schenckii*. É reportada como uma infecção zoonótica transmitida para as pessoas, principalmente pelos gatos, sendo considerada um problema de saúde pública. *Sporothrix schenckii* é um fungo dimórfico, logo, muda entre as formas miceliana (na natureza ou no laboratório a 25°C) e leveduriforme (no hospedeiro ou a 37°C em laboratório), de acordo com a temperatura e as condições do ambiente onde se encontra. É um importante agente de micoses subcutâneas que se caracterizam por resultar da inoculação de um fungo patogênico por ocasião de um traumatismo, manifestando-se como tumefação ou lesão da pele ou do tecido subcutâneo, produto da disseminação do fungo por contiguidade ou por via linfática, porém limitada ao território aquém do linfonodo regional (MORAES et al., 2010).

2.5.2 *Cyniclomyces guttulatus*

Cyniclomyces guttulatus é um ascomiceto e está naturalmente associada ao trato gastrointestinal de coelhos, cobaias e chinchilas e, é considerado um microrganismo oportunista que foi associado a causa de diarreia em cães (ZIERDT et al., 1988). Este agente etiológico é normalmente encontrado no trato digestivo de coelhos e pode ser isolado de diferentes amostras, incluindo fezes secas e úmidas, conteúdo estomacal (FLAUSINO; BARONI, 2009).

Segundo Kirk et al. (2008), apresenta a seguinte classificação:

Império: Eukaryota Corliss, 1994

Reino: Fungi Jahn e Jahn, 1949

Filo: Ascomycota Bold, 1957

Classe: Saccharomycetes Winter, 1881

Ordem: Saccharomycetales Kudrjanzev, 1960

Família: Saccharomycetaceae Winter, 1881 (*incerta sedis*)

Gênero: *Cyniclomyces* Van Der Walt e Scott, 1971

Espécie: *Cyniclomyces guttulatus* (Robin, 1853) Van Der Walt e Scott, 1971

Foi observado pela primeira vez, *in situ*, por Remak em 1845 no trato digestório e nas fezes de coelhos e de roedores domésticos e silvestres (PHAFF; MILLER, 1958). Sua classificação modificou-se várias vezes até chegar na denominação atual, através de Van Der Walt e Scott, (1971) que propuseram a criação de um novo gênero denominado *Cyniclomyces*, tendo como única espécie descrita *C. guttulatus* (FLAUSINO, 2013).

As células de *C. guttulatus* são caracterizadas por apresentarem-se de forma cilíndrica alongada, isoladas, em duplas ou em cadeias curtas (SHIFRINE; PHAFF, 1958). Entretanto, Flausino et al. (2012) observaram longas cadeias formando pseudo-hifas em lavado estomacal de cães, fato até então não observado. Sua reprodução ocorre por brotamento bipolar em base larga. Quando cultivadas em meio líquido formam pseudomicélio. Entretanto, hifas verdadeiras não são formadas. Podem ser vistas tanto em sua forma vegetativa, no estômago ou nas fezes, quanto ascosporada nas fezes (raramente), contendo

nesta última de um a quatro ou até seis ascósporos ovais ou cilíndricos (PHAFF; MILLER, 1971; KURTZMAN; FELL, 1998).

Com relação a sua fisiologia são fermentadores de carboidratos, com crescimento condicionado a temperaturas entre 30°C e 40°C (BUECHER; PHAFF, 1972; KURTZMAN; FELL, 1998), sendo que Zierdt et al. (1988) verificaram um melhor crescimento entre 38°C e 42°C. São dependentes de altos teores (10-20%) de CO₂ (RICHLE; SCHOLER, 1961; BUECHER; PHAFF, 1970; BUECHER; PHAFF, 1972; ZIERDT et al., 1988, KURTZMAN; FELL, 1998; FLAUSINO; BARONI, 2009). Em provas bioquímicas foram observadas a produção de urease e fraca fermentação de maltose e manitol (FLAUSINO; BARONI, 2009), ambas não observadas previamente (PARLE, 1956; SHIFRINE; PHAFF, 1958; RICHLE; SCHOLER, 1961). Segundo Zierdt et al. (1988), o condicionamento do crescimento de *C. guttulatus* a baixos valores de pH e a diversidade de meios existentes refletem a dificuldade do seu cultivo.

