



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ANÁLISE FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ISOLADOS
DE *Trichophyton rubrum* DE PACIENTES
COM DERMATOFITOSE

DÉBORA CRISTINA DE LIMA FERNANDES

MANAUS, 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

DÉBORA CRISTINA DE LIMA FERNANDES

ANÁLISE FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ISOLADOS
DE *Trichophyton rubrum* DE PACIENTES
COM DERMATOFITOSE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde na área de concentração: Epidemiologia e diagnóstico das doenças prevalentes na Amazônia.

Orientadora: Dr^a. Maria da Graça Souza Cunha

Co-orientador: Dr. João Vicente Braga de Souza

MANAUS, 2011

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

F363a	<p>Fernandes, Débora Cristina de Lima Análise fenotípica e genotípica de isolados de <i>Trichophyton rubrum</i> de pacientes com dermatofitose / Débora Cristina de Lima Fernandes . 2011 68 f.: il. color; 31 cm.</p> <p>Orientadora: Maria da Graça Souza Cunha Coorientador: João Vicente Braga de Souza Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Amazonas.</p> <p>1. Dermatofitose. 2. <i>Trichophyton rubrum</i>. 3. Genotipagem. 4. Rapd. I. Cunha, Maria da Graça Souza. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título</p>
-------	---

DÉBORA CRISTINA DE LIMA FERNANDES

**ANÁLISE FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ISOLADOS
DE *Trichophyton rubrum* DE PACIENTES
COM DERMATOFITOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Amazonas como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde na área de concentração: Epidemiologia e diagnóstico das doenças prevalentes na Amazônia.

Aprovado em 31 de Outubro de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Maria da Graça Souza Cunha
Universidade Federal do Amazonas-AM

Prof^ª. Dr^ª. Cristina Sayuri Maki
Universidade Federal do Amazonas-AM

Prof^ª. Dr^ª. Sônia Maria da Silva Carvalho
Universidade Federal do Amazonas-AM

Dedicatória

À Deus

Por estar comigo em todos os momentos da minha vida.

Aos meus queridos Pais,

José Fernandes de Oliveira e Maria do Carmo de L. Fernandes, por seu amor, ensinamentos e dedicação em todos os momentos da minha vida.

Ao meu esposo,

Ronaldo Soares de Lima, pela paciência e incentivo, presente de Deus em minha vida.

Aos meus irmãos,

Djane e Fernandes, pelo apoio e carinho.

Amo vocês infinitamente.

Agradecimentos

A minha professora e amiga Doutora Maria Zeli Moreira Frota, por ter compartilhado seus conhecimentos, me ensinado a ter um olhar diferenciado pela micologia, contribuindo para o meu crescimento profissional nessa área. Obrigada pelo apoio nos momentos mais difíceis e pela confiança. Gratidão sempre...

A minha orientadora Doutora Maria das Graças Souza Cunha pela confiança e apoio.

Ao meu co-orientador Doutor João Vicente Braga de Souza pelo apoio técnico, científico e acolhimento no INPA.

Aos professores do programa pela contribuição para o meu crescimento acadêmico e científico.

A todos os pacientes da FUAM que contribuíram para realização desta dissertação.

A toda equipe técnica do laboratório de micologia da FUAM que me ajudaram na realização deste trabalho.

RESUMO

Dermatofitoses ou tineas são infecções fúngicas dos tecidos queratinizados do homem e de animais, causadas por um grupo de fungos específicos, denominados de dermatófitos. Dentre as espécies dermatofíticas, o *Trichophyton rubrum* é uma das mais importantes acometendo indivíduos adultos, e tende a produzir infecções de curso evolutivo do tipo crônico, com lesões disseminadas, persistentes e recidivantes. O diagnóstico laboratorial das dermatofitoses em rotina baseia-se nas características fenotípicas das cepas fúngicas isoladas das lesões em meios de cultura específicos, para isto é necessário estudar os aspectos da macro e da micromorfologia das colônias e, provas bioquímicas quando necessário. Entretanto, diferentes isolados de *T. rubrum* podem apresentar variabilidade das suas características fenotípicas, e essas podem estar relacionadas a diferenças genéticas. O propósito deste estudo foi descrever diferentes fenótipos e avaliar a possível existência de variabilidade genotípica de isolados de *T. rubrum* de pacientes com dermatofitoses atendidos em um centro de referência em dermatologia tropical na cidade de Manaus-AM. Para isto foi empregado o método de amplificação randômica do DNA polimórfico com a utilização do primer 1: 5-GGTGCGGGAA-3. A partir da fenotipagem de 55 isolados de *T. rubrum* foram evidenciados 07 fenótipos. A análise dos isolados de *T. rubrum* pelo método de RAPD utilizando o primer 1 permitiu a discriminação de 10 perfis genotípicos distintos, distribuídos em três grupos, sendo que, a maioria dos isolados pertenceu a um mesmo grupo genético, o grupo I, com 85% de similaridade. Não foram encontradas associações entre os diferentes fenótipos e os genótipos, ou entre estes e os dados clínicos dos pacientes. Apesar do comprovado potencial da técnica do RAPD para estudos da variabilidade genética de *T. rubrum*, novos métodos que permitam fazer uma correlação entre os diferentes genótipos e os aspectos clínicos e epidemiológicos das dermatofitoses ainda precisam ser avaliados ou desenvolvidos.

Palavras Chave: Dermatofitose, *Trichophyton rubrum*, Genotipagem, RAPD

ABSTRACT

Dermatophytoses or ringworms are fungal infections of the keratinized tissues of man and animals, caused by a group of specific fungi, called dermatophytes. Among the dermatophyte species, *Trichophyton rubrum* is one of the most important affecting adult individuals, and tends to produce infections of an evolutionary course of the chronic type, with disseminated, persistent and recurrent lesions. The laboratory diagnosis of dermatophytoses in routine is based on the phenotypic characteristics of the fungal strains isolated from the lesions in specific culture media, for this it is necessary to study the macro and micromorphology aspects of the colonies and, biochemical tests when necessary. However different *T. rubrum* isolates may show variability in their phenotypic characteristics, and these may be related to genetic differences. The purpose of this study was to describe different phenotypes and to evaluate the possible existence of genotypic variability of *T. rubrum* isolates from patients with dermatophytoses treated at a referral center in tropical dermatology in the city of Manaus-AM. For this, the method of random amplification of polymorphic DNA was used with use of the primer 1: 5-GGTGCGGGAA-3. From the phenotyping of 55 isolates of *T. rubrum*, 07 phenotypes were evidenced. The analysis of *T. rubrum* isolates using the RAPD with primer 1 allowed the discrimination of 10 distinct genotypic profiles, distributed in three groups, with the majority of isolates belonging to the same genetic group, group I, with 85% similarity. No association were found between the different phenotypes and genotypes, or between these and the clinical data of the patients. Despite the proven potential of the RAPD technique for studies on the genetic variability of *T. rubrum*, new methods that make it possible a correlation between the different genotypes and the clinical and epidemiological aspects of dermatophytoses still need to be evaluated or developed.

Keywords: Dermatofitose, *Trichophyton rubrum*, Genotipagem, RAPD

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fluxo de Procedimentos	38
Figura 2: Distribuição dos isolados de <i>T. rubrum</i> em relação às manifestações clínicas..	43
Figura 3: Distribuição dos isolados de <i>T. rubrum</i> em relação ao tempo de evolução	44
Figura 4: Colônia do Tipo I	44
Figura 5: Verso da Colônia do tipo I	44
Figura 6: Colônia do tipo II	45
Figura 7: Verso da colônia do tipo II	45
Figura 8: Colônia do tipo III	45
Figura 9: Verso da colônia do tipo III	45
Figura 10: Colônia do tipo IV	46
Figura 11: Verso da colônia do tipo IV	46
Figura 12: Colônia do tipo V	46
Figura 13: Verso da colônia do tipo V	46
Figura 14: Cultivo primário de <i>T. violaceum</i>	46
Figura 15: Colônia do tipo VI	47
Figura 16: Verso da colônia tipo VI	47
Figura 17: Colônia do tipo VII	47
Figura 18: Verso da colônia do tipo VII	47
Figura 19: Distribuição dos isolados de <i>T. rubrum</i>	48
Figura 20: Características micromorfológica dos isolados de <i>T. rubrum</i>	49
Figura 21: Características micromorfológicas de <i>T. violaceum</i>	50
Figura 22: Dendograma dos isolado de <i>T. rubrum</i> obtidos com o primer I	52
Quadro 1: Relação dos isolados fúngicos submetidos às análises fenotípicas	53

LISTA DE ABREVIATURAS

AP-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase com Primer Arbitrário
PDA	Ágar Batata Dextrose
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNTP	Desoxinucleotídeo Trifosfato
DM	Diabetes Mellitus
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
HCl	Ácido Clorídrico
IGS	Região Espaçadora Intergênica
ITS	Região Espaçadora Interna Transcrita
KCl	Cloreto de Potássio
KOH	Hidróxido de Potássio
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
Mg Cl₂	Cloreto de Magnésio
NaCl	Cloreto de Sódio
NTS	Região Espaçadora não Transcrita
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
RAPD	Amplificação Randômica do DNA Polimórfico
RFLP	Polimorfismo de Tamanhos de Fragmentos de Restrição

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Dermatofitoses	14
2.2 Epidemiologia	15
2.3 Etiologia	17
2.4 <i>Trichophyton rubrum</i>	20
2.4.1 Principais Manifestações Clínicas causadas por <i>T. rubrum</i>	22
2.4.1.1 <i>Tinea unguium</i>	22
2.4.1.2 <i>Tinea pedis</i>	24
2.4.1.3 <i>Tinea corporis</i>	25
2.4.1.4 <i>Tinea cruris</i>	25
2.4.2 Fenotipagem de <i>Trichophyton rubrum</i>	26
2.4.3 Genotipagem de <i>T. rubrum</i>	29
2.4.3.1 RAPD	32
3. OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo Geral	36
3.2 Objetivos Específicos	36
4. METODOLOGIA	37
4.1 Modelo de Estudo	37
4.2 Universo de Estudo	37
4.2.1 Participantes	37
4.2.2 Amostras	37
4.3 Informações Éticas	37
4.4 Fluxo de Procedimentos	38
4.5 Detalhamento dos Procedimentos	39
4.5.1 Reativação dos isolados fúngicos	39
4.5.2 Caracterização Fenotípica	39
4.5.2.1 Estudo Macromorfológico	39
4.5.2.2 Estudo Micromorfológico	39
4.5.3 Caracterização Genotípica	40
4.5.3.1 Extração do DNA fúngicos	40
4.5.3.2 RAPD	41

4.6 Análise dos Resultados	41
5. RESULTADOS	43
6. DISCUSSÃO	54
7. CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	60

1. INTRODUÇÃO

As Dermatofitoses são infecções fúngicas de elevada prevalência no mundo, especialmente nas regiões tropicais, onde persiste um clima quente e úmido, condições estas consideradas ideais para o desenvolvimento e proliferação dos fungos. Também conhecidas como “tinhas” ou “*tineas*”, manifestam-se por meio de lesões superficiais nos tecidos queratinizados do homem e de animais, como a pele, pêlos e unhas. São causadas por um grupo de fungos denominados de dermatófitos, os quais obtêm seus nutrientes principalmente a partir da queratina dos tecidos parasitados (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; LACAZ et al., 2002).

Sob a influência de uma série de fatores, dentre os quais, a localização anatômica infectada, a capacidade de virulência do fungo e a suscetibilidade do hospedeiro, as dermatofitoses ou tinhas podem se manifestar com diferentes formas clínicas e graus de inflamação. Na prática clínica, estas micoses representam um dos principais motivos nas consultas dermatológicas, tanto em serviços públicos como privados, e algumas formas clínicas se constituem em um problema de saúde pública de maior relevância, dado ao seu índice de morbidade e das dificuldades de ordem terapêutica. Apesar disso, pouco se sabe a respeito dos processos fisiológicos e dos mecanismos patogênicos envolvidos nas dermatofitoses (FAERGEMANN; BARAN, 2003; YANG, et al., 2007).

Dentre as espécies dermatofíticas, o *Trichophyton rubrum* é uma das mais importantes acometendo indivíduos adultos, e tende a produzir infecções de curso evolutivo do tipo crônico, com lesões disseminadas e persistentes, muitas vezes obrigando o uso de medicamentos por um tempo prolongado, e que nem sempre garantem a cura do paciente. História de recidivas ou de re-infecções é muito freqüente nesses pacientes (ZAIAS, 1996; MUKHERJEE et al., 2003; VALDIGEN, 2006).

Diante desse quadro, muitos são os questionamentos a serem elucidados, sobretudo relacionados ao entendimento dos aspectos da interação patógeno-hospedeiro. Para isto novos estudos se fazem necessários, envolvendo principalmente análises genéticas e imunológicas, que apontem para novas estratégias na abordagem clínica e terapêutica das dermatofitoses.

Atualmente a biologia molecular tem proporcionado uma série de ferramentas indispensáveis para o avanço do conhecimento no que diz respeito aos aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais de inúmeras patologias. Crescente interesse tem sido observado no meio científico nos estudos de variabilidade genética dos patógenos e que visem à descoberta e o mapeamento de genes importantes relacionados a fatores de virulência e ou de resistência às drogas.

A importância da genotipagem de fungos dermatófitos é destacada por diferentes autores, por se constituir em uma ferramenta valiosa que pode fornecer as respostas para algumas questões fundamentais na prática clínica, diagnóstica, taxonômica e epidemiológica, como por exemplo: para comprovar os casos de re-infecção ou de recidiva; na identificação de cepas endêmicas; monitoramento de possíveis linhagens resistentes a drogas, e ainda, para um melhor entendimento da dinâmica do processo infeccioso (JACKSON et al., 2000; SOLL, et al., 2000; CISALPINOS; TRAVASSOS, 2002).

Estudos referentes à caracterização fenotípica e molecular dos dermatófitos, bem como sobre as possíveis associações de diferentes genótipos com os aspectos clínicos, são ainda escassos no Brasil. Na região norte, onde as condições climáticas são bastante favoráveis para uma elevada prevalência das dermatofitoses, não foram encontradas publicações atualizadas sobre estes aspectos.

No presente estudo avaliou-se a possível existência de diferentes genótipos de isolados de *T. rubrum*, de pacientes com dermatofitoses atendidos em um centro de referência em dermatologia tropical na cidade de Manaus-AM, bem como descrever as características fenotípicas dos mesmos.

Os dados obtidos foram analisados no intuito de se verificar possíveis associações entre os fenótipos e genótipos dos isolados de *T. rubrum* e os aspectos clínicos das lesões dos pacientes com dermatofitose.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Dermatofitoses

Dermatofitoses ou tinhas (do latim *tineas*) são infecções fúngicas dos tecidos queratinizados do homem e de animais, pele, pêlos e unhas, causadas por um grupo específico de fungos, denominados de dermatófitos (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; ZAITZ et al., 1998; LACAZ et al., 2002). Estas micoses incluem um amplo espectro de manifestações clínicas, em que diferentes localizações anatômicas do corpo podem ser acometidas.

Uma das classificações das dermatofitoses muito utilizada na prática clínica está baseada na localização anatômica da lesão, na qual é utilizado o termo “*tinea*” (do latim), seguido do nome da região acometida, assim, as dermatofitoses são classificadas nos seguintes tipos clínicos: *tinea capitis*, *tinea faciei*, *tinea barbae*, *tinea corporis*, *tinea manum*, *tinea cruris*, *tinea pedis*, e *tinea unguium* (KURSTAK, 1989; LACAZ et al., 2002).

Em geral as tinhas manifestam-se por meio de lesões bem características, sendo na maioria das vezes, eritematosas, descamativas, pruriginosas e delimitadas por bordos elevados. Contudo, existem muitas variantes clínicas, cujas manifestações não são facilmente diferenciadas de outras dermatoses, como a dermatite de contato, eczema, psoríase, dentre outras patologias, sendo assim imprescindível a realização do diagnóstico diferencial por meio dos exames laboratoriais (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; GREKIN et al., 2000).

