

MARCELO FABIANO GOMES BORIOLLO

Biólogo

**ESTUDO DO PERFIL ELETROFORÉTICO
DE PROTEÍNAS INTRACELULARES DE *Candida albicans*
ISOLADAS DA CAVIDADE BUCAL DE ESCOLARES**

*Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da
Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção do Título de MESTRE em
BIOLOGIA E PATOLOGIA BUCO-
DENTAL*

PIRACICABA

2000

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
BIBLIOTECA



1150042148



FOP

MARCELO FABIANO GOMES BORIOLLO T/UNICAMP B644e

Biólogo

**ESTUDO DO PERFIL ELETROFORÉTICO
DE PROTEÍNAS INTRACELULARES DE *Candida albicans*
ISOLADAS DA CAVIDADE BUCAL DE ESCOLARES**

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83
CPG, 15/05/2000

Assinatura do Orientador

*Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da
Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção do Título de MESTRE em
BIOLOGIA E PATOLOGIA BUCO-
DENTAL*

Orientador: *Prof. Dr. José Francisco Höfling*
Titular da Disciplina de Microbiologia e
Imunologia, FOP-UNICAMP

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Francisco Höfling
Prof. Dr. Mario Tsunezi Shimizu
Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves

1504

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	FO-P
N.º CHAMADA:	7/Unicamp
	136442
V.	Es.
TOMBO BC/	42198
PROC.	16-278100
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 99,00
DATA	19/09/00
N.º CPD	

Pablo Id: 0205737

CM-00144290-0

Ficha Catalográfica

B644e Boriollo, Marcelo Fabiano Gomes.
Estudo do perfil eletroforético de proteínas intracelulares de *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal de escolares. /Marcelo Fabiano Gomes Boriollo. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2000.
148p. : il.

Orientador : Prof. Dr. José Francisco Höfling
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Eletroforese em gel. 2. Análise numérica. 3. *Candida albicans*. I. Höfling, José Francisco. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB / 8 – 6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba / UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 29 de Fevereiro de 2000, considerou o candidato MARCELO FABIANO GOMES BORIOLLO aprovado.

1. Prof. Dr. JOSE FRANCISCO HOFLING

Handwritten signature of Jose Francisco Hofling in black ink.

2. Prof. Dr. MARIO TSUMEZI SHIMIZU

Handwritten signature of Mario Tsumezi Shimizu in black ink.

3. Prof. Dr. REGINALDO BRUNO GONCALVES

Handwritten signature of Reginaldo Bruno Goncalves in black ink.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ...

... Aos meus pais Laércio Boriollo e Lourdes Aparecida Gomes Boriollo, pelos conselhos e incentivos que me levaram a seguir esse caminho, pelas colaborações, principalmente para minha educação, pela paciência e sabedoria com que me orientaram e, especialmente, pelo amor que me proporcionaram durante toda minha vida.

... À Mirela Farias da Silva, pela compreensão dos momentos ausentes, pelo seu amor, carinho, confiança, paciência e incentivo.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao amigo Dr. José Francisco Höfling, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, professor Titular da Disciplina de Microbiologia e Imunologia, cuja competência científica proporcionou orientação segura durante o desenvolvimento desse trabalho, e pela constante confiança depositada desde o princípio.

AGRADECIMENTOS

À Direção da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu Diretor Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum e Diretor Associado Prof. Dr. Frab Norberto Boscolo.

À Coordenadora dos Cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa da Prof.^a Dr.^a Altair Antoninha Del Bel Cury.

Aos Professores da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas.

Dr. Carlos R. H. Fortinguerra (Anatomia).

Dr. Celso Paulino da Costa (Microbiologia e Imunologia).

Dr. Fausto Bérzin (Anatomia).

Dr. Jaime A. Cury (Bioquímica).

Dr. José Merzel (Morfologia).

Dr. Oslei Paes de Almeida (Patologia).

Dr. Pedro Duarte Novaes (Histologia).

Dr. Pedro Luiz Rozalen (Farmacologia e Anestesiologia Terapêutica).

Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves (Microbiologia e Imunologia).

Dr. Sérgio R. P. Line (Histologia).

Dr.^a Cinthia Machado Tabchoury (Bioquímica).

Dr.^a Darcy O. Tosello (Histologia).

Dr.^a Heloisa A. de Lima Castro (Anatomia).

Dr.^a Maria C. F. de Arruda Veiga (Fisiologia).

Dr.^a Silvana Pereira Barros (Histologia).

Ao Dr. Mário Tsunezi Shimizu, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Francisco, Área de Microbiologia e Imunologia, Professor da Disciplina de Microbiologia e Imunologia e Coordenador do curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas.

À Dr^a. Denise M. Palomari Spolidorio, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual de São Paulo, Professora da Disciplina de Microbiologia e Imunologia.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas

Sr. Anderson Laerte Teixeira (Microbiologia e Imunologia).

Sr. Emílio Carlos Salles (Centro de Processamento de Dados)

Sr. José Alfredo da Silva (Bioquímica).

Sr. Waldomiro Vieira Filho (Bioquímica).

Sr^a. Elza M. Thomazini (Microbiologia e Imunologia).

Sr^a. Heloisa Maria Ceccotti (Biblioteca)

Sr^a. Mariza de Jesus Carlos Soares (Bioquímica).

Sr^a. Wilma C. Ferraz (Microbiologia e Imunologia).

Sr^a. Érica Alessandra Pinho (Pós-graduação).

Aos amigos da Disciplina de Microbiologia e Imunologia, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas.

Ao amigo Mestre Edvaldo Antônio Ribeiro Rosa, do curso de Doutorado em Biologia e Patologia Buco-Dental, pelo exemplo de competência em suas atribuições científicas, e papel determinante na minha formação científica.

Sr. Cássio Vicente Pereira (Dentista – Doutorado)

Sr^a. Alessandra Campos (Farmacêutica – Mestrado)

Sr^a. Rosimeire Takaki Rosa, (Farmacêutica – Mestrado)

Sr^{ta}. Cristina Crespo Rodrigues (Bióloga – Mestrado)

Sr^{ta}. Janaina de Oliveira Rodrigues (Bióloga – Mestrado)

Aos amigos Doutorandos e Mestrandos, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelos meios tradicionais oferecidos para o fomento da pesquisa científica.

Meus sinceros agradecimentos.

Amor à Sabedoria

*... A sabedoria inspira a vida aos seus filhos,
ela toma sob a sua proteção aqueles que a procuram,
ela os precede no caminho da justiça.*

*Aquele que a ama, ama a vida,
aqueles que velam para encontrá-la sentirão sua doçura.*

*Aqueles que a possuem terão a vida como herança,
e Deus abençoará todo o lugar onde ela entrar.*

*Aqueles que a servem serão obedientes ao Santo,
aqueles que a amam serão amados por Deus.*

*Aquele que a ouve julgará as nações,
aquele que é atento em contemplá-la permanecerá seguro.*

*Quem nela põe sua confiança ter-la-á como herança
e sua posteridade a possuirá.*

*Pois na provação ela anda com ele,
e escolhe-o em primeiro lugar.*

*Ela traz-lhe o temor, o pavor e a aprovação.
Ela o atormenta com sua penosa disciplina,
até que, tendo-o experimentado nos seus pensamentos,
ela possa confiar nele.*

*Então ela o porá firme, voltará a ele em linha reta.
Ela o cumula de alegria, desvenda-lhe seus segredos
e enriquece-o com tesouros de ciência, de inteligência e de justiça.*

*Porém, se ele se transviar, ela o abandonará,
e o entregará às mãos do seu inimigo. ...*

Sumário

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	17
1. Figuras	17
2. Tabelas	19
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	23
RESUMO	25
ABSTRACT	27
INTRODUÇÃO	29
REVISÃO DE LITERATURA	33
<i>Candida</i> associada à cavidade oral e fatores exógenos	54
MATERIAL E MÉTODOS	59
1. Procedência das Amostras	59
2. Manutenção das amostras	60
3. Padronização da extração das proteínas de componentes intracelulares	61
4. Extração de proteínas intracelulares de <i>Candida albicans</i>	62
5. Determinação da concentração protéica dos extratos de <i>Candida albicans</i>	62
6. Desnaturação das proteínas das amostras de <i>Candida albicans</i>	63
7. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)	63
8. Análise numérica dos perfis eletroforéticos das proteínas intracelulares de <i>Candida albicans</i> obtidos por SDS-PAGE	64
8.1 Processamento das imagens	65
8.2 Construção das matrizes de similaridade	65
8.3 Construção dos dendrogramas de similaridade	66
8.4 Construção das matrizes de correlação cofenética	66
9. Avaliação da reprodutibilidade	67
RESULTADOS	69
1. Perfis protéicos em SDS-PAGE	69
2. Análise dos dendrogramas de similaridade	75
2.1 Análise dos dendrogramas de similaridade para as diferentes classes socioeconômicas ...	75
2.2 Análise dos dendrogramas de similaridade para as diferentes escolas	86
2.3 Análise dos dendrogramas de similaridade contendo todos os isolados	102
3. Avaliação da reprodutibilidade	106
DISCUSSÃO	111
CONCLUSÃO	119

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
APÊNDICES	145
1 Critérios de Classificação Socioeconômica dos Escolares	145
2. Meios de Cultura	146
2.1 Meio Completo para Leveduras (MCL)	146
2.2 Yeast Peptone Dextrose (YPD)	146
3. Soluções	146
3.1 Acrilamida/Bis (30 % T; 2,6 % C)	146
3.2 Corante	146
3.3 Descorante	146
3.4 Fixador PAGE	146
3.5 Fixadora	147
3.6 Gel Empilhador (Stacking Gel) a 4,5%	147
3.7 Gel Separador (Running Gel) a 12,5%	147
3.8 Persulfato de Amônia	147
3.9 Reagente de BRADFORD (1976)	147
3.10 SDS a 10 %	147
3.11 Tampão Dissociante de ALFENAS et al. (1991)	148
3.12 Tampão do Tanque (Eletrodo): Tris-Glicina pH 8,9 (10X)	148
3.13 Tampão Tris-HCl 0,6173 M pH 6,8	148
3.14 Tampão Tris-HCl 3,778 M pH 8,9	148

Lista de Ilustrações

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1. Figuras

Figura 1. Perfis protéicos das linhagens de <i>Candida albicans</i> isoladas de escolares da classe socioeconômica A	69
Figura 2. Perfis protéicos das linhagens de <i>Candida albicans</i> isoladas de escolares da classe socioeconômica A	70
Figura 3. Perfis protéicos das linhagens de <i>Candida albicans</i> isoladas de escolares das classes socioeconômicas A e B	70
Figura 4. Perfis protéicos das linhagens de <i>Candida albicans</i> isoladas de escolares da classe socioeconômica B	71
Figura 5. Perfis protéicos das linhagens de <i>Candida albicans</i> isoladas de escolares da classe socioeconômica B	71
Figura 6. Perfis protéicos das linhagens de <i>Candida albicans</i> isoladas de escolares das classes socioeconômicas B e C	72
Figura 7. Perfis protéicos das linhagens de <i>Candida albicans</i> isoladas de escolares da classe socioeconômica C	72
Figura 8. Perfis protéicos das linhagens de <i>Candida albicans</i> isoladas de escolares das classes socioeconômicas C e D	73
Figura 9. Perfis protéicos das linhagens de <i>Candida albicans</i> isoladas de escolares da classe socioeconômica D	73
Figura 10. Perfis protéicos das linhagens de <i>Candida albicans</i> isoladas de escolares da classe socioeconômica E	74
Figura 11. Perfis protéicos das linhagens de <i>Candida albicans</i> isoladas de escolares da classe socioeconômica E	74
Figura 12. Dendrogramas de similaridade para as linhagens de <i>Candida albicans</i> isoladas de escolares representativos da classe socioeconômica A	76
Figura 13. Dendrogramas de similaridade para as linhagens de <i>Candida albicans</i> isoladas de escolares representativos da classe socioeconômica B	78

Figura 14. Dendrogramas de similaridade para as linhagens de <i>Candida albicans</i> isoladas de escolares representativos da classe socioeconômica C	80
Figura 15. Dendrogramas de similaridade para as linhagens de <i>Candida albicans</i> isoladas de escolares representativos da classe socioeconômica D	82
Figura 16. Dendrogramas de similaridade para as linhagens de <i>Candida albicans</i> isoladas de escolares representativos da classe socioeconômica E	84
Figura 17. Dendrogramas de similaridade para as linhagens de <i>Candida albicans</i> isoladas de escolares representativos da escola AV	86
Figura 18. Dendrogramas de similaridade para as linhagens de <i>Candida albicans</i> isoladas de escolares representativos da escola CS	88
Figura 19. Dendrogramas de similaridade para as linhagens de <i>Candida albicans</i> isoladas de escolares representativos da escola FE	90
Figura 20. Dendrogramas de similaridade para as linhagens de <i>Candida albicans</i> isoladas de escolares representativos da escola FMC	92
Figura 21. Dendrogramas de similaridade para as linhagens de <i>Candida albicans</i> isoladas de escolares representativos da escola HF	94
Figura 22. Dendrogramas de similaridade para as linhagens de <i>Candida albicans</i> isoladas de escolares representativos da escola LAE	96
Figura 23. Dendrogramas de similaridade para as linhagens de <i>Candida albicans</i> isoladas de escolares representativos da escola MA	98
Figura 24. Dendrogramas de similaridade para as linhagens de <i>Candida albicans</i> isoladas de escolares representativos da escola MEP	100
Figura 25a. Dendrogramas de similaridade para as linhagens de <i>Candida albicans</i> isoladas de escolares de cinco classes socioeconômicas, com linhas de corte em 0.6000 (60%) e 0.7000 (70%)	102
Figura 25b. Dendrogramas de similaridade para as linhagens de <i>Candida albicans</i> isoladas de escolares de cinco classes socioeconômicas, com linhas de corte no valor médio	103
Figura 25c. Dendrogramas de similaridade para as linhagens de <i>Candida albicans</i> isoladas de escolares de cinco classes socioeconômicas, com linhas de corte em 0.8000 (80%) e 0.9000 (90%)	104
Figura 26. A – Dendrograma de similaridade para as repetições da linhagem padrão de <i>Candida albicans</i> CBS-562 em diferentes géis. B - Perfis protéicos das repetições da linhagem padrão de <i>Candida albicans</i> CBS-562 em 11 géis	108

Figura 27. Coeficiente de correlação cofenético (r_{cs}) calculado entre <i>S</i> e <i>C</i> para onze repetições da linhagem padrão de <i>Candida albicans</i> CBS-562 em diferentes géis	109
--	-----

2. Tabelas

Tabela 1. Relação das origens das amostras de <i>Candida albicans</i>	59
Tabela 2. Relação das amostras de <i>Candida albicans</i> , isoladas da cavidade oral de escolares de cinco classes socioeconômicas, utilizadas nos experimentos	60
Tabela 3. Diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a classe socioeconômica A	77
Tabela 3.1. Diferentes associações obtidas entre linhagens com diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a classe socioeconômica A	77
Tabela 4. Diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a classe socioeconômica B	79
Tabela 4.1. Diferentes associações obtidas entre linhagens com diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a classe socioeconômica B	79
Tabela 5. Diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a classe socioeconômica C	81
Tabela 5.1. Diferentes associações obtidas entre linhagens com diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a classe socioeconômica C	81
Tabela 6. Diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a classe socioeconômica D	83
Tabela 6.1. Diferentes associações obtidas entre linhagens com diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a classe socioeconômica D	83
Tabela 7. Diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a classe socioeconômica E	85
Tabela 7.1. Diferentes associações obtidas entre linhagens com diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a classe socioeconômica E	85
Tabela 8. Diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a escola AV	87

Tabela 8.1. Diferentes associações obtidas entre linhagens com diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a escola AV	87
Tabela 9. Diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a escola CS	89
Tabela 9.1. Diferentes associações obtidas entre linhagens com diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a escola CS	89
Tabela 10. Diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a escola FE	91
Tabela 10.1. Diferentes associações obtidas entre linhagens com diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a escola FE	91
Tabela 11. Diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a escola FMC	93
Tabela 11.1. Diferentes associações obtidas entre linhagens com diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a escola FMC	93
Tabela 12. Diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a escola HF	95
Tabela 12.1. Diferentes associações obtidas entre linhagens com diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a escola HF	95
Tabela 13. Diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a escola LAE	97
Tabela 13.1. Diferentes associações obtidas entre linhagens com diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a escola LAE	97
Tabela 14. Diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a escola MA	99
Tabela 14.1. Diferentes associações obtidas entre linhagens com diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a escola MA	99
Tabela 15. Diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a escola MEP	101
Tabela 15.1. Diferentes associações obtidas entre linhagens com diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a escola MEP	101
Tabela 16. Diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para escolares de cinco classes socioeconômicas	105

Tabela 16.1. Diferentes associações obtidas entre linhagens com diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para escolares de cinco classes socioeconômicas	106
Tabela 17. Matriz de dados binários representativos dos valores de massas moleculares de cada banda protéica da linhagem padrão de <i>Candida albicans</i> CBS-562, em diferentes géis com <i>intervalo de confiança</i> de $\pm 1,245$ kDa	107
Tabela 18. Matriz de similaridade (<i>S</i>) para onze repetições da linhagem padrão de <i>Candida albicans</i> CBS-562 em diferentes géis	107
Tabela 19. Matriz de correlação cofenética para as onze repetições da linhagem padrão de <i>Candida albicans</i> CBS-562 em diferentes géis	109

Lista de Abreviaturas e Siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[³⁵S] <i>Isótopo 35 do Enxofre</i>	g <i>Gravidade - Unidade de Força Centrífuga</i>
µg <i>Micrograma</i>	HF <i>E.E.P.S.G. "Prof. Honorato Faustino"</i>
µL <i>Microlitro</i>	kbp <i>Kilobases</i>
18S <i>Subunidade Ribossômica com Índice de Sedimentação 18</i>	kDa <i>Kilodaltons</i>
5S <i>Subunidade Ribossômica com Índice de Sedimentação 5</i>	LAE <i>Liceu Colégio "Albert Einstein"</i>
ABA/ABIPEME <i>Associação Brasileira de Anunciantes e pelo Instituto de Pesquisa de Mercado</i>	M.M. <i>Massas Moleculares</i>
AP-PCR <i>Arbitrary Primer Polymerase Chain Reaction</i>	MA <i>E.E.P.S.G. "Prof. Elias de Melo Ayres"</i>
ATP <i>Adenosina Trifosfato</i>	MCL <i>Meio Completo para Leveduras</i>
AV <i>Colégio Alphaville</i>	MEP <i>E.E.P.G. "Prof. Manasses Ephraim Pereira"</i>
C <i>Matriz Cofenética</i>	mg <i>Miligrama</i>
CBS <i>Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Netherlands</i>	mL <i>Mililitro</i>
CS <i>E.E.P.G. "Prof. Carlos Sodero"</i>	mµ <i>Milimicra</i>
DNA <i>Ácido desoxirribonucléico</i>	MLEE <i>Eletroforese de Enzimas Multilocos</i>
EK <i>Electrophoretic Karyotype</i>	mm <i>Milímetro</i>
FE <i>E.E.P.G. "Prof. Francisca Elisa"</i>	mol%C+G <i>Percentual Molar de Guanina adicionado de Citosina</i>
FMC <i>E.E.P.G. "Prof. Francisco Mariano da Costa"</i>	mtDNA <i>Ácido desoxirribonucléico mitocondrial</i>
g <i>Grama - Unidade de Massa</i>	nm <i>Nanômetro</i>
	NMR <i>Nuclear Magnetic Ressonance</i>

NTSYS-pc *Sistema de Análise Multivariada e Taxonomia Numérica - Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System - personal computer*

°C *Escala Célcus de Temperatura*

PAGE *Polyacrylamide Gel Electrophoresis)*

PCR *Polymerase Chain Reaction*

PFGE *Pulsed Feild Gel Electrophoresis*

q.s.p. *Quantidade Suficiente Para*

r_{cs} *Coeficiente de Correlação Cofenética*

REA *Restriction Endonucleasis Analysis*

Rf *Mobilidade Eletroforética Relativa*

RFLP *Restriction Fragment Length Polymorphism*

rpm *Rotações por Minuto*

rRNA *Ácido ribonucléico ribossomômico*

S *Matriz de Similaridade*

SD *Coeficiente de Associação (Similaridade) de Dice*

SDS *Dodecil Sulfato de Sódio - Sodium Dodecyl Sulfate*

SSCP-PCR *Single Strand Conformational Polymorphism*

T.S. *Linhagem-tipo ou Linhagem padrão*

TEMED *Tetrametiletlenodiamina*

Tm *Temperatura de fusão - Melting temperature*

UPGMA *Agrupamento Pareado sem Peso com Significado Aritmético - Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*

UTOs *Unidades Taxonômicas Operacionais - OTU's Operational Taxonomic Units*

YPD *Meio Extrato de Leveduras, Peptona e Glucose - Yeasts Peptone Dextrose*

Resumo

RESUMO

Um total de setenta e cinco amostras de *Candida albicans* isoladas da cavidade oral de escolares saudáveis, do município de Piracicaba, estado de São Paulo, região sudeste do Brasil, com idades variando entre seis e nove anos, provenientes de cinco classes socioeconômicas e oito escolas, foram estudadas. Com base nos dados da literatura, o propósito da presente pesquisa foi analisar os graus de associação (similaridade) entre esses isolados, através da técnica de eletroforese de proteínas intracelulares em gel de poliacrilamida, em sistema descontínuo (SDS-PAGE), com ênfase nos estudos de caracterização epidemiológica desses microrganismos. As amostras foram inoculadas em 50 mL de meio de cultura YPD. Decorrido o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas a 3.000 x g, por 5 minutos. Os sedimentos obtidos foram ressuspensos em água destilada gelada, lavados e fracionados em alíquotas de 0,5mL, os quais foram submetidos ao processo de extração de proteínas por pérolas de vidro. As concentrações de proteínas das amostras foram padronizadas para 800µg/500µL, as quais foram mantidas a - 75 °C até o momento de uso. Os extratos celulares obtidos, foram submetidos à técnica de SDS-PAGE. Após a corrida eletroforética os géis foram revelados. As bandas de proteínas, indicativas do perfil eletroforético de cada amostra, receberam valores 1 (um) para a presença de bandas e 0 (zero) para a ausência das mesmas, numa comparação entre os "lanes". O conjunto desses dados permitiu a confecção de matrizes de dados binários com *intervalo de confiança* de $\pm 1,245$, as quais foram plotadas no pacote estatístico NTSYS-pc 1.70 aplicando o *coeficiente de associação* (similaridade) de Dice. Essas matrizes de similaridade foram tratadas

pelo algoritmo UPGMA, que gerou os dendrogramas que possibilitaram as análises dos graus de similaridade existentes entre os isolados de *Candida albicans*. Os resultados obtidos mostraram a formação de vários “clusters”, presentes nos dendrogramas UPGMA, com características heterogêneas, contendo as amostras de escolares provenientes de diferentes classes socioeconômicas e escolas. Essa heterogeneidade sugere a existência de polimorfismo nessa espécie. A aplicação de proteínas intracelulares para análise numérica de *Candida albicans*, permite a determinação preliminar dos agrupamentos desses isolados, independentemente de suas origens. A diversidade e heterogeneidade dos “clusters”, detectáveis nos diversos dendrogramas, obtidos pela análise do perfil eletroforético dos extratos protéicos dessa espécie, sugerem que a caracterização infraespecífica mais apurada deve envolver marcadores menos sujeitos a interferências de expressão, como por exemplo, aqueles que exploram o polimorfismo de ácidos nucléicos.

Abstract

ABSTRACT

A total of seventy five samples of *Candida albicans*, isolated from the oral cavities of healthy scholars living in Piracicaba city, São Paulo state, southeast area of Brazil, with ages varying from six to nine year-old, and coming from five distinct socioeconomic levels and eight schools, were studied. Based on the literature data, the purpose of the present research was to analyze the association (similarity) degrees existing among those isolates, through the whole-cell polyacrylamide gel electrophoresis technique (SDS-PAGE), with emphasis in to ascertain the possible epidemiological relationships among such microorganisms. The samples were inoculated in YPD culture medium, and after the incubation, they were centrifuged at 3,000 x g for 5 minutes. The obtained sediments were washed in cold distilled water and the whole-cell proteins were extracted by disruption with glass beads. The protein concentration of the samples was standardized for 800mg/500mL, which were maintained at -75°C, until the moment of use. The obtained cell extracts were submitted to SDS-PAGE technique. After the electrophoresis, the gels were revealed and the protein bands received values 1 for the presence of bands and 0 for the absence of the same ones, in a lanes' comparison. The collection of those data allowed the confection of several binary data matrices with a confidence interval of $\pm 1,245$, which were plotted on the NTSYS-pc 1.70 version statistical package applying the *association coefficient of Dice*, which generated similarity (S_D) matrices. Those similarity matrices were treated by the UPGMA algorithm, that allowed the analyses of similarity levels among *Candida albicans* isolates by dendrograms. The results showed the formation of several clusters with heterogeneous composition, including samples not related to their respective

socioeconomic levels or schools. These heterogeneity suggests the high degree of polymorphism in such species. The application of whole-cell proteins for *Candida albicans* numerical analysis allows the preliminary determination of groupings of those isolates, independently of their origins. The clusters' diversity and heterogeneity detected in the several dendrograms suggest that, a more accurate infraspecific characterization should involve markers less subject to expression interference, as for example, those that explore the nucleic acids' polymorphism.

INTRODUÇÃO

O gênero *Candida* compreende um grupo de leveduras que pode ser encontrado nos mais diversos ecossistemas, desde florestas tropicais (HAGLER, 1995) e rios brasileiros (PEÇANHA *et al.*, 1996), até como componente do espectro de leveduras que contaminam chás alemães (MAYSER *et al.*, 1995), inclusive com algumas espécies de interesse médico e estomatológico (SOLL *et al.*, 1994). Estes organismos também foram associados às doenças derivadas do uso abusivo de medicações imunossupressivas, ou como manifestações oportunistas em pacientes portadores de imunodeficiências congênicas ou adquiridas (McCULLOUGH *et al.*, 1996).

A ocorrência de *Candida* na cavidade bucal se apresenta sob a forma comensal e constitui parte da microbiota bucal normal. As razões para o estabelecimento de infecções são fatores precipitadores, tais como, queda de imunidade do hospedeiro, desordens endócrinas, lesões em mucosas, higiene oral deficiente, tratamento prolongado com antibióticos, corticosteróides e outros. A variedade das manifestações clínicas da candidose bucal reflete a diversidade das inúmeras condições predisponentes. A boca, ao contrário de outras cavidades naturais, está constantemente exposta a fortes estímulos mecânicos, térmicos e químicos, em decorrência dos atos fisiológicos a ela inerentes, destacando-se a mastigação. Desta forma, a boca está propensa a apresentar, com apreciável precocidade, frequência e expressividade, alterações decorrentes de modificações sistêmicas, sejam elas de fundo carencial, metabólico, ou de outra natureza, as quais poderão concorrer para o rompimento do equilíbrio biológico entre população microbiana e hospedeiro. Na cavidade oral, a *Candida albicans* integra-se a outros microrganismos aí existentes, como

vírus, bactérias, fungos e protozoários. A compatibilidade da coexistência dessa população microbiana com a saúde bucal e individual decorre do desenvolvimento, desde o nascimento, através de mecanismos imunológicos, de processos de adaptação e readaptação, contínuos, em virtude dos quais se estabelece vínculo biológico entre o organismo e os microrganismos que ele abriga. Tal vínculo garante a condição saprofítica desses microrganismos, pelo estabelecimento de um estado de equilíbrio biológico (LACAZ, 1980).

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 tem permitido a caracterização de leveduras através da análise de substâncias de naturezas diversas, tais como cromossomos (ASADURA *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 a essa última técnica, sabe-se que a mesma tem sido empregada satisfatoriamente na caracterização de bactérias (TANNER *et al.*, 1986; COSTAS *et al.*, 1989a; HOMES *et al.*, 1990; PALOMARI, 1992) e de leveduras (VANCANNEYT *et al.*, 1991; VANCANNEYT *et al.*, 1992; GOMES, 1995). Os valores numéricos de mobilidades relativas e ou massas moleculares de bandas eletroforéticas resultantes da separação das proteínas, podem ser convertidas numa matriz de dados binários que, com auxílio de sistemas computadorizados, fornecem resultados comparativos na forma de matrizes ou dendrogramas 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 disponível, o propósito da presente pesquisa foi analisar os graus de similaridade fenética de isolados de *Candida albicans* (BERKHOUT, 1923) provenientes de escolares pertencentes a cinco classes socioeconômicas, através da técnica de eletroforese de proteínas intracelulares em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Revisão de Literatura

REVISÃO DE LITERATURA

As diferentes espécies que compõem o gênero *Candida* encontram-se distribuídas em diferentes filós (ou divisões), de acordo com as características sexuais de cada uma. Assim, os estados anamórficos das leveduras *C. guilliermondii*, *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens*, *C. krusei*, *C. sorbosa*, *C. pseudotropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. pulcherrima*, têm seus estados teleomórficos no filo *Ascomycota*, nas espécies *Yamadazyma guilliermondii*, *Pichia ohmeri*, *Issatchenkia orientalis*, *Issatchenkia occidentalis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Lodderomyces elongisporus* e *Metschnikovia pulcherrima*, respectivamente (BARNETT *et al.*, 1983; KREGER-VAN RIJ, 1984; PRADA, 1992; CASTRO, 1995; SAN MILLAN *et al.*, 1997). Algumas espécies de *Candida* apresentam seus estados teleomórficos no filo *Basidiomycota*, como é o caso da *C. scotii*, *C. capsuligena*, *C. frigida* e *C. gelida*, que são formas imperfeitas de *Leucosporidium scotii*, *Filobasidium capsuligenum*, *L. frigidum* e *L. gelidum*, respectivamente (VAN der WALT, 1970; DAVENPORT, 1974). Existem, ainda, espécies que não apresentam estado perfeito conhecido, como é o caso da *C. albicans*, principal espécie de interesse médico, e da *C. tropicalis* (LODDER, 1970). De acordo com PORTO (1980) existiam, até esta data, 81 espécies de leveduras classificadas dentro do gênero *Candida*.

A determinação de uma classificação sistemática de isolados de *Candida*, foi inicialmente desenvolvida a partir de conhecimentos prévios acerca da fisiologia e bioquímica dessas leveduras, e tem evoluído no sentido de permitir a caracterização individual para cada isolado (“fingerprinting”) e de favorecer a compreensão das relações de afinidades fenéticas, genéticas e

filogenéticas entre duas ou mais entidades. Inicialmente, a rotina laboratorial de identificação e caracterização de tais leveduras envolvia, e ainda hoje são empregadas, técnicas de avaliação da formação de estruturas celulares típicas, como clamidósporos, pseudohifas e hifas verdadeiras (SANDVEN, 1990). Desta forma, *C. albicans* pode ser diferenciada das demais espécies, pelo fato desta produzir clamidósporos terminais globosos, de parede espessa e geralmente em grande número (LACAZ, 1980), com abundante pseudomicélio decorrente da não separação de blastósporos gemulantes, e em culturas velhas pode-se encontrar micélio verdadeiro. Esse último autor acrescenta ainda, que *C. stellatoidea* pode ser diferenciada de *C. albicans*, embora que com certa dificuldade, pelo fato da primeira apresentar escassa produção de clamidósporos, que quando presentes, encontram-se dispostos em cadeias de dois a três esporos. SAMARANAYAKE & MacFARLANE (1990), acrescentam que algumas linhagens de *C. tropicalis*, eventualmente podem apresentar pequena formação de clamidósporos terminais periformes. Outras espécies não produzem tal estrutura.

Métodos auxanográficos, que avaliam o comportamento dos espécimes a serem identificados, quanto às suas capacidades de fermentação e assimilação de carboidratos, foram primeiramente propostos por WICKERHAM & BURTON (1948) e também por WICKERHAM (1951). Os testes de assimilação foram posteriormente avaliados por FIOL (1975), que observou a baixa capacidade de especiação de leveduras esporogênicas, por determinados açúcares, propondo uma reformulação na maneira como esses testes deveriam ser conduzidos. Ainda em 1975, LAND *et al.* demonstraram que a incorporação de corantes no meio de cultivo, aumentava significativamente a capacidade de especiação de leveduras de importância médica, e mais recentemente, SANDVEN (1990) validou tais métodos ressaltando sua

capacidade discriminatória, em nível de espécies. Desta forma, isolados que não produzem clamidósporos podem ser classificados nas demais espécies que compõem o gênero. Um outro método auxanográfico, baseado na capacidade que algumas espécies apresentam de hidrolisar amidas, foi proposto por MIRA-GUTIERREZ *et al.* (1995), e permitiu a caracterização de sete gêneros e dezenove espécies de leveduras, isoladas a partir de material clínico e confirmada pelos métodos convencionais de identificação.

Historicamente, durante as décadas de 50 e 60, a necessidade de se estabelecer os graus de variabilidade infraespecífica, em função da importância patológica e ecológica dessas leveduras, conduziu vários grupos de pesquisa a desenvolver métodos sorológicos e quimiotaxonômicos que pudessem discriminar as diferentes populações clonais de *Candida*. Na sorologia, as publicações de maior relevância exploravam o uso de técnicas de imunodifusão dupla, aglutinação, imunofluorescência e imunoeletroforese, empregando-se proteínas citoplasmáticas ou polissacarídeos de parede. Nessa linha de investigação, TSUCHIYA *et al.* (1955) apresentaram uma série de trabalhos que demonstravam a possibilidade do emprego de antígenos termoestáveis e termolábeis, obtidos a partir da parede celular, com aplicação taxonômica. HASENCLEVER & MITCHEL (1961), publicaram um artigo onde reclassificavam a espécie *C. stellatoidea* dentro de sorotipos de *C. albicans*. Em 1973, AXELSEN observou que a imunoeletroforese bidimensional podia caracterizar linhagens de *C. albicans*, a partir da variabilidade existente entre 78 frações antigênicas obtidas a partir do extrato celular dessa espécie. Outras variações da técnica de imunoeletroforese, tal como imunoeletroforese cruzada, têm sido empregadas como ferramentas taxonômicas para espécies de *Candida* (GABRIEL-BRUNEAU & GUINET, 1984). A sorologia continua auxiliando na classificação de linhagens de *C. albicans*, através do emprego de testes de

aglutinação, permitindo a separação de isolados em dois sorogrupos (A e B), colaborando para a melhor caracterização desses microrganismos (SILVEIRA *et al.*, 1995).

Métodos quimiotaxonômicos buscam estabelecer as relações de afinidade entre diferentes linhagens através da comparação das composições químicas de diversas estruturas celulares, como: polissacarídios, proteínas, ácidos nucleicos, enzimas, ácidos graxos, etc. A ressonância nuclear magnética (NMR) de polissacarídios da parede celular foi amplamente empregada com fins taxonômicos, para leveduras de diversos gêneros: *Nadsonia*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera* e *Sacharomycodes* (SPENCER & GORIN, 1968), *Hansenula* e *Pichia* (SPENCER & GORIN, 1969a), *Torulopsis*, *Debaryomyces* e *Metschnikowia* (SPENCER & GORIN, 1969b, 1970a, 1970b) e *Candida* (SPENCER & GORIN, 1969c, 1971). Os principais polissacarídios analisados são as mananas, cujas cadeias laterais do esqueleto principal podem apresentar concentrações variáveis de oligossacarídios com ligações β 1-2, β 1-3 e β 1-6, de relativo valor sistemático (OLSEN, 1990). A técnica de ressonância nuclear magnética foi empregada por SHIBATA *et al.* (1996b) para diferenciar, através da estrutura das mananas com ligações β 1-2, *C. famata* de *C. saitoana*, e *C. guilliermondii* de outras espécies de *Candida* (SHIBATA *et al.*, 1996a). Variações nas proporções de ligações α 1-6, α 1-2 e α 1-3, de mananas, permitiram a KOGAN *et al.* (1988) estabelecer diferenças entre *C. albicans* sorotipos A e B e *C. parapsilosis*.