O isolamento e manuseio foram desenvolvidos por Flausino e Baroni (2009) no Brasil. Seus isolados podem ser mantidos por um longo período através de sucessivas sementeiras em meio YPG e YPGA modificado (FLAUSINO; BARONI, 2009) apesar de ser considerado um microrganismo de grande dificuldade de isolamento e manutenção (PARLE, 1956; SHIFRINE; PHAFF, 1958, 1959; RICHLE; SCHOLER, 1961; BUECHER; PHAFF, 1970, 1972; PHAFF; MILLER, 1971; ZIERDT et al., 1988).

Devido a dificuldade em seu cultivo causada pela elevada demanda nutricional, poucos são os estudos moleculares relacionados a esta levedura. Até o presente momento, uma cepa encontrada em coelhos (KURTZMAN; ROBNET, 1998) e outra em cães (GJERDE et al., 2009) foram identificadas, sequências da região D1/D2 26SrDNA foram depositadas no GenBank / NIH, EUA, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) da mesma maneira que os isolados encontrados em coelhos e cães (FLAUSINO et al., 2012) no Brasil também foram depositados. Kurtzman e Robnet, depositaram em 2013 as sequências parciais para os genes 18S, Translation elongation factor, 26S rDNA e RNA polimerases I e II.

Segundo Shifrine e Phaff (1958), o ciclo biológico de *C. guttulatus* está relacionado à coprofagia e a eliminação de ascósporos nas fezes. Porém, Zierdt et al. (1988) relataram que, na ausência de coprofagia, provavelmente ocorra auto sustentação. Já, Buecher e Phaff (1972) pensaram na possibilidade da ocorrência de um quimiostato natural no estômago de coelho.

Até o presente, não são conhecidos benefícios, bem como, não são conhecidas as alterações associadas à presença deste leveduriforme (ZIERDT et al., 1988). Ainda, com base em Zierdt et al.(1988), uma camada destas leveduras forma uma barreira entre os conteúdos do lúmen estomacal e a superfície da mucosa. Com a alta taxa de reprodução, as leveduras são eliminadas nas fezes. Podem apresentar um potencial patogênico oportunista que se manifesta quando ocorre um desequilíbrio nos mecanismos de defesa ou comprometimento das barreiras físicas de proteção.

2.5.2.1 Em coelhos e cobaias

Conhecido há mais de 150 anos como habitante do trato gastrintestinal de coelhos e, há 51 anos em roedores (RICHLE; SCHOLER, 1961), *C. guttulatus* está associado a áreas da superfície da mucosa estomacal de ratos, camundongos e de outros roedores, onde formam um revestimento interno extracelular (ZIERDT et al., 1988).

Outros animais colonizados por esta levedura incluem coelhos selvagens e chinchilas (RICHLE; SCHOLER, 1961; ZIERDT et al., 1988), os coelhos domésticos, porquinhos-da-índia (ZIERDT et al., 1988) e a lebre selvagem da Califórnia (*Lepus californicus* Gray, 1837).

Apesar da controvérsia quanto a sua patogenicidade, este microrganismo já foi suspeito de ter causado diarreia crônica em coelhos (RICHLE; SCHOLER, 1961) e, atualmente na Europa é considerado como um dos agentes etiológicos associados a casos de diarreia em coelhos e chinchilas (ANONIMO, 2000; FLAUSINO et al., 2013).

2.5.2.2 Em cães

Apesar de *C. guttulatus* não ser reconhecido como habitante natural em carnívoros (SHIFRINE; PHAFF, 1958), esta levedura foi observada por Saito et al. (1984) em cães no Japão e subsequentemente Howers e Blankenstein (2001) relataram o mesmo achado em cães que tiveram diarreia. Há casos de diarreia em cães na Europa, EUA e Japão (HOUWERS; BLANKENSTEIN, 2001; NEEL et al., 2006; GJERDE et al., 2009; DIJKSTRA et al., 2010; SAITO et al. 2012). Casos recentes foram observados em cães, no município do Rio de Janeiro, sendo que um deles com sintomas de gastroenterite hemorrágica (FLAUSINO et al., 2012), em cães com histórico de gastrite e colangiohepatite (FURTADO et al., 2013) e em cães com diarreia na Holanda porém sem significado clínico (Mandiger et al., 2014).

Howers e Blankenstein (2001) relataram a observação desta levedura em 15% de amostras de fezes de cães que tiveram diarreia crônica, quando consultados no Centro de Diagnóstico Microbiológico Veterinário na Holanda. Estes autores sugeriram que a explicação para a presença desta levedura no trato digestório dos cães devia-se a um processo de queda de resistência, permitindo sua infecção de forma secundária e sua colonização.

