

Agenor Messias Silvestre Junior

Sistemática molecular de *Trichosporon* spp. baseada em genes ribossomais e sua correlação com fatores de virulência e epidemiologia

São Paulo

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Agenor Messias Silvestre Junior

Sistemática molecular de *Trichosporon* spp. baseada em genes ribossomais e sua correlação com fatores de virulência e epidemiologia

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2009

Agenor Messias Silvestre Junior

Sistemática molecular de *Trichosporon* spp. baseada em genes ribossomais e sua correlação com fatores de virulência e epidemiologia

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Briones

São Paulo

2009

Silvestre, Agenor Messias

Sistemática molecular de *Trichosporon* spp. baseada em genes ribossomais e sua correlação com fatores de virulência e epidemiologia

Tese (Doutorado) Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Microbiologia e Imunologia

Título em inglês:

Molecular systematics of *Trichosporon* spp. based on ribosomal genes and its correlation with virulence factors and epidemiology

1- *Trichosporon* spp. 2-Fatores de virulência 3- Filogenética 4- Trichosporonose

Este trabalho foi desenvolvido na Disciplina de Biologia Celular do Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia da Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM), com o auxílio financeiro do CNPq e FAPESP.

Resumo

As leveduras do gênero *Trichosporon* surgem como patógenos emergentes com altas taxas de morbidade e mortalidade em uma população de imunocomprometidos em crescente expansão. O aumento expressivo de relatos de casos de tricosporonose invasiva e a identificação controversa desse gênero implicam em um déficit epidemiológico que por sua vez, dificulta a compreensão da história natural dessas infecções. Isso conduz a atrasos no diagnóstico e, conseqüentemente, na terapia antifúngica apropriada. A presente investigação teve como objetivos avaliar os aspectos epidemiológicos relacionados à colonização e infecção humana por leveduras do gênero *Trichosporon* através de metodologias fenotípicas e genotípicas e sua correlação com fatores de virulência *in vitro*. Avaliamos 112 isolados de pele de indivíduos sadios e 26 isolados de urina (22) e cateter (4) identificados pelo método fenotípico. Dos isolados colonizantes (112) as seguintes espécies foram identificadas: *T. cutaneum* (29,46%), *T. asteroides* (20,53%), *T. ovoides* (15,17%), *T. inkin* (10,71%), *T. mucoides* (8,92%) e *T. asahii* (6,25%). Dentre os isolados de urina e cateter as espécies identificadas foram *T. asahii*, a espécie mais isolada (n = 23; 76,66%), seguido por *T. inkin* (n = 5; 16,66%) e *T. asteroides* (n = 2; 6,6%). Na identificação genotípica das leveduras do gênero *Trichosporon* utilizamos as regiões ITS e IGS do DNA ribossômico. Após a análise filogenética constatamos que a região que melhor discrimina as espécies é a IGS, assim o padrão ouro para nossa investigação foi baseado nessa região. Nos isolados de urina e cateter a espécie *T. asahii* foi predominante, sendo identificada em 22 isolados (84,6%), seguida por dois isolados de *T. inkin* (7,69%). *T. coremiiforme* e *T. debeurmannium* foram isolados em uma amostra cada (3,84%). Quando comparamos os dados obtidos pela identificação molecular e fenotípica observamos que apenas em 30% dos isolados (21/70), a identificação fenotípica foi capaz de identificar corretamente os isolados de *Trichosporon* spp. Como ferramenta epidemiológica analisamos o polimorfismo das sequências de *T. asahii*, segundo a classificação em genótipos. A análise bayesiana classificou o isolado 062 pertencente ao genótipo 3, o isolado 002 pertencente ao genótipo 4 e nenhum isolado pertencente aos genótipos 5, 6 e 7. Da mesma forma não podemos afirmar com qual genótipo, 1 ou 2, o restante dos isolados mais se assemelha devido à grande politomia e a baixa probabilidade *a posteriori* dos ramos. Avaliamos como fatores de virulência a produção de exoenzimas (Proteinase, Fosfolipase e DNase) e Índice de adesão desses isolados, sendo possível observar que existe dois padrões distintos: isolados colonizantes com baixa produção de exoenzimas e pouco aderentes e isolados de urina e cateter com produção pronunciada de exoenzimas e com índice de aderência elevados.

Abstract

Yeasts of the genus *Trichosporon* appear as emerging pathogens with high rates of morbidity and mortality in immunocompromised patients and is becoming increasingly widespread. The significant increase of invasive trichosporonosis and the controversial identification of this kind imply an epidemiological deficit which in turn complicates the understanding of the natural history of these infections, leading to delays in diagnosis and, consequently, appropriate antifungal therapy. The present study aimed to evaluate the epidemiological aspects related to human colonization and infection by *Trichosporon* spp. through phenotypic and genotypic methods and its correlation with virulence factors *in vitro*. We evaluated 112 isolates from skin of healthy individuals and 26 isolates from urine (22) and catheter (4) identified by the phenotypic method. Among the colonizing isolates (112) the following species were identified: *T. cutaneum* (29.46%), *T. asteroides* (20.53%), *T. ovoides* (15.17%), *T. inkin* (10.71%), *T. mucoid* (8.92%) and *T. asahii* (6.25%). Among the isolates from urine and catheter the species identified were *T. asahii* the most species isolated (n = 23; 76.66%), followed by *T. inkin* (n = 5; 16.66%) and *T. asteroides* (n = 2, 6.6%). For the genotypic identification of yeasts *Trichosporon*, the ITS and IGS regions of ribosomal DNA were used. After phylogenetic analysis, the region that better discriminates the species is IGS, and the gold standard for our investigation was based in that region. In isolates from urine and catheter the *T. asahii* was the predominant species, being identified in 22 isolates (84.6%), followed by two *T. inkin* (7.69%). *T. coremiiforme* and *T. debeurmannium* were isolated in one sample each (3.84%). When comparing the data obtained by molecular and phenotypic identifications it was observed that only in 30% of the isolates (21/70), the phenotypic identification was able to correctly identify isolates of *Trichosporon* spp. The polymorphism of the sequences of *T. asahii*, was analyzed according to the classification of genotypes. Bayesian analysis classified the 062 isolate belonging to genotype 3, the isolated 002 belonging to genotype 4 and no isolate belonging to genotypes 5, 6 and 7. Likewise we cannot say with which genotype 1 or 2, the remainder of the isolates most closely because of the large polytomous and low posterior probability of the branches. Evaluated as virulence factors of production of exoenzymes (proteinase, phospholipase and DNase) and index of adhesion of these isolates and it was observed that there are two distinct patterns: isolates colonizing low-exoenzymes and loosely adhering, and isolated from urine and catheter pronounced production of exoenzymes and high rate of adherence.

Abreviaturas

Ac	Anticorpo
A.f.	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Ag	Antígeno
DAPI	4'6-diamino-2 phenylindole
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EDTA	Ethylenediaminetetracetic acid
FIT-C	Fluorescein isothiocyanate
gp	Glicoproteína
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HEPES	Ácido N-2 etanosulfônico
HAT	Sodium hypoxantine and thymidine
H.c.	<i>Histoplasma capsulatum</i>
Inh-ELISA	ELISA de inibição
Ig	Imunoglobulina
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
J.L.	Doença de Jorge Lobo
kDa	Kilodalton
MAb	Anticorpo monoclonal
mg	Miligramas
ng	Nanograma
µg	Micrograma
P	Padrão de peso molecular
P. b.	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>

PBS	Phosphate buffer solution
PBS-T	Phosphate buffer solution + Tween 20
PEG	Polietilenoglicol
PMSF	Phenylmethyl sulphonyl fluoride
rpm	Rotações por minuto
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SFB	Soro fetal bovino
SHN	Soro humano normal
S.s.	<i>Sporothrix schenckii</i>
ST	Sem tratamento
T.r.	<i>Trichophyton rubrum</i>
UFC	Unidade formadora de colônia

Lista de figuras

Figura 1. - Representação esquemática do locus do DNA ribossomal de *Trichosporon* spp. Os retângulos pretos indicam regiões transcritas funcionais e a região dos espaçadores internos (ITS) e a região dos espaçadores intergênicos (IGS) são evidenciados pelas setas. Adaptada de Sugita et al. (2002).

Figura 2- Ilustração das medições da atividade enzimática (Pz). Diâmetro da colônia (dc). Diâmetro da colônia mais a zona de precipitação (dcp).

Figura 3- Espectro epidemiológico das idades dos 112 indivíduos sadios com colonização por *Trichosporon* spp.

Figura 4- Espectro epidemiológico das idades dos 30 pacientes com infecção de urina e cateter por *Trichosporon* spp.

Figura 5 - Número de indivíduos e taxa de colonização de *Trichosporon* spp. na região ínguino-crural segundo a etnia (A) e nível educacional (B). A porcentagem é relativa a cada grupo.

Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos da PCR das regiões ITS e IGS dos isolados padrão (CBS) e isolados clínicos de *Trichosporon* spp.

Figura 07. Filogenia dos isolados de *Trichosporon* spp. baseados na análise bayesiana da região ITS.

Figura 08. Cladograma dos sequenciamentos da região ITS dos isolados de *Trichosporon* spp. Valores de colocar probabilidade posterior indicado nos ramos.

Figura 09. Rede filogenética gerada pelo Splitstree utilizando a região ITS dos isolados de *Trichosporon* spp.. Valores assinalados nos ramos indicam o bootstrap (1000 pseudoréplicas).

Figura 10. Filogenia dos isolados de *Trichosporon* spp. baseados na análise bayesiana da região IGS. Valores assinalados nos ramos indicam a probabilidade posterior dos ramos.

Figura 11. Rede filogenética gerada pelo Splitstree utilizando a região IGS dos isolados de *Trichosporon* spp. Valores assinalados nos ramos indicam probabilidade posterior dos ramos.

Figura 12 . Rede filogenética gerada pelo Splitstree utilizando a região IGS dos diferentes genótipos de *T. asahii*

Figura 13. Índice de aderência dos isolados superficiais de *Trichosporon* spp. á células epiteliais (HeLa).

Figura 13. Filogenia dos genótipos de *T. asahii* baseados na análise bayesiana da região IGS. Valores assinalados nos ramos indicam a probabilidade posterior dos ramos.

Figura 14. Índice de aderência dos isolados de urina e cateter de *Trichosporon* spp. á células epiteliais (HeLa).

Figura 15. Índice de aderência dos isolados de urina e cateter de *Trichosporon* spp. á células epiteliais (HeLa).

Figura 16. Leveduras do gênero *Trichosporon* e células HeLa coradas com Giemsa (40X).

Figura 17. Leveduras do gênero *Trichosporon* e células HeLa coradas com DAPI, visualizadas sobre fluorescência e contraste de fase (40X), respectivamente.

Figura 18. Leveduras do gênero *Trichosporon* e células HeLa coradas com DAPI, visualizadas sobre fluorescência e contraste de fase (40X), respectivamente.

Figura 19. Leveduras do gênero *Trichosporon* e células HeLa coradas com DAPI, visualizadas sobre fluorescência e contraste de fase (40X), respectivamente.

Lista de tabelas

Tabela 1- Cepas padrão utilizadas como referência, segundo sua origem, local de isolamento e espécie. * Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).

Tabela 2- Chave de identificação das espécies de relevância clínica do gênero *Trichosporon*, segundo parâmetros bioquímicos e morfológicos (Guarro & De Hoog, 2000, P.164-175).

Tabela 3. Sequências de ITS e IGS de *Trichosporon* e *Cryptococcus* spp. que não foram obtidas pelo presente trabalho.

Tabela 4. Classificação da atividade enzimática e sua representação gráfica segundo Price et al. (1982) modificado.

Tabela 5. Análise da distribuição dos 1004 voluntários sadios atendidos no ambulatório de dermatologia do Hospital São Paulo, UNIFESP-EPM e Hospital Heliópolis (PAM), segundo as variáveis analisadas.

Tabela 6. Taxa de isolamento das espécies de *Trichosporon* (identificadas fenotipicamente) provenientes de urina e cateter de acordo com idade.

Tabela 7. Parâmetros fisiológicos, segundo De Hoog & Guarro J. (2001). para identificação clássica de espécies de *Trichosporon*.

Tabela 8. Taxa de isolamento das espécies de *Trichosporon* (identificadas fenotipicamente) provenientes de urina e cateter de acordo com idade.

Tabela 9. Identificação genotípica dos isolados de *Trichosporon* spp. de origem superficial e profunda e os parâmetros resultantes dos seqüenciamentos obtidos.

Tabela 10. Comparação entre os resultados obtidos através dos métodos de identificação dos isolados de *Trichosporon* spp.

Tabela 11. Modelos de substituição utilizados pelos programas de inferência filogenética

Tabela 12. Medições das atividades da proteinase dos isolados de *Trichosporon* spp. de origem superficial (pele).

Tabela 13. Medições das atividades da proteinase dos isolados de *Trichosporon* spp. de origem profunda (urina e cateter).

Tabela 14. Medições das atividades da fosfolipase dos isolados de *Trichosporon* spp. de origem superficial.

Tabela 15. Medições das atividades da fosfolipase dos isolados de *Trichosporon* spp. de origem profunda (urina e cateter).

Tabela 16. Medições das atividades da DNase dos isolados de *Trichosporon* spp. de origem superficial.

Tabela 17. Medições das atividades da DNase dos isolados de *Trichosporon* spp. de origem profunda (urina e cateter).

Sumário

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Infecções fúngicas.....	01
1.2. O gênero <i>Trichosporon</i>	02
1.3. Perspectiva histórica do gênero <i>Trichosporon</i> spp.	03
1.4. Colonização por leveduras do gênero <i>Trichosporon</i>	05
1.5. Infecções por <i>Trichosporon</i> spp.	07
1.5.1. Infecções Superficiais.....	07
1.5.2. Infecções invasivas por <i>Trichosporon</i> spp.	08
1.5.3. Infecções por <i>Trichosporon</i> no Brasil.....	11
1.6. Diagnóstico e Identificação.....	15
16.1. Identificação fenotípica do gênero <i>Trichosporon</i>	16
16.2. Identificação genotípica do gênero <i>Trichosporon</i>	17
1.7. Fatores de virulência.....	19
2. JUSTIFICATIVA	22
3. OBJETIVOS	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. Origem dos isolados de <i>Trichosporon</i> “superficiais” e “profundos”.....	24
4.1.1. Isolamento de <i>Trichosporon</i> spp. de origem superficial pela técnica do quadrado de tapete (Mariat & Tapia, 1966).	24
4.1.2. Cepas padrão de <i>Trichosporon</i> spp.	24
4.1.3. Isolamento de <i>Trichosporon</i> spp. de origem profunda.....	25
4.2. Teste para pureza das amostras.	25
4.3. Identificação fenotípica e fisiológica dos isolados de <i>Trichosporon</i> spp. segundo Guarro & De Hoog,2000.....	26
4.3.1 Avaliação de características morfológica.....	27
4.3.1.1. Estudo macromorfológico.....	27
4.3.1.2. Estudo micromorfológico.....	27
4.3.1.3. Caracterização bioquímica dos isolados	28
4.3.1.3.1. Prova de hidrólise da uréia.....	28
4.3.1.3.2. Assimilação de carboidratos (auxanograma).....	28
4.3.1.3.3. Testes de sensibilidade à temperatura e a cicloheximida.....	29
4.4. Identificação de leveduras do gênero <i>Trichosporon</i> por técnicas moleculares.....	29
4.4.1. Extração do DNA genômico de amostras de <i>Trichosporon</i> spp.	30
4.4.2. Tratamento do DNA com RNase.....	31
4.4.3. Quantificação do DNA por espectrofotometria.....	32
4.4.4. Regiões amplificadas e oligonucleotídeos para identificação molecular....	32
4.4.4.1. Oligonucleotídeos internos para região IGS-1.....	34
4.4.4.2. Reação da polimerase em cadeia (PCR).....	35
4.4.4.3. Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	36
4.4.4.4. Reação de seqüenciamento de nucleotídeos.....	36
4.4.4.5. Precipitação dos produtos de PCR.....	37
4.5. Análise filogenética dos seqüenciamentos	38
4.5.1. Montagem das sequências consenso (“contigs”)	38
4.5.2 Alinhamento das sequências com o programa Clustal W.	39
4.5.3. Métodos de inferência filogenética.	39

4.5.4. Modelo de substituição de nucleotídeos.	42
4.6. Estudo de fatores associados a virulência in vitro das leveduras do gênero <i>Trichosporon</i>	42
4.6.1. Pesquisa de exoenzimas.....	43
4.6.1.1. Proteinase.....	43
4.6.1.2. Pesquisa de fosfolipase.....	45
4.6.1.3. Pesquisa de desoxirribonuclease (DNase)	45
4.7. Ensaio de Adesão (Pires, 1993; Taborda, Casadevall, 2002 modificados).....	46
4.7.1. Cultivo e preparo de células HeLa.....	46
4.7.1.1. Preparo das monocamadas de células HeLa.....	47
4.7.2. Preparo e incubação do inóculo de <i>Trichosporon</i> spp.....	47
4.7.3. Fixação, coloração.....	48
4.7.4. Determinação do índice de aderência	48
5. RESULTADOS	50
5.1. Origem dos isolados de <i>Trichosporon</i> “superficiais” e “profundos”.....	43
5.2. Identificação fenotípica e fisiológica dos isolados de <i>Trichosporon</i> spp.	47
5.3. Identificação genotípica dos isolados de <i>Trichosporon</i> “superficiais” e “profundos”.....	51
5.4. Filogenia do gênero <i>Trichosporon</i>	58
5.4.1. Avaliação de confiabilidade	59
5.4.2. Árvores filogenéticas região ITS dos isolados de <i>Trichosporon</i> spp.....	60
5.4.3. Análise de recombinação genética da região ITS de <i>Trichosporon</i> spp.	61
5.4.4. Árvores filogenéticas região IGS dos isolados de <i>Trichosporon</i> spp.....	66
5.4.5. Análise de recombinação genética da região IGS de <i>Trichosporon</i> spp.	67
5.3.1. Identificação do polimorfismo das sequências da região IGS-1 de <i>T. asahii</i>	70
5.1. Pesquisa de exoenzimas	73
5.5.1. Pesquisa de Proteinase (Aoki et al., 1990; Oksuz et al., 2007).....	73
5.2.2 Pesquisa de fosfolipase (PRICE et al 1982).....	76
5.5.3. Pesquisa de desoxirribonuclease (DNase)	79
5.6. Ensaio de Adesão (Pires, 1993; Taborda, Casadevall, 2002 modificados).....	82
6. DISCUSSÃO	89
7. CONCLUSÕES	107
8. REFERENCIAS BIBLIORAFICAS	109

1. INTRODUÇÃO

1.1. Infecções fúngicas

As infecções fúngicas vêm crescendo como causa importante de morbidade e mortalidade em muitos países (Manuel & Kibbler, 1998; Chagas et al., 2008). O espectro das micoses oportunistas em pacientes imunodeprimidos, como com câncer está mudando rapidamente, não somente com o aumento na freqüência das infecções fúngicas nesta população, mas a sua ocorrência durante o curso da quimioterapia e o reconhecimento de novos fungos como potenciais patógenos (Anaisse et al., 1992).

As micoses invasivas são problemas importantes para as unidades hospitalares, pois requerem a distinção dos fatores relacionados ao hospedeiro ou ambientais, que predispõem o paciente às infecções oportunistas (Lamagni et al., 2001). As infecções fúngicas adquiridas em ambientes hospitalares podem ser originadas da microbiota endógena nos casos de infecções por leveduras ou são transmitidas por profissionais da saúde, fômites ou por via aérea por meio de propágulos fúngicos (Walsh et al., 1990).

A incidência de infecções fúngicas nosocomiais aumentou nos últimos 20 anos por inúmeras razões relacionadas à emergência de novas doenças, ao aumento na utilização de tratamentos imunossupressores, a processos invasivos e o aumento da sobrevivência de pacientes altamente susceptíveis (Pittet & Wenzel, 1995; Beck-Sague & Jarvis, 1993; Cohen ML, 2000).

As infecções fúngicas em pacientes com transplantes de órgãos sólidos representam o principal desafio destes pacientes, estando intrinsecamente

associadas com a morbidade e mortalidade destes indivíduos (Patterson, JE, 1999).

Patógenos clássicos como *Candida* spp. constituem a quarta causa mais comum de infecção nosocomial. *Aspergillus* spp. é o principal agente que causa morte por infecção pulmonar em pacientes transplantados de células hematopoiéticas; Criptococose por *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* é a principal causa de mortalidade atribuída às infecções fúngicas em pacientes infectados com vírus da imunodeficiência adquirida humana (HIV) (Walsh *et al.*, 1990,1992).

Nesse cenário, alguns fungos, especialmente os do gênero *Trichosporon* surgem como patógenos emergentes com altas taxas de morbidade e mortalidade em uma população de imunocomprometidos em expansão (Walsh *et al.*, 2004). Com o aumento expressivo de relatos de casos de tricosporonose invasiva, o gênero *Trichosporon* tem sido frequentemente considerado como a segunda causa de infecções disseminadas ocasionadas por leveduras.

1.2. O gênero *Trichosporon*

O gênero *Trichosporon* Behrend é composto por leveduras anamórficas (Basidiomycota, Hymenomyces, Trichosporonales) não sendo conhecida a fase sexuada. Contudo, a classificação como Basidiomycete é aceita devido a caracteres como composição de carboidratos da parede celular (xilose) e relação Guanina-Citocina (57-60%). Outra característica do gênero *Trichosporon* que corrobora com esta classificação é a presença de septos doliporos (Guého *et al.*, 1993).

Leveduras do gênero *Trichosporon* são microrganismos ubíquos, isto é, apresentam distribuição ampla na natureza, com predominância nos climas tropicais e temperados. O isolamento destas espécies ocorre com maior frequência em materiais ambientais principalmente no solo e madeiras em decomposição. Contudo, podem fazer parte da microbiota permanente do trato gastrointestinal ou colonizantes transitórias da pele e do trato respiratório de humanos (Lussier et al., 2000; Walsh et al., 2004; Chagas et al., 2008).

Estruturas características da micromorfologia do gênero *Trichosporon* são os blastoconídios, medindo $2 \times 4 \mu\text{m}$ e micélio hialino verdadeiro e presença de pseudo-hifas, ambos desarticulados pela presença de artroconídios (Middelhoven et al., 2004). Porém, as identificações de algumas espécies estão relacionadas à presença de outras estruturas micromorfológicas como célula apressória, macroconídios ou conidiação meristemática (De Hoog et al., 2000).

As colônias de *Trichosporon*, em ágar Sabouraud dextrose, apresentam-se com crescimento moderado, de 2 a 7 dias, com coloração variando de branco à creme, com aspecto cerebriforme, pregueado e rugoso. As espécies deste gênero são capazes de assimilar diferentes fontes de carboidratos, além de degradar a uréia.

1.3. Perspectiva histórica do gênero *Trichosporon* spp.

A primeira descrição que deu origem ao gênero *Trichosporon* foi feita por Rabenhorst em 1867, quando cultivou um organismo dos cabelos de uma peruca, denominando-o *Pleurococcus beigelii* (Rabenhorst, 1867). Em 1890, Behrend obteve cultivo de um fungo proveniente de paciente com Piedra branca e classificou-o como *Trichosporon ovoides* (Behrend, 1890).

Há inúmeros trabalhos que relatam a identificação de outras espécies de *Trichosporon*, porém, em 1902 Vuillemin definiu que todas as espécies propostas não passavam de variações de uma mesma espécie que recebeu o nome de *Trichosporon beigelii* (Vuillemin 1902 apud Guého 1992, De Hoog et al., 1992).

Em 1910, Beurmann cultivou um fungo de lesões de pele e denominando-o *Oidium cutaneum* (Beurmann & Gougerot, 1910) que, posteriormente foi renomeado para *T. cutaneum* (Ota, 1926). Por muito tempo, a taxonomia do gênero ficou restrita aos dois nomes considerados sinônimos e muitos micologistas aceitaram que o gênero *Trichosporon* se tratava de uma única espécie e determinaram que o nome mais apropriado fosse *T. beigelii* (Kown-chung, 1992).

A nomenclatura e classificação do gênero *Trichosporon* foi de certa forma negligenciada por décadas e somente foi revisada e recebeu maior consideração dos taxonomistas após o trabalho realizado por Guého et al. (1992) que por meio de técnicas moleculares ofereceu uma nova perspectiva ao táxon, uma vez que os caracteres macro, micromorfológicos e fisiológicos utilizados apresentavam resultados subjetivos e de pouca reprodução devido à heterogeneidade dos isolados.

Pesquisadores franceses, em estudos sobre a seqüência do DNAr subunidade 26-S e reassociações de DNA, identificaram 19 táxons distintos para o gênero *Trichosporon* sendo 13 deles considerados predominantemente sapróbios (*T. aquatile*, *T. bassicae*, *T. cerebriforme*, *T. dulciturum*, *T. faecale*, *T. gracile*, *T. jiroveci*, *T. laibachi*, *T. loubieri*, *T. moniliforme*, *T. montevidense*, *T. pullulans* e *T. sporotricoides*) e seis espécies comuns em doença humana: *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. inkin*, *T. mucoides* e *T. ovoides* (Guého et al., 1992, 1994).

O gênero ainda sofreu uma nova classificação com os trabalhos de Sugita e colaboradores (1994, 1995), quando fizeram uma revisão das espécies, determinando 17 espécies e 5 variedades para o gênero *Trichosporon*. Posteriormente, Sugita et al., (2002) propuseram 25 espécies para o gênero *Trichosporon*, dentre as quais 8 espécies teriam relevância para a clínica médica, incluindo duas espécies emergentes em infecções invasivas: *T. pullulans* e *T. loubieri*.

1.4. Colonização por leveduras do gênero *Trichosporon*

A colonização de áreas corporais por microrganismos depende da capacidade destes em resistir e superar os mecanismos de resistência do hospedeiro. As diferenças estruturais e funcionais de pele de diferentes áreas do corpo influenciam na quantidade e os tipos de microrganismos da microbiota normal de uma área específica (Sidrim & Rocha, 2004).

A colonização da superfície corpórea dos seres vivos pela microbiota fúngica é um evento dinâmico, ou seja, periodicamente, sofre mudanças qualitativas e/ou quantitativas. Essas mudanças decorrem, em grande parte, de fatores ambientais, como, localização geográfica, sanidade e condições climáticas (tempo, temperatura e de exposição à luz ultravioleta) (Araújo et al., 2003). Diversos gêneros fúngicos constituem a microbiota superficial do homem, com predominância das formas leveduriformes, principalmente em indivíduos neutropênicos (Nucci et al., 1995). Os fungos leveduriformes mais comumente isolados são: *Candida* spp. (Oliveira et al., 2006), *Rhodotorula* spp. (Lunardi et al., 2006; Riedel et al., 2007), *Malassezia* spp. (Batra et al., 2005; Tarazooie et al., 2004; Oliveira et al., 2006) e *Trichosporon* spp. (Herbrecht et al., 1993; Guého et al., 1994).

Trichosporon spp. é considerado como microbiota transitória normal da pele humana, especialmente na região perianal. A prevalência de *Trichosporon* na pele da região perigenital foi determinada em 322 voluntários assintomáticos e a taxa de colonização evidenciada foi de 12,4% (Fischman et al., 1980; Ellner et al., 1991).

Alguns autores relatam diferenças marcantes na colonização por *Trichosporon* segundo a idade, sexo e condição social dos pacientes. Stenderup et al. (1986) isolou *Trichosporon* da região anal em 45 (13%) de 343 homens homossexuais. Nenhum dos pacientes do grupo controle foi positivo para cultura destas leveduras. Essa elevada colonização em homens homossexuais foi evidenciada em outro estudo escandinavo (Torssander et al., 1985) sendo descrita por muito tempo como fator importante para a colonização de *Trichosporon* nessa população.

Fungos do gênero *Trichosporon* spp. podem ser isolados de ambiente hospitalar. Infecções do trato urinário por *Trichosporon* foram descritas em pacientes portadores de cateter Foley (Stone et al., 1989), sendo que vários pacientes apresentaram cultura da urina positiva para esse fungo. Investigações revelaram que o sistema de drenagem do cateter urinário estava contaminado.

Leveduras do gênero *Trichosporon* spp. foram isoladas de roupas íntimas (Ellner et al., 1990), fortalecendo a idéia de que o microclima estabelecido, principalmente na região crural, favoreça a colonização humana (Cox and Perfect, 1999). Acredita-se que não ocorra transmissão destas leveduras de homem a homem, revelando assim, a importância da interação entre o estado de portador e fatores predisponentes ao estabelecimento da doença.

Makela e colaboradores (2003) relataram a ocorrência de 18 cepas de *T. inkin* isoladas de secreção vaginal, concluindo que *T. inkin* é encontrado

ocasionalmente em culturas vulvovaginais e usualmente como não patogênico. Essa colonização transitória tende a ocorrer em maior predominância em mulheres afro-descendentes com algum tipo de perturbação na microbiota vaginal (vaginose bacteriana e tricomoníase) e aumento do pH.

As infecções invasivas por *Trichosporon* spp. são geralmente precedidas da colonização do trato respiratório ou gastrointestinal, sendo comum nestes pacientes a presença de cateter venoso em posição central (Walsh et al., 1990; 1992, 2004; Lussier et al., 2000).

1.5. Infecções por *Trichosporon* spp.

1.5.1. Infecções Superficiais

O gênero *Trichosporon* foi criado com a espécie *T. beigelii* para acomodar o agente da micose superficial Piedra branca (Guého et al. 1992). Essa infecção é benigna, assintomática que acomete o pelo, formando nódulos claros dispostos irregularmente, compostos por elementos fúngicos compactados, facilmente destacados do pêlo e não ocorre a invasão dos folículos, mas os pêlos podem, eventualmente, se tornar quebradiços (Guého et al. 1992).

Os nódulos podem ser observados a olho nu nos pêlos da área genital, couro cabeludo, barba e bigode (Avram et al., 1987; Benson et al., 1983; Kalter et al., 1986). Fatores socioeconômicos, higiênicos, sexo e hábitos sexuais são determinantes na prevalência da Piedra branca (Stenderup et al., 1986; Ellner et al., 1993; Trérizol-ferly et al., 1994).

Piedra branca é prevalente nas regiões de clima temperado e tropical, porém existem casos descritos na Escandinava (Stenderup et al., 1986). As leveduras do gênero *Trichosporon* são bem adaptadas para crescerem nas camadas lipídicas mais externas do eixo pilar, sendo o único gênero capaz de produzir estes nódulos característicos. As principais espécies de *Trichosporon* encontradas na Piedra branca são predominantemente *T. inkin* (em pêlos pubianos) e *T. ovoides* (em cabelos) (Rippon, 1988). Intertrigo é um sinal muito observado no sul da Índia, onde as regiões genitocrural e perianal são acometidas, sendo *T. inkin* a espécie mais relacionada a esse tipo de infecção (Herbrecht et al., 1993). Pulvirenti e colaboradores (2006) descreveram uma infecção cutânea superficial com dois anos de evolução em um adolescente imunocompetente, causada por *T. asahii*, evidenciando o caráter patogênico dessa espécie de *Trichosporon*. Outras infecções superficiais também podem ser causadas por *Trichosporon* spp. incluindo onicomicoses e otomicoses (Reirsol, 1955; Fusaro and Miller 1984; Martins et al., 2007). *T. asahii* tem sido descrito como agente causador de quadros de pneumonia alérgica no Japão (Takayoshi et al., 1995; Nishiura et al., 1997; Yoo et al., 1997, Groll & Walsh, 2001).

1.5.2. Infecções invasivas por *Trichosporon* spp.

O gênero *Trichosporon* tem sido relatado como a segunda causa mais comum de infecções por leveduras após o gênero *Candida* em pacientes com doenças hematológicas malignas, casos onde a mortalidade é da ordem de 80%, mesmo com o tratamento com anfotericina B (Flemming et al., 2002; Walsh et al., 2004). O primeiro caso de infecção disseminada por *Trichosporon* (tricosporonose) foi descrito por Watson & Kallichurun (1970) e era proveniente de uma mulher de 39 anos de idade que apresentava câncer no pulmão com metástase cerebral, cuja cultura revelou *T. beigeli*.

A tricosporonose é uma doença fúngica do tipo invasiva acometendo, principalmente, indivíduos imunocomprometidos. As infecções invasivas por *Trichosporon* spp. são geralmente precedidas da colonização do trato respiratório ou gastrointestinal (Walsh et al., 2004) e estão relacionadas, particularmente, às enfermidades hematológicas malignas, como linfomas e leucemias. Pacientes submetidos a transplantes de órgãos, principalmente de medula óssea, por seu estado de profunda depressão imunológica, estão sujeitos às infecções por *Trichosporon* spp. (Tashiro et al., 1995; Kremery et al., 1999). Outros fatores de risco para estabelecimento da infecção são: AIDS, longos períodos com a presença de cateter venoso na posição central, uso crônico de corticosteróides e cirurgias de válvulas cardíacas (Barchiesi et al., 1993; Walsh et al., 1993; Spanik et al., 1995).

Existem duas apresentações clínicas de tricosporonose: localizada e disseminada; a primeira forma é caracterizada por infecções confinadas a um único órgão ou sistema e na segunda apresentação existe a invasão de 2 ou mais órgãos e perpetuação hematogênica. As regiões mais freqüentemente atingidas são as válvulas cardíacas, peritônio, feridas cirúrgicas e sistema nervoso central (SNC) (Cox & Perfect, 1999).

Haupt e colaboradores (1983) estudaram 353 pacientes neutropênicos em decorrência da quimioterapia para tumores hematológicos ou transplantes de medula óssea. Essa investigação evidenciou que 13 (3,7%) destes pacientes desenvolveram culturas positivas para *Trichosporon* spp. nas amostras de pele, fezes e urina. Dois desses pacientes desenvolveram infecções disseminadas por após se tornarem neutropênicos.

Herbrech e colaboradores (1993) ressaltam em seus estudos que 73% dos pacientes apresentavam neoplasias como doenças de base, principalmente,

leucemia aguda e, conseqüentemente, neutropenia induzida pelo tratamento quimioterápico.

Há inúmeros estudos sobre infecções invasivas por *Trichosporon* spp. (Kataoka-Nishimura *et al.* 1998; Kim *et al.*, 2001, Meyer *et al.*, 2002, Yang *et al.*, 2002, Rodrigues *et al.*, 2006), apresentando diferentes quadros clínicos, sendo neutropenia intensa fator comum. Contrariando essa constante, há casos de endocardites consideradas infecções disseminadas, não apresentando neoplasias ou neutropenia como doença de base (Madhavan *et al.*, 1976; Marier *et al.*, 1978; Mogahed *et al.*, 1981; Reyes *et al.*, 1985; Reinhar *et al.*, 1988; Martinez-Lacaza *et al.*, 1991; Keavy *et al.*, 1991).