O perfil constitucional de ácidos graxos de cadeia longa estabelecido através da cromatografia de interfase gás-líquida, permitiu a diferenciação de diversos gêneros de leveduras (KOBAYASHI *et al.*, 1987) e também foi aplicado no estudo dos estados perfeitos e imperfeitos de ascomicetos do gênero *Candida*, por VILJOEN *et al.* (1987). No interior das

células, esses compostos podem estar na forma de triacilgliceróis ou ácidos graxos polares livres, tais como ácido oléico e ácido esteárico (MALKHAS'IAN *et al.*, 1982). BOTHA & KOCK (1993) observaram que a análise dos ácidos graxos de cadeia longa não deve ser um recurso de primeira escolha em processos de identificação presuntiva de leveduras, principalmente para basidiomicetos. Porém, continuam os autores, essa técnica permite discriminar diferentes linhagens dentro de uma espécie e diferentes espécies dentro de um gênero.

Citocromos são heme-proteínas envolvidas nos processos de oxidação final da cadeia respiratória, cujos espectros de absorção espectrofotométricos podem ser empregados em sistemática de *Candida* (MONTROCHER & CLAISSE, 1984; MONTROCHER & CLAISSE, 1987) e, em leveduras, podem variar de 510 a 605 mμ (EDDY, 1958). De especial importância taxonômica, o citocromo C já teve sua composição aminoacídica e seu gene seqüenciados por FREIRE-PICOS *et al.* (1995), que avaliaram os graus de homologia e as possíveis relações filogenéticas existentes entre *Kluyveromyces lactis*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida krusei*.

De acordo com MENDONÇA-HAGLER & HAGLER (1991), a primeira propriedade química dos ácidos nucleicos empregada como critério taxonômico foi a composição de bases do DNA, geralmente expressa em percentual molar de guanina adicionado de citosina (mol%G+C), cujo valor é constante para cada microrganismo. Na dupla hélice do DNA, entre as bases aminadas homólogas guanina e citosina, existem três interações do tipo “pontes de hidrogênio” que são mais termoestáveis, que as duas “pontes de hidrogênio” existentes entre adenina e timina. Quanto maior a mol%G+C numa dupla fita de DNA, maior a temperatura necessária para promover a desnaturação térmica.

Segundo JOHNSON (1989), pode-se determinar a mol%G+C empregando-se um espectrofotômetro de ultravioleta (260nm) termoccontrolável, que fornece uma sigmóide cujo ponto médio representa a temperatura média de desnaturação da dupla fita (T_m). Quanto maior o valor de T_m , maior a mol%G+C.

Dentre as pesquisas iniciais envolvendo a determinação diferencial de leveduras com base nas diferentes proporções molares de nucleotídios, destacam-se as de DUPONT & HEDRICK (1971), que estabeleceram as primeiras proporções para o gênero *Trichosporon*, e as pesquisas de GUEHO (1979), que determinou os valores mol%G+C para diversas espécies do gênero *Geotrichum*, classificando-as nos filos *Ascomycota* e *Basidiomycota*, as de HOOG & GUEHO (1984), que avaliaram os valores mol%G+C das linhagens-tipo ("type-strains") de algumas espécies dos gêneros *Moniliella*, *Trichosporonoides* e *Hyalodendron*, estabelecendo padrões de variação desses valores, para as referidas espécies. Ainda em 1984, GUEHO *et al.* empregaram a técnica na classificação de 28 espécies de *Trichosporon*, o que permitiu a divisão destas espécies em dois grupos, onde o primeiro, que pareceu estar relacionado com o filo *Ascomycota*, incluía espécies com valores mol%G+C menores que 50% (34.7-48.8), e o segundo grupo, que parecia estar relacionado com basidiomicetos, incluía aquelas espécies cujos valores mol%G+C eram maiores que 50% (57-64). Experimento similar foi conduzido por PAPPAGIANIS *et al.* (1985), que avaliou a aplicabilidade da técnica para *Coccidioides*. O mérito principal dos trabalhos acima citados, foi apresentar a possibilidade que a técnica tem de relacionar espécies de leveduras com os filos nos quais elas estão classificadas. NAKASE *et al.* (1993) empregaram tal técnica, como auxiliar, no estudo sistemático de leveduras balistospóricas. Os autores observaram a diversidade destas leveduras, pertencentes a dois gêneros (*Ballistosporomyces* e *Kockovaella*), que apresentaram variação de 39 a 68,5%,

para valores de mol%G+C no DNA cromossômico. HAMAJIMA *et al.* (1988) empregaram os valores mol%G+C, determinados pelas técnicas de T_m e por HPLC (High Performance Liquid Chromatography), para propor a exclusão da espécie, de linhagens de *C. tropicalis* que não absorviam um determinado fator sérico monoespecífico, comumente absorvível por células de *C. tropicalis*. Mais recentemente, GUEHO *et al.* (1996) avaliaram as composições mol%G+C das três espécies de *Malassezia* que compõem o gênero, e propuseram a inclusão de outras quatro, aumentando o número total de espécies para sete.

Vários pesquisadores (SHECHTER, 1973; HALL, 1973; VANCANNEYT *et al.*, 1991, HÖFLING *et al.*, 1998) têm utilizado a análise eletroforética de proteínas celulares totais (SDS-PAGE), na taxonomia dos fungos. O tipo, número e a sequência dos aminoácidos, determina o tamanho da proteína, seu formato e suas cargas elétricas totais, determinando sua mobilidade eletroforética. Pequenas diferenças nas sequências dos aminoácidos, podem provocar grandes diferenças na mobilidade das proteínas. SHECHTER *et al.* (1966) desenvolveram um estudo comparativo sobre eletroforese de proteínas de 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, demonstrando que a técnica permitia a diferenciação dos isolados em gêneros, e a diferenciação das espécies de um mesmo gênero. 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 oomycetos do gênero *Phytophthora*, conseguindo encontrar variações entre as bandas obtidas a partir de diferentes espécies.

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 para 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. Outra variação da técnica foi desenvolvida por SHEN *et al.* (1988), os quais introduziram a técnica de análise dos perfis de proteínas radiomarcadas com [³⁵S] 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. beigelii*) e uma espécie de *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*), obtendo resultados bastante satisfatórios.

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 para suas identificações. Obtiveram padrões de bandas protéicas cujas massas moleculares variaram entre 29 e 116 kDa (kilodaltons), suficientes para a análise diferencial desses organismos. 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.

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 “lanes”, 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 *Rhodospordium*, com seus característicos “fingerprints”. De importância industrial, GUILLAMON *et al.* (1993) empregaram a SDS-PAGE para estabelecer as relações de afinidade, em nível infraespecífico, para diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de processos fermentativos da indústria vinícola espanhola e puderam observar a variabilidade decorrente da seleção artificial por interferência humana, comprovando, uma vez mais, a importância e versatilidade dessa metodologia.

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 seqüências 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 está embasada. A comparação dos padrões eletroforéticos é uma técnica com resolução taxonômica satisfatória, que é aplicável ao nível de espécies, subespécies ou biotipos.

Isoenzimas são, segundo DIXON & WEBB (1979), múltiplas formas de uma enzima ocorrendo numa única espécie. Isso decorre da presença de vários *loci*, codificando diferentes versões de uma enzima, ou da existência de múltiplos alelos num único *locus* (HARRIS, 1975), e nesse último caso, cada enzima recebe a denominação aloenzima ou alozima (PRAKASH *et al.*, 1969). Ao se estudar a expressão e atividade enzimática, pode-se avaliar parâmetros como homozigose, heterozigose, variação nas massas moleculares e cargas iônicas das isoenzimas, que conferem características polimórficas entre dois ou mais alelos e mesmo entre genes distantes, que codifiquem diferentes formas moleculares da mesma enzima. As isoenzimas podem ser detectadas através de eletroforese em gel. Essa técnica tem sido empregada em estudos taxonômicos e epidemiológicos com fungos filamentosos (CLARE, 1963; STOUT & SHAW, 1974; JONES & NOBLE, 1982; ARAÚJO *et al.*, 1997), *myxomycetos* (FRANKE & BERRY, 1972), e em ensaios com leveduras (BAPTIST &

KURTZMAN, 1976; OKUNISHI *et al.*, 1979; YAMAZAKI & KOMAGATA, 1981).

LEHMANN *et al.* (1989a) trabalhando com algumas espécies do gênero *Candida* como *C. albicans*, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis* e *C. paratropicalis*, isoladas a partir de diversos focos infecciosos, pesquisaram o polimorfismo para 4 sistemas enzimáticos, e obtiveram resultados peculiares para cada espécie estudada. Nesse mesmo ano, LEHMANN *et al.* (1989b) efetuaram a análise numérica desses isolados, baseada na interpretação dos “clusters” formados após a eletroforese e detecção das múltiplas formas dessas e de outras enzimas, conseguindo agrupar os isolados em dois “clusters” maiores: a) *C. albicans* – *C. stellatoidea* I e II, e b) *C. tropicalis* – *C. paratropicalis*. CAUGANT & SANDVEN (1993), trabalhando com 98 isolados de *C. albicans*, pesquisaram o polimorfismo para 9 sistemas enzimáticos e puderam observar o polimorfismo para essas enzimas dentro daquela população de leveduras. Outros pesquisadores também publicaram artigos acerca da classificação de espécies de *Candida* e de leveduras de outros gêneros, através da análise por eletroforese de enzimas multilocus (SMITH *et al.*, 1990; LACHER & LEHMANN, 1991; LEHMANN *et al.*, 1991; MERZ *et al.*, 1992; LEHMANN *et al.*, 1993; PUJOL *et al.*, 1993; DOEBBLING *et al.*, 1993; WHITE & AGABIAN, 1995; LE GUENNEC *et al.*, 1995; BOERLIN *et al.*, 1995; ARNAVIELHE *et al.*, 1996; BOERLIN *et al.*, 1996; REYNES *et al.*, 1996; PUJOL *et al.*, 1997a; PUJOL *et al.*, 1997b).

A análise do padrão de restrição total do genoma, mais comumente designada por REA (Restriction Endonuclease Analysis), foi primeiramente empregada na caracterização de leveduras por NATH & BOLLON (1976) e para espécies de *Candida*, por SCHERER & STEVENS, em 1987. A técnica de REA é baseada na característica que as endonucleases de restrição bacterianas têm de

clivar a dupla fita de DNA, quando estas reconhecem pequenas seqüências específicas de 4 a 8 pares de bases, denominadas palíndromos. O polimorfismo observado na técnica de REA ocorre porque o genoma de indivíduos geneticamente distintos difere na seqüência de nucleotídios ao longo do DNA (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995) e a presença ou ausência dos palíndromos, reconhecidos e clivados pelas enzimas de restrição, pode variar entre os diferentes indivíduos, gerando polimorfismo. Diferenças nas seqüências de DNA também podem resultar de inserções, deleções ou de outros rearranjos (translocações, inversões) que alteram as distâncias entre os sítios de restrição. Os fragmentos obtidos a partir da digestão do DNA cromossômico são separados por eletroforese em suporte de agarose ou poliacrilamida (BARBIERO *et al.*, 1994), gerando “fingerprints” genômicos, uma vez que o número e a localização dos sítios de clivagem são específicos para cada genoma (GIOVANNETTI & VENTURA, 1995).

Tal recurso tem sido empregado na taxonomia de *Candida* e de outras leveduras, tanto na análise do DNA genômico total (LEE *et al.*, 1991; MAFFEI *et al.*, 1994; ZERVOS & VAZQUEZ, 1996; NOSKIN *et al.*, 1996), como em trechos específicos do DNA. PFALLER *et al.* (1990) promoveram a digestão total do genoma de *C. albicans* pela Eco R1 e após a separação eletroforética dos fragmentos, observaram que isolados obtidos de diferentes sítios anatômicos de um mesmo paciente seguiam um padrão clonal de colonização. SANCHEZ *et al.* (1993) avaliaram a aquisição nosocomial de *C. parapsilosis* em pacientes submetidos a transplantes de medula óssea, através dessa técnica. No ano seguinte, duas publicações (ROMANO *et al.*, 1994; CARLOTTI *et al.*, 1994a) também relataram que a REA era capaz de auxiliar na compreensão dos mecanismos de infecção cruzada de *C. albicans*, em ambientes hospitalares, demonstrando a relevância da técnica.

Em 1989, SU & MEYER propuseram o emprego da técnica de REA para analisar o polimorfismo do DNA mitocondrial (mtDNA) de linhagens de *C. parapsilosis*, *C. kefir* e *C. albicans*, e estabelecer parâmetros de diferenciação para essas espécies. CARRUBA *et al.* (1991) ressaltam que para *C. parapsilosis*, fragmentos de DNA mitocondrial fornecem maiores informações que fragmentos de DNA genômico total. GIMENEZ-JURADO *et al.* (1995) também empregaram o polimorfismo do mtDNA para analisar a diversidade genética existente dentro do gênero *Metschnikowia*. MORACE *et al.* (1997) realizaram a digestão de “amplicons” do gene da citocromo P-450 (L1A1) lanosterol-1,4 α -demetilase, que encerra uma região altamente conservada do DNA nas diferentes espécies de *Candida*, e submeteram os fragmentos obtidos à eletroforese, obtendo perfis característicos para cada espécie.

Ultimamente, também “amplicons” de seqüências conservadas de DNA, que codificam subunidades ribossômicas 18S, têm sido digeridos por endonucleases de restrição (ssu 18S rRNA PCR-REA) e as migrações eletroforéticas dos fragmentos, empregada na avaliação do polimorfismo inter e intraespecífico. VILGALYS & HESTER (1990) foram os primeiros pesquisadores que empregaram tal técnica para a caracterização de *Candida*, *Cryptococcus* e *Trichosporon*. Esses autores ressaltaram a relativa simplicidade do método, que não envolve procedimentos de transferência (“Southern blot”), tampouco de hibridação. HOPFER *et al.* (1993) e MAIWALD *et al.* (1994) empregaram essa técnica para digerir os “amplicons” de alguns cryptococci, *Candida* e *Trichosporon*. Em 1995, BALEIRAS-COUTO *et al.* submeteram *S. cerevisiae*, *C. valida* e *C. lipolytica* à análise baseada em marcadores RAPD e relataram que essa técnica fornecia resultados menos estáveis que o polimorfismo de restrição do gene da ssu 18S rRNA, para aquelas espécies

ensaiadas. Outras subunidades ribossômicas e regiões conservadas também foram analisadas quanto ao polimorfismo derivados de amplificação e clivagem enzimática. WILLIAMS *et al.* (1995) avaliaram a variabilidade existente em “amplicons” de regiões de espaçamento intergênico do rDNA de diversas espécies de *Candida* e relataram que *C. guilliermondii*, *C. glabrata* e *C. pseudotropicalis* não puderam ser caracterizadas individualmente, ao passo que *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* forneceram perfis distintos para cada espécie. NHO *et al.* (1997) publicaram um artigo, no qual descrevem a adaptação da técnica para o gene que codifica a subunidade 5.8S do rRNA de *C. krusei*, *C. inconspicua* e *C. norvegensis*, e sua aplicabilidade visto que esses autores obtiveram bandas espécie-específicas.

Outra técnica, denominada RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), também é derivada da clivagem do genoma das leveduras, e envolve a transferência dos fragmentos de DNA para membranas inertes de nitrocelulose ou nylon, com posterior desnaturação da dupla fita, e hibridação com sondas específicas de DNA radiomarcadas ou quimioluminescentes, que sensibilizam películas radiográficas (STEIN *et al.*, 1991; MARAIS *et al.*, 1998).

Duas publicações relatam a eficiência de uma sonda específica (CkF1,2) para a caracterização de *C. krusei*, que permitiu a diferenciação dessa dentre outras espécies (CARLOTTI *et al.*, 1996) bem como a caracterização das diferentes linhagens de *C. krusei* (CARLOTTI *et al.*, 1994b). ROY & MEYER (1998) empregaram a análise baseada no RFLP, para caracterizar 3 grupos de *C. parapsilosis* isolados de material clínico, e puderam quantificar a divergência genética existente entre esses grupos. FAIX *et al.* (1995) caracterizaram linhagens de *C. albicans* isoladas de casos de candidemia neonatal empregando as enzimas Eco R1 e Xba 1, com posterior hibridação com a sonda 27A, obtendo perfis que permitiram comparar os graus de semelhança entre essas

linhagens. MATHABA *et al.* (1995) também empregaram a sonda 27A, que apresenta moderada frequência de seqüências repetitivas, para caracterizar 57 linhagens de *C. albicans* isoladas da cavidade oral de 18 pacientes, e observaram que na maioria dos casos somente um clone da levedura predominava. Ainda a respeito do emprego de marcadores RFLP na caracterização de linhagens orais de *C. albicans*, BOERLIN *et al.* (1996) empregaram as endonucleases Eco R1 e Hinf 1 para digerir o genoma e a sonda Ca3 para observar o polimorfismo no padrão de restrição de 189 linhagens dessa levedura. Também, esses autores, concluíram que somente um clone de *C. albicans* estava envolvido em episódios recorrentes de candidose orofaríngea. CARMOUGRAND *et al.* (1988) analisaram o polimorfismo existente nos padrões de restrição do mtDNA de *C. parapsilosis*, detectável pela hibridação com os seguimentos das subunidades 6 e 8 da ATPase, que permitiu a diferenciação de diversos isolados. A construção de oligonucleotídios artificiais com seqüências repetitivas radiomarcadas poly d(GT), poly d(CA) e poly (GT), à serem empregados como sondas, foi proposta por WILKINSON *et al.*, em 1992, que observaram o poder discriminatório desses oligonucleotídios para diferentes linhagens de *C. albicans*. Em 1993, NIESTERS *et al.* propuseram que a amplificação dos domínios V4 nos genes de ssu rRNA, com subsequente clivagem enzimática e hibridação com sondas espécie-específicas, poderia ser usado na determinação diferencial de diversas espécies de *Candida* de interesse médico.

A PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) é uma técnica que tem provido importante informação taxonômica. PFGE é baseada no conceito de que o tamanho limite dos fragmentos de DNA separáveis pela eletroforese convencional em agarose (cerca de 50 kbp) pode ser aumentado pela introdução de pulsos, ou alterações na direção do campo elétrico (KAUFMANN, & PITT, 1994). PIZZIRANI-KLEINER & AZEVEDO (1989) reportam que moléculas de

DNA superiores que 50-60 kbp têm mobilidades eletroforéticas que são independentes de suas respectivas massas moleculares, isto é, todas elas migram juntas no gel. Foram SCHWARTZ & CANTOR (1994), trabalhando com *Saccharomyces cerevisiae*, quem resolveu o problema da separação eletroforética de grandes segmentos de DNA. Esses pesquisadores observaram que alternando a direção do campo elétrico, essas moléculas passam a migrar diferencialmente. Aplicando um campo elétrico variável, as moléculas de DNA movem-se diagonalmente, em “zigzag”, sendo possível o isolamento devido às suas diferentes massas moleculares.

Essa técnica permitiu estabelecer os cariótipos eletroforéticos (EK) de *C. albicans* (LISCHEWSKI *et al.*, 1995), *C. stellatoidea* e *C. clausenii* (MAHROUS *et al.*, 1994), *C. krusei* e *C. inconspicua* (ESSAYAG *et al.*, 1996), *C. boidinii* (LIN *et al.*, 1996), *C. parapsilosis* (CASSONE *et al.*, 1995; PFALLER *et al.*, 1995), *C. tropicalis* (SUZUKI *et al.*, 1991), *C. rugosa* (DIB *et al.*, 1996), *C. glabrata* (VAZQUEZ *et al.*, 1993), *C. lusitaniae* (MERZ *et al.*, 1992), várias espécies de *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces* (TOROK *et al.*, 1993), *Kluyveromyces* (SOR & FUKUHARA, 1989), *Hortaea*, *Filobasidiella* e *Mallassezia* (BOEKHOUT *et al.*, 1993), e foi empregada por ZERVOS & VAZQUEZ (1996) e por VAZQUEZ *et al.* (1996), para avaliar as possíveis origens da flora fúngica envolvida em infecções.

A PFGE pode ser empregada na caracterização da estrutura de cromossomos, plasmídeos, ou DNA mitocondrial (mtDNA). Em uma publicação de 1993, FUKUHARA *et al.* avaliaram a conformação linear do mtDNA de *Pichia pijperi*, *P. jadinii* e *Williopsis mrakii*, que quando comparada com o mtDNA circular de espécies afins, demonstrou alta homologia gênica, sugerindo que essas duas formas de mtDNA não têm origens distantes, portanto, de pouca valia taxonômica. A PFGE também é uma técnica útil na separação de grandes

fragmentos de cromossomos fúngicos recém-digeridos por endonucleases de restrição para sítios raros de clivagem (KAUFMANN & PITT, 1994). O uso dessa técnica permite a confecção de mapas físicos para vários gêneros de leveduras, uma vez que essas endonucleases fornecem grandes fragmentos (KRAWIEC & RILEY, 1990). Esses mapas físicos podem fornecer importantes informações a respeito da extensão do genoma (SMITH & CONDEMINE, 1990). Perfis de macrorestrição de DNA, obtidos a partir desse procedimento, permitiram à CORMICAN *et al.* (1996) determinar que ocorria uma predominância uniclonal para *C. glabrata*, em diversos sítios anatômicos de um mesmo indivíduo. Em 1994, BRANCHINI *et al.* empregaram essa técnica para demonstrar a variabilidade genotípica de *C. parapsilosis* isolada de catéteres e da circulação sangüínea periférica. PONTIERI *et al.* (1996) observam as relações existentes entre linhagens de *C. parapsilosis* isoladas de sangue, de vagina e do solo. Após a comparação dos resultados obtidos, com os de outros procedimentos analíticos, os autores concluíram que essa técnica permite a obtenção de “fingerprints” genômicos de *C. parapsilosis*. WAGGONER-FOUNTAIN *et al.* (1996) utilizaram o polimorfismo dos fragmentos de macrorestrição separados por PFGE, para avaliar a transmissão vertical e horizontal de *Candida* em neonatos prematuros, que eram mantidos em ambiente ambulatorial.

A PCR (Polymerase Chain Reaction) é uma poderosa técnica, que envolve a síntese *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença de Taq DNA polimerase. A técnica de PCR é baseada na amplificação enzimática e anelamento de “primers” (iniciadores, a partir da terminação 5’) que delimitam as seqüências do DNA de dupla fita, que se deseja amplificar (SAIKI *et al.*, 1988), empregando as seqüências das fitas de DNA do microrganismo como “template”. Esses “primers” são sintetizados

artificialmente, de modo que as seqüências de nucleotídios sejam complementares àquelas que flanqueiam a região que será amplificada. Essas amplificações são conduzidas em aparelhos apropriados, denominados termocicladores, que controlam a temperatura de cada fase do ciclo de amplificação. Os produtos de amplificação (“amplicons”) podem ser separados por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida.

Estudos filogenéticos envolvendo a amplificação por PCR e seqüenciamento de pequenas subunidades ribossômicas de RNA (srRNA) foram conduzidos por HENDRIKS *et al.* (1991), os quais avaliaram os graus de polimorfismo dessas regiões, para diversas espécies de *Candida*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora* e para *Saccharomyces cerevisiae*, estabelecendo distâncias evolutivas para tais espécies. Ainda com interesse evolutivo, o gene do citocromo P450-L1A1, foi analisado por BURGNER-KAIRUZ *et al.* (1994), que compararam as seqüências do produto de amplificação desse gene, para diferentes espécies de *Candida*, *Cryptococcus*, *Trischoporon* e *Torulopsis*, estabelecendo graus de afinidade filogenética, derivados do polimorfismo gerado durante processos evolutivos. A análise do seqüenciamento direto de “amplicons” de seqüências do gene do 18S RNA (ssu rRNA) de *Lodderomyces elongisporus* permitiram à JAMES *et al.* (1994) avaliar as inter-relações existentes entre essa e outras espécies de ascomycetes e organismos “ascomycete-like”. Os resultados obtidos por esses autores indicam que *L. elongisporus* deve ser o estado teleomórfico de *C. parapsilosis*.

CARLOTTI *et al.* (1997a) descreveram o emprego da técnica na caracterização de *C. krusei*, com a finalidade de realizar a identificação de isolados dessa espécie. Os autores desenvolveram dois “primers” que amplificam seqüências tandemicamente repetitivas e polimórficas (CKRS-1) de regiões intergênicas não-transcricionais de genes de rRNA de *C. krusei*. Esse

grupo de pesquisadores (CARLOTTI *et al.*, 1997b) comparou, ainda, os resultados obtidos, com outros resultados derivados de hibridização com a sonda CkF 1,2, e concluíram que o polimorfismo observável na amplificação do CKRS-1 permite a determinação de “fingerprints” de diferentes isolados de *C. krusei*. NISHIKAWA *et al.* (1997) desenvolveram “primers” para seqüências espécie-específicas de subunidades ribossômicas, que permitem a diferenciação de isolados do complexo *Debaryomyces hansenii/Candida famata* de outros isolados de *C. guilliermondii*.

Em 1995, WALSH *et al.* propuseram que uma variação da técnica original de PCR, a análise do polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP-PCR), poderia ser útil na identificação e caracterização de fungos e leveduras patógeno-oportunistas. Contudo, esses autores não conseguiram discriminar isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, como entidades diferenciadas, quando empregado o amplicon de pequenos fragmentos do gene do 18S rRNA.

Muitos outros grupos de pesquisadores publicaram artigos onde empregaram a técnica de PCR como auxiliar na identificação e/ou caracterização de isolados de *Candida*, como MANAVATHU *et al.* (1996) com *C. krusei*, HAYNES & WESTERNEG (1996) com *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, MIYAKAWA *et al.* (1992) com *C. albicans* e NIESTERS *et al.* (1993) com *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, e outras leveduras relacionadas com esse gênero, como *Saccharomyces* (LIECKFELDT *et al.*, 1993; LOPES *et al.*, 1998) ou *Metschnikowia* (MENDONÇA-HAGLER *et al.*, 1993).

Dentre as diferentes aplicações da PCR, a técnica de AP-PCR (Arbitrary Primed PCR), que determina os marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphism of DNA), é o método que mais tem sido empregado, em

estudos sistemáticos ou epidemiológicos. Nessa técnica, somente um único “primer” é empregado, de forma arbitrária, enquanto que na técnica de PCR clássica, dois “primers” que codificam uma sequência alvo conhecida, são empregados (WELSH & McCLELLAND, 1990). O aparecimento de bandas eletroforéticas permite a observação da natureza molecular do polimorfismo dos *loci* RAPD. WILLIAMS *et al.* (1990) relatam que evidências experimentais, têm mostrado que diferenças de apenas um par de bases (mutações pontuais) são suficientes para causar a não-complementariedade do “primer” com a fita “template”, o que impede a amplificação do segmento. Outras fontes de polimorfismo podem incluir deleções ou inserções nos sítios de ligação do “primer”, que aumentam as distâncias a serem percorridas pela Taq polimerase. Desta forma, o polimorfismo genético detectado através dos marcadores RAPD tem uma natureza binária, podendo, o segmento amplificado estar presente ou ausente. Em 1997, SAN MILAN *et al.* demonstraram que diversos isolados clínicos presuntivamente identificados como *C. guilliermondii*, na realidade apresentavam grande semelhança com *C. fermentati*, para marcadores RAPD. Esses autores apontam para o fato de que a técnica de AP-PCR permite discriminações mais precisas, na caracterização dessas leveduras ao nível de espécie.

O poder de caracterização de linhagens de uma mesma espécie de *Candida* através de marcadores RAPD, foi demonstrado por HOLMBERG & FERROZE (1996), que obtiveram diferentes perfis de bandejamento eletroforético, para “amplicons” de diversas linhagens de *C. albicans*. Contudo, em outro estudo de caracterização para dezenove isolados orais de *C. albicans*, HOWELL *et al.* (1996) obtiveram que a técnica de AP-PCR forneceu três distintos tipos para marcadores RAPD, contra outros cinco tipos obtidos pela técnica de REA, com as enzimas Eco R1 e Hinf 1. A heterogeneidade genômica de *C.*

parapsilosis, comumente acessada através da eletrocariotipagem por PFGE (CARUBA *et al.*, 1991), também é possível de ser realizada por AP-PCR, com resultados muito semelhantes, conforme indicado por LOTT *et al.* (1993). Diversas espécies de *Kluyveromyces*, muitas delas classificadas como estados teleomórficos de diversas espécies de *Candida*, foram diferenciadas com base em marcadores RAPD, por MOLNAR *et al.* (1996), que comprovaram a capacidade discriminatória da técnica de AP-PCR, na diferenciação de espécies. Leveduras de outros gêneros, como a *Phaffia* (VARGA *et al.*, 1995), também têm sido analisadas através desse recurso analítico.

Diversos trabalhos de revisão sobre o emprego de ferramentas moleculares como auxiliares analíticos em levantamentos sistemáticos, taxonômicos, evolutivos e epidemiológicos envolvendo microrganismos - e em especial, leveduras - têm sido publicados e parte deles foram aqui descritos. Apesar da alta especificidade dessas técnicas, na caracterização inter e intra-específica, a experiência acumulada aponta para a necessidade de se empregar mais de uma técnica na caracterização de gêneros, espécies ou de linhagens (HALL, 1969; JONES, 1975; PRICE *et al.*, 1978; MURRAY *et al.*, 1988; MAGEE *et al.*, 1988; OLSEN, 1990; HUNTER, 1991; PFALLER, 1992; KURTZMAN, 1994; McCULLOUGH *et al.*, 1996; BASTIDE *et al.*, 1996, HÖFLING *et al.*, 1997). Em 1995, BART-DELABESSE *et al.* realizaram um levantamento epidemiológico em clínica de queimados, onde empregaram as técnicas de AP-PCR, RFLP e eletrocariotipagem por PFGE para compreender o mecanismo de infecção cruzada em pacientes com candidemia, e também concluíram que a combinação de pelo menos dois diferentes métodos deve ser empregada na caracterização de linhagens de *Candida*, confirmando tais afirmações.

***Candida* associada à cavidade oral e fatores exógenos**

O estudo de STENDERUP (1990) confirma a importância da espécie *Candida albicans* como o agente etiológico de grande parte das infecções fúngicas ocorridas na cavidade oral, ressaltando sua associação com outras espécies microbianas. Essa associação pode ocorrer por meio da aderência com espécies bacterianas ou através de carboidratos, por exemplo, quando o indivíduo apresenta uma dieta rica em açúcares. ALLEN (1992) salienta que a *Candida albicans* é um fungo de maior ocorrência na cavidade oral, sendo que acima de 50% ou mais da população adulta normal e saudável, apresentam essa espécie como componente da microbiota oral normal. EPSTEIN *et al.* (1990) relatam que pacientes sadios devem apresentar baixo percentual de leveduras orais. Contudo, STENDERUP (1990) menciona que a ocorrência de *Candida albicans* na cavidade bucal representa 60% a 70% dos isolados, seguido de *C. glabrata* e *C. tropicalis* e outras espécies de *Candida*, e uma ocorrência mais rara e transitória dos gênero *Rhodotorula* e *Saccharomyces*.

Segundo KOGA *et al.* (1993 e 1995) a Síndrome do Respirador Bucal interfere com a presença do gênero *Candida* e outras espécies que colonizam a cavidade bucal, favorecendo um aumento na prevalência de *C. albicans* intra oral.

Os mecanismos pelos quais *C. albicans* causa doença em pacientes debilitados são pouco conhecidos. Vários fatores que contribuem à patogenicidade dessas espécies de leveduras foram sugeridos, tais como, a habilidade de formarem hifas, a capacidade de aderência a mucosa, a presença de substâncias semelhantes a endotoxinas e secreção de enzimas hidrolíticas, e outros (ODDS, 1979; e SHIMIZU, 1988).

O aumento na prevalência de Candidose superficial e invasiva atribuído ao uso indiscriminado de antibiótico e agentes imunossupressivos foi observado. A espécie *C. albicans* pode proliferar no trato alimentar de pacientes sob antibioticoterapia, e a presença de endotoxinas dessa levedura assume importância como fator patogênico. Com o crescimento de tal microrganismo a endotoxina, produzida durante seu ciclo de vida, pode produzir irritação local causando lesões em superfícies teciduais (SEELIG, 1966). Essas espécies, bem como outras do gênero, causam algumas doenças humanas por meio de invasão tecidual, indução ao estado de hipersensibilidade e produção de toxinas. A capacidade de aderir em superfícies, também permite colonizar e infectar mucosas do hospedeiro (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990b).

SHIMIZU (1990) e RUCHEL *et al.* (1982) relatam que os fatores de virulência de *C. albicans* estão relacionados com a produção de hialuronidase, condroitin sulfatase, proteinase e fosfolipase. Esses fatores podem ocorrer de maneira conjunta ou separada determinando a intensidade da virulência. SHIMIZU (1990) continua, relatando não ter observado diferenças na produção de enzimas entre amostras isoladas tanto de pacientes clinicamente saudáveis quanto de pacientes com suspeita de candidose, bem como diferenças referente a patogenicidade entre as amostras.

CLARIFKER (1960) salienta que as leveduras presentes nos alimentos, água, ar e superfícies corporais ou inanimadas, contaminam a cavidade oral uma vez estabelecido o contato. A ocorrência de tais microrganismos também foi constatada em processos cariogênicos ou em canais radiculares de humanos (PASSOS, 1961; e BERTOLINI, 1964), em usuários de próteses dentárias (DAVENPORT, 1970), nas candidoses e nas estomatites causadas por prótese total, havendo predominância de *C. albicans* sorotipo A (MARTIM *et al.*, 1982), no periodonto, e na saliva de pacientes com

periodontite crônica, apresentando considerável quantidade de isolados quando comparado com o periodonto saudável (JORGE, 1995).

FOSDICK & HANSEN (1937) foram uns dos primeiros a sugerir a possível correlação entre leveduras e produção de ácidos na cavidade oral. Tal fato foi verificado com incubação “*in vitro*” contendo esmalte dental e saliva. Esses autores observaram que saliva contendo *Lactobacillus acidophilus* não resulta em dissolução do esmalte, enquanto que a adição de leveduras orais a esse composto resulta na produção de ácido suficiente para dissolver o esmalte. Desta forma, concluíram que de todos os microrganismos bucais testados, leveduras e *L. acidophilus* foram os mais ativos na redução do ácido pirúvico para ácido láctico. A correlação positiva de lactobacilos e leveduras intra-orais, com o aumento de lesões cariosas, também foi analisada por PIENIHÄKKINEN (1987b).

A associação entre quantidade de fungos e atividade cariogênica foi amplamente estudada por GLASS (1985), RUSSEL (1987), PIENIHAKKINEN (1987a) e RUSSEL *et al.* (1991). Esses autores demonstraram a presença de espécies de *Candida* em cáries dentais e estruturas ao redor, tais como, gengiva, placa e canal radicular. Com intuito de avaliar a correlação de leveduras com o risco de cárie, os mesmos constataram elevada frequência de *Candida* em lesões de cárie sugerindo que tais lesões atuem como reservatórios para essas leveduras. Em consequência, outras estruturas orais podem ser colonizadas por espécies de *Candida* provenientes das lesões.

Durante o período neonatal, as condições que predispõem a instalação de leveduras estão, provavelmente, na imaturidade do sistema imune e circunstâncias da microbiota oral (OKSALA, 1990). Tal fato foi relatado por RUSSEL & LAY (1973) e LAY & RUSSEL (1977). Estes salientam que 5% a 7 % das crianças apresentam *Candida albicans* durante as primeiras horas após o

nascimento, e decorrido uma semana estes valores atingem 14%. BERDICEVSKY *et al.* (1984) menciona a presença de *Candida* ocorrendo em 49% de crianças entre 3 e quase 6 anos e em 65% de crianças entre 6 e 12 anos.

As causas para a presença de *C. albicans* em portadores sadios são ainda pouco conhecidas. Vários fatores parecem contribuir para o surgimento intraoral desses microrganismos, tais como, qualidade da dieta, da higiene oral, alterações nos fluxos salivares, desordens sistêmicas ou locais (STENDERUP, 1990).

Elevadas taxas de leveduras foram encontradas em indivíduos apresentando deficiências nutricionais, o que pode influenciar a microbiota oral (BASU *et al.*, 1961). SAMARANAYAKE (1986) relata uma variedade de fatores relacionados com a patogênese das infecções orais por *Candida*, incluindo deficiências nutricionais, tais como a carência de ferro, ácido fólico, vitaminas A, B, C, K, zinco, ou ainda, uma dieta rica em carboidratos. Conforme os achados de JENKINS *et al.* (1977), a deficiência nutricional por ferro ou ácido fólico pode facilitar a invasão epitelial por pseudohifas de *C. albicans*. FREITAS & BIRMAN (1989) salientam que em bocas clinicamente normais, a percentagem de portadores de *Candida* é cerca de 33% a 40%. Resultados semelhantes foram observados ocorrendo na saliva de indivíduos sadios (LILIENTHAL, 1950).