Peter e Howers (2009) já tinham observado esta levedura em grande quantidade nas fezes de um gato com diarreia. Entretanto, Flausino et al. (2012) observaram *C. guttulatus* em 34 (24,61%) de um total de 66 cães examinados em uma clínica veterinária no município do Rio de Janeiro, Brasil. Dos animais positivos, três tinham quadro clínico característico de gastroenterite e, de um deles, isolaram esta levedura. Mandiger et al., 2014, afirmaram que mesmo quando a diarreia crônica é diagnóstica, a presença de *C. guttulatus* não tem significado clínico pois mesmo após o tratamento com antifúngicos (13/21) dos animais voltaram a apresentar diarreia porém sem a presença de *C. guttulatus* nas fezes. Desta maneira, a infecção por *C. guttulatus* pode desencadear um desequilíbrio nas funções gastrintestinais agravando o quadro da diarreia sem ser a causa principal da mesma, sendo assim considerado um achado incidental.

2.5.3 Diagnóstico Diferencial

O diagnóstico diferencial é necessário sempre que ocorre dúvida quanto a identificação da levedura para a escolha do melhor método de tratamento evitando equívocos, envolvendo aspectos clínicos e laboratoriais. O diagnóstico diferencial varia conforme o microrganismo. No caso de *C. guttulatus* este diagnóstico deve incluir os prováveis patógenos fúngicos e parasitos que causam diarreia.

Segundo Van Praag (2009) as células de *C. guttulatus* na sua fase gastrintestinal devem ser diagnosticadas com cuidado, pois podem ser confundidas com formas exógenas das espécies do gênero *Eimeria* de coelhos. Esta afirmativa foi também assinalada por Costa et al. (2001), em relação a formas endógenas, quando trabalharam com a infecção experimental de *Cystoisospora felis* em coelhos domésticos. Flausino et al (2013) também

relataram a possibilidade de confundir os estágios endógenos de *Eimeria caviae* com *C. guttulatus*, em cobaias.

2.6 HISTÓRICO DE SUA POSSÍVEL PATOGENICIDADE OU INFECÇÃO INTERCORRENTE

Como assinalado por Ettinger (1996) vômitos e diarreias são considerados os principais sintomas clínicos das doenças gastrintestinais em animais. Vômito é a principal manifestação clínica de alterações do estômago, enquanto diarreia é uma perturbação na função do intestino delgado ou grosso (ETTINGER, 1996). As infecções bacterianas, virais e parasitárias representadas em sua maioria por casos de diarreia, enquanto as causas não infecciosas de diarreia incluem drogas, condições cirúrgicas, infecções sistêmicas e intolerância alimentar. Nas doenças infecciosas, as alterações na dieta, podem desempenhar um papel importante através da indução de um desequilíbrio da microbiota intestinal. Diarreia em cães e gatos pode variar de um evento de curta duração discreto, até manifestações clínicas graves que podem levar à morte. Casos de diarreia podem ser classificados como aguda ou crônica. Nos casos mais graves são frequentemente sinais clínicos de início repentino e geralmente persistem durante alguns dias, com a consistência das fezes de aquosas, aquosa com muco, embora, em casos graves, podem ser sanguinolenta. Em contraste, os casos crônicos podem se estender por semanas ou meses e podem demonstrar um padrão de recorrências periódicas, com os animais passando por períodos alternados de melhora e piora da condição.

A maioria das espécies de leveduras associadas com cães é considerada como organismos comensais, como *Candida* sp., *Malassezia pachydermatis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhodotorula* sp., fazendo parte da microbiota normal dos cães em vários sítios anatômicos (BRITTO et al., 2009). No entanto, os membros destes gêneros também foram descritos como agentes etiológicos de infecções localizadas e sistêmicas em humanos e em vários animais, incluindo cães, muitas vezes como consequência de distúrbios nas barreiras físico-químicas ou imunológicas de defesa do hospedeiro (CAFARCHIA; OTRANTO, 2004; SILVA et al., 2011; WIRTH; GOLDANI, 2012). Relatos de leveduras associadas à diarreia em cães, ou em qualquer outro animal, são escassos. Porém, *C. guttulatus* tem sido associado a casos de diarreia em coelhos na Suíça (RICHLE; SCHOLER, 1961) e nos EUA (HERSEY, 2008). Além disso, a presença desta levedura em grande número nas fezes de gatos e cães com diarreia foi relatada por pesquisadores holandeses (HOUWERS; BLANKENSTEIN, 2001; PETERS; HOUWERS, 2009), em um cão com gastroenterite recorrente na Noruega (GJERDE et al., 2009), e foi associado com um caso de diarreia hemorrágica em um Labrador Retriever no Japão (SAITO et al., 2009).

