



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA E
DE IDENTIFICAÇÃO DE DERMATÓFITOS POR
ANÁLISE DE PCR-RLP**

MARIA ZELI MOREIRA FROTA

**MANAUS
2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

MARIA ZELI MOREIRA FROTA

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA E
DE IDENTIFICAÇÃO DE DERMATÓFITOS POR
ANÁLISE DE PCR- RFLP**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazona, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia, na área de concentração "Saúde.

Orientadora: Dra. Maria Cristina dos Santos

Co-orientador: Dr. João Vicente Braga de Souza

**MANAUS - AM
2011**

Ficha Catalográfica

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

F941a Frota, Maria Zeli IMoreira
Avaliação de métodos de extração de dna e de identificação de dermatófitos por análise de PCR-RFLP / Maria Zeli IMoreira Frota. 2011
94 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Maria Cristina dos Santos
Coorientador: João Vicente Braga de Souza
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Dermatófitos. 2. Extração de DNA. 3. pcr-rflp. 4. Topoisomerase II. I. Santos, Maria Cristina dos II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

MARIA ZELI MOREIRA FROTA

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA E DE
IDENTIFICAÇÃO DE DERMATÓFITOS POR ANÁLISE DE
PCR- RFLP**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazona, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia, na área de concentração “Saúde.

Aprovado em 31 de agosto de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Cristina dos Santos, Presidente
Universidade Federal do Amazonas-AM

Prof. Dr. José Odair Pereira, Membro
Universidade Federal do Amazonas-AM

Profa. Dra. Sônia Maria da Silva Carvalho
Universidade Federal do Amazonas-AM

Prof. Dr. Felipe Gomes Naveca, Membro
Instituto Leônidas e Maria Deane, FIOCRUZ-AM

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

Dedicatória

À Deus

Por ser a razão da minha existência, a minha fortaleza e o meu refúgio.

Aos meus queridos pais

Edmundo C. Frota e Raimunda M. Frota, por todo o amor, carinho e dedicação; por serem minha fonte de inspiração e exemplo de dignidade, honestidade e simplicidade.

Aos meus irmãos

Willamy, Whagno, Whyker e Zeilla, parceiros de todas as horas, pela nossa verdadeira amizade e companheirismo.

... Amo vocês.

Agradecimentos

A realização deste trabalho contou com o apoio e colaboração de várias pessoas e diferentes instituições, aos quais manifesto o meu mais sincero agradecimento.

*Aos meus orientadores, **Dra. Maria Cristina dos Santos** e **Dr. João Vicente Braga de Souza**, pelos conhecimentos e experiências compartilhados, e pela orientação, acolhimento e confiança, essenciais para o desenvolvimento deste trabalho e para o meu crescimento profissional.*

*À **Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia “Alfredo da Matta”-FUAM**, onde grande parte desse estudo foi desenvolvido, contando com o apoio e colaboração da Equipe Técnica dos Laboratórios de Micologia e de Biologia Molecular. Aos colaboradores e queridos amigos: Dauranila, Daniel, Jorge, Eleade, André e Cynthia, por todo o apoio e amizade demonstrados durante a realização deste trabalho.*

*Aos funcionários dos Laboratórios de Micologia e de Micobacteriologia do **Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia-INPA**, onde foram realizados os ensaios de biologia molecular, e em especial ao Mauricio Ogusku, pela amizade, atenção e todo o apoio dispensados, e pelos ensinamentos nas técnicas moleculares.*

À Aya Sadahiro, pela amizade especial, pelo incentivo, e por sempre estar presente nos meus desafios acadêmicos e profissionais.

À Débora Fernandes e Karoline Jimenez, pela dedicação e apoio na execução das técnicas laboratoriais, e em especial, pela amizade e consideração sempre demonstrados.

Aos meus colegas de Doutorado, Mauricio Ogusku, Luciana Fugimoto, Clarice Carvalho, Antônio Boechat e Alita Lima, pela amizade e convivência prazerosa durante os módulos do PPGBIOTEC.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas, aos Professores, Técnicos e Alunos que direta ou indiretamente me apoiaram nessa jornada.

Ao Programa Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, à Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Amazonas, e seus funcionários, por todo o apoio e atenção dispensados.

Aos Professores do PPGBIOTEC, pela inestimável contribuição para o meu crescimento acadêmico e científico.

Aos pacientes da FUAM, que gentilmente concordaram em participar desta pesquisa, e por terem indiretamente motivado a realização da mesma.

*Quem mediu na concha da sua mão as
águas, e tomou a medida dos céus aos
palmos, e recolheu numa medida o pó da
terra, e pesou os montes com peso e os
outeiros em balanças?*

Não sabes? Nunca ouviste falar?

*O Senhor, o Deus eterno,
o Criador de toda a terra.
Ele não se cansa nem fica exausto;
sua sabedoria é inescrutável*

Bíblia, Isaías 40:12;28

RESUMO

Os dermatófitos compreendem um grupo de fungos filamentosos de grande interesse na área da saúde, devido à sua capacidade de parasitar os tecidos queratinizados, como a pele, pêlos e unhas, e à sua ampla distribuição no mundo. Como consequência desse parasitismo instala-se um processo infeccioso de dermatofitose, a partir do qual pode ocorrer uma diversidade de manifestações clínicas, acometendo pessoas de ambos os gêneros e de todos os grupos etários. Os métodos laboratoriais para o diagnóstico micológico nem sempre permitem uma clara definição do agente em nível de espécie. No presente estudo foram analisadas diferentes estratégias para a extração de DNA e para a identificação molecular por PCR-RFLP das principais espécies de dermatófitos. Duas regiões alvo, a região ITS/DNAr e o gene da topoisomerase II foram analisadas, testando-se três protocolos de PCR e três enzimas de restrição (*DdeI*, *HinfI*, *HaeIII*). Na extração do DNA, o método de lise utilizando pérolas de vidro e a separação do DNA com base no método de Gustincich (1991) demonstrou importantes vantagens. Nossos resultados demonstraram que o gene da topoisomerase II é uma região alvo adequada para identificação das sete principais espécies de fungos dermatófitos patogênicos, reforçando estudos anteriores, e apontaram para um novo protocolo de RFLP-PCR, que se baseia em uma PCR desse gene utilizando o primer dPsD2, seguido da digestão dos produtos obtidos com a enzima de restrição *HaeIII*.

Palavras chaves: Dermatófitos, Extração de DNA, PCR-RFLP, Topoisomerase II.

ABSTRACT

Dermatophytes comprise a group of filamentous fungi of great interest on public health because of their ability to parasitize keratinized tissues, such as skin, hair and nails, and for their wide distribution in the world. As a consequence of this parasitism, an infectious process of dermatophytosis is established, from which a variety of clinical manifestations can occur, affecting people of both genders and all age groups. Laboratory methods for mycological diagnosis do not always allow a clear and specific definition of the agent. In this study, different strategies for extraction of DNA, and molecular typing by PCR-RFLP, of seven dermatophyte species were assessed. Two target regions: ITS/rDNA and the topoisomerase II gene were evaluated, by testing three PCR protocols and three restriction enzymes (DdeI, HinfI, HaeIII). For the DNA extraction, the glass bead shaking technique for cell lysis, followed by Gustincich (1991) based method for DNA separation, demonstrated more advantages. Our results have demonstrated that the topoisomerase II gene is a suitable target region for identification of the seven major pathogenic dermatophyte fungal species, reinforcing previous studies, and pointed to a new PCR-RFLP protocol, which is based on a PCR of this gene using dPsD2 primer, followed by digestion of PCR products with *HaeIII* restriction enzyme.

Palavras chaves: Dermatophytes, DNA Extraction, PCR-RFLP, Topoisomerase II.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 (1º Artigo)	Produtos de PCR de sete cepas de dermatófitos obtidos com os primers ITS1 e ITS4.....	57
Figura 1 (2º Artigo)	Produtos de PCR da região ITS/DNAr e do gene da topoisomerase de sete cepas de dermatófitos obtidos com os primers ITS5 e NL4.....	66
Figura 2 (2º Artigo)	RFLP da região ITS/DNAr de sete cepas de dermatófitos obtidos com os primers ITS5 e NL4 e digeridos com <i>DdeI</i> , <i>HinfI</i> e <i>HaeIII</i>	68
Figura 3 (2º Artigo)	RFLP da região ITS/DNAr de sete cepas de dermatófitos obtidos com os primers ITS1 e ITS4 e digeridos com <i>DdeI</i> , <i>HinfI</i> e <i>HaeIII</i>	68
Figura 4 (2º Artigo)	RFLP do gene da topoisomerase II de cepas de dermatófitos obtidos com os primers dPsD2 e digeridos com <i>DdeI</i> , <i>HinfI</i> e <i>HaeIII</i>	68
Figura 5 (2º Artigo)	Produtos amplificados do gene da topoisomerase II obtidos com diferentes concentrações de DNA <i>T. rubrum</i> (TR007/FUAM).....	69
Figura 1 (3º Artigo)	Reação de amplificação do gene da topoisomerase II utilizando o primer dPsD2 a partir de espécimes clínicos obtidos de pacientes com dermatoses.....	79
Figura 2 (3º Artigo)	RFLP-PCR do gene da topoisomerase II a partir de espécimes clínicos.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Gêneros e espécies de dermatófitos.....	18
Tabela 1 (1º Artigo)	Médias das concentrações do DNA de sete espécies de dermatófitos obtidas com diferentes métodos de lise da parede celular.....	55
Tabela 2 (1º Artigo)	Médias do grau de pureza do DNA de sete espécies de dermatófitos obtidas com diferentes métodos de lise da parede celular.....	55
Tabela 3 (1º Artigo)	Médias das concentrações do DNA de sete espécies de dermatófitos obtidas com diferentes métodos de recuperação do DNA.....	56
Tabela 4 (1º Artigo)	Médias do grau de pureza do DNA de sete espécies de dermatófitos obtidas com diferentes métodos de recuperação do DNA.....	56
Tabela1 (2º Artigo)	Protocolos de PCR utilizados para amplificação da região ITS/DNAr e do gene da topoisomerase II.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AP-PCR	Reação da Cadeia de Polimerase com Primer Arbitrário
BDA	Ágar Batata Dextrose
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
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
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
NaCl	Cloreto de Sódio
NTS	Região Espaçadora não Transcrita
PCR	Reação da Cadeia de Polimerase
RAPD	Amplificação Randômica do DNA Polimórfico
RFLP	Polimorfismo de Fragmento de Restrição

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 Dermatofitos.....	17
2.2 Taxonomia dos Dermatofitos.....	19
2.3 Ecologia e Evolução dos Dermatofitos.....	20
2.4 Patogenia.....	22
2.5 Epidemiologia das Dermatofitoses.....	25
2.6 Aspectos Clínicos das Dermatofitoses.....	27
2.7 Diagnóstico Laboratorial.....	31
2.7.1. Métodos Convencionais.....	31
2.7.2. Métodos Moleculares	33
3. OBJETIVOS.....	40
3.1 Geral.....	40
3.2 Específicos.....	40
4. METODOLOGIA.....	41
4.1 Modelo de Estudo.....	41
4.2 Universo de Estudo.....	41
4.3 Informações Éticas.....	41
4.4 Detalhamento dos Procedimentos.....	42
4.4.1 Reativação dos isolados fúngicos.....	42
4.4.2 Caracterização Fenotípica.....	42
4.4.2.1 Estudo Macromorfológico.....	42
4.4.2.2 Estudo Micromorfológico.....	42
4.4.3 Caracterização Genotípica.....	43
4.4.3.1 Avaliação dos métodos para a lise da parede celular fúngica.....	43
4.4.3.2 Avaliação dos métodos de separação do DNA.....	44
4.4.3.3 Avaliação da concentração, pureza e viabilidade para PCR do DNA	45
4.4.3.4 Seleção de protocolo de PCR para PCR-RFLP.....	45
4.4.3.5 Seleção de enzima de restrição para PCR-RFLP.....	46
4.4.3.6 Eletroforese.....	46
4.4.3.7 Avaliação da reprodutividade, especificidade e sensibilidade da PCR-RFLP.....	46
4.5 Análise dos Resultados.....	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1 Artigo 1: Avaliação de metodologias para extração de DNA de fungos dermatofitos...	49
5.2 Artigo 2: Avaliação de diferentes protocolos para a identificação de espécies de dermatofitos por PCR-RFLP.....	61
5.3 Artigo 3: Aplicação de uma PCR-RFLP, que tem o gene da topoisomerase II como alvo, para a identificação de agentes de dermatofitoses em espécimes clínicos.....	74
6. CONCLUSÃO.....	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

1. INTRODUÇÃO

Os dermatófitos constituem um grupo restrito de fungos filamentosos filogeneticamente relacionados e que compartilham várias características entre si, em especial, nos aspectos morfológicos, bioquímicos e fisio-patológicos. Suas diferentes espécies estão inseridas em três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, havendo aproximadamente 25 espécies de interesse médico distribuídas em todo o mundo (WEITZMAN; SUMMERBEL, 1995; LACAZ et al., 2002; GRASER et al, 2008)

Os dermatófitos destacam-se dos demais fungos patogênicos pela sua capacidade em absorver nutrientes principalmente a partir de queratina, podendo assim parasitar os tecidos superficiais queratinizados de homens e animais, causando as dermatofitoses ou “tinhas” (do latim “*tinea*”). Estas infecções incluem diferentes entidades clínicas, acometendo crianças desde os primeiros anos de vida e adultos de todas as idades, a partir do contato direto ou indireto com os esporos ou propágulos fúngicos existentes nos reservatórios naturais ou hospedeiros primários (KOWN CHUNG; BENNETT, 1991; LACAZ et al., 2002).

Em geral, as dermatofitoses são de elevada prevalência no mundo, principalmente nas regiões de clima tropical, constituindo-se em um problema de saúde pública com importantes implicações sócio-econômicas e clínicas. O tratamento dessas micoses é feito à base de antifúngicos orais ou tópicos, tem alto custo, e na maioria das vezes requer um período de tempo considerável para a obtenção da cura, sendo que muitos indivíduos não apresentam êxito no tratamento, em especial nos casos das dermatofitoses crônicas, causadas por espécies de dermatófitos antropofílicos (KANE et al., 1997; BIRREN, 2004; GRASER et al, 2008).

A distribuição das espécies dermatofíticas nas várias regiões do mundo é diversificada, podendo ser influenciada por vários fatores, tais como: fatores geográficos,

climáticos, hábitos da população, dentre outros, e inclusive, com alterações ao longo dos anos (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; TIETZ et al., 1995). No hospedeiro humano essas espécies possuem afinidades diferenciadas pelas regiões anatômicas do hospedeiro, podendo estar mais associadas a determinados tipos clínicos de dermatofitoses. Na dependência do agente etiológico e de sua interação com o hospedeiro, algumas diferenças podem ainda ser observadas em relação à evolução da infecção, manifestações clínicas das lesões e resposta à terapêutica (KUSTARK, 1989; WAGNER; SOHNLE, 1995; ZAIAS; REBELL, 1996).