2.2 Epidemiologia

As dermatofitoses são infecções fúngicas de elevada prevalência no mundo, especialmente nas regiões tropicais, em que persiste um clima quente e úmido, condições consideradas ideais para o desenvolvimento da maioria das espécies fúngicas de interesse médico. Trata-se de uma doença cosmopolita, embora exista ampla variação na distribuição das diferentes espécies de dermatófitos.

Fatores como idade, sexo, aspectos sócio-econômicos, condições climáticas locais, migrações, convívio com animais domésticos, dentre outros, exercem grande influência na distribuição das espécies nas diversas regiões do mundo, promovendo variações no espectro destes fungos, e podendo inclusive gerar mudanças ao longo dos anos (EVANS, 1998; UNGPAKRON, 2005; MARAKI et al., 2007; SEEBACHER et al., 2008).

As infecções dermatofíticas afetam milhões de indivíduos constituindo-se em um relevante problema de saúde pública. Esta prevalência é mais elevada em países em desenvolvimento do que em países industrializados. Entre comunidades pobres em países de clima tropical, as dermatofitoses têm sido reportadas entre as mais frequentes doenças de pele (FALAHATI et al., 2003; HAY, 2006; POPOOLA et al., 2006).

Neji et al (2009), realizaram um estudo na Tunísia com 9.960 indivíduos, no período de 1998 a 2007, no qual detectaram *T. rubrum* (74,5%) como principal agente de infecção fúngica cutânea, seguido de *T. violaceum* (7,9%), *T. mentagrophytes* (7,5%) e *Microsporum canis* (3,8%).

Na cidade de Braga, em Portugal, Valdigem et al (2006) realizaram um levantamento retrospectivo incluindo pacientes atendidos no período de 1983 a 2002 do Hospital de São Marcos. Neste estudo foi examinado um total de 10.003 pacientes com suspeita de dermatofitoses, dentre os quais 2.357 pacientes apresentaram confirmação do diagnóstico. Os resultados obtidos indicaram o *T. rubrum* como principal agente de infecção fúngica cutânea.

Dados semelhantes foram obtidos por vários autores em diferentes regiões do mundo, na Malásia (NG et al., 2002), Estados Unidos (FOSTER et al., 2004), México (WELSH et al., 2006), Grécia (MARAQUI et al., 2007), reforçando os dados da literatura mundial que apontam essa espécie como sendo a de maior prevalência dentre os dermatófitos.

Entretanto, um espectro diferente das espécies causadoras de dermatofitoses tem sido relatado em países islâmicos nos quais a espécie prevalente não é o *T. rubrum* (MUHSIN et al., 1999; ELLABIB et al., 2002; MAHMOUD, 2002).

Em um estudo realizado por Falahati et al. (2003), no Teerã, Irã, 1.254 pacientes foram examinados durante um período de três anos no qual foi constatado que o *Epidermophyton floccosum* (31,4%) foi o dermatófito de maior prevalência, seguido do *T. rubrum* (18,3%) e, entre as formas clínicas, a *tinea corporis* predominou com 31,4%.

No Brasil, alguns autores têm relatado mudanças no perfil epidemiológico e etiológico das dermatofitoses, que podem ser explicadas com base nas diferentes condições geoclimáticas e sociais de cada região, e também devido às constantes correntes migratórias no país (REIS et al., 1992; MEZZARI, 1998; RUIZ; ZAITZ, 2001; COSTA et al., 2002; ARAÚJO et al., 2003; CHINELLI et al., 2003).

Com o intuito de avaliar a epidemiologia e etiologia das dermatofitoses, Chinelli et al. (2003) analisaram os resultados de 655 culturas realizadas pelo Laboratório de Micologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no período de janeiro de 1992 a junho de 2002, e constataram o predomínio da espécie *T. rubrum* (48,7%), sobre os demais dermatófitos em todas as regiões do corpo, exceto no couro cabeludo, onde o *M. canis* predominou.

Em Pernambuco, na cidade de Recife, foram estudados 1.238 casos de dermatofitoses em um período de cinco anos, no qual o principal agente isolado de pele glabra, virilha e mãos foi o *T. rubrum* (26,7%) (DAMAZIO et al., 2007).

Aquino et al. (2007), por meio de um estudo retrospectivo realizado no Ambulatório do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas de Porto Alegre, obtiveram a partir do ano de 1998 até 2006, 5.077 amostras, e dentre estas 2.033 (40%) foram positivas para dermatófitos, sendo o *T. rubrum* a espécie clínica mais frequentemente isolada (62,4%), seguida do *T. mentagrophytes* (18,2%).

Em relação à região norte do país ainda existe uma lacuna a ser preenchida na literatura científica, com informações referentes ao perfil epidemiológico das dermatofitoses.

Em estudo conduzido por Frota et al. (2005) em uma Fundação de Dermatologia Tropical na cidade de Manaus-AM (dados ainda não publicados), incluindo 1.215 indivíduos adultos com suspeita de dermatofitoses, verificou-se que, dentre as culturas positivas para dermatófitos, houve predominância absoluta das espécies antropofílicas, sendo o *T. rubrum* a espécie mais isolada, correspondendo a 51,1% dos casos, destacando-se como principal agente de *tinea unguium*, *tinea corporis*, *tinea pedis* e *tinea cruris*. As dermatofitoses com evolução do tipo crônica representaram neste estudo 72,4% dos casos.

A despeito dos dados epidemiológicos apresentados em diferentes estudos realizados no Brasil, a prevalência das dermatofitoses e de seus agentes etiológicos pode estar sendo subestimada, considerando que esta doença não é de notificação compulsória, e considerando ainda a questão da automedicação, e que não raramente o diagnóstico é feito apenas com base nas evidências clínicas.

2.3 Etiologia

Os dermatófitos constituem um grupo de fungos filamentosos queratinolíticos pertencentes à classe dos *Hiphomycetes*, Subdivisão *Deuteromycotina*, representados pelos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. A descoberta da fase sexuada de algumas espécies provocou mudanças na sua taxonomia, as quais passaram a ser classificadas na subdivisão *Ascomycotina* e pertencendo a um novo gênero, *Arthroderma*.

Dentro dos gêneros *Trichophyton* e *Microsporum* existem um grande número de espécies, algumas das quais se destacam pela grande importância em micologia médica, enquanto que o gênero *Epidermophyton* possui apenas uma espécie de interesse médico, o *E. floccosum* (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; EVANS, 1998; LACAZ et al., 2002; NEGRONI, 2010).

As espécies dermatofíticas possuem naturalmente afinidades ou predileções diferenciadas; esta observação levou Georg (1964) a estabelecer sua classificação ecológica com base em seu habitat natural ou reservatório primário, podendo ser: geofílicos, zoofílicos e antropofílicos (GEORG, 1964 e APUD LACAZ et al., 2002).

Os fungos geofílicos estão associados a material queratinizado proveniente do solo, tais como, cabelos, escamas de pele, unhas, chifres, cascos, conchas e carapaças de insetos, e podem infectar tanto homens como animais após contato com o solo contaminado. No entanto, existem casos em que o fungo geofílico chega ao homem a partir de um animal, um hospedeiro intermediário (KANE et al., 1997; KUSHWAHA, 2000; SIDRIM; ROCHA, 2004).

As espécies zoofílicas usualmente infectam animais ou estão associadas aos mesmos, mas podem ocasionalmente infectar humanos após o contato direto com animais domésticos, geralmente, provocando uma resposta inflamatória aguda intensa, com lesões eritemato-descamativas bem delimitadas e de fácil tratamento (CUCÉ; NETO, 1990; CREMER et al., 1995).

Os dermatófitos antropofílicos, por sua vez, infectam primariamente os homens, e raramente animais, causando infecções de evolução crônica, com menor processo inflamatório, e de difícil tratamento, em virtude da forte adaptação do fungo ao hospedeiro (CUCÉ; NETO, 1990; MACURA, 1993).

Esta classificação ecológica dos dermatófitos é de suma importância para a compreensão das diferentes características clínicas das infecções dermatofíticas, como por exemplo, o sítio cutâneo geralmente infectado, o grau de infecção produzido, e a cronicidade das infecções (KUSTARK, 1989; HAINER, 2003).

Escamas epidérmicas da pele infectada, pelos ou unhas parasitadas liberados pelo hospedeiro primário, ou solo contaminado, são as principais fontes de transmissão das tinhas, a partir do contato direto ou indireto (KANE et al., 1997; RUIZ; ZAITZ, 2001).

O início do processo infeccioso ocorre através da inoculação de estruturas vegetativas, tais como os artroconídios ou fragmentos de hifas, no extrato córneo da epiderme e de pelos.

A inoculação de elementos infecciosos na pele e ou a aderência de propágulos no extrato córneo é o primeiro passo que precede a invasão fúngica (JONES, 1993; WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; KAUFMAN et al., 2007).

A germinação dos artroconídios na superfície queratinizada, a produção de queratinase e de outras enzimas extracelulares, tais como proteases, lipases, fosfatases, nucleases e glicosidases são importantes para o estabelecimento do parasitismo pelos dermatófitos. Antígenos de superfície e produtos metabólicos antigênicos estimulam as respostas imunológicas e inflamatórias do hospedeiro (TSUBOI et al., 1989; TSUBOI et al., 1992; WEITZMAN;SUMMERBELL, 1995).

Uma vez iniciado o processo de invasão do tecido queratinizado, os dermatófitos desencadeiam uma resposta inflamatória bem definida, e reações imunológicas mediadas por células. Muito raramente, estes fungos invadem as camadas mais profundas não ceratinizadas da pele, e quando isto acontece, geralmente está associado a pacientes imunossuprimidos (OGAWA et al., 1998).

A infecção pode se propagar a partir de uma localização primária através de auto-inoculação e lesões secundárias podem surgir posteriormente em qualquer parte do corpo.

As lesões podem ser simultâneas, intermitentes ou podem ocorrer após um intervalo de tempo, e sua gravidade varia de acordo com a localização anatômica e a resposta imune do hospedeiro (JONES, 1993; WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995).

2.4 *Trichophyton rubrum*

T. rubrum foi descrito por Castellani em 1910, e faz parte de um complexo de espécies estreitamente relacionadas, incluindo mais 14 espécies e variedades, sendo as mesmas: *T. megninii*, *T. violaceum*, *T. circonvolutum*, *T. fischeri*, *T. fluviomuniense*, *T. glabrum*, *T. gourvilii*, *T. kanei*, *T. kuryangei*, *T. pedis*, *T. raubitschekii*, *T. rodhainii*, *T. soudanense* e *T. yaoundei*.

Graser et al. (2000) por meio de um estudo comparativo entre as características fenotípicas e genotípicas, por meio do sequenciamento da região espaçadora interna transcrita do DNAr, PCR fingerprinting e análise de polimorfismos de fragmentos amplificados (AFLP), reclassificaram ou estabeleceram sinonímias com respeito a dois clados monofiléticos, ambos estreitamente relacionados e co-específicos, sendo o clado 1, *T. violaceum* e clado 2, *T. rubrum* e *T. megninii*.

O *T. rubrum* é uma espécie antropofílica amplamente distribuída no mundo, reconhecida como um dos principais agentes de dermatofitoses em indivíduos adultos (FAERGEMANN; BARAN, 2003; FOSTER et al., 2004; ROMANO et al., 2005; WELSH et al., 2006).

Está principalmente associada a quadros clínicos de evolução crônica, resistência terapêutica e recidiva, constituindo-se em um dos problemas mais comuns atendidos nos serviços de saúde na área da dermatologia. Diferentemente, o *T. violaceum* tem distribuição mais limitada, sendo frequentemente isolado no norte da África e Oriente Médio (FAERGEMANN; BARAN, 2003; MUKHERJEE et al., 2003; YANG, et al., 2007; ROMANO et al., 2005; FOSTER et al., 2004; WELSH et al., 2006).

Esquenazi et al. (2004), em um estudo *in vitro*, verificaram que o *T. rubrum* possui a capacidade de aderir a células epiteliais através de adesinas carboidrato específicas, que são expressas na superfície dos microconídios. Alguns fatores ainda não elucidados podem modular a patogenicidade dos dermatófitos.

Notavelmente, esses fungos, dependendo dos fatores envolvidos na inter-relação dermatófito-hospedeiro, são capazes de desencadear padrões distintos de respostas imunológicas. O *T. rubrum* é um agente frequentemente associado a casos de dermatofitoses com discreto processo inflamatório e a uma resposta imune celular ineficaz.

O padrão de resposta imunológica do hospedeiro pode ser facilmente evidenciado realizando-se o teste intradérmico com o antígeno metabólico de *Trichophyton*, a tricofitina.

Grande parte dos indivíduos com dermatofitose crônica causada por *T. rubrum* não desenvolvem a resposta tardia (do tipo celular ou Th1), mas uma resposta de hipersensibilidade imediata (do tipo humoral ou Th2) (VILANI-MORENO et al., 1999; ELEWSKI et al., 2002; WOODFOLK, 2005; CORDEIRO et al., 2006).

De acordo com Woodfolk (2005) a maior susceptibilidade à dermatofitose do tipo crônico está associada com atopia e a uma resposta imune tipo Th2. Campos et al. (2003), a partir do estudo de um caso de paciente sem história de imunossupressão sistêmica ou atopia, sugeriram por sua vez que *T. rubrum* poderia estar direcionando a resposta imunológica para o tipo Th2.

O desenvolvimento de imunidade mediada por células com hipersensibilidade tardia e resposta inflamatória, está associada à cura clínica, enquanto que uma falha nessa resposta predispõe o indivíduo à infecção dermatofítica do tipo crônica e recorrente (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995).

Dahl (1993, 1994) sugere que nas dermatofitoses crônicas causadas por *T. rubrum* pode estar havendo uma supressão dos mecanismos de defesa do hospedeiro, por substâncias

produzidas por este fungo, as mananas, as quais poderiam indiretamente prevenir a completa erradicação do fungo e favorecer as recidivas.

2.4.1 Principais Manifestações Clínicas causadas por *T. rubrum*

Dentre as principais manifestações clínicas associadas ao *T. rubrum* destacam-se a *tinea unguium*, *tinea pedis*, *tinea cruris* e *tinea corporis*, com evolução do tipo crônica, acometendo especialmente indivíduos adultos, jovens ou idosos (HAVLICKOVA et al., 2008; SEEBACHER et al., 2008).

Estas dermatofitoses, em especial a *tinea unguium* e a *tinea pedis*, representam um importante quadro clínico que interfere diretamente na qualidade de vida do indivíduo, não somente pela questão estética, mas também, pelas complicações secundárias e da dificuldade terapêutica na prática clínica.

2.4.1.1 *Tinea unguium*

“*Tinea unguium*”, é um termo empregado somente para as onicomicoses causadas por fungos dermatófitos, dentre os quais o *T. rubrum* é apontado como o principal agente. A *tinea unguium* ocorre com maior frequência nas unhas dos pododáctilos, e juntamente com a candidíase ungueal (onicomicose causada por *Candida sp*), representa uma das mais importantes onicopatias, dada a sua elevada prevalência, morbidade e dificuldade terapêutica (FAERGEMANN; BARAN, 2003; BARAN; KAOUKHOV, 2005).

O quadro clínico mais comum de *tinea unguium* é o acometimento da região latero-distal subungueal, com descolamento da unha do leito ungueal e presença de mancha branco-amarelada. Onicólise e onicodistrofia também podem estar presentes. Entretanto, para o diagnóstico diferencial das outras onicopatias é imprescindível a realização dos exames laboratoriais (ELLIS, 1999; FAERGEMANN; BARAN, 2003; BARAN; KAOUKHOV, 2005; DEGREEF, 2008).

Geralmente o tratamento das onicomicoses requer o uso de drogas antifúngicas com esquemas terapêuticos prolongados, que nem sempre garantem a cura, além de aumentar os riscos de efeitos colaterais. Falhas podem ocorrer em até 30 a 50% no tratamento das onicomicoses com os antifúngicos itraconazol e terbinafina (GUPTA et al., 1997; SUHONEN et al., 1999; GUPTA, SHEAR, 2000).

Nos países europeus há uma estimativa de que a onicomicose acometa aproximadamente 29,6% da população, sendo os dermatófitos os principais agentes (BURZYKOWSKI, et al., 2003). Romano et al. (2005) em um estudo retrospectivo realizado na Itália sobre *tinea unguium* revelaram que de um total de 4.046 culturas positivas, 87,1% foram causadas por *T. rubrum*.