Além disso, *C. guttulatus* foi também relatada como responsável secundário de infecções gastrintestinais em Rottweilers na Holanda (DIJKSTRA, 2010) e foi observado, aparentemente como um achado incidental, na bile e fezes de um Labrador Retriever diagnosticado com colecistite enfisematosa nos EUA (NEEL et al., 2006). Também no Brasil foi relatada em três cães (um Rottweiler, um Husky Siberiano e um Shih Tzu) que tiveram histórico médico recorrente de problemas gastrintestinais caracterizados por vômito, diarreia e ocasionalmente diarreia sanguinolenta (FLAUSINO et al., 2012).

2.7 MARCADORES MOLECULARES EMPREGADOS NA IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS

2.7.1 PCR

A PCR foi considerada como uma técnica revolucionária permitindo um rápido desenvolvimento no estudo das sequências dos ácidos nucleicos. Esta técnica foi desenvolvida por Kary Banks Mullis em 1983 e consiste na síntese enzimática de cópias de ácidos nucleicos *in vitro*. Assim, é possível a obtenção de várias cópias de uma sequência específica de DNA a partir de uma fita molde (COSTA, 2009).

O princípio da PCR envolve três etapas básicas por ciclo, estimuladas pelo calor e repetidas várias vezes em ciclos:- Abertura da fita de DNA que servirá de molde, por desnaturação térmica;- Pareamento de oligonucleotídeos sintéticos (primers ou iniciadores), que funcionam como iniciadores da reação de polimerização, a cada uma das fitas do DNA molde, à região complementar da fita que sofrerá a duplicação;- Polimerização, através de uma enzima polimerase, das novas fitas de DNA a partir de cada um dos iniciadores, utilizando cada um dos quatro dNTPs como substrato da reação de polimerização.

Nas últimas décadas vários métodos baseados na PCR vêm sendo desenvolvidos para detecção de leveduras, entre eles os que têm como alvo microssatélites, DNA da mitocôndria (mtDNA), sequências genômicas repetitivas e DNA codificadores dos RNA's ribossomais (MARCOS; PINCUS, 2013).

Várias técnicas baseadas em PCR vem sendo sugeridas para a identificação de espécies fúngicas. Métodos baseados em PCR são fáceis de se aplicar e tem a vantagem de exigir quantidades pequenas de material de partida ou DNA molde (XU, 2006; KURTZMAN, 2014).

2.7.2 RFLP

RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism" ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição) é um marcador molecular baseado no polimorfismo de fragmentos gerados por corte da fita dupla de DNA, que é obtido pela fragmentação do DNA através do uso de endonucleases de restrição gerando perfis de restrição, tem mostrado resultados promissores para a caracterização de várias espécies de leveduras (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; PHAM et al., 2011; ECHEVERRIGARA et al., 2013). Tem como princípio, que as diferenças genéticas entre os indivíduos podem criar sítios de restrição e essas diferenças podem ser visualizadas por separação em eletroforese após a digestão com endonucleases de restrição (TROST et al., 2004).

2.7.3 PCR-RFLP

A análise do (RFLP) de produtos de PCR (PCR-RFLP) é uma técnica simples e rápida e fornece resultados confiáveis (TROST et al., 2004). Também chamada de CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences), esta é uma técnica que combina o PCR com o RFLP envolvendo 3 etapas: amplificação, digestão e separação em gel (agarose ou poliacrilamida)

por eletroforese. Essa união permitiu a distinção entre diferentes espécies de leveduras (ECHEVERRIGARA et al., 2013).

Na análise de PCR-RFLP, a detecção de padrões polimórficos entre indivíduos é baseado em diferenças nos tamanhos dos fragmentos de restrição obtidos a partir da região do DNA amplificado gerado por uma endonuclease específica ou um conjunto múltiplo de enzimas de restrição. Apresenta algumas vantagens como, fácil implementação e interpretação, fácil manuseio dos equipamentos necessários para a realização da técnica, uso de grandes quantidades de amostras (TROST et al., 2004).