A identificação taxonômica dos agentes dermatofíticos em nível de espécie tem, portanto, grande importância do ponto de vista epidemiológico e clínico. Em rotina laboratorial essa identificação é realizada a partir do exame de cultura, no qual são realizados os estudos da macro e micromorfologia da colônia, e, quando necessário, provas bioquímicas (SIDRIM; ROCHA, 2004; LACAZ et al., 2002).

Contudo, os métodos convencionais para a definição do agente etiológico são laboriosos, e muitas vezes não permitem um resultado conclusivo em virtude da variabilidade ou, da instabilidade das características fenotípicas dos isolados dermatofíticos, podendo resultar no crescimento de colônias atípicas ou mesmo na perda da capacidade de esporulação *in vitro*, gerando assim laudos incorretos ou até inviabilizando a identificação em nível de gênero e/ou espécie.

Além disso, o serviço de diagnóstico micológico, incluindo coleta, processamento e a análise dos espécimes clínicos, exige uma estrutura e equipe técnica especialmente habilitada, e tempo de dedicação relativamente longo para esses procedimentos, motivo pelo qual se deflagra a ausência deste serviço na maioria dos laboratórios em análises clínicas, sejam públicos ou privados.

Considerando as dificuldades no diagnóstico convencional das dermatofitoses e, a importância da identificação do agente etiológico em nível de espécie, o presente estudo teve

como objetivo principal testar diferentes métodos para a extração de DNA de sete espécies de fungos dermatófitos e, fazer a identificação molecular de isolados de pacientes com dermatofitoses, com base na técnica de análise de polimorfismos de fragmentos de restrição de produtos amplificados pela PCR (RFLP-PCR). Para a otimização do método de RFLP-PCR foram avaliados diferentes primers para as regiões ITS do DNAr (ITS/DNAr) e do gene da topoisomerase II, e a digestão dos produtos amplificados utilizando as seguintes enzimas de restrição: *DdeI*, *HinfI* e *HaeIII*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Dermatófitos

A etimologia do termo dermatófito deriva de duas palavras gregas: *dérma/δερμα*, que significa pele, e *phyto/φυτό*, que significa planta (KOUTANTOS, 2006), arremetendo-nos aos tempos antigos em que os fungos eram equivocadamente considerados membros primitivos das plantas. Entretanto, apesar de inadequado e de não representar um taxon no sistema de classificação fúngica, o termo dermatófitos é ainda amplamente empregado para designar esse grupo de fungos.

As infecções causadas pelos dermatófitos são denominadas de dermatofitoses ou “tinhas” e incluem diferentes entidades clínicas acometendo estritamente os tecidos superficiais queratinizados de homens e animais, como o extrato córneo da epiderme, pêlos e unhas. O termo “tinhas” originou-se da expressão em latim “*tineas*”, termo introduzido ainda no primeiro século D.C por médicos pertencentes à escola de Galeno para referir lesões do couro cabeludo, incluindo a do tipo favosa, uma *tinea* inflamatória do couro cabeludo que já havia sido descrita por Celsus e denominada de *kerion celsi* (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; ZAITZ et al., 1998; LACAZ et al., 2002).

A primeira descrição da origem fúngica das dermatofitoses foi em 1837, quando Robert Remak demonstrou estruturas fúngicas em paciente com favus, infecção do couro cabeludo hoje atribuído ao *Trichophyton schoenleini* (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992). Entretanto, a despeito desses valiosos relatos da história da medicina, existem evidências bíblicas da existência milenar de lesões cutâneas e do couro cabeludo, compatíveis com as formas clínicas das dermatofitoses. A exemplo disto, no capítulo 13 do livro de Levítico escrito por Moisés aos sacerdotes da época, encontram-se descrições das características e tipo de evolução das lesões de *tinea*, e recomendações para que se fizesse a distinção das lesões de “lepra”, sendo que neste último caso o indivíduo deveria ser mantido em total isolamento.

Os avanços no conhecimento das dermatofitoses revestiram-se de fundamental importância para a consolidação de uma nova área do conhecimento, a “Micologia Médica”, visto que estas foram as primeiras patologias de etiologia fúngica a serem reconhecidas acometendo o homem (AJELLO, 1977).

2.2 Taxonomia dos dermatófitos

A classificação taxonômica dos fungos dermatófitos não está totalmente consolidada, tendo em vista as lacunas ainda existentes no conhecimento de algumas de suas características e ciclos de vida. Segundo Kushwaha; Guarro (2000), a organização dos dados para a distinção dos taxons destes fungos se constitui em uma tarefa difícil, pois requer informações tanto do estado assexuado ou anamorfo, quanto do estado sexuado ou teleomorfo, sendo que, na prática clínica, as espécies implicadas nas dermatofitoses são todas anamórficas.

O estudo sistemático dos dermatófitos teve início com os estudos de Raymond Sabouraud em 1910, renomado médico francês que publicou uma obra clássica intitulada *Les teignes*, que incluía os aspectos clínicos das tinhas e os aspectos morfológicos de fungos dermatófitos isolados em meios de cultura. Com base nesses estudos, Sabouraud propôs quatro gêneros para os dermatófitos: *Achorion*, *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*. Posteriormente, Emmons em 1934, com base nas características morfológicas dos conídios (esporos produzidos mediante reprodução assexuada) eliminou o gênero *Achorion* reconhecendo apenas os demais gêneros, assim permanecendo até os dias atuais (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; EVANS, 1998; LACAZ et al., 2002).

Estes gêneros incluem várias espécies de interesse médico pertencentes à subdivisão Deuteromycotina (fungos mitospóricos), classe Hyphomycetes, ordem Hyphomycetales e família Hyphomycetacea (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; LACAZ et al., 2002). Deste total, o gênero *Trichophyton* é o que possui o maior número de espécies seguido do gênero

Microsporum, enquanto no gênero *Epidermophyton* apenas uma espécie foi descrita, conforme é demonstrado na tabela 1.

Tabela 1.

Gêneros e espécies de dermatófitos

***Microsporum* Gruby 1843**

M. audouinii Gruby 1843

M. canis Bodin 1902

M. equinum (Delacroix et Bodin) Guegue'n 1904

M. ferrugineum Ota 1921

M. fulvum Uriburu 1909

M. gallinae (Megnin) Grigorakis 1929

M. gypseum (Bodin) Guiart et Grigorakis 1928

M. nanum Fuentes 1956

M. persicolor (Sabouraud) Guiart et Grigorakis 1928

M. praecox Rivalier, ex Padhye, Ajello et McGinnis 1987

M. racemosum Borelli 1965

M. vanbreuseghemii Georg, Ajello, Friedman et Brinkman 1962

***Trichophyton* Malmsten 1845**

T. concentricum Blanchard 1895

T. equinum (Matruchot et Dassonville) Gedoelst 1902

T. gourvilii Catanei 1933

T. kanei Summerbell 1989a

T. megninii Blanchard 1896

T. mentagrophytes (Robin) Blanchard 1896

T. raubitschekii Kane, Salkin, Weitzman, Smitka 1981a

T. rubrum (Castellani) Sabouraud 1911

T. schoenleinii (Lebert) Langeron et Milochévitch 1930

T. simii (Pinoy) Stockdale, Mackenzie et Austwick 1965

T. soudanense Joyeux 1912

T. tonsurans Malmsten 1845

T. verrucosum Bodin 1902

T. violaceum Bodin 1902

T. yaoundei Cochet et Doby Dubois 1957 (not validly published)

***Epidermophyton* Sabouraud 1907**

E. floccosum (Harz) Langeron et Milochévitch 1930

Fonte: WEITZMAN; SUMMERBEL, 1995

A descoberta da fase sexuada ou estado teleomórfico de algumas espécies dermatofíticas, provocou mudanças na sua taxonomia, sendo que, as espécies que tiveram a sua fase sexuada reconhecida, passaram a ser consideradas como pertencentes à subdivisão *Ascomycotina*. Este fato foi descrito primeiramente por Nannizzi em 1920, quando evidenciou a formação de cleistotécio no *Microsporum gypseum*, e esta forma sexuada foi denominada de *Gymnoascus gypseum* (NANNIZZI, 1920 APPUD NEGRONI, 2010).

A descoberta de Nannizzi, no entanto, foi reconhecida apenas em 1960 quando Griffin confirmou a existência da fase sexual do gênero *Microsporum*, e em homenagem a este criou o gênero *Nannizia*. Em 1959, Dawson e Gentles descobriram o estado perfeito de *Trichophyton ajelloi* ao qual foi dado o nome de *Arthroderma uncinatum*, criando assim um novo gênero para os dermatófitos. (DAWSON; GENTLES, 1959 APUD NEGRONI, 2010).

Entretanto, estudos morfológicos mais detalhados não revelaram diferenças significativas entre estes dois gêneros, tendo sido então proposto por Weitzmam et al. em 1968, a permanência apenas do gênero *Arthroderma*. Assim, os teleomorfos dos dermatófitos foram classificados dentro da família *Arthrodermataceae* pertencente à ordem *Onygenalis*, subdivisão *Ascomycotina* (CURRAH, 1985).

2.3 Ecologia e Evolução dos Dermatófitos

As espécies dermatofíticas diferenciam-se quanto ao seu habitat natural ou reservatório primário, podendo ser classificadas como geofílicas, zoofílicas ou antropofílicas, conforme estabelecido por Georg (1964). Esta classificação ecológica dos dermatófitos tem importância fundamental para um melhor entendimento da epidemiologia, taxonomia, e até mesmo da evolução clínica e características das lesões dermatofíticas, as quais variam consideravelmente dependendo da espécie envolvida e de sua inter-relação com o hospedeiro. (KWON CHUNG; BENNETT, 1991; LACAZ et al., 2002).

São considerados dermatófitos geofílicos aqueles cujo habitat natural é o solo. Estas espécies se utilizam de substratos queratinosos, tais como, cabelos, escamas de pele, unhas, chifres, cascos, conchas e carapaças de insetos presentes no solo, os quais se constituem em um reservatório primário destes fungos (KANE et al., 1997; KUSHWAHA; GUARRO, 2000; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Estudos filogenéticos têm fortalecido a antiga hipótese de que os dermatófitos patogênicos foram originados a partir da evolução de ancestrais geofílicos não patogênicos.

De acordo com alguns autores, a capacidade de determinados fungos geofílicos em decompor queratina e, sua freqüente associação com penas e pêlos de animais em contato com o solo, facilitaram a adaptação dos mesmos ao hospedeiro animal e humano, originando assim os dermatófitos zoofílicos e antropofílicos (CHMEL, 1980; WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995).

De acordo com Chabasse (2008) os dermatófitos se destacam na Micologia Médica por representarem um modelo interessante de evolução por meio do parasitismo. O autor defende a existência de duas principais linhagens: uma formada por dermatófitos associados ao solo, incluindo as espécies geofílicas clássicas e, algumas zoofílicas que mantiveram a possibilidade da reprodução sexuada; e outra linhagem, formada por dermatófitos associados estritamente ao parasitismo, incluindo algumas espécies zoofílicas e todas as antropofílicas, estas últimas, consideradas parasito-obrigatórias.

Segundo este mesmo autor, algumas características em comum reforçam a diferenciação dessas duas linhagens, destacando-se na linhagem associada ao solo, as principais características: estado teleomorfo e anamorfo; capacidade de degradar queratina, com a presença de órgão de perfuração (teste de perfuração de pêlo *in vitro* positivo); intensa conidiogênese; osmotolerância e produção de urease. Enquanto nas espécies dermatofíticas não associadas ao solo, o estado teleomorfo é inexistente; não há órgão de perfuração; não apresentam resistência a osmofilia, e as mesmas não são capazes de degradar a uréia (CHABASSE, 2008).

A homologia encontrada em nível genético entre alguns dermatófitos parasito-obrigatórios e dermatófitos geofílicos, sugere fortemente que os primeiros dermatófitos existiram no solo antes de passarem a viver estritamente em parasitismo (RIPPON, 1988).

De acordo com Weitzman; Summerbell (1995), a adaptação evolucionária de algumas espécies dermatofíticas ao hospedeiro humano e animal ocasionou a perda total de certas

características geofílicas, tais como, abundância conidial e de estruturas ornamentais, osmotolerância, processo de conjugação heterotática, dentre outras.

Gokulshankar et al. (2010), em estudo recente sobre a atividade de proteases durante o processo de esporulação fúngica, observaram menor atividade enzimática de isolados de dermatófitos antropofílicos, em relação ao *M. gypseum* e *M. canis*, e presumiram que isto também poderia estar relacionado com a adaptação evolutiva em determinadas espécies. Contudo, segundo os autores, estudos mais detalhados da atividade de diferentes proteases tais como queratinase, elastase, dentre outras, nos diferentes grupos ecológicos de dermatófitos, são necessários para um melhor entendimento da evolução dessas espécies antropofílicas.

Ocasionalmente os dermatófitos geofílicos acometem animais e homens a partir do contato direto ou indireto com o solo contaminado. Os animais domésticos podem ainda ser hospedeiros intermediários e servir de veículo de transmissão destas espécies para o homem (MACURA; 1993; SPIEWAK, 1998).

As espécies geofílicas incluem o *Microsporum amazonicum*, *M. cookei*, *M. fulvum*, *M. gypseum*, *M. nanum*, *M. praecox*, *M. racemosum*, *Trichophyton ajelloi*, *T. phaseoliforme* e *T. terrestre*. Dentre estas o *M. gypseum* se destaca como a espécie geofílica mais freqüentemente isolada na maioria das regiões do mundo. Esta espécie está, principalmente, implicada em casos de dermatofitoses em crianças, acometendo a pele glabra e couro cabeludo, neste último, causando parasitismo em pêlos do tipo ectotrix. Também pode ser isolada de indivíduos adultos causando, principalmente, *tinea corporis* e mais raramente *tinea unguium* (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; SPIEWAK, 1998; HAVLICKOVA et al.; 2008).

As espécies zoofílicas por sua vez, estão associadas aos animais e ocasionalmente infectam humanos. A incidência destas espécies em humanos depende de uma série de fatores, tais como: o estilo de vida do indivíduo (contato direto ou indireto com animais); a

distribuição geográfica dos fungos zoofílicos e de sua preferência pelos hospedeiros animais; a possibilidade de transmissão de um indivíduo para outro, dentre outros fatores (MARY, 1972; SPIEWAK, 1998).

Pertencem ao grupo dos dermatófitos zoofílicos: *Microsporum canis*; *M. gallinae*; *M. persicolor*; *M. nanum*; *M. equinum*; *Trichophyton erinacei*; *T. mentagrophytes* var *mentagrophytes* (*granulosum*); *T. simii*; *T. verrucosum*, e *T. equinum* (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; GRASER; SUMMERBELL, 2008). Destes, o *M. canis* destaca-se como a espécie de maior incidência em cães e gatos no mundo inteiro sendo também um dos mais isolados de humanos dentre os zoofílicos. Esta espécie é comumente agente de *tinea capitis* em crianças. Outra importante espécie é o *Trichophyton mentagrophytes* var *mentagrophytes*, geralmente associada a diferentes quadros de dermatofitoses em adultos, tais como *tinea pedis*, *tinea corporis* e *tinea cruris* (CHMEL, 1980; BRILHANTE, 2004; GINTER-HANSELMAYER et al., 2007).