As manifestações clínicas mais freqüentes da tricosporonose são febre, comprometimento pulmonar e lesões cutâneas. A infecção pulmonar por *Trichosporon* pode estar associada a outros patógenos fúngicos como *Aspergillus* (Saul *et al.*, 1981; Hoy *et al.*, 1986; Walsh *et al.*, 1986) e *Candida* (Hoy *et al.*, 1986; Kimura *et al.*, 1989). O fígado é freqüentemente acometido na tricosporonose, assim como em outras infecções fúngicas, sendo que hematúria, proteinúria, insuficiência renal podem ser observadas (Walsh, 1989). Outros relatos de tricosporonose invasiva foram publicados por Kirmani *et al.*, (1980), Henwick *et al.*, (1992), Kataoka-Nishimura *et al.*, (1998); Kim *et al.*, (2001), Meyer *et al.*, (2002), Yang *et al.*, (2002), Rodrigues *et al.*, (2006). Segundo estes autores a maioria dos pacientes com este tipo de infecção apresentava neutropenia intensa.

Segundo esse cenário, a espécie mais associada a este tipo de infecção invasiva é *T. asahii*, seguido por *T. mucoides* e *T. inkin* (Fleming *et al.*, 2002; Madariaga *et al.*, 2003). Recentemente, evidências clínicas e microbiológicas confirmaram as espécies *T. loubieri* e *T. pulullans* como patógenos humanos e

demonstraram a sua capacidade em causar infecções invasivas (Marty et al., 2003; Lestini and Church, 2006).

Segundo Tashiro et al., (1994) as infecções ocasionadas por *Trichosporon* podem apresentar um diagnóstico difícil, o que reflete subestimação da real incidência desta doença. Na autopsia de 203 pacientes com doenças malignas, a pesquisa, por imunohistoquímica e cortes histológicos, evidenciou a infecção por *Trichosporon* em 7,7% dos casos. Essa infecção é associada com alta taxa mortalidade e prognóstico ruim. Neutropenia ocasionada por quimioterapia citotóxica é o principal fator de risco para a infecção profunda por *Trichosporon* spp. (Ando et al., 1990,1991).

1.5.3. Infecções por *Trichosporon* no Brasil

As infecções por *Trichosporon* spp. no Brasil, especialmente os estudos de casos de Piedra branca, têm sido relatadas desde 1930, quando Fonseca Filho, (1930) publicou trabalho estabelecendo comparações entre as Piedras identificadas na Europa, Ásia e nas Américas.

Segundo Magalhães et al., (2008) o Brasil é o país que apresenta o maior número de casos publicados de Piedra branca genital (Brito & Costa 1966, Londero et al., 1966, Carneiro et al., 1971, Carneiro et al., 1973, Fishman et al., 1980, Zaror et al., 1989, Almeida et al., 1990). Os casos brasileiros de Piedra branca provenientes de pelos do couro cabeludo são originários dos Estados da Paraíba, de São Paulo e do Rio de Janeiro (Carneiro et al., 1971, 1973; Gondim-Gonçalves et al., 1991; Rodriguez Tudela et al., 2000, Pontes et al., 2002^a; Nora et al., 2002; Diniz & Souza Filho, 2005; Roselino et al., 2008). Existem casos descritos de Piedra branca em outras regiões anatômicas, em diversos estados do Brasil, como Pará, Rio Grande do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraíba e

Espírito Santo (Brito & Costa, 1966, Londero et al., 1966, Fischman et al., 1980, Zaror et al., 1989, Roselino et al., 2008, Gondim-Gonçalves et al., 1991, Nora et al., 2002, Pontes et al., 2002a, Pontes et al., 2002a , b, Diniz & Souza Filho, 2005).

Martins e colaboradores (2007) relataram a ocorrência de onicomicoses causadas por *Trichosporon* spp. no Estado de São Paulo. Apesar do elevado número de estudos publicados a identificação da espécie de *Trichosporon* presente nessas infecções não é realizada na maioria das vezes (Pontes, et al., 2002^{a,b}).

Entretanto, trabalhos mais recentes apresentam maior preocupação com a identificação dos isolados, independentes de serem provenientes de origem superficial ou profunda. Roselino et al., (2008) estudaram 5 isolados oriundos do couro cabeludo e identificaram como *T. cutaneum*. Magalhães et al., (2008) estudaram 10 isolados clínicos de Piedra branca genital e do couro cabeludo e identificaram *T. ovoides* como a espécie predominante (7 isolados), seguida por *T. inkin* (2 isolados) e um isolado não foi possível de ser identificado.

Febré e colaboradores (1999) caracterizaram dois isolados de *Trichosporon* oriundos de urina de pacientes internados em centro de tratamento intensivo (CTI) fazendo uso de sonda vesical. Os isolados foram identificados como *T. inkin* e *T. ovoides*, ambos resistentes a anfotericina B. Neves et al., (2002) isolaram uma cepa de cavidade oral que foi identificada como *T. pullulans*.

Em contraste com o grande número de casos superficiais de infecções por *Trichosporon* spp., os episódios de doença invasiva são mais raros ou têm sido pouco diagnosticados ou estudados. Rodrigues *et al.*, (2006) realizaram estudo retrospectivo de 1999 a 2005 em um hospital do Rio Grande do Sul e descreveram 22 casos clínicos de tricosporonoses por *T. asahii*, isolados de 30 amostras

clínicas (23 de urina, 3 de sangue, 2 de líquido de ascite, 1 de líquido de diálise e 1 de líquido pleural).

Moretti-Branchini et al., (2001) descreveram dois casos de tricosporonose invasiva em pacientes transplantados de medula óssea no Hospital das Clínicas da Universidade de Campinas (Unicamp), Estado de São Paulo. Um dos pacientes apresentou cultura de ponta de cateter e swab anal positivos para *T. inkin*. O segundo paciente desenvolveu neutropenia intensa devido à quimioterapia, apresentando em seguida hemocultura positiva em que o isolado foi erroneamente identificado como *Candida* spp. Posteriormente, verificou-se que se tratava de *T. asahii* var. *asahii*.

Chagas-Neto et al., (2008) analisaram infecções de corrente sanguíneas causadas por *Trichosporon* spp. por meio de sequenciamento da região IGS1 dessas leveduras e encontraram *T. asahii* como espécie prevalente, seguida por *T. asteroides*, *T. coremiiforme* e *T. dermatis*.

Recentemente, Ribeiro et al., (2008) realizou a identificação molecular de 21 isolados brasileiros de *Trichosporon* spp. provenientes de urina (n=3), unhas (n=8), sangue (n=3), pele (n=4), mucosa vaginal (n=2) e couro cabeludo (n=1). Destes isolados foram descritas 6 espécies de *Trichosporon*: *T. asahii* foi predominante (43%), seguido por *T. faecale* (24%) e *T. inkin* (14%). Dos isolados de origem profunda, *T. asahii* foi isolado em 83% dos espécimes clínicos, enquanto espécies não-*T. asahii* corresponderam a 17%.

1.6. Terapia associada ao gênero *Trichosporon*.

A terapia antifúngica para as infecções causadas por leveduras do gênero *Trichosporon* é controversa. Anaisse et al., (1992) demonstraram que essas leveduras são resistentes à anfotericina B. Além disso, a atuação fungicida da

droga não tem sido observada em pacientes granulocitopênicos (Walsh et al., 1990).

Testando a suscetibilidade de 39 isolados de *Trichosporon* contra os seguintes antifúngicos: anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e ravuconazol, Paphitou e colaboradores (2002) demonstraram que os MICs (Concentração Inibitória Mínima) para o polieno testado foram relativamente elevados quando comparados àqueles apresentados pelos azólicos, sugerindo uma superioridade em relação à anfotericina B.

Falhas terapêuticas foram relatadas utilizando fluconazol, anfotericina B e combinações de ambas as drogas. Da mesma forma, há relatos de isolados de *T. asahii* naturalmente resistentes à anfotericina B, fluconazol, itraconazol e 5-fluorocitosina (Paphitou et al., 2002; Makimura et al., 2004). Além disso, as equinocandinas apresentam pouca atividade contra *Trichosporon* spp. sendo pouco recomendadas terapêuticamente (Walsh, et al., 2004). Os autores concluíram que os azóis demonstraram maior eficiência do que a anfotericina B e que essa droga é contra-indicada como único princípio para tratamento da tricosporonose (Paphitou et al., 2002).

Estudos sugerem que o perfil de sensibilidade apresenta variações segundo a espécie de *Trichosporon* (Garcia-Martos et al., 2001). *Trichosporon cutaneum*, uma espécie frequentemente associada às infecções superficiais demonstrou suscetibilidade aos antifúngicos: anfotericina B, fluconazol, itraconazol, cetoconazol e 5-fluorocitosina. Por outro lado, outra espécie, *T. mucoides*, mais associada a processos invasivos, mostrou ser resistente à anfotericina B (Garcia-Martos et al., 2001).

Outros pesquisadores trazem a informação de que isolados envolvidos com fungemias, como *T. asahii*, já começaram a demonstrar resistência às

formulações mais modernas como anfotericina B lipossomal e aos triazólicos, como voriconazol, testadas *in vivo* (Bassetti et al., 2004).

Apesar do aumento expressivo dos casos de tricosporonose localizada e disseminada, bem como, os relatos de infecção refratária à terapêutica convencional, estudos sobre a sensibilidade *in vitro* de *Trichosporon* spp. ainda são raros, ocasionando uma quantidade limitada de informação a respeito do tratamento de escolha para essas infecções.

1.7. Diagnóstico e Identificação.

O aumento das infecções oportunistas, com prognóstico ruim, em pacientes imunodeprimidos hospitalizados, implicou em aprimoramento e desenvolvimento de técnicas diagnósticas que apresentassem maior especificidade, sensibilidade e rapidez nos resultados, substituindo ou complementando as técnicas de identificação das espécies de *Trichosporon*, incluindo desde a caracterização morfológica e bioquímica até o uso de ferramentas moleculares.

1.7.1. Identificação fenotípica do gênero *Trichosporon*.

Os métodos fenotípicos são amplamente utilizados em laboratórios de rotina na micologia médica e baseiam-se em características fisiológicas, como assimilação de diferentes fontes de carboidratos, degradação da uréia e caracteres morfológicos (artroconídios, blastoconídios, hifas e pseudo-hifas). Contudo, diversos autores têm relatado a interpretação dos resultados obtidos como subjetiva e variável, demonstrando uma acurácia limitada desses testes (Gueho et al., 1992; Sugita et al., 1994, 1995; Walsh et al., 2004, Chagas et al., 2008).

Segundo Herbrech e colaboradores (1993), as culturas de sangue provenientes de pacientes com tricosporonose constituem um bom método de isolamento de *Trichosporon*, sendo positivas em 79% dos casos revisados. Por outro lado, as culturas de escarro e lavado bronco alveolar foram positivas em menos da metade dos pacientes e as biópsias de pele foram positivas em 18% dos casos.

O teste de látex para antígeno de *Cryptococcus neoformans* pode ser positivo em pacientes com tricosporonose disseminada (Campbell et al., 1985; McManus et al., 1985; Walsh et al., 1990; Melcher et al., 1991). McManus and Jones (1985) descreveram um caso de tricosporonose em paciente transplantado de medula óssea que apresentou teste de aglutinação com látex falso positivo para *Cryptococcus neoformans*. Estudos comprovaram a estreita relação entre os gêneros *Cryptococcus* e *Trichosporon* (Guého et al., 1993). Estes dois fungos têm antígenos em comum, por isso é possível a ocorrência de reação cruzada durante a realização da prova de antígeno polissacarídeo criptocócico em pacientes com tricosporonose (Mcmanus & Jones, 1985; Melcher et al., 1991).

Biópsia de lesão cutânea pode ser uma ferramenta útil para o diagnóstico de tricosporonose, pois 77% de pacientes com lesões cutâneas demonstraram a infecção por *Trichosporon* em exames histológicos ou micológicos, porém a manifestação dessas lesões pode ocorrer de forma tardia, adiando o tratamento (Herbrech et al., 1993).

Neste contexto, deve-se somar às inconsistências de resultados ao déficit de acurácia e especificidade dos métodos de identificação comerciais, sejam eles automatizados ou não.

Os sistemas comerciais de identificação de leveduras mais utilizados na rotina laboratorial podem ser divididos em: **Automatizados** (Vitek System® (BioMérieux Vitek, Hazelwood, EUA); Baxter MicroScan® (Baxter MicroScan, West Sacramento, EUA) e **não automatizados** (API 20C AUX (BioMérieux – Vitek, Inc., Hazelwood, Mo. ; ID 32C (BioMérieux – Marcy l’Etoile – França); RapID Yeast Plus System (Innovative Diagnostic System, Norcross, Ga., EUA). A utilização destes métodos apresenta limitações como a necessidade de provas adicionais (urease e sensibilidade à cicloheximida), realizações de provas de micromorfologia, base de banco de dados limitadas (ainda apresentam identificação pelo táxon extinto = *T. beigeli*) e ainda identificações inconsistentes e incongruências foram relatadas.

1.7.2. Identificação genotípica do gênero *Trichosporon*.

Para resolver esse quadro obscuro na identificação dessas leveduras surgiram métodos moleculares como boa alternativa aos métodos clássicos (fenotípicos), uma vez que apresentam alta reprodutibilidade e objetividade na interpretação dos resultados (Pfaller et al., 1995).

As ferramentas moleculares têm revolucionado especialmente a taxonomia e a epidemiologia das leveduras do gênero *Trichosporon*. A técnica da PCR tem sido a mais promissora, associada ao sequenciamento de regiões conservadas do genoma, representadas por genes ribossomais (Sugita et al., 1997, 1998). Estes genes têm regiões muito conservadas, alternadas por regiões variáveis, ideais para comparações intra-específicas e interespecíficas. Além disso, apresentam múltiplas cópias no genoma, não codificam proteínas, apresentam cópias em “tandem”, podem ser tratadas como um gene único e estão presente em todos os organismos, compartilhando assim uma mesma origem evolutiva (Guarro et al., 1999).

Sugita e colaboradores (1998) realizaram a construção de uma árvore filogenética para as espécies deste gênero, construída a partir da comparação das sequências de nucleotídeos da subunidade menor (small subunit - SSU) e da subunidade maior (large subunit - LSU) do rDNA (DNA ribossomal). Seguindo uma sequência de trabalhos publicados sobre a taxonomia de *Trichosporon* spp., Sugita et al., (1999) sequenciaram os espaçadores transcritos internos (internal transcriber spacer - ITS1 e ITS2) de *Trichosporon* spp. e propuseram 17 espécies e cinco variedades dentro do gênero *Trichosporon*, concluindo que as seis espécies clinicamente relevantes *poderiam* ser identificadas por suas sequências de ITS.

Sugita et al., (2002) determinaram a seqüência da região espaçadora intergênica (intergenic spacer - IGS1) que está localizada entre os genes 26S e 5S do rDNA em 25 espécies de *Trichosporon*. A seqüência da região IGS1 variou em comprimento de 195 pares de base (pb) a 704 pb. A análise comparativa das sequências de nucleotídeos sugeriu que estas variações eram maiores na região IGS1 que as das regiões de ITS. A utilização desta região do rDNA para sequenciamento tem grande potencial como ferramenta diagnóstica e epidemiológica nas tricosporonoses, além de estudos sobre filogenia.

Outro estudo utilizando a região IGS1 foi realizado por Rodriguez-Tudela et al., (2005) onde conseguiram identificar em nível de espécie todos os isolados de *Trichosporon* spp. Entretanto, quando tentaram identificar até a espécie esses mesmos isolados por métodos fenotípicos, não houve equivalência com os resultados obtidos com a identificação por sequenciamento da região IGS1.

1.8. Fatores de virulência

A patogenicidade ou virulência de um microrganismo é definido como sua capacidade de determinar doença, que é mediada por múltiplos fatores. Apesar de certos aspectos da virulência serem determinados geneticamente, eles são expressos pelos microrganismos apenas quando existem condições ambientais favoráveis, tais como teor nutricional, atmosfera de oxigênio e temperatura (Alvares et al., 2007). Essas condições são específicas para cada microrganismo e para cada isolado de determinado agente. Podem variar de hospedeiro para hospedeiro e mesmo entre os diferentes tecidos de um mesmo hospedeiro (Ghannoum & Radwan, 1990).

Hogan e colaboradores (1996) definem fator de virulência em fungos de importância médica como qualquer fator que um fungo possua que seja capaz de aumentar sua virulência em um determinado hospedeiro, destacando como fatores relevantes a habilidade da cepa crescer à temperatura de 37°C e no pH fisiológico, assim como a capacidade de mudar sua morfologia, dependendo do estado de parasitismo, como ocorre nos fungos dimórficos.

As principais propriedades ligadas às células fúngicas que lhes conferem a capacidade de produzir doença incluem adesão a substratos inertes e biológicos, desenvolvimento da forma filamentosa, variabilidade fenotípica (switching), variabilidade genotípica, produção de toxinas e enzimas extracelulares hidrolíticas, variabilidade antigênica, imunomodulação dos mecanismos de defesa do hospedeiro que constituem os fatores mais importantes para o desencadeamento de infecções (Lacaz et al., 2002; Ghannoum and Radwan, 1990). Nenhum deles parece ser responsável individualmente pela patogenicidade, mas há uma combinação de diferentes fatores que atuam em determinadas fases da infecção (Biasoli et al., 2002; Odds, 1998).

A aderência permanente entre o microrganismo invasor e o tecido do hospedeiro compõe o evento inicial na patogênese das doenças infecciosas e requer o estabelecimento de ligações específicas entre estruturas complementares existentes na superfície do patógeno e da célula epitelial (Ghannoum and Radwan, 1990). Entretanto, alguns microrganismos não invasivos permanecem aderidos à superfície hospedeira, enquanto outros utilizam essa adesão como a primeira etapa para a invasão tecidual. Não foi encontrado nenhum estudo de aderência realizado com leveduras do gênero *Trichosporon*.

Outro fator amplamente estudado e bem determinado para a patogênese fúngica é a produção de exoenzimas. Segundo Wain et al., (1964), as infecções causadas por *Candida* spp. estão relacionadas diretamente com a produção de exoenzimas, especialmente proteinases e fosfolipases e, atualmente, elas têm sido consideradas um dos mais importantes fatores de virulência em *C. albicans* (Ghannoum, 2000; Schaller et al. 2003). No gênero *Trichosporon* apenas o trabalho de Dağ & Cerikçioğlu (2006) cita fatores de virulência. Eles estudaram a produção de proteinases ácidas, fosfolipases e esterases, produção de biofilme e as propriedades hidrofóbicas de 48 isolados de *T. asahii* de origem clínica e saprófita encontrando atividade enzimática apenas nos ensaios de esterases.

A análise da atividade enzimática extracelular apresenta extensa colaboração para o esclarecimento de muitos aspectos relacionados com a ecologia e a patogenicidade dos fungos. Esses aspectos foram muito bem estudados no gênero *Candida*, levedura considerada a mais importante em infecções superficiais e invasivas em seres humanos. A pesquisa da atividade de exoenzimas foi estudada em Basidiomycetes como os do gênero *Malassezia* e *Trichosporon* (Naglik et al., 2004; Ichikawa et al., 2004). Apesar das várias pesquisas sobre o papel de fatores de virulência na patogenicidade de *Trichosporon* spp., pouco foi esclarecido, requerendo novas investigações.

2. JUSTIFICATIVA

Segundo o cenário exposto observamos que o gênero *Trichosporon* apresenta uma gama muito extensa de infecções humanas que podem ser refratárias às principais drogas disponíveis comercialmente, tornando-se evidente que há poucas informações disponíveis sobre as características das infecções por este patógeno, principalmente nos hospitais brasileiros. Há, então, a necessidade da realização de estudos que permitam a caracterização do perfil epidemiológico da infecção por *Trichosporon* identificando as espécies mais prevalentes, bem como suas relações entre fatores associados à virulência das espécies que ocorrem em nosso meio.

Dessa maneira, o presente estudo propõe a identificar quais as espécies do gênero *Trichosporon* prevalentes em nosso meio, comparando as técnicas de identificação molecular e fenotípica e as possíveis correlações entre fatores de virulências dos isolados obtidos de colonização de pele de indivíduos normais e de infecções de urina e cateter de indivíduos internados em UTIs.

3. OBJETIVOS

3.1. Investigar a frequência de isolamento das leveduras do gênero *Trichosporon* que compõe a microbiota da pele da região inguino-crural de voluntários sadios do sexo masculino, relacionando-os quanto à idade, etnia, grau de escolaridade e estado civil .

3.2. Identificar as espécies dos isolados de *Trichosporon* spp. obtidas da pele (superficial), urina e cateter (profundos) através de métodos clássicos (fenotípicos) e moleculares (genotípicos).

3.3. Avaliar a os perfis dos fatores de virulência estudados (enzimas extracelulares e ensaio de adesão) nos isolados de origem superficial e profundos.

3.4. Realizar a análise filogenética dos isolados de *Trichosporon* spp. de origem superficial e profunda.

3.5. Analisar o polimorfismo das sequências da região IGS-1 de *T. asahii* e classificar os isolados dessa espécie quanto aos seus biótipos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Origem dos isolados de *Trichosporon* “superficiais” e “profundos”.

4.1.1. Isolamento de *Trichosporon* spp. de origem superficial pela técnica do quadrado de tapete (Mariat & Tapia, 1966).

No período de Abril/2006 a Março/2008 foram coletados materiais de 1004 indivíduos do sexo masculino que compareceram para consultas nos ambulatórios de dermatologia da UNIFESP e do Hospital Heliópolis, São Paulo. Utilizamos como critério de inclusão: indivíduos do sexo masculino e não apresentar lesões de pele na região de coleta. O material biológico foi coletado por fricção de um quadrado de tapete esterilizado (3x3 cm) na região escrotal e perianal. Posteriormente, os carpetes foram pressionados diretamente em placa de Petri, contendo ágar Sabouraud dextrose (caseína 20g/L, dextrose 40 g/l, ágar bacteriológico 15g/L e cloranfenicol 0,05g/L- Difco®, Becton, Dickinson and Company, EUA), a 25°C e observado o crescimento de fungos (Mariat and Tapia, 1966).

4.1.2. Cepas padrão de *Trichosporon* spp.

Ao estudo foram adicionadas cepas padrão, representativas de 5 espécies de relevância clínica do gênero *Trichosporon*: *Trichosporon asahii* (CBS 2530), *Trichosporon asteroides* (CBS 2481), *Trichosporon inkin* (CBS 5585), *Trichosporon mucoides* (CBS 7625) e *Trichosporon ovoides* (CBS 7556) com a finalidade de comparação para os estudos de identificação clássica (bioquímica e morfológica) e moleculares de identificação de espécies. A origem e os sítios de isolamento dessas cepas estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Cepas padrão utilizadas como referência, segundo origem, local de isolamento e espécie.

Nº da Coleção	Origem	Sítio	Espécie
CBS 2530	Brasil	abscesso	<i>Trichosporon asahii</i> var. <i>asahii</i>
CBS 2481	Suíça	Pele	<i>Trichosporon asteroides</i>
CBS 5585	-	Pele	<i>Trichosporon inkin</i>
CBS 7625	Bélgica	Meningite	<i>Trichosporon mucoides</i>
CBS 7556	-	Piedra branca	<i>Trichosporon ovoides</i>

* Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)

4.1.3. Isolamento de *Trichosporon* spp. de origem profunda.

Para os isolados “profundos” foram selecionados isolados de cultura de urina e de cateter de pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTI) dos hospitais acima citados.

4.2. Teste para verificação da pureza das amostras.

A obtenção de culturas puras e isoladas é um passo fundamental na identificação de leveduras. Para descartar uma possível contaminação por outros gêneros de leveduras, especificamente *Candida* spp., todas as amostras foram incubadas em meio cromogênico seletivo CHROMagar *Candida*® (Difco®, Becton, Dickinson Company, EUA) para certificação da pureza do cultivo. Após 48h de incubação a 35°C foram selecionadas as colônias apresentando a mesma coloração, sendo posteriormente cultivadas novamente por 48h de incubação a 35°C, em ágar Sabouraud dextrose (Difco), para posterior identificação.

4.3. Identificação fenotípica e fisiológica dos isolados de *Trichosporon* spp. , segundo Guarro & De Hoog, 2000.

A identificação do gênero *Trichosporon* foi baseada em aspectos micro e macromorfológicos da colônia e na produção de urease em meio de ágar uréia de Christensen.

A identificação em nível de espécie foi baseada em resultados de testes bioquímicos de assimilação de carboidratos (Wickerham, 1951). Para a interpretação do perfil bioquímico das culturas utilizamos as fontes de carbono descrito na tabela 2, que foi elaborada segundo recomendações de Guarro & De Hoog, (2000).

Tabela 2. Chave de identificação das espécies de relevância clínica do gênero *Trichosporon*, segundo parâmetros bioquímicos e morfológicos (Guarro & De Hoog, 2000,).

1a	Crescimento com melibiose como fonte de carbono.....	2
1b	Sem crescimento com melibiose como fonte de carbono.....	3
2a	Tolerante à cicloheximida.....	<i>T. mucoides</i>
2b	Não tolerante à cicloheximida.....	<i>T. cutaneum</i>
3a	Crescimento com myo–inositol e sem crescimento com L-arabinose	<i>T. inkin</i>
3b	Sem crescimento com myo–inositol e crescimento com L-arabinose	4
4a	Colônia com crescimento muito lento e formação de células meristemáticas.....	<i>T. asteroides</i>
4b	Colônia e microscopia com outras características.....	5
5a	Presença de célula apressória nas culturas em lâminas.....	<i>T. ovoides</i>
5b	Ausência de célula apressória nas culturas em lâminas.....	6
6a	Artroconídios em forma de barril ; ausência de células meristemáticas.....	<i>T. asahii</i>
6b	Artroconídio alongado ou células meristemáticas.....	<i>T. asteroides</i>

4.3.1 Avaliação de características morfológicas

4.3.1.1. Estudo macromorfológico

O estudo macromorfológico foi realizado através da obtenção de colônias gigantes em ágar Sabouraud dextrose (Difco®) a 30°C, período de 3 a 5 dias. Analisamos os aspectos de relevo, cor e textura, segundo caracteres macromorfológicos marcantes desse gênero de leveduras, como aspecto cerebriforme e estrias radiais de suas colônias, relevantes para identificação do gênero *Trichosporon*.

4.3.1.2. Estudo micromorfológico

A partir dos cultivos de *Trichosporon* spp. foram feitos microcultivos em lâmina, segundo Lacaz e colaboradores (2002). Com auxílio de alça de platina a colônia de levedura suspeita de *Trichosporon* spp. foi semeada em três estrias paralelas em placa de Petri contendo o meio ágar fubá suplementado com 1% de Tween 80 (fubá 40g, Tween 80 - LabSinth 10mL, água destilada q.s.p. 1.000 mL) com a finalidade de estimular a formação do micélio reprodutivo. As estrias foram cobertas com lamínula estéril e em seguida as placas foram incubadas a 30°C, durante 48-72 h.

Após a incubação, as placas foram observadas ao microscópio óptico (100X e 400X) pesquisando-se por estruturas de reprodução assexuada: blastoconídios, hifas hialinas, artroconídios e presença de célula apressória (Lacaz et al., 2002; Sidrim & Rocha, 2004).

4.3.1.3. Caracterização bioquímica dos isolados (Guarro et al., 2000)

4.3.1.3.1. Prova de hidrólise da uréia

Todas as amostras foram submetidas ao teste de produção de urease em meio ágar uréia de Christensen (**Christensen**, 1946) (Meio base = fosfato de potássio monobásico 2g; cloreto de sódio 5g; vermelho de fenol 12mg; glicose 1g; peptona 1g; ágar bacteriológico 20g - Difco®, EUA e água destilada – q.s.p. 1000 mL, acrescido de dois mL de solução de uréia = 2,2 g- q.s.p. 11 mL). A hidrólise da uréia foi observada através da mudança da coloração do ágar, do amarelo para róseo intenso, indicado pelo vermelho de fenol (indicador de pH) devido à alcalinização do meio de cultura (Lacaz, et al., 2002; Sidrim & Rocha, 2004). Cepas de referência (CBS 2530) e de *Geotrichum* spp. foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

4.3.1.3.2. Assimilação de carboidratos (auxanograma) (Lodder & Kreger-Van-Rij, 1970).

Neste teste fisiológico avalia-se a capacidade do microrganismo utilizar variadas fontes de carbono como fonte de energia. Foi utilizado o meio de cultura denominado - meio C (sulfato de amônio 5 g; fosfato de potássio monobásico 1 g; sulfato de magnésio 0,5 g; ágar bacteriológico 20 g - Difco®, EUA e água destilada – q.s.p. 1000 mL) destituído de qualquer fonte de carbono. Neste meio base adicionou-se uma suspensão da levedura a ser testada, com turbidez previamente ajustada à escala nº 0,5 de McFarland. Após a solidificação do meio, pequenas alíquotas de diferentes açúcares (dextrose, L-arabinose, sorbitol, melibiose, Myo-inositol) foram adicionadas em pontos distintos da placa. Para controle positivo do teste utilizou-se dextrose. As placas de Petri foram incubadas a 30°C e as leituras foram realizadas a cada 24 horas, por um período de até uma semana.

A leitura foi feita pela presença de halo de turbidez resultante do crescimento e indica prova de assimilação positiva para a cada substrato adicionado (Lacaz et al., 2002; Sidrim & Rocha, 2004). Os resultados foram analisados e comparados. (Ver a tabela 02 preconizada por De Hoog & Guarro, 2001).

4.3.1.3.3. Testes de sensibilidade à temperatura e à cicloheximida.

Testes adicionais foram realizados com todas as amostras, como a capacidade de crescimento na temperatura de 37°C e a sensibilidade dos isolados à presença de cicloheximida na concentração 0,1% presente no meio de ágar Sabouraud dextrose (Difco®).

4.4. Identificação de leveduras do gênero *Trichosporon* por técnicas moleculares.

Para realização destes ensaios foram selecionados isolados representativos dos dois grupos, sendo, 39 de origem superficial (colonização) e 26 isolados profundos, sendo 22 originários de infecção urinária e 04 isolados de cateteres, e cinco cepas de referência (CBS) totalizando 70 amostras. Todas as amostras foram previamente identificadas por métodos bioquímicos e identificadas por métodos moleculares para confirmação da identificação de espécie e análise filogenética.

4.4.1. Extração do DNA genômico de amostras de *Trichosporon spp.*

Todos os isolados selecionados foram semeados em estrias em placas de Petri para obtenção de unidade formadora de colônia (UFC). Apenas uma unidade formadora de colônia (UFC) de cada levedura foi semeada em placa de ágar Sabouraud dextrose e incubada a 30° C, durante 48 horas.

Em seguida, os isolados foram cultivados em 100 mL de meio caldo YPD a 30°C, sob agitação constante de 50 rpm, por 24 horas, para a obtenção de um pré-inóculo. Deste pré-inóculo, 100µl foram transferidos para 2 mL de caldo YPD, incubado por 12 horas sob agitação orbital constante de 70 rpm, constituindo um segundo pré-inóculo com a finalidade de obter a maior quantidade possível de células leveduriformes jovens e, conseqüentemente, mais fáceis de romper a parede celular.

Na extração de DNA genômico de *Trichosporon spp.* utilizamos o protocolo de isolamento rápido e em pequena escala descrito por Wash e colaboradores (1994), com algumas alterações. Para esse procedimento foram transferidos 1,3 mL do pré-inóculo nº2, para um tubo cônico de 1,5 mL (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e centrifugados a 6.000 rpm, por 3 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas em 1 mL de água milli-Q esterilizada por duas vezes sob as mesmas condições de centrifugação descritas. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi removido e as células homogeneizadas em 200 µL de tampão protoplasto (100 µL de Tris-HCl 100mM pH 7,5; 20µL de EDTA 10mM; 2µL de Zymolyase 0,2mg/mL; 10µL de β Mercaptoetanol 10 µg/mL e 870 µL de água MiliQ) e incubadas por 2 horas a 37°C, agitando-se os tubos a cada 30 minutos.

Decorrido o tempo de incubação, as amostras foram homogeneizadas e adicionados 200 μ L de solução de lise (20 μ L NaOH 10N; 880 μ L água MilliQ; 100 μ L de SDS 10%; Proteinase K a 20mg/mL) e incubadas por 20 minutos a 65°C. Em seguida foram resfriadas rapidamente no gelo. Para precipitar as proteínas e os restos celulares foram adicionados 200 μ L de acetato de potássio 5M, pH 5,4 e incubados por 15 minutos no gelo. A suspensão foi centrifugada em velocidade de 15000 rpm por 3 minutos e o sobrenadante transferido para outro tubo de microcentrifugação (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

Ao sobrenadante foram adicionados 0,6 mL de isopropanol (Merck®), ou seja, para cada 500 μ L de centrifugado obtido eram adicionados 300 μ L de isopropanol e misturados gentilmente por inversão e incubados à temperatura ambiente, por 12 horas. Após a centrifugação por 5 minutos à velocidade de 15000 rpm o sobrenadante foi descartado e adicionado 1mL de etanol (Merck®) a 70% ao precipitado, homogeneizado e misturado por inversão, incubado à temperatura ambiente, por 10 minutos e novamente centrifugado por 10 minutos à velocidade de 15000 rpm. A lavagem com etanol a 70% foi repetido e o precipitado seco por 10 minutos foi submetido ao tratamento com RNase.

4.4.2. Tratamento do DNA com RNase

Para a purificação do DNA foi adicionado 98 μ L de água milli-Q esterilizada, 1 μ L de Tris-HCl 1 M pH 7,5 e 1 μ L de RNase a 10 mg/mL (MPbio, Qbiogene, EUA) e colocados em banho-maria a 37° C por 1 hora. O DNA foi precipitado com a adição de 10 μ L de acetato de sódio 3M e 220 μ L de etanol absoluto gelado.

A suspensão foi homogeneizada e incubada por 10 minutos em gelo e centrifugada a 15.000 rpm, por 15 minutos, a 4° C. Após, sobrenadante foi desprezado e adicionados 500 μ L de etanol 80% para retirar o excesso de sal. Em seguida, foi centrifugado novamente, como acima, o etanol evaporado e o

precipitado seco por 10 minutos. A dissolução completa do precipitado foi realizada em 50 μ L de milli-Q esterilizada.