Para o diagnóstico molecular de doenças fúngicas, utilizando procedimentos de amplificação de DNA, a escolha do alvo adequado, identificação rápida e barata dos produtos de PCR são pré-requisitos importantes. A maioria dos procedimentos de diagnóstico, até agora descritos são caracterizados pela aplicabilidade limitada, custo elevado de equipamentos de laboratório ou baixo poder de discriminação entre as espécies (GARNER, 2010). Um procedimento simples e barato é fundamental para a identificação rápida de leveduras clinicamente relevantes. Os genes codificadores dos RNA's ribossomais são mais utilizados como alvos nos sistemas baseados em PCR para detecção e identificação de fungos.

2.7.4 O gene 26S rDNA

O DNA ribossomal (rDNA) tem sido apontado como sendo um alvo valioso para estudos de sistemática molecular tanto de organismos relacionados quanto de organismos distantes, devido a essa região ser muito conservada e estar presente em todos os eucariontes.

A região do domínio D1/D2 do gene 26S rDNA contém várias regiões de sequências altamente conservadas e úteis para identificação de espécies e pode ser amplificada por PCR para todas as espécies com apenas um par de iniciadores. (KURTZMAN; ROBNETT, 1998; KURTZMAN, 2014). A análise desta região proporciona uma melhor identificação das leveduras isoladas quando comparados a outros métodos (GARNER, 2010).

Kurtzman e Robnett (1998), afirmam que uma elevada diferença de nucleotídeos entre os indivíduos pode ser indicativo de uma nova espécie. Indivíduos que apresentam uma diferença maior que 1% entre os nucleotídeos (acima de 6 nucleotídeos) são consideradas espécies diferentes e os indivíduos que apresentam de 0-3 nucleotídeos de diferenças são consideradas espécies irmãs.

2.7.5 Sequenciamento

O sequenciamento de DNA é uma técnica que tem como objetivo determinar a ordem das bases nitrogenadas da molécula de DNA. Consiste em uma série de métodos bioquímicos que determinam a sequência de bases de cada fragmento da molécula de DNA.

A importância do sequenciamento de DNA é o conhecimento da sequência de bases de um gene que fornece informações importantes sobre sua estrutura, função e relação evolutiva com outros genes (de um mesmo organismo ou de organismos diferentes)

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PROCEDÊNCIA DAS AMOSTRAS

Um total de 23 isolados de *C. guttulatus* coletados de coelhos (15 isolados), Cães (7 isolados) e porquinho da índia (1 isolado) foram utilizados neste estudo (Tabelas 1 e 2). O material oriundo dos cães foi cedido pelo Centro de Terapia Intensiva e Emergência Veterinária (CTI Vet), localizado na Barra da Tijuca, Rio de Janeiro, RJ conforme declaração no anexo 1. Além disso, a metodologia foi avaliada pela CEUA/IV/UFRRJ protocolo 009759.

Tabela 1. Amostras de *Cyniclomyces guttulatus* de Cães utilizadas no estudo

Código da Amostra	Data do Isolamento	Fonte do material
Husky*	2011	Lavado estomacal
CL1	16/08/2012	Lavado estomacal
CL2	03/09/2012	Lavado estomacal
CF1 (Tequila)	14/05/2013	Fezes
CF2 (Lalá)	31/07/2013	Fezes
CF3 (Thor)	31/07/2013	Fezes
CF4 (Cão novembro)	08/09/2014	Fezes

*DNA cedido pelo Dr. Gilberto Flausino.

Os cães CL1 e CL2, estavam internados com quadro grave de doença gastrointestinal e diarreia constante. CF1 é um cão sem histórico de diarreia e tinha o hábito de lamber coco. CF2 e CF3 não apresentavam diarreia era apenas um exame de rotina. CF4 não apresentava sinais de doença gastrointestinal.

Tabela 2. Origem, fonte e grupo ("sequence type") das culturas de *Cyniclomyces guttulatus* isoladas de coelhos e cobaias

Amostra	Origem	Fonte do Material	Grupo ST's
R1	LQEPV*	Fezes	1
R2	LQEPV	Fezes	2
R3	LQEPV	Fezes	1
R4	LQEPV	Fezes	1
R5	LQEPV	Fezes	1
R6	LQEPV	Fezes	2
R7	LQEPV	Fezes	2
R8	IZ/UFRRJ **	Fezes	3
R9	IZ/UFRRJ	Fezes	2
R8 (7-7-13)	IZ/UFRRJ	Fezes	2
Coelho 14-05	IZ/UFRRJ	Conteúdo Estomacal	2
Coelho 1	IZ/UFRRJ	Conteúdo Estomacal	2
Coelho 2	IZ/UFRRJ	Conteúdo Estomacal	2
Coelho 3	IZ/UFRRJ	Conteúdo Estomacal	2
Coelho 4	IZ/UFRRJ	Conteúdo Estomacal	2
Porquinho-da-Índia	Seropédica	Fezes	2

* Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária; ** Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Tabela referente aos dados do sequenciamento (sessão 4.4).