Em relação aos dermatófitos antropofílicos, os mesmos são amplamente distribuídos no mundo, sendo isolados mais comumente de indivíduos adultos. Neste grupo destacam-se as espécies pertencentes ao gênero *Trichophyton* tais como *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* var *interdigitales*, *T. tonsurans*, *T. violaceum* e, o *Epidermophyton floccosum*. Outras espécies como *Microsporum audouinii*, *M. ferrugineum*, *T. concentricum* e *T. schoenleinii* têm ocorrência mais limitada (HAVLICKOVA, et al., 2008; MARTO et al., 2010).

2.4 Patogenia

A estrutura física e química da pele representa a maior barreira de defesa do hospedeiro contra fungos patogênicos. A pele, em geral, é uma superfície inóspita para o crescimento fúngico, em virtude da exposição dos raios UV, da constante renovação das células epiteliais pela queratinização, bem como, pela competição da própria microbiota

contra os demais microrganismos invasores. Além disso, a epiderme constitui um sistema de defesa, que envolve populações de células, como os queratinócitos e células de Langerhans, que podem exercer funções efectoras nas reações imunológicas cutâneas contra as infecções superficiais (WAGNER; SOHNLE, 1995; ABBAS, et al., 2008).

Entretanto, os dermatófitos têm a capacidade de invadir o estrato córneo ou estruturas queratinizadas derivadas da epiderme causando lesões superficiais na pele, pêlos e unhas. Os mecanismos envolvidos na patogênese das dermatofitoses, contudo, ainda não estão elucidados, e, a despeito de um número considerável de estudos já realizados, pouco se sabe a respeito dos eventos subsequentes à inoculação dos propágulos fúngicos na pele, bem como dos fatores moduladores desses eventos.

De acordo com Viani et al. (2001), a instalação do processo infeccioso primário clássico está relacionada, principalmente, às enzimas produzidas pelo dermatófito e, em segundo plano, a forças mecânicas. Em estudos da atividade enzimática de cepas de *M. canis*, incluindo queratinases, lipases, elastases e DNases, os autores demonstraram que a enzima queratinase está diretamente correlacionada com o desenvolvimento dos sintomas das lesões dermatofíticas, não sendo observada tal situação com as outras enzimas.

Os artroconídios dos dermatófitos são responsáveis pela propagação das espécies no ambiente, dada a sua resistência às diferentes condições ambientais, e, constituem-se nas principais estruturas infectantes. A aderência desses esporos e a invasão fúngica no estrato córneo humano tem sido alvo de diferentes estudos (FUJITA et al., 1993; DUEK et al., 2004; TABART et al., 2007), contudo, a falta de padronização dos métodos e dos modelos experimentais, dificulta a obtenção de resultados conclusivos a respeito da cinética desses eventos na infecção dermatofítica.

A exemplo, Duek et al., (2004), a partir da inoculação ex vivo de esporos de *T. mentagrophytes* no extrato córneo, observaram, após análises por microscopia eletrônica, uma

tênue aderência entre os esporos e o estrato córneo após doze horas de inoculação e a germinação dos esporos em vinte e quatro horas, sendo que os tubos germinativos iniciais ocorriam ainda no espaço extracelular. A proliferação e invasão de hifas fúngicas na camada córnea foram observadas em aproximadamente três dias. Tabart et al.(2007), em outro modelo experimental utilizando epiderme reconstruída de felino, verificaram que a aderência começava em duas horas e mantinha-se crescente por seis horas.

De acordo com Simpanya (2000), na infecção dermatofítica essa alteração morfológica dos conídios para a formação de hifas pressupõe uma expressão aumentada de proteínas permitindo a adaptação do dermatófito e o início da infecção no hospedeiro.

Notavelmente as espécies dermatofíticas apresentam grande especificidade quanto à sua capacidade invasora, sendo que, apenas algumas são capazes de invadir pêlos e unhas, enquanto todas podem invadir o estrato córneo da epiderme. Na prática clínica é possível ainda observar, predileções diferenciadas de algumas espécies pelos sítios anatômicos do hospedeiro e também, diferentes padrões de manifestação clínica, sendo algumas mais virulentas do que outras. As razões para estas especificidades são ainda desconhecidas, mas alguns autores acreditam que isto pode estar relacionado às exigências nutricionais específicas e, à capacidade de produção enzimática de cada espécie. (APODACA; MCKERROW, 1998; ABDEL-RAHMAN, 2002; GOKULSHANKAR et al., 2010).

Contudo, vários outros fatores envolvidos nessa interação patógeno-hospedeiro, e conseqüentemente, na diversidade encontrada nas manifestações clínicas das dermatofitoses devem ser considerados, tais como, o efeito da temperatura do hospedeiro; a secreção de ácidos graxos insaturados de cadeia longa, pelas glândulas sebáceas, os quais podem exercer uma ação fungicida ou fungistática; a ação de inibidores de proteases fúngicas, e em especial, aos fatores imunológicos no hospedeiro (DEI CAS; VERNES, 1986; EL-NAGHY et al., 1992; SIMPANYA, 2000; WOODFOLK, 2005).

A imunidade humoral e celular deve exercer um importante papel na evolução das diferentes formas clínicas da doença. As células Th1 apresentam um efeito imunológico celular, enquanto que as células Th2 promovem uma resposta predominantemente humoral, inclusive com a produção de anticorpos da classe IgE, favorecendo a diferenciação e ativação de eosinófilos, mas suprimindo a imunidade mediada por células (JONES, 1980; WAGNER; SOHNLE, 1995; BETTELLI et al., 2006).

Estudos demonstram que muitos pacientes com dermatofitose crônica causada por *T. rubrum* apresentam uma resposta imune celular (tipo Th1) deprimida no teste intradérmico com o antígeno de *Trichophyton* (tricofitina), evidenciando que esta espécie consegue evadir ou causar uma supressão da resposta imune mediada por células (VILANI-MORENO et al., 1999; ELEWSKI et al., 2002).

Segundo Woodfolk (2005), com base na associação com a dermatofitose aguda e crônica, a resposta imune do tipo Th1, parece conferir proteção, enquanto a resposta imune humoral (tipo Th2), não. A diferenciação das células TCD4 em Th1 ou Th2 interfere na natureza da doença e está sob a regulação de diferentes mecanismos, e, conforme o autor, a definição desses mecanismos imunológicos que direcionam a resposta para um dos pólos Th1 ou Th2, são prioridades para o entendimento da interação dermatófito-hospedeiro.

2.5 Epidemiologia das dermatofitoses

A ampla distribuição e a elevada prevalência das dermatofitoses, desperta grande interesse no que concerne à epidemiologia dessas micoses, especialmente pelo fato de existirem diferenças em relação à distribuição de seus agentes nas diversas regiões do mundo.

Essas diferenças são decorrentes da influência de vários fatores, tais como as condições climáticas, geográficas, hábitos da população, condições sócio-econômicas e culturais, dentre outros fatores. Além disso, mudanças têm sido observadas ao longo dos anos, no espectro de distribuição das espécies dermatofíticas em diferentes países, com a

diminuição e até mesmo a erradicação de alguns agentes, e aumento na frequência de outros (SVEJGAARD, 1995; TIETZ et al., 1995; HAVLICKOVA, 2008; FULLER, 2009).

Seebacher et al. (2008), em uma revisão atualizada da literatura científica a respeito da epidemiologia das infecções dermatofíticas, encontrou um grande número de publicações sobre o tema nas últimas décadas, e isto tem contribuído significativamente para um maior conhecimento sobre a distribuição dos dermatófitos e das dermatofitoses no mundo, bem como das mudanças ocorridas no decorrer do século passado em vários países.

De acordo com estes autores, nos últimos 70 anos o espectro dos dermatófitos tem sofrido mudanças. Antes da segunda guerra mundial, *Microsporum audouinii* e *Epidermophyton floccosum* eram os mais isolados, nos últimos 50 anos porém, o *T. rubrum* tem tido gradativamente maior prevalência seguido do *T. mentagrophytes*. Este perfil tem sido também comum na Europa do norte e central, e nos países Árabes, estando principalmente associado à maior prevalência de *T. pedis*. Em contraste, no sul da Europa, especialmente nos países mediterrâneos, a incidência de infecções causadas por *M. canis* tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, acometendo especialmente crianças.

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. No entanto, a maioria dos estudos aponta para a predominância das espécies de fungos antropofílicos em indivíduos adultos, destacando-se especialmente o *T. rubrum* (REIS et al., 1992; MEZZARI, 1998; RUIZ; ZAITZ, 2001; COSTA et al., 2002; ARAÚJO et al., 2003).

Particularmente as regiões tropicais oferecem clima e condições naturais propícias para o desenvolvimento e proliferação dos dermatófitos, assim como para a maioria dos fungos patogênicos (REIS et al., 1992; MEZZARI, 1998; RUIZ; ZAITZ, 2001).

A despeito disto, no Brasil em especial na região Norte, os estudos epidemiológicos com dados representativos são ainda escassos. Frota et al. (2005) em um estudo incluindo 1.215 indivíduos adultos com suspeita de dermatofitoses atendidos em um serviço de dermatologia tropical na cidade de Manaus, no período de 2000 a 2004, verificaram a predominância das espécies antropofílicas, sendo o *Trichophyton rubrum* a espécie mais isolada, correspondendo a 51,1% dos casos. As principais manifestações clínicas encontradas foram: *tinea unguium*, *tinea corporis*, *tinea pedis* e *tinea cruris*, e as dermatofitoses com evolução do tipo crônico representaram neste estudo 72,4% dos casos (dados ainda não publicados).

2.6 Aspectos Clínicos das Dermatofitoses

As formas clínicas das tinhas ou dermatofitoses são representadas pelas manifestações patológicas, recebendo denominações de acordo com as regiões afetadas. A classificação adotada pela maioria dos dermatologistas, geralmente usa o termo “*tinea*” seguido da descrição em latim do local anatômico afetado, assim, as dermatofitoses estão classificadas como: *tinea capitis*, *tinea corporis*, *tinea cruris*, *tinea pedis*, *tinea unguium*, *tinea barbae*, *tinea faciei* e *tinea manuum* (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; SIDRIM; ROCHA, 2004; LACAZ et al., 2002).

As lesões de tinha possuem grande variação na sua forma de apresentação, diferindo em seu aspecto conforme a localização anatômica, as espécies envolvidas e a resposta imunológica do hospedeiro. O potencial patogênico dos dermatófitos depende de uma série de fatores cutâneos e sistêmicos, que por sua vez influenciam na resistência natural do hospedeiro a estas infecções. Desta forma, as dermatofitoses podem ser agudas ou crônicas, inflamatórias ou não inflamatórias (KUSTARK, 1989; WAGNER; SOHNLE, 1995).

As formas agudas das dermatofitoses são causadas principalmente por espécies zoofílicas e geofílicas, sendo geralmente infecções inflamatórias, bem delimitadas, de fácil

tratamento, e que conferem ao indivíduo certo grau de resistência à reinfecção. As dermatofitoses de evolução crônica são na maioria das vezes causadas por espécies antropofílicas, e se caracterizam por apresentarem lesões de evolução lenta, menos circunscritas que as agudas, e não inflamatórias. Os pacientes cronicamente infectados não respondem bem à terapia antifúngica, e recidivas são muito comuns (GRAPPEL et al., 1974; HAY, 1979; KUSTARK, 1989; CREMER et al., 1995; ZAIAS; REBELL, 1996).

Na prática clínica os dermatófitos nem sempre provocam exclusivamente lesões superficiais, podendo ocorrer casos de lesões mais profundas, pustulosas ou granulomatosas, conhecidas como “Kerion” (favo de mel), o “granuloma de Majocchi” (lesões dérmicas) ou a “foliculite abscedante de Hoffmann”, com lesões hipodérmicas (LACAZ et al., 2002).

Em adição, mecanismos imunológicos nas dermatofitoses, em especial nas causadas por *Trichophyton mentagrophytes*, podem levar ao aparecimento de erupções cutâneas secundárias, chamadas de reações de “ide”. Estas reações geralmente resultam em lesões vesiculares assépticas em um foco distante da infecção dermatofítica. Estas lesões podem ainda se apresentar na forma papular, eczematosa ou semelhantes ao eritema multiforme (KOWN CHUNG; BENNETT, 1992; WAGNER; SOHNLE, 1995).

As tinhas dos pés (região plantar e interdígitos) e das unhas dos pés, estão entre as formas clínicas mais comuns em adultos de todo o mundo. Estas infecções são geralmente de evolução crônica, sendo o *Trichophyton rubrum*, o seu agente etiológico mais freqüente, seguido do *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* e *Epidermophyton floccosum* (CANTEROS et al., 1994; MIDGLEY et al., 1994; ZAIAS; REBELL, 1996).

Zaias; Rebell (1996), como resultado de vários anos de estudos sobre as dermatofitoses crônicas, descreveram a “síndrome das dermatofitoses crônicas causadas por *Trichophyton rubrum*”, que segundo os autores consiste de um conjunto de sinais clínicos que ocorre apenas em hospedeiros suscetíveis (característica provavelmente herdada por

dominância autossômica). A infecção primária, na maioria das vezes assintomática e pouco aparente, ocorre geralmente em região plantar, havendo posteriormente, acometimento das unhas dos pés (região subungueal distal). Uma história intermitente de *tinea cruris* também é muito comum nestes pacientes, e algumas vezes outras regiões tornam-se infectadas, como a região palmar e unhas das mãos.

A variabilidade encontrada na prevalência de determinadas formas clínicas das dermatofitoses, tem levado vários autores a estudarem os possíveis fatores envolvidos neste fenômeno. Entre estes fatores citam-se a idade, sexo e grupo étnico. Na população infantil, principalmente na faixa etária de 5 a 10 anos, os problemas predominantes são as tinhas do couro cabeludo, por sua vez, raras ou incomuns em jovens e adultos. Com o passar dos anos as tinhas dos pés e das unhas, bem como outras formas crônicas das dermatofitoses, tornam-se cada vez mais freqüentes (ARENAS, 1991; ZIENICKE et al., 1991; ROGER et al., 1996; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Fatores cutâneos são também importantes para o aparecimento das dermatofitoses nos indivíduos; calor e umidade em algumas regiões anatômicas predis põem o indivíduo a desenvolver, tanto formas agudas como formas crônicas da infecção. O uso constante de sapatos fechados, as áreas de dobras do corpo, bem como o atrito nestas áreas (interdígitos, regiões inguinal e submamárias), promovem as condições ideais de temperatura e hidratação, para a instalação de uma infecção dermatofítica (WAGNER; SOHNLE, 1995; ZAITZ, 1998). A presença de lipídios fungistáticos no couro cabeludo de adultos foi associada ao raro aparecimento de *tinea capitis* nos mesmos (ROTHMAN et al., 1947 apud KURSTARK, 1989).