JORGE *et al.* (1987) relataram que o uso de aparelhos ortodônticos por pacientes proporciona um aumento de *C. albicans* na cavidade oral e o baixo grau de higienização contribui diretamente com a presença dessa levedura, enquanto que em pacientes com higienização mais eficiente apresenta menor frequência de *C. albicans* na cavidade oral.

Em indivíduos com hábitos de fumar foi observado um aumento no número de portadores de *C. albicans* (ARENDORF, 1979). Estudos com adultos

portadores de leveduras orais, incluindo *C. albicans*, revelaram um aumento dessas leveduras com o decorrer da idade e com prevalência em fumantes (ARENDORF *et al.*, 1986). BASTIAAN & READE (1982) correlacionaram a prevalência de *C. albicans* na cavidade oral com sexo, idade, queratinização e hábito de fumar, demonstrando que a prevalência é maior em mulheres mais idosas. OLIVER & SHILLITOE (1984) e ARENDORF *et al.* (1983) estudaram o efeito do tabaco na prevalência de leveduras na cavidade oral, ao passo que DARLING *et al.* (1990) analisaram os efeitos do uso da maconha sobre a microbiota oral. Em ambas avaliações, esses pesquisadores constataram um aumento na incidência de *Candida* nesses indivíduos, ocorrendo principalmente a espécie *C. albicans*.

A condição socioeconômica associada aos hábitos de higiene, a alimentação e aos aspectos culturais, tem modificado sensivelmente a prevalência dos microrganismos orais, despertando a atenção dos pesquisadores em relação a esses fatores (SPOLIDORIO, 1997). Certas ocupações em conjunto com a condição social podem afetar os hábitos bucais e dietéticos, bem como as doenças sistêmicas podem alterar o fluxo salivar. MOREIRA (1997), estudando *Candida* na cavidade bucal de escolares entre 6 e 9 anos, provenientes de diferentes classes socioeconômicas e escolas, salienta que 47% da totalidade de estudantes apresentam essa levedura, com predominância de *C. albicans*, sugerindo nenhuma prevalência de tal isolado por sexo e classe socioeconômica. ARENDORF *et al.* (1979) salientam que as diferenças socioeconômicas podem causar alterações significativas na microbiota oral. Cabe mencionar que a escassez de pesquisas envolvendo o isolamento de leveduras orais em diversos níveis socioeconômicos limita maiores especulações. Contudo, essa escassez de dados que envolvem a natureza destas especulações, despertou nosso interesse e foi objetivo de nossa atual pesquisa.

Material e Métodos

MATERIAL E MÉTODOS

1. Procedência das amostras

Na presente pesquisa, foram utilizadas setenta e cinco amostras de *Candida albicans* isoladas da cavidade oral de escolares do município de Piracicaba, estado de São Paulo, região sudeste do Brasil.

O estudo envolveu amostras previamente isoladas de estudantes de escolas públicas e particulares (Tabela 1), com idades variando entre 6 e 9 anos, de ambos os sexos, sem distinção de raça, provenientes de cinco categorias socioeconômicas, determinadas de acordo com os critérios adotados pela Associação Brasileira de Anunciantes e pelo Instituto de Pesquisa de Mercado - ABA/ABIPEME - (APÊNDICE 1), os quais não utilizavam aparelhos ortodônticos, ou ainda, não estavam sob tratamento com antibióticos sistêmicos ou outros medicamentos (MOREIRA, 1997).

Tabela 1. Relação das origens das amostras de *Candida albicans*

Número de Escolares	Escola Nome	Código	Setor
6	Colégio Alphaville	AV	Privado
9	E.E.P.G. "Prof. Carlos Sodero"	CS	Público
10	E.E.P.G. "Profª. Francisca Elisa"	FE	Público
16	E.E.P.G. "Prof. Francisco Mariano da Costa"	FMC	Público
10	E.E.P.S.G. "Prof. Honorato Faustino"	HF	Público
11	Liceu Colégio "Albert Eistein"	LAE	Privado
6	E.E.P.S.G. "Prof. Elias de Melo Ayres"	MA	Público
7	E.E.P.G. "Prof. Manasses Ephraim Pereira"	MEP	Público

Essas amostras (Tabela 2), inicialmente coletadas, processadas e identificadas em pesquisas anteriores, encontram-se disponíveis na Micoteca do Laboratório de Microbiologia e Imunologia, do Departamento de Diagnóstico Oral, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas.

Tabela 2. Relação das amostras de *Candida albicans*, isoladas da cavidade oral de escolares de cinco classes socioeconômicas, utilizadas nos experimentos

Código da amostra – Classe socioeconômica – Código da escola				
A1 – A – AV	A52 – A – LAE	B24 – B – MA	C23 – C – HF	D5 – D – FMC
A20 – A – AV	A55 – A – LAE	B23 – B – MA	C44 – C – HF	D19 – D – MEP
A21 – A – FE	A61 – A – LAE	B46 – B – MA	C32 – C – MEP	D20 – D – MEP
A7 – A – FE	A17 – A – MA	B54 – B – MA	C33 – C – MEP	E10 – E – CS
A15 – A – FE	B4 – B – AV	B56 – B – MA	C36 – C – MEP	E25 – E – CS
A09 – A – FE	B32 – B – AV	B31 – B – MEP	C40 – C – MEP	E30 – E – CS
A4 – A – FE	B5 – B – AV	C4 – C – AV	D21 – D – CS	E32 – E – CS
A16 – A – HF	B16 – B – FE	C5 – C – FE	D23 – D – CS	E39 – E – CS
A23 – A – LAE	B13 – B – FE	C9 – C – FMC	D25 – D – FMC	E7 – E – CS
A28 – A – LAE	B11 – B – FE	C47 – C – FMC	D28 – D – FMC	E8 – E – CS
A33 – A – LAE	B15 – B – FE	C20 – C – HF	D32 – D – FMC	E43 – E – FMC
A40 – A – LAE	B18 – B – FMC	C12 – C – HF	D14 – D – FMC	E48 – E – FMC
A48 – A – LAE	B33 – B – HF	C16 – C – HF	D6 – D – FMC	E52 – E – FMC
A50 – A – LAE	B21 – B – HF	C48 – C – HF	D36 – D – FMC	E17 – E – FMC
A64 – A – LAE	B38 – B – LAE	C17 – C – HF	D13 – D – FMC	E57 – E – FMC

2. Manutenção das amostras

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

A. As amostras foram inoculadas em meio completo para leveduras (MCL) (APÊNDICE 2.1), de acordo com o estabelecido por NEDER (1992), contendo uma mistura de peptona e extrato de levedura, em tubos de cultura

(13x100mm), e levadas à estufa a 37°C por 24/72 horas para o desenvolvimento celular. Após o crescimento, os tubos da coleção foram mantidos em temperatura ambiente durante 30 dias, sendo posteriormente renovados a medida do necessário.

B. As amostras foram mantidas em tubos de cultura (13x100mm), contendo meio completo para leveduras (MCL) (APÊNDICE 2.1), e recobertas com óleo mineral estéril, em temperatura ambiente. As cepas assim conservadas, eram substituídas a cada 6 meses.

Periodicamente, nos dois casos, foram realizados exames para o reconhecimento da morfologia celular e colonial (aspectos macro e microscópicos), para detecção de possíveis contaminantes.

3. Padronização da extração das proteínas de componentes intracelulares

Amostras de cultura mantidas conforme o item 2.A, foram inoculadas em frascos com 50mL de meio de cultura YPD (APÊNDICE 2.2) (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, durante 18 horas. Decorrido o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas a 3.000 x g, por 5 minutos (Centrífuga 215 – Fanen Indústria e Comércio), de acordo com WATERS & 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 metabólicos extracelulares, sendo centrifugados novamente a 3.000 x g, por 5 minutos. Os sedimentos obtidos foram fracionados em alíquotas de

aproximadamente 0,5 mL, os quais foram submetidos ao processo de extração de proteínas.

4. Extração de proteínas intracelulares de *Candida albicans*

Para a extração das proteínas intracelulares foi empregada a metodologia descrita por ANTONSSON *et al.* (1994) com modificações. Aos sedimentos obtidos, 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, e um igual volume de água destilada esterilizada gelada. As misturas permaneceram em banho de gelo por 5 minutos, e logo após, agitadas 4 vezes em disruptor de células Mini-BeadBeater® (Biospec Products, Inc.) a 4.200 rpm, por 30 segundos, com intervalos de 1 minuto (as misturas foram mantidas em banho de gelo, durante os intervalos). Os lisados foram separados a 15.000 x g, por 5 minutos, em centrífuga Centrimicro 242 (Fanen Ind. Com. de Equipam. para Laboratórios). Os sobrenadantes obtidos foram mantidos a – 75 °C até o momento de uso.

5. Determinação da concentração protéica dos extratos de *Candida albicans*

Foram determinadas as concentrações protéicas dos extratos das amostras de *Candida albicans*, através do método espectrofotométrico de BRADFORD (1976), que conforme trabalhos conclusivos de EZE & DUMBROFF (1982), mostrou-se muito sensível. Para a construção da curva padrão foi utilizado solução padrão de albumina bovina nas concentrações de

200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400 e 1600 $\mu\text{g/mL}$ do tampão Tris HCl pH 6,8 (APÊNDICE 3.13). Aos tubos de ensaio, foram adicionados e homogeneizados 5mL do reagente de BRADFORD (1976) (APÊNDICE 3.9) e 0,1mL da solução padrão de albumina bovina. A curva padrão foi construída a partir da leitura de densidade ótica (absorbância) a 595 nm. Analogamente, foi determinada a densidade ótica das amostras, estimando-se a concentração de proteína das mesmas, baseando-se na curva padrão. As concentrações de proteína das amostras foram padronizadas em 800 $\mu\text{g}/500\mu\text{L}$ (AMES, 1974).

6. Desnaturação das proteínas das amostras de *Candida albicans*

Às alíquotas de 100 μL da solução protéica (800 $\mu\text{g}/500\mu\text{L}$) acrescentou-se 100 μL de tampão dissociante preconizado por ALFENAS *et al.* (1991) (APÊNDICE 3.11). As misturas foram mantidas em banho de água fervente por 10 minutos, resfriadas, centrifugadas a 12.000 x g por 1 minuto e os sobrenadantes mantidos a -75°C até o momento de uso.

7. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Os extratos protéico, obtidos conforme os itens 3, 4, 5 e 6 acima mencionados, foram submetidos à técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) em sistema descontínuo, de acordo com LAEMMLI (1970), em cuba de acrílico descrita por STUDIER (1973), de dimensões de 180x160mm, com placas de vidro de 140x130mm e espaçadores de 1,5mm. Utilizou-se o gel empilhador

(“stacking gel”) a 4,5% (APÊNDICE 3.6) e o gel separador (“running gel”) a 12,5% (APÊNDICE 3.7), em sistema de tampão Tris-glicina pH 8,9 (APÊNDICE 3.14).

Foram introduzidos 50 μ L dos extratos tratados com tampão 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% (APÊNDICE 3.5), por 20 minutos, lavados com água destilada e corados com solução Coomassie Blue G-250 0,025% (APÊNDICE 3.2), por 12 horas, sendo posteriormente descorados por lavagens sucessivas com solução ácido acético-metanol-água 1:2,5:6,5 (APÊNDICE 3.3).

8. Análise numérica dos perfis eletroforéticos das proteínas intracelulares de *Candida albicans* obtidos por SDS-PAGE

Para o estabelecimento do grau de similaridade entre as linhagens de *Candida albicans*, utilizaram-se os extratos de proteínas intracelulares das amostras, obtidas pelo método descrito no item 4, adicionado dos extratos protéicos da linhagem-tipo representativa da espécie *Candida albicans* CBS-562 (VANCANNEYT *et al.*, 1991) ao lado do padrão de massa molecular (Bio-Rad Laboratories), para avaliação da reprodutibilidade (COSTAS *et al.*, 1989a; COSTAS *et al.*, 1989b).

As condições de cultivo, técnicas de extração, determinação da concentração, desnaturação das proteínas e eletroforese em gel de poliacrilamida

(SDS-PAGE) para o emprego da linhagem tipo CBS-562 são as mesmas descritas nos itens acima.

8.1 Processamento das imagens

Após a descoloração dos géis, os mesmos foram secados em papel de filtro e interpostos entre duas folhas de filme para transparência. Esses conjuntos foram levados à um “twin-scanner” (Scan Jet 4C e adaptador para transparência HP 4C, Hewlett Packard Co.) onde suas imagens positivas e a demarcação das bandas protéicas foram processadas através do programa SigmaGel (Jandel Co.), que forneceu a mobilidade relativa de cada banda (valores de R_f e massa molecular) em função dos valores conhecidos dos padrões de massa molecular.

8.2 Construção das matrizes de similaridade

Os valores das massas moleculares das bandas protéicas, obtidos em função dos valores padrões conhecidos de massa molecular, receberam valores 1 (um), para a presença de bandas, e 0 (zero), para a ausência das bandas, numa comparação entre os “lanes”. Os conjuntos dessas informações deram origem a quatorze matrizes de dados binários com *intervalo de confiança* de $\pm 1,245$, sendo cinco matrizes para classes socioeconômicas, oito para escolas e uma para matriz total. Essas matrizes de dados binários foram plotadas no pacote estatístico NTSYS-pc versão 1.70 (Applied Biostatistics, Inc.), onde empregou-se o programa QUALITATIVE e o *coeficiente de associação*

(similaridade) *de Dice*^{*}, que permitiu a obtenção de quatorze matrizes de similaridade (*S*).

8.3 Construção dos dendrogramas de similaridade

Utilizando o mesmo pacote estatístico, essas matrizes de similaridade foram transferidas para o programa SHAN CLUSTERING onde o uso do algoritmo UPGMA (FARRIS, 1969; SNEATH & JOHNSON, 1972; SNEATH & SOKAL, 1973) gerou os dendrogramas que possibilitaram as avaliações dos graus de similaridade existentes entre as amostras de *Candida albicans*.

8.4 Construção das matrizes de correlação cofenética

Os dendrogramas UPGMA derivados de suas matrizes de similaridade (*S*), as quais contém os valores de similaridade originais entre UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais), foram plotados no programa COPENETIC VALUES que forneceu as matrizes de valores cofenéticos (*C*). Os *coeficientes de correlação cofenética* (r_{CS}), que são as correlações entre os pares correspondentes de *C* e *S* (SOKAL & ROHLF, 1962; SOKAL & ROHLF, 1970), foram obtidos empregando-se o programa MATRIX COMPARISON.

^{*} Coeficiente de associação de Dice:

$$S_D = \frac{2a}{2a + u} = \frac{2a}{2a + b + c}$$

9. Avaliação da reprodutibilidade

Para a avaliação da reprodutibilidade, foram comparados os perfis protéicos da linhagem padrão de *Candida albicans* (CBS-562), aplicada nos diferentes géis. A metodologia empregada para essa avaliação é a mesma empregada nos itens 8.2, 8.3 e 8.4, acima descritos.

RESULTADOS

1. Perfis protéicos em SDS-PAGE

A eletroforese dos extratos celulares de setenta e cinco (75) linhagens de *Candida albicans* e da linhagem padrão CBS-562, permitiu a observação dos perfis protéicos contendo, em média, 20 bandas eletroforéticas por “lane”, dentro de um intervalo de massas moleculares variando entre 18,4 kDa e 66 kDa (Figuras 1 a 11).

Figura 1. Perfis protéicos das linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares da classe socioeconômica A

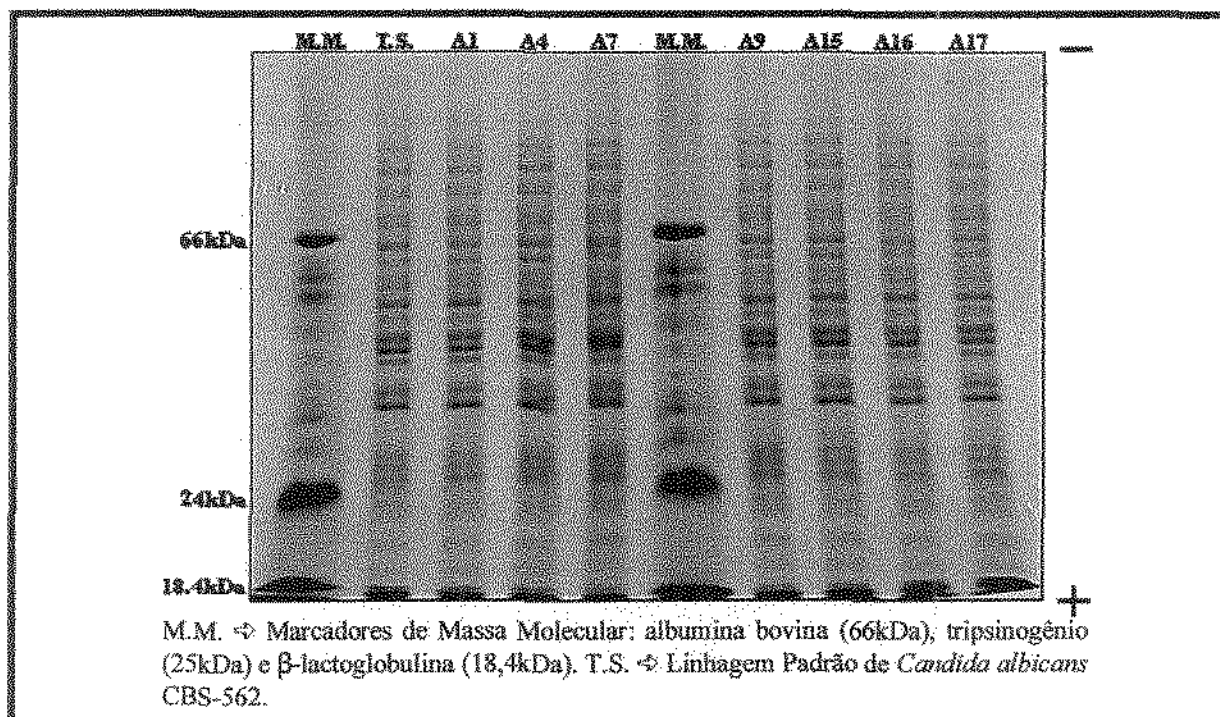


Figura 2. Perfis protéicos das linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares da classe socioeconômica A

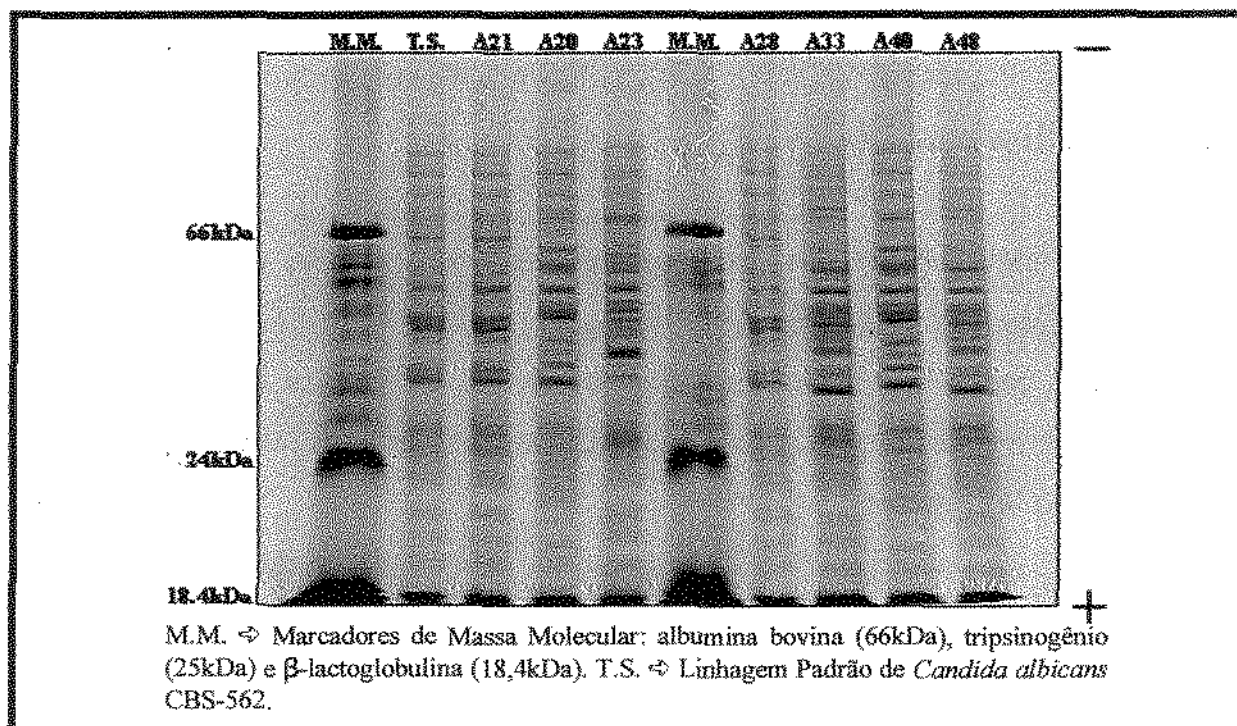


Figura 3. Perfis protéicos das linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares das classes socioeconômicas A e B

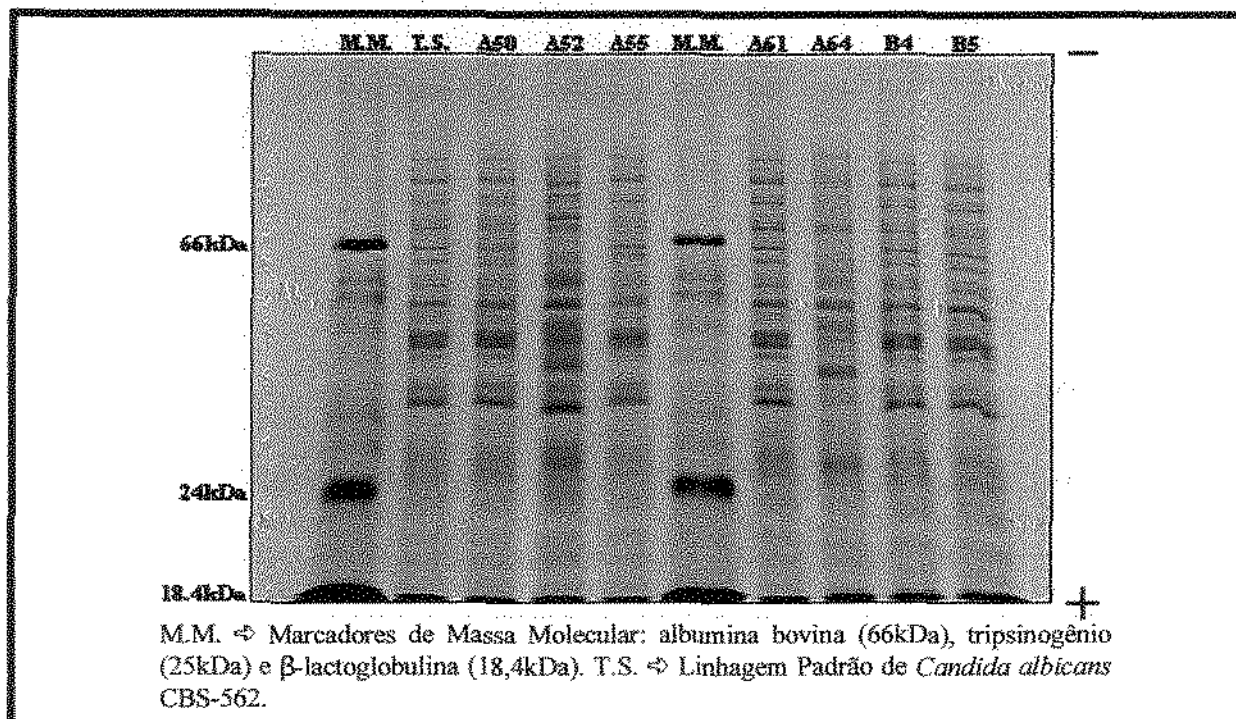


Figura 4. Perfis protéicos das linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares da classe socioeconômica B

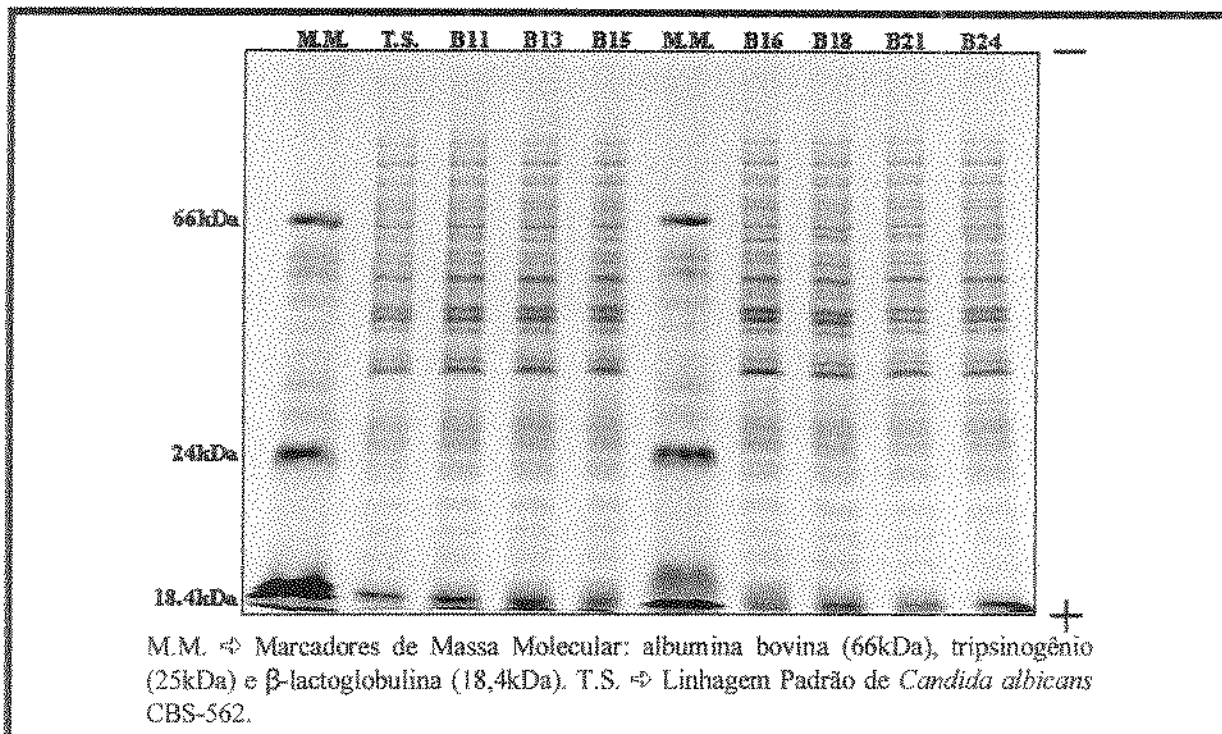


Figura 5. Perfis protéicos das linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares da classe socioeconômica B

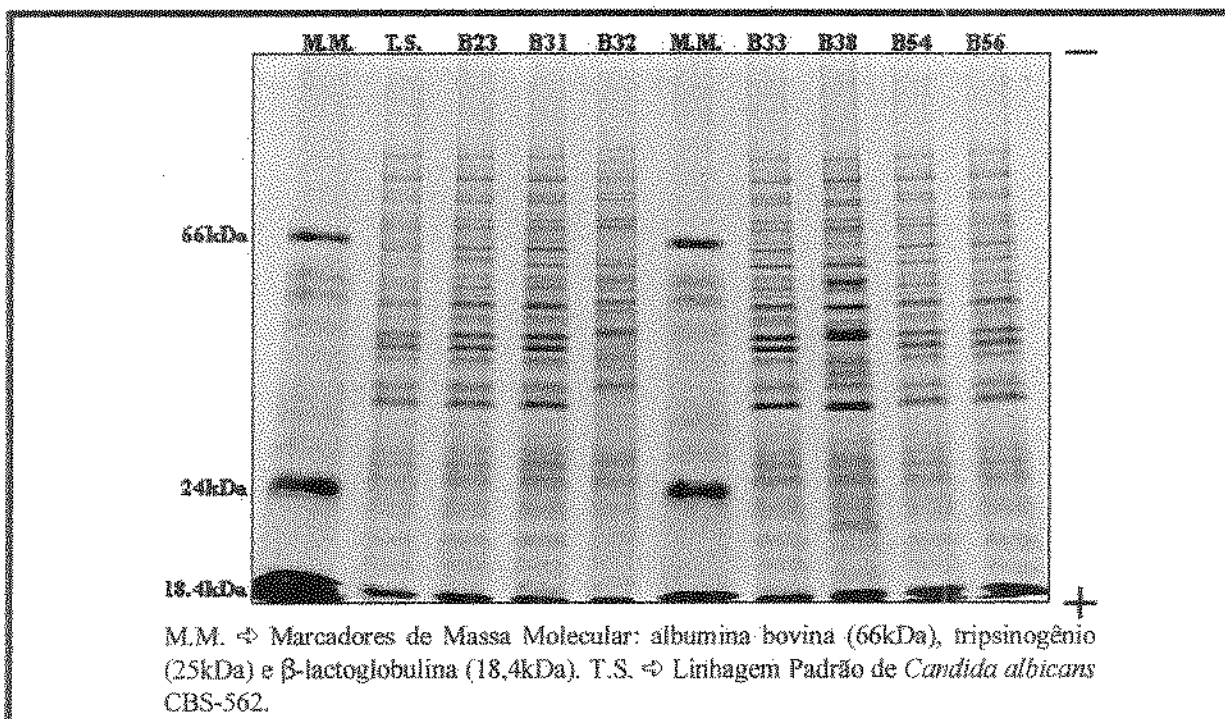


Figura 6. Perfis protéicos das linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares das classes socioeconômias B e C

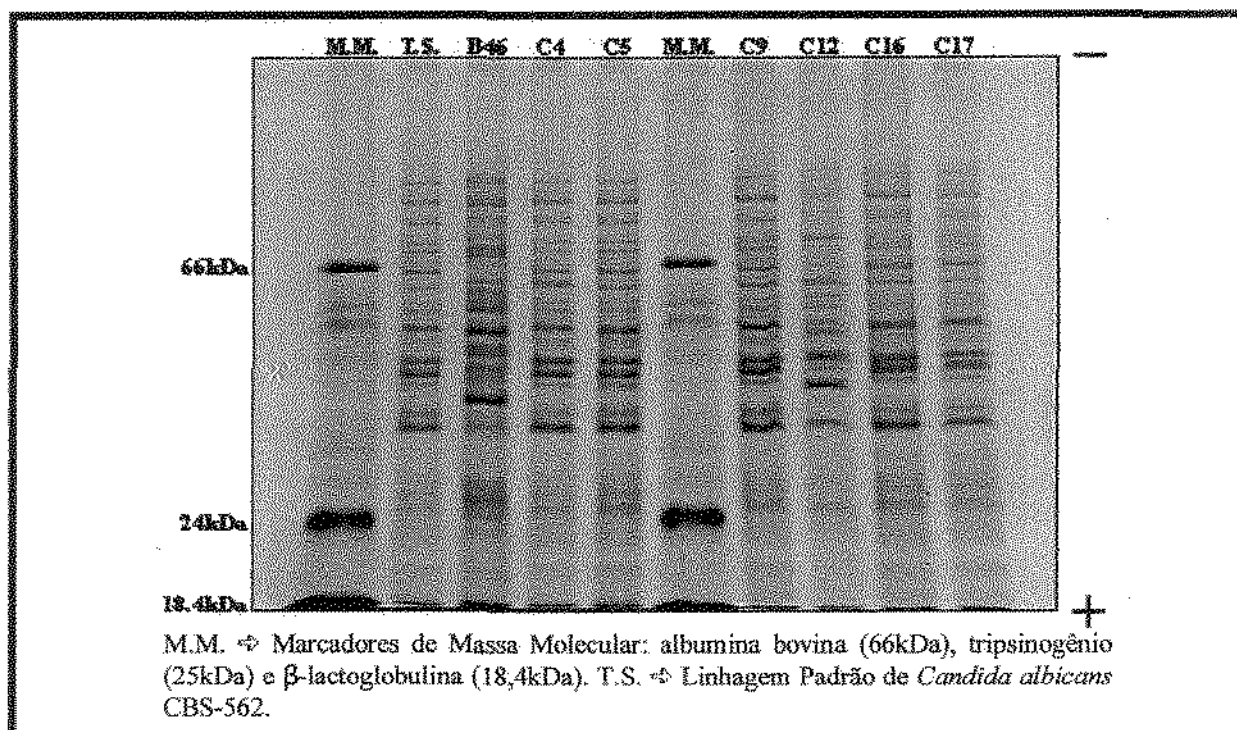


Figura 7. Perfis protéicos das linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares da classe socioeconômica C

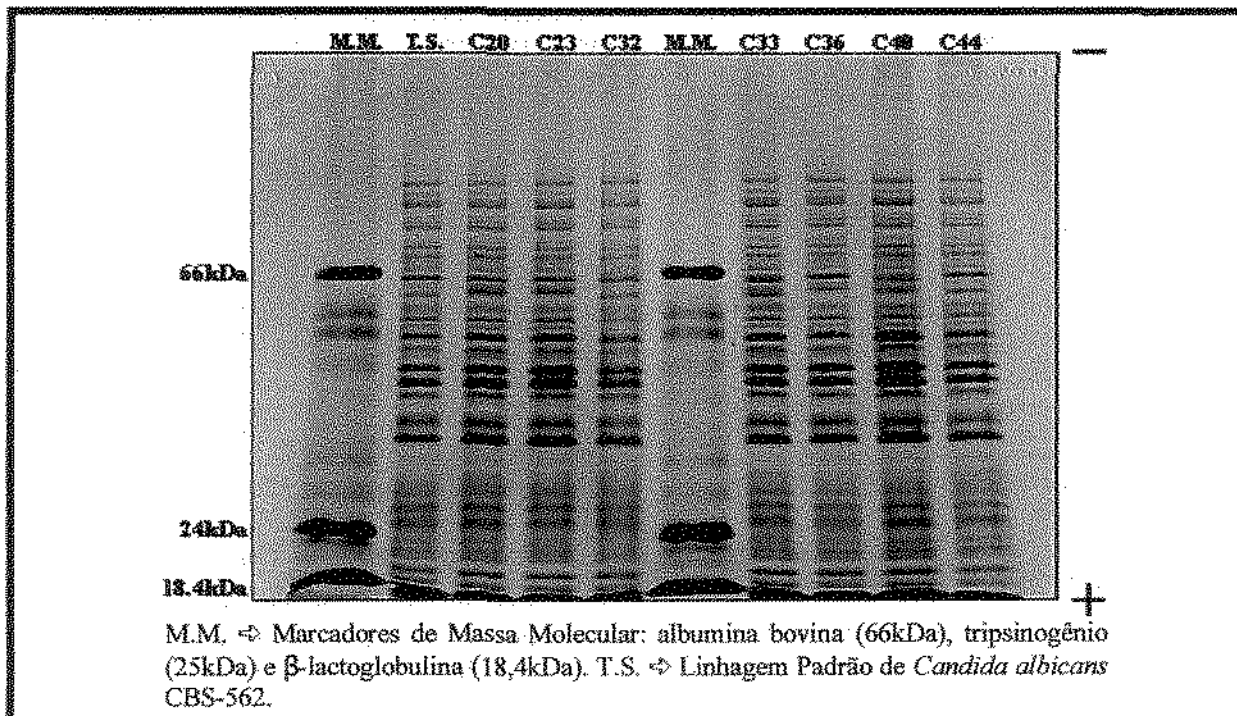


Figura 8. Perfis protéicos das linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares das classes socioeconômica C e D