Os fungos dermatófitos também se destacaram como os principais agentes de onicomicose em países asiáticos, tais como a China, Filipinas, Coreia, Indonésia e Taiwan, sendo o *T. rubrum* a espécie mais isolada (HAY, 2005).

Brilhante et al. (2000), em Fortaleza, ao relacionar as espécies isoladas com os respectivos sítios anatômicos infectados, observaram que o *T. rubrum* esteve presente em 72,8% e 77,7%, das lesões do corpo e unhas, respectivamente.

Diferentes autores referem uma suscetibilidade aumentada às dermatofitoses de evolução crônica, em especial *tinea unguium* e *tinea pedis* causadas por *T. rubrum*, em indivíduos portadores de doenças crônico-degenerativas, tais como Diabetes Mellitus (DM) (BOUGERA, 2004; MAYSER, et al., 2004; PIERARD;PIERARD-FRANCHIMONT, 2005) e Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) (TRACUILO et al., 2003).

Entretanto, Romano et al (2001), Boonchai et al. (2003) e Garcia-Humbria et al. (2005), em estudos envolvendo pacientes com DM e LES, não encontraram associação entre essas patologias e as dermatofitoses, demonstrando ser este ainda um ponto de discussão.

Muito embora existam controvérsias quanto à maior susceptibilidade de portadores de DM e de LES, ou mesmo de outras doenças de base, às dermatofitoses, a associação das mesmas, merece especial atenção pelos profissionais de saúde devido à morbidade ligada a este problema e seu impacto na qualidade de vida desses indivíduos, visto que as infecções fúngicas são apontadas como uma das importantes causas da síndrome do pé diabético.

2.4.1.2 *Tinea pedis*

Tinea pedis é uma infecção dermatofítica que pode acometer as regiões plantar, látero-plantar, dorso dos pés e espaços interdigitais. Representa uma das dermatoses mais comuns entre homens adultos, com elevada prevalência especialmente entre grupos de militares, maratonistas, nadadores e outros profissionais. Dentre os fatores que favorecem a infecção estão o uso frequente de sapatos fechados, sudorese, uso de banheiros coletivos, chão de piscinas, e a falta de cuidado com os pés (NOGUCHI et al., 1995; INGORDO et al., 2004; DJERIDANE et al., 2006).

Dentre os principais agentes de *tinea pedis* destacam-se *T. rubrum* e *T. mentagrophytes var. interdigitale* e *E. floccosum*, sendo a primeira espécie, a mais isolada. Eritema, descamação, prurido e fissuras nos pés e interdígito são manifestações clínicas comuns na *tinea pedis*. A forma aguda da doença causada principalmente por *T. mentagrophytes*, caracteriza-se geralmente pelo aparecimento de vesículas ou bolhas e prurido constante (DJERIDANE et al., 2007, DEGREEF, 2008).

Na forma crônica da doença, geralmente associada ao *T. rubrum*, os sintomas são bem mais brandos, em que predomina uma descamação muitas vezes discreta, com ou sem prurido (WEITZMAN;SUMMERBELL, 1995; ZAITZ, 1995; ZAIAS; REBELL, 1996).

Diante desse quadro clínico, um número considerável de pacientes com *tinea pedis* de evolução crônica não manifesta incômodo com esse quadro a ponto de procurar tratamento

adequado, permanecendo com a infecção durante muitos anos, ou só procuram ajuda médica quando a infecção se dissemina para outros sítios anatômicos.

2.4.1.3 *Tinea corporis*

Acomete a pele glabra, principalmente na região do tórax, membros superiores, inferiores, região abdominal e pescoço, com aspecto clínico característico, em especial quando evoluem de forma aguda, com lesões eritematosas, pruriginosas, anulares, de contornos delimitados e, em certos casos, com vesículas ou pústulas nas extremidades. Estas lesões são popularmente conhecidas como “impingem” (“ringworm”, no inglês) e são muito comuns em crianças e adolescentes que tem contato direto ou indireto com animais domésticos ou terra. Dentre os agentes mais comuns estão *M. canis* e *M. gypseum* (MACURA, 1993; ZUBER; BADDAM, 2001; STRATEN et al., 2003).

As lesões de *tinea corporis* de evolução crônica acometem principalmente adultos, manifestando-se geralmente de forma mais discreta, embora com tendência a serem mais extensas, e estão associadas às espécies antropofílicas, das quais se destacam *T. rubrum*, *T. tonsurans* e *T. mentagrophytes interdigitale*. Muitas vezes a *tinea corporis* de evolução crônica se desenvolve após a disseminação do fungo a partir de um foco primário, geralmente *tinea pedis* ou *tinea unguium* (WEINSTEIN; BERMAN, 2002; GUPTA et al., 2003).

2.4.1.4 *Tinea cruris*

Acomete a região inguinal, perianal e perineal de homens e mulheres adultas, manifestando-se geralmente com lesões eritematosas, descamativas, pruriginosas, unilaterais ou bilaterais. Comumente as lesões são delimitadas por bordas elevadas com ou sem vesículas. *T. rubrum* é um dos agentes etiológicos mais isolados de *tinea cruris*, destacando-se também *T. tonsurans* e *E. floccosum* (DEGREEF, 2008).

Alguns fatores tais como o clima quente e úmido das regiões tropicais, sudorese, uso de roupas oclusivas e apertadas que causam a maceração da pele favorecem a infecção fúngica.

É frequente a co-existência da *tinea pedis*, sendo esta, geralmente a lesão primária que se dissemina por auto-inoculação para a região inguino-crural, região na qual o fungo encontra ambiente propício de umidade e calor para se desenvolver (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; LACAZ et al., 2002; HAVLICKOVA et al., 2008).

2.4.2 Fenotipagem de *Trichophyton rubrum*

A identificação das espécies dermatofíticas tem como base as características fenotípicas das colônias, para isto, é necessário analisar principalmente os aspectos da macro e da micromorfologia das colônias, após aguardar um período entre 7 a 14 dias de crescimento, e requer experiência do analista para a definição do agente etiológico. Teste da capacidade de perfuração de pêlos e provas bioquímicas, tais como o teste da urease e testes de assimilação de vitaminas, podem também ser realizados.

Estes métodos convencionais, além de laboriosos, apresentam algumas limitações para o diagnóstico micológico, tanto para a diferenciação interespecífica dos isolados, quanto para se comprovar a existência de variabilidade entre isolados de uma mesma espécie dermatofítica (intraespecífica). (SIDRIM; ROCHA 2004; PANASITE et al. 2006).

Diferentes isolados de *T. rubrum* podem apresentar notável variabilidade das suas características morfológicas e fisiológicas, incluindo principalmente diferenças nos aspectos morfológicos das colônias, ou mesmo nos aspectos nutricionais, como a atividade da urease, e quanto à presença do pigmento difuso avermelhado, que é uma característica peculiar desta espécie (GOULING et al., 2006).

As diferenças fenotípicas, de acordo com Graser (1999), podem estar relacionadas a diferenças genéticas.

As características morfológicas e fisiológicas dos dermatófitos estão relacionadas com a sua associação ao solo. As espécies associadas ao solo, que são as geofílicas e algumas zoofílicas, podem se reproduzir sexuadamente; apresentam abundante esporulação; capacidade de perfurar o pelo; são independentes de vitaminas; urease positivas, dentre outras características.

Enquanto que, as espécies não associadas ao solo, as antropofílicas, parecem ter perdido a capacidade de reprodução sexuada; apresentam diminuição da esporulação; perda da capacidade de perfuração do pelo e de degradação da uréia, e produzem uma ou mais vitaminas ou fatores de crescimento.

No segundo grupo estão incluídos *T. rubrum*, *T. verrucosum*, *T. equinum*, *Microsporum audouinii* e *T. soudanense* (Summerbel, 2000).

As cepas típicas de dermatófitos podem ser identificadas diretamente a partir de isolamentos primários em ágar Sabouraud com antibiótico, porém muitas vezes subcultivos em meios específicos são necessários. Diferentes meios de cultura podem ser utilizados, dentre os quais, o ágar lactrimel de Borrelli (BLA) e o ágar batata dextrose (PDA) estimulam a esporulação da maioria dos dermatófitos e a produção de pigmento (PIHET; ROBERT, 2008).

Tipicamente, a colônia de *T. rubrum* caracteriza-se pelo desenvolvimento de micélio aéreo cotonoso, branco e lentamente libera um pigmento avermelhado que se difunde no meio de cultura. Alguns isolados podem produzir micélio cotonoso, denso, praticamente desprovidos de esporos e com uma tonalidade esverdeada melanóide.

Os microconídios são geralmente abundantes, e apenas ocasionalmente produzem frequentes macroconídios, tendendo neste caso, a ser menos cotonosa ou mais pulverulenta ou granulosa, de crescimento mais lento, e algumas vezes intensamente pigmentado lembrando o *T. violaceum*. Os microconídios são piriformes (em forma de lágrima) dispostos ao longo das

hifas, mas podem também ser globosos e apresentam 2-3 por 3-5 μ m de tamanho. Geralmente os cultivos primários produzem raros macroconídios, os quais são alongados, com base afilada, septados (com 3 a 8 células) e de parede fina e os clamidoconídios são em pequeno número. (REBELL; TAPLIN, 1974; LACAZ et al., 2002; ELLIS et al., 2007).

Young em 1972 investigou a estabilidade morfológica de isolados de *T. rubrum* e estabeleceu sete formas que diferiam em seus padrões morfológicos, a saber: variante cotonosa, granular, disgônica (hifas com distorções), melanóide, africana, hiperpigmentada e a variante rodhainii. No entanto, a maioria das formas e variedades de *T. rubrum* descritas gera controvérsias entre os especialistas, sendo principalmente reconhecidos dois tipos morfológicos, o cotonoso e o granuloso (YOUNG apud TORO et al., 2006; KAMINSKI et al., 2004).

Toro et al. (2006) em estudo realizado em uma região no Chile, utilizando três diferentes meios de cultura, encontraram duas únicas variedades morfológicas de *T. rubrum*, a cotonosa e a granulosa. Para diferenciar as variedades deste complexo, os autores sugeriram o uso dos meios ágar sabouraud dextrose, ágar lactrimel e o meio sólido leite-glicose-púrpura de bromocresol (BCP-M-G).

Seis variedades morfológicas de *T. rubrum* foram identificadas por Hernández et al. (2007) em estudo realizado no México. Dentre essas variedades duas foram as mais freqüentes, a variedade “Y” e variedade “TD” (typical downy), apresentando as seguintes características em ágar sabourad: variedade Y- colônia plana ou ligeiramente elevada, de cor branca com periferia amarelada, e verso amarelo e vermelho, e a variedade “TD” - colônia cotonosa típica com pigmento difuso vermelho.

Em relação à micromorfologia, a variedade cotonosa apresentou microconídios piriformes sem a presença de macroconídios, e na variedade granular foram descritos

abundantes microconídios e macroconídios. Os autores não encontraram nenhuma correlação das diferentes variedades encontradas, com fatores como idade, gênero e fatores de risco.

2.4.3 Genotipagem de *T. rubrum*

Os avanços em biologia molecular têm permitido o desenvolvimento de métodos de tipagem molecular rápidos, com alta sensibilidade e especificidade, com importantes aplicações em diversas áreas.

De acordo com Jackson et al. (2000), um sistema de tipagem para fungos dermatófitos tem bastante utilidade e diversas aplicações importantes, tais como: para determinar quando algumas cepas são mais propensas a causar onicomicose do que infecções de pele; se o isolado original é o responsável pela re-infecção ou uma nova cepa teria sido adquirida; aplicação na área epidemiológica, incluindo a identificação de cepas endêmicas de uma determinada região geográfica e a determinação de fontes comuns e rotas de infecção.

Soll et al. (2000) destacam a importância da análise genética entre isolados fúngicos de uma mesma espécie, a fim de se entender a dinâmica do processo infeccioso e monitorar a emergência de linhagens resistentes a drogas. Cisalpino; Travassos (2002) enfatizam a aplicação da genotipagem na taxonomia, diagnóstico, subtipagem, epidemiologia, e ainda no desenvolvimento de novas drogas e no estudo da patogênese de fungos infecciosos.

O crescente interesse tem sido observado nos últimos anos na tipagem molecular de dermatófitos, não só para a sua identificação em nível de espécie, como também no intuito de investigar a variabilidade genotípica intraespecífica desses fungos (FENG et al., 2000).

O uso de técnicas moleculares para avaliação de fungos tem tido rápido avanço desde a década de 90, dentre elas destacam-se: análise de polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP), com ou sem sondas de DNA; PCR-RFLP; amplificação randômica do DNA polimórfico (RAPD); análise de sequência de ácido nucléico; reação em cadeia da Polimerase

com Primer Arbitrário (AP-PCR). (JACKSON et al., 1999; FENG et al., 2000; MOCHIZUKI et al. 2003; BAEZA, et al., 2006).

Contudo, percebe-se que ainda hoje permanecem algumas contradições diante de questões fundamentais, como qual *locus* genético que se constitui no melhor alvo e qual o melhor método para a genotipagem de fungos dermatófitos.

Sequências dentro do complexo de genes do DNA ribossomal têm sido muito utilizadas como região alvo. Esta seção do genoma inclui sequências relativamente conservadas dos genes 18S, 5.8S, 28S e 5S; regiões espaçadoras internas transcritas denominadas de ITS1 e ITS2, que são regiões variáveis que flanqueiam o gene 5.8S do DNAr; regiões espaçadoras intergênicas, denominadas de IGS1 e IGS2 ou de NTS (região espaçadora não transcrita) (IWEN, 2003).

Graser et al. (1999b) estudaram a variabilidade genotípica entre 96 isolados de *T. rubrum* originados de quatro continentes. Neste estudo foram analisados 12 marcadores representando 27 *loci* por meio das técnicas de PCR fingerprinting, RFLP, e marcadores monomórficos de DNA amplificados aleatoriamente.

Contudo, os autores não conseguiram detectar nenhum polimorfismo, sugerindo um modo de reprodução estritamente clonal e forte adaptação desta espécie fúngica à pele humana.

Em 2007, esses mesmos autores analisaram 7 marcadores microssatélites de 200 isolados de *T. rubrum*, selecionados de diferentes regiões do mundo, e evidenciaram duas populações distintas, *T. violaceum* e *T. rubrum*, sendo uma com origem predominante na África enquanto que a outra de distribuição universal.

Essas populações demonstraram também diferentes predileções em relação à localização anatômica das lesões, causando principalmente *tinea capitis* e *tinea pedis*, respectivamente.

Jackson et al. (1999) analisaram a variação molecular de sequências repetitivas no DNAr de *T. rubrum* e de outras espécies de dermatófitos, e evidenciaram diferenciação entre os isolados por meio da combinação da técnica de DNAr-RFLP com *Southern blotting* das regiões ITSs e NTS.

Segundo os autores, a análise de polimorfismos no DNAr na região ITS é útil para a diferenciação das espécies de fungos dermatófitos, enquanto que as variações intraespecíficas de *T. rubrum* podem ser melhor detectadas por meio da análise na região NTS.

Em um estudo posterior, Jackson et al. (2000) descreveram dois novos sub-elementos repetitivos em *tandem* (TRSs), TRS-1 e TRS-2, após análise sequencial, localizados na região NTS do DNAr. Nesse trabalho 100 cepas foram analisadas, originadas da Europa Ocidental, Islândia e Japão, em que foram evidenciados por amplificação, 21 produtos de PCR com o TRS1, e 23 produtos de PCR com TRS-1 e TRS-2. De acordo com os autores, a variação de tamanho nessa região é principalmente devido à variação no número de cópias de TRS-1.

Anos mais tarde, Gouling et al. (2007) reproduziram a metodologia de Jackson et al. (2000) e encontraram polimorfismos entre 49 isolados de *T. rubrum*, tendo sido reconhecidos 20 padrões distintos. Os autores demonstraram apenas pequenas diferenças geográficas, em relação aos resultados de Jackson.