As fezes dos coelhos foram cedidas pelo LQEPV (Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária) e o conteúdo estomacal pelo Instituto de Zootecnia após o descarte dos coelhos.

As outras espécies de leveduras utilizadas, tais como: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula* sp. e *Malassezia pachydermatis*, foram cedidas da coleção do Professor Dr. Carlos Alberto da Rocha Rosa da UFRRJ, através da Professora Dra. Kelly Moura Keller da UFMG.

3.2 AVALIAÇÃO LABORATORIAL

Toda metodologia para isolamento de *C. guttulatus* foi desenvolvida no Laboratório de Coccídios e Coccidioses (LCC) do antigo PSA (Embrapa/UFRRJ), Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Anexo 1 do Instituto de Veterinária (IV) desta IFES. A metodologia de identificação molecular foi realizada no Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular (Lab BioMol)/DPA/IV/UFRRJ.

3.2.1 Identificação Morfológica e Isolamento das amostras de *Cyniclomyces guttulatus*

A presença de *C. guttulatus* foi inicialmente determinada através da análise de uma gota de suspensão de fezes em água destilada autoclavada, corada entre lâmina e lamínula com azul de algodão lactofenol. Amostras suspeitas de estarem positivas para esta leveduras foram cultivadas como descrito em seguida.

As leveduras foram cultivadas baseado na descrição de Phaff e Miller (1971) com modificações descritas por Flausino e Baroni (2009). Uma alíquota das amostras de fezes foi resuspensas em solução salina 0,85%, corados com azul de algodão e visualizadas, em microscópio ótico. Após a visualização, a suspensão de fezes foi semeada em meio YPG (1% extrato de levedura, 1% de peptona de proteose, 20% glicose, água destilada e pH 3 ajustado com HCl 1N), autoclavado a 120°C durante 15 minutos e YPGA (meio sólido através da adição de 2% agar-agar), também autoclavado antes de ser distribuído em condições assépticas nas placas de petri estéreis. Antibiótico (ampicilina 3mg/mL) foi adicionado ao meio para inibir o crescimento de bactérias gastrintestinais. A incubação foi feita por 24-48hrs em 37° C e alto teor de CO₂ (10-20%) e saturação de umidade.

Os isolados de *C. guttulatus* foram mantidos em laboratório, por sucessivas sementeiras a cada 72 horas em placas de YPGA para análises complementares.

3.2.2 Preparação de Culturas Estoque

Visando análises futuras, foi realizado o processo de criopreservação das culturas consideradas suspeitas de *C. guttulatus*, através do processo de criopreservação em freezer - 80°C. Para isto, uma colônia identificada como *C. guttulatus*, foi colocada em 3mL de meio YPG e incubada por 24-72horas para crescimento. Após o período de incubação foi centrifugado a 5000xg. O pellet formado foi resuspendido em 1mL de meio YPG e 500µL de glicerol 50% (concentração final de glicerol 16.7%) e foi congelado em criotubos de 2mL.

3.2.3 Identificação Bioquímica - Zimograma

Para a caracterização foi utilizada a metodologia de Buecher e Phaff (1972), com modificações. Foram testados no zimograma os carboidratos glicose, sacarose, maltose, manitol, lactose, galactose e rafinose, em fungo leveduriforme com características morfológicas condizentes com *C. guttulatus* isolado de coelho e cães.

Para isto foi utilizado 4,5mL de um meio básico que consiste no caldo YP (1% extrato de levedura + 1% peptona de proteose) acrescido de Azul de Bromotimol como indicador de pH ácido e 10% de uma solução a 30% do carboidrato a ser testado (concentração final de carboidrato de 3%). Tubos de ensaio com dimensões de 100 x 10 mm, previamente lavados com detergente. Tubos de Durham invertidos, lavados e secos com a mesma metodologia acima descrita, foram colocados dentro dos tubos anteriormente descritos, para observação da produção de gás. Após, o meio básico foi esterilizado por autoclavagem a 120 °C por 15 minutos. Sob condições de esterilidade, em capela de fluxo laminar, foi adicionado em cada tubo 0,5 mL de solução a 30% dos respectivos carboidratos, e esterilizada por vapor fluyente,

em triplicata. Para os controles negativos (sem açúcar) foi adicionado 0,5mL de água destilada estéril em cada tubo.