O efeito de alguns hormônios esteróides foi objeto de estudo devido à capacidade destes hormônios em inibir o crescimento de dermatófitos e de outros fungos, embora ainda

não se tenha esclarecido o papel dos mesmos na biologia e patogênese das dermatofitoses (CLEMONS et al., 1988).

A suscetibilidade às dermatofitoses, em especial às formas crônicas, tem sido ainda associada a uma série de fatores sistêmicos ou condições clínicas. Em geral são patologias ou procedimentos terapêuticos, envolvidos na diminuição da eficácia de certas funções imunológicas. Apesar das controvérsias, uma variedade de estudos indica maior suscetibilidade a estas infecções em indivíduos portadores de doenças como diabetes mellitus (MAYSER, et al., 2004; FOSS et al., 2005; PIERARD;PIERARD-FRANCHIMONT, 2005), atopia (JONES, 1980; WILSON et al., 1993), ictiose vulgaris (SHELLEY et al., 1989), síndrome de cushing e lúpus eritematoso sistêmico (TRACUILO et al., 2003). Indivíduos submetidos a tratamento prolongado com corticosteróides são também considerados mais suscetíveis a estas infecções (ODOM, 1994).

As manifestações clássicas das tinhas são popularmente denominadas de “impingem”, e acometem as regiões da pele glabra (tronco, membros inferiores e superiores, pescoço, face e virilha), apresentando lesões circulares eritemato-descamativas, delimitadas por bordos elevados e pruriginosas. As variantes clínicas incluem lesões com formação de pápulas ou vesículas, lesões únicas, múltiplas ou coalescentes, ausência de bordos ou prurido, dentre outras variantes. Nas regiões palmar e plantar, incluindo os espaços interdigitais, em que se observa maior queratinização da pele, a descamação é a principal manifestação clínica, podendo estar associada à presença de vesículas, prurido, eritema e erupção superficial da epiderme, dependendo da intensidade do processo inflamatório (KWON CHUNG; BENNET, 1992; WAGNER; SOHNLE, 1995; LACAZ et al., 2002).

2.7 Diagnóstico Laboratorial

2.7.1 Métodos Convencionais

O diagnóstico laboratorial das dermatofitoses é realizado a partir do exame direto com KOH a 20% das escamas epidérmicas e pêlos coletados por meio da raspagem superficial das lesões, e, do exame de cultura. O exame direto permite a visualização microscópica de estruturas fúngicas no material parasitado, que são as hifas hialinas septadas e ramificadas e de artrósporos (KANE et al., 1997; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Este exame destaca-se pela maior rapidez e sensibilidade em relação ao exame de cultura, porém não permite a definição do agente fúngico, nem mesmo confirma que se trata de fungo dermatófito, visto que, outros fungos filamentosos hialinos podem ser agentes emergentes de dermatomicoses (micoses de pele e unhas causadas por fungos não dermatófitos) e, neste caso, produzem as mesmas estruturas no exame direto (SUMMERBELL et al., 2005; BONTEMS et al., 2009).

O exame de cultura permite o isolamento e a identificação em nível de espécie do agente fúngico, porém, apesar de sua especificidade é um exame demorado, levando em média 15 dias para a liberação do resultado, tem baixa sensibilidade e requer uma experiência diferenciada do analista clínico para a identificação taxonômica do isolado fúngico. Para a diferenciação das espécies é fundamental considerar os aspectos macro e micromorfológicos da colônia, tais como, a cor, topografia, textura, presença de pigmento difuso no meio de cultura, tamanho, forma e arranjo dos macro e microconídios, características das hifas, ramificações, presença de hifas espiraladas e clamidosporos. Outros recursos de fenotipagem podem ser utilizados, incluindo provas nutricionais (vitaminas e aminoácidos), prova da urease, perfuração do pêlo *in vitro*, dentre outros testes (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; LACAZ et al., 2002; SIDRIM, ROCHA, 2004).

Contudo, diferentes fatores podem comprometer a qualidade e a resolatividade dos exames convencionais para o diagnóstico das dermatofitoses. Em alguns casos, como na *tinea unguium* e *tinea pedis*, a sensibilidade do exame de cultura pode ser de apenas 50% ou até menos, sendo freqüentes os resultados falso-negativos e contaminações por agentes bacterianos ou mesmo por fungos contaminantes (MOHANTY et al., 1999; SCHERER et al., 2001). O uso de medicamentos pode também inibir o crescimento do agente dermatófito nos meios de isolamento, o que é comum em rotina devido ao problema da auto-medicação.

Em adição, ainda que se obtenha sucesso no isolamento primário do dermatófito, são comuns entre esses agentes as variações fenotípicas de uma mesma espécie, e também, o “pleomorfismo”, processo em que há perda da capacidade de esporulação in vitro, resultando em colônias macro e microscopicamente atípicas, o que também inviabiliza a sua identificação taxonômica. O crescimento no exame de cultura de fungos contaminantes considerados agentes emergentes de dermatomicoses, também não possibilita uma certeza quanto ao significado deste resultado (GUPTA et al., 2001; SUMMERBELL et al., 2005; DOBROWOLSKA et al., 2006; BONTEMS et al., 2009).

Uma das maiores dificuldades no diagnóstico micológico pelos métodos convencionais está relacionada, principalmente, aos casos de onicomicose, haja vista a baixa sensibilidade e especificidade do exame direto e de cultura. A etiologia das onicomicoses, na prática laboratorial, é uma questão de difícil definição em virtude da freqüência com que outros fungos filamentosos não dermatófitos (FFND) têm sido isolados, tais como *Fusarium*, *Scytalidium*, *Scopulariopsis*, *Aspergillus*, dentre outros fungos contaminantes, os quais podem ser os agentes primários da infecção, ou agentes secundários a um processo de dermatofitose, ou ainda, apenas contaminantes casuais e transitórios (SUMMERBELL et al., 2005; BARAN et al., 2006; BOTEMS et al., 2009)

A correta definição do agente etiológico nos casos de onicomicose e de outras dermatofitoses de evolução crônica e recidivante é fundamental para a escolha da melhor conduta terapêutica e acompanhamento clínico dos pacientes. Nesse contexto, os métodos de tipagem molecular representam uma alternativa muito promissora para a implantação de um sistema rápido e de alta sensibilidade e especificidade, que possa ser empregado em rotina para o diagnóstico laboratorial das dermatofitoses.

2.7.2 Métodos Moleculares

O advento da biologia molecular permitiu o desenvolvimento de técnicas altamente sensíveis e específicas com ampla aplicabilidade, não somente na área do diagnóstico, como também na área epidemiológica, taxonômica, em estudos da diversidade genética de populações, dentre outras.

Diferentes métodos de tipagem molecular têm sido utilizados nos últimos anos para revelar variabilidade em diferentes alvos da molécula do DNA, para a diferenciação inter-específica, e algumas vezes, até mesmo intra-específica de determinados isolados de fungos. No entanto, estes métodos variam consideravelmente quanto à habilidade de detectar diferenças entre os isolados, facilidade de execução, reprodutibilidade e custos.

Dentre os métodos utilizados estão: análise por seqüenciamento do DNA mitocondrial (MOCHIZUKI et al., 2003; TAMBOR et al., 2006); amplificação randômica do DNA polimórfico (RAPD) (LIU et al., 2000; BAEZA et al., 2006;); AP-PCR (LIU et al., 1997); PCR fingerprinting (FAGGI et al., 2001; POUNDER et al., 2005); análise por seqüenciamento e de polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP-PCR) dos genes do DNAr e da região espaçadora interna transcrita (ITS) (JACKSON et al., 1999; MOCHIZUKI et al., 1999); sequenciamento de genes codificadores de proteínas, tais como: quitina sintase (KANO et al., 1998; KANO et al., 2000) e superóxido dismutase

(DENIS et al, 2000; FREALLE; 2007), e análise por RFLP-PCR do gene da topoisomerase II (KANBE et al., 2003; KAMIYA et al, 2004; GANLIN et al, 2005).

Os métodos que utilizam a reação da PCR são particularmente promissores por causa da sua facilidade de execução, especificidade e sensibilidade. Basicamente, polimorfismos nos genes do DNAr e região ITS, têm sido os principais alvos utilizados para a identificação em nível de espécies de isolados de dermatófitos, bem como de outros fungos de interesse médico, tais como *Candida*, *Aspergillus fumigatus* e *Fusarium sp*, para fins de diagnóstico ou em estudos filogenéticos (RADFORD et al., 1998; IROBI et al., 1999; WU et al., 2009; MONOD et al., 2006).

A região do DNAr, como são chamados os genes que codificam o RNA ribossômico, é a região mais conservada no genoma com possibilidades de divergências filogenéticas. O gene total contém uma pequena subunidade 18S e 5,8S, e uma larga subunidade 28S. Os mesmos estão organizados como famílias de genes em *tandem*, onde cada unidade repetida contém uma unidade de transcrição do RNAr, bem como uma região espaçadora intergênica (IGS) que separa essas unidades de transcrição. A região IGS de cada unidade repetida, por sua vez, contém uma variedade de seqüências em tandem, referidas como subrepetidas. Entre os genes da subunidade 18S e 5.8S encontra-se a região ITS I, e, entre 5.8S e a subunidade larga 28S, a região ITS II, as quais também apresentam polimorfismos (WHITE et al., 1990; IWEN et al., 2002).

Um método de RFLP-PCR tendo como alvo a região ITS/DNAr foi otimizado por Irobi et al. (1999) para a diferenciação de espécies de *Candida*. A região alvo foi amplificada utilizando os iniciadores ITS5 e NL4, resultando em um produto único de cada espécie, o qual foi posteriormente submetido à ação das seguintes enzimas de restrição: *BfaI*, *HaeIII* e *DdeI*. Neste estudo, diferentes perfis de RFLP foram obtidos permitindo assim a identificação de sete espécies de *Candida*.

Jackson et al. (1999), a partir da hibridização do DNA genômico de isolados de *T. rubrum* digerido com *EcoRI*, com sondas (método de Southern-Blotting) para a pequena subunidade 18S e ITSs adjacentes, observaram que dois fragmentos se ligaram à sonda: um pequeno de tamanho constante (3kb), e outro que variava de tamanho de acordo com o número de unidades repetitivas na região espaçadora não transcrita (NTS) (4,7 a 5,8kb). Os autores utilizaram ainda a técnica de RFLP-PCR para a diferenciação de isolados de dermatófitos, com base na digestão de produtos amplificados das regiões ITS e 18S, utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4 e a enzima de restrição *MvaI*. Contudo, este sistema não possibilitou a discriminação de taxons intimamente relacionados, incluindo as variedades de *T. mentagrophytes*; e entre *T. soudanese* e *T. rubrum*.

Em outro trabalho, Jackson et al. (2000) observaram que a amplificação específica da região NTS/DNA_r em isolados de *T. rubrum* identificou variações intra-específicas no número de cópias de dois elementos sub-repetitivos, denominados pelos autores de TRS-1 e TRS-2.

Gupta et al. (2001) no intuito de avaliar a variabilidade entre amostras seriadas de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*, isolados de pacientes com onicomicose em tratamento, utilizaram o mesmo sistema de tipagem descrito por Jackson. Apesar de terem evidenciado cinco perfis de RFLP nos pacientes estudados, não foi encontrada correlação entre um genótipo e um tipo de lesão em particular, ou do surgimento de algum genótipo diferente durante o tratamento. Os autores reforçaram a utilidade do método para revelar diferenças interespecíficas de *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *T. tonsurans*.

No entanto, Baeza et al.(2006), com o propósito de verificar variabilidade intra-específica em isolados de *T. rubrum*, obtiveram melhores resultados com a técnica de RAPD ao utilizarem dois iniciadores desenvolvidos pelos autores (primer 1 e 6), comparando com o

método descrito por Jackson et al. (2000) com base na PCR dos elementos repetitivos TRS-1 e TRS-2 da região NTS/DNAr.

Em estudo recente, Bagyalakshmi et al. (2008) também destacaram a técnica de RFLP-PCR como um método específico e altamente sensível para a detecção de dermatófitos e para a diferenciação interespecífica, utilizando como alvo as regiões 18SDNAr e ITS. Os autores utilizaram uma PCR para a região ITS2 a partir de DNA de espécimes clínicos (raspados de lesões), cujo produto de amplificação permitiu diferenciar dermatófitos de outros fungos não dermatófitos.

Nesse mesmo estudo, DNAs genômicos de isolados de dermatófitos também foram analisados, nos quais, a região 18S foi amplificada utilizando os primers DH1R e DH1L para a subunidade D2 do domínio hipervariável V4, específica para dermatófitos. Ambos os produtos de amplificação obtidos foram digeridos com a endonuclease *HaeIII*, e os perfis de RFLP permitiram a confirmação das espécies *T. rubrum*, *M. gypseum* e *T. mentagrophytes* e dos fungos não dermatófitos (BAGYALAKSHMI et al., 2008).

De Baere et al. (2010) também analisaram polimorfismos na região ITS2 por RFLP-PCR para a diferenciação de 95 isolados pertencentes aos gêneros: *Arthroderma*, *Chrysosporium*, *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*. Neste estudo os produtos da PCR foram digeridos com a enzima *BstUI* (CG/CG), e os fragmentos de restrição gerados permitiram a diferenciação das espécies de *Arthroderma*, *Chrysosporium* e *Epidermophyton*, entretanto, não foi possível a distinção entre as espécies do gênero *Trichophyton*.

Após análises na base de dados do GenBank (NCBI), Dobrowolska et al. (2006) selecionaram três enzimas de restrição para a digestão de produtos amplificados das regiões ITS1; 5,8SDNAr e ITS2, sendo as mesmas: *HinfI*; *HhaI* e *MvnI*. As duas primeiras geraram cinco perfis de RFLP espécie-específicos, enquanto que após a digestão com *MvnI*, apenas três perfis gênero-específicos foram obtidos para os 30 isolados de dermatófitos pertencentes

à espécies: *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. verrucosum*, *E. floccosum* e *M. canis*. Os autores ressaltaram a superioridade da tipagem molecular dos fungos dermatófilos sobre os métodos convencionais de fenotipagem, após a comparação dos resultados e confirmação por sequenciamento das amostras quando resultados discrepantes eram obtidos.