Chang et al., 2008 evidenciaram grande variabilidade genética nas regiões IGS de 36 isolados de *T. violaceum*, espécie intimamente relacionada a *T. rubrum*, após análise por DNAr-RFLP com *Southern blotting*, à semelhança da metodologia utilizada por Jackson et al. (2000). De acordo com os autores, a heterogeneidade evidenciada é devido a diferentes números de cópias de uma sequência repetitiva em *tandem* de 171pb.

2.4.3.1 RAPD

Independente do nome utilizado, RAPD ou AP-PCR, e das pequenas variações na metodologia, a técnica de PCR utilizando primers de sequência arbitrária abriu uma perspectiva inteiramente nova para análises genômicas de indivíduos e populações.

O método de RAPD pode ser utilizado em distintas abordagens, incluindo mapeamento genético, detecção da diversidade genética entre linhagens de mesma espécie, epidemiologia molecular e análise de relações taxonômicas (WELSH et al., 1995; SOLL et al., 2000).

Embora considerado um método de fácil execução, rápido e sensível, algumas desvantagens do RAPD são conhecidas, e estão principalmente relacionadas à sua reprodutibilidade. Diante deste problema alguns autores enfatizam a importância da otimização das condições técnicas, tais como escolha de *primers* adequados, concentração de DNA, temperaturas apropriadas durante a amplificação e a concentração de magnésio no mix de reação (ELLSWORTH, et al., 1993; BAEZA, et al., 2006; SANTOS et al., 2009).

A técnica de AP-PCR foi empregada por Liu et al., (1996) para analisar a variação genotípica de isolados de dermatófitos para fazer a diferenciação entre as espécies, e também já foi empregada para diferenciar isolados de uma mesma espécie (FENG et al., 2000; GUOLING et al., 2006).

Mochizuki et al. (1997) utilizou o RAPD para diferenciar dermatófitos antropofílicos, o qual revelou-se como uma ferramenta eficiente para a diferenciação entre as espécies.

Contudo, apenas um mínimo de polimorfismo intra-específico foi evidenciado pelos autores ao analisarem isolados de *T. mentagrophytes var interdigitale*.

Resultados diferentes foram obtidos por Kac et al. (1999) ao analisarem a capacidade discriminatória do método de RAPD na tipagem de 46 isolados de *T. mentagrophytes* originados de diferentes continentes.

Dentre os 23 *primers* testados o A08 (5'-GTGACGTAGG-3') revelou polimorfismos nos isolados, produzindo 23 perfis diferentes dentro de três grupos. Os autores indicaram o RAPD como um método que pode ser aplicado com sucesso para revelar diversidade genética entre isolados de *T. mentagrophytes*.

Guoling et al. (2006), ao analisarem o genótipo de isolados de *T. rubrum* utilizando AP-PCR, não evidenciaram nenhuma variação no genoma após subcultivos, a despeito das variações fenotípicas encontradas, o que indicaria segundo os autores, uma estabilidade do genótipo desta espécie.

Por outro lado, polimorfismos genéticos em isolados de *T. rubrum* foram evidenciados por Baeza et al. (2006) em estudo envolvendo a tipagem molecular de 67 isolados de *T. rubrum* pelo método de RAPD, em São Paulo, Brasil.

Os autores testaram um total de 06 *primers*, dos quais dois revelaram polimorfismos (*primer* 1: 5'-GGTGCGGGAA-3' e *primer* 6: 5'-CCCGTCAGCA-3'), obtendo um total de 12 e 11 padrões, respectivamente.

Nesse mesmo estudo os autores analisaram a região espaçadora não transcrita do DNAr por meio da PCR dos sub-elementos repetitivos TRS-1 e TRS-2, conforme descrito por Jackson (2000), e evidenciaram um número consideravelmente menor de perfis de bandas, apenas 03 tipos para TRS-1 e 01 tipo TRS-2, em relação aos 21 tipos reconhecidos por Jackson. Uma possível explicação para isto seria que, a multiplicação do número de cópias de TRS-1 por um *crossover* desigual não é um evento comum.

Os polimorfismos intraespecíficos obtidos no estudo de Baeza et al. (2006) contrastam com os resultados de outros autores que também utilizaram o método de RAPD, sendo que a maioria não conseguiu detectar qualquer polimorfismo, ou apenas polimorfismos mínimos (ZHONG et al. 1997; LIU et al. 1996).

Conforme estes autores, provavelmente as sequências empregadas nesse estudo hibridizaram com regiões menos conservadas do DNA genômico, resultando em um alto grau de polimorfismo. Para avaliar a estabilidade do método, cada amostra de DNA genômico foi amplificada em duplicata com amplificações por PCR realizadas em diferentes momentos, e, para testar a reprodutibilidade, os DNAs de 14 isolados foram extraídos de culturas independentes.

Yang et al. (2009), analisaram 150 isolados de *T. rubrum* obtidos de pacientes japoneses e chineses, por meio da técnica de RAPD, utilizando os *primers* 1 e 6 descritos por Baeza et al. (2006), e também por análises de sequências da região NTS no gene do RNAr.

A análise por RAPD distribuiu as 150 cepas dentro de dois principais grupos (A e B), sendo que dos isolados do Japão, 30% pertenceram ao grupo A, e 70% ao grupo B, enquanto que, 91% dos isolados da China eram do grupo A. A análise da região NTS evidenciou 4 grupos principais, com base no sequenciamento de DNA.

Estes autores verificaram que as duas metodologias revelaram diferenças genotípicas entre os isolados do Japão e da China, e que os perfis de RAPD obtidos a partir da amplificação com os *primers* decâmeros utilizados neste estudo tiveram boa correlação com os resultados obtidos pelo sequenciamento da região NTS (YANG et al. 2009).

Santos et al. (2009) também confirmaram a eficácia do RAPD com a utilização dos *primers* 1 e 6 descritos por Baeza et al. (2006), para a diferenciação de cepas de *T. rubrum* e *T. interdigitale* (*T. mentagrophytes* var *interdigitale*).

Nesse estudo os autores tiparam 86 isolados de casos de onicomicose e verificaram que ambos os *primers* foram capazes de diferenciar as duas espécies estudadas, sendo que para *T. rubrum* foram evidenciados 19 genótipos com os *primers* 1 e 6, enquanto para *T. interdigitale*, foram evidenciados 10 genótipos com o *primer* 1 e 21 com o *primer* 6.

Em estudo comparativo entre os métodos de RAPD e um novo método de PCR, denominado de PCR-MP originalmente desenvolvido para a diferenciação de cepas bacterianas, Leibner-Ciszak et al. (2010) sugeriram a utilização dessas duas técnicas simultaneamente, para screening de isolados de *T. rubrum* e *T. interdigiliale*.

Esta técnica baseia-se na redução da temperatura de desnaturação durante a PCR, quando apenas fragmentos estáveis de DNA, ou com menor conteúdo G+C são amplificados, após a digestão inicial do DNA genômico com enzima de restrição.

Hryniewicz-Gwozdz et al. (2011) utilizaram a técnica de RAPD para a genotipagem de 55 isolados de *T. rubrum* de três diferentes regiões na Polônia e Alemanha, e obtiveram um total de 40 genótipos distribuídos em seis grupos empregando os primers de Baeza et al. (2006), entretanto, 34 genótipos foram representados por isolados únicos.

Os autores não referiram uma repetição dos testes para a confirmação dos resultados, e o elevado grau de polimorfismos encontrado, segundo os próprios autores, pode ser devido a um problema na reprodutibilidade do método empregado.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar as características fenotípicas e genotípicas de isolados de *Trichophyton rubrum* de pacientes com dermatofitose, e investigar a possível associação das mesmas com os dados clínicos: localização anatômica, tipo evolutivo e manifestações clínicas.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Descrever as características fenotípicas dos isolados de *T. rubrum* com base nos aspectos macro e micromorfológicos da colônia;

3.2.2 Investigar o perfil genotípico entre isolados de *T. rubrum* por meio de técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA Analysis);

3.2.3 Analisar a associação entre os fenótipos e genótipos dos isolados de *T. rubrum*, bem como com os dados clínicos.

4. METODOLOGIA

4.1 Modelo de Estudo

Trata-se de um estudo descritivo e transversal, no qual foram analisadas as características fenotípicas e genotípicas de isolados de *T. rubrum* de pacientes com dermatofitoses e suas possíveis associações com as manifestações clínicas apresentadas pelos indivíduos participantes da pesquisa.

Este projeto foi desenvolvido na Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia Alfredo da Matta - FUAM em colaboração com a Faculdade de Ciências Farmacêuticas - FCF/UFAM e o Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia -INPA.

4.2 Universo de Estudo

4.2.1 Participantes

Pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de dermatofitoses causadas pelo *T. rubrum*, incluídos no projeto de tese intitulado “Avaliação de métodos de extração de DNA e de identificação de dermatófitos por análise de RFLP-PCR”. Os seguintes dados clínicos foram obtidos do banco de dados do referido projeto: tipo evolutivo e localização anatômica.

4.2.2 Amostras

Foram utilizados 55 isolados clínicos de *T. rubrum* obtidos no ano de 2008 como etapa do referido projeto. Os isolados encontram-se preservados no Laboratório de Micologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-FCF/UFAM, preservados em água destilada estéril (CASTELLANI, 1967).

4.3 Informações Éticas

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Alfredo da Matta- FUAM (CEP-FUAM), conforme parecer nº 025/2010 – CEP/FUAM.

4.4 Fluxo de Procedimentos

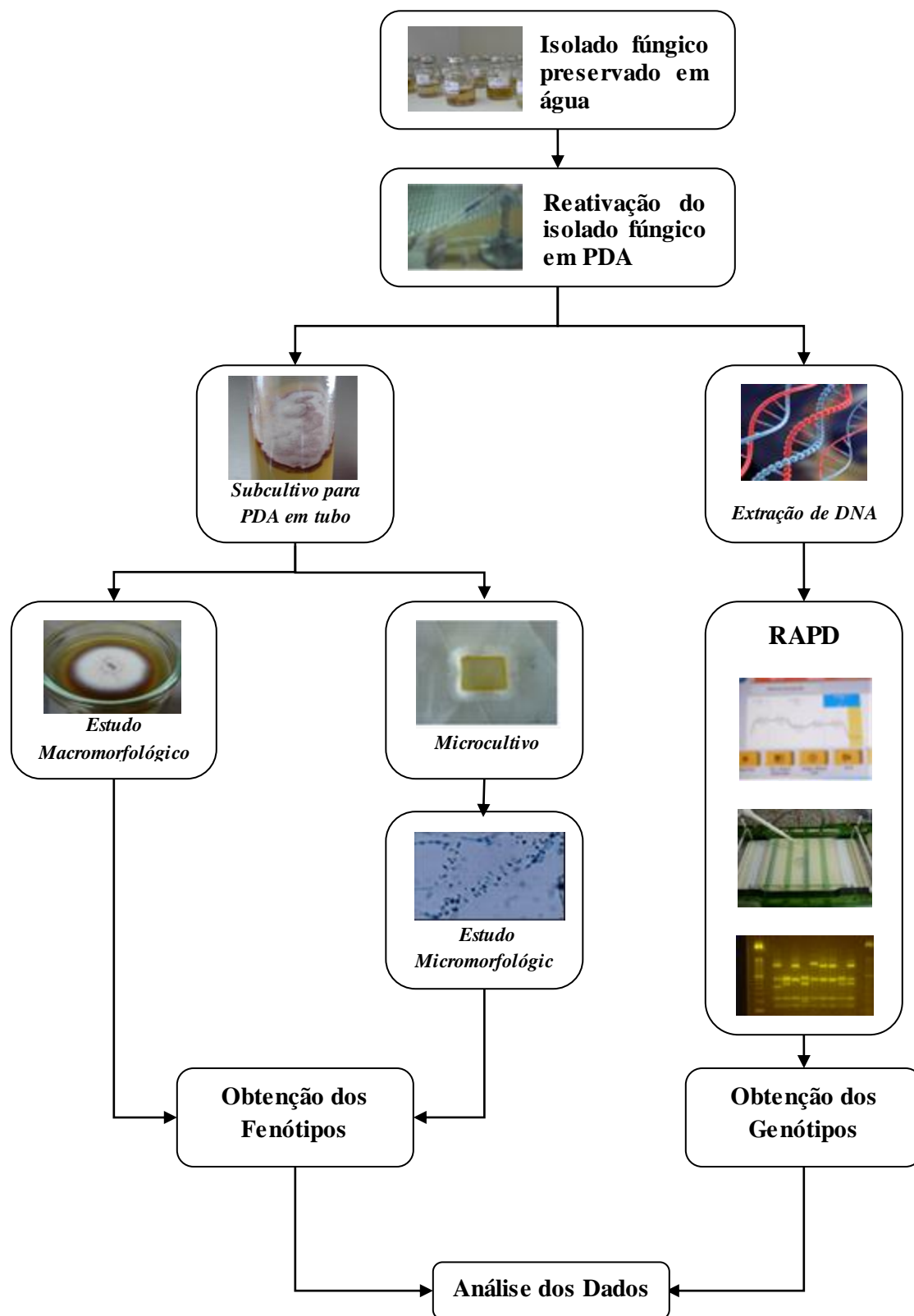


Figura 1. Fluxo de procedimentos

4.5 Detalhamento dos Procedimentos

4.5.1 Reativação dos isolados fúngicos

Os isolados de *T. rubrum* preservados em água destilada esterilizada foram reativados por meio de repique de um fragmento da colônia em meio de cultura Ágar Batata Dextrose (PDA) contido em tubo de ensaio e, posteriormente, incubado em temperatura ambiente por um período de 15 dias para crescimento satisfatório da colônia.

4.5.2 Caracterização Fenotípica

A caracterização fenotípica dos isolados de *T. rubrum* foi feita a partir dos dados obtidos nos estudos da macro e micromorfologia da colônia cultivada em PDA.

4.5.2.1 Estudo Macromorfológico

As amostras fúngicas previamente repicadas foram subcultivadas em meio PDA contido em placa de Petri e mantidas em temperatura ambiente, para o crescimento da colônia gigante e estudo macromorfológico.

Para a análise macromorfológica das colônias foram considerados os seguintes critérios: taxa de crescimento, a partir da medição diária do diâmetro da colônia; cor do verso e anverso, textura do micélio vegetativo, topografia do verso e anverso e presença de pigmento difuso no meio de cultura.

4.5.2.2 Estudo Micromorfológico

Nesta etapa o isolado fúngico foi cultivado entre lâmina e lamínula conforme a técnica de microcultivo descrita por Ridell (RIDELL, apud SIDRIM; ROCHA, 2004). Este método permitiu a visualização das estruturas fúngicas de forma mais organizada, pois o fungo se desenvolve na superfície da lâmina e da lamínula.

Para a análise micromorfológica foram consideradas as características das hifas primárias e suas ramificações, a presença e disposição dos macroconídios, microconídios e clamidoconídios, a partir das análises microscópicas em aumento de 100 e 400x.

Os conídios foram avaliados ainda quanto à sua morfologia e quantidade aproximada obedecendo à seguinte escala: ausentes = 0, raros = de 1 a 10, frequentes = 10 a 50 e abundantes > 50 conídios por 10 campos em aumento de 100x (BRILHANTE, 2005).

4.5.3 Caracterização Genotípica

4.5.3.1 Extração do DNA fúngicos

O DNA genômico foi extraído a partir do micélio fúngico de acordo com a técnica descrita por Del Sal et al.(1989) com algumas modificações. Uma alíquota de micélio foi transferida para um microtubo no qual foi adicionado 500 µL de tampão de lise (10mM Tris/HCl pH8, 1mM EDTA, 1% SDS, 100 µg/ml de proteinase K). A mistura foi incubada por 1 hora a 37°C, em seguida 200µL de solução 5 mol/L de NaCl foram adicionados e o conteúdo incubado por 10 min 65°C.

Posteriormente, 100 µl 10% (w/v) de CTAB foram adicionados e incubados por mais 20min a 65°C. A solução foi tratada com RNase A, na concentração final de 50 µg /mL por 1h a 37°C, após este passo o DNA foi extraído com um volume igual de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico [25:24:1 (v/v)], e centrifugado a 12000 x g durante 15 min. a 4 °C. Este procedimento foi repetido três vezes.