A suspensão de leveduras foi preparada em capela de fluxo laminar onde foram retiradas 4 alçadas de massa colonial de cultivo recente, de acordo com a técnica descrita por Flausino e Baroni (2009). As amostras foram suspensas em tubos de fundo cônico com capacidade de 50 mL, em 5 mL de solução salina a 0,85%, previamente esterilizada por autoclavação. As amostras foram lavadas por 3(três) vezes consecutivas, por centrifugação, a 700 xg por 3 minutos e, após a última lavada, o precipitado foi resuspenso em 25 mL da mesma solução, estando, assim, preparada para semeadura no caldo contendo os carboidratos.

Foi adicionado 500 µL da suspensão de leveduras aos tubos com os respectivos carboidratos e os mesmos foram incubados a 37 °C em estufa bacteriológica, por um período de cinco dias, com leituras diárias.

3.2.4 Identificação Molecular

3.2.4.1 Extração de DNA

Em condições de esterilidade, uma colônia isolada de *C. guttulatus* foi retirada e ressuspenso em 250µl de PBS pH 7,2(Fosfato de Sódio Bibásico, de Fosfato de Sódio Monobásico e Cloreto de Sódio pH 7,2-7,4)em microtubos fundo cônicos de 1,5mL e tampa rosca contendo 50µg de esferas de vidro - “glass beads” (425-600 µm; Sigma-Aldrich; product # G8772). Os tubos foram submetidos a um ciclo de 1 minuto no mini-beadbeater-16^a e as células lisadas em 250µl de solução de lise celular duas vezes concentrada (20mM Tris-HCl pH 8,0, 20mM EDTA pH 8,0, 400mM NaCl, 1% Dodecil Sulfato de Sódio) e incubada por 15 minutos a 56°C. Após a lise, o DNA foi extraído por sucessivas etapas de fenol (pH 7.4-7.8 BioAgency) e fenol/clorofórmio, (Bioagency), seguido de centrifugação por 10 minutos 16.000 xg. Precipitação com isopropanol (MERCK) durante 20 minutos em temperatura ambiente e centrifugação por 10 minutos 16.000 xg seguidos de duas lavagens com etanol 70% e centrifugação por 2minutos a 16.000 xg para retirar o excesso de sal e ressuspenso em 50µl de água destilada para biologia molecular e armazenado em freezer - 20°C.

3.2.4.2 PCR do gene 26S rDNA

Foi realizada a PCR seguindo as condições descritas por Kurtzman e Robnett (1998), com modificações, para gerar um fragmento de aproximadamente 630 pares de bases (pb) da região do domínio D1/D2 do gene 26SDNA ribossomal (rDNA). Amplificação foi feita utilizando-se 2µL de DNA, 200 µM de dNTPs, 2,5mM de MgCl₂, 20pmol de cada primer e 0,5U de Platinum Taq DNA polimerase em um volume final de 25 µL). Os iniciadores utilizados foram: NL1 (5'-TGCTGGAGCCATGGATC-3') e NL4 (5'-AACGGCTTCGACAACAGC-3') e utilizou-se um programa de 5min 94 °C (para ativar a enzima) seguidos de 30ciclos 94°C por 1min, 52°C por 30seg, 72°C por 45seg, e uma extensão final de 72 °C por 5min em termociclador^d. Uma alíquota de 5µL da reação de PCR foi examinada por eletroforese em gel de agarose (1,5%), corado com brometo de etídio (2,5µg/mL), para confirmar a presença do amplicon apropriado.

Foi utilizado para testar a sensibilidade da técnica de PCR uma diluição seriada a partir de uma amostra de DNA (concentração de 100ng/ul) da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O DNA desta levedura foi extraído e quantificado (nanodrop) e depois de feita uma diluição seriada (fator de 10) para obter concentrações de (10ng/μL à 1 fg/μL), a fim de evidenciar até qual diluição poderia gerar uma banda visível e assim determinou a eficácia da amplificação. Os fragmentos gerados foram visualizados por eletroforese (5V/cm) por 60 minutos, em gel de agarose 1,5% em tampão TAE 1X e corados com brometo de etídio (2,5μg/mL) e visualizados em fotodocumentador^b.