Em outro estudo recente, Bontems et al. (2009) estabeleceram uma metodologia para identificação de *Trichophyton* e FFND por RFLP da região 28S do DNAr amplificada utilizando os primers LSU1 e LSU2 (330 – 332pb), a partir de amostras de raspados de unhas de pacientes com onicomicose. Neste estudo, a digestão dos amplicons com as enzimas *HinfI* e *RsaI* permitiu total diferenciação de isolados de *Trichophyton sp.* de FFND e *Candida sp.*, entretanto, isolados de *Aspergillus sp.* e *T. mentagrophytes*, bem como *Fusarium sp.* e *Candida sp.* revelaram padrão de bandas idênticos. Enquanto que, a digestão com *SmaI* permitiu a diferenciação entre *Aspergillus* do grupo flavus; e a digestão com *AvaI*, *Eco47III* e *SmaI* distinguiu *Fusarium* de *C. albicans* e *C. parapsilosis*. De acordo com os autores, a utilização da técnica de RFLP-PCR em DNAs extraídos diretamente de espécimes clínicos permitiu definir se o FFND isolado em cultura era de fato o agente infeccioso da onicomicose e, discriminar a presença de *Trichophyton* e de contaminantes transitórios.

Alguns autores têm demonstrado que a identificação com base na técnica de RFLP-PCR, utilizando como alvo o gene da topoisomerase II, também pode ser uma ferramenta útil para a diferenciação de espécies de fungos dermatófitos. Kamiya et al. (2004) obtiveram perfis de RFLP específicos para as 06 espécies de dermatófitos, após digestão com a endonuclease *HinfI* de produtos amplificados por meio da PCR-Nested (nPCR), utilizando os primers dPsD1 e dPsD2.

Ganlin et al. (2005) em um estudo semelhante, confirmaram a utilidade deste método, sendo que além da *HinfI*, outra enzima foi utilizada: *HincII*, para a digestão dos produtos amplificados por nPCR. De acordo com os autores, o gene da topoisomerase, apesar de

altamente conservado, permite a diferenciação de espécies com elevada similaridade. Entretanto, entre as espécies *T. rubrum* e *T. violaceum*, o perfil de RFLP obtido foi muito semelhante, no qual 5 fragmentos de restrição foram gerados com as duas enzimas, com diferença em único fragmento (de apenas 10pb aproximadamente).

A revisão da literatura demonstra, portanto, um importante avanço na aplicação das técnicas moleculares para a identificação das espécies dos fungos dermatófitos, e a sua grande vantagem em relação aos métodos convencionais, destacando-se a técnica de RFLP-PCR, pela sua praticidade, rapidez e eficiência. Contudo, apesar da facilidade técnica na amplificação de DNA por meio da PCR, bem como na obtenção dos fragmentos de restrição e na interpretação dos resultados, não existe um consenso entre os autores acerca da padronização das condições técnicas em nenhuma das etapas de trabalho.

De acordo com a literatura científica no que se refere ao emprego da técnica de RFLP-PCR para a tipagem molecular de fungos dermatófitos, são muitas as variações metodológicas encontradas nos estudos publicados nos últimos anos, desde a forma de isolamento e purificação dos ácidos nucleicos, seja a partir de culturas ou de espécimes clínicos; escolha das regiões alvo; dos iniciadores da reação de amplificação, e das enzimas de restrição. Além disso, percebe-se que a maioria dos estudos publicados não teve grande abrangência, tendo sido direcionada ou, demonstrando resolutividade apenas para uma única espécie ou para poucas espécies de dermatófitos.

É importante ainda considerar que o isolamento e a purificação do DNA representam uma etapa fundamental para a obtenção de bons resultados nos protocolos de amplificação, porém, esta não se constitui uma tarefa fácil quando se trata de extração de DNA de fungos, devido à sua parede celular. Composta especialmente de quitina, a parede celular fúngica tem grande resistência à ação das soluções de lise geralmente empregadas nos protocolos de extração (LOFFLER et al., 1997; MULLER et al., 1998). Algumas espécies dermatofíticas

caracterizam-se inclusive, pela produção de abundantes macroconídios de parede celular espessa, tais como o *Microsporum canis*, *M. gypseum* e *Epidermophyton floccosum*, o que dificulta mais ainda o processo de lise química e a obtenção de DNA em quantidade e grau de pureza satisfatória.

Diante disto, diferentes métodos de extração de fungos filamentosos dermatófitos e não dermatófitos têm sido empregados, a maioria dos quais incluindo etapa inicial para a ruptura mecânica da parede celular, tais como maceração em gral e pistilo, agitação vigorosa com *beads* (grânulos de vidro), incubação overnight com enzimas, uso de nitrogênio líquido, dentre outras estratégias (LOFFLER et al., 1997; MULLER et al., 1998; WILLIAMSON et al., 2000; SAMBROOK; RUSSEL, 2001; KARAKOUSIS et al., 2006). De acordo com Manian et al. (2001) não existe um único método adequado para a lise celular e extração de DNA de todos os fungos, devido às peculiaridades estruturais de cada espécie.

Assim, apesar do avanço obtido com o emprego da técnica de RFLP-PCR para a genotipagem de dermatófitos, evidencia-se a necessidade de estudos que visem comparar diferentes protocolos ou as principais variações metodológicas que têm se revelado mais promissoras, no intuito de contribuir para a definição das melhores condições para a tipagem molecular desses fungos em rotina laboratorial, levando em consideração a aplicabilidade da metodologia para a identificação das espécies mais frequentemente isoladas na região do estudo, haja vista as diferenças epidemiológicas encontradas nas dermatofitoses em todo o mundo.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar diferentes metodologias para a extração de DNA e para a identificação molecular de fungos dermatófitos com base na análise de polimorfismo de fragmentos de restrição de produtos amplificados (PCR-RFLP).

3.2 Específicos

3.2.1 Analisar diferentes estratégias metodológicas para a lise da parede celular de dermatófitos.

3.2.2 Testar e comparar o desempenho de diferentes métodos para a recuperação de DNA de dermatófitos.

3.2.3 Avaliar diferentes regiões alvo e enzimas de restrição para a realização da técnica de RFLP-PCR para a diferenciação interespecífica de dermatófitos.

3.2.4 Identificar isolados de dermatófitos pela técnica de PCR-RFLP aplicando os métodos que apresentaram melhor desempenho nas etapas de lise, recuperação, amplificação e digestão do DNA, e, comparar os resultados obtidos com os da identificação pelos métodos de fenotipagem.

3.2.5 Avaliar a aplicabilidade do método de PCR-RFLP que apresentou o melhor desempenho, para a identificação de dermatófitos diretamente de espécimes clínicos obtidos de pacientes com lesões dermatológicas.

4. METODOLOGIA

4.1 Modelo de Estudo

Trata-se de um estudo descritivo e transversal, no qual foram avaliados diferentes métodos para a extração de DNA, e tipagem molecular de fungos dermatófitos com base na análise de polimorfismo de fragmentos de restrição de produtos amplificados (RFLP-PCR). Esta pesquisa foi desenvolvida na Fundação de Dermatologia Tropical e Venerologia “Alfredo da Matta”- FUAM em colaboração com a Faculdade de Ciências Farmacêuticas-FCF/UFAM e o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – (INPA),

4.2 Universo de Estudo

4.2.1 Amostras

Foram utilizados 65 isolados de fungos dermatófitos, obtidos pelo projeto intitulado “*Polimorfismo dos genes de IL-10 e TNF- α em indivíduos com dermatofitoses*” no período de 2009 a 2010. Os isolados fúngicos foram coletados de indivíduos adultos na faixa etária de 18 a 65 anos, e encontram-se preservados no Laboratório de Micologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-FCF/UFAM sob dois diferentes métodos de preservação: subcultivo em Ágar Batata Dextrose (BDA) armazenado em geladeira a 4°C, água destilada estéril (CASTELLANI, 1967).

4.2.2 Critérios de Elegibilidade

Foram incluídos os isolados fúngicos que apresentarem viabilidade e pureza após o procedimento de reativação por meio de repique em meio de cultura BDA.

4.3 Informações Éticas

O projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação “Alfredo da Matta”- FUAM (CEP-FUAM), para a devida apreciação e solicitação de dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) dos pacientes, uma vez que foram utilizados no presente estudo, isolados fúngicos subcultivados a partir de material biológico (raspado

cutâneo) obtidos em pesquisa em andamento e já aprovada pelo referido CEP sob o título “*Polimorfismo dos genes de IL-10 e TNF- α em indivíduos com dermatofitose*”

4.4 Detalhamento dos Procedimentos

4.4.1 Reativação dos isolados fúngicos

Os isolados fúngicos que se encontravam preservados em água destilada esterilizada foram reativados por meio do repique de um fragmento da colônia em meio de cultura BDA contido em tubo de ensaio e, posteriormente incubados em temperatura ambiente por um período de 15 dias, para crescimento satisfatório da colônia.

4.4.2 Caracterização Fenotípica

A caracterização fenotípica dos isolados fúngicos foi feita a partir dos dados obtidos nos estudos da macro e micromorfologia da colônia cultivada em BDA.

4.4.2.1 Estudo Macromorfológico

As amostras fúngicas previamente repicadas foram subcultivadas em meio BDA 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. LACAZ, et al (2002).

4.4.2.2 Estudo Micromorfológico

Para esta etapa o isolado fúngico foi cultivado entre lâmina e lamínula conforme a técnica de microcultivo descrita por Ridell (RIDELL, apud SIDRIM; ROCHA, 2004). Após o período ótimo de crescimento as lâminas foram preparadas e analisadas utilizando microscópio óptico (NIKON mod. Eclipse-E200) em aumento de 100 e 400x. Para a análise micromorfológica foram consideradas as características das hifas primárias e suas

ramificações; a presença e disposição dos macroconídios, microconídios, hifas espiraladas e clamidoconídios; espessura da parede celular dos macroconídios e número de septações.

4.4.3 Caracterização Genotípica

Para os ensaios moleculares, sete linhagens pertencentes à coleção de fungos do laboratório de Micologia da Fundação de Dermatologia Tropical “Alfredo da Matta” na cidade de Manaus-AM, foram utilizadas, sendo estas: *T. mentagrophytes* (FUAM-TM165), *T. rubrum* (FUAM-TR007), *T. violaceum* (FUAM-TV046), *T. tonsurans* (FUAM-TT086), *M. canis* (FUAM-MC084), *M. gypseum* (FUAM-MG082) e *E. floccosum* (FUAM-EF197), as quais foram utilizadas como padrões. A identidade destas linhagens foi validada por sequenciamento da região ITS1 do DNAr (Makimura et al. 1998), utilizando o analisador automático ABI 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems) e comparação ao Banco Gene Bank.

Após o sequenciamento, estas linhagens foram utilizadas como padrões para a realização dos ensaios para avaliação dos métodos de lise da parede celular, de separação do DNA genômico e de genotipagem por RFLP-PCR.

Para a realização dos ensaios, as cepas foram repicadas em meios de cultura BDA contidos em tubos de ensaio e incubadas em temperatura ambiente, durante um período de quatro a sete dias, tempo suficiente para a obtenção de uma colônia de aproximadamente 1 cm de diâmetro. Uma porção da colônia com peso aproximado de 100 mg de micélio foi transferida para um microtubo de polipropileno com capacidade para 2 mL.

4.4.3.1 Avaliação dos métodos para a lise da parede celular fúngica

Diferentes estratégias para a ruptura mecânica da parede celular fúngica foram avaliadas:

Lise 1) maceração do micélio, com bastão de vidro;

Lise 2) maceração do micélio congelado (-20°C), com bastão de vidro;

Lise 3) maceração do micélio congelado (-80°C), com bastão de vidro;

Lise 4) maceração do micélio congelado em nitrogênio líquido, com bastão de vidro;

Lise 5) maceração do micélio congelado em nitrogênio líquido com bastão de vidro e digestão enzimática (proteínase K);

Lise 6) Agitação do micélio com pérolas de vidro.

Nos métodos de lise descritos nos itens de 1 a 5, a maceração do micélio foi realizada no próprio microtubo com o auxílio de um bastão de vidro de 5mm de diâmetro, durante 1 min., sendo em seguida adicionados 500uL de solução de lise (Tri-HCl 150mM, NaCl 2M, DTAB 12%, EDTA 30mM). No método de lise 6 a agitação do micélio com pérolas de vidro (0,1 a 0,5mm de diâmetro) (Lise 6) foi realizada com a solução de lise utilizando um agitador tipo vortex em alta rotação por 15 segundos. Posteriormente, os micélios foram incubados por 15min a 75°C.

Os diferentes métodos de lise da parede celular foram avaliados a partir da separação do DNA utilizando o kit QIAamp Tissue (Qiagen, Germany), recomendado por Löffler et al. (1997), e posteriormente, os DNAs obtidos foram submetidos à análise espectrofotométrica para quantificação e avaliação do grau de pureza.

4.4.3.2 Avaliação dos métodos de separação do DNA

Uma vez definidas as melhores condições para a lise da parede celular, foi feita a avaliação de três diferentes métodos para a separação do DNA, conforme abaixo:

1) Método de separação por coluna de sílica. Foi utilizado o kit QIAamp Tissue (Qiagen, Germany), seguindo as instruções do fabricante. O DNA foi eluído em 100 µL de tampão TE.

2) Método segundo Del Sal et al. (1989). Neste protocolo o produto lisado foi incubado com NaCl 0,5M durante 10 min a 65°C, posteriormente com CTAB (Sigma) 10% por 20 min, e tratado com RNase A (Roche) por 1h. A separação foi realizada com igual volume de fenol-

clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). O DNA foi precipitado com 2 volumes de propanol gelado por 20 min a -20°C, lavado e ressuspenso em 100µL de TE.

3) Método segundo Gustincich et al. (1991), compreendendo as seguintes etapas: desproteinização com clorofórmio em igual volume; após centrifugação por 5 min foi adicionado ao sobrenadante 1mL CTAB 0,5% para a precipitação do DNA, e em seguida foi realizada nova centrifugação a 5 min e o pellet foi ressuspenso em 300 µL de NaCl 1,2M. Posteriormente o DNA foi precipitado em 750 mL de etanol absoluto gelado, e lavado 2x com etanol a 70%. Após a secagem do mesmo, o DNA foi diluído em tampão TE (100µL).

4.4.3.3 Avaliação da concentração, pureza e viabilidade para PCR do DNA obtido

A concentração do DNA genômico foi verificada através de leitura em equipamento UV/VISDrop ASP3700 Spectrophotometer (Advanced Technology & Industrial Co., LTD) no comprimento de onda de 260 nm, observando que uma unidade de absorbância correspondeu a 50 µg/ml. Foram realizadas também leituras em comprimento de onda 280 nm, para determinação do grau de pureza do DNA, considerando a razão 260/280.