4.4.3. Quantificação do DNA por espectrofotometria

Cinco (5) μ L de DNA foram adicionados a 995 μ L de água bidestilada e realizada leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm para verificar a razão (260/280) entre os valores obtidos. Segundo Sambrook e colaboradores (1989), a absorvância igual a 1,0 contém concentração aproximada de 50 μ g/mL de DNA de dupla fita. A absorvância em 280nm de comprimento de onda também foi medida para verificar a presença de proteínas e calcular a pureza do DNA. A razão entre as leituras DO_{260}/DO_{280} permitiu uma estimativa da pureza do DNA e essa razão deve se manter entre 1,8 a 2,0. A razão abaixo de 1,6 indica grande quantidade de proteínas e contaminantes e na sua ocorrência a extração deve ser realizada novamente. Algumas amostras foram ainda quantificadas por visualização em gel de agarose corado com brometo de etídio onde foram usados marcadores “Low” e “High DNA Mass Ladder” (Gibco, BRL).

4.4.4. Regiões amplificadas e oligonucleotídeos para identificação molecular

A escolha dos oligonucleotídeos utilizados baseia-se na sua descrição na literatura, sua reprodutibilidade e, principalmente, sua capacidade de identificação final em nível de espécie dos isolados de *Trichosporon*. Duas regiões do DNA ribossomal (DNAr) têm recebido amplo destaque na taxonomia do gênero *Trichosporon* e foram selecionadas para identificação dos nossos isolados: região do Espaçador Interno Transcrito (ITS - “Internal transcribed Spacer”) (Sugita et al., 1995; 1997; 1999) e região Espaçadora Intergênica 1 (IGS-1 - “Intergenic Spacer”) (Sugita et al., 2002; Rodriguez-Tudela et al., 2005).

Os oligonucleotídeos pITS-F (**GTC GTA ACA AGG TTA ACC TGC GG**) e pITS-R (**TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC**) específicos para as regiões ITS-1 e ITS-2 do gênero *Trichosporon* preconizados por Sugita e colaboradores (1999) foram utilizados por sua capacidade de identificar, por sequenciamento direto do produto de PCR, 17 espécies e 5 variedades do gênero *Trichosporon* e possibilitar a montagem de árvores filogenéticas dessas espécies.

O segundo par de oligonucleotídeos 26SF-(IGS1-26SS) (**5' -ATC CTT TGC AGA CGA CTT GA- 3'**) e 5SR -(IGS2-58S) (**5-AGC TTG ACT TCG CAG ATC GG-3**), preconizados por Sugita e colaboradores (2002) são específicos para o gênero *Trichosporon*, amplificam a região IGS1 do rDNA e foram utilizados para confirmar a identificação da espécie.



Figura 1. Representação esquemática do locus do DNA ribossomal de *Trichosporon* spp. Os retângulos pretos indicam regiões transcritas funcionais e a região dos espaçadores internos transcritos (ITS) e a região dos espaçadores intergênicos (IGS) são evidenciados pelas setas. Adaptada de Sugita e colaboradores (2002).

4.4.4.1. Oligonucleotídeos internos para região IGS-1

Para as reações de sequenciamento da região IGS-1 foram desenhados mais dois pares de oligonucleotídeos com localização de anelamento de aproximadamente 200 pares de bases mais internos aos oligonucleotídeos descritos no item 4.4.4, visando melhorar a qualidade dos sequenciamentos, especificamente na região central das sequências.

O primeiro par de oligonucleotídeos foi desenhado utilizando-se o programa Primer3plus (Compbio/UNIFESP) com a sequência: pIGS-F (**AAG CTA CAA AGT TGG AAG GAT G**) e pIGS-R (**AGC TCT CAA CTC TGA CTT CAC AT**) específicos para as regiões IGS-1 do gênero *Trichosporon*. O segundo par de oligonucleotídeos foi desenhado pelo Prof. Dr. Marcelo Briones, tendo como base a sequência anterior, com algumas alterações para aumentar a estabilidade do oligonucleotídeo pIGS-MB-F (**CAA AGC TAC AAA GTT GGA AGG ATG**) e pIGS-MB-R (**GAT GTG AAG TCA GAG TTG AGA GCG T**).

4.4.4.2. Reação da polimerase em cadeia (PCR)

Para obtermos a amplificação das regiões descritas acima foram realizadas reações de PCR utilizando tubos de microcentrifugação de 0,2 mL de capacidade com os seguintes componentes: 25µL de PCR Master Mix 2X, PROMEGA [*Taq* DNA polimerase 50u/mL - Invitrogen; deoxinucleotídios (dATP,dGTP,dCTP,dTTP, 400µM cada); MgCl₂ 3mM] 1µL de cada oligonucleotídeo na concentração inicial de 100 pmol/µL; 2µL do DNA diluído a 40ng/µL, 22µL de água milli-Q esterilizada, totalizando um volume de 50µL.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (Amplifon II, Thermoline) segundo seguintes programas: para os oligonucleotídeos pITS-F

e pITS-R foram utilizados os seguintes ciclos de PCR: ciclo de desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos a 94° C – 30 segundos (desnaturação); 57° C – 30 segundos (hibridização); 72°C – 45 segundos (extensão). Para o ciclo de extensão final foi utilizada a temperatura de 72° C por 10 minutos, conforme protocolo sugerido por Sugita e colaboradores (1999).

Para os oligonucleotídeos foram utilizados os seguintes ciclos de PCR: ciclo de desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos seguidos de 30 ciclos de 30 segundos cada a 94°C – 1 minuto (desnaturação); 57°C - 1 minuto (hibridização); 72°C - 1 minuto (extensão). Para o ciclo de extensão final, foi utilizada a temperatura de 72°C por 10 minutos. Para ambas as reações de PCR utilizando os dois diferentes pares de oligonucleotídeos, o termociclador foi resfriado para 4°C até a retirada das amostras do aparelho. Os produtos de PCR foram visualizados em géis de agarose com brometo de etídio, sob luz UV.

4.4.4.3. Eletroforese de DNA em gel de agarose

Para preparação do gel, a agarose (Ultra Pure Agarose-Invitrogen) foi preparada na concentração de 1,0% (w/v) dissolvida em solução tampão Tris bórico EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 0,5X (TBE – 90 mM Tris base; 90 mM ácido bórico; 2 mM EDTA bisódico) e dissolvida por aquecimento. Posteriormente ao resfriamento do meio a 60°C foram adicionados 3µL de brometo de etídio (0,5ug/mL) – (USB Corporation, Cleveland, EUA), a cada 100 mL de agarose dissolvida em TBE. As amostras de DNA foram coradas com 2µL de Orange G (0,01%) (Sigma Chemical - EUA). Para estimativa do tamanho das bandas de DNA, marcadores de peso molecular (100 pb, INVITROGEN) foram corridos paralelamente às amostras a serem testadas (2µL de solução contendo peso molecular; 2µL de Orange G e 8µL de H₂O miliQ). Foram adicionadas 10µL da reação diluída a cada orifício do gel, sendo o mesmo submetido à corrente elétrica de 80 volts, por 3 horas.

4.4.4.4. Reação de sequenciamento de nucleotídeos

Os produtos de PCR foram sequenciados pelo método de terminação de cadeia por dideoxynucleotídeo (Sanger et al., 1977) modificado para sequenciamento, utilizando terminadores de cadeia dideoxynucleotídeos fluorescentes BigDye™ utilizando-se o sequenciador automático ABI PRISM ABI 3100 Sequencer (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA).

A reação de sequenciamento foi realizada em placas contendo 96 poços (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA). Os produtos de PCR foram diluídos a 1:3, acrescentando-se 40 µL de água MiliQ por reação. A cada poço foram adicionados 6µL do produto de PCR de cada isolado testado, 1,6 pmoles/µL acrescidos de 2µL de tampão “Save Money” (2,5X), 2µL de BigDye™ v3 e o volume foi completado para 10 µL.

A reação foi realizada com desnaturação inicial a 95° C por 4 minutos, seguindo o programa: 96°C por 5 minutos, seguido por 25 ciclos de 96°C (desnaturaç o) por 10 segundos, 50°C por 10 segundos (hibridizaç o) e 60°C por 4 minutos (extens o). Para o ciclo de extens o final foi utilizada a temperatura de 72° C por 10 minutos. Os mesmos oligonucleot deos descritos na rea o de PCR foram utilizados para rea o de sequenciamento.

4.4.4.5. Precipita o dos produtos de PCR

Essa etapa do sequenciamento tem por objetivo livrar o material a ser sequenciado dos deoxinucleot deos n o incorporados e sais que restaram da rea o de sequenciamento que podem interferir de maneira prejudicial na migra o e leitura do material.

Ao t rmino do programa descrito no item anterior foram adicionados   rea o de sequenciamento 8µL de  gua MiliQ e 32 µL de etanol 100%, deixado

precipitar por 15 minutos e a placa centrifugada por 45 minutos a 4000 rpm. Decorrido o tempo de centrifugação a placa foi invertida e repetida a centrifugação a 500 rpm, por 30 segundos. Posteriormente, adicionou-se 150µL de etanol 70% e a placa foi novamente centrifugada por 15 minutos a 4000 rpm. A placa foi invertida e centrifugada novamente a 500 rpm por 30 segundos e, por fim, seca por 1 minuto a 90°C no termociclador.

O precipitado foi ressuspenso em 10 µL de formamida HI-DI e desnaturado por 5 minutos a 90°C, seguido de incubação em gelo por 5 minutos e submetido à corrida eletroforética. A análise cromatográfica foi feita em aparelho de sequenciamento *ABI 3100 Sequencer (Applied Biosystems®*, Foster City, CA, USA) segundo normas do fabricante para uso do conjunto “BigDye terminator” para sequenciadores por detecção da fluorescência. Os dados de sequenciamento são automaticamente coletados utilizando-se o programa Data Collection v1.0.1 (Applied Biosystems) gerando cromatogramas para cada sequência.

4.5. Análise filogenética dos sequenciamentos

A inferência filogenética é um procedimento de estimativa, onde deve ser escolhida a suposta melhor historia evolutiva com base em informações incompletas, uma vez que geralmente analisamos apenas sequências contemporâneas.

4.5.1. Montagem das sequências consenso (“contigs”)

Os cromatogramas obtidos das reações de sequenciamento com os oligonucleotídeos iniciadores das regiões ITS e IGS foram processados pelo programa Phred (Ewing et al., 1998a; Ewing et al., 1998b). Este programa realiza a identificação das bases nucleotídicas levando em conta a intensidade

do sinal, espaçamento entre picos e o espectro de emissão de cada fluoróforo e gera um escore. Esse escore é utilizado pelo programa Phrap para montagem das sequências consenso (“contigs”) com um escore associado. O programa Phrap foi utilizado para montagem de sequências de DNA uma vez que ao invés de determinar uma sequência consenso a partir das parciais ele constrói um mosaico utilizando as regiões de melhor qualidade de cada uma das fitas sequenciadas. As montagens foram inspecionadas utilizando-se o Consed (Gordon et al. 1998). O programa Consed permite visualizar e editar as montagens das sequências consenso feitas pelo Phrap.

4.5.2 Alinhamento das sequências com o programa Clustal W.

Em posse das sequências necessárias à construção das árvores filogenéticas foi realizado o alinhamento múltiplo das sequências, utilizando para tanto o programa Clustal W (Thompson et al., 1994, Higgins and Sharp, 1988). Para a inferência das filogenias foram construídos 3 alinhamentos, um para a região IGS, outro para a ITS e um último somente com as sequências de IGS dos isolados identificados como *T. asahii*. As sequências utilizadas nos alinhamentos que não foram geradas neste trabalho estão na tabela 03.

4.5.3. Métodos de Inferência filogenética.

Uma das etapas do processo de inferência filogenética é a definição de critérios para comparar filogenias alternativas na busca pela melhor árvore. Após a definição do modelo, o método é o fator que mais influencia a robustez das filogenias. Os diferentes métodos fazem diferentes pressupostos sobre o processo evolutivo.

Relações filogenéticas entre *taxa* são usualmente representadas por uma árvore filogenética. Tais árvores são normalmente computadas a partir de métodos como a parcimônia, distância, máxima verossimilhança e método bayesiano.

Esses métodos modelam a evolução de um gene baseado na premissa que o processo é dominado por dois tipos de eventos, mutação e especiação e geram árvores bifurcadas. Ao analisarmos relações intra-específicas em que a divergência é recente espera-se que os haplótipos ancestrais ainda estejam presentes na população. Como um único haplótipo ancestral pode dar origem a vários haplótipos descendentes, politomias reais podem ser encontradas.

Cenários evolutivos que envolvem eventos reticulados como hibridização, transferência lateral e recombinação não são bem descritos por árvores dicotômicas e nesses casos redes filogenéticas devem ser utilizadas (revisado por Huson e Bryant, 2006). Os métodos de genealogias em rede, implementados pelo programa SplitsTree (Huson, 1998), permitem a persistência de nós ancestrais, politomias e reticulações originadas por homoplasias.

O método utilizado em nosso trabalho foi "*split decomposition*", onde qualquer tipo de dado pode ser particionado em conjunto de sequências, ou *splits*. Pode-se construir uma rede combinando esses *splits* sucessivamente. Cada *split* irá definir um ramo conectando as duas partições delimitadas pelo *split*. Esse método foi o escolhido, pois permite o uso de modelos de substituição e pode ser avaliado pelo bootstrap. Outro método relevante para a análise das relações intra e interespecíficas é o método bayesiano implementado pelo MrBayes (Huelsenbeck e Ronquist, 2001).

Tabela 03. Sequências de ITS e IGS de *Trichosporon* e *Cryptococcus* que não foram obtidas pelo presente trabalho.

Espécie	Região do Ribossomal	Número de acesso no GenBank	Número da sequência no alinhamento
<i>T. inkin</i> CBS5585	ITS	AF444420	071
<i>T. inkin</i> CBS5585	IGS	EU934804	071
<i>T. asteroides</i> CBS2481	ITS	AF444416	072
<i>T. asteroides</i> CBS2481	IGS	AB081515	072
<i>T. debeurmannianum</i> CBS1896	ITS	AB035571	073
<i>T. debeurmannianum</i> CBS1896	IGS	AB066411	073
<i>T. dermatis</i> CBS2043	ITS	AY143557	074
<i>T. dermatis</i> CBS2043	IGS	AB066412	074
<i>T. coremiiforme</i> CBS2482	ITS	AF444434	075
<i>T. coremiiforme</i> CBS2482	IGS	AB066406	075
<i>T. ovoides</i> CBS7556	ITS	AF444439	076
<i>T. asahii</i> genótipo 1	IGS	EU934801	078
<i>T. asahii</i> genótipo 2	IGS	AB713831	079
<i>T. asahii</i> genótipo 3	IGS	EU934803	080
<i>T. asahii</i> genótipo 4	IGS	EU938046	081
<i>T. asahii</i> genótipo 5	IGS	AB071386	082
<i>T. asahii</i> genótipo 6	IGS	AB180192	083
<i>T. asahii</i> genótipo 7	IGS	AB180193	084
<i>Cryptococcus amylolentus</i> CBS6039	ITS	AF444306	077
<i>C. neoformans</i> CBS132	ITS	AF444326	078
<i>C. heveanensis</i> CBS569	ITS	AF444301	079
<i>C. gatti</i> CBS6956	IGS	AJ300905	076
<i>C. neoformans</i> CBS132	IGS	AJ300905	077

O método bayesiano utiliza-se da máxima verossimilhança (ML – *maximum likelihood*) que é dada não pela busca da árvore que maximize o valor da verossimilhança dos dados observados, mas sim pela procura de árvores que maximizem a verossimilhança dos dados, ou seja, o alinhamento. Nele, a probabilidade *a priori* de uma filogenia é combinada com a verossimilhança produzindo uma probabilidade *a posteriori*, a qual pode ser interpretada como sendo a probabilidade da árvore estar correta. Este método utiliza a cadeia de Markov – Monte Carlo para “procurar” no espaço das árvores possíveis qual aquela que maximiza o valor da probabilidade *a posteriori* (Huselbeck & Ronquist, 2001, Larget & Simon, 1999).

Para verificar a robustez dos clados inferidos pela genealogia em rede e pelo método bayesiano foi feita a análise do *bootstrap*. Os parâmetros foram reestimados para 1000 pseudo-réplicas de *bootstrap*. Esse método consiste em gerar várias pseudo-réplicas dos dados originais com variações aleatórias para verificar o grau de suporte que as sequências fornecem para os clados. A partir de cada pseudo-réplica é feita uma nova inferência e após várias repetições do processo, contam-se quantas vezes o grupo testado apareceu. Se mais de 95% das árvores ou redes apresentarem o grupo, este é considerado significativamente sustentado (Felsenstein, 1988).

4.5.4. Modelo de substituição de nucleotídeos.

O modelo de substituição de nucleotídeos ideal para as amostras em investigação bem como os parâmetros do modelo foram estimados usando o teste hierárquico de verossimilhança com correção de Bonferroni implementado pelo programa Modeltest (Posada & Crandall, 1998). O programa utiliza os testes de quociente de verossimilhança (Likelihood Ratio Test) para realizar diversas comparações sucessivas entre modelos hierárquicos, de forma a encontrar o modelo mais simples que melhor represente os dados analisados. A análise pelo programa Modeltest não só forneceu o modelo ideal para as

amostras que se deseja analisar, como também os parâmetros que serão utilizados no programa SplitsTree que constrói a genealogia em rede.

Para as inferências no MrBayes foi utilizado como *input* inicial o modelo de substituição de nucleotídeos GTR (“*general time-reversible*”) com distribuição gamma.

4.6. Estudo de fatores associados à virulência *in vitro* das leveduras do gênero *Trichosporon*.

O estudo de fatores de virulência foi realizado com os isolados de *Trichosporon* por meio dos testes de produção de enzimas extracelulares (DNAse, proteinase e fosfolipase) e capacidade de adesão às células epiteliais. A cepa de *T. asahii* (CBS 2530) descrita na tabela 1 foi utilizada como padrão para os testes citados, por ter a mesma origem dos isolados em estudos e pertencer a uma coleção internacional.

4.6.1. Pesquisa de exoenzimas

4.6.1.1. Proteinase (Aoki et al., 1990; Oksuz et al., 2007)

Para esse ensaio utilizou-se o meio base ágar proteinase (60 mL de uma solução contendo 0,04g MgSO₄, 7 H₂O, 0,5g K₂HPO₄, 1g NaCl, 0,2g extrato de levedura, 4 dextrose e 0,5g albumina de soro bovino - BSA (fração V; Sigma Chemical, USA) com pH ajustado para 3,5, utilizando-se HCl [1N] como preconizado por Aoki et al., (1990). Essa solução foi esterilizada por filtração e adicionou-se 140 mL de solução ágar (10g/L) previamente autoclavada.

Os isolados de *Trichosporon* spp. eram sub-cultivados em meio ágar Sabouraud dextrose (Difco®), por 48 horas e, posteriormente, inoculados em pontos equidistantes nas placas.

Os testes foram realizados em duplicata e todas as medições foram realizadas em dois planos perpendiculares e as médias dessas duas medições foram utilizadas (Figura 2). Os isolados permaneceram incubados a 37°C, durante oito dias. A presença da enzima foi observada pela formação de uma zona opaca ao redor da colônia da levedura (precipitação de cálcio) e a atividade enzimática foi medida pela técnica de Price e colaboradores (1982) modificado. Durante a realização dessa investigação optou-se pelo cálculo de PZ, dividindo-se o diâmetro do halo de precipitação (dh) pelo diâmetro da colônia (dc) obtendo um uma correlação mais natural entre o número e a atividade enzimática, ou seja:

$$PZ = \frac{\text{diâmetro do halo de precipitação (dh)}}{\text{diâmetro da colônia (dc)}}$$

De acordo com esse sistema, quanto maior o valor de PZ, maior a atividade enzimática; PZ <0,33 significa que a amostra não apresenta atividade da enzima analisada. Quanto maior o valor de PZ, maior a atividade enzimática da amostra, e assim os resultados podem ser apresentados na tabela 04, juntamente com as representações gráficas da atividade enzimática.

Tabela 04. Classificação da atividade enzimática segundo Price et al. (1982), modificado.

Valores de PZ	Atividade enzimática
$Pz > 0,99$	Produtoras muito fortes
$0,99 < Pz > 0,8$	Produtoras fortes
$0,8 < Pz > 0,6$	Produtoras moderadas
$0,6 < Pz > 0,3$	Produtoras fracas
$Pz < 0,3$	Não produtoras

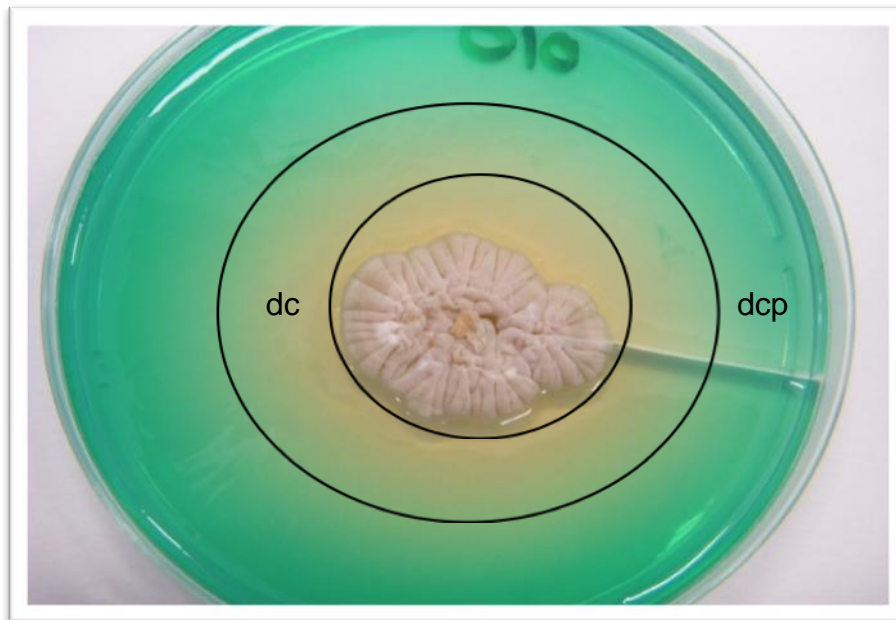


Figura 02. Ilustração das medições da atividade enzimática (Pz). Diâmetro da colônia (dc) ; Diâmetro da colônia mais a zona de precipitação (dcp).

4.6.1.2. Pesquisa de fosfolipase (Polak, 1992; Price et al., 1982)

Para a detecção da atividade enzimática de fosfolipase foi utilizado o meio ágar-fosfolipase (dextrose 40g; ágar 16g; cloreto de Sódio (NaCl) 1M 58,44g; cloreto de Cálcio (CaCl₂) 5mM 0,735g e q.s.p. de H₂O destilada 1L). O meio base, após autoclavado, era colocado em banho-maria a 60°C. Após a temperatura estabilizar adicionava-se 80 ml da emulsão de gema de ovo estéril (egg yolk - Sigma/Fluka), procedia-se a homogeneização das duas soluções e vertia-se 20 ml por placa de Petri, sob fluxo laminar e deixados solidificar por alguns minutos.

Amostras de *Trichosporon* spp. foram crescidas previamente por 48 horas em ágar Sabouraud dextrose (Difco®) e então inoculadas em pontos equidistantes nas placas de ágar-fosfolipase. Os testes foram realizados em duplicata e todas as medições foram realizadas em dois planos perpendiculares (x e z, figura 2) e as médias dessas duas medições foram utilizadas. A presença da enzima foi observada pela formação de halo branco em contraste com o meio de cultura e ao redor da colônia da levedura. A atividade enzimática foi analisada segundo Price e colaboradores (1982) e foram consideradas como produtoras de fosfolipase as amostras que, assim como o controle positivo foram capazes de produzir um halo opaco. A cepa de *C. albicans* (ATCC 90028) foi utilizada como controle positivo do teste (Price et al., 1982).

4.6.1.3. Pesquisa de desoxirribonuclease (DNase)

Os isolados de *Trichosporon* com 24 horas de crescimento foram semeados em meio comercial DNase com corante verde de metila (DNA test Agar - Difco®) e incubados a 37°C, por 7 dias. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Após cultura em meio contendo ácido desoxirribonucléico pesquisa-se a presença da enzima pela produção de um halo transparente ao redor da colônia em contraste com o restante da placa que apresenta coloração esverdeada devido ao corante. A ausência do halo indica teste negativo. A medição do halo seguiu os mesmos parâmetros dos outros testes enzimáticos já mencionados.

4.7. Ensaio de Adesão (Pires, 1993; Taborda & Casadevall, 2002 modificados)

Para o ensaio de adesão foram utilizadas as 70 amostras de *Trichosporon*, selecionadas para a identificação molecular.

4.7.1. Cultivo e preparo de células HeLa

Células HeLa (carcinoma de ovário humano) foram cultivadas em meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e outros complementos como bicarbonato de sódio, a 37° C, em estufa com 5% de CO₂. Quando as células estavam semi-confluentes o meio era aspirado e as células lavadas com PBS. As células foram removidas da garrafa de cultura com auxílio de uma solução de PBS contendo EDTA (2%). Após suspensão das células, o EDTA foi inativado com meio RPMI adicionado de 10% de SFB. O volume total foi transferido para tubo Falcon e centrifugado por 5 minutos a 1500 rpm. O meio foi removido do tubo por aspiração e o sedimento ressuspenso em 3 mL de PBS, pH 7,2.

A contagem das células foi feita em câmara de Neubauer com auxílio de uma solução de Azul-Tripan. Nesta técnica, as células mortas apresentam-se na cor azul, pois, o aumento da permeabilidade da membrana possibilita a entrada do corante, o que não ocorre com as células viáveis. Para determinação do número total de células, aquelas viáveis presentes nos quatro quadrantes da câmara eram contadas e o número dividido por 4. Os valores resultantes eram multiplicados por 10^4 para obtenção do número de células/mL. Após determinação do número de células HeLa foram preparadas suspensões contendo 4×10^4 células. Esse número foi escolhido através de teste piloto realizado previamente, por formar monocamada com melhor confluência para os ensaios de adesão.

4.7.1.1. Preparo das monocamadas de células HeLa

Para o ensaio de formação da monocamada foram utilizadas placas de poliestireno com 24 poços (Corning). Uma suspensão de 200 μ L de células HeLa em meio RPMI com 10% de SFB, contendo 4×10^4 células, foi adicionado por poço. Os experimentos foram realizados em triplicata, assim para cada isolado testado eram preparados três poços. As células foram incubadas durante 18 horas a 37° C, em estufa com 5% de CO₂.

4.7.2. Preparo e incubação do inóculo de *Trichosporon spp*

O inóculo de levedura para o teste foi preparado a partir da cultura estoque, repicada em ágar Sabouraud dextrose (Difco®) incubada por 18 horas, a 37° C. Quatro alçadas da cultura foram inoculadas em Sabouraud glicose caldo por 18 horas, a 37° C. O meio foi, então, centrifugado por 10 minutos a 2000 rpm e o sedimento lavado em PBS. Esse procedimento foi repetido 3 vezes. O depósito celular foi ressuspenso em 3 mL de PBS, pH 7,2 e o número de células determinado por microscopia ótica em câmara de Neubauer.

Em experimento prévio havia sido determinado que o inóculo que melhor favorecia a contagem de leveduras era aquele de proporção 2,5 células HeLa para uma levedura (2,5:1). Assim a suspensão final contendo $1,6 \times 10^4$ leveduras foi preparada, adicionando-se volumes adequados de RPMI à suspensão de PBS, pH 7,2.

Após a incubação das células HeLa, por 18 horas, a 37°C , em estufa com 5% de CO_2 , o meio era aspirado e delicadamente recolocado no poço, por três vezes com pipeta da Gilson de $200\mu\text{L}$ e, então, removido. Em cada poço foram adicionados $200\mu\text{L}$ da suspensão de *Trichosporon* contendo $1,6 \times 10^4$ leveduras. A placa foi então colocada em estufa com 5% de CO_2 , a 37°C , por uma hora.

4.7.3. Fixação e coloração.

Cada poço era lavado delicadamente três vezes com PBS, pH 7,2, utilizando pipeta para remoção de leveduras não aderidas. As células foram fixadas com metanol gelado ($100\mu\text{L}/\text{poço}$) seguida de incubação à temperatura ambiente por uma hora. Após a lavagem de cada poço por três vezes com PBS, $100\mu\text{L}$ de corante Giemsa (diluído 1/20) foram adicionados. A placa foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente e lavada uma vez com PBS.

Para a segunda coloração, as leveduras foram lavadas duas vezes com água destilada e adicionado 1 ml de PBS (pH 7,4) contendo $2,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ de 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e incubadas a 25°C por 20 minutos no escuro. As lamínulas redondas foram retiradas dos poços das placas de poliestireno com 24 poços (Corning) e foram montadas individualmente em lâminas de microscopia e visualizadas em microscópio de fluorescência (Leitz, Wetzlar, Alemanha) com filtro 450/465 e sob contraste de fase.

4.7.4 Determinação do índice de aderência

A determinação do número de leveduras aderidas seguiu o seguinte critério para contagem: leveduras com células filhas foram consideradas uma célula; uma hifa foi contada como uma única célula. As contagens foram efetuadas em 5 campos. Em cada campo eram contadas de 40 a 100 células HeLa. Foi verificado: o número total de células HeLa por campo; o número total de células com leveduras aderidas e o número de leveduras de *Trichosporon* aderidas. Foi determinado o Índice de Aderência (IA), obtido pelo número total de células HeLa dividido pelo número total de células HeLa com leveduras aderidas e multiplicado por 100 para ser expresso em percentagem, segundo a representação abaixo.

$$IA = \frac{\text{numero total de HeLa com leveduras aderidas}}{\text{numero total de celulas HeLa}} \times 100$$

Para avaliar os resultados do ensaio de adesão sugerimos que as amostras que apresentaram índices de aderência igual ou maiores que 40% fossem consideradas fortemente aderentes; aquelas com índice de 20% a 39% classificamos como aderentes e com índice menor que 20%, como fracamente aderentes.

5. RESULTADOS

5.1. Origem dos isolados de *Trichosporon* “superficiais” e “profundos”.

Amostras biológicas foram coletadas de 1004 voluntários assintomáticos sadios do sexo masculino, através da fricção de quadrados de carpete estéreis na pele da região ínguino-crural (Mariat & Adam-Campos, 1967). As amostras foram obtidas com o preenchimento do “termo de consentimento livre esclarecido”. Um questionário também foi utilizado nessa pesquisa onde foram incluídas perguntas sobre, idade, sexo, etnia, estado civil. A associação entre as diversas variáveis foi avaliada por meio da prova exata de Fisher. Aceitou-se a significância estatística em $p \leq 0,05$.

A média de idade dessa população foi de 29 anos, variando de 01 aos 70 anos e a mediana das idades desse grupo de pacientes foi de 28 anos. A faixa etária com maior número de pacientes coletados foi de 21 a 30 anos. De acordo com as variáveis avaliadas nessa população observou-se que os indivíduos assintomáticos estudados eram predominantemente brancos (47,31%), solteiros (50%) e possuindo apenas o ensino fundamental (51,2%) (Tabela 05).

Durante a realização da coleta com o quadrado de carpete estéril nenhum paciente relatou prurido na região genital ou qualquer tipo de sintoma. Não foi

possível estabelecer associações estatisticamente significativas entre as variáveis (idade, sexo e etnia) estudadas e as leveduras isoladas nesta investigação, devido à heterogeneidade dos grupos coletados e a amplitude de indivíduos que compõe os grupos.

Tabela 5. Análise da distribuição dos 1004 voluntários sadios atendidos no ambulatório de dermatologia do Hospital São Paulo, UNIFESP-EPM e Hospital Heliópolis, segundo a idade, etnia, estado civil e nível educacional.

Variável	Frequência						
Idade	0 – 10 59(5,87%)	11- 20 156(15,53%)	21 – 30 326(32,47%)	31 – 40 217(21,61%)	41 – 50 134(13,34%)	51 – 60 66(6,57%)	61 – 70 46(4,58%)
Etnia	Caucasianos 475 (47,31%)		Afro-descendentes 208 (20,72 %)		Mestiços 277 (27,59%)		Asiáticos 44 (4,38%)
Estado civil	Solteiro 502 (50%)		Casado 292 (29,1%)		Separado 138 (13,74%)		Viúvo 72 (7,16%)
Nível Educacional	Analfabeto 210 (20,91%)		Ensino fundamental 514 (51,2%)		Ensino médio 197 (19,62%)		Universitário 83 (8,27%)

A frequência de isolamento das leveduras do gênero *Trichosporon* obtidas da pele da região ínguino-crural dos 1004 indivíduos investigados nessa população foi de 11,15% (n=112). Esse grupo de isolados foi denominado “isolados superficiais”. As demais amostras foram consideradas negativas.

Para obtermos uma visão geral das faixas etárias dos 112 indivíduos sadios onde foram isolados *Trichosporon* spp. superficiais foi gerado um espectro

epidemiológico (Figura 3) onde é possível observar o número de pacientes para uma determinada idade.

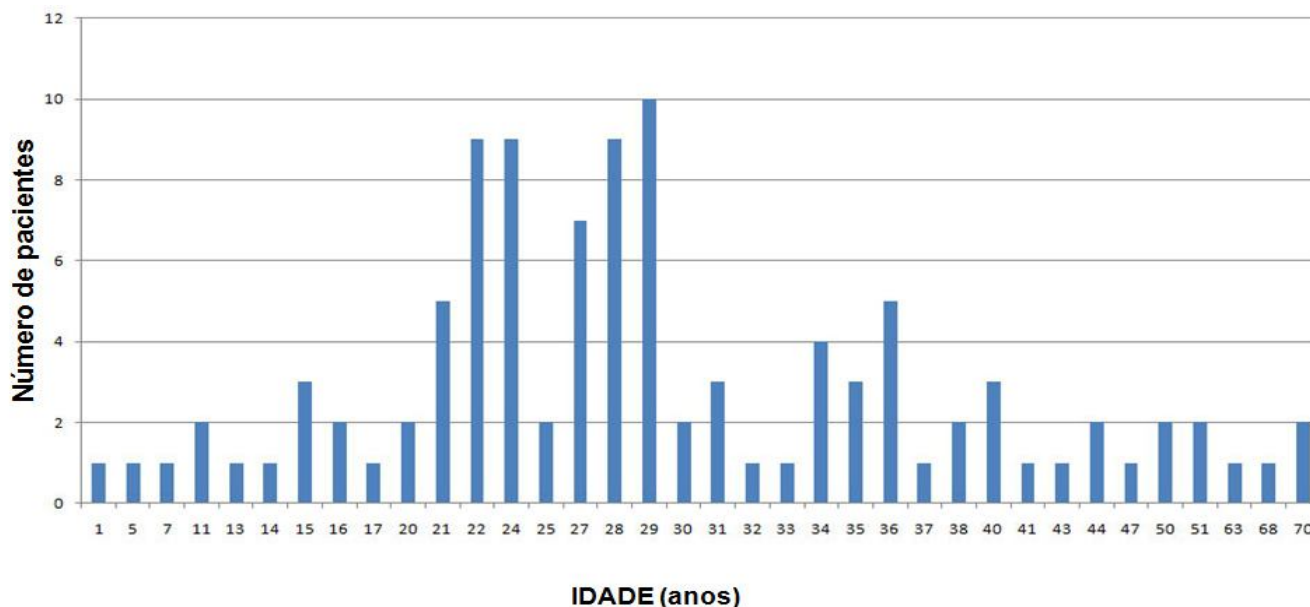


Figura 3- Espectro epidemiológico das idades dos 112 indivíduos sadios com colonização por *Trichosporon* spp.