Em todas as reações de PCR realizadas neste estudo foram incorporados dois controles negativos. O primeiro destes compreendia uma amostra em que o DNA de teste foi substituído pela mesma quantidade de água para biologia molecular, que foi adicionada ao tubo antes destes serem retirados do ambiente (livres de DNA) no qual as misturas para a reação da PCR foram preparadas e distribuídas para os tubos de reação individuais. Este controle, denominados água dentro, serviu para confirmar que os componentes da mistura da reação estavam livres de DNA contaminante. O segundo controle negativo denominado água fora, também foi composto de um tubo pelo qual o DNA foi substituído por um volume equivalente de água para biologia molecular. No entanto, este tubo controle foi mantido no ambiente (potencialmente contaminado por DNA), durante o período em que o DNA teste foi adicionado aos tubos individuais, contendo alíquotas da mistura principal para PCR. Este foi sempre o último tubo a ser preparado. Deste modo, o controle que foi intitulado água fora, serviu para determinar se havia ocorrido contaminação durante o processo de adição de amostras de DNA teste nos tubos individuais de reação. Uma reação positiva em qualquer controle negativo invalidava todas e quaisquer reações positivas registradas com o DNA teste das amostras.

3.2.4.3 PCR - RFLP (gene 26s rDNA região D1-D2)

Após a confirmação da amplificação do fragmento do tamanho esperada foi realizada a técnica de PCR-RFLP. Primeiro foi feita uma análise de digestão *in silico* empregando o programa NEBcutter (New England Biolabs, EUA). Para este fim foram empregadas sequências que corresponderam ao domínio D1-D2 de uma variedade de espécies de leveduras, associadas à microbiota fúngica normal de cães no Brasil (BRITO et al., 2009) e duas sequências de *C. guttulatus* previamente depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Nesta análise foram testadas as enzimas de restrição *DdeI*, *HaeIII*, *Hinf I*, *Hha I*, *MspI*, *NdeI*, *RsaI*, *SspI* e *SstI*. Esta análise revelou que seria possível gerar padrões de bandas específicas para cada uma das diferentes espécies de leveduras usando um combinação das enzimas *MspI*, *HaeIII* e *DdeI* e estas poderiam ser usadas para fornecer padrões de bandas distintas e características de *C. guttulatus*.

Após a escolha das enzimas, foi retirado uma alíquota de amplicon, que variava de 5-10 μl de acordo para que se tivesse 150ng de amplicon para o corte com as enzimas de restrição. A este, foi acrescentado 1,5 μl de tampão 10X concentrado, 0,5 μl de enzima e água até completar o volume final de 15 μl. Esta mistura foi incubado a 37°C por 2 horas. Os produtos dessa digestão foram visualizados através de eletroforese a 120V/1 hora em gel de poliacrilamida 8% em tampão TBE (45mM Tris, Ácido Bórico e 1mM EDTA). Os géis foram corados com brometo de etídio (2,5μg/mL) e visualizados em fotodocumentador^b. Os fragmentos gerados foram analisados com o auxílio do programa Quantity-One (BioRad, EUA) para determinar o tamanho dos fragmentos, em pares de bases, gerados pelos cortes com as enzimas e estes foram comparados com os padrões gerados nas análises *in silico*.

3.2.4.4 Sequenciamento

Amplicons gerados de todos os isolados de *C. guttulatus* (15 coelhos, 7 cães e 1 porquinho-da-Índia) foram purificados com *Exo-SAP-IT* (*GE Healthcare Life Sciences*, EUA) e submetidos as reações de sequenciamento através do “BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit” (*Applied Biosystems*, EUA). Após a reação, a remoção dos nucleotídeos não incorporados foi feita através da precipitação com EDTA/etanol seguido por ressuspensão em 10 µL de formamida (*Applied Biosystems*, EUA). Todo o sequenciamento foi realizado usando o sequenciador de DNA automático 3500 Genetic Analyzer^c, localizado no Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, UFRRJ, Campus Seropédica, RJ. “Contigs” foram montados utilizando o programa SEQUENCHER 5.2.4 (Gene Codes). As sequências obtidas foram identificadas usando o programa BlastN, junto com o banco de dados GenBank. Todas as amostras foram sequenciadas pelo menos duas vezes usando amplicons gerados de reações individuais de PCR.