4.4.3.4 Seleção de protocolo de PCR para PCR-RFLP

Foram avaliadas para amplificar o DNA das linhagens de dermatófitos, três metodologias de PCR previamente descritas, conforme o esquema abaixo:

Região/Primer/Produto esperado	Reagentes	Ciclos
Região ITS - Irobi et al. ITS5: 5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' NL4: 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'	-Volume final: 25 µL, -dNTPs: 200µM -MgCl ₂ :1,5mM -Primers: 0,5 µM (cada) -Taq Polimerase: 2,5U -DNA :50 ng	-Desnaturação inicial a 95°C por 5 min -35 ciclos: 95°C por 1 min; 55°C por 1 min e 72°C por 2min; -Extensão final: 72°C por 10 min.
Produto: aproximadamente 1600 pb		
Região ITS - Jackson et al. ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	-Volume final: 25 µL, -dNTPs: 200µM -MgCl ₂ :1,5mM -Primers: 0,5 µM (cada) -Taq Polimerase: 2,5U -DNA :50 ng	-Desnaturação inicial a 95°C por 5 min -35 ciclos: 95°C por 1 min; 55°C por 1 min e 72°C por 2min; -Extensão final: 72°C por 10 min.
Produto: aproximadamente 700 pb		

Região ITS - Kamiya et al.	-Volume final: 25 µL,	-Desnaturação inicial a 94°C por 5 min
dDPF2:	-dNTPs: 200µM	-45 ciclos: 94°C por 1 min; 63°C por 1 min e 72°C por 2min;
5'-GTYTGGAAYAAAYGGYCGYGGTAT	-MgCl ₂ :1,5mM	-Extensão final: 72°C por 10 min.
TCC-3'	-Primers: 0,5 µM(cada)	
dDPR2:	-Taq Polimerase: 2,5U	
5'-RAAVCCGCGGAACCAKGGCTTCAT	-DNA :50 ng	
KGG-3'		
Produto: aproximadamente 2380 pb		

4.4.3.5 Seleção de enzima de restrição para PCR-RFLP

Os diferentes produtos de PCR foram digeridos separadamente com 8U de enzima de restrição durante 03 horas a 37°C. Para a digestão dos produtos amplificados foram testadas separadamente três enzimas de restrição: *DdeI*, *HinfI* e *HaeIII*.

4.4.3.6 Eletroforese

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5% acrescido de SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) sob luz UV.

4.4.3.7 Avaliação da reprodutibilidade, especificidade e sensibilidade da PCR- RFLP

O método que apresentou a melhor capacidade discriminatória entre as sete espécies analisadas foi posteriormente utilizado para a identificação de 75 isolados de dermatófitos, no intuito de se avaliar a reprodutibilidade e a resolatividade do método. Para a avaliação da sensibilidade da PCR, diluições seriadas do DNA da cepa de *Trichophyton rubrum* (TR007-FUAM) foram submetidas à reação de amplificação e à análise por eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

4.5. Análise dos Resultados

Os testes para a avaliação dos métodos de lise e de separação de DNA fúngico foram realizados em triplicata, a partir do qual foi calculada a média, desvio padrão e análise

ANOVA associada ao teste de Fischer. Os ensaios de amplificação e de digestão do DNA foram feitos em duplicata (quando necessário em triplicata), e os produtos obtidos foram analisados em gel de agarose, no qual foram estimados o número e o tamanho dos fragmentos gerados. Os perfis de RFLP obtidos dos isolados fúngicos foram comparados com as linhagens de referência.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de todos os ensaios realizados no presente trabalho, bem como a discussão dos mesmos, estão demonstrados na forma de três artigos, os quais serão submetidos para a devida publicação, conforme abaixo:

Artigo 1: Avaliação de metodologias para extração de DNA de fungos dermatófitos.

Periódico: Mycologia, ISSN:0027-5514; Clasificação Qualis: B1

Artigo 2: Avaliação de diferentes protocolos para a identificação de espécies de dermatófitos por PCR-RFLP.

Periódico: Journal of Clinical Mycobiology ISSN:0095-1137; Classificação Qualis: A1

Artigo 3: Aplicação de uma PCR-RFLP, que tem o gene da topoisomerase II como alvo, para a identificação de agentes de dermatofitoses em espécimes clínicos.

Periódico: Mycologia, ISSN:0027-5514; Classificação Qualis: B1

Avaliação de metodologias para extração de DNA de fungos dermatófitos

Maria Zeli Moreira Frota^{*1}, João Vicente Braga de Souza², Débora Cristina de Lima Fernandes³, Karoline Lô Jimenez⁴, Aya Sadahiro⁵, Victor Costa Souza⁶, Daniel Lúcio Rodrigues Dutra⁷, Maria Cristina dos Santos⁸

¹ Laboratório de Micologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Manaus, Brasil

² Laboratório de Micobacteriologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brasil

^{3,4} Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Manaus, Brasil

^{5,8} Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil

⁶ Instituto Oswaldo Cruz - Instituto Leônidas e Maria Deane, Manaus, Brasil

⁷ Laboratório de Biologia Molecular, Fundação Alfredo da Mata, Manaus, Brasil

Resumo

Os dermatófitos compreendem um grupo de fungos filamentosos de grande interesse na área da medicina humana e veterinária, devido à sua capacidade de parasitar os tecidos queratinizados, como a pele, pêlos e unhas, e à sua ampla distribuição no mundo, podendo acometer pessoas de ambos os gêneros e de todos os grupos etários. O diagnóstico laboratorial pelos métodos convencionais baseia-se nas características morfológicas do fungo e é considerado laborioso e falho. Diferentes métodos moleculares têm sido utilizados para a identificação dos dermatófitos, sendo muitas as variações metodológicas, desde a etapa de obtenção do DNA, o que compromete a consolidação de um método padrão para a tipagem molecular desses fungos. No presente estudo foram analisados diferentes estratégias metodológicas de lise mecânica da parede celular e de recuperação do DNA para aplicação em reação de PCR. Considerando o rendimento e a qualidade do DNA obtido, não foram observadas diferenças significativas entre as metodologias, entretanto o método de lise por meio da agitação vigorosa do micélio com pérolas de vidro demonstrou grande vantagem operacional, e o método de separação por sais utilizando CTAB, revelou-se uma alternativa eficiente para substituir o método de separação em coluna de sílica muito utilizado em kits comerciais.

Palavras chaves: Dermatófitos, RFLP-PCR, Genotipagem.

Introdução

Os dermatófitos constituem um grupo restrito de fungos filamentosos filogeneticamente relacionados e que compartilham várias características entre si, em especial, nos aspectos morfológicos, bioquímicos e fisio-patológicos. Suas diferentes espécies estão inseridas em três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. Destacam-se dos demais fungos patogênicos pela sua capacidade em absorver nutrientes principalmente a partir de queratina, podendo assim parasitar os tecidos superficiais queratinizados de homens e animais, causando infecções cutâneas denominadas de dermatofitoses ou “*tineas*”

(Weitzman; Summerbel, 1995; Graser et al., 2008). As dermatofitoses têm distribuição universal com elevada prevalência na maioria das regiões do mundo, constituindo-se em um problema em saúde pública. Manifestam-se com quadros clínicos variados, de evolução aguda ou crônica, e acometem indivíduos de ambos os sexos e de todas as faixas etárias (Seebacher et al. 2008).

O diagnóstico laboratorial das dermatofitoses é realizado a partir do exame direto da amostra biológica, após o clareamento com a potassa, e, do exame de cultura, este último define o agente fúngico em nível de espécie com base nos estudos da macro e micromorfologia da colônia, e, quando necessário, com o auxílio de provas bioquímicas (Richardson, Warnock, 2003; Lacaz et al. 2002). No entanto, o processamento e análises dos espécimes clínicos pelos métodos convencionais são considerados laboriosos; exigem uma estrutura e equipe técnica especialmente habilitada; em muitos casos apresentam baixa sensibilidade e especificidade, além do tempo relativamente longo até a liberação do laudo final (Petrini; Von Roser, 2002). Diante disto, o advento da biologia molecular trouxe inúmeras perspectivas, no sentido do desenvolvimento de métodos rápidos, com alta sensibilidade e especificidade, para aplicação não somente na área do diagnóstico, como também na área epidemiológica, taxonômica, estudos da diversidade genética de populações, dentre outras aplicações (Iwen, et al .2002; Kawai, 2003).

Entretanto, no que diz respeito aos fungos, é de fundamental importância considerar que a grande variabilidade morfológica encontrada entre as diferentes espécies pode interferir na qualidade e no rendimento do DNA durante o processo de extração, etapa fundamental para a obtenção de bons resultados nos protocolos de amplificação do DNA. A parede celular fúngica, composta principalmente de quitina, é um dos fatores que pode dificultar a extração devido à sua grande rigidez e resistência à ação química das soluções de lise geralmente empregadas (Adams, 2004; Fredricks et al. 2005).

Diferentes protocolos para a extração de DNA de fungos filamentosos ou de leveduras podem ser encontrados na literatura, os quais apresentam variantes metodológicas, tanto na etapa de lise da parede celular como na etapa de recuperação ou purificação do DNA. A maioria dos métodos de extração empregados para fungos, no geral, inclui uma etapa inicial de ruptura mecânica da parede celular, tais como maceração do micélio em grau e pistilo, agitação vigorosa com pérolas de vidro, uso de nitrogênio líquido, choque térmico, sonicação, dentre outras estratégias (Muller et al. 1998; Van Burik et al. 1998; Williamson et al. 2000; Sambrook ; Russel, 2001; Yamada et al. 2002; Karakousis et al. 2006).

Na etapa de recuperação do DNA da solução de lise, o uso de kits comerciais que fazem a separação em coluna de sílica, tem sido um dos recursos mais utilizados nos estudos moleculares de fungos. Outras alternativas incluem protocolos clássicos de separação por polaridade utilizando fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, e protocolos que se fundamentam em precipitação iônica, como o que utiliza Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), originalmente desenvolvidos para a extração de plantas (Weiland, 1997; Fredricks, et al. 2005).

Diante de tantas variáveis metodológicas e da falta de padronização de métodos para a obtenção de DNA de fungos dermatófitos, torna-se difícil a escolha de um método de extração para a realização de estudos moleculares dessas espécies. O presente estudo teve como objetivo principal avaliar diferentes protocolos para a extração de DNA no intuito de propor um protocolo simplificado que possa ser aplicado adequadamente em estudos de genotipagem de espécies de fungos dermatófitos. Assim, foram avaliadas 06 diferentes estratégias metodológicas para a etapa de lise da parede celular, e 03 métodos de recuperação de DNA.

Materiais e Métodos

Linhagens: Para todos os ensaios, sete linhagens, pertencentes à coleção de fungos do serviço de Micologia da Fundação de Dermatologia Tropical “Alfredo da Matta” na cidade de

Manaus-AM, foram utilizadas: *Trichophyton mentagrophytes* (FUAM-TM165), *T. rubrum* (FUAM-TR007), *T. violaceum* (FUAM-TV046), *T. tonsurans* (FUAM-TT086), *Microsporum canis* (FUAM-MC084), *M. gypseum* (FUAM-MG082) e *Epidermophyton floccosum* (FUAM-EF197). A identidade destas linhagens foi validada por sequenciamento da região ITS1 do DNAr (Makimura et al. 1999), utilizando o analisador automático Seq3130 Genetic Analyser (Applied Biosystem) .

Preparo das amostras para os testes de extração de DNA: As linhagens foram repicadas em meio ágar batata com dextrose e mantidas em temperatura ambiente por um período entre 04 a 07 dias com a finalidade de se obter uma colônia de aproximadamente 1cm de diâmetro. Em seguida, 100mg de micélio de cada cultura foram transferidos para microtubos de 2,0 mL, onde foram submetidos aos testes de extração de DNA.

Avaliação da lise celular: Diferentes estratégias para a ruptura mecânica da parede celular fúngica foram avaliadas: Lise 1) maceração do micélio, com bastão de vidro; Lise 2) maceração do micélio congelado (-20°C), com bastão de vidro; Lise 3) maceração do micélio congelado (-80°C)), com bastão de vidro; Lise 4) maceração do micélio congelado em nitrogênio líquido, com bastão de vidro; Lise 5) maceração do micélio congelado em nitrogênio líquido com bastão de vidro e digestão enzimática (proteínase K); Lise 6) Agitação do micélio com pérolas de vidro. A maceração do micélio foi realizada no próprio microtubo com o auxílio de um bastão de vidro de 5mm de diâmetro, durante 1 min., em seguida foram adicionados 500uL de solução de lise (Tri-HCl 150mM, NaCl 2M, DTAB 12%, EDTA 30mM). A agitação do micélio com pérolas de vidro (0,1 a 0,5mm de diâmetro) (Lise 6) foi realizada com a solução de lise utilizando um agitador tipo vortex em alta rotação. Os micélios foram incubados por 15min a 75°C. Para a avaliação do desempenho dos diferentes métodos de lise, o DNA foi recuperado da solução utilizando-se o kit QIAamp Tissue

(Qiagen, Germany) conforme as instruções do fabricante, e submetido à análise espectrofotométrica para avaliação da concentração de DNA e grau de pureza.

Métodos para a separação do DNA: Foram testados 03 protocolos para a separação do DNA da solução de lise, conforme segue: **Protocolo 1-** Método de separação por coluna de sílica. Foi utilizado o kit QIAamp Tissue (Qiagen, Germany), seguindo as instruções do fabricante. O DNA foi ressuspensão em 100 µL de tampão TE. **Protocolo 2 -** Método segundo Del Sal et al. (1989). Neste protocolo o produto lisado foi incubado com NaCl 0,5M durante 10 min a 65°C, posteriormente com CTAB (Sigma) 10% por 20 min, e tratado com RNase A (Roche) por 1h. A separação foi realizada com igual volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). O DNA foi precipitado com 2 volumes de propanol gelado por 20 min a -20°C, lavado e ressuspensão em 100µL de TE. **Protocolo 3 -** Método segundo Gustincich et al. (1991), compreendendo as seguintes etapas: desproteinização com clorofórmio em igual volume e precipitação do DNA com CTAB 0,5%; em seguida foi realizada nova centrifugação por 5 min e o pellet foi ressuspensão em 300 µL de NaCl 1,2M; posteriormente o DNA foi precipitado em 750 µL de etanol absoluto gelado, e lavado 2x com etanol a 70%. Após a secagem do mesmo, o DNA foi diluído em tampão 100µL TE.

Avaliação da concentração, pureza e viabilidade para PCR do DNA obtido: A concentração do DNA genômico foi verificada através de leitura em equipamento UV/VISDrop ASP3700 Spectrophotometer (Advanced Technology & Industrial Co., LTD) no comprimento de onda de 260 nm, observando que uma unidade de absorbância correspondeu a 50 µg/ml. Foram realizadas também leituras em comprimento de onda 280 nm, para determinação do grau de pureza do DNA. Todos os testes de lise foram feitos em triplicata e os testes de recuperação do DNA em duplicata. A partir dos resultados obtidos foi calculado a média, desvio padrão e realizada a análise ANOVA associada ao teste de Fischer.

Após a definição das melhores condições para as etapas de lise e de recuperação de DNA das 07 espécies de dermatófitos, os DNAs assim obtidos foram submetidos a uma PCR da região ITS do DNAr utilizando os primers ITS1 e ITS4, conforme técnica descrita por Jackson et al. (1999), no intuito de se verificar a presença de alguma contaminação ou de algum interferente na reação de PCR, e os produtos amplificados foram seqüenciados utilizando o analisador automático Seq3130 Genetic Analyser (Applied Biosystem).