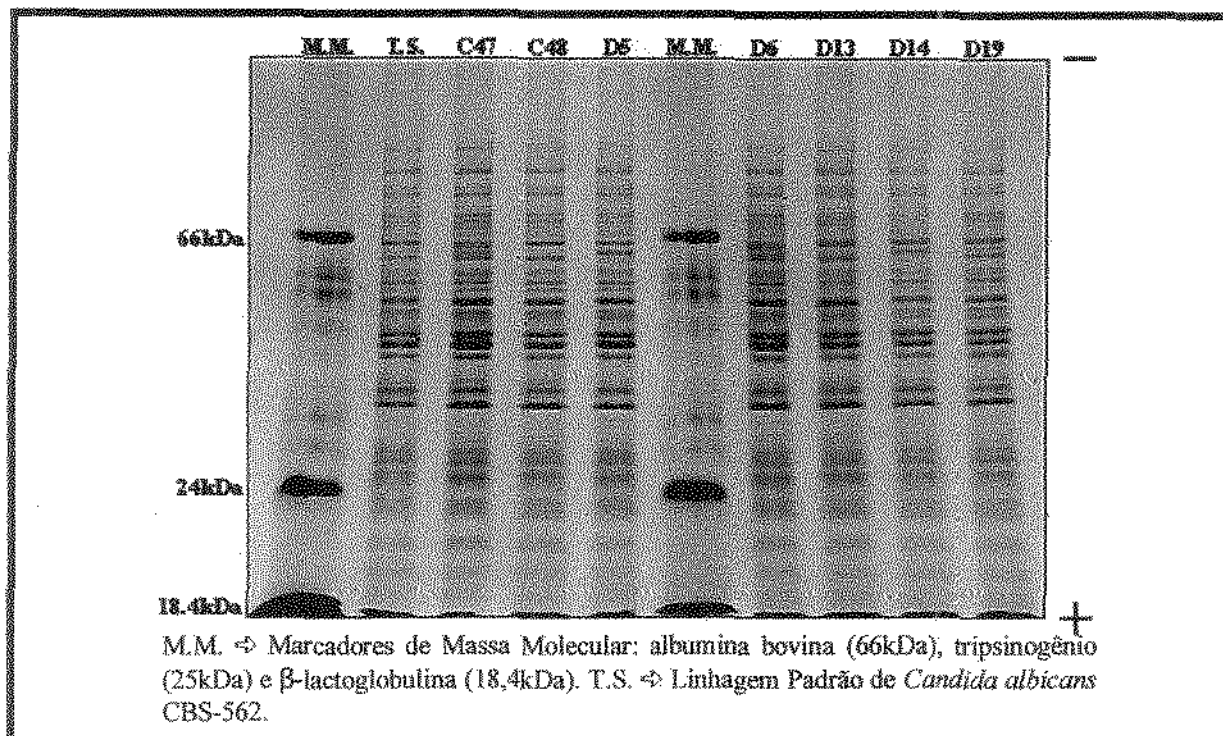


Figura 9. Perfis protéicos das linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares da classe socioeconômica D

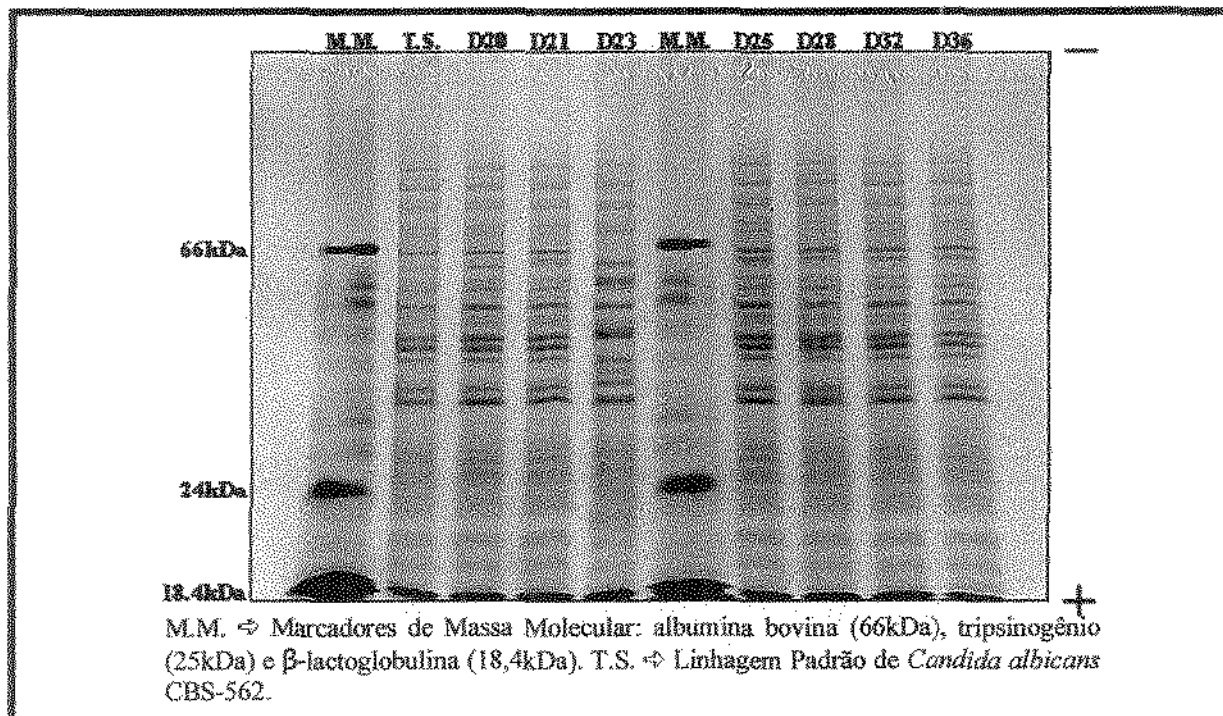


Figura 10. Perfis protéicos das linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares da classe socioeconômica E

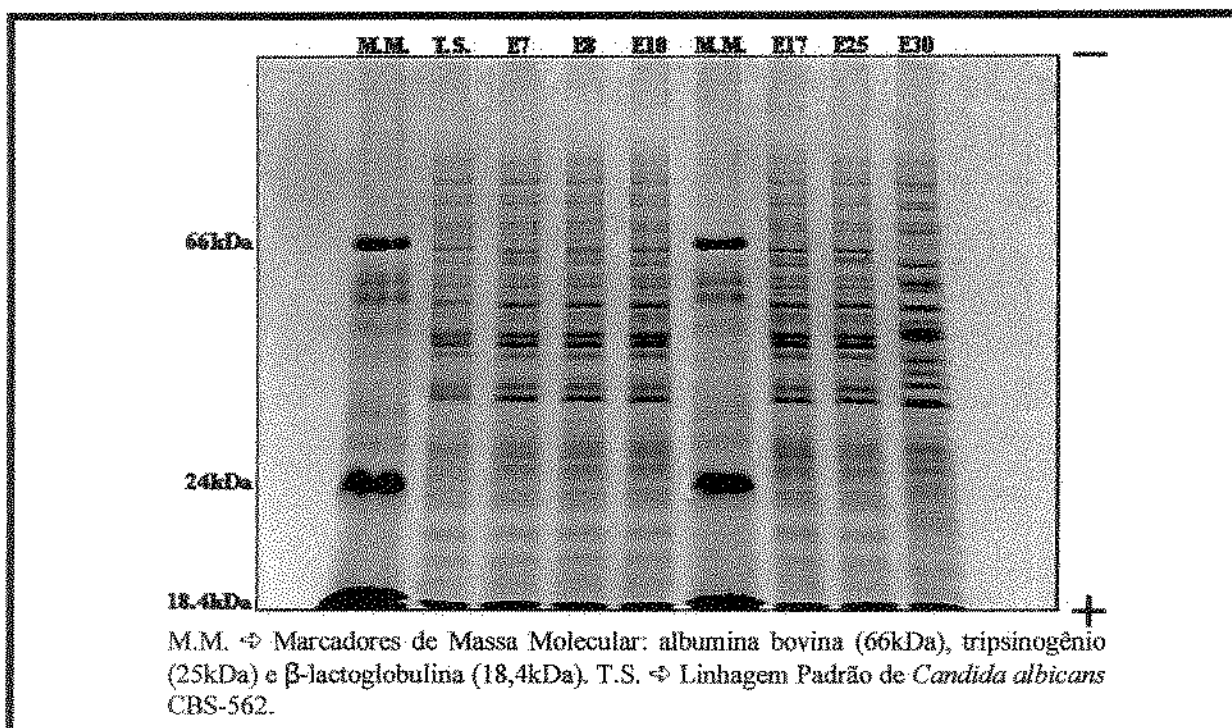
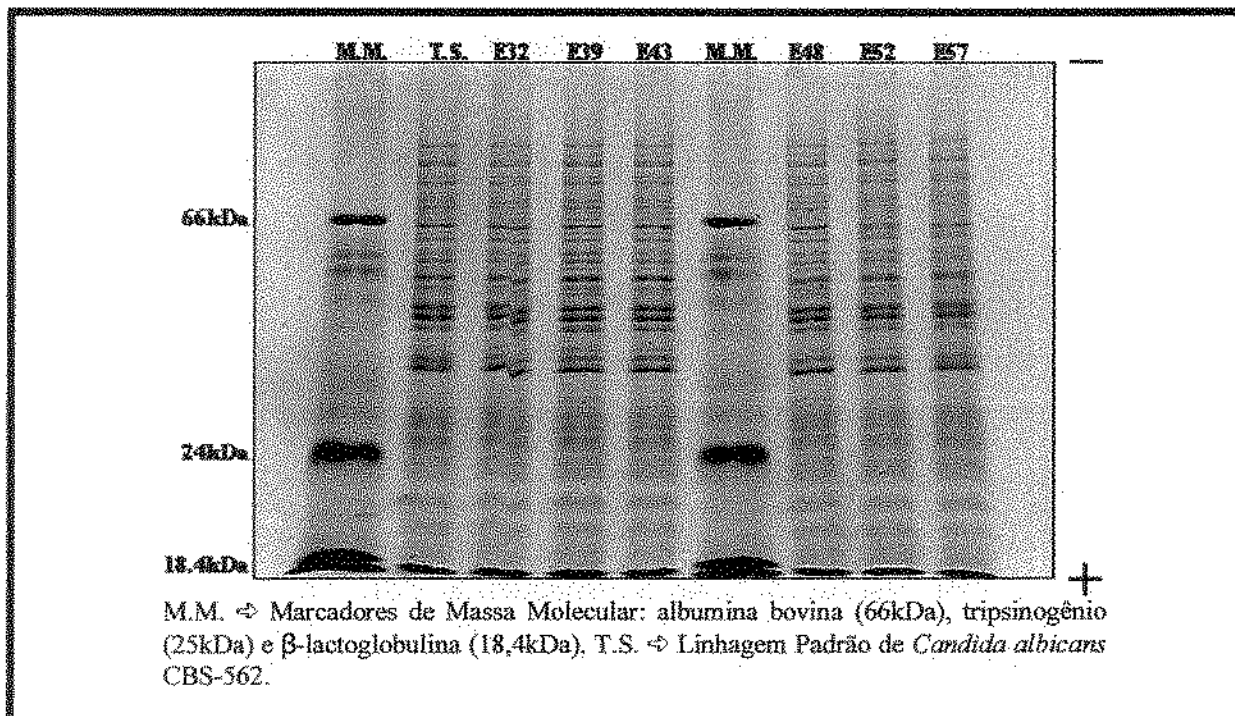


Figura 11. Perfis protéicos das linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares da classe socioeconômica E



2. Análise dos dendrogramas de similaridade

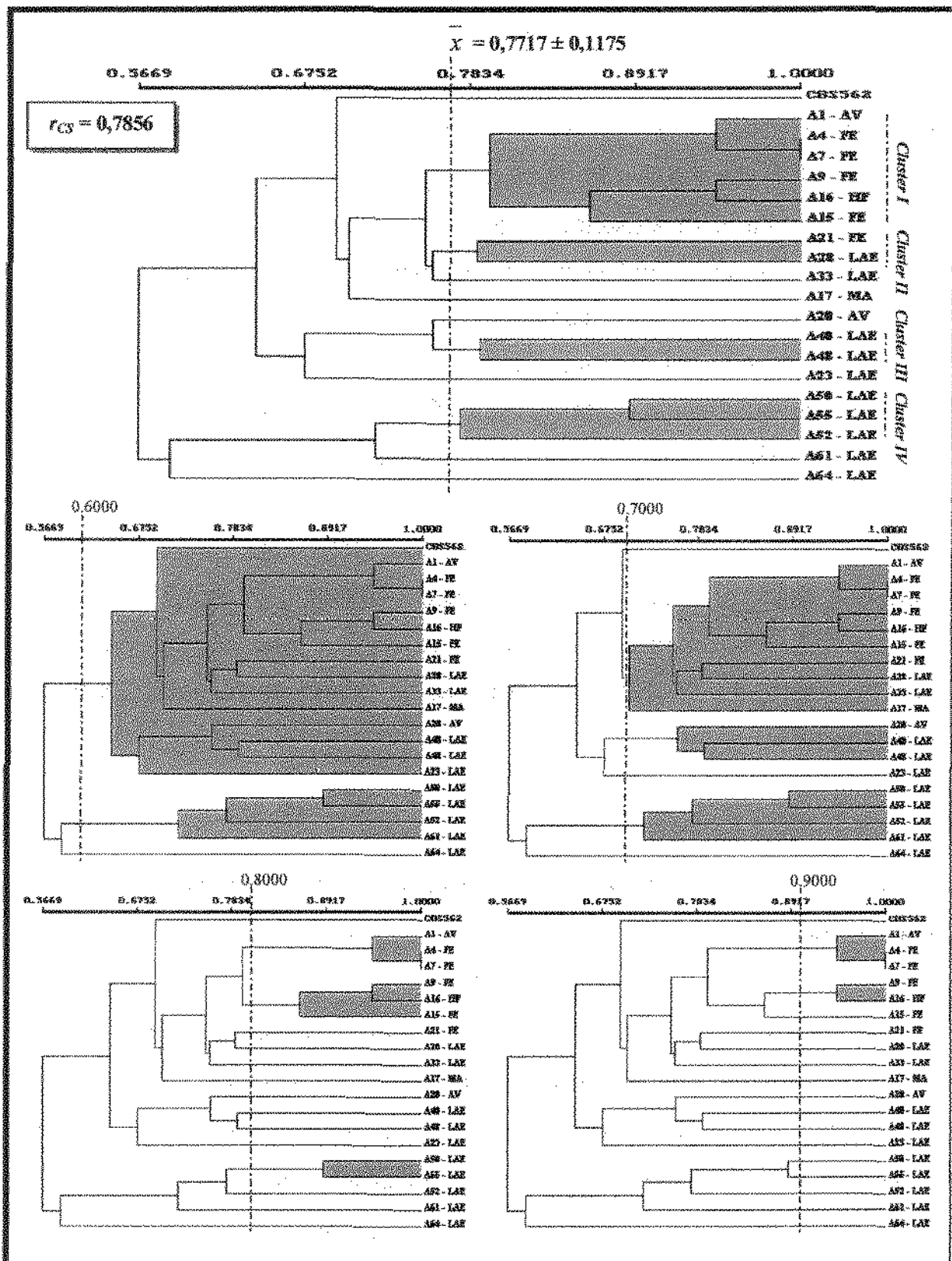
A utilização do *coeficiente de associação* (similaridade) de Dice possibilitou a construção das matrizes de similaridade (S) para as amostras. Essas matrizes, analisadas através do método de agrupamento UPGMA, permitiram a obtenção dos dendrogramas, os quais possibilitaram as avaliações dos graus de similaridade existentes entre os isolados de *Candida albicans*, e também a avaliação dessas linhagens separadamente em suas respectivas classes socioeconômicas e escolas (Figuras 17 a 29). Esses dendrogramas também foram analisados aplicando-se nos mesmos cinco diferentes linhas de corte, traçadas perpendicularmente em 60%, 70%, 80% e 90%, bem como nos valores médios de similaridade, que possibilitaram a formação de diferentes “clusters” durante a análise.

As matrizes de valores cofenéticos (C), obtidas a partir dos respectivos dendrogramas de similaridade UPGMA, possibilitaram a determinação dos *coeficientes de correlação cofenética* (r_{CS}), entre as matrizes de similaridade (S) e suas respectivas matrizes de valores cofenéticos (C), para cada dendrograma.

2.1 Análise dos dendrogramas de similaridade para as diferentes classes socioeconômicas

As linhagens de *Candida albicans* foram analisadas separadamente dentro de suas respectivas classes socioeconômicas comparando-se a dispersão dos graus de similaridade dos dendrogramas, a formação de “clusters” em diferentes linhas de corte e os graus de associação para cada linhagem em relação a outra, levando-se em consideração também suas escolas.

Figura 12. Dendrogramas de similaridade para as linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares representativos da classe socioeconômica A



As linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares pertencentes a classe socioeconômica A mostraram-se associadas com graus de similaridade variando entre 0,5669 (56,7%) e 1,0 (100%). A quantidade dos diferentes "clusters" formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas, bem como as diferentes associações entre as linhagens podem ser visualizados nas tabelas 3 e 3.1 abaixo.

Tabela 3. Diferentes "clusters" formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a classe socioeconômica A

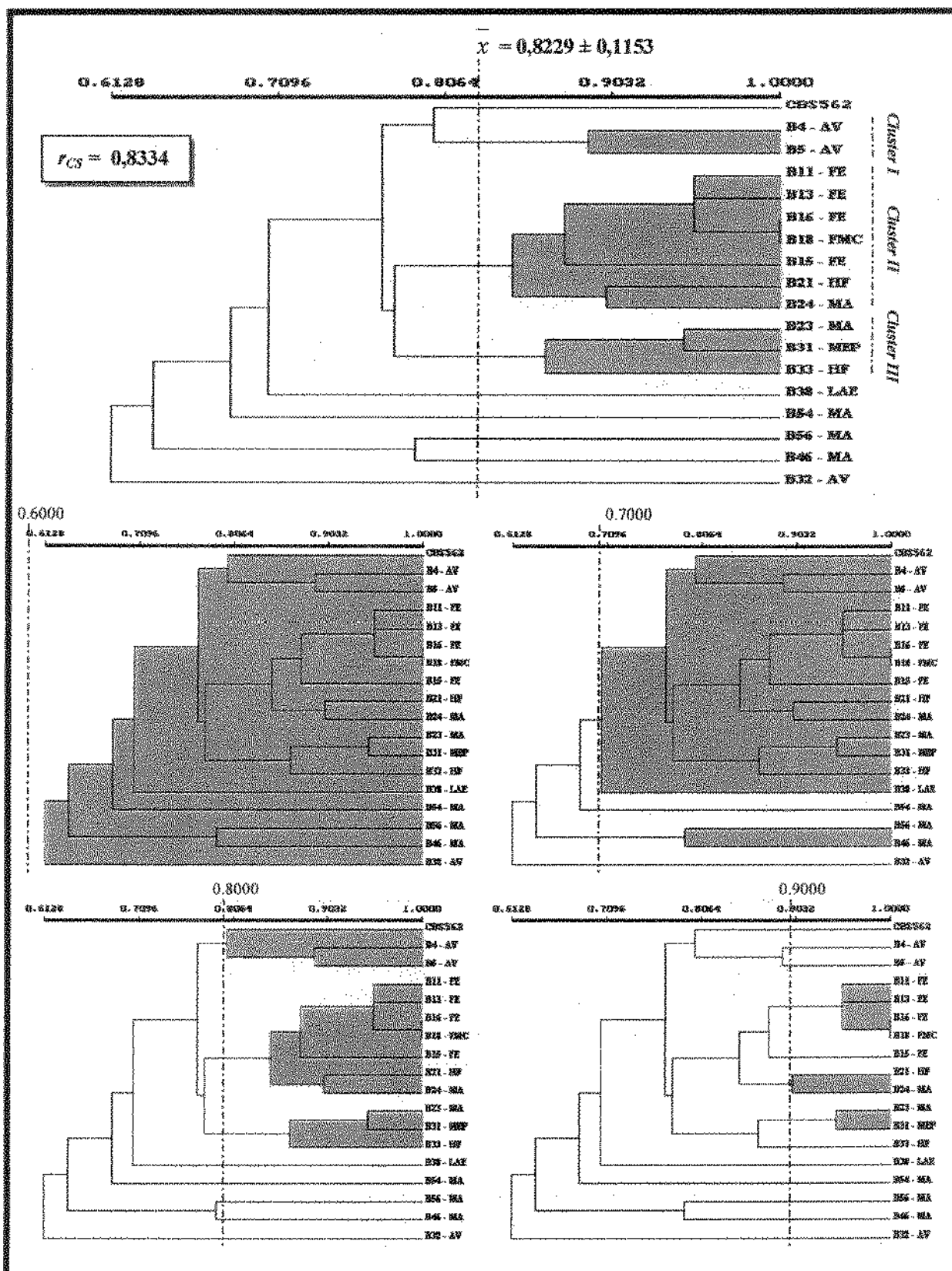
Linha de Corte	Número de Linhagens/Cluster		%	Número de Linhagens/Escola					
				CBS-562	AV	FE	HF	LAE	MA
0.6000	Cluster I	15	75	1	2	5	1	5	1
	Cluster II	4	20					4	
	Não agrupadas	1	5					1	
0.7000	Cluster I	10	50		1	5	1	2	1
	Cluster II	3	15		1			2	
	Cluster III	4	20					4	
	Não agrupadas	3	15	1				2	
0.8000	Cluster I	3	15		1	2			
	Cluster II	3	15			2	1		
	Cluster III	2	10					2	
	Não agrupadas	12	60	1	1	1		8	1
0.9000	Cluster I	3	15		1	2			
	Cluster II	2	10			1	1		
	Não agrupadas	15	75	1	1	2		10	1
Média (0.7717)	Cluster I	6	30		1	4	1		
	Cluster II	2	10			1		1	
	Cluster III	2	10					2	
	Cluster IV	3	15					3	
	Não agrupadas	7	35	1	1			4	1

Tabela 3.1. Diferentes associações obtidas entre linhagens com diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a classe socioeconômica A

Linha de Corte	v	y	z
60%	18	12	1
70%	17	9	2
80%	8	4	11
90%	5	2	14
Média (77,2%)	13	4	6

v ⇨ número de linhagens associadas com uma ou mais linhagens da mesma classe socioeconômica. y ⇨ número de linhagens associadas com uma ou mais linhagens de escolas iguais e diferentes, portanto, no mínimo com duas linhagens associadas. z ⇨ número de linhagens sem associação com outras linhagens das mesmas ou diferentes escolas e classes socioeconômicas.

Figura 13. Dendrogramas de similaridade para as linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares representativos da classe socioeconômica B



As linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares pertencentes a classe socioeconômica B mostraram-se associadas com graus de similaridade variando entre 0,6128 (61,3%) e 1,0 (100%). A quantidade dos diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas, bem como as diferentes associações entre as linhagens podem ser visualizados nas tabelas 4 e 4.1 abaixo.

Tabela 4. Diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a classe socioeconômica B

Linha de Corte	Número de Linhagens/Cluster	%	Número de Linhagens/Escola								
			CBS-562	AV	FE	FMC	HF	LAE	MA	MEP	
0.6000	Cluster I	18	100,0	1	3	4	1	2	1	5	1
0.7000	Cluster I	14	77,8	1	2	4	1	2	1	2	1
	Cluster II	2	11,1							2	
	Não agrupadas	2	11,1		1					1	
0.8000	Cluster I	3	16,7	1	2						
	Cluster II	7	38,9			4	1	1		1	
	Cluster III	3	16,7					1		1	1
	Não agrupadas	5	27,7		1				1	3	
0.9000	Cluster I	4	22,2			3	1				
	Cluster II	2	11,1					1		1	
	Cluster III	2	11,1							1	1
	Não agrupadas	10	55,6	1	3	1		1	1	3	
Média (0.8229)	Cluster I	2	11,1		2						
	Cluster II	7	38,9			4	1	1		1	
	Cluster III	3	16,7					1		1	1
	Não agrupadas	6	33,3	1	1				1	3	

Tabela 4.1. Diferentes associações obtidas entre linhagens com diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a classe socioeconômica B

Linha de Corte	v	y	z
60%	17	14	0
70%	15	10	2
80%	12	4	5
90%	8	3	9
Média (82,3%)	12	4	5

v ⇨ número de linhagens associadas com uma ou mais linhagens da mesma classe socioeconômica. y ⇨ número de linhagens associadas com uma ou mais linhagens de escolas iguais e diferentes, portanto, no mínimo com duas linhagens associadas. z ⇨ número de linhagens sem associação com outras linhagens das mesmas ou diferentes escolas e classes socioeconômicas.

As linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares pertencentes a classe socioeconômica C mostraram-se associadas com graus de similaridade variando entre 0,6009 (60,1%) e 1,0 (100%). A quantidade dos diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas, bem como as diferentes associações entre as linhagens podem ser visualizados nas tabelas 5 e 5.1 abaixo.

Tabela 5. Diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a classe socioeconômica C

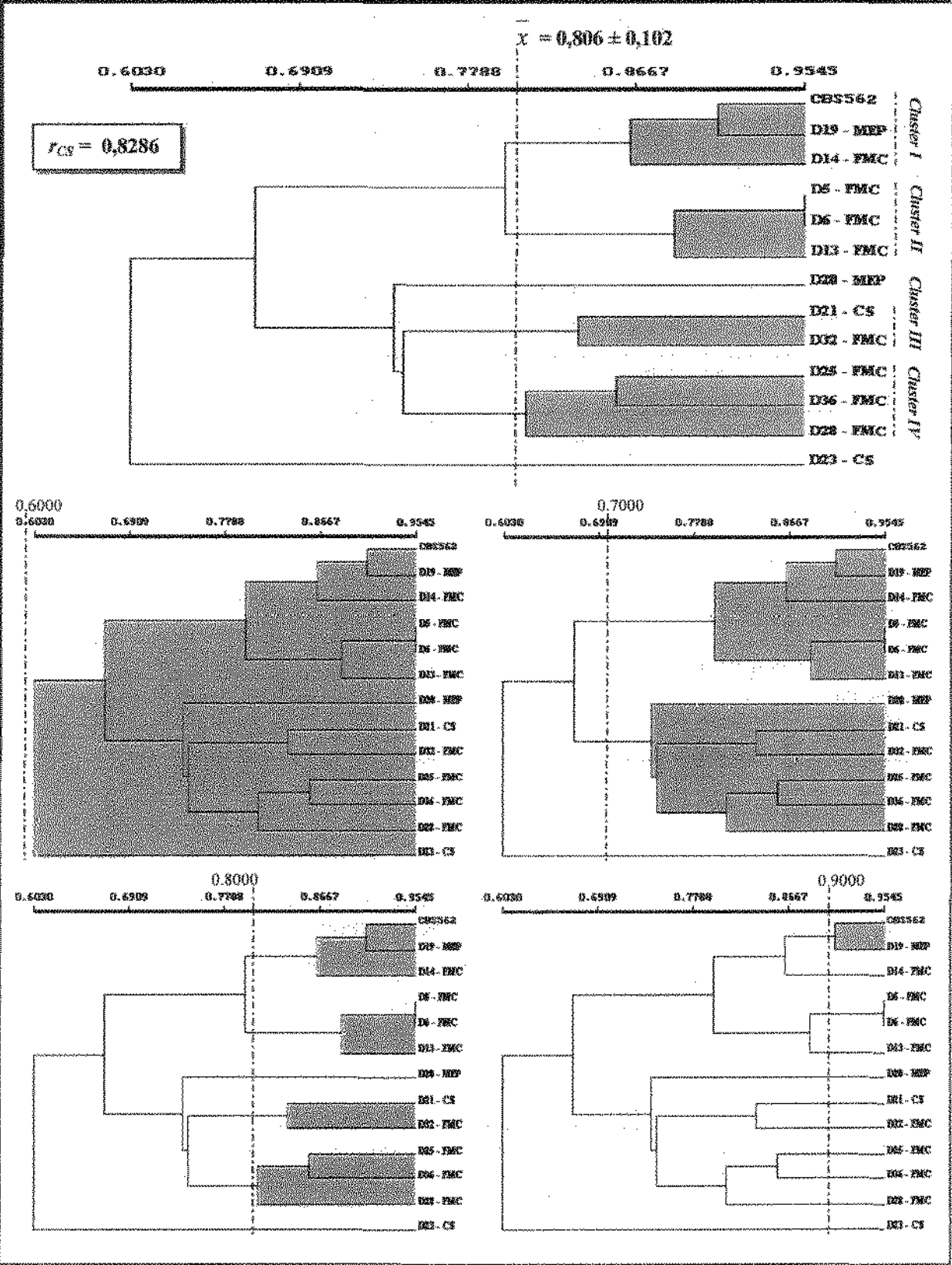
Linha de Corte	Número de Linhagens/Cluster	%	Número de Linhagens/Escola						
			CBS-562	AV	FE	FMC	HF	MEP	
0.6000	Cluster I	16	100,0	1	1	1	2	7	4
0.7000	Cluster I	15	93,8	1	1	1	2	6	4
	Não agrupadas	1	6,2					1	
0.8000	Cluster I	5	31,2	1	1	1	1	1	
	Cluster II	6	37,5					2	4
	Cluster III	2	12,5					2	
	Não agrupadas	3	18,8				1	2	
0.9000	Cluster I	2	12,5				1	1	
	Cluster II	6	37,5					2	4
	Não agrupadas	8	50	1	1	1	1	4	
Média (0.8439)	Cluster I	3	18,8			1	1	1	
	Cluster II	6	37,5					2	4
	Não agrupadas	7	43,7	1	1		1	4	

Tabela 5.1. Diferentes associações obtidas entre linhagens com diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a classe socioeconômica C

Linha de Corte	y	y	z
60%	15	13	0
70%	14	12	1
80%	12	6	3
90%	8	6	7
Média (84,4%)	9	6	6

y ⇨ número de linhagens associadas com uma ou mais linhagens da mesma classe socioeconômica. y ⇨ número de linhagens associadas com uma ou mais linhagens de escolas iguais e diferentes, portanto, no mínimo com duas linhagens associadas. z ⇨ número de linhagens sem associação com outras linhagens das mesmas ou diferentes escolas e classes socioeconômicas.

Figura 15. Dendrogramas de similaridade para as linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares representativos da classe socioeconômica D



As linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares pertencentes a classe socioeconômica D mostraram-se associadas com graus de similaridade variando entre 0,6030 (60,3%) e 0,9545 (95,5%). A quantidade dos diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas, bem como as diferentes associações entre as linhagens podem ser visualizados nas tabelas 6 e 6.1 abaixo.

Tabela 6. Diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a classe socioeconômica D

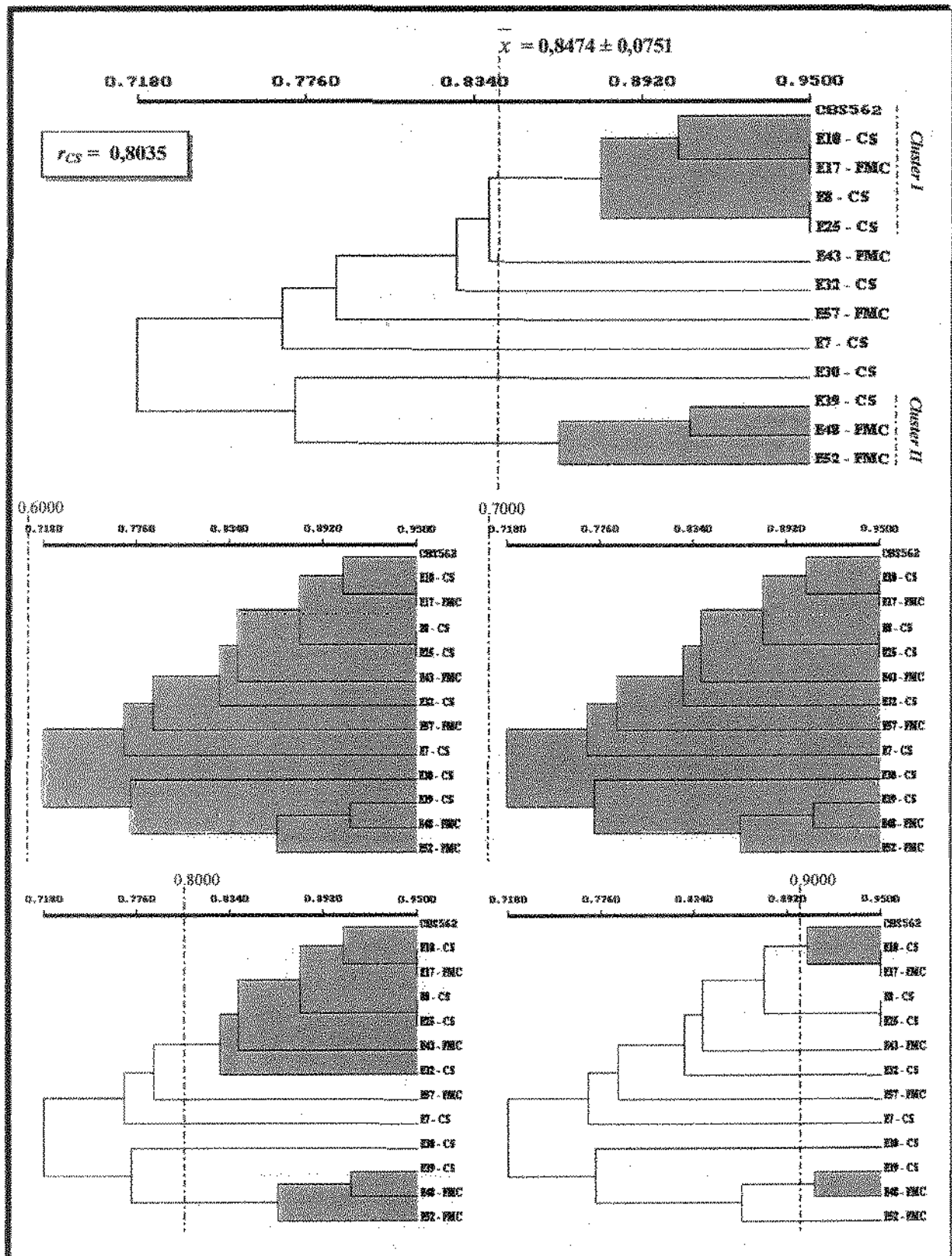
Linha de Corte	Número de Linhagens/Cluster		%	Número de Linhagens/Escola			
				CBS-562	CS	FMC	MEP
0.6000	Cluster I	13	100,0	1	2	8	2
0.7000	Cluster I	6	46,2	1		4	1
	Cluster II	6	46,2		1	4	1
	Não agrupadas	1	7,6		1		
0.8000	Cluster I	3	23,1	1		1	1
	Cluster II	3	23,1			3	
	Cluster III	2	15,35		1	1	
	Cluster IV	3	23,1			3	
	Não agrupadas	2	15,35		1		1
0.9000	Cluster I	2	15,35	1		1	
	Não agrupadas	11	84,65		2	8	1
Média (0.8060)	Cluster I	3	23,1	1		1	1
	Cluster II	3	23,1			3	
	Cluster III	2	15,35		1	1	
	Cluster IV	3	23,1			3	
	Não agrupadas	2	15,35		1		1

Tabela 6.1. Diferentes associações obtidas entre linhagens com diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a classe socioeconômica D

Linha de Corte	v	y	z
60%	12	12	0
70%	11	8	1
80%	10	0	2
90%	2	0	10
Média (80,6%)	11	0	1

v ⇨ número de linhagens associadas com uma ou mais linhagens da mesma classe socioeconômica, y ⇨ número de linhagens associadas com uma ou mais linhagens de escolas iguais e diferentes, portanto, no mínimo com duas linhagens associadas, z ⇨ número de linhagens sem associação com outras linhagens das mesmas ou diferentes escolas e classes socioeconômicas.

Figura 16. Dendrogramas de similaridade para as linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares representativos da classe socioeconômica E



As linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares pertencentes a classe socioeconômica E mostraram-se associadas com graus de similaridade variando entre 0,7180 (71,8%) e 0,9500 (95%). A quantidade dos diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas, bem como as diferentes associações entre as linhagens podem ser visualizados nas tabelas 7 e 7.1 abaixo.