Os 112 isolados clínicos superficiais de *Trichosporon* spp. foram selecionados e purificados por técnica de esgotamento no meio de cultura cromogênico CHROMagar *Candida*® visando obter culturas puras e isoladas, onde foram analisados o aspecto e a cor das colônias obtidas. Foram observadas variações de cores nas colônias dos isolados de *Trichosporon* spp. quando semeadas em meio cromogênico CHROMagar *Candida*®, incluindo tons de azul (maioria do isolados) e róseos, mas nenhuma variação que impossibilitasse a leitura do teste foi observada.

Durante a realização dos estudos foram obtidos 26 isolados de *Trichosporon* spp. provenientes de urina e de ponta de cateter de pacientes internados em UTIs. Esse grupo de isolados foi denominado “isolados profundos”.

A média de idade dessa população foi de 62,8 anos, variando de 31 aos 80 anos e a mediana das idades desse grupo de pacientes foi de 64,5 anos. A faixa etária com maior número de isolados foi a de 71 a 80 anos, com onze cepas obtidas (Figura 4).

Tabela 6. Taxa de colonização por espécies de *Trichosporon* isolados da região ínguino-crural de indivíduos assintomáticos do sexo masculino, segundo a faixa etária.

ESPÉCIES	FAIXA DE IDADES						TOTAL N (%)
	0 – 10 (n=59)	11- 20 (n=166)	21 – 30 (n=357)	31 – 40 (n=222)	41 – 50 (n=134)	51 – 70 (n=66)	
<i>T. asahii</i>	-	4	1	1	-	1	7 (6,25)
<i>T. asteróides</i>	-	4	11	6	1	1	23 (20,53)
<i>T. ovoides</i>	-	2	8	3	2	2	17 (15,17)
<i>T. mucoides</i>	-	4	1	2	3	-	10 (8,92)
<i>T. inkin</i>	2	-	7	1	1	1	12 (10,71)
<i>T. cutaneum</i>	1	-	20	11	-	1	33 (29,46)
<i>Trichosporon</i> spp.	-	-	6	4	-	-	10 (8,92)
TOTAL	3 (2.67%)	14 (12.5%)	54 (48.2%)	28 (25%)	7 (6.25%)	6 (5.35%)	112 (100)

O grupo de pacientes com infecção de urina e cateter por leveduras do gênero *Trichosporon* apresentaram um espectro epidemiológico diferente do observado no grupo superficial, com pacientes de faixa etária predominantemente mais elevada.

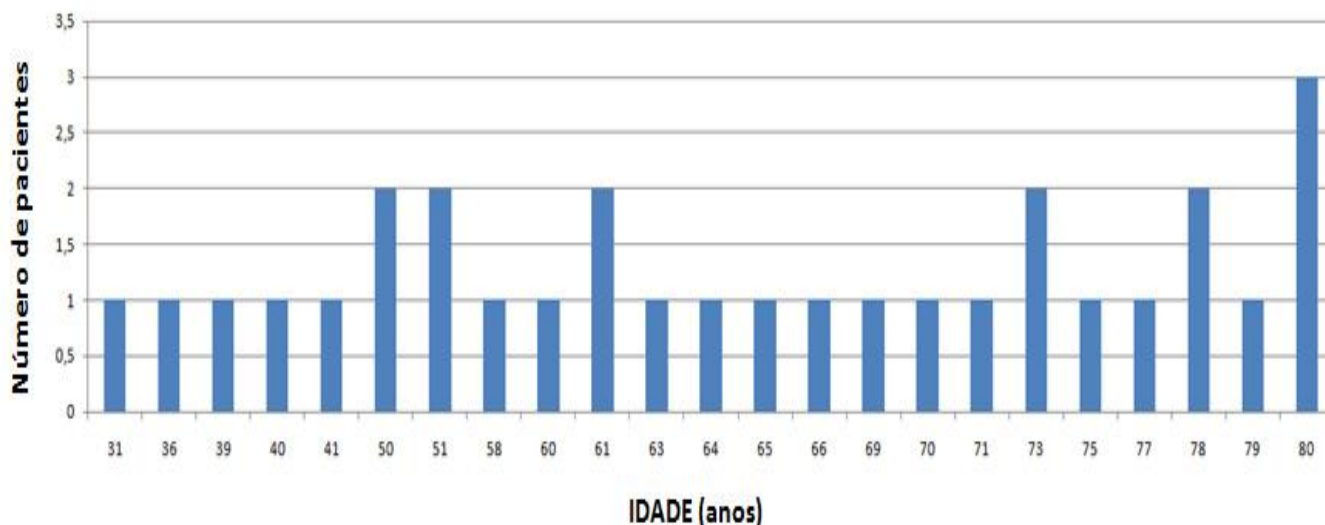


Figura 4- Espectro epidemiológico das idades dos 30 pacientes com infecção de urina e cateter por *Trichosporon* spp.

5.2. Identificação fenotípica e fisiológica dos isolados de *Trichosporon* spp.

Os parâmetros fisiológicos e a padronização da identificação por métodos fenotípicos foram baseados em estudos anteriores preconizados por De Hoog & Guarro J. (2001)(Tabela 07).

A análise micro-morfológica foi baseada na presença de célula apressória, presença de células meristemáticas e morfologia dos artroconídios (forma de barril

ou alongados). Todas as amostras testadas para produção de urease foram positivas, sendo esse passo indispensável para diferenciação das leveduras do gênero *Trichosporon* spp. de outro gênero estreitamente relacionado, como *Geotrichum* spp. As amostras-padrão *T. asahii* (CBS 2479), *T. inkin* (CBS 5585), *T. mucoides* (CBS 7625) e *T. ovoides* (CBS 7556) foram usadas como controles positivos.

Tabela 7. Parâmetros fisiológicos para identificação clássica de espécies do gênero *Trichosporon*, segundo De Hoog & Guarro J. (2001)

Testes de assimilação de	<i>T.</i>	<i>T.</i>	<i>T.</i>	<i>T.</i>	<i>T.</i>	<i>T.</i>
	<i>asahii</i>	<i>asteroides</i>	<i>cutaneum</i>	<i>inkin</i>	<i>mucoides</i>	<i>ovoides</i>
L-Arabnose	+	+	+	-	+	V
Sorbitol	-	-	+	-	+	-
Melibiose	-	-	+	-	+	-
Myo-Inositol	-	v		+	+	-
Crescimento a 37°C	+	v	-	+	+	V
0,1 % Cicloheximida	+		-	V	+	+
Apressória	-	-	-	+	-	+

(+) teste positivo; (-) teste negativo; (v) teste variável

Utilizando-se testes bioquímicos e fisiológicos, bem como as características macro e micro-morfologia de *Trichosporon* spp., 102 (91,1%) isolados puderam ser identificados como espécie. Dez isolados (8,92%) não foram conclusivos para testes de padrão de assimilação.

A tabela 6 mostra as diferentes espécies de *Trichosporon* isolados da área de pele perigenital de acordo com a idade. A colonização da pele foi maior entre os indivíduos dos 21 aos 30 (48,2%) e 31 aos 40 (25,0%) anos e todas as seis espécies de relevante interesse médico estavam presentes.

Entre os 112 isolados de *Trichosporon* spp. superficiais as seguintes espécies foram identificadas: *T. cutaneum* (29,46%), *T. asteroides* (20,53%), *T. ovoides* (15,17%), *T. inkin* (10,71%), *T. mucoides* (8,92%) e *T. asahii* (6,25%) (Tabela 6). No que diz respeito à identificação das espécies de *Trichosporon* pela metodologia clássica foi necessário repetir o teste de assimilação de 2 a 3 vezes para alguns isolados, devido aos resultados iniciais inconclusivos. Nesses casos, quando um inóculo fúngico mais intenso era utilizado, o halo de assimilação podia ser melhor visualizado.

As taxas de colonização do gênero *Trichosporon* variaram muito de acordo com a idade e, em menor intensidade, em relação à raça ou nível de escolaridade do paciente, porém não foram estatisticamente significantes. As figuras 5A e 5B mostram as percentagens de isolados de acordo com a raça e escolaridade. A colonização por *Trichosporon* spp. foi maior no grupo de indivíduos analfabetos (18,57%), seguidos pelos grupos de indivíduos que possuíam o ensino fundamental (10,12%), médio (8,63%) e graduados universitários (4,82%).

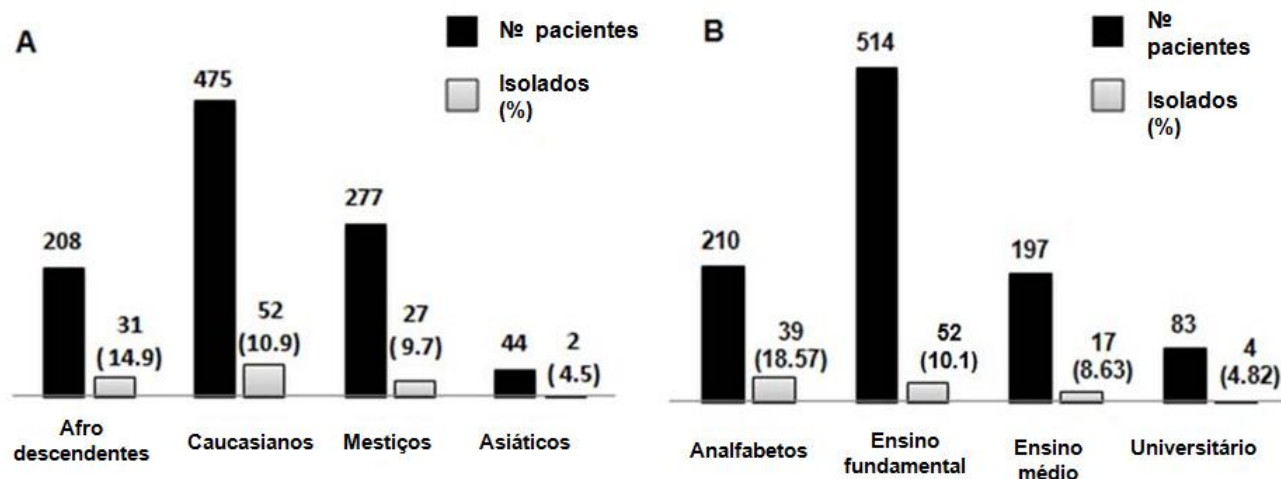


Figura 5 – Número de indivíduos e taxa de colonização de *Trichosporon* spp. na região ínguino-crural segundo a etnia (A) e nível educacional (B). A porcentagem é relativa a cada grupo.

Entre o grupo de pacientes internados na UTI, 30 isolados de *Trichosporon* spp., (26 a partir de urina e 4 de cateteres) foram identificados, sendo cada isolado obtido de um paciente diferente. *T. asahii* foi espécie mais isolada (n = 23; 76,66%), seguido por *T. inkin* (n = 5; 16,66%) e *T. asteroides* (n = 2; 6,6%) (Tabela 8). Com base em faixas etárias, o grupo etário dos 71 aos 80 anos representou 36,7% dos isolados, seguido pelos indivíduos com idade entre 61 a 70 anos (26,7%), 51 a 60 anos (13,33%), 31 a 40 anos (13,33%) e 41 a 50 anos (10%). Todos estes indivíduos apresentavam ao menos a conclusão da escola primária.

Tabela 8. Taxa de isolamento das espécies de *Trichosporon* (identificadas fenotipicamente) provenientes de urina e cateter de acordo com a faixa etária.

ESPÉCIES	IDADES (anos)					TOTAL
	31 – 40	41 – 50	51 – 60	61 – 70	71-80	
<i>T. asahii</i>	4	3	4* ⁽²⁾	4	8	23 (76,66%)
<i>T. inkin</i>	-	-	-	3* ⁽¹⁾	2* ⁽¹⁾	5 (16,66%)
<i>T. asteroides</i>	-	-	-	1	1	2 (6,66%)
TOTAL	4(13,33%)	3 (10%)	4(13,33%)	8 (26,7%)	11 (36,7%)	30 (100%)

*_(n) = isolados de cateter (dois *T. asahii* e dois *T. inkin*)

5.3. Identificação genotípica dos isolados de *Trichosporon* “superficiais” e “profundos”.

Nos ensaios para identificação genotípica foram selecionados isolados dos dois grupos, sendo 39 de origem superficial (colonização) e 26 isolados profundos, sendo 22 originários de infecção urinária e 4 isolados de cateteres, e cinco cepas de referência (CBS) totalizando 70 amostras.

Após a extração do DNA genômico e da PCR, utilizando os "primers" pITS-F e pITS-R, específicos para as regiões ITS-1 e ITS-2 (Sugita et al., 1999) e 26SF-(IGS1-26SS) preconizados por Sugita e colaboradores (2002) que amplificam a região IGS1 do rDNA, uma única banda foi amplificada para cada isolado, sendo

uma de 550 pares de base (pb) para região ITS e uma banda de 650 pb para região IGS (Figura 6).

Assim, ficou confirmado que os isolados clínicos, bem como as cepas de referência utilizadas como controle pertenciam ao gênero *Trichosporon* spp. Além disso, estes oligonucleotídios quando utilizados para amplificar o DNA de *Candida* spp. (controle-negativo) não evidenciaram nenhuma banda, mesmo inespecíficas, confirmando que estes oligonucleotídeos são suficientemente discriminatórios para o gênero *Trichosporon* como preconiza a literatura (Sugita et al., 1999, Sugita et al., (2002).

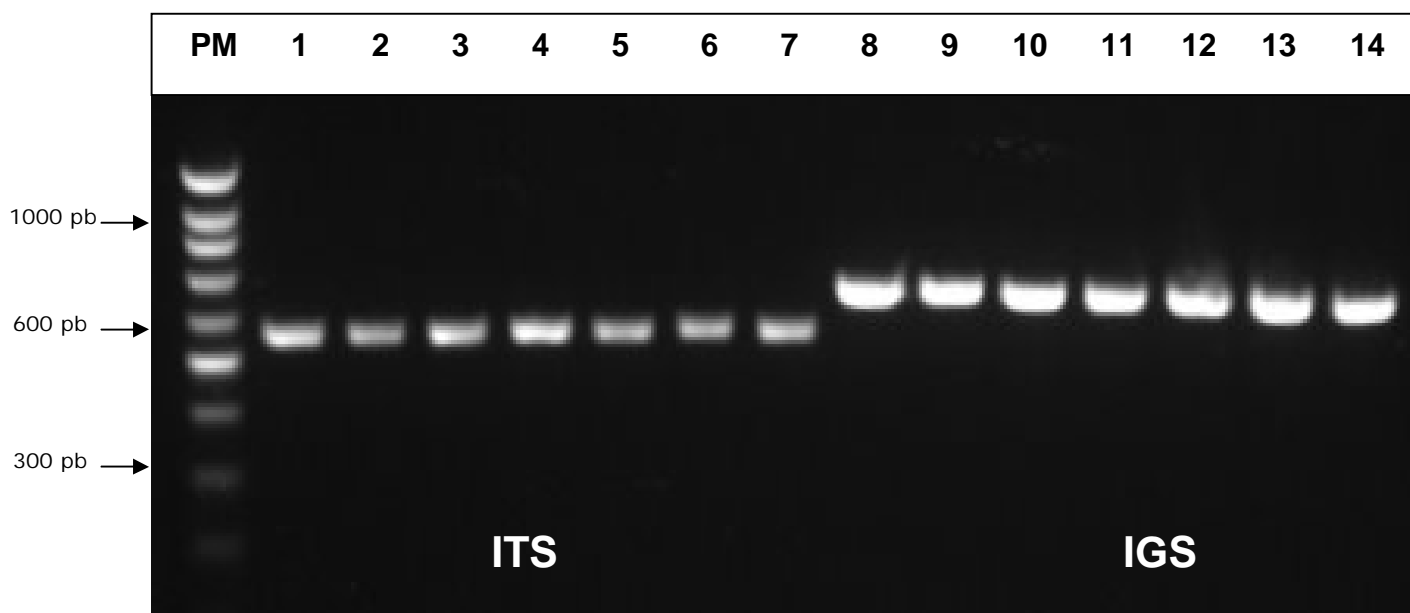


Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos da PCR das regiões ITS e IGS dos isolados padrão (CBS) e isolados clínicos de *Trichosporon* spp.

PM = Padrão de peso molecular (High DNA Mass Leader- Life Technologies®).

1 – 7 - Produtos de PCR da região ITS de *Trichosporon* spp.; 8-14 Produtos de PCR da região IGS de *Trichosporon* spp. Amostras: 1 e 8 = *T. asahii* var. *asahii* (CBS 2479); Amostras 2 e 9 = *T. inkin* (CBS 5585); Amostras 3 e 10 = *T. ovoides* (CBS 7556); Amostras 4 e 11 = *T. mucoides* (CBS 7625); 5 e 12 = *T. asteroides* (CBS 2481); Amostras 6 e 13 = *T. asahii* (isolado clínico- pele); Amostras 7 e 14 = *T. inkin* (isolado clínico – urina).

Os produtos de PCR de DNA genômico dos 70 isolados em estudo genotípico foram sequenciados utilizando-se os mesmos oligonucleotídeos descritos anteriormente para as duas regiões analisadas (ITS e IGS) estas análises foram realizadas **Paloma Hernandez e aluna de mestrado Melissa Mitne Petry** . A análise destas sequências foi realizada pelo aluno de doutorado **Jackson Cordeiro de Lima** utilizando o conjunto de programas Phred-Phrap-Consed (Ewing et al. 1998; Ewing & Green, 1998).

Estas análises demonstraram que a qualidade dos sequenciamentos da região ITS não estava satisfatória, isto é, estava maior que um erro a cada 10kb, e os sequenciamentos da região IGS apresentavam qualidade satisfatória nas extremidades dos fragmentos sequenciados, porém o meio dessa sequência também apresentava uma qualidade inferior, semelhante ao observado na região ITS. Para resolução satisfatória desses desvios foram repetidos os sequenciamentos da região ITS, aumentando assim o número de fitas (DNA) sequenciadas para cada amostra, o que foi suficiente para resolver o problema de qualidade na região ITS. Para a região IGS foram desenhados dois pares de oligonucleotídeos: o primeiro par de oligonucleotídeos pIGS-F e pIGS-R e o segundo par : pIGS-MB-F e pIGS- MB-R. Essas providências foram suficientes para a obtenção de sequenciamentos com qualidade para a identificação. Os erros das sequências consenso estão dispostos na tabela 9.

Posteriormente, as sequências consenso foram comparadas com bancos genômicos através do site “National Center for Biotechnology Information (NCBI) disponível eletronicamente em: <http://ncbi.nlm.nih.gov>” utilizando-se o serviço *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Este programa é caracterizado pela busca de similaridades locais e pode ser utilizado para identificar e classificar os homólogos em potencial para uma determinada sequência. Após a confirmação de que a sequência era realmente ITS ou IGS estas foram alinhadas utilizando-se o programa Clustal-W.

No grupo de isolados superficiais (n=39) a região IGS permitiu identificar genotipicamente todos os isolados sendo que 28 foram identificados como *T. asahii* (71,79%) e 05 identificados como *T. inkin* (12,82%). As espécies *T. dermatis* e *T. asteroides* foram identificadas em quatro isolados, sendo dois por espécie. Por sua vez, *T. ovoides* e *T. coremiiforme* foram identificados em um isolado cada (Tabela 09). Pelo sequenciamento da região ITS, Tri 022 poderia ser *T. dermatis* ou *T. mucoides*, o isolado 032, poderia ser *T. asteroides* ou *T. japonicum* e o isolado 059 poderia ser *T. asteroides* ou *T. japonicum*, não sendo possível discriminar a espécie destes isolados analisando apenas essa região (Tabela 09).

No grupo de 26 isolados de origem profunda (22 de urina e 4 de cateter) identificados genotipicamente pela região IGS, a espécie *T. asahii* foi predominante, sendo identificada em 22 isolados (84,6%), seguida por dois isolados de *T. inkin* (7,69%). *T. coremiiforme* e *T. debeurmannium* foram isolados em uma amostra cada (3,84%).

Nos isolados de urina foram identificados *T. asahii* (n=18/ 69,23 %), *T. inkin* (n=2 /7,69%), *T. coremiiforme* (n=1/ 3,84%) e *T. debeurmannium* (n=1/ 3,84%). Ao analisarmos os isolados de cateter, todos foram identificados como *T. asahii*.

Tabela 09. Identificação genotípica dos isolados de *Trichosporon* spp. de origem superficial e profunda e os parâmetros resultantes dos sequenciamentos obtidos.

Isolado	Local de coleta	Montagem IGS Err/10kb	Contigs IGS bp	IGS Espécie	IGS Blast E-value	Montagem ITS Err/10kb	Contigs ITS bp	ITS Espécie	ITS Blast E-value
TRI001	superficial	576,83	617bp	<i>T. asahii</i>	0.0	266,39	497bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI002	superficial	231,23	618bp	<i>T. asahii</i>	0.0	169,97	494bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI003	urina	1331	619bp	<i>T. asahii</i>	0.0	303,04	488bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI004	urina	3274	903bp	<i>T. asahii</i>	0.0	1623	493bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI005	urina	209,97	618bp	<i>T. asahii</i>	0.0	163,59	495bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI006	urina	138,26	620bp	<i>T. asahii</i>	0.0	69,99	502bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI007	urina	262,58	621bp	<i>T. asahii</i>	0.0	142,87	522bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI008	urina	172,34	651bp	<i>T. asahii</i>	0.0	301,97	507bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI009	superficial	96,26	613bp	<i>T. asahii</i>	0.0	443,32	525bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI010	urina	165,61	616bp	<i>T. asahii</i>	0.0	1331	481bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI011	urina	518,53	602bp	<i>T. inkin</i>	0.0	3619	771bp	<i>T. inkin</i>	0,0
TRI012	urina	355,76	619bp	<i>T. asahii</i>	0.0	550,07	528bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI013	urina	913,95	900bp	<i>T. asahii</i>	0.0	100,61	497bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI014	superficial	193,31	617bp	<i>T. asahii</i>	0.0	1105	520bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI015	urina	86,77	621bp	<i>T. coremiiforme</i>	0.0	109,32	522bp	<i>T. coremiiforme</i>	0,0
TRI016	urina	470,81	624bp	<i>T. inkin</i>	0.0	787,33	488bp	<i>T. inkin</i>	0,0
TRI017	urina	200,43	620bp	<i>T. asahii</i>	0.0	329,99	515bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI018	superficial	572,08	621bp	<i>T. asahii</i>	0.0	174,74	494bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI019	cateter	4988	1211bp	<i>T. asahii</i>	0.0	479,01	528bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI020	cateter	552,94	621bp	<i>T. asahii</i>	0.0	1017	523bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI021	superficial	64,42	652bp	<i>T. asahii</i>	0.0	130,12	522bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI022	superficial	760,01	490bp	<i>T. dermatis</i>	0.0	760,75	506bp	<i>T. dermatis</i> / <i>T. mucoides</i>	0.0 / 0.0
TRI023	superficial	108,62	338bp	<i>T. asahii</i>	1e-171	493,42	493bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI024	superficial	1787	588bp	<i>T. asahii</i>	1e-169	365,91	493bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI025	CBS	335,31	490bp	<i>T. mucoides</i>	0.0	248,38	479bp	<i>T. mucoides</i>	0,0
TRI026	cateter	5268	1360bp	<i>T. asahii</i>	0.0	543,08	490bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI027	cateter	4975	1146bp	<i>T. asahii</i>	0.0	820,69	482bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI028	superficial	114,92	619bp	<i>T. asahii</i>	0.0	693,12	523bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI029	superficial	3744	904bp	<i>T. asahii</i>	0.0	963,57	524bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI030	superficial	1898	903bp	<i>T. asahii</i>	0.0	431,46	491bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI031	urina	2758	831bp	<i>T. asahii</i>	1e-171	1724	450bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI032	superficial	763,52	877bp	<i>T. asteroides</i>	0.0	1269	491bp	<i>T. asteroides</i> / <i>T. japonicum</i>	0.0 / 0.0
TRI033	superficial	377,7	621bp	<i>T. asahii</i>	0.0	734,78	477bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI034	superficial	340,4	903bp	<i>T. asahii</i>	0.0	580,07	489bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI035	superficial	481,52	901bp	<i>T. asahii</i>	0.0	2257	490bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI036	superficial	653,58	490bp	<i>T. dermatis</i>	0.0	2783	509bp	<i>T. dermatis</i>	0,0
TRI037	superficial	303,62	892bp	<i>T. asahii</i>	0.0	1178	484bp	<i>T. asahii</i>	0,0

Tabela 9. Continuação...

Isolado	Local de coleta	Montagem IGS Err/10kb	Contigs IGS bp	IGS Espécie	IGS Blast E-value	Montagem ITS Err/10kb	Contigs ITS bp	ITS Espécie	ITS Blast E-value
TRI039	urina	3497	855bp	<i>T. debeurmannianum</i>	3e-72	972,07	463bp	<i>T. debeurmannianum</i>	0,0
TRI040	urina	264,26	906bp	<i>T. asahii</i>	0.0	156,78	524bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI041	urina	477,72	903bp	<i>T. asahii</i>	0.0	1089	470bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI042	urina	42,53	933bp	<i>T. asahii</i>	0.0	414,56	522bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI043	superficial	1282	599bp	<i>T. inkin</i>	0.0	2547	482bp	<i>T. inkin</i>	0,0
TRI044	superficial	491,3	630bp	<i>T. ovoides</i>	0.0	47,51	547bp	<i>T. ovoides</i>	0,0
TRI045	CBS	101,7	916bp	<i>T. faecale</i>	0.0	64,78	519bp	<i>T. faecale / T. insectorum</i>	0.0 / 0.0
TRI046	CBS	676,88	566bp	<i>T. loubieri</i>	0.0	456,37	478bp	<i>T. loubieri</i>	0,0
TRI047	superficial	235,67	629bp	<i>T. inkin</i>	0.0	726,45	487bp	<i>T. inkin</i>	0,0
TRI048	urina	904,57	903bp	<i>T. asahii</i>	0.0	811,25	523bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI049	superficial	200,52	623bp	<i>T. asahii</i>	0.0	430,82	490bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI050	superficial	1730	931bp	<i>T. asahii</i>	0.0	1218	474bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI051	superficial	1336	600dp	<i>T. asahii</i>	0.0	828,19	493bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI052	superficial	832,33	905bp	<i>T. asahii</i>	0.0	884,79	493bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI053	superficial	1119	594bp	<i>T. inkin</i>	0.0	1254	485bp	<i>T. inkin</i>	0,0
TRI054	superficial	1147	593bp	<i>T. inkin</i>	0.0	415,74	489bp	<i>T. inkin</i>	0,0
TRI055	urina	3352	904bp	<i>T. asahii</i>	0.0	2131	532bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI056	urina	92,43	653bp	<i>T. asahii</i>	0.0	875,87	471bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI057	superficial	96,27	912bp	<i>T. coremiiforme</i>	0.0	287,47	504bp	<i>T. coremiiforme</i>	0,0
TRI058	superficial	441,38	902bp	<i>T. asahii</i>	0.0	1046	482bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI059	superficial	93,7	878bp	<i>T. asteroides</i>	0.0	1134	477bp	<i>T. asteroides / T. japonicum</i>	0.0 / 0.0
TRI060	superficial	369,76	591bp	<i>T. inkin</i>	0.0	974,24	484bp	<i>T. inkin</i>	0,0
TRI061	superficial	231,36	900bp	<i>T. asahii</i>	0.0	2455	478bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI062	superficial	1001	674bp	<i>T. asahii</i>	0.0	1907	493bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI063	superficial	2199	897bp	<i>T. asahii</i>	0.0	735,9	465bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI064	superficial	180,01	618bp	<i>T. asahii</i>	0.0	1190	493bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI065	superficial	306,67	655bp	<i>T. asahii</i>	0.0	1315	910bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI066	superficial	71,02	932bp	<i>T. asahii</i>	0.0	68,26	933bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI067	superficial	267,16	904bp	<i>T. asahii</i>	0.0	947,63	534bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI068	CBS	226	625bp	<i>T. asahii</i>	0.0	1696	530bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI069	CBS	873,97	904bp	<i>T. asahii</i>	0.0	6570	980bp	<i>T. asahii</i>	0,0
TRI070	superficial	3124	878bp	<i>T. asahii</i>	0.0	2249	480bp	<i>T. asahii</i>	0,0

Quando comparamos os dados obtidos pela identificação molecular e fenotípica observamos que apenas em 30% dos isolados (21/70), a identificação fenotípica foi capaz de identificar corretamente os isolados de *Trichosporon* spp., dados expostos na tabela 09. Quando utilizamos, por exemplo, a espécie *T. ashaii*, podemos observar a variação existente entre as técnicas de identificação: 24 isolados *T. ashaii* pelo método fenotípico, 52 isolados pelo método genotípico, região ITS e IGS.

Tabela 10. Comparação entre os resultados obtidos através dos métodos de identificação dos isolados de *Trichosporon* spp.

	Fenotípica	IGS	ITS
<i>T. ashaii</i>	24	52	52
<i>T. asteroides</i>	18	02	--
<i>T. ovoides</i>	06	01	01
<i>T. mucoides</i>	--	01	01
<i>T. inkin</i>	05	07	07
<i>T. cutaneum</i>	17	--	--
<i>T. coremiiforme</i>	--	02	02
<i>T. dermatis</i>	--	02	01
<i>T. debeurmannianum</i>	--	01	01
<i>T. faecale</i>	--	01	--
<i>T. loubieri</i>	--	01	01
Incongruências	--	--	04

Contudo, mesmo utilizando as técnicas moleculares para identificação podemos observar que em 04 isolados, a região ITS apresentou incongruências, ou seja, não foi capaz de discriminar entre as espécies de *Trichosporon*. As incongruências encontradas foram: *T. asteroides* / *T. japonicum* ; *T. asteroides* / *T. japonicum* ; *T. dermatis* / *T. mucoides* ; *T. faecale* / *T. insectorum* ; sendo que *T. asteroides* esteve presente em 50% (2/4) das incongruências.

5.4. Filogenia do gênero *Trichosporon*.

Para obter uma estimativa melhor da história evolutiva das leveduras do gênero *Trichosporon* e suas correlações de parentescos evolutivos foram realizadas inferências filogenéticas com base nos dados de sequenciamentos. Estas análises foram realizadas pela **Dra. Renata Carmona**.

A parte inicial do teste consiste na escolha do modelo filogenético que melhor representa o processo evolutivo que levou ao surgimento das sequências analisadas. Para essas análises foi utilizado o programa Modeltest (Posada & Crandall, 1998) de forma a encontrar o modelo que melhor se ajusta aos dados analisados e os parâmetros deste modelo para a inferência da árvore filogenética. O modelo escolhido e os parâmetros do modelo para cada conjunto de dados estão dispostos na tabela 11.

Tabela 11. Modelos de substituição utilizados pelos programas de inferência filogenética

Região	IGS	ITS
Modelo evolutivo	*K80+G	** HKY+G
Frequência das bases	A=0,25	A=0,2824
	C=0,25	C=0,2097
	G=0,25	G=0,2190
	T=0,25	T=0,2889
Ti/tv	0,985	0,9693
Distribuição gamma	6,0915	1,2586

* Kimura (1980) ** HKY (Hasegawa et al., 1985)

Utilizando esses parâmetros estimados, a próxima etapa foi inferir as genealogias a partir dos dados moleculares obtidos dos sequenciamentos, utilizando-se os programas SplitsTree (Huson, 1998; Huson & Bryant, 2006) e MrBayes (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). Se as redes obtidas pelo SplitsTree possuírem poucas reticulações então uma análise filogenética dicotômica pode ser feita. Os parâmetros do modelo de substituição são inferidos pelo MrBayes (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) sendo o modelo de substituição de nucleotídeos GTR (“general time-reversible”) com distribuição gamma utilizado como *input*.

5.4.1. Avaliação de confiabilidade

Após estimarmos uma filogenia foi avaliada a confiabilidade da árvore ou especificamente, qual é a confiança nos grupamentos formados por cada um dos nós da árvore. O “bootstrap” é uma técnica computacional de re-amostragem que

pode ser utilizada para estimar distribuições desconhecidas ou difíceis de serem descobertas analiticamente (Efron, 1979).

O teste de bootstrap serve como forma de calcular índices que indiquem o grau de confiança dos ramos internos da árvore. O bootstrap estima a distribuição da amostra pela re-amostragem repetida de dados a partir do conjunto original. Os valores são geralmente interpretados como níveis de confiança para os grupamentos filogenéticos e os valores estão expressos em porcentagem e indicados nos ramos internos. Essas análises foram aplicadas em todos os métodos de inferência utilizados na presente investigação.

5.4.2. Árvores filogenéticas da região ITS dos isolados de *Trichosporon* spp.

Foram analisados 70 isolados de *Trichosporon* spp., descritos anteriormente na tabela 9, além de 6 sequências obtidas no *GenBank* e 3 sequências de grupos externos totalizando 79 sequências no alinhamento. As relações filogenéticas entre as espécies de *Trichosporon* identificadas estão graficamente representadas pela árvore filogenética gerada a partir de análises bayesianas da região ITS 1 e 2 + 5,8S (Figura 07). Valores de probabilidade posterior foram adicionados para representar os valores de confiabilidade. Os parâmetros estimados para o modelo de substituição de nucleotídeos GTR para o alinhamento da região ITS foram: $r(AC) = 0,143031$, $r(AG) = 0,190108$, $r(AT) = 0,133835$, $r(CG) = 0,104037$, $r(CT) = 0,305053$, $r(GT) = 0,123936$, $f(A) = 0,278878$,

$f(C) = 0,206788$, $f(G) = 0,224493$, $g(T) = 0,289841$ e parâmetro alfa da distribuição $\text{gamma} = 0,191578$.