O DNA foi precipitado com dois volumes de 2-propanol a -20°C por 20 min, lavado duas vezes em 500 µl de etanol 70%, e após a secagem, ressuspensão em 100 µl de tampão TE (Tris/HCl 40mM, pH 8,2 e EDTA 2mM).

A quantificação das amostras de DNA foi realizada por espectrofotometria em comprimento de onda de 260 nm.

4.5.3.2 RAPD

A reação de amplificação randômica do DNA polimórfico foi realizada de acordo com a técnica descrita por Baeza et al. (2006), utilizando o *primer* 1: 5`-GGTGCGGGAA - 3`. A amplificação foi realizada a partir de um volume de 25µl contendo 50ng de DNA e uma mistura liofilizada de reação tampão (30mM KCl, 3mM MgCl₂, 10mM Tris pH 8,3), 0,4 mM (cada) dNTP, 2,5 µg BSA, 25pmol/µl de *primer* e Taq DNA polimerase. As amostras foram amplificadas em um termociclador, como segue: desnaturação inicial de 5 min a 95°C, seguida por 45 ciclos consistindo de desnaturação a 95°C por 1min, hibridização do *primer* a 36°C por 1min, extensão a 72°C por 2min e desnaturação a 95°C por 1min. As reações de amplificação de todos os isolados foram repetidas em diferentes momentos.

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% e visualizados com Sybr Safe. Os perfis de RAPD foram analisados considerando as principais bandas obtidas, ou seja, as mais visíveis e com melhor definição, estas foram identificadas visualmente e confirmadas com a utilização do software Phoretix 1D.

4.6 Análise dos Resultados

Perfis de RAPD foram analisados pelo software Phoretix 1D (versão 11V; Nonlinear Dynamics Ltd - UK). O coeficiente de similaridade (SAB) entre os padrões de banda para um determinado par de isolados A e B foi calculado pela fórmula $SAB = 2E / (2E + a + b)$, onde E é o número de bandas comuns nos padrões de A e B, “a” é o número de bandas no padrão A, sem correlatos padrão B, e “b” é o número de bandas no padrão B, sem correlatos em A.

Com base nos valores SAB, dendrogramas foram gerados baseados no método UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic means) implementado pelo software Phoretix 1D.

Os dados obtidos da fenotipagem e genotipagem foram descritos e apresentados por meio de gráficos e figuras.

5. RESULTADOS

No presente estudo foram incluídos 55 isolados de *T. rubrum* obtidos de pacientes adultos com diagnóstico de dermatofitose, dos quais, 42% pertenciam ao gênero feminino e 58% ao masculino, com idades variando entre 18 a 64 anos.

A distribuição dos isolados de *T. rubrum* em relação às manifestações clínicas associadas, está representada na figura 2; sendo que a maioria foi obtida de casos de *tinea cruris* (47%) e de *tinea corporis* (24%); isolados de *tinea unguium* e *tinea pedis* representaram 13% e 3%, respectivamente.

Quanto ao tipo evolutivo das dermatofitoses, mais de 60% dos casos apresentou evolução do tipo crônico com mais de um episódio de ocorrência; destas, 31% com evolução entre 1 a 4 anos e 33% com mais de 5 e até mais de 10 anos de evolução conforme Figura 2.

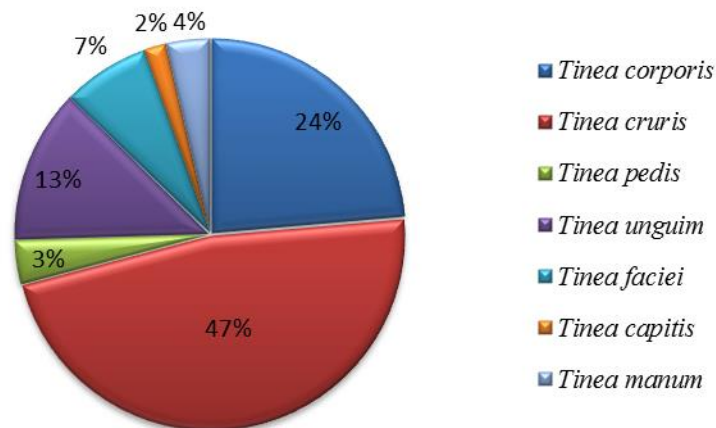


Figura 2. Distribuição dos isolados de *T. rubrum* em relação às manifestações clínicas.

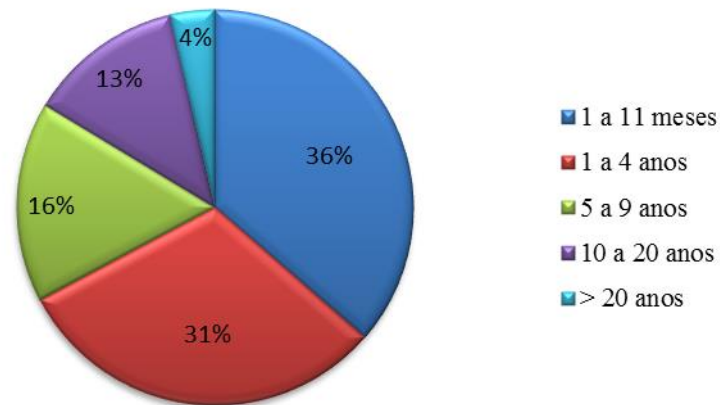


Figura 3. Distribuição dos isolados de *T. rubrum* em relação ao tempo de evolução.

Análises dos Fenótipos

Os isolados de *T. rubrum* foram submetidos aos estudos de fenotipagem, após subcultivo em ágar batata contido em placa de Petri, considerando os aspectos morfológicos da colônia, taxa de crescimento e presença de pigmento difuso. As colônias foram observadas diariamente até alcançarem o seu diâmetro máximo de crescimento, o que ocorreu no 15º dia.

A partir dessa análise foram evidenciados sete tipos macromorfológicos de culturas, conforme demonstrado abaixo:

Tipo I – Colônia branca; textura cotonosa com micélio aéreo baixo; topografia discretamente elevada apresentando sulcos radiais pouco profundos; crescimento máximo de aproximadamente 35 mm de diâmetro; pigmento difuso vermelho carmesim (Figura 4 e 5).



Figura 4. Colônia tipo I



Figura 5. Verso colônia tipo I

Tipo II – Colônia branca com algumas matizes rosadas; textura cotonosa com micélio aéreo baixo; discretamente elevada com sulcos radiais pouco profundos; 32 mm de diâmetro; verso acastanhado na parte central e periferia amarelada; sem pigmento difuso (Figura 6 e 7).



Figura 6. Colônia tipo II Figura 7. Verso colônia tipo II

Tipo III – Colônia branca rosada; pulverulenta; apiculada com sulcos radiais profundos; centro umbilicado; 25 mm de diâmetro; verso acastanhado e rugoso; sem pigmento difuso (Figura 8 e 9).



Figura 8. Colônia tipo III Figura 9. Verso colônia tipo III

Tipo IV – Colônia branca; pequena; cotonosa, plana, 23 mm de diâmetro; verso amarelo esverdeado na área central e laranja na periferia, sem pigmento difuso (Figura 10 e 11).



Figura 10. Colônia tipo IV

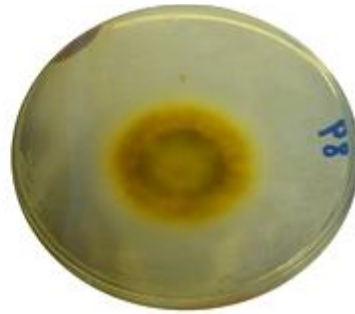


Figura 11. Colônia tipo IV

Tipo V – Colônia violácea, pulverulenta, topografia rugosa, crescimento lento, 19 mm de diâmetro; pigmento difuso vermelho escuro (Figuras 12 e 13). Pleomorfismo rápido resultando na perda da cor violácea e crescimento de micélio aéreo branco e cotonoso.

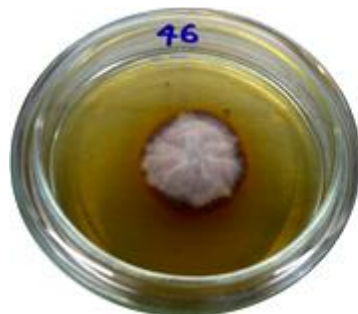


Figura 12. Colônia tipo V



Figura 13. Verso da colônia tipo V

Figura 14. Cultivo primário do *T. violaceum*

Tipo VI – Colônia branca; pulverulenta; topografia rugosa com sulcos radiais profundos, bordos irregulares; centro umbilicado; 30 mm de diâmetro; verso claro e rugoso; sem pigmento difuso (Figura 15 e 16).



Figura 15. Colônia tipo VI



Figura 16. Verso colônia tipo VI

Tipo VII – Colônia branca; cotonosa com micélio aéreo elevado; topografia plana; 40 mm de diâmetro; verso pouco avermelhado e periferia amarelada; sem pigmento difuso (Figura 17 e 18).



Figura 17. Colônia tipo VII



Figura 18. Verso colônia tipo VII

Considerando as características macromorfológicas acima descritas, um percentual de 72% dos isolados apresentaram colônias compatíveis com o tipo I e 12% com o tipo II; os fenótipos do tipo III, IV, V, VI e VII foram representados por um percentual entre 2 a 5% dos isolados (Figura 19).

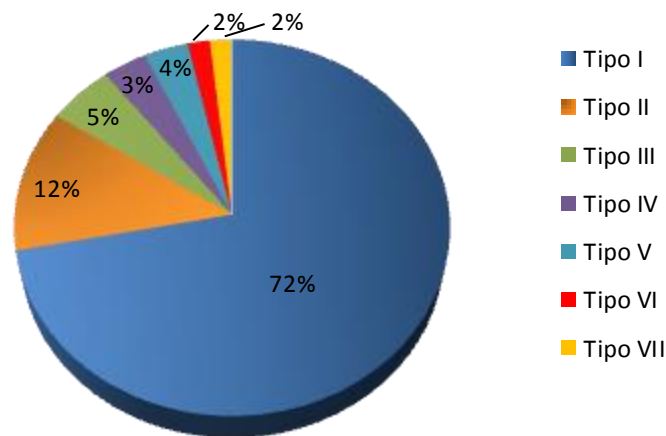


Figura 19. Distribuição dos isolados de *T. rubrum* em relação aos diferentes tipos de colônias (fenótipos).

A análise das características micromorfológicas das colônias, observadas a partir da técnica do microcultivo, revelou que todos os isolados apresentaram as características micromorfológicas comuns da espécie que são: abundantes microconídios em forma de lágrima (piriformes), dispostos lateralmente ao longo de hifas primárias delicadas, hialinas, septadas e pouco ramificadas; poucos isolados apresentaram microconídios partindo de microconidióforos. Os macroconídios estavam ausentes, ou em pequeno número na maioria dos isolados, tendo sido frequentes em apenas 11,4% dos isolados, sendo os mesmos alongados, de paredes finas, com até 8 septos. Clamidoconídios e hifas grossas e artrosporadas estavam presentes nos diferentes tipos de colônias em aproximadamente 50% dos isolados (Figura 20 a, b, c e d).

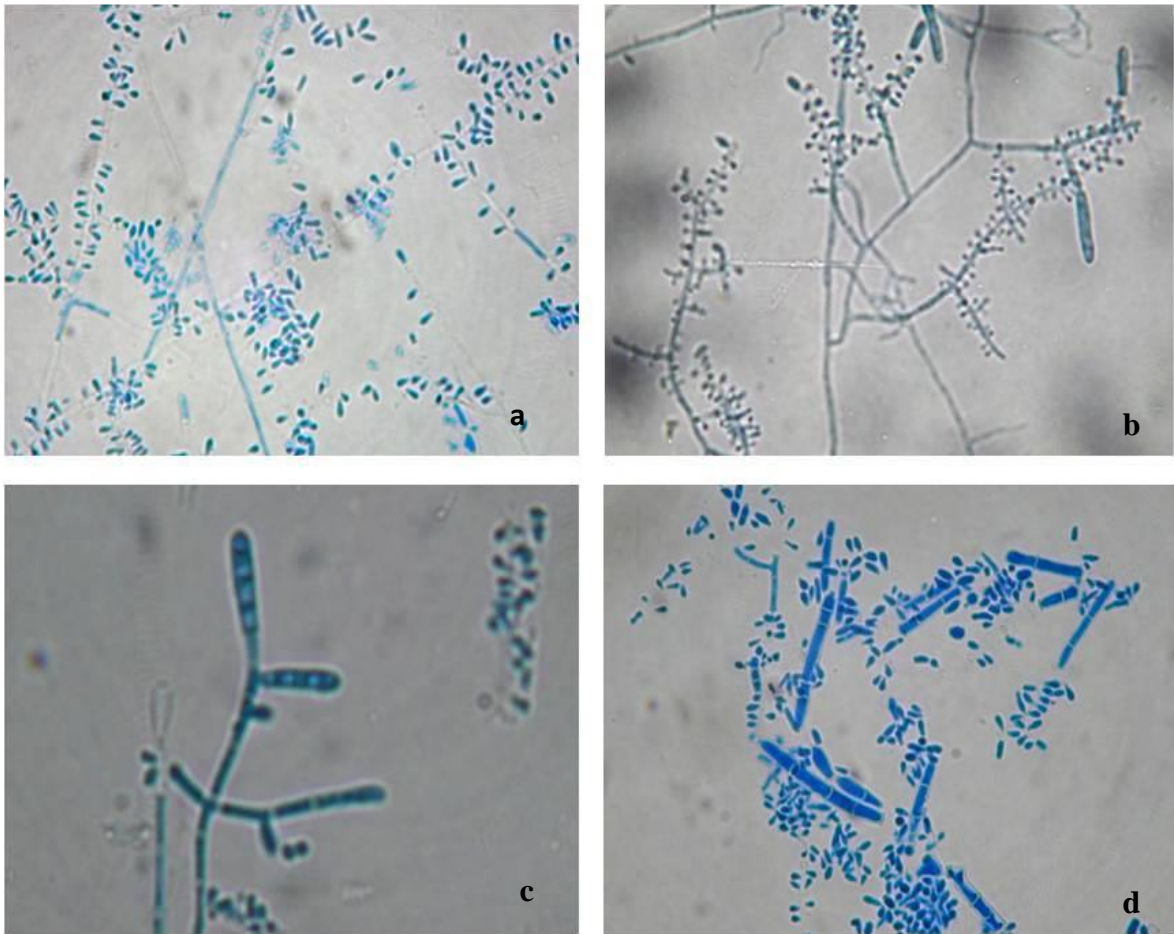


Figura 20. Características micromorfológicas dos isolados de *T. rubrum*. a) abundantes microconídios dispostos ao longo de hifas primárias pouco ramificadas. b) Microconídios partindo de microconidióforos ramificados. c e d) Macroconídios septados, de parede fina, alongados e com base afilada; raras vezes partindo de um mesmo ponto da hifa, à semelhança de *E. floccosum*.

Um padrão micromorfológico mais diferenciado foi observado apenas nas colônias do tipo V, pertencentes à espécie *T. violaceum* (isolados nº 46 e 161), as quais, além das estruturas comuns ao *T. rubrum*, revelaram também freqüentes hifas de parede grossa, artrosporadas, distorcidas e muito ramificadas; macroconídios muito alongados e até com mais de 10 septos, alguns de parede grossa e pedicelados (Figura 21).