Tabela 7. Diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a classe socioeconômica E

Linha de Corte	Número de Linhagens/Cluster		%	Número de Linhagens/Escola		
				CBS-562	CS	FMC
0.6000	Cluster I	13	100,0	1	7	5
0.7000	Cluster I	13	100,0	1	7	5
0.8000	Cluster I	7	53,8	1	4	2
	Cluster II	3	23,1		1	2
	Não agrupadas	3	23,1		2	1
0.9000	Cluster I	3	23,1	1	1	1
	Cluster II	2	15,35		2	
	Cluster III	2	15,35		1	1
	Não agrupadas	6	46,2		3	3
Média (0.8474)	Cluster I	5	38,45	1	3	1
	Cluster II	3	23,1		1	2
	Não agrupadas	5	38,45		3	2

Tabela 7.1. Diferentes associações obtidas entre linhagens com diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a classe socioeconômica E

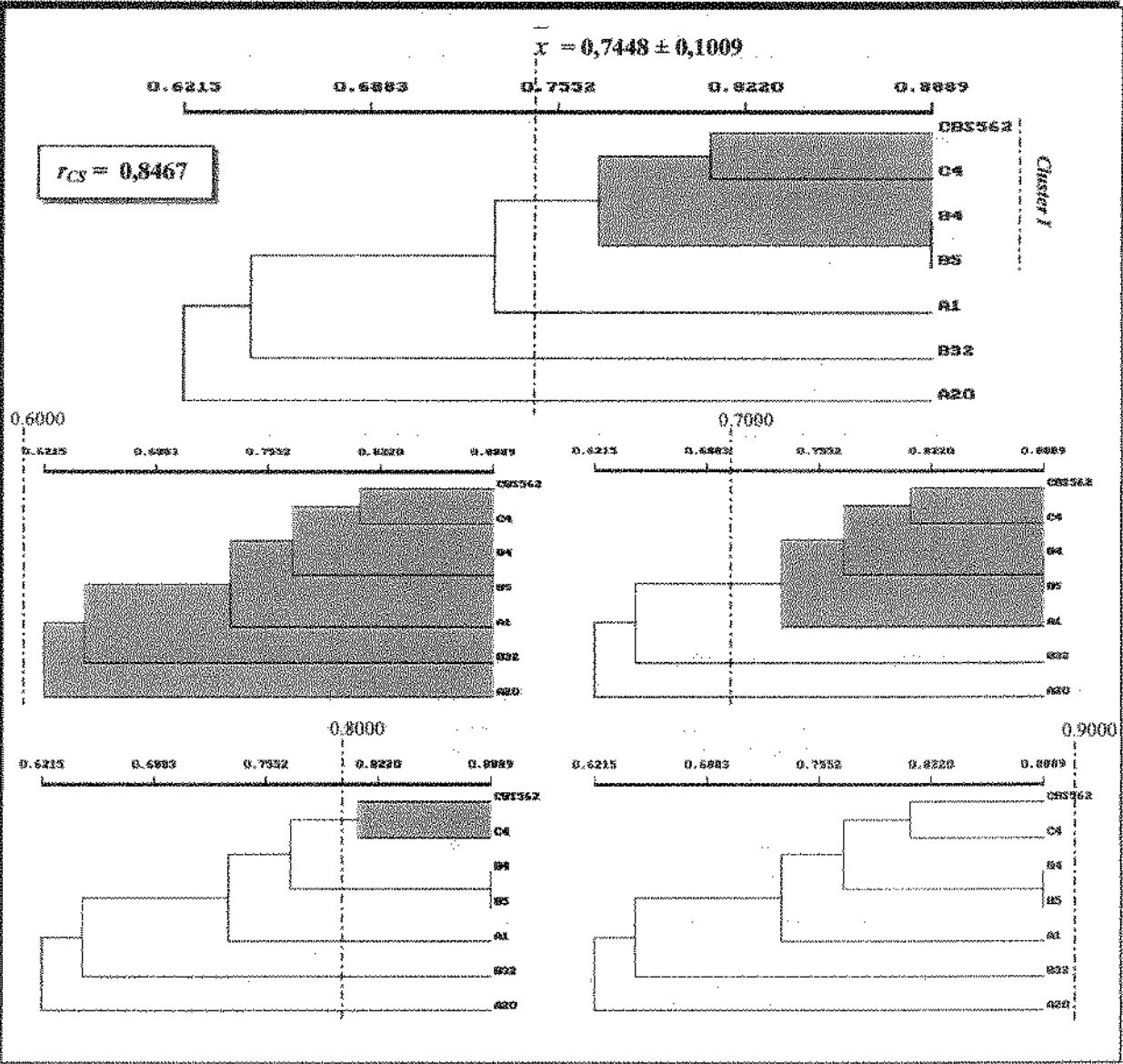
Linha de Corte	<i>v</i>	<i>y</i>	<i>z</i>
60%	12	12	0
70%	12	12	0
80%	9	8	3
90%	6	0	6
Média (84,7%)	7	5	5

v ⇨ número de linhagens associadas com uma ou mais linhagens da mesma classe socioeconômica. *y* ⇨ número de linhagens associadas com uma ou mais linhagens de escolas iguais e diferentes, portanto, no mínimo com duas linhagens associadas. *z* ⇨ número de linhagens sem associação com outras linhagens das mesmas ou diferentes escolas e classes socioeconômicas.

2.2 Análise dos dendrogramas de similaridade para as diferentes escolas

As linhagens de *Candida albicans* também foram analisadas separadamente, dentro de suas respectivas escolas, comparando-se a dispersão dos graus de similaridade dos dendrogramas, a formação de “clusters” em diferentes linhas de corte e os graus de associação para cada linhagem em relação a outra, levando-se em consideração também suas classes socioeconômicas.

Figura 17. Dendrogramas de similaridade para as linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares representativos da escola AV



As linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares pertencentes a escola AV mostraram-se associadas com graus de similaridade variando entre 0,6215 (62,2%) e 0,8889 (88,9%). A quantidade dos diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas, bem como as diferentes associações entre as linhagens podem ser visualizados nas tabelas 8 e 8.1 abaixo.

Tabela 8. Diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a escola AV

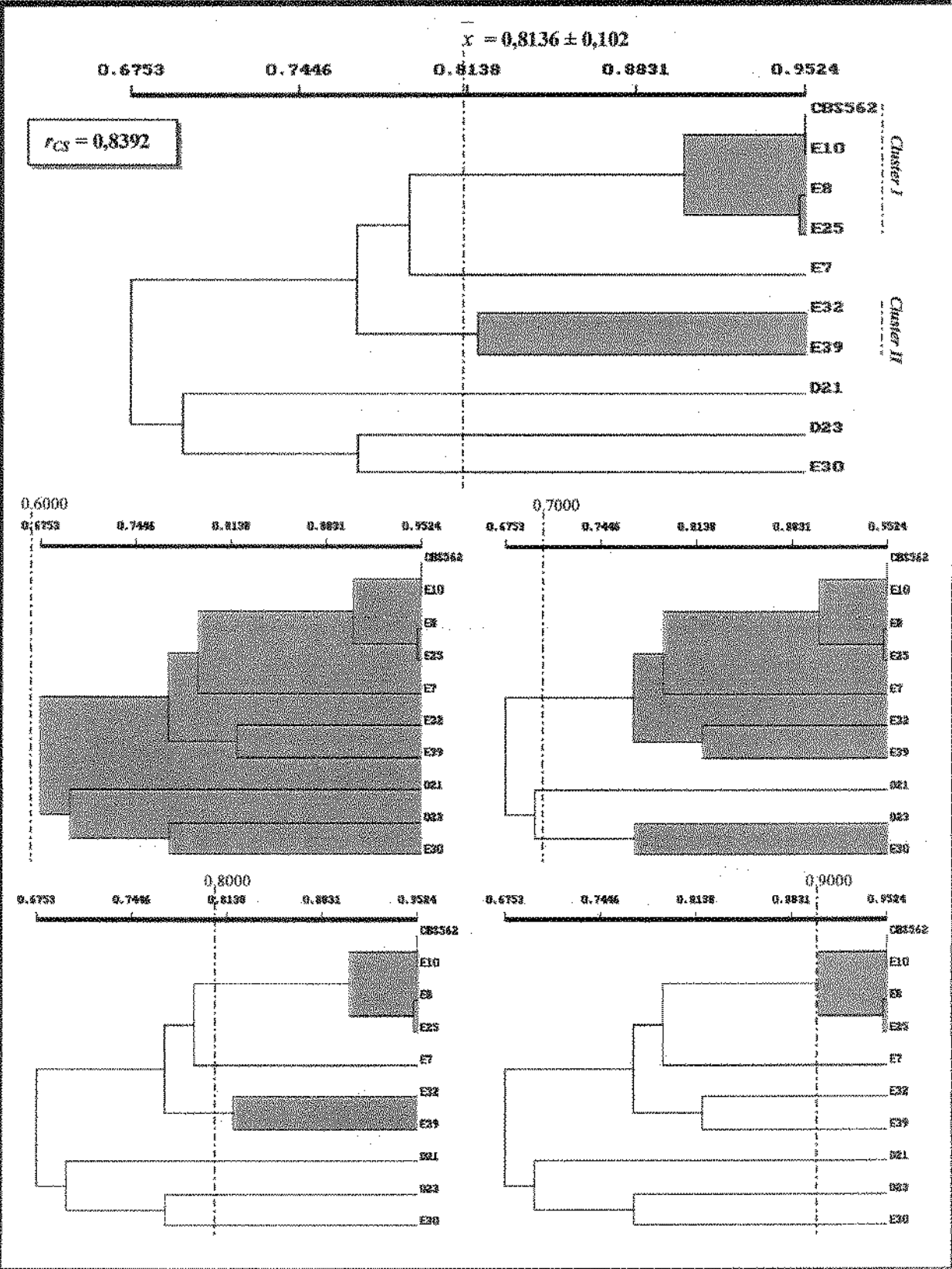
Linha de Corte	Número de Linhagens/Cluster		%	Número de Linhagens/Classes			
				CBS-562	A	B	C
0.6000	Cluster I	7	100,0	1	2	3	1
0.7000	Cluster I	5	71,4	1	1	2	1
	Não agrupadas	2	28,6		1	1	
0.8000	Cluster I	2	28,6	1			1
	Não agrupadas	5	71,4		2	3	
0.9000	Não agrupadas	7	100,0	1	2	3	1
Média	Cluster I	4	57,1	1		2	1
(0.7448)	Não agrupadas	3	42,9		2	1	

Tabela 8.1. Diferentes associações obtidas entre linhagens com diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a escola AV

Linha de Corte	x	w	z
60%	5	6	0
70%	2	4	2
80%	0	2	4
90%	0	0	6
Média (74,5%)	2	3	3

x ⇨ número de linhagens associadas com uma ou mais linhagens de classes socioeconômicas iguais e diferentes, portanto, no mínimo com duas linhagens associadas. w ⇨ número de linhagens associadas com uma ou mais linhagens da mesma escola. z ⇨ número de linhagens sem associação com outras linhagens das mesmas ou diferentes escolas e classes socioeconômicas.

Figura 18. Dendrogramas de similaridade para as linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares representativos da escola CS



As linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares pertencentes a escola CS mostraram-se associadas com graus de similaridade variando entre 0,6753 (67,5%) e 0,9524 (95,2%). A quantidade dos diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas, bem como as diferentes associações entre as linhagens podem ser visualizados nas tabelas 9 e 9.1 abaixo.

Tabela 9. Diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a escola CS

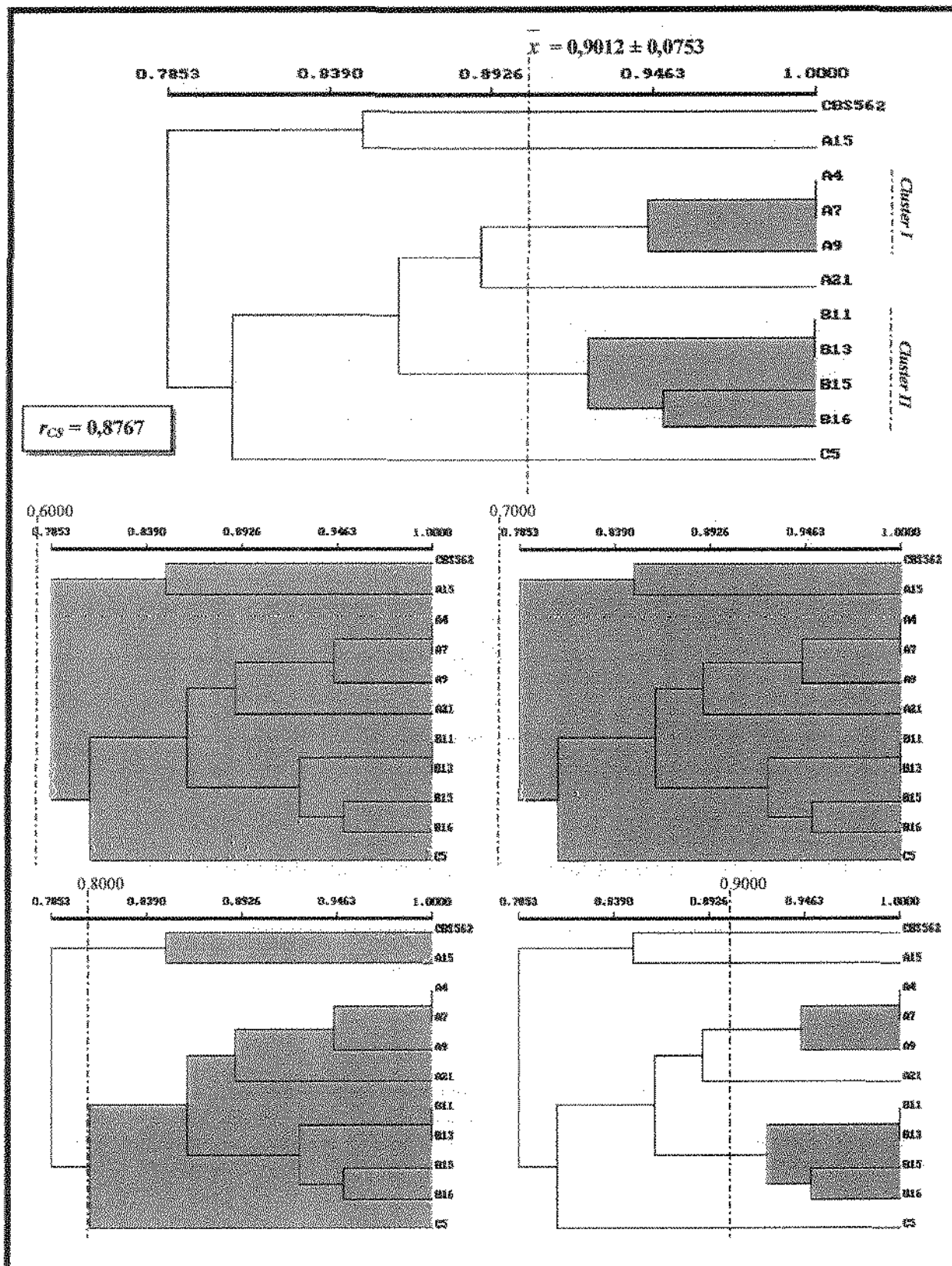
Linha de Corte	Número de		%	Número de Linhagens/Classes		
	Linhagens/Cluster			CBS-562	D	E
0.6000	Cluster I	10	100,0	1	7	2
0.7000	Cluster I	7	70,0	1		6
	Cluster II	2	20,0		1	1
	Não agrupadas	1	10,0		1	
0.8000	Cluster I	4	40,0	1		3
	Cluster II	2	20,0			2
	Não agrupadas	4	40,0		2	2
0.9000	Cluster I	4	40,0	1		3
	Não agrupadas	6	60,0		2	4
Média (0.8136)	Cluster I	4	40,0	1		3
	Cluster II	2	20,0			2
	Não agrupadas	4	40,0		2	2

Tabela 9.1. Diferentes associações obtidas entre linhagens com diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a escola CS

Linha de Corte	x	w	z
60%	9	9	0
70%	0	8	1
80%	0	5	4
90%	0	3	6
Média (81,4%)	0	5	4

x $\rightarrow$ número de linhagens associadas com uma ou mais linhagens de classes socioeconômicas iguais e diferentes, portanto, no mínimo com duas linhagens associadas. w $\rightarrow$ número de linhagens associadas com uma ou mais linhagens da mesma escola. z $\rightarrow$ número de linhagens sem associação com outras linhagens das mesmas ou diferentes escolas e classes socioeconômicas.

Figura 19. Dendrogramas de similaridade para as linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares representativos da escola FE



As linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares pertencentes a escola FE mostraram-se associadas com graus de similaridade variando entre 0,7853 (78,5%) e 1,0 (100%). A quantidade dos diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas, bem como as diferentes associações entre as linhagens podem ser visualizados nas tabelas 10 e 10.1 abaixo.

Tabela 10. Diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a escola FE

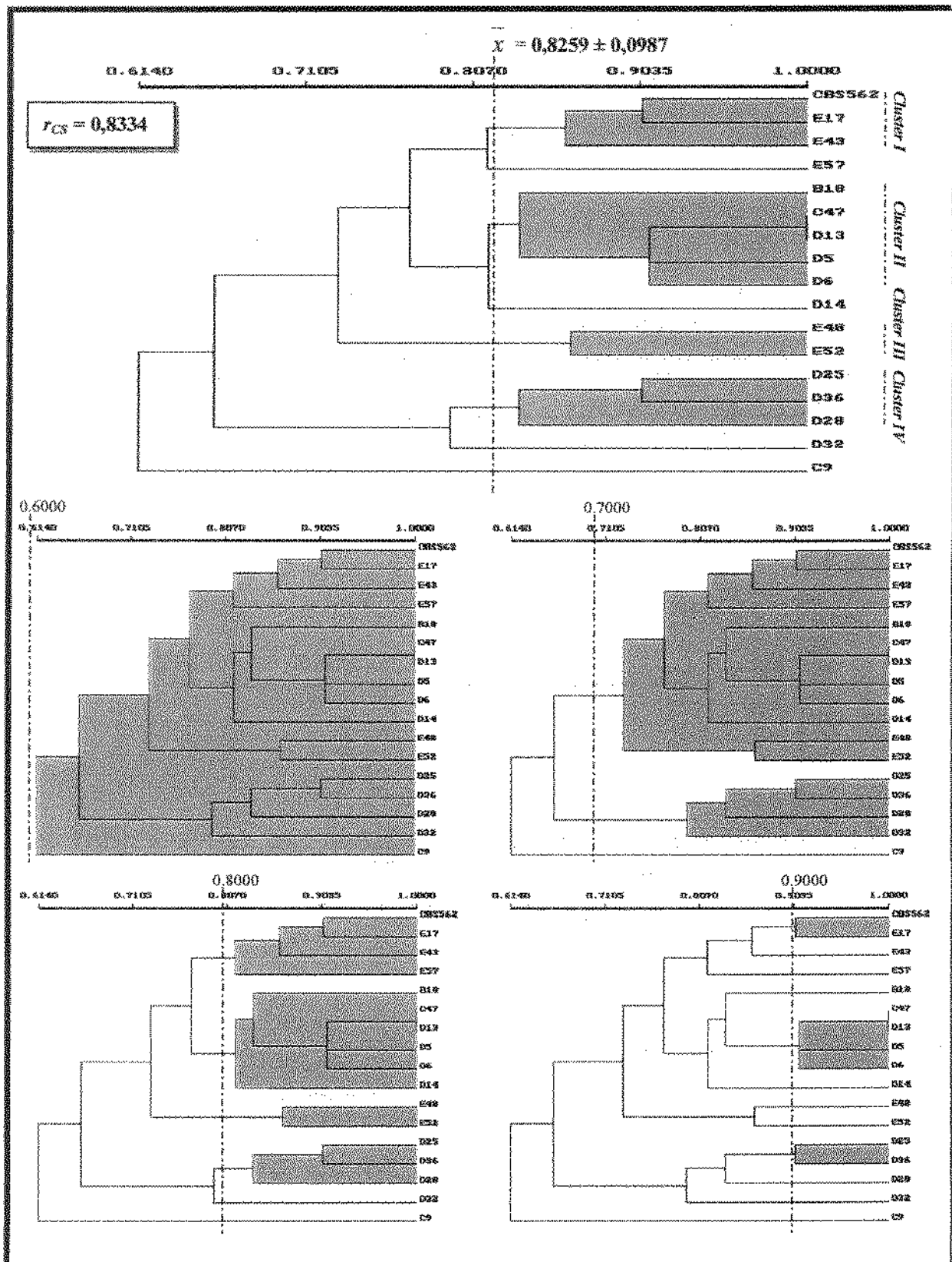
Linha de Corte	Número de Linhagens/Cluster		%	Número de Linhagens/Classe			
				CBS-562	A	B	C
0.6000	Cluster I	11	100,0	1	5	4	1
0.7000	Cluster I	11	100,0	1	5	4	1
0.8000	Cluster I	9	81,8	1	1		
	Cluster II	2	18,2		4	4	1
0.9000	Cluster I	3	27,2		3		
	Cluster II	4	36,4			4	
	Não agrupadas	4	36,4	1	2		1
Média (0.9012)	Cluster I	3	27,2		3		
	Cluster II	4	36,4			4	
	Não agrupadas	4	36,4	1	2		1

Tabela 10.1. Diferentes associações obtidas entre linhagens com diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a escola FE

Linha de Corte	x	w	z
60%	9	10	0
70%	9	10	0
80%	8	9	1
90%	0	7	3
Média (90,1%)	0	7	3

x = número de linhagens associadas com uma ou mais linhagens de classes socioeconômicas iguais e diferentes, portanto, no mínimo com duas linhagens associadas. w = número de linhagens associadas com uma ou mais linhagens da mesma escola. z = número de linhagens sem associação com outras linhagens das mesmas ou diferentes escolas e classes socioeconômicas.

Figura 20. Dendrogramas de similaridade para as linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares representativos da escola FMC



As linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares pertencentes a escola FMC mostraram-se associadas com graus de similaridade variando entre 0,6140 (61,4%) e 1,0 (100%). A quantidade dos diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas, bem como as diferentes associações entre as linhagens podem ser visualizados nas tabelas 11 e 11.1 abaixo.

Tabela 11. Diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a escola FMC

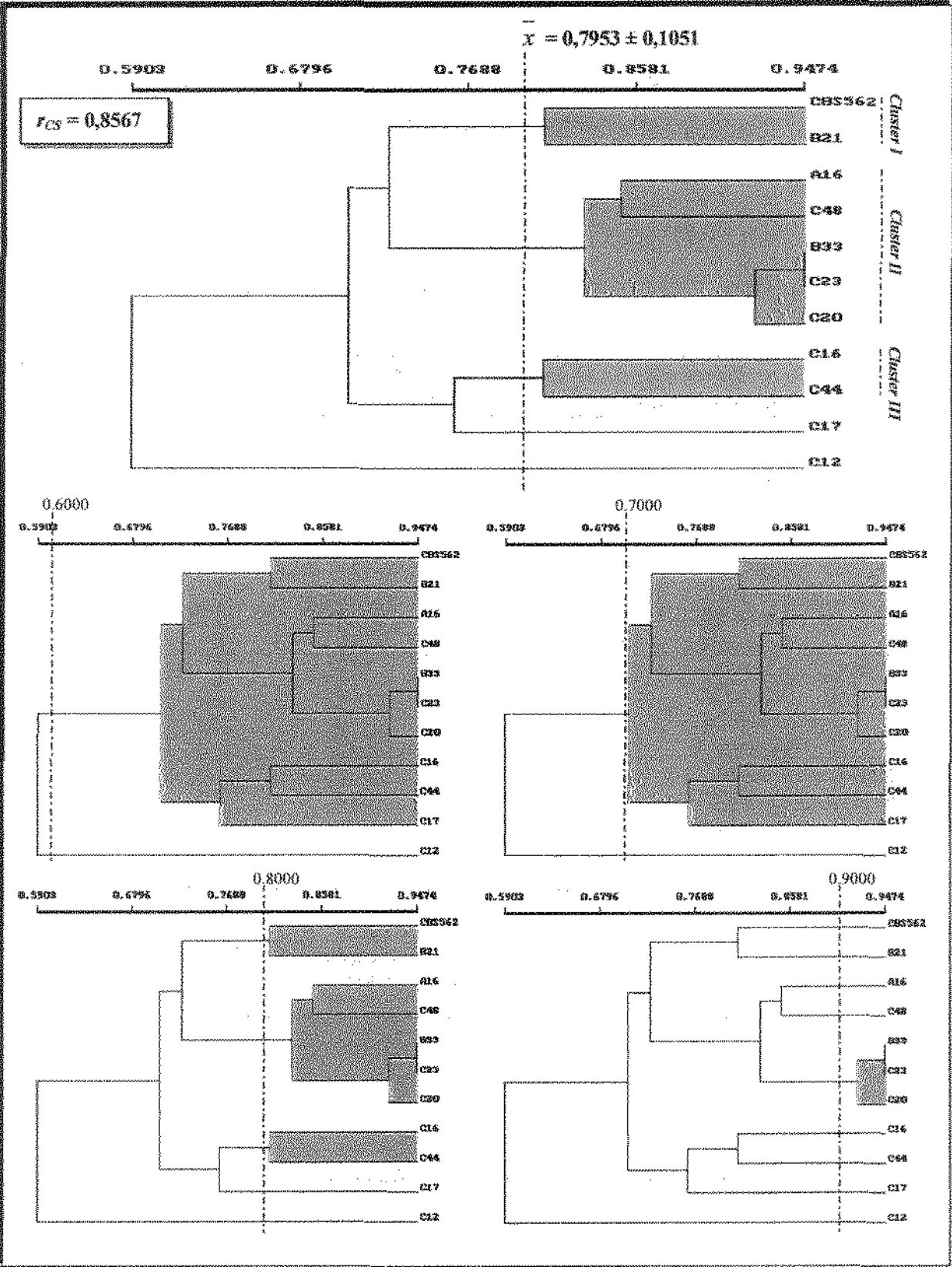
Linha de Corte	Número de Linhagens/Cluster		%	Número de Linhagens/Classe				
				CB8-562	B	C	D	E
0.6000	Cluster I	17	100,0	1	1	2	8	5
0.7000	Cluster I	12	70,6	1	1	1	4	5
	Cluster II	4	23,5				4	
	Não agrupadas	1	5,9			1		
0.8000	Cluster I	4	23,5	1				3
	Cluster II	6	35,3		1	1	4	
	Cluster III	2	11,8					2
	Cluster IV	3	17,6				3	
	Não agrupadas	2	11,8			1	1	
0.9000	Cluster I	2	11,8	1				1
	Cluster II	4	23,5			1	3	
	Cluster III	2	11,8				2	
	Não agrupadas	9	52,9		1	1	3	4
Média (0.8259)	Cluster I	3	17,6	1				2
	Cluster II	5	29,5		1	1	3	
	Cluster III	2	11,8					2
	Cluster IV	3	17,6				3	
	Não agrupadas	4	23,5			1	2	1

Tabela 11.1. Diferentes associações obtidas entre linhagens com diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a escola FMC

Linha de Corte	x	w	z
60%	15	16	0
70%	9	15	1
80%	4	14	2
90%	3	6	10
Média (82,6%)	3	12	4

x ⇨ número de linhagens associadas com uma ou mais linhagens de classes socioeconômicas iguais e diferentes, portanto, no mínimo com duas linhagens associadas. w ⇨ número de linhagens associadas com uma ou mais linhagens da mesma escola. z ⇨ número de linhagens sem associação com outras linhagens das mesmas ou diferentes escolas e classes socioeconômicas.

Figura 21. Dendrogramas de similaridade para as linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares representativos da escola HF



Resultados

As linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares pertencentes a escola HF mostraram-se associadas com graus de similaridade variando entre 0,5903 (59%) e 0,9474 (94,7%). A quantidade dos diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas, bem como as diferentes associações entre as linhagens podem ser visualizados nas tabelas 12 e 12.1 abaixo.

Tabela 12. Diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a escola HF

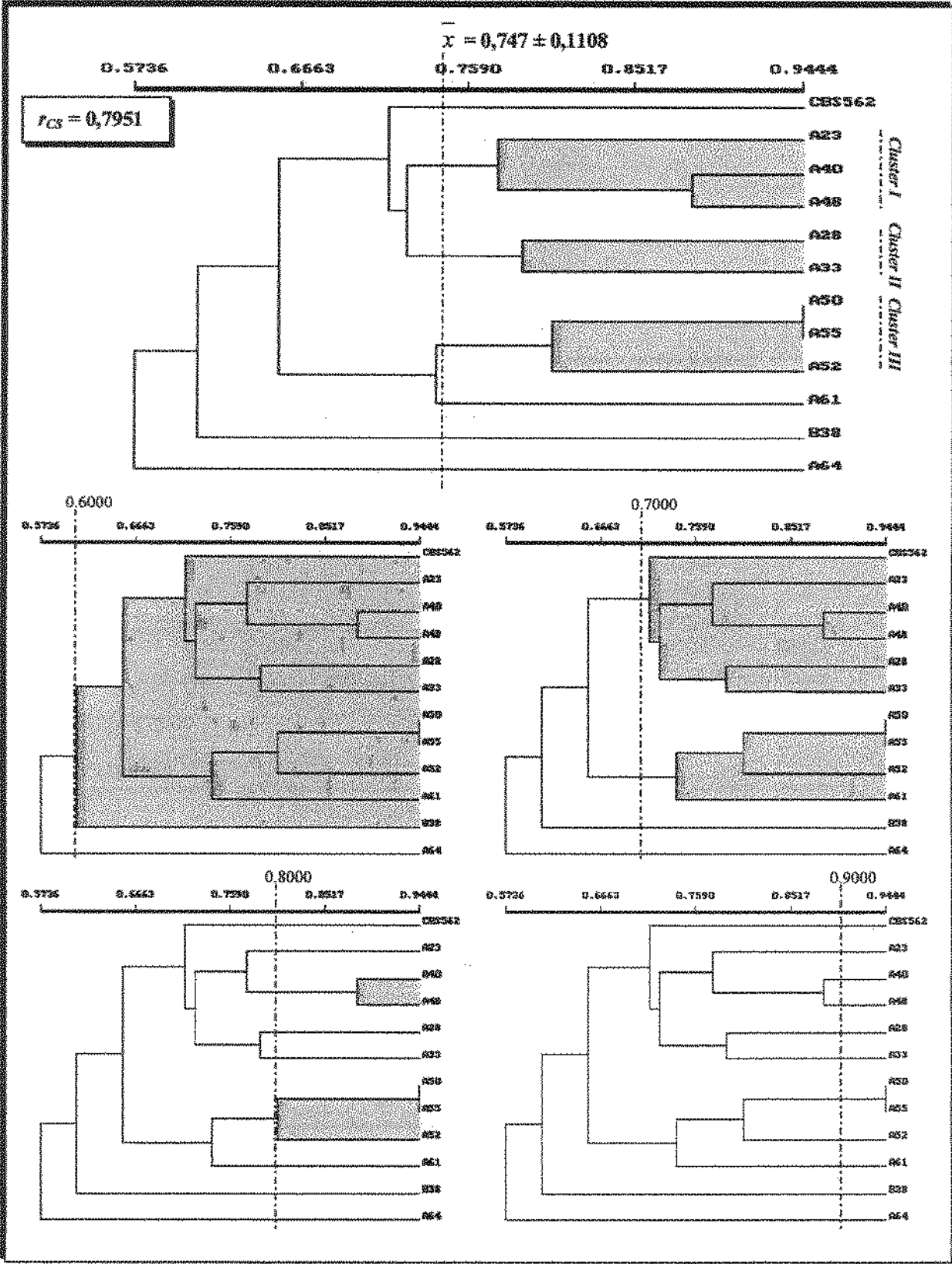
Linha de Corte	Número de Linhagens/Cluster	%	Número de Linhagens/Classe				
			CBS-562	A	B	C	
0.6000	Cluster I	10	90,9	1	1	2	6
	Não agrupadas	1	9,1				1
0.7000	Cluster I	10	90,9	1	1	2	6
	Não agrupadas	1	9,1				1
0.8000	Cluster I	2	18,2	1		1	
	Cluster II	5	45,4		1	1	3
	Cluster III	2	18,2				2
	Não agrupadas	2	18,2				2
0.9000	Cluster I	3	27,3			1	2
	Não agrupadas	8	72,7	1	1	1	5
Média (0.7953)	Cluster I	2	18,2	1		1	
	Cluster II	5	45,4		1	1	3
	Cluster III	2	18,2				2
	Não agrupadas	2	18,2				2

Tabela 12.1. Diferentes associações obtidas entre linhagens com diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a escola HF

Linha de Corte	x	w	z
60%	8	9	1
70%	8	9	1
80%	3	7	3
90%	2	3	7
Média (79,5%)	3	7	3

x ⇨ número de linhagens associadas com uma ou mais linhagens de classes socioeconômicas iguais e diferentes, portanto, no mínimo com duas linhagens associadas. w ⇨ número de linhagens associadas com uma ou mais linhagens da mesma escola. z ⇨ número de linhagens sem associação com outras linhagens das mesmas ou diferentes escolas e classes socioeconômicas.

Figura 22. Dendrogramas de similaridade para as linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares representativos da escola LAE



As linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares pertencentes a escola LAE mostraram-se associadas com graus de similaridade variando entre 0,5736 (57,4%) e 0,9444 (94,4%). A quantidade dos diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas, bem como as diferentes associações entre as linhagens podem ser visualizados nas tabelas 13 e 13.1 abaixo.

Tabela 13. Diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a escola LAE

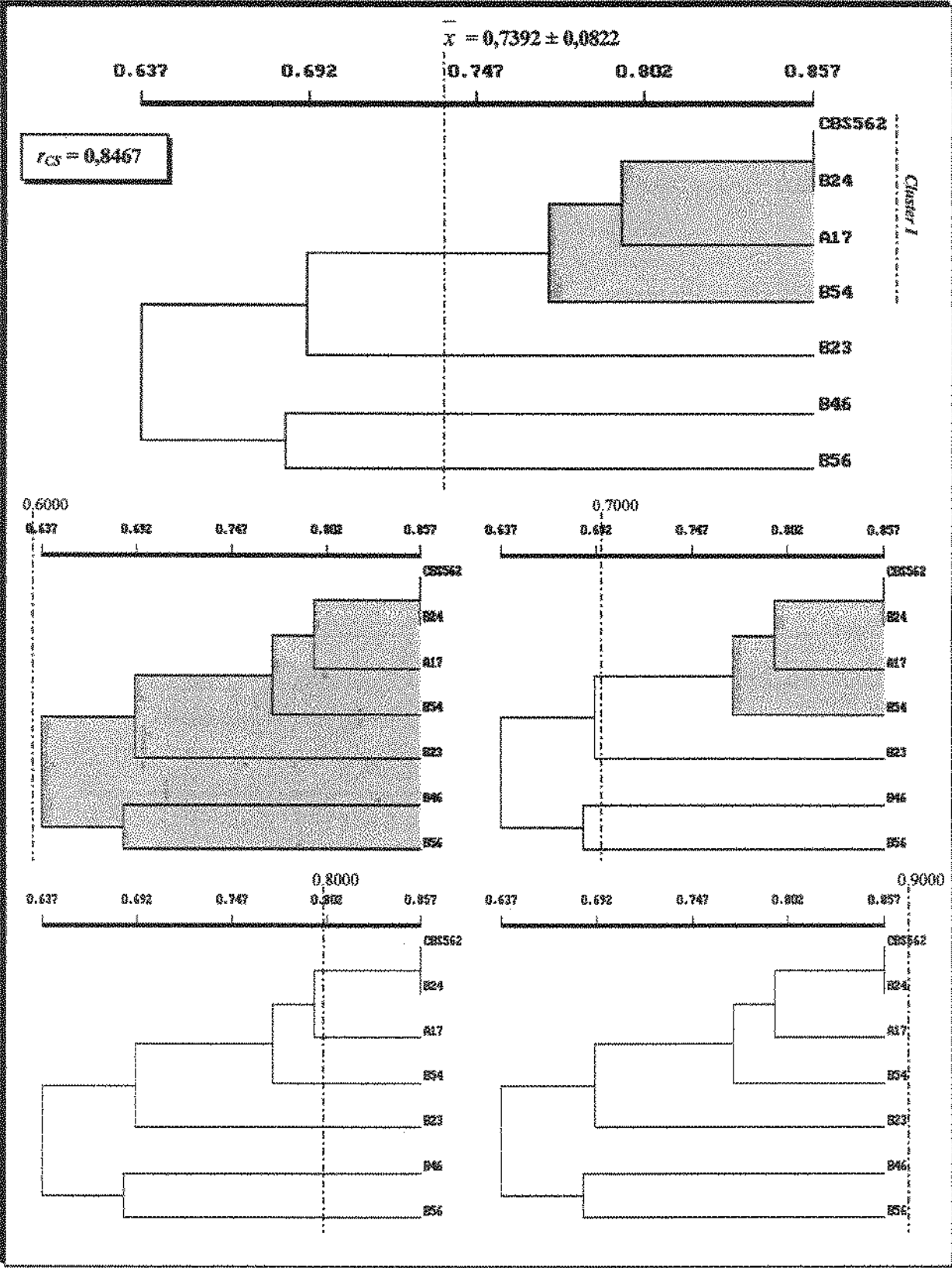
Linha de Corte	Número de Linhagens/Cluster		%	Número de Linhagens/Classe		
				CBS-562	A	B
0.6000	Cluster I	11	91,7	1	9	1
	Não agrupadas	1	8,3		1	
0.7000	Cluster I	6	50,0	1	5	
	Cluster II	4	33,3		4	
	Não agrupadas	2	16,7		1	1
0.8000	Cluster I	2	16,7		2	
	Cluster II	3	25,0		3	
	Não agrupadas	7	58,3	1	5	1
0.9000	Cluster I	2	16,7		2	
	Não agrupadas	10	83,3	1	8	1
Média (0.7470)	Cluster I	3	25,0		3	
	Cluster II	2	16,7		2	
	Cluster III	3	25,0		3	
	Não agrupadas	4	33,3	1	2	1

Tabela 13.1. Diferentes associações obtidas entre linhagens com diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a escola LAE

Linha de Corte	x	w	z
60%	9	10	1
70%	0	9	2
80%	0	5	6
90%	0	2	9
Média (74,7%)	0	8	3

x ⇨ número de linhagens associadas com uma ou mais linhagens de classes socioeconômicas iguais e diferentes, portanto, no mínimo com duas linhagens associadas. w ⇨ número de linhagens associadas com uma ou mais linhagens da mesma escola. z ⇨ número de linhagens sem associação com outras linhagens das mesmas ou diferentes escolas e classes socioeconômicas.