A árvore da região ITS (Figura 07) demonstra que essa região apresenta pequena capacidade discriminatória, sendo capaz de diferenciar apenas dois grandes grupos, segundo a espécie, isto é, *T. asahii* e *T. não-asahii*. Essa capacidade discriminatória da região ITS não sofreu influência segundo a origem do isolado (superficial ou profundo), apresentando poder discriminatório satisfatório apenas para a espécie *T. asahii*.

O cladograma gerado a partir dos sequenciamentos da região ITS, (Figura 8), segundo as respectivas árvores-consenso, resultantes de randomizações individuais a partir de uma árvore inicial gerada pela análise de Bayes demonstra o mesmo poder discriminatório da região ITS, com todos os isolados identificados como *T. asahii*, estreitamente relacionados com apenas uma interposição de um isolado (015 – *T. coremiiforme*). Podemos observar que, em menor grau, os isolados de *T. inkin* encontram-se relativamente juntos, exceto pela interposição de um isolado de *T. ovoides* (044) (Figura 09). Os valores de “bootstrap” foram adicionados aos seus respectivos ramos.

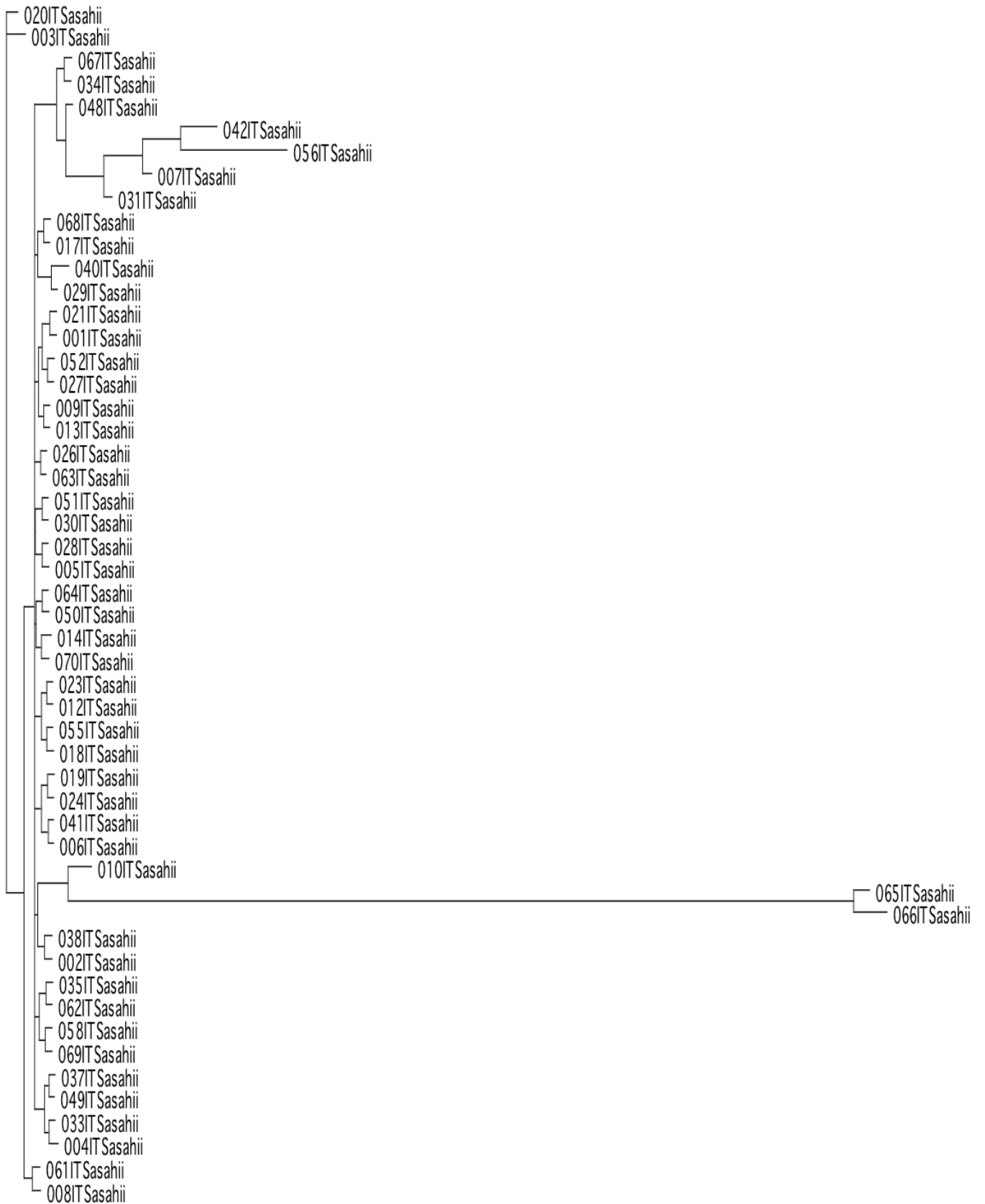
5.4.3. Análise de recombinação genética da região ITS de *Trichosporon* spp.

A avaliação do processo de recombinação entre as espécies filogenéticas foi realizada pelo software Splitstrees 4.0 (Huson, 1998) através das redes de

recombinação que demonstram o intercâmbio gênico entre os isolados de *Trichosporon* spp.

Através da análise de redes de recombinação foi possível observar que a região ITS dos isolados de *Trichosporon* apresentam dois pólos bem delimitados (Figura 09), compostos pela **clade cutaneum**, que é composta pelas espécies: *T. cutaneum*, *T. dermatis*, *T. mucoides* e *T. debermanium* e a **clade ovoides** – *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. ovoides*, *T. coremiiforme* e *T. inkin*. As sequências de *Cryptococcus amyloletus*, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus heveanensis* foram utilizadas como grupo externo (outgroup) (Tabela 3).

Nesta análise fica evidenciado que, durante o processo de evolução, ocorreu troca genética entre os isolados de mesma espécie, entre os isolados que compõem a mesma clade, entre os isolados das diferentes clades evidenciadas e, também, entre os isolados de *Trichosporon* e as sequências que compõem o grupo externo (outgroup).



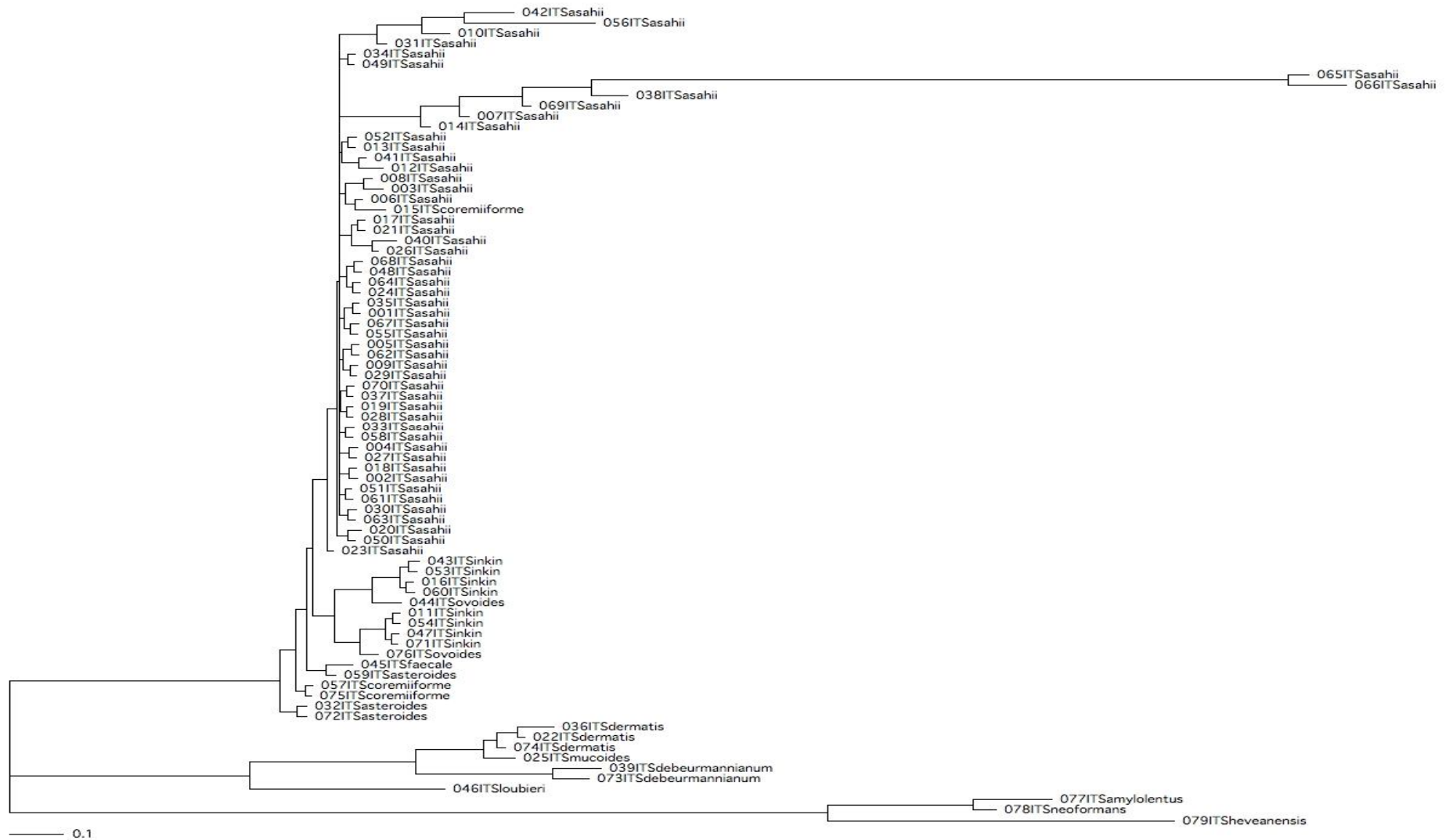


Figura 07. Filogenia dos isolados de *Trichosporon* spp. baseados na análise bayesiana da região ITS.

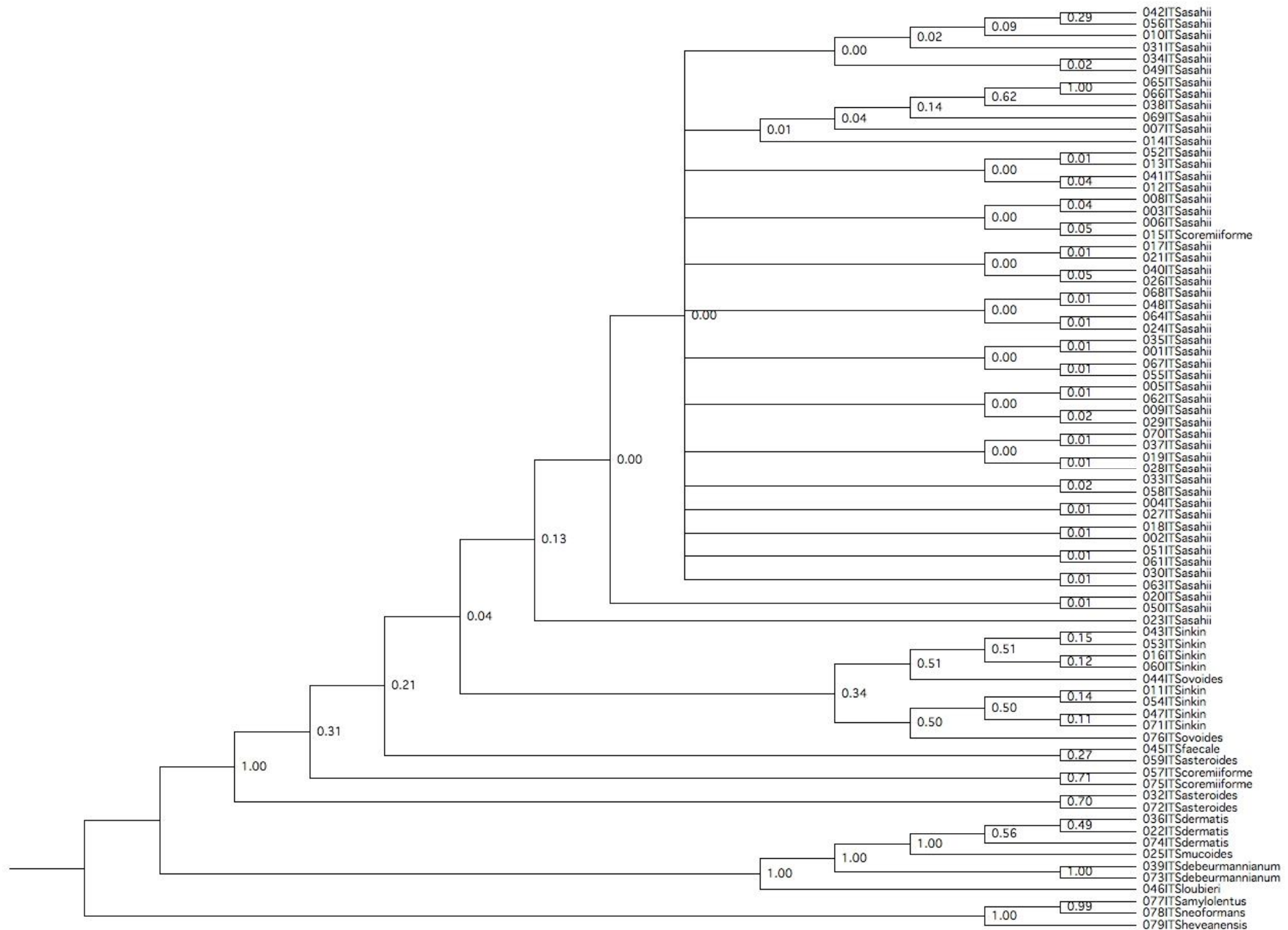


Figura 08. Cladograma dos sequenciamentos da região ITS dos isolados de *Trichosporon* spp. Valores de colocar probabilidade posterior indicado nos ramos.

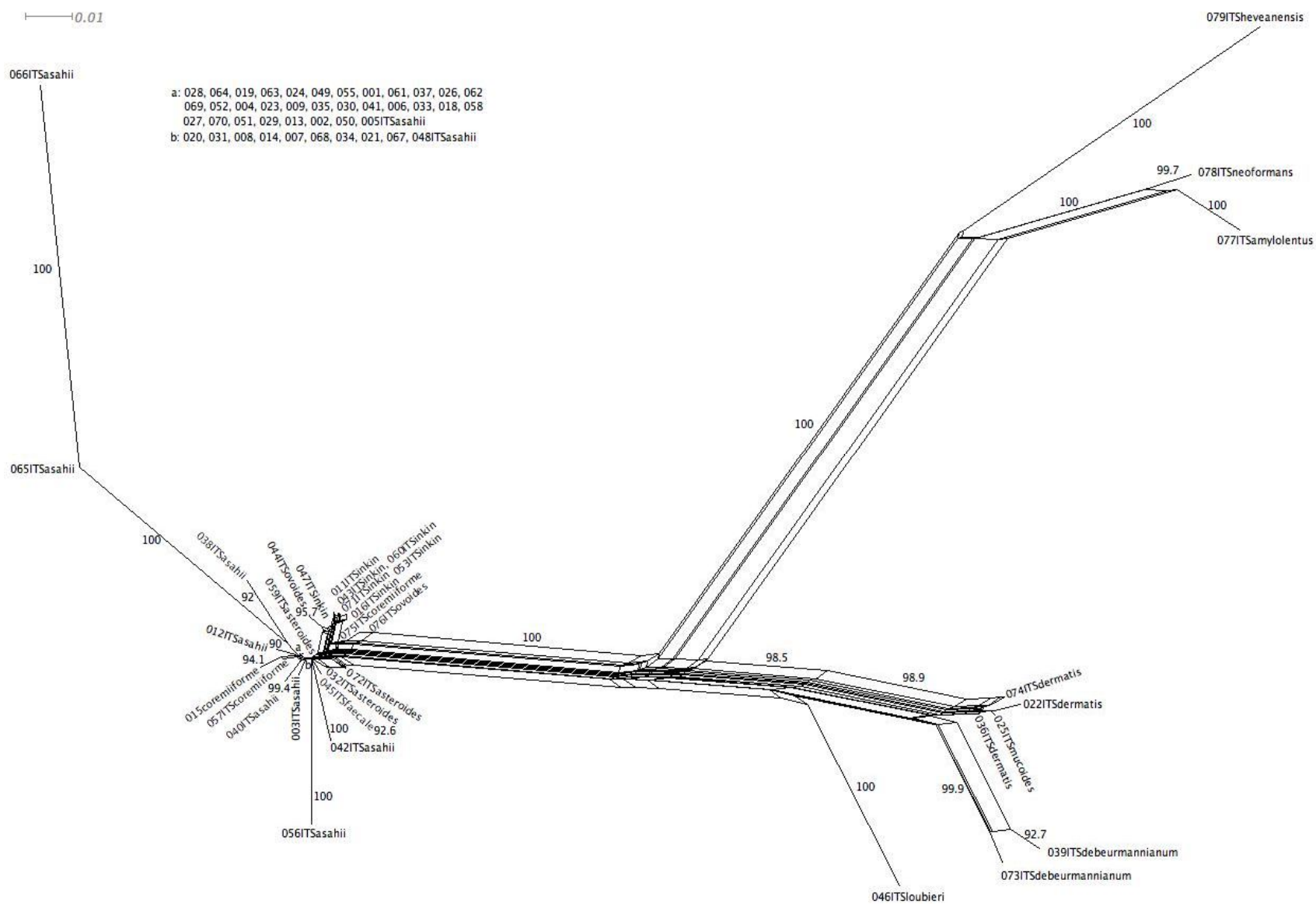


Figura 09. Rede filogenética gerada pelo Splitstree utilizando a região ITS dos isolados de *Trichosporon* spp.. Valores assinalados nos ramos indicam o bootstrap (1000 pseudoréplicas).

5.4.4. Árvores filogenéticas região IGS dos isolados de *Trichosporon* spp.

Todas as análises realizadas com a região ITS foram igualmente realizadas com a região IGS do gênero *Trichosporon*. As 70 sequências da região IGS obtidas neste estudo, mais 5 obtidas do *GenBank* e 2 sequências de grupos externos foram analisadas com o programa MrBayes. As sequências de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gatti* foram utilizadas como grupo externo (outgroup). Os parâmetros estimados para o modelo de substituição de nucleotídeos GTR para o alinhamento da região IGS foram: $r(AC) = 0,109498$, $r(AG) = 0,238771$, $r(AT) = 0,112070$, $r(CG) = 0,135501$, $r(CT) = 0,294032$, $r(GT) = 0,110128$, $f(A) = 0,255274$, $f(C) = 0,218121$, $f(G) = 0,262257$, $g(T) = 0,264348$ e parâmetro alfa da distribuição gamma = 2,464997.

As árvores resultantes das análises com o Mrbayes (Figura 10) evidenciaram que a região IGS apresenta um poder discriminatório maior que o encontrado na região ITS. A análise dessa região possibilitou a diferenciação de todas as espécies de *Trichosporon* encontradas nos isolados em estudo. Assim como na região ITS todas as sequências de *T. asahii* foram agrupadas juntas, porém, nesta análise o isolado 015 – *T. coremiforme* foi agrupado com os outros 2 isolados dessa mesma espécie, os isolados 075 e 057.

5.4.5. Análise de recombinação genética da região IGS de *Trichosporon* spp.

A avaliação do processo de recombinação entre as espécies filogenéticas foi realizada como descrito anteriormente utilizando-se a construção de redes filogenéticas pelo software Splitstrees 4.0.

Essa região apresentou um número de eventos reticulados com troca gênica, visualmente inferior ao observado para região ITS (Figuras 11). Esses eventos de recombinação são menos pronunciados inclusive quando comparados às sequências de *C. neoformans* e *C. gatti* (“outgroup”).

Os resultados obtidos para a região IGS possuem um poder discriminatório superior ao observado nas análises filogenéticas da região ITS e credenciam essa região do DNA ribossomal para os ensaios de identificação dos diferentes subtipos encontrados em *T. asahii*.

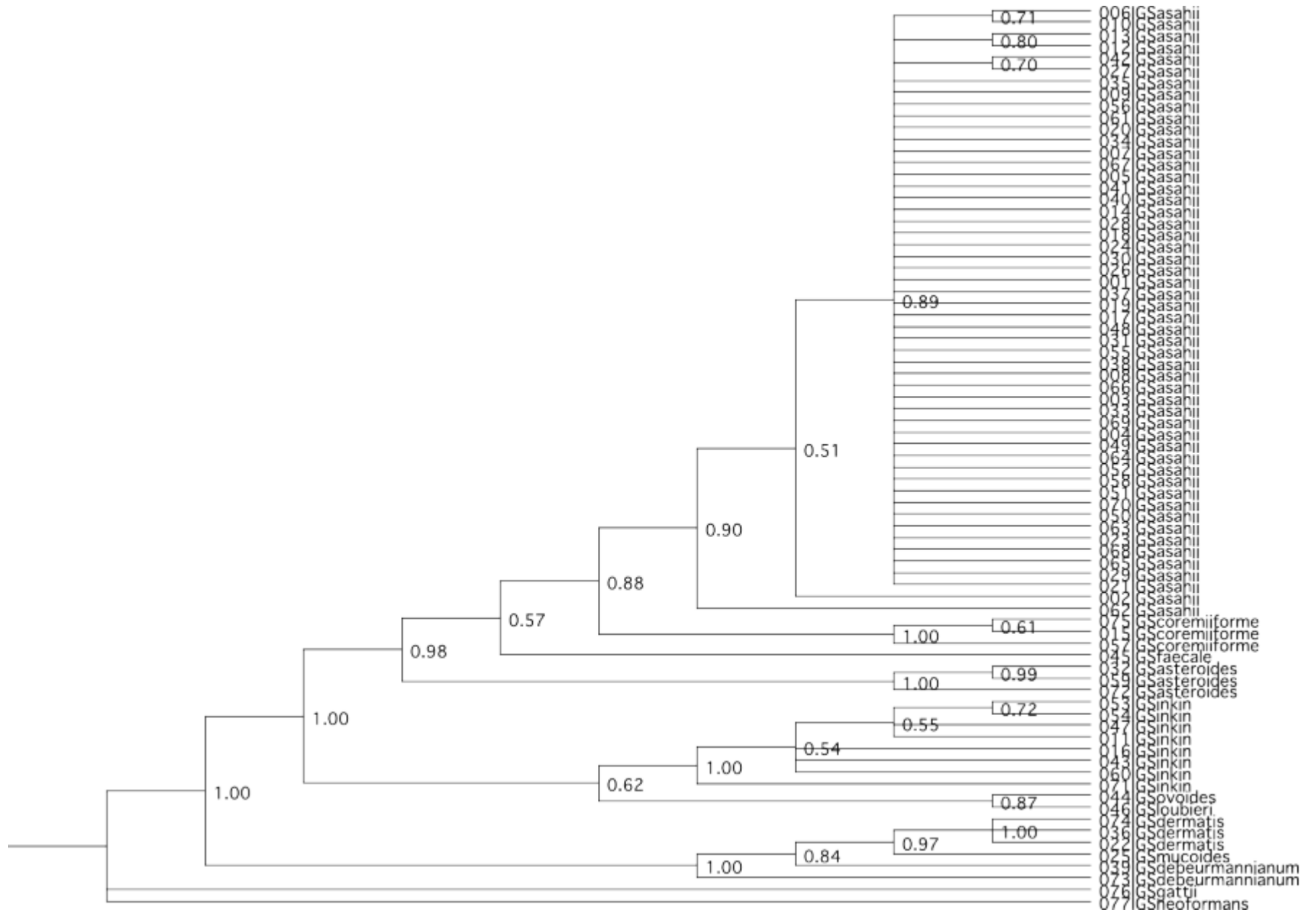


Figura 10. Filogenia dos isolados de *Trichosporon* spp. baseados na análise bayesiana da região IGS. Valores assinalados nos ramos indicam a probabilidade posterior dos ramos.

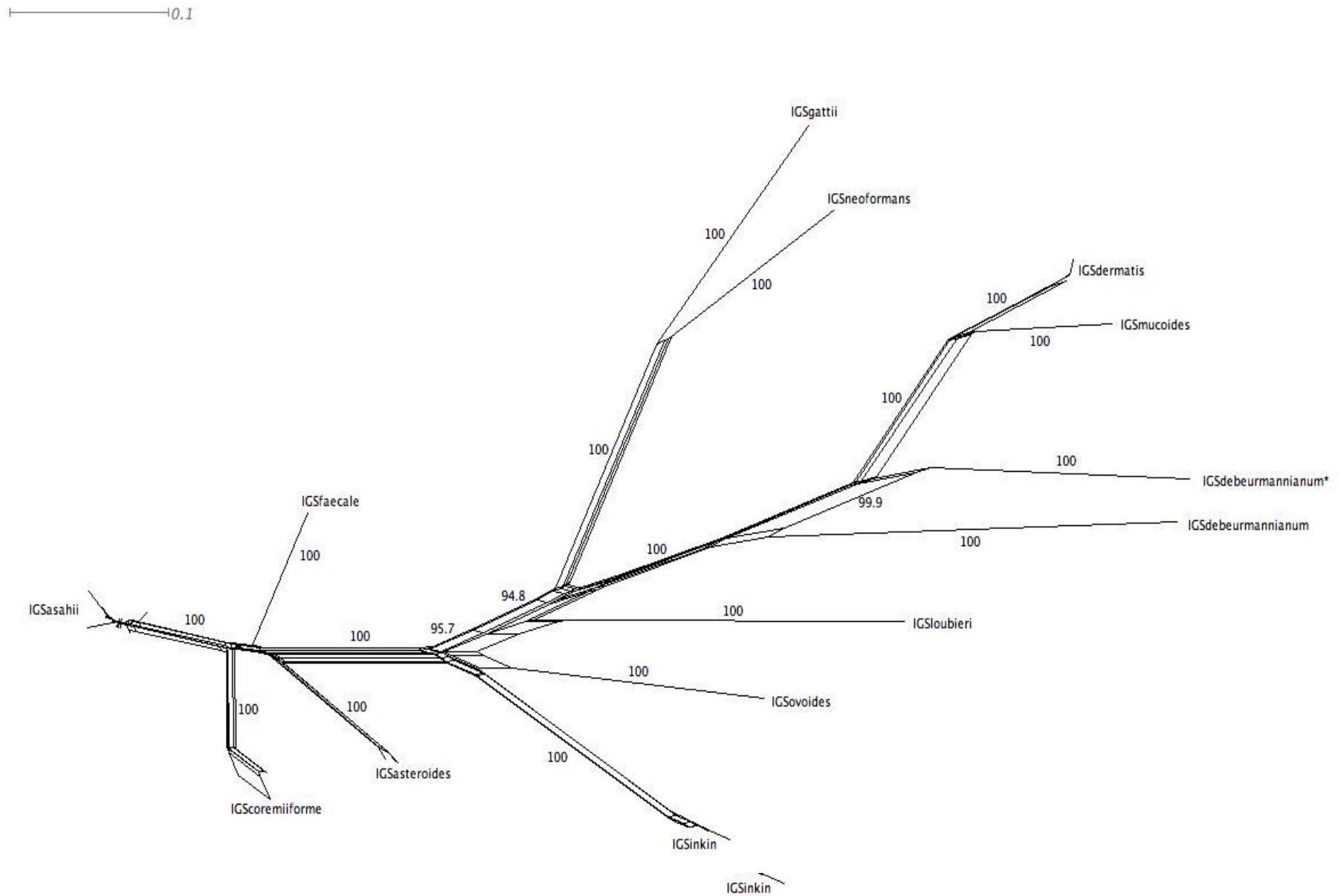


Figura 11. Rede filogenética gerada pelo Splittree utilizando a região IGS dos isolados de *Trichosporon* spp.. Valores assinalados nos ramos indicam o bootstrap (1000 pseudoréplicas).

5.4.6. Identificação do polimorfismo das sequências da região IGS-1 de *T. asahii*.

Estudos recentes (Sugita et al., 2002; Tudela et al., 2007; Chagas et al., 2009) têm demonstrado a existência de polimorfismo na sequência da região IGS1 das leveduras do gênero *Trichosporon*. A análise desse polimorfismo tem sido correlacionada com a origem geográfica dos isolados estudados, propondo que isolados endêmicos de uma determinada região pertençam a genótipos específicos.

Para identificar a qual genótipo de *T. asahii* nossos isolados pertencem foram utilizadas as sequências da região IGS dos 52 isolados de *T. asahii* identificados nesse estudo mais as sequências dos 7 genótipos já descritos na literatura (Sugita et al., 2002; 2004).

Analisando-se a genealogia em rede pode-se perceber que o isolado 062 pertence ao genótipo 3, o isolado 002 pertence ao genótipo 4 e que não foram encontrados isolados pertencentes aos genótipos 5, 6 e 7 (Figura 12). Devido ao baixo suporte estatístico não podemos afirmar se os outros isolados pertencem ao genótipo 1 ou ao 2. Para inferência no MrBayes foi utilizado um isolado de *T. coremiiforme* como grupo externo. Os parâmetros estimados para o modelo de substituição de nucleotídeos GTR para o alinhamento da região IGS somente do *T. asahii* foram: $r(AC) = 0,155473$, $r(AG) = 0,225461$, $r(AT) = 0,108472$, $r(CG) = 0,126651$, $r(CT) = 0,258611$, $r(GT) = 0,125332$, $f(A) = 0,264595$, $f(C) = 0,222988$,

$f(G) = 0,263743$, $g(T) = 0,248674$ e parâmetro alfa da distribuição gamma = $0,097511$. A análise bayesiana foi consistente com os resultados obtidos pelo SplitsTree com o isolado 062 pertencente ao genótipo 3, o isolado 002 pertencente ao genótipo 4 e nenhum isolado pertencente aos genótipos 5, 6 e 7 (Figura 13). Da mesma forma não podemos afirmar com qual genótipo, 1 ou 2, o restante dos isolados mais se assemelha devido à grande politomia e a baixa probabilidade *a posteriori* dos ramos.

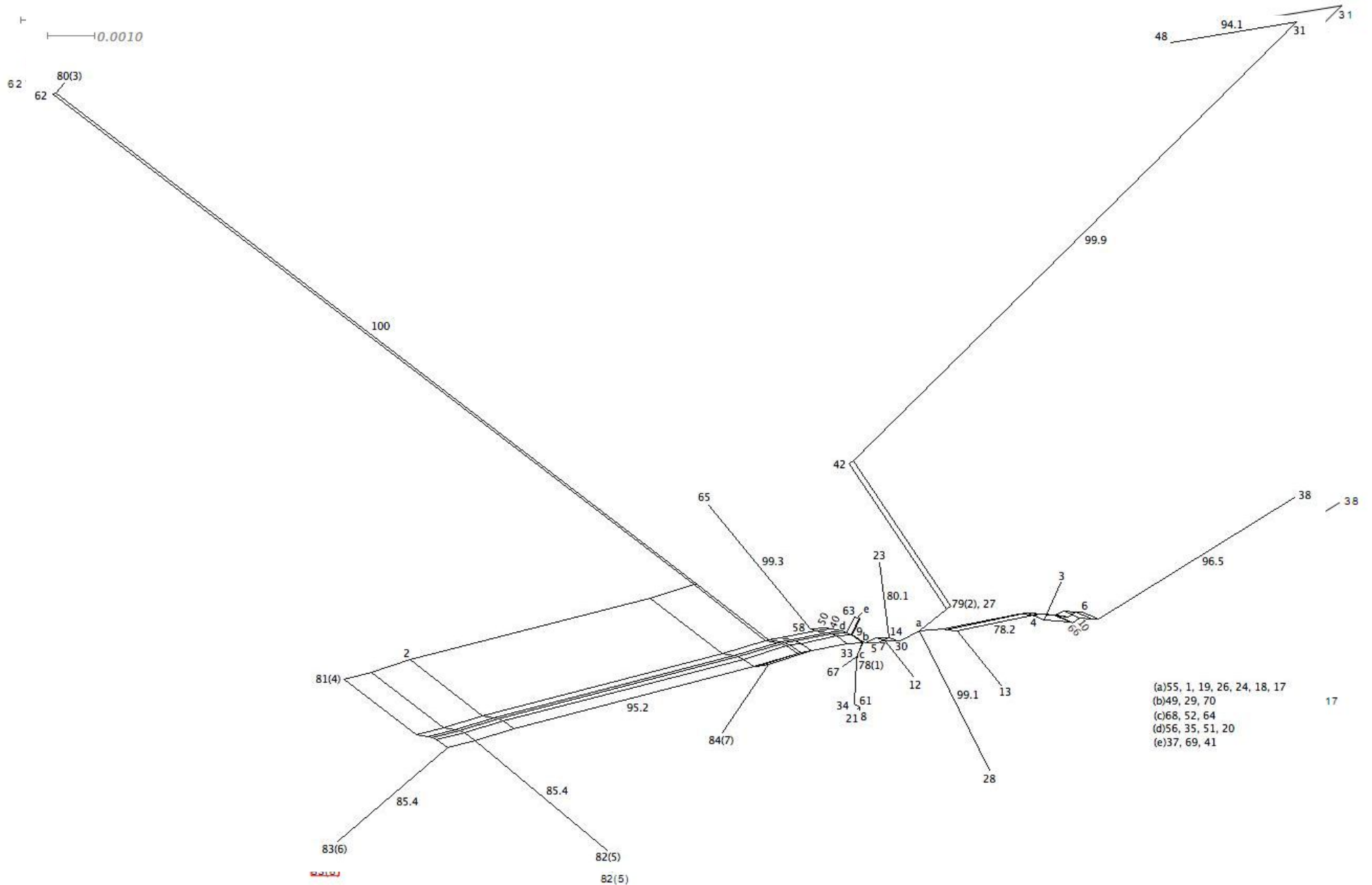


Figura 12. Rede filogenética gerada pelo Splitstree utilizando a região IGS dos diferentes genótipos de *T. asahii*. Valores assinalados nos ramos indicam o bootstrap (1000 pseudoréplicas).