Resultados

Os resultados referentes às concentrações e graus de pureza dos DNAs obtidos com os diferentes métodos de lise estão representados nas tabelas 1 e 2, respectivamente. Os 06 métodos avaliados tiveram um desempenho satisfatório considerando que, na maioria dos testes obteve-se um rendimento acima de 20ng/μL e graus de pureza entre 1,7 e 2,0. Os maiores rendimentos de DNA, acima de 40ng/μL, e os menores rendimentos, abaixo de 20ng/μL, ocorreram de forma aleatória entre as 07 espécies com os diferentes métodos, à exceção do *T. rubrum*, que não apresentou nenhum resultado abaixo de 29ng/μL. A maceração do micélio no próprio microtubo utilizando-se um bastão de vidro, empregada em quase todos os métodos testados (com exceção do método 6), permitiu a obtenção de resultados satisfatórios na quebra da parede celular fúngica, sendo portanto, uma alternativa que pode substituir o uso de gral e pistilo, indicado por alguns autores (Karakousis et al. 2006). Contudo, neste tipo de manipulação, especialmente quando a amostra encontra-se sob forte congelamento, há o risco de que fragmentos sejam expelidos do microtubo. A agitação vigorosa do micélio com pérolas de vidro em solução de lise (método 6) apresentou mais vantagens, por dispensar a etapa da maceração manual, a qual exige maior esforço e maior tempo de trabalho do operador. Este método permitiu maior produtividade, menor risco de contaminação da amostra e do operador, e mais rapidez na etapa de lise da parede celular

fúngica, tendo sido este, portanto, o método de escolha para a realização dos testes de lise da parede celular.

Tabela 1. Médias das concentrações do DNA de sete espécies de dermatófitos obtidas com diferentes métodos de lise da parede celular.

Linhagens	Concentração do DNA (ng/μL)					
	Lise 1	Lise 2	Lise 3	Lise 4	Lise 5	Lise 6
TR007	29±4 ^{abc}	57±25 ^{bc}	35±6 ^{abc}	43±17 ^{abc}	33±22 ^{abc}	40±1 ^{abc}
TV046	21±1 ^{ab}	33±12 ^{abc}	23±10 ^{ab}	36±14 ^{abc}	33±18 ^{abc}	29±19 ^{abc}
TT086	28±7 ^{abc}	41±1 ^{abc}	40±15 ^{abc}	21±9 ^{ab}	20±19 ^{abc}	16±6 ^{ab}
TM165	26±12 ^{abc}	20±11 ^{ab}	16±5 ^a	14±10 ^a	14±9 ^a	38±19 ^{abc}
MC084	16±9 ^{abc}	37±13 ^{abc}	24±0,7 ^{abc}	16±7 ^{abc}	12±7 ^a	43±32 ^{abc}
MG082	50±18 ^{abc}	38±21 ^{abc}	29±6 ^{abc}	29±29 ^{abc}	28±5 ^{ab}	25±11 ^{abc}
EF197	17±3 ^{ab}	17±14 ^a	35±25 ^{abc}	71±41 ^c	19±3 ^a	22±3 ^{ab}

Tabela 2. Médias do grau de pureza do DNA de sete espécies de dermatófitos obtidas com diferentes métodos de lise da parede celular.

Linhagens	Pureza do DNA (268/280)					
	Lise 1	Lise 2	Lise 3	Lise 4	Lise 5	Lise 6
TR007	1,9±0,3 ^a	2,00±0,08 ^a	1,7±0,5 ^a	1,7±0,1 ^a	1,8±0,5 ^a	1,8±0,1 ^a
TV046	1,7±0,3 ^a	1,7±0,2 ^a	1,70±0,06 ^a	1,70±0,01 ^a	1,70±0,01 ^a	1,80±0,01 ^a
TT086	1,8±0,4 ^a	1,9±0,2 ^a	1,9±0,1 ^a	1,8±0,3 ^a	1,70±0,07 ^a	1,7±0,1 ^a
TM165	1,90±0,01 ^a	1,9±0,2 ^a	2,0±0,2 ^a	1,7±0,6 ^a	1,70±0,14 ^a	1,9±0,1 ^a
MC084	2,00±0,07 ^a	1,9±0,1 ^a	1,8±0,1 ^a	1,7±0,1 ^a	1,70±0,07 ^a	2,0±0,1 ^a
MG082	2,00±0,01 ^a	1,9±0,1 ^a	1,7±0,1 ^a	1,7±0,2 ^a	1,8±0,1 ^a	1,8±0,1 ^a
EF197	1,7±0,2 ^a	1,7±0,2 ^a	1,9±0,2 ^a	1,80±0,07 ^a	1,70±0,07 ^a	1,8±0,1 ^a

As médias destacadas com as mesmas letras não apresentaram diferenças significativas ao nível de 95%, aplicando-se ANOVA e Fisher.

Método Lise 1- maceração do micélio, com bastão de vidro;

Método Lise 2- maceração do micélio, congelado à -20°C, com bastão de vidro;

Método Lise 3- maceração do micélio, congelado à -80°C, com bastão de vidro;

Método Lise 4- maceração do micélio, congelado em nitrogênio líquido, com bastão de vidro;

Método Lise 5- maceração do micélio, congelado em nitrogênio líquido, com bastão de vidro e digestão com proteinase K;

Método Lise 6- maceração do micélio com pérolas de vidro em tampão de lise.

Em relação às análises dos três métodos para a separação do DNA, os resultados referentes às concentrações e graus de pureza, estão demonstrados na tabela 3. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os mesmos, os quais apresentaram, na maioria dos testes realizados, rendimentos de DNA entre 20 e 40ng/μL (tabela 3) e grau de pureza $\geq 1,7$ (tabela 4). O protocolo 2, em comparação aos demais, foi o mais laborioso com sete etapas de procedimento utilizando um maior número de reagentes. Neste método o tempo

necessário para realização da metodologia foi de 2 horas e 40 minutos. Vale ainda ressaltar, a questão da toxicidade da mistura fenol-clorofórmio-alcool isoamílico. Por sua vez, o protocolo 3 em comparação ao método anterior apresentou maior simplicidade metodológica, com apenas cinco etapas de procedimentos, menor número de reagentes, e o tempo total para a finalização foi de 1 hora.

Tabela 3. Médias das concentrações do DNA de sete espécies de dermatófitos obtidas com diferentes métodos de recuperação do DNA

Linhagens	Concentração do DNA (ng/μL)		
	Separação 1	Separação 2	Separação 3
TR007	42±3 ^b	27±4 ^{ab}	34±18 ^{ab}
TV046	22±9 ^{ab}	43±20 ^b	27±10 ^{ab}
TT086	17±1 ^{ab}	25±9 ^{ab}	22±11 ^{ab}
TM165	37±2 ^{ab}	34±1 ^{ab}	42±11 ^b
MC084	35±11 ^{ab}	40±24 ^{ab}	26±9 ^{ab}
MG082	30±7 ^{ab}	29±5 ^{ab}	39±3 ^{ab}
EF197	23±1 ^{ab}	18±3 ^{ab}	13,5±0,7 ^a

As médias destacadas com as mesmas letras não apresentaram diferenças significativas ao nível de 95%, aplicando-se ANOVA e Fisher.

Tabela 4. Médias do grau de pureza (Razão A260/280) dos DNAs de sete espécies de dermatófitos obtidas com diferentes métodos de recuperação do DNA

Linhagens	Pureza do DNA (268/280)		
	Separação 1	Separação 2	Separação 3
TR007	1,8±0,07 ^{abc}	1,7±0,1 ^{abc}	1,8±0,07 ^{abc}
TV046	1,8±0,07 ^{abc}	1,7±0,07 ^{abc}	1,7±0,07 ^{abc}
TT086	1,8±0,1 ^{abc}	1,7±0,1 ^{abc}	1,6±0,07 ^a
TM165	2,0±0,07 ^c	1,7±0,1 ^{abc}	1,7±0,07 ^{abc}
MC084	1,9±0,1 ^{bc}	1,7±0,21 ^{abc}	1,7±0,01 ^{abc}
MG082	1,8±0,07 ^{abc}	1,6±0,14 ^{ab}	1,8±0,07 ^{abc}
EF197	1,9±0,07 ^{abc}	1,7±0,07 ^{abc}	1,8±0,4 ^{abc}

As médias destacadas com as mesmas letras não apresentaram diferenças significativas ao nível de 95%, aplicando-se ANOVA e Fisher.

O método de agitação do micélio em vortex com pérolas de vidro foi, portanto, a melhor opção para a etapa de lise mecânica da parede celular, e para a recuperação do DNA, o método segundo Gustincich et al. (1991). Os DNAs das 07 linhagens utilizadas nesse estudo, obtidos por meio dessa metodologia de extração, foram submetidos a uma PCR da região ITS do DNAr, utilizando os primers ITS1 e ITS4 (Figura 1). Foram obtidos produtos de PCR de

700 pb com o DNA de todas as linhagens. Os produtos amplificados foram submetidos à análise por sequenciamento da região ITS1/DNA_r, por meio da qual foram confirmadas a identificação das espécies de cada cepa.

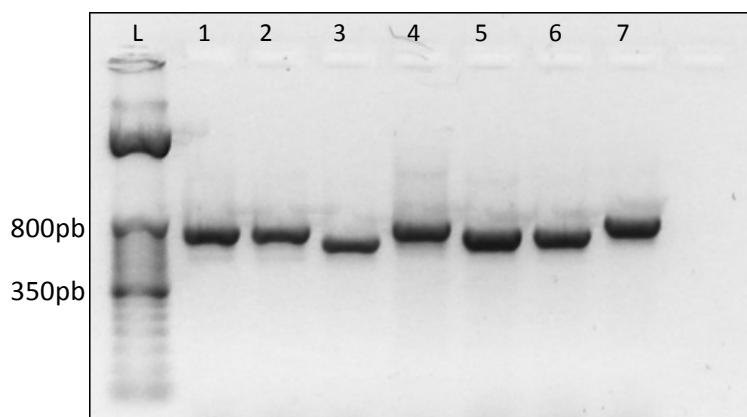


Figura 1. Produtos de PCR de sete cepas de dermatófitos obtidos com os primers ITS1 e ITS4 - L: Ladder 50pb; 1: *T. rubrum* (TR007/FUAM); 2: *T. violaceum* (TV046/FUAM); 3: *M. gypseum* (MG082/FUAM); 4: *M. canis* (MC084/FUAM); 5: *T. tonsurans* (TT086/FUAM); 6: *T. mentagrophytes* (TM165/FUAM); 7: *E. floccosum* (EF197/FUAM); B: Branco.

Discussão

Os estudos moleculares para as mais diversas aplicações exigem a obtenção de uma amostra de DNA de boa qualidade, em termos de concentração e de pureza. O mesmo deve estar livre de impurezas ou de interferentes que possam, por exemplo, inibir os tratamentos enzimáticos ou interferir nos padrões de migração em gel de eletroforese. A escolha de um protocolo de extração deve ser feita considerando especialmente o tipo de amostra analisada e qual a ferramenta molecular que será utilizada, sendo, portanto, de suma importância a adaptação de métodos adequados. A grande variabilidade estrutural e morfológica encontrada entre as diferentes espécies fúngicas pode interferir na qualidade e no rendimento do DNA durante o processo de extração, especialmente devido à rigidez da parede celular (Adams, 2004; Fredricks et al. 2005). No caso dos dermatófitos, algumas espécies caracterizam-se pela produção abundante de clamidiosporos (esporos de resistência) ou macroconídios com parede

celular grossa, tais como o *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium sp* e *Trichophyton tonsurans*, reforçando a necessidade de um método eficiente para a ruptura celular.

De acordo com os resultados obtidos nas análises espectrofotométricas, todos os métodos de lise mecânica tiveram desempenho satisfatório em termos de rendimento e pureza do DNA extraído. Semelhantemente, os 03 protocolos avaliados para a recuperação do DNA, apesar de seus princípios técnicos distintos, não demonstraram diferenças significativas de resultados. Ao levar em consideração os critérios operacionais, a agitação em vortex do micélio com pérolas de vidro em 200 µL solução de lise, foi o melhor método para a etapa inicial de lise mecânica da parede celular fúngica. O uso deste método também foi aplicado com sucesso em estudos anteriores para a lise celular de outras espécies de fungos filamentosos e de leveduras, tais como: *Aspergillus sp.*, *Alternaria sp.*, *Fusarium sp.*; *Aureobasidium sp.*; *Candida sp*, *Malassezia sp* e *Filobasidiella sp.*(Van Burik et al. 1998; Fredricks et al., 2005; Yamada et al., 2002).

Na etapa de recuperação de DNA, os kits comerciais geralmente são considerados superiores aos métodos caseiros (Fredricks et al, 2005; Karakousis et al., 2006), entretanto, no presente estudo, o rendimento dos DNAs obtidos com kit QIAamp Tissue (Qiagen, Germany) foram compatíveis com os outros protocolos. Considerando as vantagens e desvantagens de cada protocolo, verificamos que, apesar da maior praticidade e rapidez, o uso do kit comercial apresentou duas dificuldades operacionais: primeiro, a limitação do volume da amostra de micélio lisado que pode ser aplicado na coluna, sendo no máximo de 400µL, e, segundo, ao processar amostras mais densas, o procedimento de separação ficou prejudicado obrigando a repetição em até 4x, o processo de centrifugação a fim de se evitar grandes perdas de DNA. Além disso, dependendo do custo do kit, a sua disponibilidade para uso em rotina e mesmo em pesquisas, pode se tornar inviável, especialmente em instituições públicas. O

protocolo 3 revelou-se uma excelente alternativa para substituir o uso de kits comerciais, apresentando rapidez e simplicidade metodológica.

Referências

- ADAMS D J. 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*. 150 (7): 2029-2035.
- AL-SAMARRAI TH, SCHMID J. 2000. A simple method for extraction of fungal genomic DNA. *Lett Appl Microbiol*. 30:53-56.
- DEL SAL G, MANFIOLETTI G, SCHNEIDER C. 1989. The CTAB-DNA precipitation method: a common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. *Biotechniques*. 7:514-519.
- DUO-CHUAN L. 2006. Review of fungal chitinases. *Mycopathologia*. 161(6):345-360.
- FEOFILOVA EP. 2010. The Fungal Cell Wall: Modern Concepts of Its Composition and Biological Function. *Microbiology*. 79 (6):711-720.
- FREDRICKS DN, SMITH C, MEIER A. 2005. Comparison of Six DNA Extraction Methods for Recovery of Fungal DNA as Assessed by Quantitative PCR. *J. Clin. Microbiol*. 43 (10):5122-5128.
- GRASER Y, SCOTT J, SUMMERBELL R. 2008. The New Species Concept in Dermatophytes-a Polyphasic Approach. *Mycopathologia*. 166 (5-6): 239-256.
- GRIFFIN DW, KELLOGG CA, PEAK KK, SHINN EA. 2002. A rapid and efficient assay for extracting DNA from fungi. *Lett. Appl. Microbiol*. 34:210-214.
- GUSTINCICH S, MANFIOLETTI G, DEL SAL G, SCHNEIDER C, CARNINCI, P. 1991. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques*. 11(3):298-302.
- HAUGLAND RA, BRINKMAN N, VESPER SJ. 2002. Evaluation of rapid DNA extraction methods for the quantitative detection of fungi using real-time PCR analysis. *J. Microbiol. Methods*. 50:319-32.
- IWEN PC, HINRICHS SH, RUPP ME. 2002. Utilization of the internal transcribed space region as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens, *Med. Mycol*. 40 (1):87-109.
- JACKSON CJ, BARTON RC, KELLY SL, EVANS EG. 1999. Species Identification and Strain Differentiation of Dermatophyte Fungi by Analysis of Ribosomal-DNA Intergenic Spacer Regions. *J of Clin Microbiol*. 931- 936.