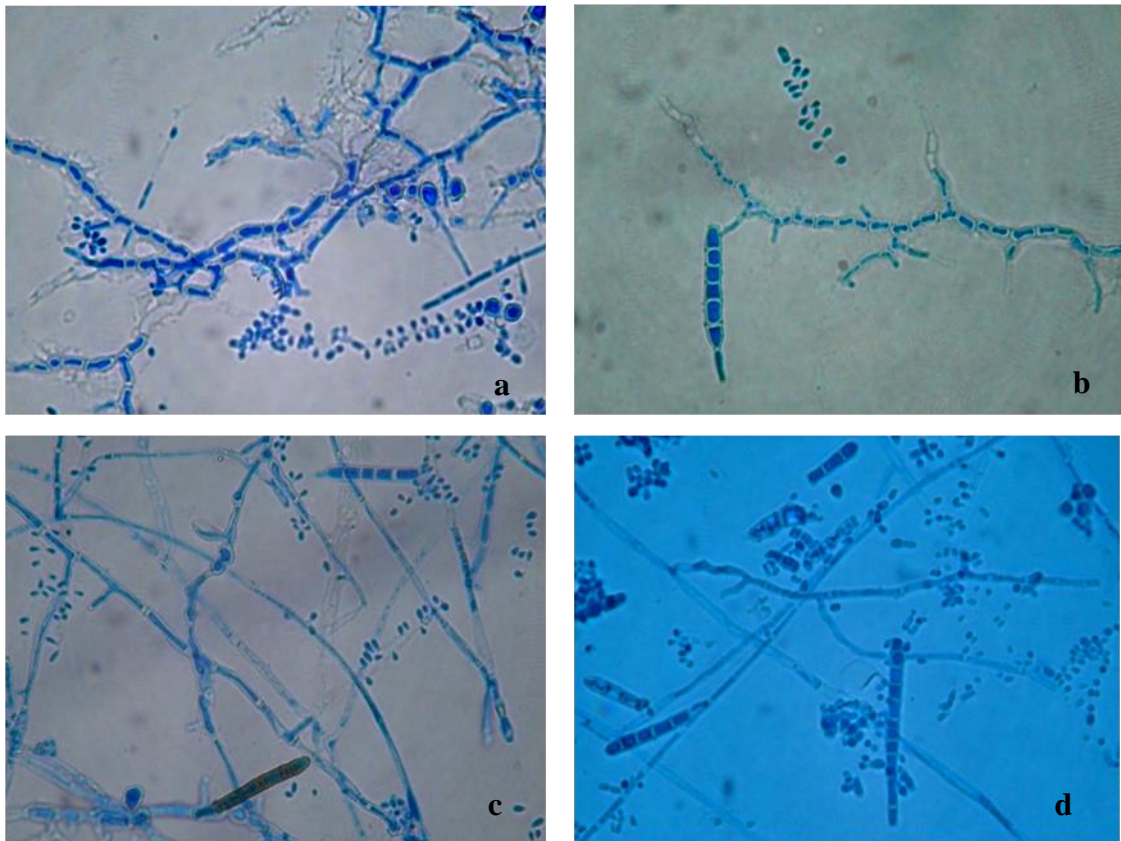


Figura 21. Características micromorfológicas de *T.violaceum*. **a e b)** Hifas septadas com abundantes microconídios em forma de lágrima e hifas artrosporadas de parede grossa, distorcidas e com muitas ramificações; macroconídio com duplo contorno e pedicelado. **c e d)** macroconídios alongados e septados.

Os 55 isolados de *T. rubrum* submetidos aos estudos de fenotipagem, tiveram a sua identificação em nível de espécie confirmada em estudo anterior por meio de PCR-RFLP do gene da topoisomerase, utilizando a endonuclease *HaeIII* e as amostras de n. 07 (*T. rubrum*) e 46 (*T. violaceum*) foram submetidas à análise de sequenciamento da região ITS após amplificação com os primers universais ITS1 e ITS4 (FROTA et al. 2011).

A análise da possível associação entre os fenótipos de *T. rubrum* com os dados clínicos, não revelou qualquer correlação.

Análises dos Genótipos

No intuito de se verificar a possível variabilidade genotípica dos isolados de *T.rubrum* foi realizada a tipagem molecular de 38 isolados pela técnica de RAPD, utilizando o primer 1

descrito por Baeza et al. (2006). Os perfis de RAPD obtidos foram analisados utilizando-se o software Phoretix 1D, no qual foram consideradas as principais bandas reveladas e o índice de semelhança entre os isolados.

Um total de 10 perfis foram distribuídos dentro de três grupos, os quais foram denominados de grupo I, II e III, a similaridade entre os grupos I e II foi de 53%, entre I e III de 40% e entre II e III foi de 40%. O Grupo I foi constituído por 32 isolados e esses possuíam similaridade de 85%. O Grupo II foi constituído por 5 isolados e esses possuíam similaridade de 58%. O grupo III foi representado por um único isolado (nº. 46), o qual foi identificado como *T. violaceum* pelos métodos convencionais de fenotipagem (Figura 22).

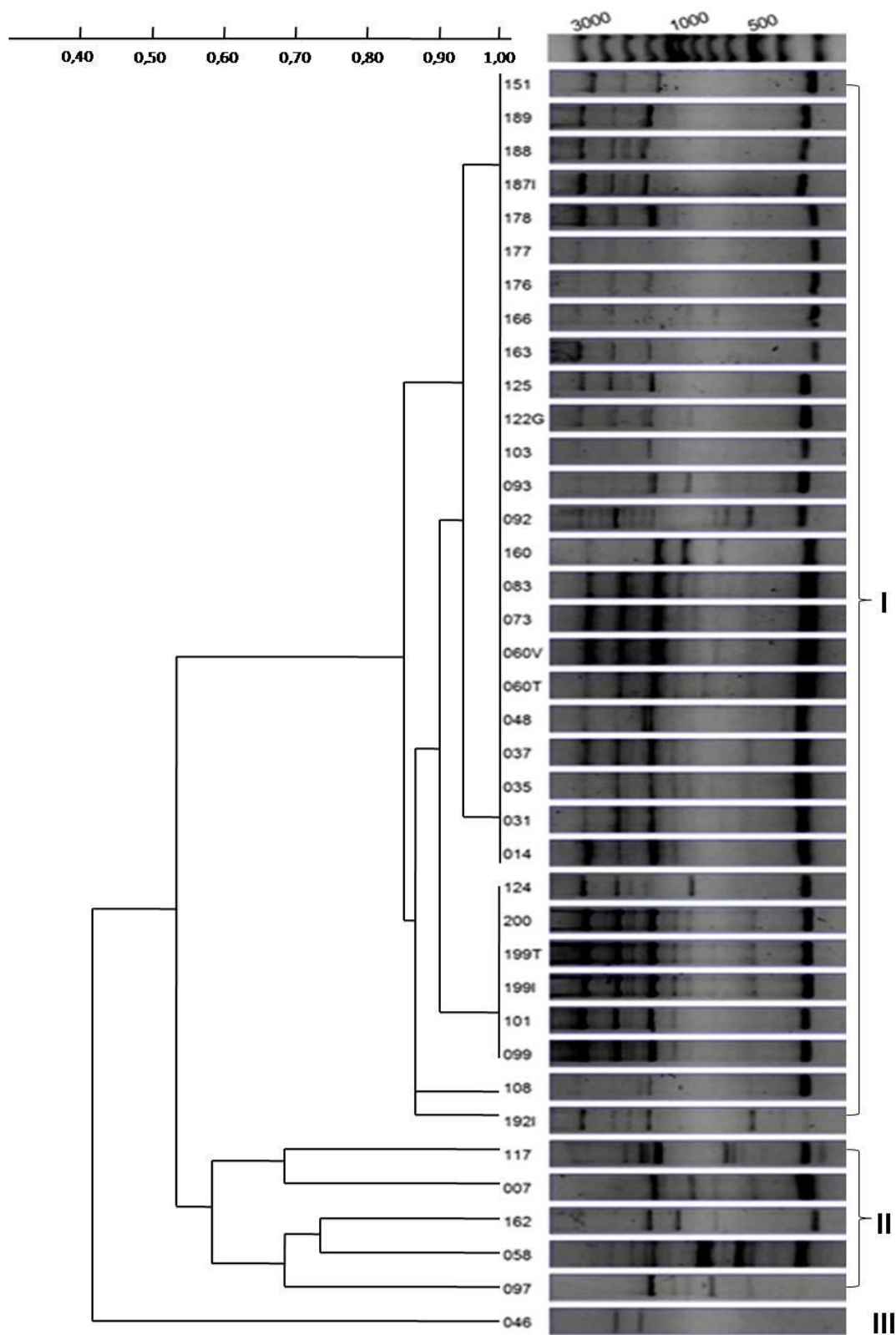


Figura 22. Dendrograma dos isolados de *T. rubrum* obtidos com o primer 1

No quadro 1 está representada a distribuição dos 38 isolados submetidos à genotipagem por meio do RAPD, em relação aos seus respectivos fenótipos e aspectos clínicos. Não foram encontradas associações entre os diferentes fenótipos e os genótipos, ou entre estes e os aspectos clínicos.

Quadro 1. Relação dos isolados fúngicos submetidos às análises fenotípicas e genotípicas

ISOLADO	ESPÉCIE	DIAGNÓSTICO	EVOLUÇÃO	FENÓTIPO	GENÓTIPO
07	<i>T. rubrum</i>	Tinha faciei	1 a 4 anos	Tipo I	Grupo II
14	<i>T. rubrum</i>	Tinha faciei	1 a 4 anos	Tipo II	Grupo I
31	<i>T. rubrum</i>	Tinha unguium	Menos de 1 ano	Tipo III	Grupo I
35	<i>T. rubrum</i>	Tinha faciei	Menos de 1 ano	Tipo I	Grupo I
37	<i>T. rubrum</i>	Tinha cruris	1 a 4 anos	Tipo II	Grupo I
46	<i>T. violaceum</i>	Tinha unguium	10 a 20 anos	Tipo V	Grupo III
48	<i>T. rubrum</i>	Tinha corporis	Menos de 1 ano	Tipo III	Grupo I
58	<i>T. rubrum</i>	Tinha pedis	1 a 4 anos	Tipo VII	Grupo II
60i	<i>T. rubrum</i>	Tinha cruris	5 a 9 anos	Tipo III	Grupo I
60t	<i>T. rubrum</i>	Tinha corporis	5 a 9 anos	Tipo III	Grupo I
73	<i>T. rubrum</i>	Tinha corporis	Menos de 1 ano	Tipo I	Grupo I
83	<i>T. rubrum</i>	Tinha cruris	Menos de 1 ano	Tipo VI	Grupo I
92	<i>T. rubrum</i>	Tinha cruris	5 a 9 anos	Tipo II	Grupo I
93	<i>T. rubrum</i>	Tinha cruris	1 a 4 anos	Tipo I	Grupo I
97	<i>T. rubrum</i>	Tinha cruris	Menos de 1 ano	Tipo I	Grupo II
99	<i>T. rubrum</i>	Tinha cruris	1 a 4 anos	Tipo I	Grupo I
101	<i>T. rubrum</i>	Tinha cruris	Menos de 1 ano	Tipo I	Grupo I
103	<i>T. rubrum</i>	Tinha cruris	5 a 9 anos	Tipo I	Grupo I
108	<i>T. rubrum</i>	Tinha cruris	Menos de 1 ano	Tipo I	Grupo I
117	<i>T. rubrum</i>	Tinha unguium	10 a 20 anos	Tipo II	Grupo II
122	<i>T. rubrum</i>	Tinha unguium	5 a 9 anos	Tipo I	Grupo I
124	<i>T. rubrum</i>	Tinha cruris	Menos de 1 ano	Tipo II	Grupo I
125	<i>T. rubrum</i>	Tinha manum	1 a 4 anos	Tipo I	Grupo I
151	<i>T. rubrum</i>	Tinha corporis	Menos de 1 ano	Tipo IV	Grupo I
160	<i>T. rubrum</i>	Tinha corporis	5 a 9 anos	Tipo I	Grupo I
162	<i>T. rubrum</i>	Tinha cruris	5 a 9 anos	Tipo I	Grupo II
163	<i>T. rubrum</i>	Tinha pedis	10 a 20 anos	Tipo I	Grupo I
166	<i>T. rubrum</i>	Tinha cruris	1 a 4 anos	Tipo I	Grupo I
176	<i>T. rubrum</i>	Tinha unguium	1 a 4 anos	Tipo I	Grupo I
177	<i>T. rubrum</i>	Tinha corporis	Mais de 20 anos	Tipo I	Grupo I
178	<i>T. rubrum</i>	Tinha cruris	1 a 4 anos	Tipo I	Grupo I
187	<i>T. rubrum</i>	Tinha cruris	1 a 4 anos	Tipo I	Grupo I
188	<i>T. rubrum</i>	Tinha cruris	1 a 4 anos	Tipo I	Grupo I
189	<i>T. rubrum</i>	Tinha faciei	1 a 4 anos	Tipo I	Grupo I
192	<i>T. rubrum</i>	Tinha corporis	Menos de 1 ano	Tipo I	Grupo I
199i	<i>T. rubrum</i>	Tinha cruris	1 a 4 anos	Tipo I	Grupo I
199t	<i>T. rubrum</i>	Tinha corporis	1 a 4 anos	Tipo I	Grupo I
200	<i>T. rubrum</i>	Tinha corporis	Menos de 1 ano	Tipo I	Grupo I

6. DISCUSSÃO

Trichophyton rubrum é uma das principais espécies do grupo dos fungos dermatófitos, com ampla distribuição no mundo, estando principalmente associada a quadros clínicos de evolução crônica e recidivantes em indivíduos adultos. No presente estudo foram incluídos 55 isolados desta espécie, dos quais 64% foram obtidos de dermatofitoses com mais de 1 ano e até mais de 20 anos de evolução.

Estes isolados foram obtidos principalmente de casos de *tinea corporis* e de *tinea cruris*; o número reduzido de isolados de *tinea pedis* e de *tinea unguium* neste estudo, a despeito de serem os quadros clínicos mais associados ao *T. rubrum*, foi devido à grande dificuldade no isolamento e purificação dos agentes dermatófitos dessas lesões. Gupta et al. (2000) demonstraram que o baixo índice de positividade neste exame, mesmo diante de uma grande evidência clínica desta patologia, manteve-se após duas ou três repetições.

O procedimento de coleta da região subungueal deve ser feita o mais próximo possível do limite entre a área afetada e a área sã, e muitas vezes isto não é possível em virtude do acúmulo de material provocado pela hiperqueratose. Além disso, a proliferação de contaminantes oportunistas de natureza bacteriana ou mesmo fúngica na região subungueal e na região dos pés, compromete a qualidade do espécime clínico para o exame de cultura.

A diferenciação específica dos agentes dermatófitos tem despertado crescente interesse nos últimos anos e esforços têm sido empregados na busca de métodos que permitam fazer a diferenciação entre cepas de uma mesma espécie.

Esta discriminação pode fornecer informações de fundamental importância para um maior entendimento de diversas questões ainda não elucidadas na inter-relação patógeno-hospedeiro, tais como para a definição dos casos de recidivas ou re-infecção pós-tratamento; possibilidade de infecções por múltiplas cepas; sobre as vias de transmissão; distribuição

epidemiológica; surgimento de surtos endêmicos, e identificação de cepas resistentes à terapêutica (JACKSON et al., 2000; CISALPINOS ; TRAVASSOS, 2002; GRASER et al., 2007; LEIBNER-CISZAK et al., 2010).

No entanto, apesar das dificuldades e limitações dos métodos clássicos de fenotipagem, o exame de cultura ainda é considerado o método padrão-ouro para a diferenciação dos dermatófitos em nível de espécie e de suas variedades. Isolados de *T. rubrum* podem apresentar variações morfológicas e desenvolver-se com características bem diferentes do que se conhece como clássico para esta espécie, especialmente em relação à macromorfologia da colônia.

Neste estudo, isolados de *T. rubrum* foram submetidos à análise dos fenótipos, considerando-se diversos aspectos da macro e micromorfologia das colônias, após subcultivo em meio ágar batata dextrose contido em placa de Petri. Dos 55 isolados analisados, sete fenótipos foram claramente diferenciados, descritos e classificados como do tipo I a VII.

A maioria dos isolados (72%) apresentaram o fenótipo I, no qual foram evidenciadas as principais características associadas à espécie *T. rubrum*, sendo as mesmas: colônias brancas cotonosas; topografia plana ou discretamente sulcada, e liberação de um pigmento difuso vermelho carmesim, 12% dos isolados foram incluídos no fenótipo II, apresentando colônias cotonosas com verso acastanhado no centro e amarelado na periferia, característica estas que podem ser confundidas com colônias de outras espécies de dermatófitos. Os demais fenótipos observados foram menos frequentes, representados por apenas 2 a 5% dos isolados.