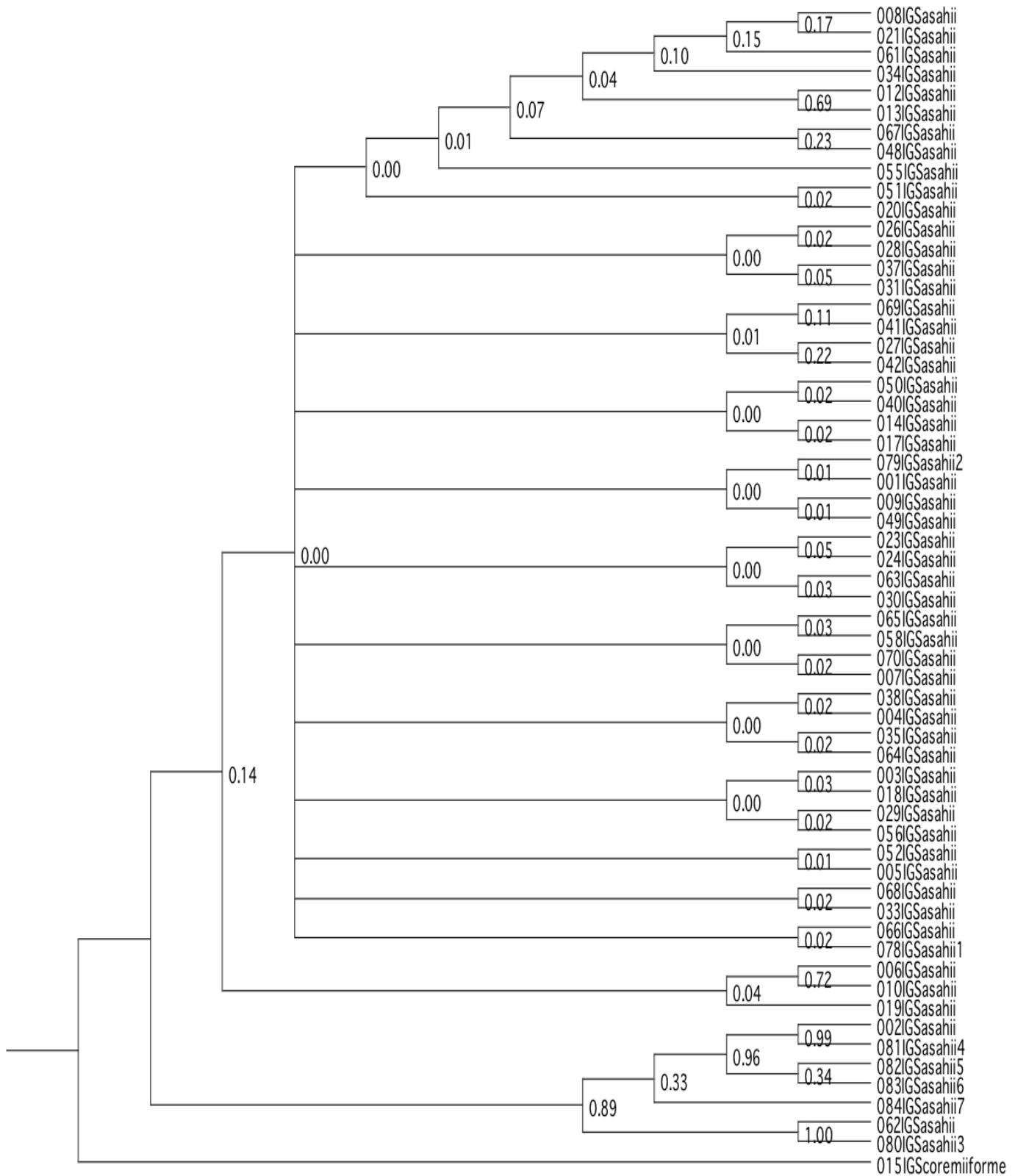


Figura 13. Filogenia dos genótipos de *T. asahii* baseados na análise bayesiana da região IGS. Valores assinalados nos ramos indicam a probabilidade posterior dos ramos.

5.5. Pesquisa de exoenzimas

5.5.1. Pesquisa de proteinase (Aoki et al., 1990; Oksuz et al., 2007)

A atividade da enzima proteinase (Pz) foi detectada em todos os 70 isolados em estudo de virulência, independentemente do local de isolamento (superficial ou profundo).

No grupo de isolados de origem superficial nenhum isolado apresentou atividade da enzima proteinase (Pz) classificado como muito forte. Apenas três isolados (021, 044 e 047) apresentaram atividade de Pz classificada como forte (FRT) (Tabela 12). Neste grupo, 66% (n=26) dos isolados apresentaram atividade de Pz como moderada (MOD) e dez (25,6%) isolados demonstraram Pz fraca (FRC), medições descritas na tabela 12.

Por sua vez, na análise dos isolados de origem profunda, a atividade de proteinase classificada como forte foi encontrada em oito (25%) isolados, 64% (n=20) dos isolados foram classificados com atividade moderada (MOD) e apenas três isolados (9,7%) obtiveram a produção de proteinase classificada como fraca (FRC), dados expostos na tabela 13.

Especificamente nos isolados de cateter, foi observado que dois isolados apresentaram atividade da enzima proteinase classificados como forte (TRI-020 e TRI-027).

O isolado TRI-039 proveniente de urina identificado como *T. debermanium* apresentou atividade de proteinase moderada (Tabela 13).

Tabela 12. Medições das atividades da proteinase dos isolados de *Trichosporon* spp. de origem superficial (pele).

		PROTEINASE								
		Local	COLONIA		HALO		MÉDIA DC	MÉDIA H	Pz	
			D1	D2	P1	P2				
1	TRI-001	superficial	30	34	44	45	38,3	44,5	0,40	FRC
2	TRI-002	superficial	24	29	34	46	38,5	40,0	0,31	FRC
3	TRI-009	superficial	19	20	38	44	30,3	41,0	0,74	MOD
4	TRI-014	superficial	35	39	51	59	37,0	55,0	0,67	MOD
5	TRI-O18	superficial	25	34	55	60	43,5	57,5	0,76	MOD
6	TRI-021	superficial	51	49	50	55	50,0	52,5	0,85	FRT
7	TRI-022	superficial	25	29	42	49	36,3	45,5	0,53	FRC
8	TRI-023	superficial	35	37	54	51	36,0	52,5	0,54	FRC
9	TRI-024	superficial	28	22	44	30	31,0	37,0	0,66	MOD
10	TRI-028	superficial	41	39	63	60	40,0	61,5	0,65	MOD
11	TRI-029	superficial	14	19	28	33	23,5	30,5	0,77	MOD
12	TRI-030	superficial	28	38	55	59	45,0	57,0	0,79	MOD
13	TRI-032	superficial	20	18	34	30	25,5	32,0	0,80	MOD
14	TRI-033	superficial	31	25	49	53	39,5	51,0	0,66	MOD
15	TRI-034	superficial	37	44	51	56	47,0	53,5	0,54	FRC
16	TRI-035	superficial	24	22	42	38	31,5	40,0	0,79	MOD
17	TRI-036	superficial	38	40	45	48	59,0	46,5	0,49	FRC
18	TRI-037	superficial	28	46	63	65	50,5	64,0	0,79	MOD
19	TRI-043	superficial	25	29	45	47	36,5	46,0	0,79	MOD
20	TRI-044	superficial	35	41	44	49	42,3	46,5	0,91	FRT
21	TRI-047	superficial	37	46	43	55	41,5	49,0	0,85	FRT
22	TRI-049	superficial	29	33	59	68	47,3	63,5	0,74	MOD
23	TRI-050	superficial	39	37	61	63	50,0	62,0	0,68	MOD
24	TRI-051	superficial	22	35	60	67	46,0	63,5	0,72	MOD
25	TRI-52	superficial	19	22	59	60	40,0	59,5	0,67	MOD
26	TRI-053	superficial	40	45	68	69	55,5	68,5	0,54	FRC
27	TRI-054	superficial	29	37	55	59	45,0	57,0	0,79	MOD
28	TRI-O57	superficial	30	39	59	64	48,0	61,5	0,78	MOD
29	TRI-058	superficial	23	37	59	67	46,5	63,0	0,74	MOD
30	TRI-059	superficial	25	29	59	64	44,3	61,5	0,72	MOD
31	TRI-O60	superficial	28	36	60	68	48,0	64,0	0,75	MOD
32	TRI-061	superficial	29	31	55	61	44,0	58,0	0,76	MOD
33	TRI-062	superficial	17	22	49	47	33,8	48,0	0,70	MOD
34	TRI-063	superficial	25	29	45	55	38,5	50,0	0,77	MOD
35	TRI-064	superficial	31	29	59	63	45,5	61,0	0,75	MOD
36	TRI-054	superficial	22	31	68	65	46,5	66,5	0,70	MOD
37	TRI-066	superficial	29	44	62	59	48,5	60,5	0,39	FRC
38	TRI-067	superficial	39	47	58	63	51,8	60,5	0,58	FRC
39	TRI-O70	superficial	37	46	62	67	53,0	64,5	0,48	FRC

NP = não produtora / FRC= fraca / MOD = moderada / FRT = Forte / MTF = Muito Forte

Tabela 13. Medições das atividades da proteinase dos isolados de *Trichosporon* spp. de origem profunda (urina e cateter).

		PROTEINASE								
		Local	COLONIA		COLONIA + HALO		MÉDIA DC	MÉDIA H	Pz	
			X	Y	X1	Y1				
40	TRI-003	urina	35	39	58	55	37,0	56,5	0,65	MOD
41	TRI-004	urina	34	36	50	59	35,0	54,5	0,64	MOD
42	TRI-005	urina	36	38	55	58	37,0	56,5	0,65	MOD
43	TRI-006	urina	34	30	49	57	32,0	53,0	0,73	MOD
44	TRI-007	urina	25	28	50	57	39,0	53,5	0,68	MOD
45	TRI-008	urina	29	31	59	61	30,0	60,0	0,58	FRC
46	TRI-010	urina	33	37	65	59	35,0	62,0	0,56	FRC
47	TRI-011	urina	30	36	60	61	33,0	60,5	0,60	FRC
48	TRI-012	urina	22	24	55	57	23,0	56,0	0,61	MOD
49	TRI-013	urina	28	34	58	58	45,0	58,0	0,78	MOD
50	TRI-015	urina	29	31	57	56	30,0	56,5	0,69	MOD
51	TRI-016	urina	22	25	65	69	23,5	67,0	0,78	MOD
52	TRI-017	urina	29	30	63	64	29,5	63,5	0,69	MOD
53	TRI-031	urina	24	22	59	62	23,0	60,5	0,76	MOD
54	TRI-038	urina	20	19	53	57	19,5	55,0	0,69	MOD
55	TRI-039	urina	21	25	65	69	23,0	67,0	0,76	MOD
56	TRI-040	urina	39	34	48	56	36,5	52,0	0,66	MOD
57	TRI-041	urina	30	28	53	58	29,0	55,5	0,85	FRT
58	TRI-042	urina	25	27	66	68	26,0	67,0	0,70	MOD
59	TRI-048	urina	22	29	44	59	25,5	51,5	0,73	MOD
60	TRI-055	urina	13	16	33	45	14,5	39,0	0,76	MOD
61	TRI-056	urina	37	36	52	68	36,5	60,0	0,61	MOD
62	TRI-045	CBS	22	20	57	64	21,0	60,5	0,84	FRT
63	TRI-046	CBS	27	26	59	60	26,5	59,5	0,87	FRT
64	TRI-068	CBS	18	20	60	67	19,0	63,5	0,94	FRT
65	TRI-069	CBS	25	28	60	68	26,5	64,0	0,82	FRT
66	TRI-025	CBS	30	36	68	69	33,0	68,5	0,81	FRT
67	TRI-019	cateter	25	29	64	62	27,0	63,0	0,77	MOD
68	TRI-020	cateter	19	15	53	67	17,0	60,0	0,89	FRT
69	TRI-026	cateter	20	22	55	58	21,0	56,5	0,77	MOD
70	TRI-027	cateter	25	29	59	64	44,3	61,5	0,92	FRT

NP = não produtora / FRC= fraca / MOD = moderada / FRT = Forte / MTF = Muito Forte

5.2.2. Pesquisa de fosfolipase (Price et al., 1982)

A atividade de fosfolipase foi detectada com menor intensidade no grupo de isolados superficiais. Neste grupo apenas dois isolados (TRI-021 e TRI-021) apresentaram atividade enzimática classificada como forte (FRT). Ainda nesse grupo 19 (48,7%) isolados apresentaram atividade de fosfolipase classificada como moderada (MOD) e 17 (43,5%) isolados apresentaram atividade de Fz fraca (FRC). O isolado (TRI001) foi o único não produtor de fosfolipase, mesmo com a repetição exaustiva dos experimentos (Tabela 14).

A atividade de fosfolipase no grupo de isolados de origem profunda foi classificada como forte em 13 (42%) isolados provenientes de urina e nenhum de cateter. Em 45% (n=14) dos isolados profundos a atividade de fosfolipase foi classificada como moderada. A atividade de Pz forte ocorreu em três isolados e muito forte (MF) ocorreu em um isolado (Tabela 15).

Tabela 14. Medições das atividades da fosfolipase dos isolados de *Trichosporon* spp. de origem superficial.

		FOSFOLIPASE								
		Local	COLONIA		COLONIA + HALO		MÉDIA DC	MÉDIA H	Fz	
			D1	D2	P1	P2				
1	TRI-001	superficial	30	34	44	45	38,3	44,5	0,10	NP
2	TRI-002	superficial	24	29	34	46	38,5	40,0	0,90	FRT
3	TRI-009	superficial	19	20	38	44	30,3	41,0	0,74	MOD
4	TRI-014	superficial	35	39	51	59	37,0	55,0	0,67	MOD
5	TRI-018	superficial	25	44	55	60	46,0	57,5	0,59	FRC
6	TRI-021	superficial	22	55	50	55	38,5	52,5	0,87	FRT
7	TRI-022	superficial	67	88	42	49	61,5	45,5	0,78	MOD
8	TRI-023	superficial	35	37	54	51	36,0	52,5	0,59	FRC
9	TRI-024	superficial	33	27	44	36	35,0	40,0	0,76	MOD
10	TRI-028	superficial	41	39	63	60	40,0	61,5	0,49	FRC
11	TRI-029	superficial	14	19	28	33	23,5	30,5	0,55	FRC
12	TRI-030	superficial	28	38	55	59	45,0	57,0	0,78	MOD
13	TRI-032	superficial	20	18	34	30	25,5	32,0	0,56	FRC
14	TRI-033	superficial	31	25	49	53	39,5	51,0	0,44	FRC
15	TRI-034	superficial	37	44	51	56	47,0	53,5	0,58	FRC
16	TRI-035	superficial	24	22	42	38	31,5	40,0	0,77	MOD
17	TRI-036	superficial	38	40	45	48	42,8	46,5	0,56	FRC
18	TRI-037	superficial	28	46	63	65	50,5	64,0	0,38	MOD
19	TRI-043	superficial	25	29	45	47	36,5	46,0	0,49	FRC
20	TRI-044	superficial	35	41	44	49	42,3	46,5	0,69	MOD
21	TRI-047	superficial	37	46	43	55	41,5	49,0	0,59	FRC
22	TRI-049	superficial	29	33	59	68	47,3	63,5	0,78	MOD
23	TRI-050	superficial	39	37	61	63	50,0	62,0	0,77	MOD
24	TRI-051	superficial	22	35	60	67	46,0	63,5	0,56	FRC
25	TRI-52	superficial	19	22	59	60	40,0	59,5	0,67	MOD
26	TRI-053	superficial	40	45	68	69	55,5	68,5	0,45	FRC
27	TRI-054	superficial	29	37	55	59	45,0	57,0	0,56	FRC
28	TRI-057	superficial	29	33	59	68	47,3	63,5	0,66	MOD
29	TRI-058	superficial	39	37	61	63	50,0	62,0	0,54	FRC
30	TRI-059	superficial	22	35	60	67	46,0	63,5	0,48	FRC
31	TRI-060	superficial	29	33	59	68	47,3	63,5	0,65	MOD
32	TRI-061	superficial	39	37	61	63	50,0	62,0	0,63	MOD
33	TRI-062	superficial	22	35	60	67	46,0	63,5	0,56	MOD
34	TRI-063	superficial	29	33	59	68	47,3	63,5	0,67	MOD
35	TRI-064	superficial	39	37	61	63	50,0	62,0	0,43	FRC
36	TRI-054	superficial	22	35	60	67	46,0	63,5	0,67	MOD
37	TRI-066	superficial	29	33	59	68	47,3	63,5	0,65	MOD
38	TRI-067	superficial	39	37	61	63	50,0	62,0	0,45	FRC
39	TRI-070	superficial	22	35	60	67	46,0	63,5	0,67	MOD

NP = não produtora / FRC= fraca / MOD = moderada / FRT = Forte / MTF = Muito Forte

Tabela 15. Medições das atividades da fosfolipase dos isolados de *Trichosporon* spp. de origem profunda.

		FOSFOLIPASE								
		ISOLADO	COLONIA		COLONIA + HALO		MÉDIA DC	MÉDIA H	Fz	
			X	Y	X1	Y1				
1	TRI-003	urina	33	24	49	47	28,5	48,0	0,80	MOD
2	TRI-004	urina	30	17	38	44	23,5	60,0	0,99	MF
3	TRI-005	urina	22	15	55	61	18,5	58,0	0,83	FRT
4	TRI-006	urina	18	17	50	57	17,5	53,5	0,68	MOD
5	TRI-007	urina	19	17	68	69	18,0	68,5	0,96	FRT
6	TRI-008	urina	15	24	64	67	19,5	65,5	0,69	MOD
7	TRI-010	urina	29	34	69	69	31,5	69,0	0,89	FRT
8	TRI-011	urina	22	31	62	69	26,5	65,5	0,77	MOD
9	TRI-012	urina	23	25	65	67	24,0	66,0	0,80	MOD
10	TRI-013	urina	22	22	70	66	22,0	68,0	0,67	MOD
11	TRI-015	urina	32	33	55	56	32,5	55,5	0,89	FRT
12	TRI-016	urina	26	39	59	52	32,5	55,5	0,54	FRC
13	TRI-017	urina	21	21	65	65	21,0	65,0	0,89	FRT
14	TRI-031	urina	39	37	54	51	38,0	52,5	0,72	MOD
15	TRI-038	urina	17	22	61	66	19,5	63,5	0,90	FRT
16	TRI-039	urina	12	24	66	69	18,0	67,5	0,79	FRT
17	TRI-040	urina	10	12	58	66	11,0	62,0	0,92	FRT
18	TRI-041	urina	11	21	69	63	16,0	66,0	0,86	FRT
19	TRI-042	urina	23	20	68	59	21,5	63,5	0,66	MOD
20	TRI-048	urina	22	19	67	56	20,5	61,5	0,94	FRT
21	TRI-055	urina	34	22	61	60	28,0	60,5	0,67	MOD
22	TRI-056	urina	13	14	56	67	13,5	61,5	0,87	FRT
23	TRI-045	urina	18	31	55	68	24,5	61,5	0,86	FRT
24	TRI-046	CBS	43	38	63	60	40,5	61,5	0,76	MOD
25	TRI-068	CBS	21	28	67	60	24,5	63,5	0,75	MOD
26	TRI-069	CBS	36	31	68	67	33,5	67,5	0,87	FRT
27	TRI-025	CBS	22	19	39	68	20,5	53,5	0,66	MOD
28	TRI-019	cateter	44	45	68	69	44,5	68,5	0,70	MOD
29	TRI-020	cateter	50	47	52	62	48,5	57,0	0,45	FRC
30	TRI-026	cateter	44	40	44	67	42,0	55,5	0,66	MOD
31	TRI-027	cateter	48	47	55	58	47,5	56,5	0,54	FRC

NP = não produtora / FRC= fraca / MOD = moderada / FRT = Forte / MTF = Muito Forte

5.5.3. Pesquisa de desoxirribonuclease (DNase)

A atividade da enzima DNase foi demonstrada para todos os isolados de origem profunda (n=31) e apenas isolado (RI-001) proveniente de origem superficial não evidenciou produção da enzima desoxirribonuclease (DNase). O grupo de isolados superficiais apresentou o seguinte perfil enzimático: dois isolados (5,1%) foram forte produtores de DNase; 19 isolados (48,7%) produtores moderados de DNase e 17 isolados (43,5%) fracamente produtores de DNase.

Os resultados da atividade enzimática do grupo infecção (cateter e urina) demonstraram que 42% (n=13) apresentaram atividade enzimática (Dz) como forte (FRT) situada entre 0,8 e 0,99, outros 14 isolados (45%) apresentaram Dz como moderada (MOD) com valores entre 0,6 e 0,8. Outros três (9,7%) isolados mostraram Dz como fraca e apenas um isolado apresentou atividade de Dz como muito forte com valores iguais ou maiores que 0,99.

Tabela 16. Medições das atividades da DNase dos isolados de *Trichosporon* spp. de origem superficial.

		DNASE								
		Local	COLONIA		HALO		MÉDIA	MÉDIA		Dz
			D1	D2	P1	P2	DC	C+H		
1	TRI-001	superficial	28	31	40	42	29,5	41,0	0,76	MOD
2	TRI-002	superficial	25	38	48	51	44,0	49,5	0,58	FRC
3	TRI-009	superficial	39	37	43	49	38,0	46,0	0,69	MOD
4	TRI-014	superficial	32	38	42	43	35,0	42,5	0,76	MOD
5	TRIO18	superficial	33	36	48	44	34,5	46,0	0,86	FRT
6	TRI-021	superficial	39	41	48	50	40,0	49,0	0,79	MOD
7	TRI-022	superficial	38	37	42	40	37,5	41,0	0,59	FRC
8	TRI-023	superficial	30	38	48	50	34,0	49,0	0,64	MOD
9	TRI-024	superficial	39	35	55	51	37,0	53,0	0,69	MOD
10	TRI-028	superficial	22	25	33	40	23,5	36,5	0,89	FRT
11	TRI-029	superficial	25	33	38	41	29,0	39,5	0,89	FRT
12	TRI-030	superficial	40	31	53	45	35,5	49,0	0,76	MOD
13	TRI-032	superficial	40	46	59	62	43,0	60,5	0,96	FRT
14	TRI-033	superficial	25	31	43	45	28,0	44,0	0,67	MOD
15	TRI-034	superficial	34	45	46	50	39,5	48,0	0,76	MOD
16	TRI-035	superficial	33	32	41	40	32,5	40,5	0,74	MOD
17	TRI-036	superficial	32	30	42	44	31,0	43,0	0,69	MOD
18	TRI-037	superficial	41	40	55	52	40,5	53,5	0,65	MOD
19	TRI-043	superficial	27	33	43	48	30,0	45,5	0,98	FRT
20	TRI-044	superficial	40	36	56	40	38,0	48,0	0,58	FRC
21	TRI-047	superficial	26	30	38	48	28,0	43,0	0,69	MOD
22	TRI-049	superficial	28	38	44	51	33,0	47,5	0,68	MOD
23	TRI-050	superficial	28	35	53	57	31,5	55,0	0,74	MOD
24	TRI-051	superficial	43	44	66	55	43,5	60,5	0,77	MOD
25	TRI-52	superficial	32	37	41	45	34,5	43,0	0,73	MOD
26	TRI-053	superficial	49	43	63	61	46,0	62,0	0,65	MOD
27	TRI-054	superficial	43	40	58	56	41,5	57,0	0,96	FRT
28	TRIO57	superficial	47	48	58	60	47,5	59,0	0,69	MOD
29	TRI-058	superficial	33	38	65	61	35,5	63,0	0,72	MOD
30	TRI-059	superficial	37	33	58	60	35,0	59,0	0,66	MOD
31	TRIO60	superficial	29	33	59	68	47,3	63,5	0,87	FRT
32	TRI-061	superficial	39	37	61	63	50,0	62,0	0,67	MOD
33	TRI-062	superficial	22	35	60	67	46,0	63,5	0,69	MOD
34	TRI-063	superficial	29	33	59	68	47,3	63,5	0,79	MOD
35	TRI-064	superficial	39	37	61	63	50,0	62,0	0,67	MOD
36	TRI-054	superficial	22	35	60	67	46,0	63,5	0,60	FRC
37	TRI-066	superficial	29	33	59	68	47,3	63,5	0,94	FRT
38	TRI-067	superficial	39	37	61	63	50,0	62,0	0,76	MOD
39	TRIO70	superficial	22	35	60	67	46,0	63,5	0,79	MOD

NP = não produtora / FRC= fraca / MOD = moderada / FRT = Forte / MTF = Muito Forte

Tabela 17. Medições das atividades da DNase dos isolados de *Trichosporon* spp. de origem profunda (urina e cateter).

		DNASE								
		Local	COLONIA		HALO		MÉDIA DC	MÉDIA C+H	Dz	
			D1	D2	P1	P2				
40	TRI-003	urina	28	31	40	42	29,5	41,0	0,72	MOD
41	TRI-004	urina	25	38	48	51	44,0	49,5	0,89	FRT
42	TRI-005	urina	39	37	43	49	38,0	46,0	0,83	FRT
43	TRI-006	urina	32	38	42	43	35,0	42,5	0,82	FRT
44	TRI-007	urina	33	36	48	44	34,5	46,0	0,75	MOD
45	TRI-008	urina	39	41	48	50	40,0	49,0	0,82	FRT
46	TRI-010	urina	38	37	42	40	37,5	41,0	0,91	FRT
47	TRI-011	urina	30	38	48	50	34,0	49,0	0,69	MOD
48	TRI-012	urina	39	35	55	51	37,0	53,0	0,70	MOD
49	TRI-013	urina	22	25	33	40	23,5	36,5	0,64	MOD
50	TRI-015	urina	25	33	38	41	29,0	39,5	0,73	MOD
51	TRI-016	urina	40	31	53	45	35,5	49,0	0,72	MOD
52	TRI-017	urina	40	46	59	62	43,0	60,5	0,71	MOD
53	TRI-031	urina	25	31	43	45	28,0	44,0	0,64	MOD
54	TRI-038	urina	34	45	46	50	39,5	48,0	0,82	FRT
55	TRI-039	urina	33	32	41	40	32,5	40,5	0,80	FRT
56	TRI-040	urina	32	30	42	44	31,0	43,0	0,72	MOD
57	TRI-041	urina	41	40	55	52	40,5	53,5	0,76	MOD
58	TRI-042	urina	27	33	43	48	30,0	45,5	0,66	MOD
59	TRI-048	urina	40	36	56	40	38,0	48,0	0,79	MOD
60	TRI-055	urina	26	30	38	48	28,0	43,0	0,65	MOD
61	TRI-056	urina	28	38	44	51	33,0	47,5	0,69	MOD
62	TRI-045	CBS	28	35	53	57	31,5	55,0	0,57	FRC
63	TRI-046	CBS	43	44	66	55	43,5	60,5	0,72	MOD
64	TRI-068	CBS	32	37	41	45	34,5	43,0	0,80	FRT
65	TRI-069	CBS	49	43	63	61	46,0	62,0	0,74	MOD
66	TRI-025	CBS	43	40	58	56	41,5	57,0	0,73	MOD
67	TRI-019	cateter	47	48	58	60	47,5	59,0	0,81	FRT
68	TRI-020	cateter	33	38	65	61	35,5	63,0	0,56	FRC
69	TRI-026	cateter	37	33	58	60	35,0	59,0	0,59	FRC

NP = não produtora / FRC= fraca / MOD = moderada / FRT = Forte / MTF = Muito Forte

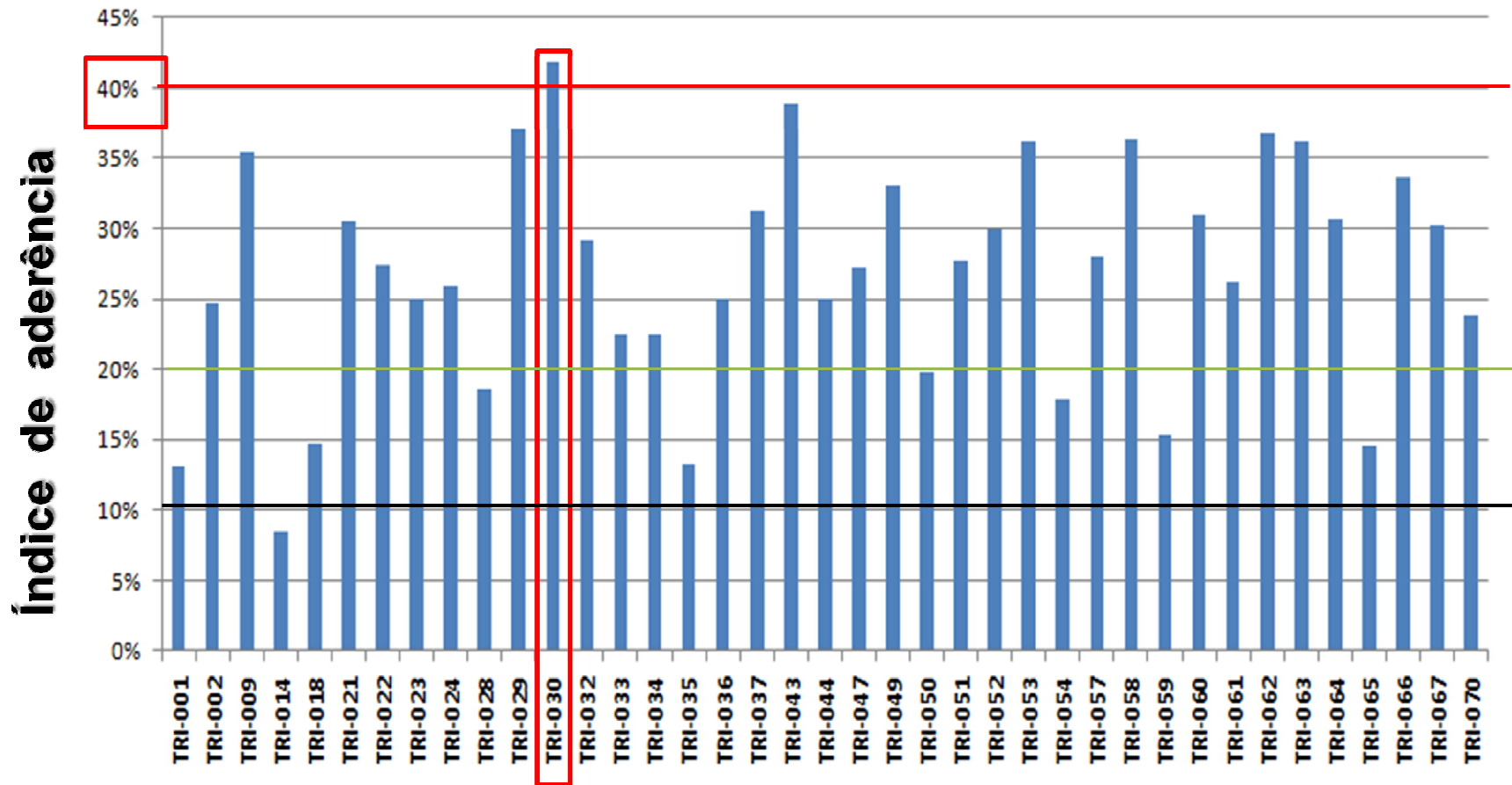
5.6. Ensaio de Adesão (Pires, 1993; Taborda &, Casadevall, 2002 modificados)

Para a determinação do ensaio de adesão de leveduras do gênero *Trichosporon* às células HeLa (carcinoma de ovário humano) dos 70 isolados representativos dos grupos colonização (n=39) e infecção (n=31) foram selecionados. O índice de Aderência (IA) dos isolados de *Trichosporon* spp. em estudo variaram consideravelmente, segundo a fonte de isolamento dos isolados.

Os isolados superficiais apresentaram aderência moderada em 74,35% (n=29), fracamente aderentes em 23,1% (n=9) e apenas um isolado 2,55 % (TRI-014) apresentou IA fraco. O isolado TRI-030 foi o único desse grupo que se apresentou fortemente aderido (Figura 14).

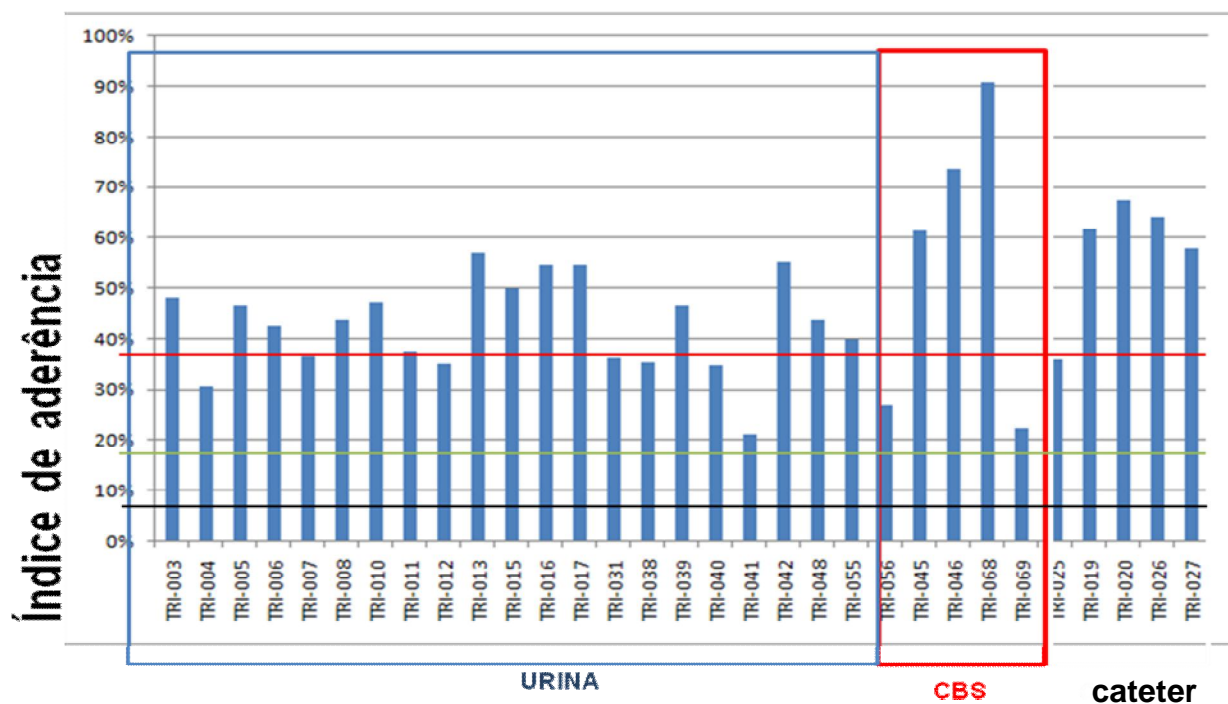
Segundo o sistema de classificação de aderência dentre os isolados de urina apenas o isolado 041 apresentou entre moderada e fraca (IA = 21%). Sete isolados foram denominados como moderados (IA entre 20% e 39%) e a maioria dos isolados de urina 57,14% (n=12) foram classificados como fortes aderentes.

Foi possível observar que os isolados provenientes de cateter (TRI-019, TRI-020, TRI-26 e TRI-027), apresentaram um IA cinco vezes maior que os demais isolados em estudo, sendo todos fortemente aderentes (Figura 15).