Figura 23. Dendrogramas de similaridade para as linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares representativos da escola MA



As linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares pertencentes a escola MA mostraram-se associadas com graus de similaridade variando entre 0,637 (63,7%) e 0,857 (85,7%). A quantidade dos diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas, bem como as diferentes associações entre as linhagens podem ser visualizados nas tabelas 14 e 14.1 abaixo.

Tabela 14. Diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a escola MA

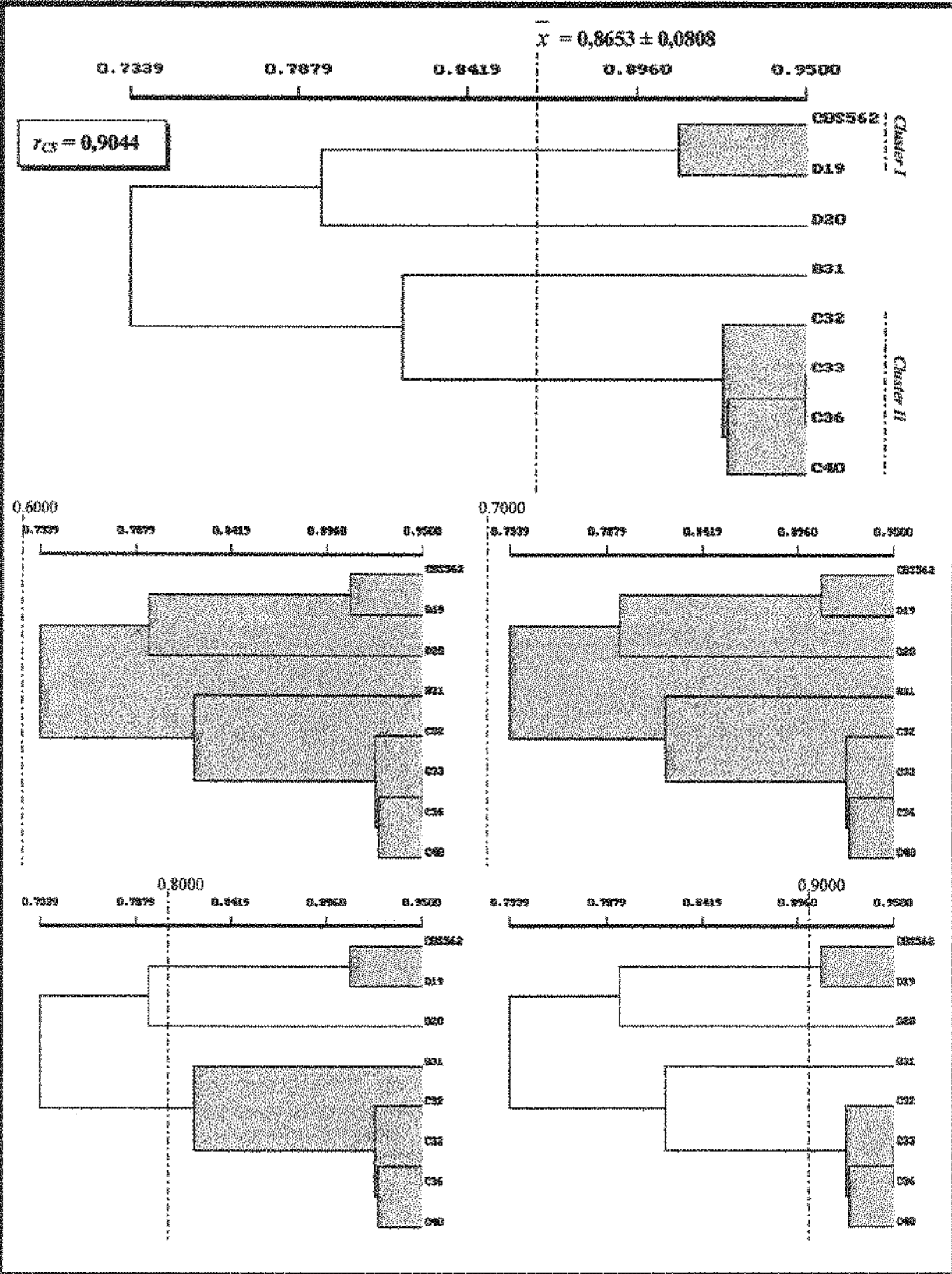
Linha de Corte	Número de Linhagens/Cluster	%	Número de Linhagens/Classe		
			CBS-562	A	B
0.6000	Cluster I	7	100,0	1	5
0.7000	Cluster I	4	57,1	1	2
	Não agrupadas	3	42,9		3
0.8000	Cluster I	2	28,6	1	1
	Não agrupadas	5	71,4	1	4
0.9000	Não agrupadas	7	100,0	1	5
Média (0.7392)	Cluster I	4	57,1	1	2
	Não agrupadas	3	42,9		3

Tabela 14.1. Diferentes associações obtidas entre linhagens com diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a escola MA

Linha de Corte	x	w	z
60%	5	6	0
70%	1	3	3
80%	0	0	6
90%	0	0	6
Média (73,9%)	2	3	3

X ⇨ número de linhagens associadas com uma ou mais linhagens de classes socioeconômicas iguais e diferentes, portanto, no mínimo com duas linhagens associadas. W ⇨ número de linhagens associadas com uma ou mais linhagens da mesma escola. Z ⇨ número de linhagens sem associação com outras linhagens das mesmas ou diferentes escolas e classes socioeconômicas.

Figura 24. Dendrogramas de similaridade para as linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares representativos da escola MEP



As linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares pertencentes a escola MEP mostraram-se associadas com graus de similaridade variando entre 0,7339 (73,4%) e 0,9500 (95%). A quantidade dos diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas, bem como as diferentes associações entre as linhagens podem ser visualizados nas tabelas 15 e 15.1 abaixo.

Tabela 15. Diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a escola MEP

Linha de Corte	Número de Linhagens/Cluster		%	Número de Linhagens/Classe			
				CBS-562	B	C	D
0.6000	Cluster I	8	100,0	1	1	4	2
0.7000	Cluster I	8	100,0	1	1	4	2
0.8000	Cluster I	2	25,0	1			1
	Cluster II	5	62,5		1	4	
	Não agrupadas	1	12,5				1
0.9000	Cluster I	2	25,0	1			1
	Cluster II	4	50,0			4	
	Não agrupadas	2	25,0		1		1
Média (0.8653)	Cluster I	2	25,0	1			1
	Cluster II	4	50,0			4	
	Não agrupadas	2	25,0		1		1

Tabela 15.1. Diferentes associações obtidas entre linhagens com diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para a escola MEP

Linha de Corte	x	w	z
60%	6	7	0
70%	6	7	0
80%	4	5	2
90%	0	4	3
Média (86,5%)	0	4	3

x ⇨ número de linhagens associadas com uma ou mais linhagens de classes socioeconômicas iguais e diferentes, portanto, no mínimo com duas linhagens associadas. w ⇨ número de linhagens associadas com uma ou mais linhagens da mesma escola. z ⇨ número de linhagens sem associação com outras linhagens das mesmas ou diferentes escolas e classes socioeconômicas.

2.3 Análise dos dendrogramas de similaridade contendo todos os isolados

As linhagens de *Candida albicans* foram analisadas em conjunto, a partir de um único dendrograma, comparando-se a dispersão dos graus de similaridade, a formação de “clusters” em diferentes linhas de corte e os graus de associação para cada linhagem em relação a outra, levando-se em consideração suas classes socioeconômicas e suas escolas.

Figura 25a. Dendrogramas de similaridade para as linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares de cinco classes socioeconômicas, com linhas de corte em 0.6000 (60%) e 0.7000 (70%)

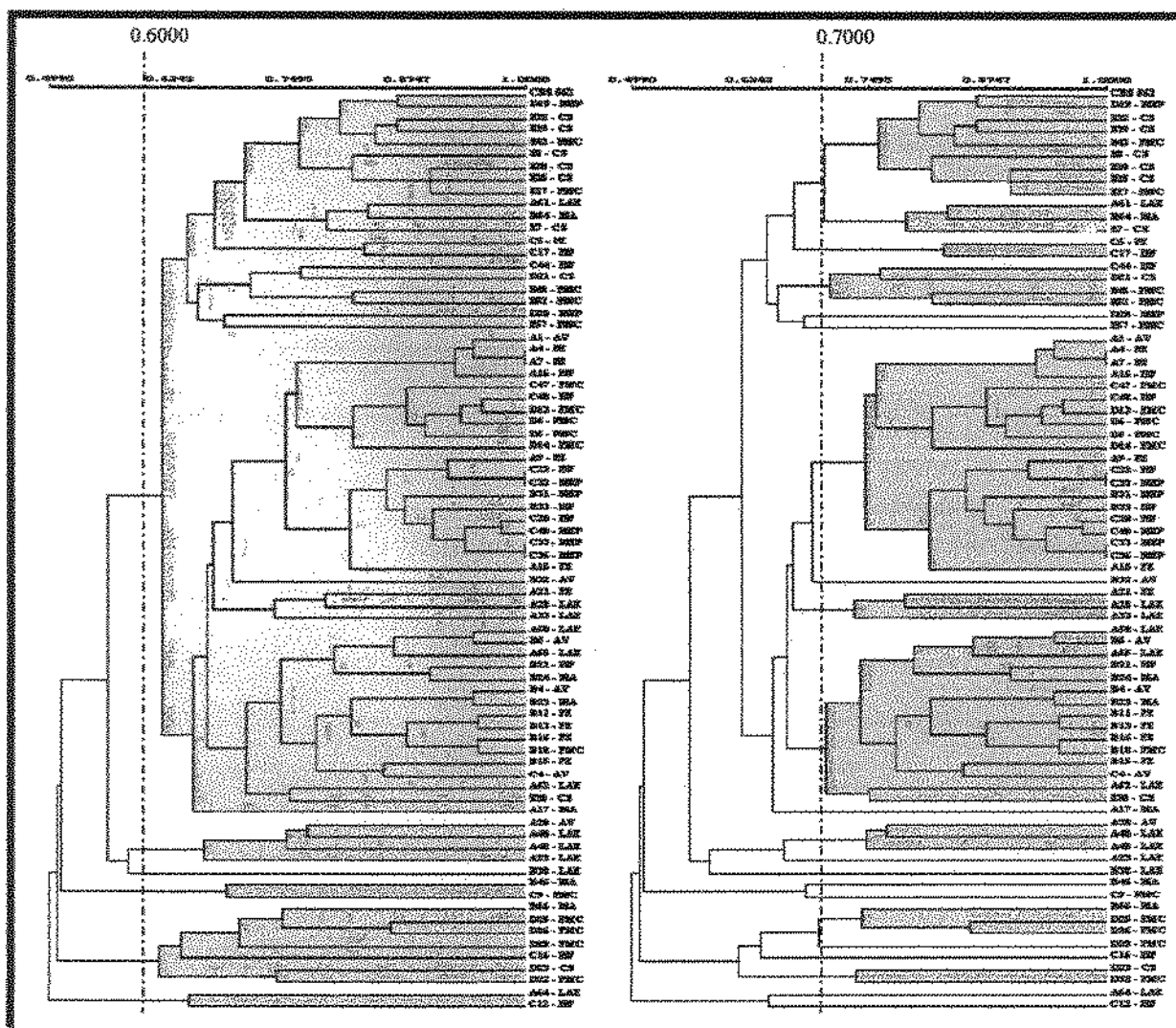


Figura 25b. Dendrogramas de similaridade para as linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares de cinco classes socioeconômicas, com linhas de corte no valor médio

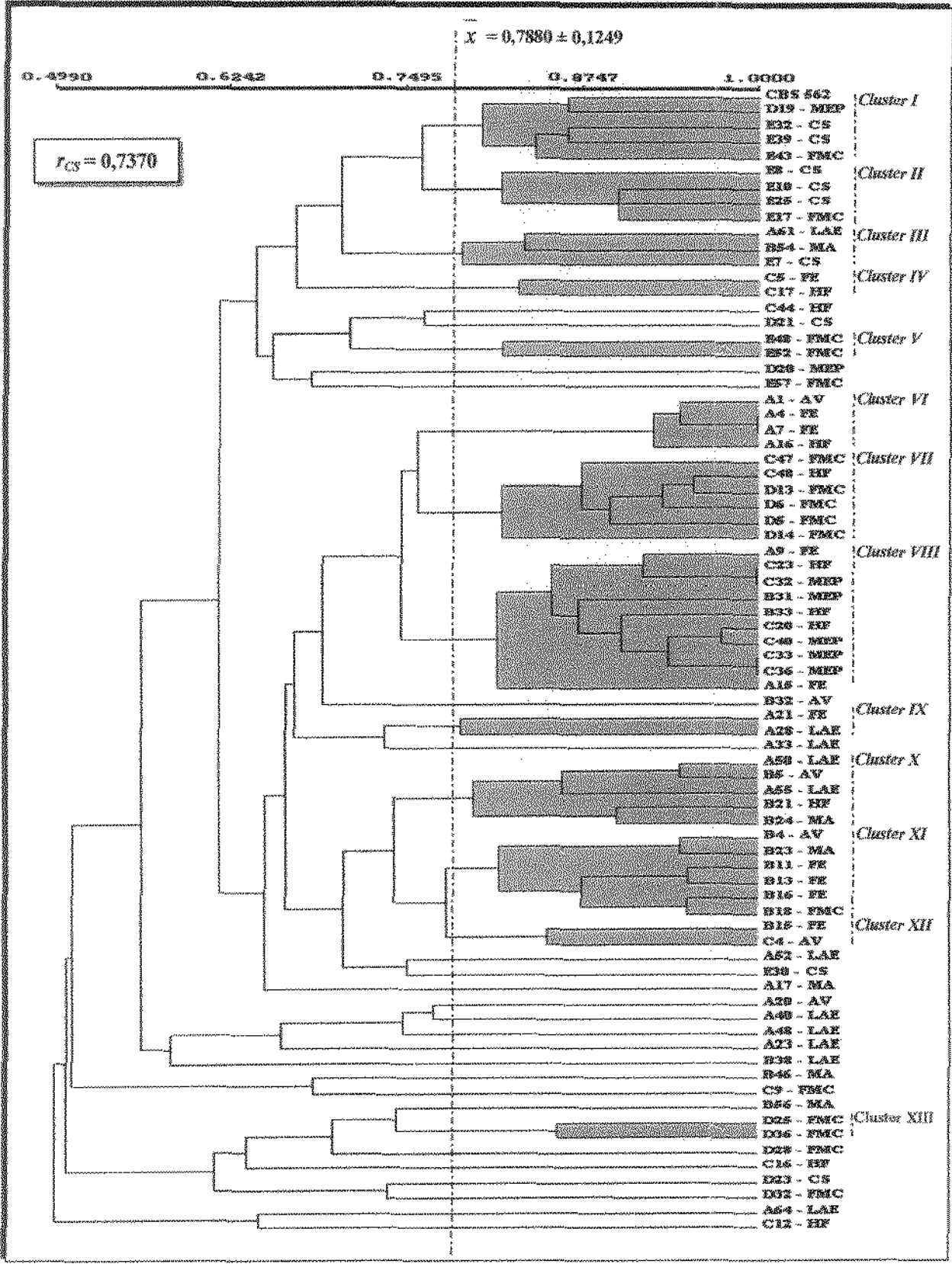
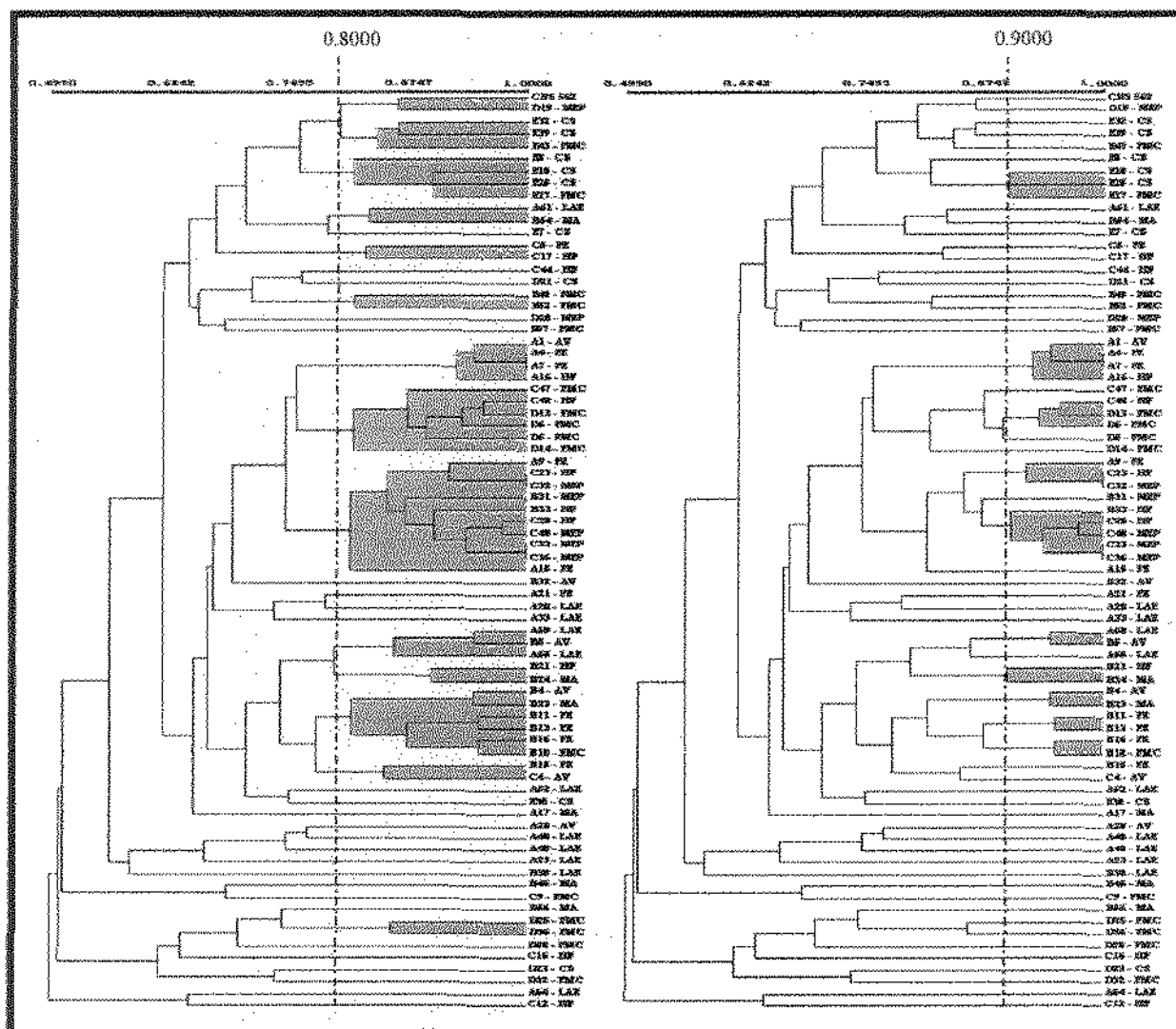


Figura 25c. Dendrogramas de similaridade para as linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares de cinco classes socioeconômicas, com linhas de corte em 0.8000 (80%) e 0.9000 (90%)



As linhagens de *Candida albicans* isoladas de escolares de cinco classes socioeconômicas mostraram-se associadas com graus de similaridade variando entre 0,4990 (49,9%) e 1,0 (100%). A quantidade dos diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas, bem como as diferentes associações entre as linhagens podem ser visualizados nas tabelas 16 e 16.1 abaixo.

Tabela 16. Diferentes “clusters” formados em diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para escolares de cinco classes socioeconômicas

Linha de Corte	Número de Linhagens/Cluster	%	Número de Linhagens/Classe.								Número de Linhagens/Escola							
			CB5-562	A	B	C	D	E	CB5-563	AV	CS	FE	FMC	HF	LAE	MEP	MA	
0.6000	Cluster I	60	78,9	1	14	14	12	7	12	1	5	8	10	11	8	6	7	4
	Cluster II	4	5,3		4						1					3		
	Cluster III	2	2,6			1	1							1				1
	Cluster IV	7	9,2			1	1	5			1		4	1				3
	Cluster V	2	2,6		1		1								1	1		
	Não agrupadas	1	1,4			1										1		
0.7000	Cluster I	9	11,8	1				1	7	1		5		2			1	
	Cluster II	3	3,9		1	1			1			1				1		1
	Cluster III	2	2,6				2						1		1			
	Cluster IV	4	5,3				1	1	2			1		2	1			
	Cluster V	20	26,3		6	2	8	4			1		4	5	5		5	
	Cluster VI	3	3,9		3								1				2	
	Cluster VII	15	19,7		3	10	1		1		3	1	4	1	1	3		2
	Cluster VIII	3	3,9		3						1					2		
	Cluster IX	3	3,9			1		2						2				1
	Cluster X	2	2,6					2				1		1				
	Não agrupadas	12	16,1		3	3	3	2	1		1			3	2	3	1	2
0.8000	Cluster I	2	2,6	1				1		1								1
	Cluster II	3	3,9						3			2		1				
	Cluster III	4	5,3						4			3		1				
	Cluster IV	2	2,6		1	1										1		1
	Cluster V	2	2,6				2						1		1			
	Cluster VI	2	2,6					2					2					
	Cluster VII	4	5,3		4					1		2		1				
	Cluster VIII	6	7,9				2	4					5	1				
	Cluster IX	10	13,2		2	2	6						2		3		5	
	Cluster X	5	3,9		2	1					1					2		
	Cluster XI	2	2,6			2									1			1
	Cluster XII	6	7,9			6					1		3	1				1
	Cluster XIII	2	2,6			1	1				1		1					
	Cluster XIV	2	2,6					2						2				
	Não agrupadas	26	34,4		10	4	4	5	3		2	4	1	4	3	8	1	3
0.9000	Cluster I	3	3,9						3			2		1				
	Cluster II	4	5,3		4						1		2		1			
	Cluster III	3	3,9				1	2						2	1			
	Cluster IIII	3	3,9		1		2						1		1		1	
	Cluster IIII	5	6,6			1	4								2		3	
	Cluster IIII	2	2,6		1	1					1					1		
	Cluster IIII	2	2,6			2												1
	Cluster IIII	2	2,6			2					1							1
	Cluster IIII	2	2,6			2							2					
	Cluster IIII	2	2,6			2							1	1				
	Não agrupadas	48	63,4	1	13	7	8	10	9	1	3	7	4	12	4	10	3	4
Média (0.7880)	Cluster I	5	6,6	1				1	3	1		2		1			1	
	Cluster II	4	5,3						4			3		1				
	Cluster III	3	3,9		1	1			1			1				1		1
	Cluster IV	2	2,6				2						1		1			
	Cluster V	2	2,6					2						2				
	Cluster VI	4	5,3		4						1		2		1			
	Cluster VII	6	7,9				2	4						5	1			
	Cluster VIII	10	13,2		2	2	6						2		3		5	
	Cluster IX	2	2,6		2								1			1		
	Cluster X	5	6,6		2	3					1				1	2		1
	Cluster XI	6	7,9			6					1		3	1				1
	Cluster XII	2	2,6			1	1				1		1					
	Cluster XIII	2	2,6					2						2				
	Não agrupadas	23	30,3		8	4	4	5	2		2	3		4	3	7	1	3

Tabela 16.1. Diferentes associações obtidas entre linhagens com diferentes linhas de corte nos dendrogramas de similaridade para escolares de cinco classes socioeconômicas

Linha de Corte	x	y	z
60%	64	66	1
70%	45	47	12
80%	21	28	26
90%	9	11	48
Média (78,8%)	24	27	23

x ⇨ número de linhagens associadas com uma ou mais linhagens de classes socioeconômicas iguais e diferentes, portanto, no mínimo com duas linhagens associadas. y ⇨ número de linhagens associadas com uma ou mais linhagens de escolas iguais e diferentes, portanto, no mínimo com duas linhagens associadas. z ⇨ número de linhagens sem associação com outras linhagens das mesmas ou diferentes escolas e classes socioeconômicas.

3. Avaliação da reprodutibilidade

Após o processamento das imagens dos géis, as bandas protéicas da linhagem padrão de *Candida albicans* CBS-562 dos diferentes géis foram convertidas em valores numéricos em relação as respectivas massas moleculares, as quais puderam ser analisadas dois a dois em uma matriz de dados binários e, empregando-se um *intervalo de confiança* de $\pm 1,245$ kDa (Tabela 17).

A utilização do *coeficiente de associação* (similaridade) *de Dice* possibilitou a construção de uma matriz de similaridade (S), onde encontram-se disponíveis os valores de similaridade da linhagem padrão CBS-562 analisada em diferentes géis (Tabela 18).

Tabela 17. Matriz de dados binários representativos dos valores de massas moleculares de cada banda protéica da linhagem padrão de *Candida albicans* CBS-562, em diferentes géis com intervalo de confiança de $\pm 1,245$ kDa

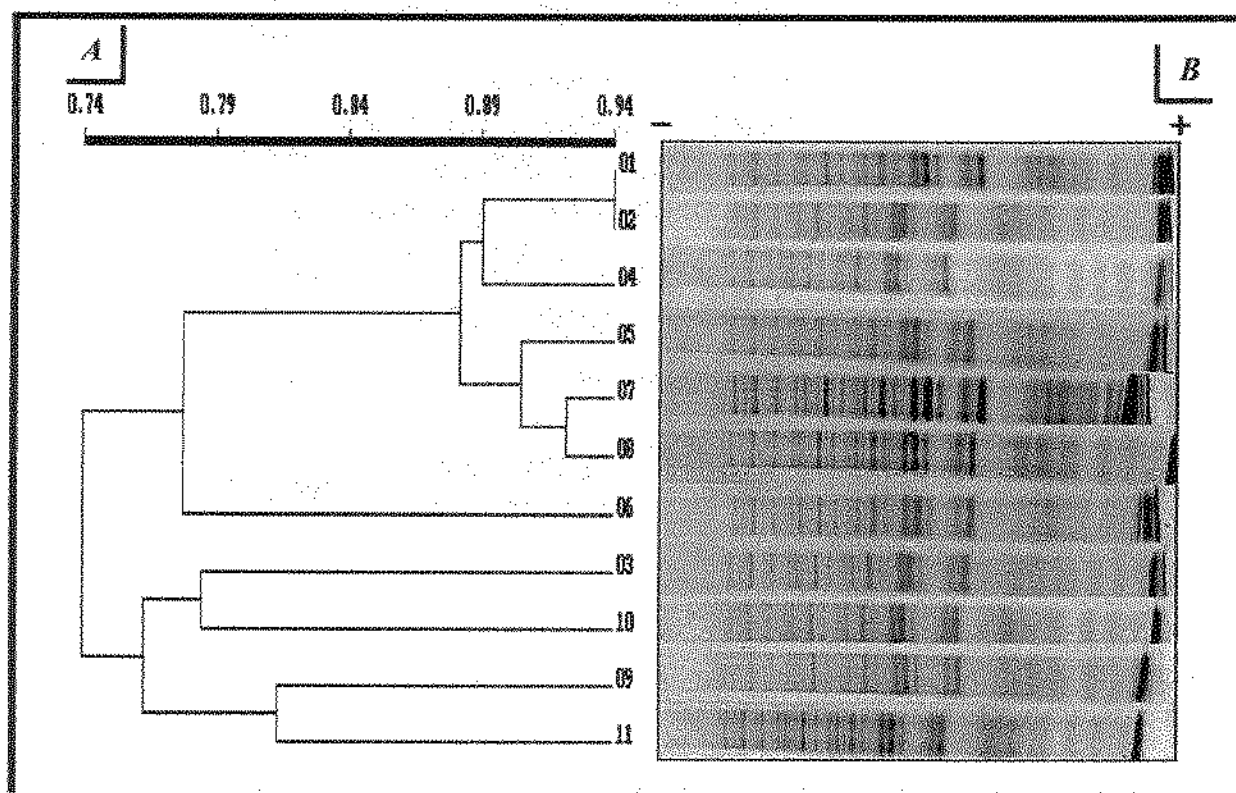
Intervalo de confiança ----- 2,49 -----		CBS 562										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
63,5	65,99	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
61	63,49	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
58,5	60,99	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
56	58,49	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1
		1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
53,5	55,99	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
51	53,49	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
		1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0
48,5	50,99	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
46	48,49	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
43,5	45,99	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
41	43,49	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
38,5	40,99	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1
		1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
36	38,49	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0
		0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
31	33,49	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
28,5	30,99	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	28,49	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
23,5	25,99	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
21	23,49	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
18,5	20,99	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
		1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1
16	18,49	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0

Tabela 18. Matriz de similaridade (S) para onze repetições da linhagem padrão de *Candida albicans* CBS-562 em diferentes géis

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	1,000										
2	0,944	1,000									
3	0,722	0,722	1,000								
4	0,895	0,895	0,789	1,000							
5	0,889	0,889	0,722	0,895	1,000						
6	0,737	0,737	0,737	0,750	0,842	1,000					
7	0,865	0,865	0,703	0,872	0,919	0,821	1,000				
8	0,900	0,900	0,750	0,905	0,900	0,810	0,927	1,000			
9	0,700	0,700	0,700	0,762	0,800	0,714	0,732	0,773	1,000		
10	0,789	0,789	0,789	0,850	0,737	0,650	0,718	0,762	0,810	1,000	
11	0,750	0,750	0,800	0,714	0,750	0,810	0,683	0,773	0,818	0,762	1,000

Essa matriz de similaridade (S), analisada através do método de agrupamento UPGMA, gerou o dendrograma de similaridade que possibilitou a avaliação dos graus de similaridade existentes entre as repetições da linhagem padrão de *Candida albicans* CBS-562 em diferentes géis (Figura 26).

Figura 26. A – Dendrograma de similaridade para as repetições da linhagem padrão de *Candida albicans* CBS-562 em diferentes géis. B - Perfis protéicos das repetições da linhagem padrão de *Candida albicans* CBS-562 em 11 géis



Os perfis protéicos da linhagem padrão de *Candida albicans* CBS-562 em diferentes géis, analisadas pelo dendrograma de similaridade, mostraram-se associados com graus de similaridade variando entre 0,74 e 0,94.

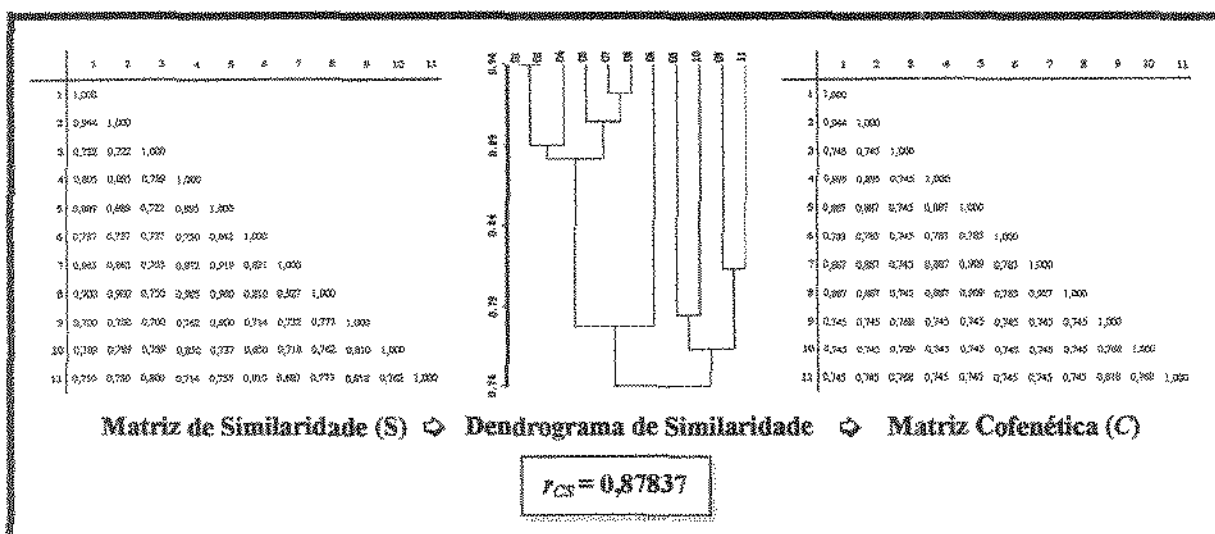
O dendrograma derivado de sua matriz de similaridade (S), também forneceu uma matriz de correlação de valores cofenéticos (C), através do programa COPENETIC VALUES (Tabela 18).

Tabela 19. Matriz de correlação cofenética para as onze repetições da linhagem padrão de *Candida albicans* CBS-562 em diferentes géis

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	1,000										
2	0,944	1,000									
3	0,745	0,745	1,000								
4	0,895	0,895	0,745	1,000							
5	0,887	0,887	0,745	0,887	1,000						
6	0,783	0,783	0,745	0,783	0,783	1,000					
7	0,887	0,887	0,745	0,887	0,909	0,783	1,000				
8	0,887	0,887	0,745	0,887	0,909	0,783	0,927	1,000			
9	0,745	0,745	0,768	0,745	0,745	0,745	0,745	0,745	1,000		
10	0,745	0,745	0,789	0,745	0,745	0,745	0,745	0,745	0,768	1,000	
11	0,745	0,745	0,768	0,745	0,745	0,745	0,745	0,745	0,818	0,768	1,000

Empregando-se o programa MATRIX COMPARISON, o *coeficiente de correlação cofenética* calculado entre a matriz de similaridade (S) e a matriz de valor cofenético (C), foi $r_{CS} = 0,87837$ (Figura 27).

Figura 27. Coeficiente de correlação cofenético (r_{CS}) calculado entre S e C para onze repetições da linhagem padrão de *Cardida albicans* CBS-562 em diferentes géis



A matriz de similaridade (S) contém os valores originais de associação entre UTOs. A matriz cofenética (C) representa os valores de associação assinalados no dendrograma de similaridade UPGMA, o qual é gerado a partir da matriz de similaridade. O *coeficiente de correlação cofenética* (r_{CS}) é a correlação entre os pares correspondentes de S e C.