Os fenótipos IV e V, apesar das diferenças em relação ao tipo I, também apresentaram características macromorfológicas que podem ser associadas ao *T. rubrum*. Os demais fenótipos descritos podem ser considerados, pelas características macromorfológicas apresentadas, variantes atípicas dessa espécie, e as suas colônias só foram identificadas considerando-se os critérios micromorfológicos, principalmente pela presença de abundantes

microconídios piriformes dispostos lateralmente ao longo das hifas. A esporulação abundante encontrada nos isolados pertencentes a esses grupos, permitiram descartar a hipótese de que os mesmos estariam pleomorfizados, situação em que as colônias produzem muitas hifas estéreis e com freqüentes clamidosporos.

A diversidade morfológica observada em isolados de *T. rubrum* culminou, há alguns anos, na proposição de mudanças taxonômicas, com a inclusão dos conceitos de “complexo *T. rubrum*” ou de “variedades de *T. rubrum*” (GRASER et al., 2000).

Kaminski (2004), com base nas características macro e micromorfológicas após subcultivos em seis diferentes meios de cultura, reconheceu apenas dois tipos de cepas: a do tipo granular, por sua vez, subdividida em duas variedades (*Rodainii* e a Africana), e a do tipo cotonosa, subdividida em seis variedades (“Y”, flava, “P”, melanóide, hiperpigmentada, sem cor e disgônica).

Os fenótipos classificados no presente estudo como do tipo I e do tipo II, apresentaram características compatíveis com aquelas atribuídas às variedades “TD” e “Y”, respectivamente, também descritas como as mais prevalentes por outros autores (KAMINSKI, 2004; HERNÁNDEZ et al., 2007).

Em relação aos aspetos micromorfológicos, em geral, os estudos não relatam variações importantes; apenas associam uma maior esporulação de microconídios e de macroconídios às colônias de textura pulverulenta ou granulosa. Em nosso estudo este tipo de colônia foi revelado em um número muito pequeno de isolados, não permitindo uma análise da associação entre essas variáveis.

Nossos resultados não demonstraram qualquer correlação entre os diferentes fenótipos observados e os dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes. Hernández et al. (2007) em análise sobre as variantes morfológicas de *T. rubrum* e a idade, gênero, fatores de risco e aspectos clínicos das lesões, também não evidenciaram correlação direta entre os mesmos.

Apesar da importância da identificação precisa das espécies dermatofíticas em rotina, e também, da grande variabilidade encontrada nos aspectos morfológicos de suas colônias, são escassos os estudos sobre a caracterização fenotípica dessas espécies, e os poucos trabalhos existentes, em geral, consideram poucos critérios, ou são realizados utilizando-se diferentes meios de cultura, o que dificulta a comparação dos resultados.

Em relação ao estudo da variabilidade genética intraespecífica, as técnicas baseadas na PCR são particularmente poderosas devido à facilidade de execução, rapidez, versatilidade e sensibilidade. Muitos métodos tradicionais de clonagem, sequenciamento e análise de polimorfismo de DNA têm dado lugar às derivações da técnica de PCR, e uma destas derivações é a tecnologia RAPD que envolve a amplificação simultânea de vários locos anônimos no genoma utilizando primers de sequência arbitrária (BAEZA et al., 2006; SANTOS et al., 2010; HRYNCEWICZ-GWOZDZ et al., 2011).

Baeza et al. (2006) obtiveram resultados consistentes utilizando dois primers (1 e 6) desenvolvidos pelos autores, os quais revelaram a variabilidade genética entre 67 isolados de *T. rubrum*. Este estudo destacou-se como uma referência na aplicação da técnica do RAPD para estudos da diversidade genômica de *T. rubrum* e conseqüentemente, para a discriminação entre cepas desta espécie em diferentes lugares do mundo.

Em nosso estudo, 38 isolados de *T. rubrum* foram submetidos à análise genotípica por meio da técnica do RAPD, utilizando-se o primer 1 descrito por Baeza et al. (2006). A genotipagem destes isolados revelou 10 perfis genéticos, os quais foram distribuídos em três grupos, classificados como I, II e III.

Apesar do número reduzido de isolados analisados, nossos resultados foram compatíveis com os obtidos por Baeza et al. (2006), considerando que os perfis obtidos foram inseridos em três diferentes grupos, sendo o grupo I o de maior representação (79% dos isolados) com um índice de 85% de similaridade genética. No entanto, em nosso estudo,

maior variabilidade foi encontrada entre os isolados inseridos no grupo II (18% dos isolados), os quais revelaram um índice de similaridade de apenas 58%, e o grupo III foi representado por apenas 01 isolado, este pertencente à espécie *T. violaceum*.

Polimorfismos genéticos entre isolados de *T. rubrum* também têm sido relatados em outros estudos mais recentes em que foram utilizados os primers 1 e 6 de Baeza, reforçando assim a importância da técnica do RAPD como uma ferramenta promissora para a tipagem molecular de fungos dermatófitos.

Santos et al. (2009) verificaram que ambos os *primers* foram capazes de diferenciar cepas de *T. rubrum* e *T. interdigitale*. Os autores analisaram 86 isolados de casos de onicomicose de *T. rubrum* no qual foram evidenciados 19 genótipos, agrupados em dois principais grupos genéticos.

Yang et al. (2009) verificaram que essa metodologia revelou diferenças genótípicas entre os isolados do Japão e da China, e que os perfis de RAPD obtidos a partir da amplificação com os *primers* 1 e 6 tiveram boa correlação com os resultados obtidos pelo sequenciamento da região NTS.

Leibner-Cisak et al. (2010) sugeriram a utilização simultânea dessa metodologia do RAPD e de uma nova técnica denominada de PCR-MP, para screening de isolados de *T. rubrum* e *T. interdigitale*.

Nossos resultados não revelaram qualquer associação entre os diferentes genótipos com os fenótipos e os dados clínicos dos pacientes. Apesar do comprovado potencial da técnica do RAPD para estudos da variabilidade genética de *T. rubrum*, este método, assim como todas as outras técnicas até hoje utilizadas não permitiram uma correlação entre os diferentes genótipos e os aspectos clínicos e epidemiológicos das dermatofitoses.

7. CONCLUSÕES

7.1 A partir dos estudos da macromorfologia de 55 isolados de *T. rubrum* foram evidenciadas diferentes características de colônias, as quais representaram 07 fenótipos.

7.2 O fenótipo predominante foi o do tipo I o qual apresentou as principais características associadas a espécie *T. rubrum*.

7.3 Não foram evidenciadas diferenças micromorfológicas associadas aos diferentes tipos de colônias.

7.4 A análise dos isolados de *T. rubrum* pelo método de RAPD permitiu a discriminação de 10 perfis genotípicos distribuídos em três grupos, sendo que, a maioria dos isolados pertenceu a um mesmo grupo genético, o grupo I, com 85% de similaridade.

7.5 Menor índice de similaridade genética foi evidenciado em uma cepa de *T. violaceum* o qual isoladamente representou o grupo III, novos estudos se fazem necessários incluindo um maior número de isolados desta espécie.

7.6 Nossos resultados não revelaram qualquer associação entre os diferentes genótipos com os fenótipos e os dados clínicos dos pacientes.

7.7 Apesar do comprovado potencial do RAPD para estudos da variabilidade genética de *T. rubrum*, novos métodos que permitam fazer uma correlação entre os diferentes genótipos e os aspectos clínicos e epidemiológicos das dermatofitoses ainda precisam ser avaliados ou desenvolvidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AQUINO, V. R.; CONSTANTE, C. C.; BAKOS, L. Frequency of dermatophytosis in mycological examinations at a general hospital in Porto Alegre, Brazil. *An Bras Dermatol.*, v. 82, p. 239-244, 2007.

ARAÚJO, A. J. G.; SOUZA, M. A. J.; BASTOS, O. M.; OLIVEIRA, J. C. Ocorrência de onicomicoses em pacientes atendidos em consultórios dermatológicos da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. *An Bras Dermatol.*, v. 78, p. 299-308, 2003.

ASTE, N.; PAU, M.; BIGGIO, P. Tinea pedis observed in Cagliari, Italy, between 1996 and 2000. *Mycoses*, v. 46, p. 38-41, 2003.

BARAN, R.; KAOUKHOV, A. Topical antifungal drugs for the treatment of onychomycosis: an overview of current strategies for monotherapy and combination therapy. *JEADV*, v.19, p.21-29, 2005.

BAEZA, L. C.; MATSUMOTO, M. T.; ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. Strain differentiation of *Trichophyton rubrum* by randomly amplified polymorphic DNA and analysis of rDNA nontranscribed spacer. *J Med Microbiol*, v.55, p.429-36, 2006.

BRILHANTE, R. S. N.; PAIXAO, G. C.; SALVINO, L. K. Epidemiologia e ecologia das dermatofitoses na cidade de Fortaleza: o *Trichophyton tonsurans* como importante patógeno emergente da *Tinea capitis*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.33, n.5, p.417-425, 2000.

BRILHANTE, R. S. N. Caracterização fenotípica e genotípica de *Microsporum canis* oriundos de cães e gatos como um possível clone fúngico. Fortaleza: UEC, 2005. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, 2005.

BOONCHAI, W.; KULTHANAN K.; MAUNGPRASAT, C.; SUTHIPINITTHAM, P. Clinical characteristics and mycology of onychomycosis in autoimmune patients. *J. Med Assoc Thai*, v.86(11), p. 995-1000, 2003.

BURZYKOWSKI, T. ; MOLENBERGHS, G. ; ABECK, D. High prevalence of foot diseases in Europe: results of the Achilles Project. *Mycoses*, v.46, p.496-505, 2003.

CAMPOS, M. R.; RUSSO, M.; GOMES, E.; ALMEIDA, S. R. Stimulation inhibition and death of macrophages infected with *trichophyton rubrum*. *Microbes infect.*, v.8(2), p. 372-9, 2006.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in man in sterile distilled water. Further researches. *J Trop Med Hyg*, v. 70, p. 181-4, 1967.

CHANG, JEN-CHYL.; HSU, M. M.; BARTON, R. C.; JACKSON, C. J. High-Frequency Intragenomic Heterogeneity of the Ribosomal DNA Intergenic Spacer Region in *Trichophyton violaceum*. *Eukaryotic Cell*, v.7, n. 4, p. 721-726, 2008.

- CHINELLI, P. A. V.; SOFIATTI, A. A.; NUNES, R. S.; MARTINS, J. E. C. Dermatophyte agents in the city of São Paulo, from 1992 to 2002. **Revista do Instituto de Medicina Tropical** de São Paulo, v.45, p. 259-263, 2003.
- CISALPINO, P. S.; TRAVASSOS, L. R. Aplicações da biologia molecular à micologia médica. In; LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. Tratado de Micologia Médica Lacaz. 9ed. São Paulo: Sarvier, 2002.
- CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S.; ROCHA, M. F.; RABENHORSCH, S. H.; MOREIRA, J. L.; GRANGEIRO, T. B.; SIDRIM, J. J. Antifungal susceptibility and genetic similarity of sequential isolates of *Trichophyton rubrum* from an immunocompetent patient with chronic dermatophytosis. *Clin Exp Dermatol*, v.31, n.1, p.122-4, 2006.
- COSTA, M.; PASSOS, X. S.; SOUZA, L. K. H.; MIRANDA, A. T. B.; LEMOS, J. A.; OLIVEIRA, J. R. J. G.; SILVA, M. R. R. Epidemiologia e etiologia das dermatofitoses em Goiânia, GO, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.35, p.19-22, 2002.
- CRAWFORD, F. Athlete's foot and fungally infected toe nails. *Clin Evid.*, v.7, p.1458-1466, 2002.
- CREMER, G.; ROUJEAU, J. C.; HOUIN, R.; REVUZ, J. Chronic dermatophyte infections - Physio-pathology, treatment. *J. Micol. Med.*, v. 5 (Suppl.1), p.2-7, 1995.
- CUCÉ, L. C.; NETO, C. F. Manual de Dermatologia. Rio de Janeiro: Atheneu, 1990.
- DAMAZIO, P. M. R. D. B. C.; LACERDA, H. R.; LACERDA FILHO, A. M.; MAGALHÃES, O. M. C.; NEVES, R. P. Epidemiology, etiology and clinical presentation of dermatophytosis in Pernambuco, 1995-2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, n.4, p.484-486, 2007.
- DAHL, M. V. Immunological resistance to dermatophyte infections. Suppression of immunity and inflammation by products produced by dermatophytes. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v.28, p.19-23, 1993.
- DAHL, M. V.; GRANDO, S. A. Chronic dermatophytosis: What is special about *Trichophyton rubrum*. *Adv. Dermatol.*, v.9, p.97-109, 1994.
- DEGREEF, H. Clinical Forms of Dermatophytosis (Ringworm Infection). *Mycopathologia*, v.166, p.257-265, 2008.
- DEL SAL, G.; MANFIOLETTI, G.; SCHNEIDER, C. The CTAB-DNA precipitation method: a common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. *Biotechniques*, v.7, p.514-519, 1989.
- DJERIDANE, A.; DJERIDANE, Y.; AMMAR-KHODJA, A. A clinic mycological study of fungal foot infections among Algerian military personnel. *Clinical and Experimental Dermatology*, v.32, p.60-63, 2007.

- ELEWSKI, B.E. Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis and management. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.11, n.3, p.415-29, 1998.
- ELEWSKI, B. E.; EL CHARIF, M.; COOPER, K. D.; GHANNOUM, M.; BIRBAUM, J. E. Reactivity to trichophyton antigen in patients with onychomycosis: effect of terbinafine. *J AM Acad Dermatol*, v.46, n.3, p.371-5, 2002.
- ELLABIB, M. S.; KHALIFA, Z.; KAVANAGH, K. Dermatophytes and other fungi associated with skin mycoses in Tripoli, Libya. *Mycoses*, v.45, p.101-4, 2002.
- ELLIS, D. H. Diagnosis of onychomycosis made simple. *J Am Acad Dermatol.*, v.40, p.S3-S8, 1999.
- ELLIS, D. (2004). Laboratory Methods. Mycology on line, Fungal descriptions, dermatophytes, Trichophyton. CRICOS Provider number 00123M School of Molecular & Biomedical Science. The University of Adelaide. Australia.
- ELLSWORTH, D. L.; RITTENHOUSE, K. D.; HONEYCUTT, R. L. Artfactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *Biotechniques*, v.14, p.214-217, 1993.
- ESQUENAZI, D.; ALVIANO, C. S.; DE SOUZA, W.; ROZENTAL, S. The influence of surface carbohydrates during in vitro infection of mammalian cells by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Res Microbiol.*, v.155, p.144-53, 2004.
- EVANS, E. G. Causative pathogens in onychomycosis and the possibility of treatment resistance: a review. *J Am Acad Dermatol.*, v.38, p.32-36, 1998.
- FALAHATI, I. M.; AKHLAGHI, L.; LARI, A. R.; ALAGHEHBANDAN, R. Epidemiology of dermatophytoses in the area of Tehran, Iran. *Mycopathologia*, v.156, p.279-87, 2003.
- FAERGEMANN, J.; BARAN, R. Epidemiology, clinical presentation and diagnosis of onychomycosis. *Br J Dermatol.*, v.149, p.1-4, 2003.
- FENG, Y.; XIAO, S.; TAN, S. Identification of common pathologic fungi using the arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Chin J Derm Venereol.*, v.14, p.157-158, 2000.
- FROTA, M. Z. M.; SILVA, F. B.; SCHETTINI, A. P.; PINHEIRO, J. R. Prevalência das Dermatofitoses em Adultos Atendidos em um Centro de Referência em Dermatologia Tropical na Cidade de Manaus-AM. In: XXIII Congresso Brasileiro de microbiologia, 2005, Santos. Anais do Congresso, 2005.
- FOSTER, K. W.; GHANNOUM, M. A.; ELEWSKI, B. E. Epidemiologic surveillance of cutaneous fungal infection in the United States from 1999 to 2002. *J. of the American Academy of Dermatol.*, v.50, p.748-752, 2004.
- GARCÍA-HUMBRÍA, L.; RICHARD-YEGRES, N.; PÉREZ-BLANCO, M.; YEGRES, F.; MENDOZA, M.; ACOSTA, A.; HERNÁNDEZ, R.; ZÁRRAGA, E. Superficial mycoses: comparative study between type2 diabetic patients and a non-diabetics control group. *Invest Clin.*, v.46, n.1, p. 65-74, 2005.