IA ≥ 40 % - Aderência Forte
39% < IA > 20% - Aderência Moderada
IA < 20% - Aderência Fraca





- IA igual e maiores que 40% - fortemente aderentes
- IA entre 20% a 39% - aderentes
- IA menor que 20% - fracamente aderentes.

Figura 15. Índice de aderência dos isolados de urina e cateter de *Trichosporon spp.* à células epiteliais (HeLa).

Examinando-se as lâminas provenientes do ensaio de adesão podemos observar o contato das células HeLa com as leveduras do gênero *Trichosporon* pela coloração de Giemsa (Figura 16) e pelo DAPI (Figuras 16, 17 e 18).

Esse contato íntimo entre levedura e célula epitelial promove uma deformação na membrana plasmática (seta figura 15) que foi investigada com maior detalhe nas colorações realizadas com o corante DAPI sob fluorescência e contraste de fases, que apresenta afinidade por estruturas ácidas, mais especificamente o núcleo. Essa depressão na membrana plasmática está bem representada nas figuras 17, 18 e 19 (setas).

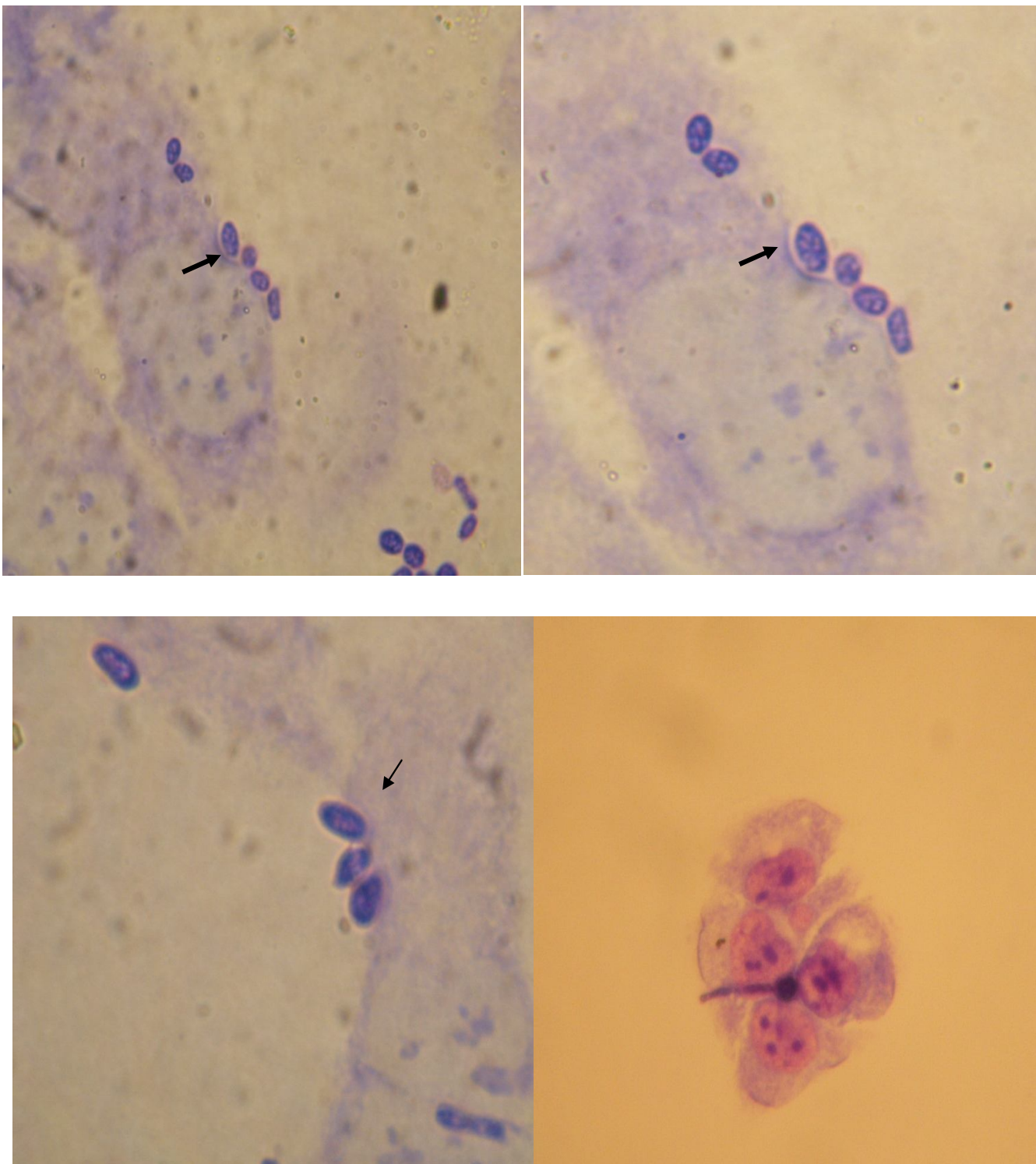


Figura 16. Leveduras do gênero *Trichosporon* e células HeLa coradas com Giemsa (40X)

A



B

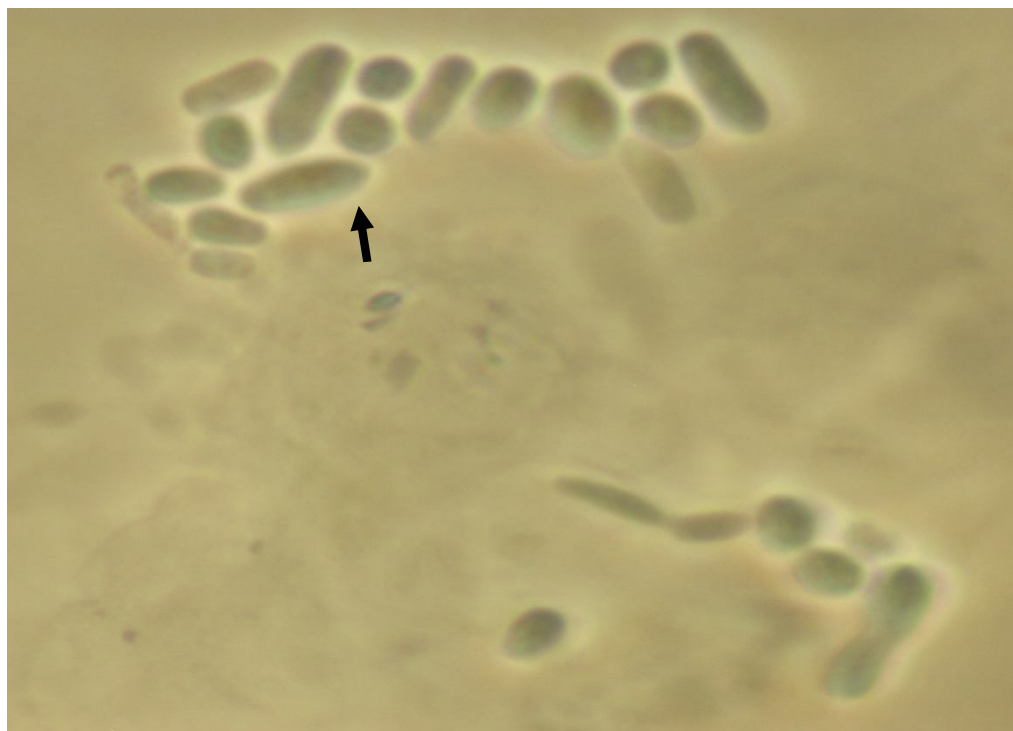


Figura 17. Leveduras do gênero *Trichosporon* e células HeLa coradas com DAPI, visualizadas sobre fluorescência (A) e contraste de fase (B) (40X).

A



B



Figura 18. Leveduras do gênero *Trichosporon* e células HeLa coradas com DAPI, visualizadas sobre fluorescência (A) e contraste de fase (B) (40X).

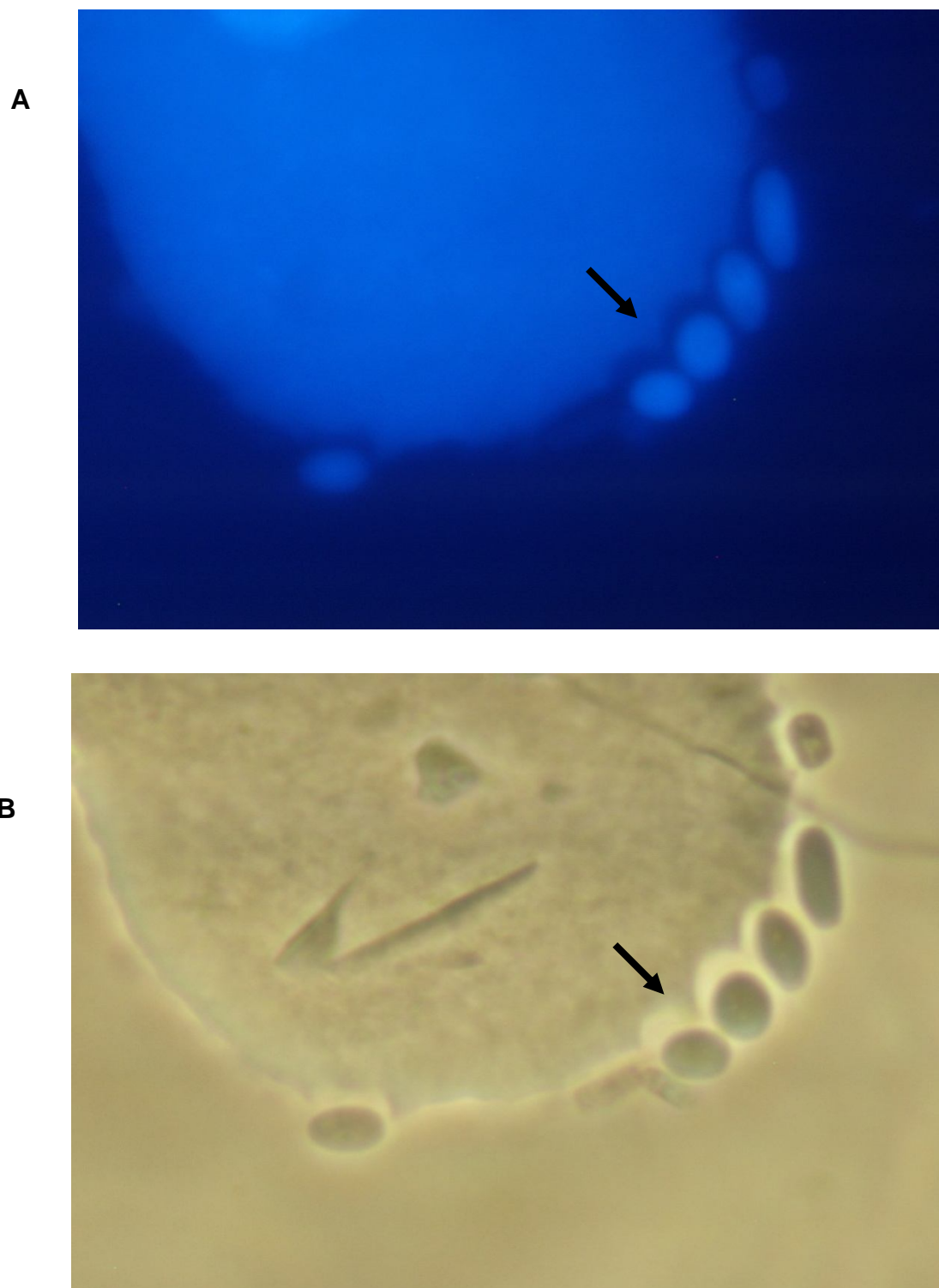


Figura 19. Leveduras do gênero *Trichosporon* e células HeLa coradas com DAPI, visualizadas sobre fluorescência (A) e contraste de fase (B) (40X).

6. DISCUSSÃO

A identificação das leveduras do gênero *Trichosporon* é controversa, fastidiosa e vem sofrendo extensa revisão nos últimos anos, sendo atualmente descritas aproximadamente 78 espécies desse gênero: *T. adenivorans*, *T. adenivorans*, *T. aneurinolyticum*, *T. appendiculare*, *T. aquatile*, *T. arenicola*, *T. asahii*, *T. asahii* var. *asahii*, *T. asteroides*, *T. atlanticum*, *T. balzeri*, *T. bancangense*, *T. beemeri*, *T. behrendii*, *T. beigelii*, *T. beijingense*, *T. brassicae*, *T. capitatum*, *T. coremiiforme*, *T. cutaneum*, *T. cutaneum* var. *cutaneum*, *T. cutaneum* var. *infestans*, *T. cutaneum* var. *multisporum*, *T. debeurmannianum*, *T. dehoogii*, *T. dendriticum*, *T. dermatis*, *T. diddensii*, *T. domesticum*, *T. dulciturum*, *T. equinum*, *T. faece*, *T. fennicum*, *T. figueirae*, *T. fuscans*, *T. gamsii*, *T. giganteum*, *T. granulosum*, *T. guehoae*, *T. hellenicum*, *T. hortae*, *T. infestans*, *T. inkin*, *T. intermedium*, *T. japonicum*, *T. jirovecii*, *T. laibachii*, *T. lignicola*, *T. loboii*, *T. lodderae*, *T. lodderi*, *T. lutetiae*, *T. margaritifera*, *T. maritimum*, *T. melibiosaceum*, *T. merulioides*, *T. minus*, *T. moniliiforme*, *T. montevideense*, *T. mucoides*, *T. multisporum*, *T. niger*, *T. ovoides*, *T. pardi*, *T. penicillatum*, *T. piscium*, *T. porosum*, *T. proteolyticum*, *T. pullulans*, *T. scarabaeorum*, *T. sinense*, *T. smithiae*, *T. sporotrichoides*, *T. terricola*, *T. undulatum*, *T. vadense*, *T. veenhuisii*, *T. veronae*.

Os testes mais usados na rotina de identificação de leveduras de interesse médico são a fermentação de fontes de carbono, o crescimento em fontes de

carbono e nitrogênio, as exigências vitamínicas, a habilidade de crescimento em várias temperaturas, a hidrólise de uréia e a resistência aos antibióticos, além da micro e macro-morfologia (Kurtzman & Fell, 1998), fatores esses sujeitos a variações técnicas e ambientais. As leveduras do gênero *Trichosporon* podem colonizar mucosas, cabelo e região perigenital e ser foco de infecção quando o paciente apresenta fatores predisponentes (Ellner et al., 1993).

O método do quadrado de carpete (Mariat & Adam-Campos, 1967) tem sido amplamente utilizado na micologia médica por sua praticidade e reprodutibilidade. Em nosso trabalho foi constatado a eficácia desse método na investigação de leveduras colonizantes na região perigenital dos 1004 indivíduos do sexo masculino, possibilitando a obtenção de 112 (11,15%) isolados. Ellner e colaboradores (1990) demonstraram que existem evidências da influência do microclima da região inguinal que favorece a colonização por esse grupo de leveduras.

As espécies colonizantes de *Trichosporon* identificadas em nosso estudo correspondem ao preconizado por outros investigadores onde *T. asteroides* e *T. cutaneum* são associados com infecção superficial; *T. ovoides* e *T. inkin* são envolvidos como agentes de piedra-branca do couro cabeludo e genital, respectivamente (Herbrecht, 1993; Sugita et al., 1995, 1998). As espécies de *Trichosporon* isoladas da superfície da pele e identificadas por métodos clássicos foram: *T. inkin*, *T. asahii*, *T. ovoides*, *T. asteroides*, *T. mucoides* e *T. cutaneum*. Esses dados indicam que quase todas as espécies de interesse médico colonizam

a pele de indivíduos saudáveis. Entre as espécies que foram mais isoladas estão em primeiro lugar o *T. asteroides* que predominou com 34 isolamentos e estava presente predominantemente nas faixas etárias de 11-20 (24%), 21-30 (41%) e 31-40 (29%) anos. Em segundo lugar, *T. cutaneum* com 24 isolamentos, estando presente especialmente nas faixas etárias de 21-30 (45%) e 31-49% (41%). Em terceiro lugar, *T. ovoides*, com 17 isolamentos, sendo predominante na faixa etária de 21-30 (41%) anos. Em quarto lugar, *T. inkin*, predominante na faixa etária de 21-30 (50%) anos.

Além disso, a distribuição das espécies identificadas em nosso estudo corrobora com os dados da literatura que apontam *T. asahii* como principal agente causal de infecções profundas de tricosporonose (Sugita et al., 1995; Takamura, et al., 1999; Chowdhary et al., 2004; Rastogi and Nirwan, 2007). Em nosso trabalho *T. inkin* apresentou incidência de 15,38% (n=4), predominando nas faixas etárias 60-70 anos (n=2/ 50%) e 70-80 anos (n=2/50%).

Os métodos fenotípicos para identificação das espécies do gênero *Trichosporon* são amplamente utilizados em laboratórios de rotina na micologia médica e têm como base as características fisiológicas, como assimilação de diferentes fontes de carboidratos, degradação da uréia e caracteres morfológicos (artroconídios, blastoconídios, hifas e pseudo-hifas). Contudo, diversos autores têm relatado a interpretação dos resultados como subjetiva e variável, demonstrando acurácia limitada desses testes (Gueho et al., 1992; Sugita et al., 1994, 1995; Walsh et al., 2004, Chagas et al., 2008).

Na presente investigação a limitação do método fenotípico fica evidente ao observarmos a tabela 06, onde 10 (8,92%) isolados não puderam ser identificados como espécie, sendo apenas classificados dentro do gênero *Trichosporon*. Ainda mais, houve dificuldade na interpretação dos resultados em cerca de 50% dos ensaios realizados. As principais divergências encontradas foram: inconsistência e dificuldade na interpretação de provas de assimilação, aliada à grande variabilidade de resultados na assimilação de açúcares, impossibilitando a definição clara de um perfil bioquímico característico para as espécies do gênero. A identificação fenotípica por sua vez foi capaz de identificar corretamente todos os isolados de referência (CBS) em contraponto com a identificação dos isolados clínicos.

Os resultados da identificação fenotípica são diretamente influenciados pela experiência do profissional micologista. Entretanto, o número de espécies novas de fungos oportunistas que causam doenças no homem aumentou muito nas últimas décadas, tornando sua identificação por meio de métodos convencionais mais difíceis, mesmo para especialistas (Middelhoven, 2003).

No computo geral de dificuldades de identificação do gênero *Trichosporon* deve-se somar a ineficiência dos métodos comerciais disponíveis no mercado. Os métodos comerciais de identificação de leveduras não oferecem resultados satisfatórios para o gênero *Trichosporon*, mesmo aqueles que utilizam 32 tipos diferentes de fontes de carbono, como o ID-32 C (Biomerieux), identificando

apenas ao nível de gênero e/ou no máximo como *T. beigelli* (táxon extinto). Devido a esse cenário, muitos pesquisadores optam pela identificação molecular dessas espécies oportunistas (Sugita et al., 1995; 1999; 2004).

Devido a esses fatos, poucos trabalhos relacionados à identificação fenotípica de isolados clínicos de *Trichosporon* spp. pelo método clássico são encontrados na literatura. Esse fato, provavelmente ocorre devido ao caráter emergente destas leveduras em infecções invasivas e os laboratórios não estão preparados para identificação das espécies deste gênero na rotina laboratorial (Vasta et al., 1993; Hazen et al., 1995). Além disso, poucos trabalhos foram realizados utilizando a metodologia fenotípica para identificação de *Trichosporon* após a subdivisão de *T. beigelli* em pelo menos 7 espécies distintas patogênicas ao homem.

Segundo estudo realizado por Rodriguez-Tudela e colaboradores (2005) utilizando o método clássico de identificação fenotípica foi possível identificar 100 % dos isolados de *Trichosporon* em nível de espécie. Entretanto, não foram totalmente equivalentes com a identificação por sequenciamento da região IGS1. Torna-se evidente que testes fenotípicos são imprecisos e subjetivos.

Uma vez determinado que os resultados provenientes de caracteres fenotípicos de identificação disponíveis para *Trichosporon* spp. geram identificações inconsistentes é necessário sua identificação por meio de técnicas moleculares que se mostram altamente eficientes na identificação dos isolados.

Atualmente preconiza-se duas regiões preferencialmente utilizadas na identificação molecular das espécies de *Trichosporon*, a análise dos espaçadores transcritos internos (ITS) que seria capaz identificar 17 espécies (seis de relevância clínica), além de cinco variedades dentro do gênero *Trichosporon* (Sugita, *et al.*, 1999) e a sequência da região espaçadora intergênica IGS1 (intergenic spacer - IGS1) que possibilita a identificação de 25 espécies de *Trichosporon* (Sugita *et al.*, 2002; Rodriguez-Tudela *et al.* (2005).

Neste contexto, o DNAr tem sido mais utilizado pelo fato de apresentar múltiplas cópias no genoma, não codificar proteínas, cópias em “tandem” podem ser tratadas como um gene único e está presente em todos os organismos, compartilhando assim a mesma origem evolutiva (Guarro *et al.*, 1999).

A região ITS não tem poder discriminatório suficiente para permitir a identificação de todos os isolados de *Trichosporon* em nível de espécie (Sugita *et al.*, 2002). A análise comparativa das sequências de nucleotídeos sugere que estas variações são maiores na região IGS1 do que nas regiões de ITS. Os resultados das nossas análises corroboram com os dados da literatura, a região IGS foi capaz de identificar 100% dos isolados em nível de espécie; a região ITS por sua vez não conseguiu identificar em nível de espécie 03 isolados clínicos superficiais e uma cepa referência com valores de e-value(s) idênticos (Tabela 9).

A qualidade das sequências de nucleotídeos obtidas dos isolados em estudo para a região IGS1 e ITS 1 e 2 apresentou escore de Phred muito variável, indo de 42.53 Err/10kb até 6570 Err/10kb. A qualidade da sequência gerada pode ser um dos motivos pela não identificação de 3 isolados quando analisado pelo ITS. Apesar dessa grande variação no escore de Phred foi possível a identificação das espécies uma vez que o E-value é altamente satisfatório em todas as amostras de DNA, ou seja, todos os isolados apresentaram E-value igual ou bastante aproximado a zero. Isso indica que estas sequências não se alinharam ao acaso quando comparadas com sequências depositadas no BLAST. Apenas na região IGS, em três ocasiões (TRI-023, TRI-024 e TRI-030) o valor de E-value não foi zero.

Ainda por análise dos resultados obtidos com o sequenciamento da região IGS1 identificamos um isolado de *T. debeurmannianum* (TRI-039), sendo este o primeiro relato desta espécie como causadora de infecção urinária descrito na literatura. Vale ressaltar que é possível que este isolado não tenha sido descrito anteriormente como agente de infecção urinária em humanos, devido à dificuldade dos laboratórios de rotina para identificação desta espécie utilizando ferramentas fenotípicas. Contudo, é importante ressaltar que antes de 1992 a maioria dos isolados de *Trichosporon* spp. era apenas considerada como *T. beigelli* (Guého et al., 1992).

Com relação aos 10 isolados de *Trichosporon* que não foram identificados por métodos fenotípicos (Tabela 6) foram satisfatoriamente identificados pelo sequenciamento da região IGS, e nove correspondem à espécie *T. ashaii* e um *T.*

inkin (Tabela 8), evidenciando novamente a extensa superioridade da identificação genotípica sobre os métodos clássicos.

T. debeurmannianum anteriormente classificado como *Cryptococcus humicola* foi reclassificado por Sugita e colaboradores (2001), sendo descritos 2 isolados (CBS 1896 e CBS 1897) provenientes de secreções brônquicas. Não foram encontrados relatos dessa espécie de *Trichosporon* na literatura.

Recentemente, Sugita e colaboradores (1998, 1999, 2002) realizaram um extenso trabalho ao analisar os espaçadores internos transcritos (ITS) e a região intergênica (IGS1) de *Trichosporon* spp. Os autores concluíram que IGS1 é superior ao ITS para identificar as espécies do gênero *Trichosporon*, especialmente aquelas espécies filogeneticamente muito próximas. Além disso, eles demonstraram que IGS1 pode ser usado como ferramenta epidemiológica, uma vez que esses autores descrevem 5 genótipos diferentes em *T. asahii*. Alguns genótipos foram especificamente associados com o Japão (genótipos 1, 2 e 4) e outros com os Estados Unidos (genótipos 3 e 5) (Sugita et al., 2002). Baseados nesses achados estudamos o polimorfismo de sequência de IGS1 dos isolados de *T. asahii* identificados nesse trabalho para verificar quais os genótipos são predominantes em nosso país, especificamente no Estado de São Paulo.

Rodriguez-Tudela e colaboradores (2007) avaliaram o polimorfismo das sequências de IGS-r de 18 isolados de *T. asahii* provenientes da Espanha, Argentina e Brasil, juntamente com 43 sequências da região IGS depositadas no

GenBank. Neste trabalho seis genótipos foram detectados em vez de 5 genótipos descritos anteriormente por Sugita e colaboradores (2002) . O genótipo 1 foi o mais encontrado em 57,3% de todos os isolados, seguido pelo genótipo 3 (14,7%) e o genótipo 5 (13,1%). As cepas espanholas tinham membros em todos os genótipos, exceto no genótipo 2, enquanto os isolados provenientes da America do Sul foram agrupados com os genótipos 1, 3 e 6. Os resultados de Rodriguez-Tudela et al. (2007) indicam que os genótipos estão presentes em pelo menos 2 países sugerindo uma distribuição mundial. Por outro lado, o genótipo 6 não havia sido descrito anteriormente, mas esse genótipo era composto apenas por 2 cepas provenientes da America do Sul, isoladas de abscessos subcutâneos e da pele.

Chagas e colaboradores (2009) estudaram a distribuição das espécies e a frequência dos genótipos de *T. asahii* baseado em sequenciamento IGS1 DNAr, de 22 isolados a partir de culturas de sangue, e verificaram que a maioria dos isolados pertencia ao genótipo 1 (86,7%), um isolado pertencia ao genótipo 3 e outro isolado pertencia ao genótipo 4, além de relatarem o primeiro isolado de *T. asahii* pertencente ao genótipo 4 na América do Sul. Chagas e colaboradores (2009) não incluíram genótipo 6 na análise porque sequências IGS1 para este genótipo não estavam disponíveis do banco de dados GenBank, quando da análise. Assim a classificação de genótipos de *T. asahii* demonstrou ser uma ferramenta epidemiológica de grande utilidade.

Nossos resultados estão de acordo com os de Chagas e colaboradores (2009), uma vez que também foram encontrados, tanto na análise em rede quanto na bayesiana um isolado pertencente ao genótipo 3 e um pertencente ao genótipo

4. Não foi encontrado nenhum isolado pertencente aos genótipos 5, 6 e 7 em ambas as análises. Os outros 50 isolados são pertencentes ao genótipo 1 ou 2, porém é impossível determinar qual isolado pertence a qual genótipo uma vez que não existe suporte estatístico para tal afirmação. Uma explicação possível para tal fato é uma similaridade de mais de 98% entre os genótipos 1 e 2. Como nesta tese foram utilizados métodos filogenéticos mais estridentes (análise bayesiana ao invés de neighbour joining), a separação dos isolados nesses dois genótipos não possui suporte estatístico suficiente (mais de 95% de *bootstrap* ou 0,95 de probabilidade *a posteriori*). Outra possibilidade para o pequeno suporte estatístico é o baixo escore de Phred para muitas dessas sequências. Apesar desse escore ter sido suficiente para a definição da espécie, este não é suficiente para identificar em qual genótipo o isolado pertence. Uma vez que os dois genótipos são muito similares, qualquer pequeno erro de sequência é capaz de dificultar a análise e “embaralhar” os isolados entre os genótipos 1 e 2.

A patogenicidade ou virulência de um microrganismo é definida como sua capacidade de determinar doença, que é mediada por múltiplos fatores. Apesar de certos aspectos da virulência serem determinados geneticamente, eles são expressos pelos microrganismos apenas quando existem condições ambientais favoráveis, tais como teor nutricional, atmosfera de oxigênio e temperatura. Essas condições são específicas para cada microrganismo e para cada isolado de determinado agente (Ghannoum & Radwan, 1990).

Os fatores de virulência que permitem *Trichosporon* spp. causar infecção sistêmica em seres humanos não são conhecidos, porém outras diferenças entre isolados invasivos obtidos a partir de locais profundos versus superficiais foram relatados anteriormente, como a variabilidade na macro e micromorfologia de *Trichosporon* sp., em função da sua origem (Lee et al., 1990). Os isolados que causam doença invasiva também têm demonstrado expressar diferentes perfis isoenzimáticos daquelas expressas por isolados não invasivos (Kemker et al., 1991).

Os estudos relacionados aos fatores associados à virulência nas diferentes espécies patogênicas de fungos têm trazido consideráveis contribuições para o estudo da patogênese das infecções. A produção das enzimas extracelulares, (proteinase, fosfolipase, lipase e DNase) estão diretamente relacionadas com a virulência desses microrganismos (Gácsér et al., 2007). No entanto, existem poucos trabalhos na literatura a respeito das características de expressão da atividade enzimática por isolados de *Trichosporon* spp.

As lipases são enzimas responsáveis pela hidrólise dos triglicerídeos, conseqüentemente a produção de glicerídeos e ácidos graxos livres; as fosfolipases atuam sobre os fosfolipídeos presentes nas membranas celulares. Os achados obtidos na presente investigação sugerem que lipase e fosfolipase sejam as principais enzimas produzidas por *Trichosporon* spp. A literatura considera lipase um importante fator relacionado à patogenicidade de outros fungos Basidiomycetes como as leveduras do gênero *Malassezia* (Ran et al., 1993;

Gandra et al., 2006).

Em nosso estudo, isolados obtidos a partir de {urina e cateter} produziram quantidades significativamente maiores de exo-proteinases do que os obtidos a partir de fonte superficial (pele). Essas exoenzimas contribuem para a invasividade das células do hospedeiro por inúmeros gêneros de leveduras e são divididas em duas grandes famílias, proteinases (PEA) e fosfolipases (PL). Ghannoum et al. (2000) demonstraram que a fosfolipase é necessária para a virulência em modelo animal de candidíase, onde uma cepa com gene suprimido, produzindo menos fosfolipase *in vitro*, foi menos virulenta (40% de mortalidade versus 100% tipo selvagem). Em modelos animais de candidíase invasiva e deleção de genes sap 1- 6, responsáveis pela produção de proteinases, resulta na atenuação da virulência.

Alguns autores relatam que, *in vitro*, a inibição da proteinase reduz a capacidade de adesão de leveduras de *C. albicans* às células epiteliais (Borg & Rüchel, 1998; El-maghrabi et al., 1990; Ollert et al., 1993; Sullivan et al., 1995). Em nosso trabalho observou-se que os isolados provenientes de cateter foram fortemente aderentes e também apresentou forte produção de proteinase, o que não ocorreu em relação às amostras isoladas de urina e pele. Resultados semelhantes foram observados por Melo (2003) e Pires et al., (2001) quando estudaram outros fungos, como *C. albicans*.

A produção de enzimas extracelulares como proteinase e fosfolipase estão

entre os fatores de virulência muito estudados em outros gêneros de leveduras, especialmente *Candida* spp. Pires e colaboradores (1996) estudando 50 cepas de *C. albicans*, isoladas de lesões bucais de pacientes portadores de HIV, observaram que 96% delas eram produtoras de proteinase e 90% produziam também fosfolipase. Em nossos ensaios todos os isolados testados foram produtores de proteinase e de Dnase, variando apenas quanto à quantidade dessas enzimas expressas. Nessa parte do estudo pesquisou-se a produção das enzimas DNase, proteinase e fosfolipase para o gênero *Trichosporon* com o objetivo de correlacionar esses fatores de virulência e sua incidência em locais invasivos (urina e cateter) ou superficiais (pele de indivíduos sadios).

A morfogênese é outro fator de virulência e se refere à transição entre as células unicelulares de levedura e crescimento filamentosos. Assim como descrito por Calderone & Fonzi (2001), leveduras do gênero *Trichosporon*, assim como *C. albicans*, pode converter reversivelmente células unicelulares de levedura em pseudohifas ou hifas verdadeiras. Assim, estas leveduras são capazes de crescer isotropicamente (levedura) ou apicalmente (hifa e pseudohifa) e são mais adequadamente definidas como polimórficas quanto ao seu padrão de crescimento.

Assim como outros agentes patogênicos, virulência em *Trichosporon* sp. inclui reconhecimento pelo hospedeiro. Na ligação do fungo às células hospedeiras, proteínas celulares do hospedeiro ou competição

microbianas (co-agregação) provavelmente impedem ou ao menos reduz o grau de depuração com o anfitrião.

Várias enzimas de degradação são capazes de promover a virulência. Intuitivamente, a invasão deverá ser facilitada pela transição entre o estado leveduriforme para o crescimento filamentosos (morfogênese), em comparação ao crescimento isotrópico (“single”- célula, levedura).

Estudos mais aprofundados sobre a adesão em *Trichosporon* spp. ainda necessitam de modelos mais detalhados, como os já existentes para *C. albicans*, que apresentam isolados avirulentos ou mutantes, que não apresentem ligação às várias proteínas da matriz extracelular (ECM) de células de mamíferos, tais como fibronectina (FN), laminina, fibrina e colágeno (Ghannoum (2000).

Nem sempre todas as etapas de virulência são cumpridas por um microrganismo, sendo requisito básico para o estabelecimento de uma infecção que o patógeno entre em contato com a camada que recobre a superfície epitelial da mucosa do hospedeiro. A aderência permanente entre o microrganismo invasor e o tecido do hospedeiro requer o estabelecimento de ligações específicas entre estruturas complementares existentes na superfície do patógeno e da célula epitelial (Ghannoum & Radwan, 1990).

O evento inicial na patogênese de doenças infecciosas é a adesão microbiana aos tecidos do hospedeiro. Alguns microrganismos não-invasivos

permanecem aderidos à superfície hospedeira enquanto outros utilizam essa adesão como a primeira etapa para a invasão tecidual. A adesão de patógenos à superfície de células eucarióticas é mediada por macromoléculas denominadas adesinas (estruturas da superfície do microrganismo que interagem com receptores específicos nas células eucarióticas).

Em muitos trabalhos foi reconhecida a importância da compreensão do processo de adesão microbiana, particularmente no nível bacteriano, havendo necessidade de estudos mais aprofundados sobre leveduras, em especial nos gêneros de leveduras emergentes (Jabra-Rizki et al., 2001).

Este estudo reforça a importância de identificar corretamente os isolados clínicos de *Trichosporon*, especificamente ao nível de espécie. Assim como os autores têm descrito na literatura foi possível demonstrar que a identificação fenotípica apresenta resultados inconsistentes, principalmente nas espécies com perfil fisiológico muito similar, produzindo na maioria das vezes resultados inconclusivos ou presuntivos.