Discussão

DISCUSSÃO

A análise dos perfis eletroforéticos de proteínas, associados com sistemas estatísticos computadorizados, tem possibilitado a identificação, a classificação, a comparação e, ainda, a reclassificação de linhagens, espécies e gêneros de bactérias (KERSTERS & DE LEY, 1975; TANNER, 1986; COSTAS *et al.*, 1987) e leveduras (MAIDEN & TANNER, 1991; VANCANNEYT *et al.*, 1991; VANCANNEYT *et al.*, 1992; HÖFLING *et al.*, 1998), em levantamentos taxonômicos e epidemiológicos. Na presente pesquisa, amostras de *Candida albicans* isoladas da cavidade oral de escolares, com idade variando entre 6 e 9 anos, provenientes de diversas categorias socioeconômicas e escolas, foram analisadas aplicando-se a técnica de SDS-PAGE e análise numérica.

As figuras de 1 a 11 mostram os resultados dos perfis eletroforéticos obtidos a partir de setenta e cinco linhagens de *Candida albicans* e da linhagem padrão CBS-562 os quais contém, em média, 20 bandas por "lane", dentro de um intervalo de massas moleculares variando entre 18,4 kDa e 66 kDa. Esses perfis protéicos foram relativamente similares entre si, com poucas variações infraespecíficas perceptíveis, quando comparadas visualmente. ROSA (1997), empregando um intervalo de massas moleculares semelhantes, observou que bandas com massas superiores a 45 kDa se repetem na maioria das espécies, sugerindo que possam ser representativas do gênero ou de uma instância maior. Na tentativa de se encontrar uma região dos "lanes" que contivesse um maior número de bandas que permitissem uma interpretação em termos de polimorfismo infraespecífico, optou-se por analisar bandas compreendidas num intervalo de massas moleculares de 18,8 kDa a 66 kDa. Os

dados obtidos decorrentes de tal procedimento, mostraram-se sugestivos de expressar essa variabilidade, permitindo o acesso à um certo grau de polimorfismo, que pode ser observado *a posteriori* nos dendrogramas.

A análise da reprodutibilidade dos perfis eletroforéticos foi acessada através da inclusão da linhagem padrão CBS-562 aplicada nos onze géis. KERSTERS & DE LEY (1975) salientam que alguns fatores podem afetar a reprodutibilidade eletroforética, tais como, condições de crescimento, velocidade de centrifugação dos extratos e condições de eletroforese em gel. Nesse trabalho, foram realizadas padronizações prévias das condições acima, buscando minimizar possíveis desvios de reprodutibilidade. O valor de similaridade mínima encontrado entre essas repetições foi $S_D \text{ mín.} \geq 0,74$. Tal valor pode parecer insuficiente quando comparados com outros obtidos por COSTAS *et al.* (1989) que obteve um $r \geq 0,94$ trabalhando com *Enterobacter cloacae* e HOLMES *et al.* (1990) obtendo um valor $r \geq 0,97$ para *Serratia marcescens*, ou mesmo VANCANNEYT *et al.* (1991) que empregou *Pichia fermentans* e obteve uma reprodutibilidade $r \geq 0,94$. Além disso, cabe salientar que esses autores aplicaram em suas análises o *coeficiente de correlação* baseado no momento de Pearson (r), que analisa caracteres quantitativos não plotáveis em tabelas de dados binários. Nossos valores de similaridade foram obtidos empregando-se o *coeficiente de associação* (similaridade) *de Dice* que permite uma análise qualitativa baseada na presença e ausência de um dado caracter, dessa maneira podendo ser utilizado em tabelas de dados binários. Esses autores empregaram o recurso de se determinar a reprodutibilidade tomando-se o valor de similaridade que forma os “clusters” com as repetições dentro dos dendrogramas finais, onde encontram-se as outras amostras envolvidas nos estudos. Tal procedimento aumenta a compactação desses

“clusters” levando a um aparente aumento nos índices de reprodutibilidade. Além disso, comparam a reprodutibilidade dos géis utilizando repetições de um mesmo microrganismo entre diferentes géis e num mesmo gel, o que tende a maximizar os valores de similaridade (ou mesmo de correlação), visto que a variabilidade dentro de um mesmo gel é menor, uma vez que as condições de eletroforese são as mesmas. Na presente pesquisa, nos propusemos a usar um recurso alternativo, onde as repetições são analisadas independentemente das demais amostras, em um dendrograma isolado (Figura 26), evitando a interferência dessas variáveis. Nossos resultados de reprodutibilidade foram obtidos utilizando-se uma repetição da linhagem padrão CBS-562 para cada gel. Esses resultados demonstraram que tal recurso não contribuiu satisfatoriamente na maximização dos valores de similaridade, talvez, em parte, devido ao número de géis (onze géis) envolvidos no estudo.

Na análise numérica, diferentes *intervalos de confiança* aplicados na construção das matrizes de dados binários ($\pm 0,25$; $\pm 0,5$; $\pm 0,75$; $\pm 1,0$ e $\pm 1,25$), diferentes *coeficientes de associação* (*Simple Matching*, *Jaccard* e *Dice*) e o *coeficiente de correlação* baseado no momento de Pearson, foram comparados, de maneira tal, que permitissem a maximização do valor de similaridade mínimo que delimita a árvore fenética, a qual contém as repetições da linhagem padrão CBS-562. Dentre todas as combinações possíveis, o *intervalo de confiança* $\pm 1,25$ e o *coeficiente de associação de Dice* foram aqueles que melhor responderam a tal critério, permitindo sua extrapolação para as demais análises. Esse critério está em concordância com BORIOLLO *et al.* (1999) e GUILLAMÓN *et al.* (1993), os quais relatam que o *coeficiente de Dice* pode maximizar os valores de similaridade mínimos num dendrograma, com ênfase na análise numérica de leveduras.

Na avaliação do algoritmo UPGMA, o qual organiza as UTOs em “clusters” na construção dos dendrogramas, um *coeficiente de correlação cofenética* (r_{CS}) foi computado entre os elementos correspondentes da matriz de similaridade (S) e da matriz de valores cofenéticos (C) derivada dos dendrogramas. O *coeficiente de correlação cofenética* é uma medida de comparação entre valores de similaridade representados na matriz de valores cofenéticos (ou nos dendrogramas) e aqueles representados na matriz de similaridade (S) (SOKAL & ROHLF, 1962; SOKAL & ROHLF, 1970). Os diferentes *coeficientes de correlação cofenética* derivados da análise das classes socioeconômicas variaram entre $r_{CS} = 0,7856$ e $r_{CS} = 0,8553$; para as diferentes escolas variaram entre $r_{CS} = 0,7951$ e $r_{CS} = 0,9044$; para o dendrograma geral envolvendo todos os isolados foi $r_{CS} = 0,7370$; e para o teste de reprodutibilidade foi $r_{CS} = 0,8784$. De modo geral, os *coeficientes de correlação cofenética* obtidos estão compreendidos entre 0,60 e 0,95 (SNEATH & SOKAL, 1973) e entre 0,74 e 0,90 (SOKAL & ROHLF, 1970), valores esses considerados aceitáveis, em análises dessa natureza, corroborando dessa maneira com os achados de FARRIS (1969), o qual ressaltou o fato de que o algoritmo UPGMA tende a maximizar os valores r_{CS} . Esses resultados, quando analisados em conjunto, sugerem que métodos de agrupamento baseados em critérios eqüitativos, seqüenciais, aglomerativos e hierárquicos (SAHN clustering methods), como no caso, o UPGMA, são úteis na construção de dendrogramas para fins de estudos epidemiológicos envolvendo essa espécie de microrganismo.

Conforme pode ser observado nas figuras 12 a 25, quando são traçadas linhas de corte em 60%, 70%, 80% e 90% de similaridade, ocorre uma redução na formação no número de “clusters” bem como na composição de outros. Esses resultados estão em concordância com aqueles relatados por

SNEATH & SOKAL (1962), cuja tese prevê a redução do número das UTOs em seus “clusters” a medida que são traçadas tais linhas de corte, concomitante com a manutenção da ordenação dessas UTOs nas árvores fenéticas. De forma convergente, a redução do número de “clusters” e dos componentes de outros “clusters” implica numa redução das possíveis associações entre as UTOs, conforme pode ser visto nas tabelas 3.1, 4.1, 5.1, 6.1, 7.1, 8.1, 9.1, 10.1, 11.1, 12.1, 13.1, 14.1, 15.1 e 16.1.

Em decorrência do fato de nenhuma das linhas de corte traçadas em valores arbitrários permitir uma avaliação nas possíveis associações, optou-se por se analisar a formação de “clusters” formados a partir do ponto médio de similaridade, conforme empregado primeiramente por PUJOL *et al.* (1997). Tal recurso, quando empregado na análise do polimorfismo de diferentes espécies de *Candida* acessada através da avaliação dos perfis de desidrogenases, permitiu à ROSA *et al.* (1999) obterem “clusters” monoespecíficos e multiespecíficos com capacidade discriminatória superior àquela obtida, se houvessem aplicado a linha de corte em um valor arbitrário de $S = 0,80$, como preconizado por HELLSTEIN *et al.* (1993), o que justifica o traçado de linhas de corte flexíveis obtidas a partir do ponto médio de similaridade em dendrogramas construídos a partir de variáveis processadas por coeficientes de associação. Ainda, SNEATH (1989) ressalta que linhas de corte traçadas arbitrariamente não correspondem a critérios objetivos para estabelecer diferentes posições taxonômicas ou epidemiológicas.

Os dendrogramas cortados por traços perpendiculares dispostos nos limites de similaridade de 60%, 70%, 80%, 90% e no ponto da similaridade média encerram vários “clusters” mistos contendo múltiplos isolados oriundos de escolares provenientes das classes socioeconômicas A, B, C, D e E, bem como das diferentes escolas e no dendrograma geral (Figuras 12 a 25 e Tabelas

3 a 16), demonstrando que a composição desses “clusters” independe dos fatores classe socioeconômica e escola. Tal comportamento já havia sido apontado por MATEE *et al.* (1996), que não conseguiram estabelecer uma correlação positiva entre a predominância de diferentes biotipos de *Candida albicans* e fatores exógenos tais como idade, gênero e hábitos alimentares para uma população infantil africana, devido a dispersão e diversidade desses biotipos na população estudada. O fenômeno de formação multiquantitativa de “clusters” foi recentemente descrito por SCHMID *et al.* (1999), que utilizando a técnica de hibridação pela sonda Ca3 aplicada às amostras de *Candida albicans* provenientes de pacientes de diferentes regiões geográficas, observaram a ocorrência de agrupamentos heterogêneos de isolados dessa levedura que independiam da natureza regional. Nessa linha de investigação, PUJOL *et al.* (1997) empregaram as técnicas de RAPD (Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso), MLEE (Eletroforese de Enzimas Multilocus) e RFLP (Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos de Restrição) com hibridização pelas sondas Ca3 e CARE2 na análise epidemiológica de isolados clínicos de *Candida albicans* de origens diversas, concluindo, que somente isolados estritamente relacionados (e. g.: isolados de parceiros sexuais, de diferentes sítios anatômicos de um mesmo indivíduo ou variantes fenotípicas de um mesmo isolado) podem combinar-se com $S_{AB} \geq 0,94$ dentro de “clusters” contendo linhagens não relacionadas (e.g.: isolados de diferentes regiões geográficas, de indivíduos imunocomprometidos e imunocompetentes não relacionados). Esses dados mostram, uma vez mais, que os diferentes tipos genéticos dessa espécie encontram-se dispersos em diferentes populações ou em parcelas das mesmas, e que quando analisados numericamente, tendem a se combinarem mais estreitamente, a despeito dos diferentes grupos de onde foram isoladas, o que vem, ao menos em parte, esclarecer o fato de não observarmos prováveis

associações entre isolados de escolares relacionados numa mesma escola ou classe socioeconômica.

Os dados coligidos dos estudos levados à efeito nessa pesquisa, objetivando estabelecer padrões de agrupamento de isolados de *Candida albicans* provenientes de escolares de diferentes categorias socioeconômicas e escolas, mostram a formação de vários “clusters” heterogêneos, sugerindo a existência de polimorfismo nessa espécie. A aplicação de proteínas intracelulares e análise numérica, permite a determinação preliminar dos agrupamentos desses isolados, independentemente de suas origens. Contudo, a diversidade e heterogeneidade dos “clusters”, formados nos dendrogramas, sugerem que a caracterização infraespecífica mais apurada deve envolver marcadores menos sujeitos a interferências de expressão, como por exemplo, aqueles que exploram o polimorfismo de ácidos nucléicos.

Conclusões

CONCLUSÕES

1. A análise do perfil de proteínas intracelulares das amostras de *Candida albicans*, isolados da cavidade oral de escolares, originou diversos dendrogramas que apresentam “clusters” com características heterogêneas.
2. A associação entre as amostras, presentes nos dendrogramas, independe dos fatores estudados, como classes socioeconômicas e escolas.
3. A heterogeneidade dos “clusters”, revelados pelos diversos dendrogramas, é significativo da existência de polimorfismo nessa espécie.
4. A aplicação de proteínas intracelulares e análise numérica, permite a determinação preliminar dos agrupamentos desses isolados, independentemente de suas origens.
5. A diversidade e heterogeneidade dos “clusters”, detectáveis nos diversos dendrogramas, obtidos pela análise do perfil eletroforético de proteínas intracelulares de *Candida albicans*, sugerem que a caracterização infraespecífica mais apurada deve envolver marcadores menos sujeitos a interferências de expressão, como por exemplo, aqueles que exploram o polimorfismo de ácidos nucléicos.

Referências Bibliográficas

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. ALLEN, C.M. Diagnosing e managing oral candidiasis. *J. Am. Dent. Ass.*, Chicago, **123**(1): 77-8, 1992.
3. AMES, G.F.L. Resolution of bacterial proteins by polyacrylamide gel electrophoresis on slabs. *J Biol Chem*, Baltimore, **249**: 634-44, 1974.
4. ANTONSSON, B. *et al.* Protein kinase C in yeast. *J Biol Chem*, Baltimore, **269**: 16821-8, 1994.
5. ARAÚJO, J.V.; JUNGHANS, T.G.; ALFENAS, A.C.; GOMES, A.P.S. Isoenzyme analysis of *Arthrobotrys*, a nematode-trapping fungus. *Braz J Med Biol Res*, Ribeirão Preto, **30**: 1149-52, 1997.
6. ARENDORF, T.M. *et al.* Intra-oral yeast in indigent South African community. *J. dent. Ass. S. Afr.* Cape Town, **41**(6):327-30, 1986.
7. ARENDORF, T.M. *et al.* Tobbaco smoking and denture wearing in oral candidal leucoplakia. *Br. Dent. J.* London, **155**(10):340-3, 1983.
8. ARENDORF, T.M.; WALKER, D.M. Oral Candidal populations in health and disease. *Br Dent Journal*, **147**:262-272, 1979.
9. ARNAVIELHE, S. *et al.* Mycological monitoring of *Candida albicans* infections in various hospital care units. Molecular typing of isolated strains and epidemiological survey. *Pathol Biol*, Paris, **44**: 447-51, 1996.
10. ASAKURA, K. *et al.* Electrophoretic Karyotypes of clinically isolated yeasts *Candida albicans* and *C. glabrata*. *J. Gen. Microbiol.*, Cambridge, **137**:2531-8, 1991.

* De acordo com a NB-66, de 1978, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviatura dos periódicos em conformidade com o "Medline".

11. AXELSEN, N.H. Quantitative immunoelectrophoretic methods as tools for a polyvalent approach to standardization in the immunochemistry of *Candida*. *Infect Immun*, Bethesda, **5**: 949-60, 1973.
12. BALEIRAS COUTO, M.M. *et al.* Random amplified polymorphic DNA and restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA in taxonomy, two identification techniques for food-borne yeasts. *J Appl Bacteriol*, Oxford, **79**: 525-35, 1995.
13. BAPTIST, J.N. & KURTZMAN, C.P. Comparative enzyme patterns in *Cryptococcus laurentii* and its taxonomic varieties. *Mycologia*, Lancaster, **68**: 1195-1203, 1976.
14. BARBERIO, C. *et al.* DNA fingerprinting of yeast strains by restriction enzyme analysis. *Res Microbiol*, Paris, **145**: 659-66, 1994.
15. BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. *Yeasts*: characteristics and identification. Cambridge, Cambridge University Press, 1983. 812p.
16. BART-DELABESSE, E. *et al.* Contribution of molecular typing methods and antifungal susceptibility testing to the study of a candidemia cluster in a burn care unit. *J Clin Microbiol*, Washington, **33**: 3278-83, 1995.
17. BASTIAAN, R.J., READE, P.C. The prevalence of *Candida albicans* in the mouths of tobacco smokers with and oral mucous membrana keratoses. *Oral Surg*, Saint Louis, **53**(2):148-151, 1982.
18. BASTIDE, J.M. *Candida* infections, new epidemiologic markers. *Rev Med Interne*, Paris, **17**(Suppl. 3): 346S-8S, 1996.
19. BASU, R., BASU, N., BANEYEE, A.K. Incidence of oral *Candida* in oral cavity. *Bull. Calcutta Sch. Trop. Med. Hyg.* Calcuta, **9**:20-1, 1961.
20. BERDICEVSKY, I. *et al.* Oral Candidal in children. *Oral Sug Oral Med Oral Pathol*, St. Louis, **57**:37-40, 1984.
21. BERTOLINI, P. *Contribuição ao estudo taxonômico de leveduras isoladas de canais radiculares de dentes humanos*. Piracicaba, 1964 [Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP].
22. BOEKHOUT, T.; RENTING, M.; SCHEFFERS, W.A.; BOSBOOM, R. The use of karyotyping in the systematics of yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek*, Amsterdam, **63**(3):157-63, Feb. 1993.

23. BOERLIN, P. *et al.* Cluster of oral atypical *Candida albicans* isolates in a group of human immunodeficiency virus-positive drug users. *J Clin Microbiol*, Washington, 33:1129-35, 1995.
24. BOERLIN, P. *et al.* Typing *Candida albicans* oral isolates from human immunodeficiency virus-infected patients by multilocus enzyme electrophoresis and DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol*, Washington, 34: 1235-48, 1996.
25. BORIOLLO, M.F.G.; PEREIRA, C.V.; ROSA, E.A.R.; HÖFLING, J.F. Estabelecimento de critérios e aplicação de dois coeficientes de associação para a análise numérica de leveduras orais por eletroforese de proteínas. *Resumos do XX Congresso Brasileiro de Microbiologia*, Salvador, pag.192, 1999.
26. BOTHA, A. & KOCK, J.L. Application of fatty acid profiles in the identification of yeasts. *Int J Food Microbiol*, Amsterdam, 19: 39-51, 1993.
27. 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.*, New York, 72: 248-54, 1976.
28. BRANCHINI, M.L. *et al.* Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol*, Washington, 32: 452-6, 1994.
29. BRUNEAU, S.; GUINET, R. Rapid identification of medically important yeasts by electrophoretic protein patterns. *FEMS Microbiol. Lt.*, 58: 329-334, 1989.
30. BUDTZ-JÖRGENSEN. Histopathology, immunology and serology of oral yeasts infections. *Acta odont. scand.*, Oslo, 48(1): 37-43, 1990b.
31. BURGNER-KAIRUZ, P. *et al.* Rapid detection and identification of *Candida albicans* and *Torulopsis (Candida) glabrata* in clinical specimens by species-specific nested PCR amplification of a cytochrome P-450 lanosterol-alpha-demethylase (L1A1) gene fragment. *J Clin Microbiol*, Washington, 32: 1902-7, 1994.
32. CAMOUGRAND, N. *et al.* Discrimination between different groups of *Candida parapsilosis* by mitochondrial DNA restriction analysis. *Curr Genet*, New York, 13: 445-9, 1988.

33. CARLOTTI, A. *et al.* A novel repeat sequence (CKRS-1) containing a tandemly repeated sub-element (kre) accounts for differences between *Candida krusei* strains fingerprinted with the probe CkF1,2. *Curr Genet*, New York, **31**: 255-63, 1997a.
34. CARLOTTI, A. *et al.* Nosocomial infection with *Candida albicans* in a pancreatic transplant recipient investigated by means of restriction enzyme analysis. *J Infect*, London, **29**: 157-64, 1994b.
35. CARLOTTI, A. *et al.* Rapid identification and fingerprinting of *Candida krusei* by PCR-based amplification of the species-specific repetitive polymorphic sequence CKRS-1. *J Clin Microbiol*, Washington, **35**: 1337-43, 1997b.
36. CARLOTTI, A. *et al.* Species-specific identification of *Candida krusei* by hybridization with the CkF1,2 DNA probe. *J Clin Microbiol*, Washington, **34**: 1726-31, 1996.
37. CARLOTTI, A.; GRILLOT, R.; COUBLE, A.; VILLARD, J. Typing of *Candida krusei* clinical isolates by restriction endonuclease analysis and hybridization with CkF1,2 DNA probe. *J Clin Microbiol*, Washington, **32**: 1691-9, 1994a.
38. CARRUBA, G. *et al.* DNA fingerprinting and electrophoretic karyotype of environmental and clinical isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol*, Washington, **29**: 916-22, 1991.
39. CASANOVA, M. & CHAFFIN, W.L. Cell wall glycoproteins of *Candida albicans* as released by different methods. *J Gen Microbiol*, Cambridge, **137**: 1045-51, 1991.
40. CASSONE, A. *et al.* Biotype diversity of *Candida parapsilosis* and its relationship to the clinical source and experimental pathogenicity. *J Infect Dis*, Chicago, **171**: 967-75, 1995.
41. CASTRO, M.M.S. *Leveduras contaminantes do processo de fermentação alcoólica: diversidade taxonômica e metabólica*. Campinas, 1995. Master Thesis, Universidade Estadual de Campinas.
42. CATO, E.P.; HASH, D.E.; HOLDMAN, L.V.; MOORE, W.E.C. Electrophoretic study of *Clostridium* species. *J Clin Microbiol*, Washington, **15**: 688-702, 1982.
43. CAUGANT, D.A. & SANDVEN, P. Epidemiological analysis of *Candida albicans* strains by multilocus enzyme electrophoresis. *J Clin Microbiol*, Washington, **31**: 215-20, 1993.

44. CLARE, B.G. Starch-gel electrophoresis of proteins as an aid in identifying fungi. *Nature*, London, **23**: 803-4, 1963.
45. CLARIFKER, M. *Contribuição ao estudo micológico do líquido bucal*. Recife, 1960 [Tese (Livre Docência) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Recife].
46. CORMICAN, M.G.; HOLLIS, R.J.; PFALLER, M.A. DNA macrorestriction profiles and antifungal susceptibility of *Candida (Torulopsis) glabrata*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, New York, **25**: 83-7, 1996.
47. COSTAS, M.; HOLMES, B.; 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*, Oxford, **67**: 441-52, 1989a.
48. COSTAS, M.; 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**: 265-74, 1989b.
49. COSTAS, M; HOLMES, B.; SLOSS, H.H. Numerical analysis of electrophoretic protein patterns of *Providencia rustigianii* strains from human diarrhoea and other sources. *J. Appl. Bacteriol.*, **63**:319-328, 1987.
50. DARLING, M.R.; ARENDORF, T.M.; COLDREY, N.A. Effect of cannabis use on oral candidal carriage. *J. oral Path. Med.*, Copenhagen, **19**(7):319-21, 1990.
51. DAVENPORT, J.C. The oral distribution of *Candida* in denture stomatitis. *Brit. Dent. J.*, London, **130**(4): 151-56, 1970.
52. DAVENPORT, R.R. *Mycology and taxonomy of fungi in fruit juices. Yeasts and yeast-like organisms*. Washington, São Paulo, Organization of the American States, Instituto de Botânica, 1974.
53. DE HOOG, G.S. & GUEHO, E. Deoxyribonucleic acid base composition and taxonomy of *Moniliella* and allied genera. *Antonie Van Leeuwenhoek*, Amsterdam, **50**: 135-41, 1984.
54. DIB, J.C. *et al.* Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis as a typing system for *Candida rugosa*, comparison of karyotype and restriction fragment length polymorphisms. *J Clin Microbiol*, Washington, **34**: 1494-6, 1996.
55. DIXON, M. & WEBB, E.C. *Enzymes*. 3.ed. New York, Academic Press, 1979. 1116p.

56. DOEBBELING, B.N. *et al*. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis with isoenzyme profiles as a typing system for *Candida tropicalis*. *Clin Infect Dis*, Chicago, **16**: 377-83, 1993.
57. DUPONT, P.F. & HEDRICK, L.R. Deoxyribonucleic acid base composition and numerical taxonomy of yeasts in the genus *Trichosporon*. *J Gen Microbiol*, Cambridge, **66**: 349-59, 1971.
58. EDDY, A.A. Aspects of the chemical composition of yeast. In: COOK, A.H. ed. *The chemistry and biology of yeasts*. New York, Academic Press, 1958. p.157-249.
59. EPSTEIN, J.B.; PEARSALL, N.N.; TRUELOVE, E.L. Quantitative relationship between *Candida albicans* in saliva and the clinical status of human subjects. *J. clin. Microbiol.*, Washington, **12**:475-6, 1980.
60. ESSAYAG, S.M.; BAILY, G.G.; DENNING, D.W.; BURNIE, J.P. Karyotyping of fluconazole-resistant yeasts with phenotype reported as *Candida krusei* or *Candida inconspicua*. *Int J Syst Bacteriol*, Washington, **46**: 35-40, 1996.
61. 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**: 1046-9, 1982.
62. FAIX, R.G.; FINKEL, D.J.; ERSEN, R.D.; HOSTETTER, M.K. Genotypic analysis of a cluster of systemic *Candida albicans* infections in a neonatal intensive care unit. *Pediatr Infect Dis J*, Baltimore, **14**: 1063-8, 1995.
63. FARRIS, J.S. On the cophenetic correlation coefficient. *Syst Zool*, Washington, **18**: 279-85, 1969.
64. FERRAGUT, C. *et al*. *Klebsiella trevisanii*, a new species from water and soil. *Int J Syst Bacteriol*, Washington, **33**: 133-42, 1983.
65. FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética*. Brasília, Embrapa-Cenargen, 1995. [Documento 20].
66. FIOL, J.B. A critical study of the taxonomic value of some tests of assimilation used for the classification of the sporogenous yeasts. *Mycopathologia*, Den Haag, **23**: 79-88, 1975.

67. FODISCK, L.S.; HANSEN, H.L. The reductase activity of various mouth organisms. *J. Am. Dent. Ass.* Chicago, **24**:14-45, 1937.
68. FRANKE, R.G. & BERRY, J.A. Taxonomic application of isozyme patterns produced with disc electrophoresis of some Myxomycetes, order Physarales. *Mycologia*, Lancaster, **64**: 830-9, 1972.
69. FREIRE-PICOS, M.A.; RODRIGUEZ-TORRES, A.M.; ESPERANZA CERDAN, M. Yeast phylogenetic relationships based on cytochrome c sequences. *Microbios*, Cambridge, **81**: 23-7, 1995.
70. FREITAS, H.R.; BIRMAN, E.G. Candidose bucal: aspectos clínicos e terapêuticos. *Rev. Ass. Paul. Cirurg. Dent.*, São Paulo, **43**(5):227-230, 1989.
71. FUKUHARA, H. *et al.* Linear mitochondrial DNAs of yeasts, frequency of occurrence and general features. *Mol Cell Biol*, Washington, **13**: 2309-14, 1993.
72. GABRIEL-BRUNEAU, S.M. & GUINET, R.M.F. Antigenic relationship among some *Candida* species studied by crossed-line immunoelectrophoresis: taxonomic significance. *Int J Syst Bacteriol*, Washington, **34**: 227-36, 1984.
73. GIMENEZ-JURADO, G.; VALDERRAMA, M.J.; SA-NOGUEIRA, I.; SPENCER-MARTINS, I. Assessment of phenotypic and genetic diversity in the yeast genus *Metschnikowia*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, Amsterdam, **68**: 101-10, 1995.
74. GIOVANNETTI, L. & VENTURA, S. Application of total DNA restriction pattern analysis to identification and differentiation of bacterial strains. In: HOWARD, J. & WHITCOMBE, D.M. *Methods in molecular biology*. Totowa, Humana Press, 1995. Vol. 46: Diagnostic bacteriology protocols, p.165-79.
75. GOMES, L.H. *Avaliação de quatro métodos para a caracterização de leveduras*. Piracicaba, 1995. [Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz-USP].
76. GUEHO, E. Deoxyribonucleic acid base composition and taxonomy in the genus *Geotrichum* Link. *Antonie Van Leeuwenhoek*, Amsterdam, **45**: 199-210, 1979.
77. GUEHO, E.; MIDGLEY, G.; GUILLOT, J. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie Van Leeuwenhoek*, Amsterdam, **69**: 337-55, 1996.

78. GUEHO, E.; TREDICK, J.; PHAFF, H.J. DNA base composition and DNA relatedness among species of *Trichosporon* Behrend. *Antonie Van Leeuwenhoek*, Amsterdam, **50**: 17-32, 1984.
79. GUILLAMON, J.M.; QUEROL, A.; JIMENEZ, M.; HUERTA, T. Phylogenetic relationships among wine yeast strains based on electrophoretic whole-cell protein patterns. *Int J Food Microbiol*, Amsterdam, **18**: 115-25, 1993.
80. HAGLER, A.N. Ascomycetaous yeast communities in coastal forest ecosystems of southeast Brazil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MICROBIAL ECOLOGY, 7., Santos, 1995. *Anais ...* p.S1-2.3.
81. HALL, R. Molecular approaches to taxonomy of fungi. *Bot Rev*, Lancaster, **35**: 285-304, 1969.
82. HALL, R. Symposium on the use of electrophoresis in the taxonomy of algae and fungi. I. Electrophoretic protein profiles as criteria in the taxonomy of fungi and algae. *Bull Torrey Bot Club*, New York, **100**: 253-9, 1973.
83. HALL, R.; ZENTMYER, G.A.; ERWIN, D.C. Approach to taxonomy of *Phytophthora* through acrylamide gel-electrophoresis of proteins. *Phytopathology*, Lancaster, **59**: 770-4, 1969.
84. HAMAJIMA, K.; NISHIKAWA, A.; SHINODA, T.; FUKAZAWA, Y. Detection of specificity of a new antigen in *Candida tropicalis* and its evaluation by taxonomic DNA analyses. *Microbiol Immunol*, Tokyo, **32**: 1013-24, 1988.
85. HARRIS, H. *Isoenzymes*. New York, Academic Press, 1975, Vol4.
86. 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 Bacteriol*, Baltimore, **82**: 547-77, 1961.
87. HAYNES, K.A. & WESTERNENG, T.J. Rapid identification of *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. krusei* by species-specific PCR of large subunit ribosomal DNA. *J Med Microbiol*, Edinburgh, **44**: 390-6, 1996.
88. HELLSTEIN, J. *et al*. Genetic Similarity and Phenotypic Diversity of Commensal and Pathogenic Strains of *Candida albicans* Isolated from the Oral Cavity. *Journal of clinical microbiology*, **31**: 3190-3199, 1993.

89. HENDRIKS, L *et al.* Phylogenetic analysis of five medically important *Candida* species as deduced on the basis of small ribosomal subunit RNA sequences. *J Gen Microbiol*, Cambridge, **137**: 1223-30, 1991.
90. HÖFLING, J.F. *et al.* Numerical analysis variations of SDS-PAGE protein patterns using different culture media for the cultivation of *Candida* from the oral cavity. *Rev Microbiol*, São Paulo, **28**: 79-84, 1998.
91. HÖFLING, J.F.; ROSA, E.A.R.; BAPTISTA, M.J.; SPOLIDÓRIO, D.M.P. New strategies on molecular biology applied to microbial systematics. *Rev Inst Med Trop S Paulo*, São Paulo, **39**: 345-52, 1997.
92. HOLMBERG, K. & FERROZE, F. Evaluation of an optimized system for random amplified polymorphic DNA (RAPD)-analysis for genotypic mapping of *Candida albicans* strains. *J Clin Lab Anal*, New York, **10**: 59-69, 1996.
93. 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**: 107-17, 1990.
94. HOPFER, R.L.; WALDEN, P.; SETTERQUIST, S.; HIGHSMITH, W.E. Detection and differentiation of fungi in clinical specimens using polymerase chain reaction (PCR) amplification and restriction enzyme analysis. *J Med Vet Mycol*, Abingdon, **31**: 65-75, 1993.
95. HOWELL, S.A.; ANTHONY, R.M.; POWER, E. Application of RAPD and restriction enzyme analysis to the study of oral carriage of *Candida albicans*. *Lett Appl Microbiol*, Oxford, **22**: 125-8, 1996.
96. HUNTER, P.R. A critical review of typing methods for *Candida albicans* and their applications. *Crit Rev Microbiol*, Boca Raton, **17**: 417-34, 1991.
97. IZARD, D. *Klebsiella terrigena*, a new species from soil and water. *Int J Syst Bacteriol*, Washington, **31**: 116-27, 1981.
98. JAMES, S.A.; COLLINS, M.D.; ROBERTS, I.N. The genetic relationship of *Lodderomyces elongisporus* to other ascomycete yeast species as revealed by small-subunit rRNA gene sequences. *Lett Appl Microbiol*, Oxford, **19**: 308-11, 1994.
99. JENKINS, W.M. *et al.* Nutricional deficiency in oral candidosis. *Int. J. oral Surg.*, Copenhagen, **6**(4):204-10, 1977.

100. JOHNSON, J.L. Bacterial classification III. Nucleic acids in bacterial classification. In: STALLEY, J.T.; BRYANT, M.P.; PFENNIG, N.; HOLT, J.G. ed. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins, Baltimore, 1989. p.1608-11.
101. JONES, G.R. . A comparison of analytical methods for the numerical taxonomy of yeasts. *J Gen Microbiol*, Cambridge, **89**: 175-81, 1975.
102. 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**: 1101-7, 1982.
103. JORGE, A.O.C *et al.* Influência do uso de aparelho ortodôntico sobre a presença de *Candida albicans* na cavidade bucal. *Revta Ass Paul Cirurg Dent*, **41**:308-310, 1987.
104. JORGE, A.O.C. *Presença de Candida e de anticorpos Anti-Candida na cavidade bucal de pacientes com periodontite crônica do adulto*. São José dos Campos, 1995 [Tese (Livre Docência) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Paulista Júlio de Mesquita Filho].
105. KAUFMANN, M.E. & PITT, T.L. Pulsed-field gel electrophoresis of bacterial DNA. In: CHART, H. ed. *Practical laboratory bacteriology*. Boca Raton, CRC Press, 1994.
106. KERSTERS, K. Numerical methods in the classification of bacteria by protein electrophoresis. In: GOODFELLOW, M.; JONES, D.; PRIEST, F.G. ed. *Computer assisted bacterial systematics*. New York, Academic Press, 1985.
107. KERSTERS, K. & DE LEY, J. Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic proteins patterns. *J Gen Microbiol*, Cambridge, **87**: 333-42, 1975.
108. KOBAYASHI, K.; SUGINAKA, H.; YANO, I. Analysis of fatty acid composition of *Candida* species by gas-liquid chromatography using a polar column. *Microbios*, Cambridge, **51**: 37-42, 1987.
109. KOGA, C.Y. *et al.* Presença de *Candida albicans* e anticorpos anti-*Candida* na saliva de crianças normais e respiradores bucais. *Revta bras. Odont.*, Rio de Janeiro, **50**(6):8-11, 1993.