- GEORG, L. K. Ecology and diagnostic problems of fungal zoonoses. *Ind. Med. Surg.*, v.33, p.308-10, 1964.
- GRASER, Y.; EL FARI, M.; VILGALYS, R.; KUIJPERS, A. F. A.; DE HOOG, G. S.; W. PRESBER, W.; TIETZ, H. J. Phylogeny and taxonomy of the family Arthrodermataceae (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region. *Med. Mycol.*, v.37, p.105-114, 1999.
- GRASER, Y.; KUHNISCH, J.; PRESBER, W. Molecular Markers Reveal Exclusively Clonal Reproduction in *Trichophyton rubrum*. *J. of clin. Microbiol.*, v.37, n.11, p.3713-17, 1999.
- GREKIN, R. C.; SAMLASKA, C. P.; VIN-CHRISTIAN, K. Diseases resulting from fungi and yeasts. In: Odon, R. B.; James, W. D.; Berger, T. G. *Diseases of the skin*. 9th edition. Philadelphia: WB Saunders; 2000. p.358-416.
- GUOLING, Y.; XIAOHONG, Y.; JINGRONG, L.; LIJI, J.; LIJIA, A. A study on stability of phenotype and genotype of *Trichophyton rubrum*. *Mycopathologia*, v.161, p.205-212, 2006.
- GUOLING, Y.; LIJIA, A.; QIAO, L.; JINGRONG, L.; WEIDA, L.; LIJI, J.; XIRAN, L. Genotyping of *Trichophyton rubrum* by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions. *Mycopathologia*, v.164, p.19-25, 2007.
- GUPTA, A. K.; CHAUDHRY, M.; ELEWSKI, B. Tinea corporis, tinea cruris, tinea nigra, and piedra. *Dermatol Clin.*, v.21, p.395-400, 2003.
- HAINER B. L. Dermatophyte infections. *Am Fam Physician.*, v.23, p.101-108, 2003.
- HAVLICKOVA, B.; CZAIIKA, V. A.; FRIEDRICH, M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*, v.51 (Supl.4), p. 2-15, 2008.
- HAY, R. Onychomycosis. Literature review. *JEADV*, v.19 (Suppl. 1), p.1-7, 2005.
- HAY, R. Skin diseases. In: JAMISON, D. T.; BREMAN, A. G.; MEASHAM, A. R. *Disease Control Priorities in Developing Countries*, 2nd edn, Chapter 37. New York: The World Bank and Oxford University Press, 2006.
- HERNANDEZ, H. F.; GAYOSSO, P. M.; MARTINEZ, C. E.; TOVAR, L. J. M. Morphological varieties of *Trichophyton rubrum* clinical isolates. *Revista Mexicana de Micologia*. v.25, p. 9-14, 2007.
- INGORDO, V.; NALDI, L.; FRACCHIOLLA, S. COLECCHIA, B. Prevalence and risk factors for superficial fungal infections among Italian Navy Cadets. *Dermatology*, v.209, p.190-6, 2004.
- IWEN, P. C. Molecular detection and typing of fungal pathogens. *Clin Lab Med.*, v.23, p. 781-799, 2003.

- JACKSON, C. J.; BARTON, R. C.; KELLY, S. L.; EVANS, E. G. Species Identification and Strain Differentiation of Dermatophyte Fungi by Analysis of Ribosomal-DNA Intergenic Spacer Regions. *J. of Clin. Microbiol.*, p. 931- 936, 1999.
- JACKSON, C. J.; BARTON, R. C.; KELLY, S. L.; EVANS, E. G. Strain Identification of *Trichophyton rubrum* by Specific Amplification of Subrepeat Elements in the Ribosomal DNA Nontranscribed Spacer. *J. of Clin. Microbiol.*, p. 4527- 4534, 2000.
- JONES, H. E. Immune response and host resistance of humans to dermatophyte infection. *J Am Acad Dermatol.*, v.28, p.12-18, 1993.
- KAC, G.; BOUGNOUX, M. E.; FEUILHADE DE CHAUVIN, M.; SENE, S.; DEROUIN, F. Genetic diversity among *Trichophyton mentagrophytes* isolates using random amplified polymorphic DNA method. *British J. of Dermatol.*, v.140, p.839-44, 1999.
- KAMINSKI, G. (<http://www.micology.adelaide.edu.au>). Kaminski's dermatophyte identification scheme. Mycology on line.
- KANE, J.; Summerbell, R.; Sigler, L.; Krajden, S.; Land, G. *Laboratory Handbook of Dermatophytes*. Belmont Star Publishing Company , 1997.
- KAUFMAN, G.; HORWITZ, B. A.; DUEK, L.; ULLMAN, Y.; BERDICEVSKY, I. Infection stages of the dermatophyte pathogen *Trichophyton*: microscopic characterization and proteolytic enzymes. *Med Mycol.*, v.45, p.149-55, 2007.
- KUSTARK, E. *Imunology of fungal diseases*. New York: Marcel Dekker, v.47, 1989.
- KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. *Medical Micology*. USA: Willians; Wilkings, 1992.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINZ-VACCARI E. M.; MELO, N. T. *Tratado de Micologia Médica Lacaz*. 9a ed., São Paulo: Sarvier, 2002.
- LARI, R. A.; AKHLAGHI, L.; FALAHATI, M.; ALAGHEHBANDAN, R. Characteristics of dermatophytoses among children in an area south of Tehran, Iran. *Mycoses*, 2005.
- LEIBNER-CISZAK, J.; DOBROWOLSKA, A.; KRAWCZYK, B.; KASZUBA, A.; STACZE, P. Evaluation of a PCR melting profile method for intraspecies differentiation of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale*. *J. of Medical Microbiol.* v.59, p.185-192, 2010.
- LITTLE, G. N.; GORDON, M. A. Survival of fungal cultures maintained under mineral oils for twelve years. *Mycologia*, v.59, p.733-6, 1967.
- LIU, D.; COLOE, S.; PEDERSEN, J.; BAIRD, R. Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction to differentiate *Trichophyton* dermatophytes. *FEMS Microbiol.*, v.136, p.147-150, 1996.
- MACURA, A. B. Dermatophyte infections. *Int J Dermatol.*, v.32, p.313-23, 1993.

MAHMOUD, A. L. A study of dermatophytoses in Sana'a, Yemen Republic. *Mycoses*, v.45, p.105-8, 2002.

MALE, O. The significance of mycology in medicine. In: Hawksworth DL, *Frontiers in Mycology*. Wallingford: CAB International, p.131-56, 1990.

MARAKI, S.; NIOTI, E.; MANTADAKIS, E.; TSELENTIS, Y. A 7-year survey of dermatophytoses in Crete, Greece. *Mycoses*, v.50, p.481-4, 2007.

MAYSER, P.; HENSEL, J.; PODOBINSKA, M.; GEIGER, M.; ULBRICHT, H.; HAAK, T. Prevalence of fungal foot infections in patients with diabetes mellitus type 1 - underestimation of moccasin-type tinea. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, v.112, n.5, p.264-8, 2004.

MCCARTHY, D. J. Origins of onychocosis. *Clin Podiatr Med Surg.*, v.12, n.2, p.221- 48, 1995.

MEZZARI, A. Frequency of dermatophytes in the metropolitan area of Porto Alegre, RS, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v.40, p.71-6, 1998.

MOCHIZUKI, T.; SUGIE, N.; UEHARA, M. Random amplification of polymorphic DNA is useful for the differentiation of several anthropophilic dermatophytes. *Mycoses*, v. 40, p.405-409, 1997.

MOCHIZUKI, T.; TANABE, H.; KAWASAKI, M.; ISHIZAKI, H.; JACKSON, C. J. Rapid identification of *Trichophyton tonsurans* by PCR-RFLP analysis of ribosomal DNA regions. *J Dermatol Sci*. v.32, p.25-32, 2003.

MUHSIN, T. M.; AL-RUBAIY, K. K.; AL-DUBOON, A. H. Characteristics of dermatophytoses in Basrah, Iraq. *Mycoses*, v.42, p.335-338, 1999.

MUKHERJEE, P. K.; LEIDICH, S. D.; ISHAM, N.; LEITNER, I.; RYDER, N. S.; GHANNOUM, M. A. Clinical *Trichophyton rubrum* strain exhibiting primary resistance to terbinafine. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.47, p.82-86, 2003.

NEJI, S.; MAKNI, F.; CHEIKHROUHOU, F.; SELLAMI, A.; SELLAMI, H.; MARRECKCHI, S.; TURKI, H.; AYADI, A. Epidemiology of dermatophytoses in Sfax, Tunisia. *Mycoses*, v.52, n.6, p.534-538, 2009.

NG, K. P.; SOO-HOO, T. S.; NA, S. L.; ANG, L. S. Dermatophytes isolated from patients in University Hospital, Kuala Lumpur, Malaysia. *Mycopathologia*, v.155, p.203-206, 2002.

NOGUCHI, H.; HIRUMA, M.; KAWADA, A.; ISHIBASHI, A.; KONO, S. Tinea pedis in members of the Japanese self-defense Forces: relationships of its prevalence and its severity with length of military service and width of interdigital spaces. *Mycoses*, v.38, p.494-9, 1995.

OGAWA, H. R. C.; SUMMERBELL, K. V.; CLEMONS, T.; KOGA, Y. P.; RAN, A.; RASHID, P. G.; SOHNLE, D. A.; TSUBOI, R. Dermatophytes and host defence in cutaneous mycoses. *Med. Mycol.*, v.36 (Suppl. 1), p.166-173, 1998.

- PANASITI, V.; BORRONI, R. G.; DEVIRGILIIS, V.; ROSSI, M.; FABBRIZIO, L.; MASCIANGELO, R.; BOTTONI, U.; CALVIERI, S. Comparison of diagnostic methods in the diagnosis of dermatomycoses and onychomycoses. *Mycoses*, v.49, p.26-9, 2006.
- PIHET, M.; ROBERT, R. Conventional Methods for the Diagnosis of Dermatophytosis *Mycopathologia*. v.166, p.295-306, 2008.
- POPOOLA, T. O. S.; OJO, D. A.; ALABI, R. O. Prevalence of dermatophytosis in junior secondary schoolchildren in Ogun State, Nigeria. *Mycoses*, v.49, p.499-503, 2006.
- REBELL, G.; TAPLIN, D. *Dermatophytes. Their recognition and identification*. Coral Gables, Florida: University of Miami Press, 1974.
- REIS, C. M. S.; GASPAS, A. P. A.; GASPAS, N. L.; LEITE, R. M. S. Estudo da flora dermatofítica na população do Distrito Federal. *An Bras Dermatol*, v.67, p.103-11, 1992.
- ROMANO, C.; MASSAIA, L.; ASTA, F.; SIGNORINI, A. M. Prevalence of dermatophytic skin and nail infections in diabetic patients. *Mycoses*, v.44, p.83-6, 2001.
- ROMANO, C.; GIANNI, C.; DIFONZO, E. M. Retrospective study of onychomycosis in Italy: 1985-2000. *Mycoses*, v.48, p.42-4, 2005.
- RUIZ, L. R. B.; ZAITZ, C. Dermatofitos e dermatofitoses na cidade de São Paulo no período de agosto de 1996 a julho de 1998. *An Bras Dermatol*, v.76, p.391-401, 2001.
- SANTOS, D. A.; ARAÚJO, R. A. C.; HAMDAN, J. S.; CISALPINO, P. S. *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale*: Genetic Diversity Among Species and Strains by Random Amplified Polymorphic DNA Method. *Mycopathologia*, 2009.
- SCHER, R. K.; TULUMBAS, B.; ARGO, L. F.; HOWELL, J. E.; SMITH, E. B.; DRAKE, L. A. The nurses's role in diagnosing and treating onychomycosis. *Dermatol Nurse*, v.7, n.6, p.335-45, 1995.
- SEEBACHER, C.; BOUCHARA, J. P.; MIGNON, B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. *Mycopathologia*, v.166, p.335-352, 2008.
- SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004.
- SOLL, D. R. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clin. Microbiol. Reviews*, v.13, p.332-370, 2000.
- STRATEN, V. R. M.; HOSSAIN, A. M.; GHANNOUM, A. M. Cutaneous infections dermatophytosis, onychomycosis, and tinea versicolor. *Infect Dis Clin Am.*, v.17, p.87-112, 2003.
- TLACUILO, A. P.; GUEVARA, E. G.; MAYORGA, J.; GARCIA, I. D. Onychomycosis in systemic lupus erythematosus: a case control study. *J. Rheumatol.*, v.30, n.7, p.1491-4, 2003.

TORO, M. A.; CASANOVA, D.; PIONTELLI, E. Phenotypic analysis of the *Trichophyton rubrum* complex in Sabouraud dextrose agar, Lactrimel agar and the Fischer & Kane technique: A regional experience. *Boletín Micológico*, v. 21, p.91 – 97, 2006.

TSUBOI, R.; KO, I.; TAKAMORI, K.; OGAWA, H. Isolation of a keratinolytic proteinase from *Trichophyton mentagrophytes* with enzymatic activity at acidic pH. *Infect. Immun.*, v.57, p.3479-3483, 1989.

TSUBOI, R.; SEKIGUCHI, K.; OGAWA, H. The properties and biological role of an acidic proteinase from *Trichophyton mentagrophytes*. *Jpn. J. Med. Mycol.*, v.33, p.147-151, 1992.

UNGPAKRON, R. Mycoses in Thailand: Current concerns. *Jap. J. Med. Mycol.*, v. 46, p.81-86, 2005.

VALDIGEM, G. L.; PEREIRA, T.; DUARTE, M. L.; OLIVEIRA, P.; LUDOVICO, P.; SOUSA-BASTO, A.; MACEDO, C.; LEÃO, C.; RODRIGUES, F. A twenty-year survey of dermatophytoses in Braga, Portugal. *Intern. J of Dermatol.*, v. 45, n.7, p.822-27, 2006.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R. C. The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev.*, v.8, n.2, p.240-59, 1995.

WELSH, O.; WELSH, E. O.; CAMPO-CANDIANI, J.; GOMEZ, M.; VERA-CABRERA, L. Dermatophytoses in Monterrey, Mexico. *Mycoses*, v.49, p.119-23, 2006.

WOODFOLK, J. A. Allergy and dermatophytes. *Clin Microbiol Rev.*, v.18, p.30-43, 2005.

YANG, J.; CHEN, L.; WANG, L.; ZHANG, W.; LIU, T.; JIN, Q. TrED: the *Trichophyton rubrum* expression database. *BMC Genomics*, v.8, p.250, 2007.

YANG, X.; SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; HIRUMA, M.; LI, R.; SUDO, H.; OGAWA, H.; IKEDA, S. Differentiation of *Trichophyton rubrum* clinical isolates from Japanese and Chinese patients by randomly amplified polymorphic DNA and DNA sequence analysis of the non-transcribed spacer region of the rRNA gene. *J. of Dermatol. Science*, v.54, p.38-42, 2009.

ZAIAS, N. Onychomycosis. *Dermatol Clin.*, v.3, n.3, p.445- 60, 1985.

ZAIAS, N.; REBELL, G. Chronic dermatophytosis syndrome due to *Trichophyton rubrum*. *Int. J. Dermatol.*, v. 35, p.614-17, 1996.

ZAITZ, C.; VENDRAME, C. M.; FERNANDEZ, D.; VELOSA, A. P.; POPPE, S.; PROENCA, N. G.; LEÃO, R. C. A possible serum factor in patients with dermatophytid of the hands. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, v.4, n.2, p.194-7, 1995.

ZAITZ, C.; MARQUES, S. A.; RUIZ, L. R. B.; SOUZA, V. M. *Compêndio de Micologia Médica*. Rio de Janeiro: MEDSI; p.81-4.

ZHONG, Z.; LI, R.; LI, D.; WANG, D. Typing of common dermatophytes by random amplification of polymorphic DNA. *Jpn J Med Mycol.*, v.38, p.239-246, 1997.

ZUBER, T.; BADDAM, K. Superficial fungal infection of the skin: where and how it appears help determine therapy. *Postgrad Med.*, v.109, p.117-32, 2001.