Documentamos que espécies de *Trichosporon* provenientes de colonização e de infecções de urina e de cateter apresentam grande diversidade e para atingirmos essa informação foi imprescindível a utilização de ferramentas moleculares. Sugerimos que os laboratórios de micologia médica devam concentrar seus esforços na capacitação de pessoal especializado para identificar ao nível molecular os agentes das micoses invasivas, podendo tornar a pesquisa

epidemiológica em um instrumento mais apurado. Conseqüentemente, a biologia molecular fornecerá dados precisos e imprescindíveis na formação de uma base racional consistente para as investigações clínicas. Ressaltamos ainda que, apenas de posse das ferramentas moleculares foi possível identificar a espécie *T. debermanianum* e descrevê-la como primeiro relato de infecção urinária dessa espécie na literatura, fato que ilustra bem a subscrição de espécies fúngicas quando baseados apenas em fatores fisiológicos. Em qualquer caso, é altamente recomendável enviar os isolados deste gênero envolvidos em infecções humanas, a um laboratório de referência devendo ser devidamente identificado por meio de sequenciamento de IGS1.

7. CONCLUSÕES

1. O método de identificação fenotípica não foi suficiente para identificação final em nível de espécie de todos os isolados clínicos incluídos no presente estudo;

2. O seqüenciamento das regiões IGS1 dos isolados de *Trichosporon* foi suficiente para a identificação de todos os isolados clínicos incluindo espécies geneticamente relacionadas;

3. O isolamento de *T. debeurmannianum* isolado de urina demonstra que essa espécie é capaz de adaptar-se ao hospedeiro humano causando doença invasiva;

4. O grupo de isolados de origem profunda (urina e cateter) demonstrou ser mais virulento que o grupo de isolados superficiais, segundo análise dos fatores de virulência.

5. De modo geral, nossos resultados permitem sugerir que é de grande relevância clínica que os laboratórios de Micologia Médica se capacitem para realizar a identificação até a espécie por métodos moleculares. Mais estudos clínicos e epidemiológicos são ainda necessários para que seja possível melhor caracterizar a epidemiologia destes agentes emergentes de infecção oportunística.

8. REFERENCIAS BIBLIORAFICAS

Almeida, H.L., Rivitti, E.A. and Jaeger R.G. 1990. White piedra: ultrastructure and a new microecological aspect. *Mycoses* **33**: 491-7.

Anaissie, E., Gokoslan, A., Hachem and R., Rubin, R. 1992. Azole therapy for Trichosporonosis: clinical evaluation for eight patients, experimental therapy for murine infection, and review. *Clin. Infect. Dis.* **15**: 781-7.

Ando, M., Arima, K., Yoneda, R. and Tamura, M. 1991. Japanese summer-type hypersensitivity pneumonitis. Geographic distribution, home environment, and clinical characteristics of 621 cases. *Am. Rev. Respir. Dis.* **144**: 765-9.

Ando, M., Sakata, T., Yoshida, K., Yamasaki, H., Araki, S., Onoue, K. and Shinoda, T. 1990. Serotype-related antigen of *Trichosporon cutaneum* in the induction of summertime hypersensitivity pneumonitis: correlation between serotype of inhalation challenge-positive antigen and that of the isolates from patient's homes. *J. Allergy Clin. Immun.* **85**: 36-44.

Aoki S, Ito-Kuwa S, Nakamura Y, Masuhara T. 1990. Comparative pathogenicity of wild type strains and respiratory mutants of *Candida albicans* in mice. *Zentralbl Bakteriol* **273**:332-43.

Araújo, A.J.G., Bastos, O.M.P., Souza, M.A.J. and Oliveira, J.C. 2003. Ocorrência de onicomicose em pacientes atendidos em consultórios dermatológicos da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. *An. Bras. Dermatol.* **78**: 445-55.

Avram, A., Buot, G., Binet, O., Gracia, A.M. and Cesarini, J.P. 1987. Clinical and mycological study of 11 cases of genitopubic trichosporosis nodosa (white piedra). *Ann. Dermatol. Venereol.* **114**: 819-27.

Barchiesi, F., Morbiducci, V., Ancarani, F., Arzeni, D. and Scalise, G., 1993. *Trichosporon beigelii* in an AIDS patient. *AIDS.* **7**: 139-40.

Bassetti, D. 2004. *Trichosporon asahii* infection treated with caspofungin combined with liposomal amphotericin B. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**: 575-7.

Batra R., Boekhout T., Guého E., Cabañes F.J., Dawson T.L. Jr, Gupta A.K. 2005. *Malassezia* Baillon, emerging clinical yeasts. *FEMS Yeast Res.* **5**:1101-13.

Beck-Sague, C.M., Jarvis, T.R. 1993. The National Nosocomial Infections Surveillance System. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States. *J. Infect.Dis.* **167**:1247-51.

- Behrend, G.** 1890. Ueber Trichomycosis nodosa (Juhel-Rénoy): Piedra (Osorio). Berlin. Klin. Wschr. **27**:464-7.
- Benson, P.M., Lapins, N.A. and Odom, R.B.** 1983. White piedra. Arch Dermatol. **119**:602-4.
- Beurmann, L., Gougerot, H. and Vaucher H.,** 1940. Oidiomycose gommeuse, ulcéreuse, disséminée. Mycose nouvelle, due à un parasite nouveau: *Oidium cutaneum* (ancien groupe des Blastomycoses). Rev. Méd. **30**: 937-58.
- Borg, M., Ruchel, R.** 1998. Expression of extracellular proteins by proteolytic *Candida* spp. during experimental infection of oral mucosa. Infect. Immun., **56**: 626-631.
- Brito, A.C. and Costa, C.A.** 1966. "Piedra" em Belém do Pará. An. Bras. Dermatol. **41**:227-8.
- Calderone R.A., Fonzi W.A.** 2001. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends Microbiol. **9**:327-35.
- Carneiro, J.A., Alonso, A.M. and Araújo, F.A.** 1973. Novos casos de Piedra branca genital (PBG). An. Bras. Dermatol. **48**: 133-6.
- Chagas-Neto, T. C., Chaves, G. M. and Colombo, A. L..** 2008. Update on the genus *Trichosporon*. Mycopathol. **166**:121–32.
- Guarro, J., Gené, J. and Stchigel, A.M.** 1992. Developments in fungal taxonomy. Clin. Microbiol. Rev. **12**:454-500.
- Cohen, M.L.** 2000. Changing patterns of infectious disease. Nature. **17**; **406**:762-7.
- Cox, G. M. and Perfect, J. R.** 1999. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and *gattii* and *Trichosporon* species. In: Ajello, L.; Hay, R.J. Topley & Wilson's: microbiology and microbial infections. **9. ed.** London: Oxford University Press, p. 460-84.
- De Hoogs, G.S., Guarro, J., Gene, J. and Figueras, M.J.** 2000. Atlas of Clinical Fungi. **2.ed.** Rio de Janeiro: Guanabara.
- Diniz, M.L. and Souza Filho, J.B.** 2005. Estudo de 15 casos de piedra branca observados na Grande Vitória (Espírito Santo-Brasil) durante cinco anos. Na. Bras. Dermatol. **80**: 49-52.
- Efron E.H.** 1979. Bootstrap methods: another look at the jackknife. Annals Stat., **7**: 1–26.

Ellner, K., McBride, M. E., Rosen, T. and Berman, D. 1993. Prevalence of *Trichosporon beigeli*. Colonization of normal perigenital skin. J. Med. Vet. Mycol., **29**: 99-103.

El-Maghrabi, E.A., Dixon, D.M. and Burnett, J.W. 1990. Characterization of *C. albicans* epidermolytic protease and their role in yeast-cell adherence to keratinocytes. Clin. Exp. Dermatol., **15**: 183-91.

Ewing, B. and Green, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities, Genome Res. **8**: 186-94.

Febré, N., Silva, V., Medeiros, E., Wey, S.B., Colombo, A.L. and Fischman, O. 1999. Microbiological characteristics of yeasts isolated from urinary tracts of intensive care unit patients undergoing urinary catheterization. J Clin Microbiol. **37**: 1594-6.

Felsenstein J. 1998. Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. Annu Rev Genet. **22**:521-65.

Fischman, O., Camargo, Z.P. and Meireles, M.C.A. 1980. Genital white piedra: an emerging new fungal disease? Proceedings of the Fifth International Conference on the Mycoses. Superficial, cutaneous, and subcutaneous infections. Caracas, Venezuela. Pan American Health Organization. Scientific publication no. **396**: 70-6.

Flemming, R.V., Walsh, T.J. and Anaissie, E.J. 2002. Emerging and less common fungal pathogens. Infect. Dis. Clin. N. Am. **16**: 915-33.

Fusaro, R.M. and Miller, N.G. 1984. Onychomycosis caused by *Trichosporon beigeli* in the United States. J. Am.Acad.Dermatol., **11**: 747.

Gandra, R. F., Simão, R. C. G., Matsumoto, E. F., Silva, B. C. M. Ruiz, L. S., Silva E. G. Gambale, W. and Paula, C. R. 2006. Genotyping by RAPD-PCR analyses of *Malassezia furfur* strains from pityriasis versicolor and seborrhoeic dermatitis patients. Mycopathologia, **162**: 273-80.

Garcia-Martos, P., Dominguez, I., Marin, P., Garcia-Agudo, R., Aoufi, S. and Mira, J. 2001. Antifungal susceptibility of emerging yeasts pathogens. Enferm. Infect. Microb. Clin. **19**: 249-56.

Ghannoum, M.A. 2000 Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clin. Microbiol. Rev. **13**: 122-43

Ghannoum, M.A. and Radwan, S.S. 1990. *Candida* adherence to epithelial cells. New York: CRC Press.C

- Gondim-Gonçalves, H., Mapurunga, A.C.P., Melo-Monteiro, C., Lowy, G., and Lima, A.A.B.** 1991. Piedra branca - revisão de literatura a respeito de três casos. *Rev. Bras. Med.* **8**: 541-4.
- Gordon, D., Abajian, C. and Green, P.** 1998. Consed: a graphical tool for sequence finishing, *Genome Res.* **8**: 195-202.
- Groll, A.H. and Walsh, T.J.** 2001. Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats. *Clin. Microbiol. Infect.* **7(supp 2)**: 8-24.
- Guého, E., De Hoogs, G.S. and Smith, M.T.** 1992. Neotypification of the genus *Trichosporon*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **61**:285-8.
- Guého, E., Improvisi, L., De Hoog, G. S. and Dupont, B.** 1994. *Trichosporon* on humans: a practical account. *Mycoses*, **37**: 3-10.
- Haupt, H.M., Merz, W.G., Beschorner, W.E., Vaughan, W.P. and Saral, R.** 1983. Colonization and infection with *Trichosporon* species in the immunosuppressed host. *J. Infect. Dis.* **47**:199-203.
- Henwick, S., Henrickson, K., Storgion, S.A. and Leggiadro, D.J.** 1992. Disseminated neonatal *Trichosporon beigelii*. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **11**:50-2.
- Herbrecht, R., Koenig, H., Waller, J., Liu, K. L. and Guého, E.** 1993. *Trichosporon* infections: clinical manifestations and treatment. *J. Mycol. Méd.*, **3**: 129-36.
- Hoy, J., Hsu, K.C., Rolston, K., Hopfer, R.L., Luna, M. and Bodey, G.P.** 1986. *Trichosporon beigelii* infection: a review. *Rev. Infect. Dis.* **8**:959-67.
- Hube, B., Sanglard, D., Odds, F.C., Hess, D., Monod, M., Schafer, W. Brown, A.J. and Gow N.A.,** 1997. Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes SAP1, SAP2, and SAP3 of *Candida albicans* attenuates virulence. *Infect. Immun.* **65**: 3529–38
- Huelsenbeck J.P. and Ronquist F.** 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics.* **17**:754-5.
- Huson DH, Bryant D.** 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol.* **23**:254-67
- Huson DH.** 1998. SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data. *Bioinformatics.* **14**:68-73.

- Ichikawa, T., Sugita, T., Wang, L., Yokoyama, K., Nishimura, K. and Nishikawa, A.** 2004. Phenotypic switching and β -N-Acetylhexosaminidase activity of the pathogenic yeast *Trichosporon asahii*. *Microbiol. Immunol.*, **48**: 237-42.
- Kalter, D.C., Tschen, J.A., Cernoch, P.L., McBride, M.E., Sperber, J., Bruce, S. and Wolf J.E. Jr.** 1986. Genital white piedra: epidemiology, microbiology, and therapy. *J. Am. Acad. Dermatol.* **14**:982-93.
- Kataoka-Nishimura, S., Akiyama, H., Saku, K., Kashiwa, M., Mori, S., Tanikawa, S., Sakamaki, H. and Onozawa, Y.** 1998. Invasive infection due to *Trichosporon cutaneum* in patients with hematologic malignancies. *Cancer.* **82**:484-7.
- Kemker, B. J., P. F. Lehmann, J. W. Lee, and T. J. Walsh.** 1991. Distinction of deep versus superficial clinical and nonclinical isolates of *Trichosporon beigellii* by isoenzymes and restriction fragment length polymorphisms of rDNA generated by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **29**:1677–83.
- Kim, J.C., Kim, Y.S., Park, C.S., Hang, J.M.; Kim, B.N., Woo, J.H., Ryu, J. and Kim, W.G.** 2001. A case disseminated *Trichosporon beigelli* infection in a patient with myelodysplastic syndrome after chemotherapy. *J. Korean Med. Sci.* **16**: 505-8.
- Kirmani, N., Tuazon, C.U. and Geelhoed, G.W.** 1980. Disseminated *Trichosporon* infection. *Arch. Intern. Med.* **140**: 277-8.
- Kozel, T. R., and R. P. Mastroianni.** 1976. Inhibition of phagocytosis by cryptococcal polysaccharide: dissociation of the attachment and ingestion phases of phagocytosis. *Infect. Immun.* **14**:62–7.
- Kozel, T. R., G. S. T. Pfrommer, A. S. Guerlain, B. A. Highison and G. J. Highison.** 1988. Role of the capsule in phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *Rev. Infect. Dis.* **10**:S436–S439.
- Kremery, V., Mateicka, F. Jr., Kunova, A., Spanik, S., Gyarfás, J., Sycova, Z., and Trupi, J.** 2001. Hematogenous Trichosporonosis in cancer patients: report of 12 cases including 5 during prophylaxis with itraconazole. *Supp. Care Cancer*, **7**: 39-43.
- Kwon-Chung, K.J. and Bennett, J.E.** 1992. *Medical Mycology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 2 ed. p. 866.
- Lacaz, C.S., Porto, E., Martins, J.E.C., Heins-Vaccari, E.M. and Melo, N.T.** 2002. *Tratado de Micologia Médica*. 9. ed. p. 100 São Paulo: Savier.
- Lamagni T.L.** 2001. Emerging trends in the epidemiology of invasive mycoses in England and Wales (1990-1999). *Epidemiol. Infect.* **126**:397-414.

- Larget B. and Simon D.L.**, 1999. Markov Chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* **16(6)**:750-9
- Lee, J. W., G. A. Melcher, M. G. Rinaldi, P. A. Pizzo, and T. J. Walsh.** 1990. Patterns of morphologic variation among isolates of *Trichosporon beigellii*. *J. Clin. Microbiol.* **28**:2823–27.
- Lee, J., Callender, D, Rubin, M. and Pizzo, P.A.** 1990-b *Trichosporon beigelli*, an emerging pathogen resistant to amphotericin B. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 1616-22.
- Lestini, B.J. and Church, J.A.** 2006. *Trichosporon pullulans* as a complication of chronic granulomatous disease in a patient undergoing immunosuppressive therapy for inflammatory bowel disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **25**: 87-9.
- Lodder, J. and Kreger Van-Rij, N. J. W.** 1970. The yeasts: A taxonomic study. 2. ed. Amsterdam: North-Holland, 1012 p.
- Londero A.T., Ramos C.D. and Fischman O.** 1966. White piedra of unusual localization. *Sabouraudia* **5**: 132-3.
- Lunardi, L. W., Aquino, V. R., Zimmerman, R. A. and Goldani, L. Z.** 2006. Epidemiology and outcome of *Rhodotorula* fungemia in a tertiary care hospital. *Clin. Infect. Dis.*, **43**: 60-3.
- Lussier, N., Laverdière, M., Delorme, J., Weiss, K. and Dandavino, R.** 2000. *Trichosporon beigelli* funguria in renal transplant recipients. *Clin. Infec. Dis.* **31**: 1299-301.
- Madariaga, M. G., Tenorio, A. and Proia, L.** 2003. *Trichosporon inkin* peritonitis treated with caspofungin. *J. Clin. Microbiol.*, **41**: 5827-29.
- Magalhães, A.R., Mondino, S.S., Silva, M. and Nishikawa, M.M.** 2008. Morphological and biochemical characterization of the aetiological agents of white piedra. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **103**:786-90.
- Makela, P., Leaman, D. and Sobel, J.D.** 2003. Vulvovaginal Trichosporonosis. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* **11**:131-3.
- Makimura, K., Suzuki, T., Tamura, T., Ikedo, M., Hanazawa, R., Takahashi, Y., Yamada, Y., Uchida, K. and Yamaguchi, H.** 2004. Comparative evaluation of standard dilution method and commercial kit for frozen plate antifungal susceptibility testing of yeasts using 200 clinical isolates. *Microbiol. Immunol.* **48**:747-53.
- Manuel R. J. and Kibbler C. C.** 1998. The epidemiology and prevention of invasive aspergillosis. *The J. Hosp. Infec.* **39**:95-109.

Mariat, F. and Adam-Campos, C. 1967. La technique du carré du tapis, méthode simple de prélèvement dans les mycoses superficielles. Ann. Inst. Pasteur, **113**: 666-8.

Mariat, F. and G. Tapia, 1966. Denombrement des champignons keratinophiles d'une population de *Cynocapales*. Ann. Parasitol. **41**:627-34.

Marier, R., Zakhireh, B., Downs, J., Wynne, B., Hammond, G.L. and Andriole, V.T. 1978. *Trichosporon cutaneum* endocarditis. Scand J Infect Dis.**10**:225-6.

Martinez-Lacasa, J., Mana, J., Niubo, R., Rufi, G., Saez, A. and Fernandez Noguez, F. 1991. Long-term survival of a patient with prosthetic valve endocarditis due to *Trichosporon beigeli*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **10**: 756-8.

Marty, F.M., Barouch, D.H., Coakley, E.P. and Baden, L.R. 2003. Disseminated Trichosporonosis caused by *Trichosporon loubieri*. J. Clin.Microbiol. **41**:5317-20.

Mcmanus, E.J. and Jones, J.M. 1985. Detection of a *Trichosporon beigeli* antigen cross-reactive with *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharides in serum from a patient with disseminated *Trichosporon* infection. J. Clin. Microbiol. **21**: 681-5.

Melcher, G.P., Reed, K.D., Rinaldi, M.G., Lee, J.W., Pizzo, A.P. and Walsh, T.J. 1991. Demonstration of a cell wall antigen cross-reacting with criptococcal polysaccharide in experimental disseminated Trichosporonosis. J. Clin. Microbiol. **29**: 192-6.

Melo, A. S. A., Serafim, R. C. S. and Briones, M. R. S., 2003, Identification of genes differentially expressed in hyphae of *Candida albicans*. Braz. J. Microb. **34**: 135-13

Meyer, M.H., Letscher-Bru, V., Waller, J., Lutz, P., Marcellin, L. and Herbrecht, R. 2002. Chronic disseminated *Trichosporon asahii* infection in a leukemic child. Clin.Infect. Dis. **35**: 22-5.

Middelhoven, W.J., Scorzetti, G. and Fell, J.W. 2004. Systematics of the anamorphic basidiomycetous yeast genus *Trichosporon* Behrend with the description of five novel species: *Trichosporon vadense*, *T. smithiae*, *T. dehoogii*, *T. scarabaeorum* and *T. gamsii*. Int. J. Syst. Evo. Microbiol. **54**:975-86.

Dağ, A. and Cerikçioğlu, N. 2006. Investigation of some virulence factors of *Trichosporon asahii* strains isolated from the clinical samples of hospitalized patients. Mikrobiyol Bul. **40**: 225-35.

Mogahed, A., Leclerc, J. and Grosogeat, Y. 1984. Prosthetic valve endocarditis caused by *Trichosporon cutaneum*. Thomas D. Int. J. Cardiol. **5**:83-7.

Moretti-Branchini, M.L., Fukushima, K., Scheiber, A.Z., Nishimura, K., Papaioordanou, P.M., Trabasso, P., Tanaka, R. and Miyaji, M. 2001. *Trichosporon* species infection in bone marrow transplanted patients. *Diagn. Microbiol. Infect.* **39**:161-4.

Naglik, J., Albrecht, A., Bader, O. and Hube, B. 2004. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell. Microbiol.*, **6**: 915-26.

Neves, R.P., Cavalcanti, M.A.Q., Chaves, G.M. and Magalhães, O.M.C. 2002. *Trichosporon pullulans* (Lidner) Diddens Lodder isolated from the oral cavity of aids patient. *Braz. J. Microbiol.* **33**: 241-2.

Nishiura, Y., Nakagawa-Yoshida, K., Suga, M., Shinoda, T., Guého, E. and Ando, M. 1997. Assignment and serotyping of *Trichosporon* species: the causative agents of summer-type hypersensitivity pneumonitis. *J. Med. Vet. Mycol.* **35**:45-52.

Nora, A.B., Zoppas, B. de A., Stefani, M., Bombe, M.G. and Ribeiro R.G. 2002. Piedra branca extragenital: relato de um caso no RS. *An Bras Dermatol* **77**: 473-7.

Nucci, M., Pulcheri, W., Spector, N., Bueno, A. P., Bacha, P. C., Caiuby, M. J., Derossi, A., Costa, R., Morais, J. C. and Oliveira, H. P. 1995. Fungal infections in neutropenic patients. A 8-year prospective study. *Rev. Inst. Med. Trop. de Sao Paulo*, **37**: 397-406.

Odds, F.C., Webster, C.E., Mayuranathan, P. and Simmons, P.D. 1988. *Candida* concentrations in the vagina and their association with signs and symptoms of vaginal candidosis. *J. Med. Vet. Mycol*, **26**: 277-83.

Oksuz S, Sahin I, Yildirim M, Gulcan A, Yavuz T, Kaya D, Koc AN. 2007. Phospholipase and proteinase activities in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. *Jpn J Infect Dis.* **60**:280-3.

Oliveira, J. A., Barros, J. A., Cortez, A. C. A. and Oliveira, J. S. R. J. 2006. Micoses superficiais na cidade de Manaus, AM, entre março e novembro/2003. *An. Bras. Dermatol.* **81**: 238-43.

Oller, M.W., Sohnchen, R., Korting, H.C., Ollert, U., Brautigam, S. and Brautigam, W. 1994. Mechanism of adherence of *C. albicans* to cultures human epidermal keratinocytes. *Infect. Immun.*, **61**: 4560-8.

Ota, M. 1926. Sur quelques champignons pathogènes du type *Trichosporon beigelli* Vuillemin. *Ann. Parasit. Hum. Comp.* **4**: 1-13.

Paphitou, N.I., Ostrosky-Zeichner, L., Paetznick, V.L., Rodriguez, R., Chen, E. and Rex, J.H. 2002. *In vitro* antifungal susceptibility of *Trichosporon* species. **46**: 1144-6.

Patterson, J.E. 1999. Epidemiology of fungal infections in solid organ transplant patients. *Transpl, Infect, Dis.* **1**:229-36.

Pfaller, M.A., Bale, M., Buschelman, B., Lancaster, M., Espinel-Ingroff, A., Rex, J.H., Rinaldi, M.G., Cooper, C.R. and McGinnis, M.R. 1995. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards recommended broth macrodilution testing of amphotericin B, fluconazole, and flucytosine. *J. Clin. Microbiol.* **33**:1104-7.

Pittet, D., Tarara, D. and Wenzel, R.P. 1994. Nosocomial bloodstream infection in critically ill patients. Excess length of stay, extra costs, and attributable mortality. *JAMA* **271**:1598-601.

Pires, M.F.C., Corrêa, B., Gambale, W. and Paula C.R. 2001. Experimental model of *Candida albicans* (serotypes A and B) adherence in vitro. *Braz. J. Microbiol.* **32**:163-9.

Pontes, Z.B.V.S., Lima, E.O., Ramos, A.L., Frade, J.D.M.S. and Oliveira, N.M.C. 2002. Espécies de *Trichosporon* Behrend: colonização anal e pedra branca gênito-púbica em pacientes HIV+. *Rev. Bras. Anal. Clin.* **34**: 173-5.

Pontes, Z.B.V.S., Ramos, A.L., Lima, E.O., Guerra, M.F.L., Oliveira, N.M.C. and Santos J.P. 2002b. Clinical and mycological study of scalp white piedra in the state of Paraíba, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **97**: 747-70.

Polak A. 1992. Virulence of *Candida albicans* mutants. *Mycoses* **35**: 9-16.

Posada D. and Crandall K.A., 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics.* **14**: 817-8.

Price, M. F., Wilkinson, I. D. and Gentry, L. O. 1982. Plate method for detection of fosfolipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*, **20**: 7-14.

Pulvirenti, N., Dall'Oglio, F., Greco, A.M., Oliveri, S., Schwartz, R.A. and Micali, G. (2006) Superficial cutaneous *Trichosporon asahii* infection in an immunocompetent host. *Int. J. Dermatol.* **45**: 1428-31.

Rabenhorst, L. 1867. Zwei Parasiten an den todten Haaren der Chignons. *Hedwigia*.**4**:1.

Reiersol, S. 1955. *Trichosporon cutaneum* isolated from a case of otomycosis, *Acta Otol. Microbiol. Scand.*, **37**:459-63.

Reyes, C.V., Stanley, M.M. and Rippon, J.W. 1985. *Trichosporon beigelii* endocarditis as a complication of peritoneovenous shunt. *Hum. Pathol.* **16**:857-9.

Ribeiro, M.A., Alastruey-Izquierdo, A., Gomez-Lopez, A., Rodriguez-Tudela, J.L. and Cuenca-Estrella, M. 2008. Molecular identification and susceptibility testing of *Trichosporon* isolates from a Brazilian hospital. Rev. Iberoamer. Micologia. **25**: 221-5.

Riedel, D. J., Johnson, J. K. and Forrest, G. N. 2007. *Rhodotorula glutinis* fungemia in a liverkidney transplant patient. Transpl. Infect. Dis., **10**: 197-200.

Rippon, J. W. 1988. Medical Mycology. 3rd ed., WB Saunders company, Philadelphia, Pennsylvania, **797** pp.

Rodrigues, G.S., de Faria, R.R., Guazzelli, L.S., Oliveira, F.M. and Severo, L.C. 2006. Nosocomial infection due to *Trichosporon asahii*: clinical revision of 22 cases. Rev. Iberoam. Micol. **23**:85-9.

Rodriguez-Tudela, J.L., Diaz-Guerra, T.M., Mellado, E., Cano, V., Tapia, C., Perkins, A., Gomez-Lopez, A., Rodero, L., Cuenca-Estrella, M. 2005. Susceptibility patterns and molecular identification of *Trichosporon* species. Antimicrob Agents Chemother. **49**:4026-34.

Rodriguez-Tudela, J. L., A. Gomez-Lopez, A. Alastruey-Izquierdo, E. Mellado, L. Bernal-Martinez, and Cuenca-Estrella, M. 2007. Genotype distribution of clinical isolates of *Trichosporon asahii* based on sequencing of intergenic spacer 1. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **58**: 435–40.

Roselino, A.M., Seixas, A.B., Thomazini, J.A. and Maffei, C.M. 2008. An outbreak of scalp white piedra in a Brazilian children day care. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. **50**:307-9.

Salzberg, S.L. Delcher, A.L. Kasif and S. White, O. 1998. Microbial gene identification using interpolated Markov models, Nucleic Acids Res. **26**: 544-8.

Sanglard, D. 1997. A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes, SAP4, SAP5, and SAP6 of *Candida albicans* causes attenuated virulence. Infect. Immun. **65**: 3539–46

Saul, S.H., Khachatoorian, T., Poorsattar, A., Myerowitz, R.L., Geyer S.J., Pasculle, A.W. and Ho, M. 1981. Opportunistic *Trichosporon* pneumonia. Association with invasive aspergillosis. Arch. Pathol. Lab. Med. **105**:456-9.

Schaller, M., Bein, M., Korting, H.C., Baur, S., Hamm, G., Monod, M., Beinhauer, S. and Hubes, B. 2003. The secreted aspartyl proteinases Sap 1 and Sap 2 cause tissue damage in an *in vitro* model of vaginal candidiasis based on reconstituted human vaginal epithelium. Infect Immun, **71**:3227-34.

Sidrim, J.J.C. and Rocha, M.F.G. 2004. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: 2ed. Guanabara Koogan, 388p.

Spanik, S., Kollar, T., Gyarfás, J., Kunova, A. and Kremery, V. 1995. Successful treatment of catheter-associated fungemia due to *Candida krusei* and *Trichosporon beigeli* in a leukemic patient receiving prophylactic itraconazole. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., **14**: 148-9.

Stenderup, A., Schonheyder, H., Ebbesen, P. and Melbye, M. 1986. White piedra and *Trichosporon beigeli* carriage in homosexual men. J. Med. Vet. Mycol., **24**: 401-6.

Stone, J. and Manasse, R. 1989. Pseudoepidemic of urinary tract infections due to *Trichosporon beigeli*. Infect. Control Hosp. Epidemiol., **10**: 312-5.

Sugita, T., Makimura, K. and Nishikawa, A. 1997. Partial sequences of large subunit ribosomal DNA of a new yeast species, *Trichosporon domesticum* and related species. Microbol. Immunol. **41**: 571-3.

Sugita, T., Nakajima, M., Ikeda, R., Matsushima, T. and Shinoda, T. 2002. Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of *Trichosporon* species. J. Clin. Microbiol. **40**: 1826-30.

Sugita, T., Nishikawa, A. and Shinoda, T. 1994. Reclassification of *Trichosporon cutaneum* by DNA relatedness by using the spectrophotometric method and chemiluminometric method. J. Gen. Appl. Microbiol. **40**: 397-408.

Sugita, T., Nishikawa, A., Shinoda, T. and Kume, H. 1995. Taxonomic position of deep-seated, mucosa-associated, and superficial isolates of *Trichosporon cutaneum* from Trichosporonosis patients. J. Clin. Microbiol. **33**: 1368-70.

Sullivan, D.J., Westerneng, T.J., Haynes, K.A., Bennett, D.E. and Coleman, D.C. 1995. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV – infected individuals. Microbiology, **141**: 1507- 21.

Taborda, C. P. and Casadevall, A. 2002. CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) are involved in complement-independent antibody-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. Immunity **16**, 791–802

Tarazooie, B, Kordbacheh, P., Zaini, F., Zomorodian, K., Saadat, F., Zeraati, H.; Hallaji, Z. and Rezaie, S. 2004. Study of the distribution of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor and healthy individuals in Tehran, Iran. BMC Dermatol. **4**: 1-6.

Tashiro, T., Nagai, H., Nagaoka, H., Goto, Y., Kamberi, P. and Nasu, M. 1995. *Trichosporon beigellii* pneumonia in patients with hematologic malignancies. *Chest*, **108**: 190-5.

Thérizol-Ferly, M., Kombila, M., Gomez, D.M., Douchet, C., Salaun, Y., Barrabes, A., Duong, T.H. and Richard-Lenoble, D. 1994. White piedra and *Trichosporon* species in equatorial Africa. II Clinical and mycological associations: an analysis of 449 superficial inguinal specimens. *Mycoses*. **37**: 255-60.

Torssander, J., Carlsson, B. and von Krogh, G. 1985. *Trichosporon beigellii*: increased occurrence in homosexual men. *Mykosen* **28**:355-6.

Ran, Y., Yoshike, T., Ogawa, H. 1993. Lipase of *M. furfur*: some properties and their relationship to cell growth. *J. Med. Vet. Mycol.*, v. 31, p. 77-85, 1993.

Reyes, C.V., Stanley, M.M. and Rippon, J.W. 1985. *Trichosporon beigellii* endocarditis as a complication of peritoneovenous shunt. *Hum Pathol*. **16**:857-9.

Wain, W.A., Price, F.M. and Cawson, R.A. 1976. Factors affecting plague formation by *Candida albicans* infecting chick chorio-allantoic membrane. *Sabouraudia* **14**: 149-54.

Walsh, T. J., Melcher, G. P., Lee, J. W. and Pizzo, P. A. 1993. Infectious due to *Trichosporon* species: new concepts in mycology, pathogenesis, diagnosis and treatment. *Curr. Top. Med. Mycol.*, **5**: 79-113.

Walsh, T.J. 1989. *Trichosporonosis*. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **3**:43-52.

Walsh, T.J., Groll, A., Hiemenz, J., Fleming, R., Roilides, E. and Anaissie, E. 2004. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**:48-66.

Walsh, T.J., Lee, J.W. and Melcher, G.P. 1992. Experimental disseminated *Trichosporonosis* in persistently granulocytopenic rabbits: implications for pathogenesis, diagnosis, and treatment of an emerging opportunistic infection. *J.infectious Dis.* **166**: 121-33.

Walsh, T.J., Melcher, G.P., Rinaldi, M.G., Lecciones, J., McGough, D.A., Kelly, P., Lee, J., Callender, D., Rubin, M. and Pizzo, P.A. 1990. *Trichosporon beigellii*, an emerging pathogen resistant to amphotericin B. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 1616-22.

Walsh, T.J., Newman, K.R., Moody, M., Wharton, R.C. and Wade, J.C. 1986. *Trichosporonosis* in patients with neoplastic disease. *Medicine (Baltimore)*. **65**:268-79.

Watson, K.C. and Kallichurum, S. 1970. Brain abscess due to *Trichosporon cutaneum*. J Med. Microbiol. **3**:191-3.

Wickerham, L. J. 1951. The taxonomy of yeasts. U. S. D. Tech. Bull. U. S. Dep. Agric., n. 1029.

Yang, R., Ao, J., Wang, W., Song, K., Li, R. and Wang, D. 2002. Disseminated trichosporonosis in China. Mycoses. **46**: 519-23.

Yoo, C.G., Kim, Y.W., Han, S.K., Nakagawa, K., Suga, M., Nishiura, Y., Ando, M. and Shim, Y.S. 1997. Summer-type hypersensitivity pneumonitis outside Japan: a case report and the state of the art. Respirology **2**: 75-7.

Zaror, L.C., Moreno,, M.I., Fishman, O., Petri, V., Carvalho, M.T.F., Pope, S. and Porfírio N., 1989. Piedra blanca genital. Reporte de três casos. Bol. Micol. **4**: 125-7.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)