110. KOGA, C.Y. *Quantificação da microbiota cariogênica e fúngica e de anticorpos anti-Candida e anti-Streptococcus mutans na saliva de pacientes respiradores bucais*. Piracicaba, 1995. [Tese (Mestrado em Biologia e Patologia Buco-Dental) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas].
111. KOGAN, G.; PAVLIAK, V.; MASLER, L. Structural studies of mannans from the cell walls of the pathogenic yeasts *Candida albicans* serotypes A and B and *Candida parapsilosis*. *Carbohydr. Res*, Amsterdam, **172**: 243-53, 1988.
112. KRAWIEC, S. & RILEY, M. Organization of the bacterial chromosome. *Microbiol Rev*, Washington, **54**: 502-39, 1990.
113. KREGER-VAN RIJ, N.J.W. *The Yeast, a taxonomic study*. Amsterdam, Elsevier, 1984. 1081p.
114. KURTZMAN, C.P. Molecular taxonomy of the yeasts. *Yeast*, Chichester, **10**: 1727-40, 1994.
115. LACAZ, C.S. *Candidíases*. São Paulo, EPU-EDUSP, 1980. 190p.
116. LACHER, D.A. & LEHMANN, P.F. Application of multidimensional scaling in numerical taxonomy, analysis of isoenzyme types of *Candida* species. *Ann Clin Lab Sci*, Philadelphia, **21**: 94-103, 1991.
117. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature*, London, **227**: 680-5, 1970.
118. LAND, G.A.; VINTON, E.C.; ADCOCK, G.B.; HOPKINS, J.M. Improved auxanographic method for yeast assimilations: a comparison with other approaches. *J Clin Microbiol*, Washington, **2**: 206-17, 1975.
119. LAY, K.M.; RUSSEL, C. *Candida* species and yeasts in mouth of infants from special care of maternity hospital. *Archs Dis. Childh.*, London, **52**(10):794-6, 1977.
120. LE GUENNEC, R. *et al.* Fluconazole- and itraconazole-resistant *Candida albicans* strains from AIDS patients, multilocus enzyme electrophoresis analysis and antifungal susceptibilities. *J Clin Microbiol*, Washington, **33**: 2732-7, 1995.
121. LEE, W. *et al.* Hospital outbreaks with yeasts. *J Hosp Infect*, London, **18**(Suppl. A): 237-49, 1991.

122. LEE, W.; BURNIE, J.P.; MATTHEWS, R. Fingerprinting *Candida albicans*. *J Immun Meth*, Amsterdam, **93**: 177-182, 1986.
123. LEHMANN, P.F. *et al.* Unrelatedness of groups of yeasts within the *Candida haemulonii* complex. *J Clin Microbiol*, Washington, **31**: 1683-7, 1993.
124. LEHMANN, P.F.; HSIAO, C.B.; SALKIN I.F. Proteins and electrophoresis profiles of selected *Candida* species. *J Clin Microbiol*, Washington, **27**: 400-4, 1989^a.
125. LEHMANN, P.F.; KEMKER, B.J.; HSIAO, C.B.; DEV, S. Isoenzyme biotypes of *Candida* species. *J Clin Microbiol*, Washington, **27**: 2514-21, 1989b.
126. LEHMANN, P.F.; WU, L.C.; MACKENZIE D.W. Isoenzyme changes in *Candida albicans* during domestication. *J Clin Microbiol*, Washington, **29**: 2623-5, 1991.
127. LIECKFELDT, E.; MEYER, W.; BORNER, T. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *J Basic Microbiol*, Berlin, **33**: 413-25, 1993.
128. LILIENTHAL, B. Studies of the flora of the mouth. III Yeast like organisms: some observation on their incidence in the mouth. *Aust. J. exp. Biol. Med. Sci.*, Adelaide, **28**(3):279-86, 1950.
129. LIN, Y.H.; LEE, F.L.; HSU, W.H. Molecular and chemical taxonomic differentiation of *Candida boidinii* Ramirez strains. *Int J Syst Bacteriol*, Washington, **46**: 352-5, 1996.
130. LISCHEWSKI, A. *et al.* Molecular epidemiology of *Candida* isolates from AIDS patients showing different fluconazole resistance profiles. *J Clin Microbiol*, Washington, **33**: 769-71, 1995.
131. LODDER, J. *The Yeasts*. Amsterdam, North Holland, 1970.
132. LOPES, M.B. *et al.* Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *Int. J. Syst. Bacteriol*, Washington, **48**: 279-86, 1998.
133. LOTT, T.J. *et al.* Genomic heterogeneity in the yeast *Candida parapsilosis*. *Curr. Genet*, New York, **23**: 463-7, 1993.

134. MAFFEI, C.M.L.; PAULA, C.R.; FRANCESCHINI, S.; MAZZOCATO, T.S. Tipagem genotípica de cepas de *Candida albicans* isoladas de gestantes com vaginite recorrente, por fragmentos de DNA clivados com enzima de restrição. *Rev Bras Patol Clín*, Rio de Janeiro, **30**(Abstract): 102, 1994.
135. MAGEE, P.T.; RIKKENINK, E.H.A.; MAGEE, B.B. Methods for the genetics and molecular biology of *Candida albicans*. *Analyt Biochem*, New York, **175**: 361-72, 1988.
136. MAHROUS, M. *et al.* DNA relatedness, karyotyping and gene probing of *Candida tropicalis*, *Candida albicans* and its synonyms *Candida stellatoidea* and *Candida clausenii*. *Eur J Epidemiol*, Roma, **8**: 444-51, 1992.
137. MAIDEN, M.F.J. & TANNER, A. Identification of oral yeasts by polyacrylamide gel electrophoresis. *Oral Microbiol Immunol*, Copenhagen, **6**: 187-90, 1991.
138. MAIWALD, M.; KAPPE, R.; SONNTAG, HG. Rapid presumptive identification of medically relevant yeasts to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Med. Vet. Mycol*, Heidelberg, **32**(2):115-122, 1994.
139. MALKHAS'IAN, S.S. *et al.* Group and fatty acid composition of the lipids in yeasts of the genus *Candida*. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, Moskva, **18**: 621-9, 1982.
140. MANAVATHU, E.K.; VAKULENKO, S.B.; OBEDEANU, N.; LERNER, S.A. Isolation and characterization of a species-specific DNA probe for the detection of *Candida krusei*. *Curr Microbiol*, New York, **33**: 147-51, 1996.
141. MARAIS, G.J.; WINGFIELD, M.J.; VILJOEN, C.D.; WINGFIELD, B.D. A new ophiostomatoid genus from *Protea infructescences*. *Mycologia*, Lancaster, **90**: 136-41, 1998.
142. MARTIM, M.V.; LAMB, D.J. Frequency of *Candida albicans* serotypes in patients with denture-induced stomatitis and in normal denture wearers. *J. clin. Path.* London, **35**(8):888-91, 1982.
143. MATEE, M.I.; SAMARANAYAKE, L.P.; SCHEUTZ, F.; SIMON, E.; LYAMUYA, E.F.; MWINULA, J. Biotypes of oral *Candida albicans* isolates in a Tanzanian child population. *APMIS*, Tanzania, **9**: 623-8, 1996.

144. MATHABA, L.T.; DAVIES, G.; WARMINGTON, J.R. The genotypic relationship of *Candida albicans* strains isolated from the oral cavity of patients with denture stomatitis. *J Med Microbiol*, Edinburgh, **42**: 372-9, 1995.
145. MAYSER, P.; FROMME, S.; LEITZMANN, C.; GRUNDER, K. The yeast spectrum of the 'tea fungus Kombucha'. *Mycoses*, Berlin, **38**: 289-95, 1995.
146. MCCULLOUGH, M.J.; ROSS, B.C.; READE, P.C. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *Int J Oral Maxillofac Surg*, Copenhagen, **25**: 136-44, 1996.
147. MENDONÇA-HAGLER, L.C. & HAGLER, A.N. Taxonomia de microrganismos. In: ROITMAN, I.; TRAVASSOS, C.R.; AZEVEDO, J.L. ed. *Tratado de Microbiologia*. São Paulo, Manole, 1991. Vol.2.
148. MENDONÇA-HAGLER, L.C.; HAGLER, A.N.; KURTZMAN, C.P. Phylogeny of *Metschnikowia* species estimated from partial rRNA sequences. *Int J Syst Bacteriol*, Washington, **43**: 368-73, 1993.
149. MERZ, W.G. *et al.* Strain delineation and epidemiology of *Candida (Clavispora) lusitanae*. *J Clin Microbiol*, Washington, **30**: 449-54, 1992.
150. MIRA-GUTIERREZ, J.; GARCIA-MARTOS, P.; MIRA-GORDILLO, A.J. Identification of yeasts by hydrolysis of amides. *Mycoses*, Berlin, **38**: 101-6, 1995.
151. MIYAKAWA, Y.; MABUCHI, T.; KAGAYA, K.; FUKAZAWA, Y. Isolation and characterization of a species-specific DNA fragment for detection of *Candida albicans* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, Washington, **30**: 894-900, 1992.
152. MOLNAR, O. *et al.* Analysis of coenzyme Q systems, monosaccharide patterns of purified cell walls, and RAPD-PCR patterns in the genus *Kluyveromyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, Amsterdam, **70**: 67-78, 1996.
153. MONOD, M.; PORCHET, S.; BAUDRAZ-ROSSELET, F.; FRENK, E. The identification of pathogenic yeast strains by electrophoretic analysis of their chromosomes. *J. Med. Microbiol.*, **32**: 123-129, 1990.
154. MONTROCHER, R. & CLAISSE, M.L. Biochemical studies in the yeast genus *Candida*. *Cell Mol Biol*, New York, **30**: 241-301, 1984.

155. MONTROCHER, R. & CLAISSE, M.L. Spectrophotometric analyses of some *Candida* species and related yeasts: significance in taxonomy. *Cell Mol Biol*, New York, **33**: 313-23, 1987.
156. MORACE, G. *et al.* Identification of various medically important *Candida* species in clinical specimens by PCR-restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol*, Washington, **35**: 667-72, 1997.
157. MOREIRA, D. *Prevalência de Candida na cavidade bucal de escolares de diferentes categorias socioeconômicas. Avaliação de parâmetros clínicos, salivares e microbiológicos*. Piracicaba, 1997. [Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas].
158. MURRAY, J.A.; CESARENI, G.; ARGOS, P. Unexpected divergence and molecular coevolution in yeast plasmids. *J Mol Biol*, London, **200**: 601-7, 1988.
159. NAKASE, T.; TAKEMATSU, A.; HAMAMOTO, M.; TAKASHIMA, M. The expanding realm of ballistosporous yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek*, Amsterdam, **63**: 191-200, 1993.
160. NATH, K. & BOLLON, A.P. Characterization of yeast ribosomal DNA fragments generated by *EcoRI* restriction endonuclease. *Mol Gen Genet*, Berlin, **147**: 153-68, 1976.
161. NEDER, R.N. *Microbiologia*. Manual de laboratório. São Paulo, Nobel, 1992. 138p.
162. NHO, S.; ERSON, M.J.; MOORE, C.B.; DENNING, D.W. Species differentiation by internally transcribed spacer PCR and *HhaI* digestion of fluconazole-resistant *Candida krusei*, *Candida inconspicua*, and *Candida norvegensis* strains. *J Clin Microbiol*, Washington, **35**: 1036-9, 1997.
163. NIESTERS, H.G.; GOESSENS, W.H.; MEIS, J.F.; QUINT, W.G. Rapid, polymerase chain reaction-based identification assays for *Candida* species. *J Clin Microbiol*, Washington, **31**: 904-10, 1993.
164. NISHIKAWA, A.; SUGITA, T.; SHINODA, T. Differentiation between *Debaryomyces hansenii*/*Candida famata* complex and *Candida guilliermondii* by polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol*, Amsterdam, **19**: 125-9, 1997.
165. NOSKIN, G.A. *et al.* Molecular typing for investigating an outbreak of *Candida krusei*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, New York, **26**: 117-23, 1996.

166. ODDS, F.C. *Candida and Candidosis*. Baltimore: Leicester Univ. Pr., 1979. p.352.
167. OKASALA, E. Factors predisposing to oral yeasts infections. *Acta odont. scand.*, Oslo, **48**(1):71-74, 1990.
168. OKUNISHI, M.; YAMADA, K.; KOMAGATA K. Electrophoretic comparison of enzymes from basidiomycetes in different stages of development. *J Gen Appl Microbiol*, Tokyo, **25**: 329-34, 1979.
169. OLIVER, D.E.; SHILLITOE, E.J. Effects of smoking on the prevalence and intraoral distribution of *Candida albicans*. *J. oral Path.*, Copenhagen, **13**(3):265-70, 1984.
170. OLSEN, I. Chemotaxonomy of yeasts. *Acta Odont Scand*, Oslo, **48**: 19-25, 1990.
171. OWEN, R.J. & JACKMAN, P.J.H. The similarities between *Pseudomonas paucimobilis* and allied bacteria derived from analysis of deoxiribonucleic acids and electrophoretic protein patterns. *J Gen Microbiol*, Cambridge, **128**: 2945-54, 1982.
172. PALOMARI, D. M. *Caracterização de amostras de espécies de Streptococcus orais. Eletroforese em gel de poliacrilamida de proteínas intracelulares*. Piracicaba, 1992 [Tese (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP].
173. PAPPAGIANIS, D.; ORNELAS, A.; HECTOR, R. Guanine plus cytosine content of the DNA of *Coccidioides immitis*. *Sabouraudia*, Abingdon, **23**: 451-4, 1985.
174. PASSOS, G.M. *Processos carióticos micóticos: técnicas de defesa*. Recife, 1961 [Tese (Cátedra de Clínica Odontológica) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Recife].
175. PEÇANHA, M.P.; PAGNOCCA, F.C.; RUGANI, C.A.; NEVES, F.A. Yeasts and other parameters of pollution of the Ribeirão Claro stream in Rio Claro, São Paulo. *Rev Microbiol*, São Paulo, **27**: 177-81, 1996.
176. PFALLER, M.A. The use of molecular techniques for epidemiologic typing of *Candida* species. *Curr Top Med Mycol*, New York, **4**: 43-63, 1992.
177. PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; HOLLIS, R.J. Variations in DNA subtype, antifungal susceptibility, and slime production among clinical isolates of *Candida parapsilosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, New York, **21**: 9-14, 1995.

178. PFALLER, MA *et al.* The use of biotyping and DNA fingerprinting in typing *Candida albicans* from hospitalized patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 13(6):481-9, 1990.
179. PIENIHÄKKINEN, K.; SCHEININ, A.; BANOCZY, J. Screening of caries in children though salivary lactobacili and yeasts. *Scand. J. dent. Res.*, Copenhagen, v.95, n.5, p.397-404, 1987.
180. PIZZIRANI-KLINE, A.A. & AZEVEDO, J.L. *Técnicas eletroforéticas para separação de cromossomos de microrganismos*. Piracicaba, FEALQ, 1989. [Manual técnico].
181. PONTIERI, E. *et al.* Correlation of SfiI macrorestriction endonuclease fingerprint analysis of *Candida parapsilosis* isolates with source of isolation. *J Med Microbiol*, Edinburgh, 45: 173-8, 1996.
182. PORTO, E. Micologia do gênero *Candida*. Caracteres gerais e bases para sua classificação. In: LACAZ, C.S. ed. *Candidíases*. São Paulo, EPU-EDUSP, 1980. p.1-26.
183. PRADA, G.M.M. *Leveduras associadas aos frutos de espécies nativas da Estação Ecológica de Juréia-Itatins (Peruíbe-São Paulo)*. Rio Claro, 1992. Master Thesis. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho.
184. PRAKASH, S.; LEWONTIN, R.C.; HUBBY, J.L. A molecular approach to the study of genic heterozigosity in natural populations. IV patterns of genetic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudobscura*. *Genetics*, Bethesda, 61: 841-58, 1969.
185. PRICE, C.W.; FUSON, G.B.; PHAFF, H.J. Genome comparison in yeast systematics, delimitation of species within the genera *Schwanniomyces*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, and *Pichia*. *Microbiol. Rev*, Washington, 42: 161-93, 1978.
186. PUJOL, C. *et al.* Atypical strains of *Candida albicans* recovered from AIDS patients. *J Med Vet Mycol*, Abingdon, 35: 115-21, 1997.
187. PUJOL, C. *et al.* Parity among the randomly amplified polymorphic DNA method, multilocus enzyme electrophoresis, and Southern blot hybridization with the moderately repetitive DNA probe Ca3 for fingerprinting *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*, Washington, 35: 2348-58, 1997.

188. PUJOL, C. *et al.* The yeast *Candida albicans* has a clonal mode of reproduction in a population of infected human immunodeficiency virus-positive patients. *Proc Natl Acad Sci USA*, Washington, **90**: 9456-9, 1993.
189. REYNES, J. *et al.* Simultaneous carriage of *Candida albicans* strains from HIV-infected patients with oral candidiasis, multilocus enzyme electrophoresis analysis. *FEMS Microbiol Lett*, Amsterdam, **137**: 269-73, 1996.
190. ROMANO, F.; RIBERA, G.; GIULIANO, M. A study of a hospital cluster of systemic candidosis using DNA typing methods. *Epidemiol Infect*, Cambridge, **112**: 393-8, 1994.
191. ROSA, E.A.R. *Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e análise numérica de leveduras isoladas da cavidade oral de humanos*. Piracicaba, 1997. [Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas].
192. ROSA, E.A.R.; ROSA, R.T.; PEREIRA, C.V.; HÖFLING, J.F. Evaluation of parity among dehydrogenases for grouping different *Candida* species commonly isolated from human oral cavity. *Revista Argentina de Microbiologia*, **31**:165-172, 1999.
193. ROY, B. & MEYER, S.A. Confirmation of the distinct genotype groups within the form species *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol*, Washington, **36**: 216-8, 1998.
194. RÜCHEL, R.A.; TEGELER, R.; TROST, M. A coparison of secretory proteinases from different strain of *Candida albicans*. *J. Med. Vet. Mycol.*, Abingdon, **20**(8):233-44, 1982.
195. RUSSEL, C.; LAY, K.M. Natural history of *Candida* species and yeast in the oral cavities of infants. *Archs oral Biol.*, Oxford, **18**:957-62, 1973.
196. RUSSEL, J.I. *et al.* Prediction of caries increment in Scottish adolescents. *Community Dent Oral Epidemiol*, **19**:74-77, 1991.
197. SAIKI, R.K. *et al.* Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, Washington, **239**: 487-91, 1988.
198. SAMARANAYAKE, L.P. & MACFARLANE, T.W. *Oral candidosis*. London, Wright, 1990. 295p.

199. SAMARANAYAKE, L.P. *et al.* Growth and acid production of *Candida* species in human saliva supplemented with glucose. *J Oral Path*, **15**:251-254, 1986.
200. SAN MILLAN, R.M.; WU, L.C.; SALKIN, I.F.; LEHMANN, P.F. Clinical isolates of *Candida guilliermondii* include *Candida fermentati*. *Int J Syst Bacteriol*, Washington, **47**: 385-93, 1997.
201. SANCHEZ, V. *et al.* Nosocomial acquisition of *Candida parapsilosis*, an epidemiologic study. *Am J Med*, New York, **94**: 577-82, 1993.
202. SANDVEN, P. Laboratory identification and sensivity testing yeast isolates. *Acta Odont Scand*, Oslo, **48**: 27-36, 1990.
203. SCHERER, S. & STEVENS, D.A. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *J Clin Microbiol*, Washington, **25**: 675-9, 1987.
204. SCHMID, J.*et al.* Evidence for a general-purpose genotype in *Candida albicans*, highly prevalent in multiple geographical regions, patient types and types of infection. *Microbiology*, **145**:2405-2413, 1999.
205. SCHWARTZ, D.C. & CANTOR, C.R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, Cambridge, **37**: 67-75, 1984.
206. SEELIG, M. Mechanisms by which antibiotics increase the incidence and severity of candidiasis and alter the immunological defenses. *Bact. Rev.*, Baltimore, **30**:442-59, 1966.
207. SHECHTER, Y. Symposium on the use of electrophoresis in the taxonomy of algae and fungi. IV. Electrophoresis and taxonomy of medically important fungi. *Bull Torrey Bot Club*, New York, **100**: 277-87, 1973.
208. SHECHTER, Y.; LANDAU, J.W.; DABROWA, N.; NEWCOMER, V.D. Comparative disc electrophoretic studies of proteins from dermatophytes. *Sabouraudia*, Abingdon, **5**: 144-9, 1966.
209. SHEN, H.D. *et al.* Differential identification of *Candida* species and other yeasts by analysis of [³⁵S] - metionine labeled polypeptide profiles. *Analyt Biochem*, New York, **175**: 548-55, 1988.

210. SHIBATA, N. *et al.* Existence of novel branched side chains containing beta-1,2 and alpha-1,6 linkages corresponding to antigenic factor 9 in the mannan of *Candida guilliermondii*. *J Biol Chem*, Baltimore, **271**: 9259-66, 1996.
211. SHIBATA, N. *et al.* Structure and antigenicity of the mannans of *Candida famata* and *Candida saitoana*: comparative study with the mannan of *Candida guilliermondii*. *Arch Biochem Biophys*, New York, **336**: 49-58, 1996.
212. SHIMIZU, M.T. Enzimas histolíticas produzidas por leveduras do gênero *Candida*. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, **19**(4):442-5, 1988.
213. SHIMIZU, M.T. *Produção de hialuronidase, condroitin sulfatase, proteinase e fosfolipase, por amostras de Candida albicans e sua correlação com virulência para camundongos inoculados experimentalmente*. São José dos Campos, 1990 [Tese (Livre Docência) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Paulista Júlio de Mesquita Filho].
214. SILVEIRA, F.R.X.; PAULA, C.R.; BIRMAN, E.G.; GAMBALE, W. *Candida albicans* isolates from the oral mucosa of healthy carriers. *Rev Microbiol*, São Paulo, **26**: 279-83, 1995.
215. SMITH, C.L. & CONDEMINE, G. New approaches for physical mapping of small genomes. *J Bacteriol*, Baltimore, **172**: 1167-72, 1990.
216. SMITH, M.T.; YAMAZAKI, M.; POOT, G.A. *Dekkera*, *Brettanomyces* and *Eeniella*, electrophoretic comparison of enzymes and DNA-DNA homology. *Yeast*, Chichester, **6**: 299-310, 1990.
217. SNEATH, P.H. & JOHNSON, R. The influence on numerical taxonomic similarities of errors in microbiological tests. *J Gen Microbiol*, Cambridge, **72**: 377-92, 1972.
218. SNEATH, P.H.A. & SOKAL, R.Q. *Numerical taxonomy*. San Francisco, Freeman, 1973. 482p.
219. SNEATH, P.H.A. Bacterial classification II - Numerical Taxonomy. In: STALEY, J.T.; BRYANT, M.P.; PFENNIG, N.; HOLT, J.G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. III. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989, p. 1619-23.
220. SOKAL, R.R. & ROHLF, F.J. The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon*, Utrecht, **11**: 33-40, 1962.

221. SOKAL, R.R. & ROHLF, F.J. The intelligent ignoramus, an experiment in numerical taxonomy. *Taxon*, Utrecht, **19**: 305-9, 1970.
222. SOLL, D.R. *et al.* Developmental and molecular biology of switching in *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, Saint Louis, **78**: 194-201, 1994.
223. SOR, F. & FUKUHARA, H. Analysis of chromosomal DNA patterns of the genus *Kluyveromyces*. *Yeast*, **5**(1):1-10, 1989.
224. SPENCER, J.F. & GORIN, P.A. Mannose-containing polysaccharides of the apiculate yeasts *Nadsonia*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, and *Sacharomycodes*, and their use as an aid in classification. *J Bacteriol*, Baltimore, **96**: 180-3, 1968.
225. SPENCER, J.F. & GORIN, P.A. Systematics of the genera *Debaryomyces* and *Metschnikowia*: proton magnetic resonance spectra of their mannans as an aid in classification. *Antonie Van Leeuwenhoek*, Amsterdam, **36**: 135-41, 1970.
226. SPENCER, J.F. & GORIN, P.A. Systematics of the genera *Hansenula* and *Pichia*: proton magnetic resonance spectra of their mannans as an aid in classification. *Can J Microbiol*, Ottawa, **15**: 375-82, 1969.
227. SPENCER, J.F. & GORIN, P.A. Systematics of the genus *Candida* Berkhout: proton magnetic resonance spectra of the mannans and mannose-containing polysaccharides as an aid in classification. *Antonie Van Leeuwenhoek*, Amsterdam, **35**: 33-44, 1969.
228. SPENCER, J.F. & GORIN, P.A. Systematics of the genus *Candida* Berkhout: proton magnetic resonance spectra of the mannose-containing polysaccharides of some further species of *Candida* as an aid in classification. *Antonie Van Leeuwenhoek*, Amsterdam, **37**: 75-88, 1971.
229. SPENCER, J.F. & GORIN, P.A. Systematics of the genus *Torulopsis*: proton magnetic resonance spectra of the mannose-containing polysaccharides as an aid in classification. *Antonie Van Leeuwenhoek*, Amsterdam, **36**: 509-24, 1970.
230. SPENCER, J.F. & GORIN, P.A.; HOBBS, G.A.; COOKE, D.A. Systematics of the genera *Torulopsis*, *Debaryomyces* and *Metschnikowia*. Proton magnetic resonance spectra of the mannans as an aid in classification. *Antonie Van Leeuwenhoek*, Amsterdam, **35**(Suppl.): A5-6, 1969.

231. SPOLIDORIO, D.M.P. *Biotipos de Streptococcus grupo mutans e avaliação de parâmetros clínicos e microbiológicos entre escolares de diferentes classes sócio-econômicas*. Piracicaba, 1997. [Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Universidade Estadual de Campinas].
232. STEIN, G.E.; SHERIDAN, V.L.; MAGEE, B.B.; MAGEE, P.T. Use of rDNA restriction fragment length polymorphisms to differentiate strains of *Candida albicans* in women with vulvovaginal candidiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, New York, **14**: 459-64, 1991.
233. STENDERUP, A. Oral mycology. *Acta Odont. Scand*, **48**:3-10, 1990.
234. STOUT, D.L. & SHAW, C.R. Genetic distance among certain species of *Mucor*. *Mycologia*, Lancaster, **66**: 969-77, 1974.
235. STUDIER, F.W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slabs gels. *J Molec Biol*, London, **79**: 237-48, 1973.
236. SU, C.S. & MEYER, S.A. Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA from *Candida parapsilosis* and other *Candida* species. *Yeast*, Chichester, **5**: 355-60, 1989.
237. SUZUKI, T.; MIYAMAE, Y.; ISHIDA, I. Variation of colony and chromosomal rearrangement in *Candida tropicalis* pK233. *J Gen Microbiol*, Cambridge, **137**: 161-7, 1991.
238. TANNER, A.C.R.; LISTGARTEN, M.A.; EBERSOLE, J.L.; STRZEMPKO. *Bacteroides forsythus* sp. nov; a slow growing, fusiform *Bacteroides* sp. from the human oral cavity. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **36**:213-221, 1986.
239. TOROK, T.; ROCKHOLD, D.; KING, A.D.JR. Use of electrophoretic karyotyping and DNA-DNA hybridization in yeast identification. *Int J Food Microbiol*, Amsterdam, **19**: 63-80, 1993.
240. TSUCHIYA, T.; FUKAZAWA, Y.; MIYASAKI, F.; KAWAKITA, F. Studies on the classification of the genus *Candida*. *Japan J Exp Med*, Tokyo, **25**: 75-83, 1955.
241. VAN DER WALT, J.P. Criteria and methods used in classification. In: LODDER, J. ed. *The Yeasts*. Amsterdam, North Holland, 1970. p.34-113.

242. 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.
243. VANCANNEYT, M.; POT, B.; HENNEBERT, G.; KERSTERS, K. Differentiation of yeast species based on electrophoretic whole-cell protein patterns. *Syst Appl Microbiol*, Stuttgart, **14**: 23-32, 1991.
244. VARGA, J. *et al.* Isoenzyme, restriction fragment length polymorphism, and random amplified polymorphic DNA characterization of *Phaffia rhodozyma* Miller *et al.* *Int J Syst Bacteriol*, Washington, **45**: 173-7, 1995.
245. VAZQUEZ, J.A. *et al.* Comparison of restriction enzyme analysis versus pulsed-field gradient gel electrophoresis as a typing system for *Torulopsis glabrata* and *Candida* species other than *C. albicans*. *J Clin Microbiol*, Washington, **31**: 2021-30, 1993.
246. VAZQUEZ, J.A. *et al.* Nosocomial acquisition of *Candida albicans*, an epidemiologic study. *J Infect Dis*, Chicago, **168**: 195-201, 1996.
247. VILGALYS, R. & HESTER, M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J Bacteriol*, Baltimore, **172**: 4238-46, 1990.
248. VILJOEN, B.C.; KOCK, J.L.F.; MÜLLER, H.B.; LATEGAN, P.M. Long-chain fatty acid compositions of some asporogeneous yeasts and their respective ascosporeogenous states. *J Gen Microbiol*, Cambridge, **133**: 1019-22, 1987.
249. WAGGONER-FOUNTAIN, L.A. *et al.* Vertical and horizontal transmission of unique *Candida* species to premature newborns. *Clin Infect Dis*, Chicago, **22**: 803-8, 1996.
250. WALSH, T.J.; FRANCESCONI, A.; KASAI, M.; CHANOCK, S.J. PCR and single-strand conformational polymorphism for recognition of medically important opportunistic fungi. *J Clin Microbiol*, Washington, **33**: 3216-20, 1995.
251. 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**: 1543-50, 1986.
252. WELSH, J. & MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with random primers. *Nucleic Acids Res*, Oxford, **18**: 7213-8, 1990.

253. WHITE, T.C. & AGABIAN, N. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases, isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. *J Bacteriol*, Baltimore, **177**: 5215-21, 1995.
254. WICKERHAM, L.J. The taxonomy of yeasts. U.S.D. *Tech Bull*, Washington, (1029), 1951.
255. WICKERHAM, L.J. & BURTON, K.A. Carbon assimilation tests for the classification of yeasts. *J Bacteriol*, Baltimore, **56**: 363-71, 1948.
256. WILKINSON, B.M. *et al.* A new, sensitive polynucleotide probe for distinguishing *Candida albicans* strains and its use with a computer assisted archiving and pattern comparison system. *J Med Vet Mycol*, Abingdon, **30**: 123-31, 1992.
257. WILLIAMS, D.W.; WILSON, M.J.; LEWIS, M.A.; POTTS, A.J. Identification of *Candida* species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. *J Clin Microbiol*, Washington, **33**: 2476-9, 1995.
258. WILLIAMS, J. *et al.* DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, Oxford, **18**: 6531-5, 1990.
259. WOONTNER, M. & JAEHNING, J.A. Accurate initiation by RNA polimerase II in a whole cell extract from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, Baltimore, **265**: 8979-82, 1990.
260. YAMAZAKI, M. & KOMAGATA, K. Taxonomic significance of electrophoretic comparison of enzymes in the genera *Rhodotorula* and *Rhodosporidium*. *Int J Syst Bacteriol*, Washington, **31**: 361-81, 1981.
261. ZERVOS, M.J. & VAZQUEZ, J.A. DNA analysis in the study of fungal infections in the immunocompromised host. *Clin Lab Med*, Philadelphia, **16**: 73-88., 1996.

APÊNDICES

1. Critérios de Classificação Socioeconômica dos Escolares

ITEM DE CONFORTO	SISTEMA DE PONTOS						
	0	1	2	3	4	5	6 ou +
Televisor	0	2	4	6	8	10	12
Rádio	0	1	2	3	4	5	6
Banheiro	0	2	4	6	8	10	12
Automóvel	0	4	8	12	16	16	16
Empregada	0	6	12	18	24	24	24
Aspirador de pó	0	5	5	5	5	5	5
Máquina de lavar	0	2	2	2	2	2	2

GRAU DE INSTRUÇÃO	NÚMERO DE PONTOS
até o primário incompleto	0
até o ginásial incompleto	1
até o colegial incompleto	3
até o superior incompleto	5
com superior completo	10

DEFINIÇÃO DAS CLASSES	
CLASSES	PONTOS
A	35 ou +
B	21 a 35
C	10 a 20
D	5 a 9
E	até 4

2. Meios de Cultura

2.1 Meio Completo para Leveduras (MCL)

❖ Peptona	10 g
❖ Extrato de levedura	10 g
❖ Fosfato dibásico de potássio	0,5 g
❖ Glicose	20 g
❖ Ágar	20 g
❖ Água destilada	q.s.p. 1.000 mL

2.2 Yeast Peptone Dextrose (YPD)

❖ Extrato de levedura	10 g
❖ Peptona	10 g
❖ Glicose	20 g
❖ Água destilada	q.s.p. 1.000 mL

3. Soluções

3.1 Acrilamida/Bis (30 % T; 2,6 % C)

❖ Acrilamida	73 g
❖ Bis	2 g

Adicionar 250 mL de água desmineralizada. Filtrar a solução e armazená-la em geladeira. Usar máscara e evitar o contato dos componentes acrílicos com a pele. Manusear com extremo cuidado, pois esses componentes são neurotóxicos, enquanto em sua forma monômera.

3.2 Corante

❖ Azul Brilhante de Coomassie G-250	100 mg
❖ Fixador PAGE	100 mL

3.3 Descorante

❖ Ácido acético	100 mL
❖ Metanol	250 mL
❖ Água destilada	q.s.p. 1.000 mL

3.4 Fixador PAGE

❖ Metanol	45 mL
❖ Ácido acético glacial	10 mL
❖ Água destilada	45 mL

3.5 Fixadora

❖ Ácido sulfossalicílico	12,5 g
❖ Água destilada	q.s.p. 100 mL

3.6 Gel Empilhador (Stacking Gel) a 4,5%

Cálculo para 30 mL de solução, suficientes para dois géis de 140 mm x 160 mm x 0,75 mm (16,8 mL)

❖ Tris HCl 0,6173 M pH 6,8	1,5 mL
❖ Solução de acrilamida	2,25 mL
❖ Solução de persulfato de amônia	0,05 mL
❖ TEMED	0,01 mL
❖ SDS 10 %	0,2 mL
❖ Água destilada	11,15 mL

3.7 Gel Separador (Running Gel) a 12,5%

Cálculo para 30 mL de solução, suficientes para dois géis de 140 mm x 160 mm x 0,75 mm (16,8 mL)

❖ Tampão Tris HCl 3,778 M pH 8,9	3 mL
❖ Solução de acrilamida	12,5 mL
❖ Solução de persulfato de amônia	0,1 mL
❖ TEMED	0,01 mL
❖ SDS 10 %	0,2 mL
❖ Água destilada	14,3 mL

3.8 Persulfato de Amônia

❖ Persulfato de amônia	0,05 g
❖ Água destilada	5 mL

3.9 Reagente de BRADFORD (1976)

❖ Coomassie Brilliant Blue G-250	200 mg
❖ Metanol ou Etanol	50 mL
❖ Ácido fosfórico 85% (H ₃ PO ₄)	100 mL
❖ Água destilada	q.s.p. 1.000 mL

Dissolver 200 mg de Azul Brilhante de Coomassie em 50 mL de metanol ou etanol. Misturar cuidadosamente por 2 horas e, após homogeneização, adicionar lentamente 100 mL de H₃PO₄ (ácido fosfórico) a 85 %. Misturar novamente por mais 2 horas, deixar em repouso por 24 horas e completar o volume com água destilada para 1.000 mL. Deixar em repouso por 24 horas e filtrar em ultrafiltro Millipore (0,45 µm de duas camadas). A preparação deve ser marrom-clara (cor de chá mate). Armazenar em geladeira, em frasco escuro.

3.10 SDS a 10 %

❖ SDS	10 g
❖ Água destilada	q.s.p. 100 mL

3.11 Tampão Dissociante de ALFENAS *et al.* (1991)

❖ Glicerol	5 mL
❖ Tris HCl 0,61 M pH 6,8	2,5 mL
❖ Azul de Bromofenol	2,5 mg
❖ β -mercaptoetanol	0,5 mL
❖ SDS	0,5 g
❖ Água destilada	q.s.p. 25 mL

3.12 Tampão do Tanque (Eletrodo): Tris-Glicina pH 8,9 (10X)

❖ Tris base	63,2 g +
❖ Glicina	39,9 g

Adicionar aproximadamente 900 mL de água destilada. Sob agitação, dissolver os produtos e completar o volume para 1.000 mL. O pH da solução fica em torno de 9,2. Filtrar a solução e armazená-la em geladeira. Diluir a solução a 1:10 antes do uso. O pH atingirá aproximadamente 8,9.

3.13 Tampão Tris-HCl 0,6173 M pH 6,8

❖ Tris	7,475 g
--------	---------

Adicionar aproximadamente 50 mL de água desmineralizada e titular com HCl concentrado para pH 6,8. Completar o volume para 100 mL. Filtrar a solução e armazená-la à temperatura ambiente.

3.14 Tampão Tris-HCl 3,778 M pH 8,9

❖ Tris	45,75 g
--------	---------

Adicionar aproximadamente 60 mL de água desmineralizada. A água deve ser previamente aquecida para facilitar a dissolução. Após o esfriamento, titular com HCl concentrado para pH 8,9. Completar o volume para 100 mL. Filtrar a solução e armazená-la à temperatura ambiente.