KARAKOUSIS A, TAN L, ELLIS D, ALEXIOU H, WORMALD PJ. 2006. An assessment of the efficiency of fungal DNA extraction methods for maximizing the detection of medically important fungi using PCR. *J. Microbiol.Methods*. 65:38-48.

KAWAI M. 2003. Diagnosis of dermatophytoses: conventional methods and molecular biology methods. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 44: 261-264.

LACAZ CS, PORTO E, MARTINS J EC, HEINZ-VACCARI EM, MELO NT. Tratado de Micologia Médica. 9a Ed. São Paulo: Sarvier; 2002.

MAKIMURA K, TAMURA Y, MOCHIZUKI T, HASEGAWA A, TAJIRI Y, HANAZAWA R, UCHIDA K, SAITO H, YAMAGUCHI H. 1999. Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *J of Clin Microbiol*. 3 (4):920-924.

MULLER FMC, WERNER KE, KASAI M, FRANCESCONI A, CHANOCK SJ, WALSH TJ. 1998. Rapid extraction of genomic DNA from medically important yeasts and filamentous fungi by high-speed cell disruption. *J Clin Microbiol*. 36:1625-1629.

PETRINI B, VON ROSEN ML. 2002. Optimal dermatophyte diagnosis requires both microscopy and culture. *Lakartidningen*. 99:4084.

RICHARDSON M, WARNOCK DW. 2003. Fungal Infections - Diagnosis and Management. *Dermatophytosis*. 80-108.

SAMBROOK J, RUSSELL DW. 2001. Rapid isolation of yeast DNA Molecular Cloning. *A Laboratory Manual*. 6.31-6.32.

VAN BURIK JAH, SCHRECKHISE RW, WHITE TC, BOWDEN RA, MYERSON, D. 1998. Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. *Medical Mycology*. 36 (5): 299-303.

WEILAND JJ. 1997. Rapid procedure for the extraction of DNA from fungal spores and mycelia. *Fungal Genet News*. 44:60-63.

WEITZMAN I, SUMMERBELL RC. 1995. The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev*. 8 (2): 240-59.

WILLIAMSON EC, LEEMING JP, PALMER HM, STEWARD CG, WARNOCK D, MARKS DI, MILLAR MR. 2000. Diagnosis of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients by polymerase chain reaction. *Br J Haematol*. 108:132-139.

YAMADA Y, MAKIMURA K, MERHENDI H, UEDA K, NISHIYAMA Y, YAMAGUCHI H, OSUMI, M. (2002). Comparison of different methods for extraction of mitochondrial DNA from human pathogenic yeasts. *Jpn. J. Infect. Dis*. 55:122-125.

Avaliação de diferentes protocolos para a identificação de espécies de dermatófitos por PCR-RFLP.

Maria Zeli Moreira Frota^{*1}, Maria Cristina dos Santos², Débora Cristina de Lima Fernandes³, Daniel Lúcio Rodrigues Dutra⁴, Aya Sadahiro⁵, João Vicente Braga de Souza⁶

^{1,3} Laboratório de Micologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Manaus, Brasil

^{2,5} Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Brasil

⁴ Laboratório de Biologia Molecular, Fundação Alfredo da Mata, Manaus, Brasil

⁶ Laboratório de Micobacteriologia, Coordenação de Pesquisas em Ciências da Saúde, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brasil

Resumo

Os dermatófitos compreendem um grupo de fungos de grande interesse na área médica, devido à sua capacidade de parasitar os tecidos queratinizados do homem e animais, causando as dermatofitoses ou *tineas*, com ampla distribuição no mundo. Questões relacionadas aos aspectos epidemiológicos e clínicos das dermatofitoses reforçam a importância da identificação desses fungos em nível de espécie em rotina laboratorial. Os métodos convencionais de diagnóstico baseiam-se principalmente nas características morfológicas do fungo, e nem sempre permitem uma clara definição em nível de espécie. Dentre os vários métodos moleculares, a técnica de RLP-PCR tem se destacado, entretanto a maioria dos estudos realizados diverge quanto às suas estratégias metodológicas. No presente estudo diferentes métodos foram avaliados para a identificação de espécies de dermatófitos por PCR-RFLP tendo como alvos a região ITS/DNAr e o gene da Topoisomerase II, incluindo três protocolos de PCR e três enzimas de restrição (*DdeI*, *HinfI*, *HaeIII*). Nossos resultados demonstraram que o gene da topoisomerase II é uma região alvo adequada para identificação de sete espécies de fungos dermatófitos frequentes no Brasil, reforçando estudos anteriores, e apontaram também para um novo protocolo de PCR-RFLP, que se baseia em uma PCR desse gene utilizando o primer dPSD2, seguido da digestão dos produtos obtidos com a enzima de restrição *HaeIII*.

Introdução

Os dermatófitos destacam-se dos demais fungos patogênicos pela sua capacidade em absorver nutrientes a partir da queratina derivada da epiderme, podendo por isso causar infecções na pele, pelos e unhas, denominadas de dermatofitoses ou *tineas*. Estas manifestam-se com quadros clínicos variados, diferindo em seu aspecto e tipo evolutivo (crônico ou agudo) conforme a espécie envolvida; a localização anatômica da lesão, e de fatores ainda pouco

esclarecidos na inter-relação dermatófito-hospedeiro [1, 2]. As dermatofitoses representam uma das principais infecções humanas em todo o mundo, constituindo-se em um problema de saúde pública, com implicações clínicas e até mesmo sócio-econômicas. A exemplo, a *tinea pedis* e a *tinea ungueum* que geralmente evoluem com quadros crônicos, recidivantes ou refratários ao tratamento, além do problema estético ocasionado pela deformidade das unhas. [3, 4, 5].

O diagnóstico laboratorial com a identificação específica dos dermatófitos tem grande importância do ponto de vista epidemiológico e clínico. Suas espécies estão inseridas nos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, e a distribuição das mesmas nas diferentes regiões do mundo, é influenciada por uma série de fatores ambientais e sócio-culturais [5, 6]. No aspecto clínico, podem estar associadas a determinado quadro de manifestações e tipo evolutivo, apresentando predileções quanto ao local anatômico afetado e grande especificidade quanto à sua capacidade invasora. [7, 8]. A identificação da espécie é feita por meio do exame de cultura, com base nas análises morfológicas da colônia, e quando necessário, de provas bioquímicas. Este exame é considerado laborioso, de baixa sensibilidade, e requer boa experiência do laboratorista, além do tempo relativamente longo para o laudo. Vários fatores podem comprometer a qualidade deste exame, tais como, o pleomorfismo; as variações fenotípicas de uma mesma espécie, e, o crescimento concomitante de fungos contaminantes [9, 10, 11, 12, 13].

Os métodos de genotipagem representam uma alternativa promissora para a implantação de um sistema rápido e de alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico das dermatofitoses. Diferentes métodos têm sido utilizados nos últimos anos para a diferenciação desses fungos, tais como, análise por sequenciamento do DNA mitocondrial [14]; amplificação randômica do DNA polimórfico (RAPD) [15, 16]; AP-PCR [17]; PCR fingerprinting [18, 19]; análise por sequenciamento e de polimorfismos de fragmentos de

restrição (PCR-RFLP) [20, 21, 22, 23, 24]; sequenciamento de genes codificadores de quitina sintase [25] e superóxido dismutase [26].

A técnica da PCR-RFLP tem sido empregada em vários estudos destacando-se pela sua praticidade, rapidez e eficiência, contudo, são muitas as variações metodológicas encontradas na literatura, especialmente na escolha dos primers, das enzimas de restrição e até mesmo da região alvo. Basicamente, polimorfismos nos genes do DNAr e da região espaçadora interna transcrita (ITS), têm sido o principal alvo utilizado [13, 20, 21, 27, 28, 29]. Alguns autores, no entanto, têm analisado polimorfismos no gene da topoisomerase II como estratégia para a diferenciação inter-específica de dermatófitos por esta técnica [22, 23, 24].

A falta de um método padrão e de estudos mais abrangentes com relação ao número de espécies analisadas reforça a necessidade de novos estudos, sobretudo, levando em consideração a aplicabilidade da metodologia para a identificação das espécies mais freqüentemente isoladas em cada região ou país, haja vista as diferenças epidemiológicas existentes.

Diante disto, o presente estudo teve como objetivo principal avaliar diferentes protocolos para diferenciação das principais espécies de dermatófitos patogênicos por meio da técnica de PCR-RFLP.

Materiais e Métodos

Linhagens padrão: Para a avaliação dos diferentes protocolos de PCR-RFLP foram utilizadas cepas de referência, um total de sete isolados fúngicos, pertencentes às espécies *Trichophyton mentagrophytes* (FUAM-TM165), *T. rubrum* (FUAM-TR007), *T. violaceum* (FUAM-TV046), *T. tonsurans* (FUAM-TT086), *Microsporum canis* (FUAM-MC084), *Microsporum gypseum* (FUAM-MG082) e *Epidermophyton floccosum* (FUAM-EF197). Estas linhagens pertencem à coleção de fungos do Laboratório de Micologia da Fundação de

Dermatologia Tropical “Alfredo da Matta” na cidade de Manaus-AM, tendo sido identificadas por métodos de fenotipagem e por meio da análise das seqüências da região ITS1 do DNAr [30] utilizando o equipamento Seq3130 Genetic Analyser (Applied Biosystem) .

Isolados: Os ensaios de seleção de uma metodologia de PCR-RFLP adequada foram realizados com as linhagens padrão. A validação da metodologia selecionada foi realizada com um total de 65 dermatófitos isolados de pacientes atendidos no Laboratório de Micologia da Fundação de Dermatologia Tropical “Alfredo da Matta.”

Preparo dos isolados para extração de DNA: Os isolados fúngicos foram repicados em meio de cultura ágar batata com dextrose, contido em tubo de ensaio, e mantidos em temperatura ambiente por um período entre 04 a 07 dias de crescimento, até a obtenção de uma colônia de aproximadamente 1cm de diâmetro. Após o período de incubação foram transferidos 100 mg de micélio para microtubos de 2,0 mL, os quais foram submetidos à extração do DNA.

Extração de DNA: Para a ruptura mecânica do micélio foi realizada a agitação vigorosa do mesmo com pérolas de vidro (0,1 a 0,5 mm de diâmetro) em tampão de lise (Tris-HCl 150mM, NaCl 2M, DTAB 12%, EDTA 30mM); incubou-se a mistura a 72°C por 15 min; em seguida foi feita a desproteinização com clorofórmio em igual volume; após centrifugação por 5 min foi adicionado ao sobrenadante 1mL CTAB 0,5% (CTAB 0,5%, NaCl 0,3M) para a precipitação do DNA, e em seguida foi realizada nova centrifugação a 5 min e o pellet foi ressuspenso em 300 µL de NaCl 1,2M. Posteriormente o DNA foi precipitado em 750 mL de etanol absoluto gelado, e lavado 2x com etanol a 70%. Após a secagem do mesmo, o DNA foi diluído em tampão TE (100µL). O rendimento e o grau de pureza dos DNAs extraídos foram mensurados por meio de análise espectrofotométrica, com base na leitura em comprimentos

de onda de 260 e 280 nm e na Razão A260/280, utilizando o equipamento UV/VISDrop ASP3700 Spectrophotometer (Advanced Technology & Industrial Co., LTD).

Seleção de protocolo de PCR: Foram avaliadas três metodologias de PCR previamente descritas, para amplificar o DNA das linhagens referência, conforme detalhado na Tabela 1.

Região/Primer/Produto esperado	Reagentes	Ciclos
Região ITS - Irobi et al. [27] ITS5: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' NL4: 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3' Produto: aproximadamente 1600 pb	-Volume final: 25 µL, -dNTPs: 200µM -MgCl ₂ :1,5mM -Primers: 0,5 µM -Taq Polimerase: 2,5U -DNA :50 ng	-Desnaturação inicial a 95°C por 5 min -35 ciclos: 95°C por 1 min; 55°C por 1 min e 72°C por 2min; -Extensão final: 72°C por 10 min.
Região ITS - Jackson et al. [20] ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' Produto: aproximadamente 700 pb	-Volume final: 25 µL, -dNTPs: 200µM -MgCl ₂ :1,5mM -Primers: 0,5 µM -Taq Polimerase: 2,5U -DNA :50 ng	-Desnaturação inicial a 95°C por 5 min -35 ciclos: 95°C por 1 min; 55°C por 1 min e 72°C por 2min; -Extensão final: 72°C por 10 min.
Região da topoisomerase- Kamiya et al. [23] dDPF2: 5'-GTYTGGAAYAAAYGGYCGYGGTAT TCC-3' dDPR2: 5'-RAAVCCGCGGAACCAKGGCTTCAT KGG-3' Produto: aproximadamente 2380 pb	-Volume final: 25 µL, -dNTPs: 200µM -MgCl ₂ :1,5mM -Primers: 0,5 µM -Taq Polimerase: 2,5U -DNA :50 ng	-Desnaturação inicial a 94°C por 5 min -45 ciclos: 94°C por 1 min; 63°C por 1 min e 72°C por 2min; -Extensão final: 72°C por 10 min.

Tabela 1. Protocolos de PCR utilizados para amplificação da região ITS/DNAr e do gene da topoisomerase II

Seleção de enzima de restrição para PCR-RFLP: Para a digestão dos produtos amplificados foram testadas separadamente três enzimas de restrição: *DdeI*, *HinfI* e *HaeIII*. Para isto foram utilizados 8U de enzima de restrição e a digestão ocorreu por 03 horas a 37°C.

Eletroforese: Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 2,5% acrescido de SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) sob luz UV.

Avaliação da reprodutibilidade, especificidade e sensibilidade da PCR-RFLP: O método que apresentou a melhor capacidade discriminatória entre as sete espécies analisadas foi posteriormente utilizado para a identificação de 65 isolados de dermatófitos, no intuito de se avaliar a reprodutibilidade e a resolutividade do método. Para a avaliação da sensibilidade da PCR, diluições seriadas do DNA da cepa de *Trichophyton rubrum*/TR007-FUAM foram submetidas à reação de amplificação e à análise por eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

Resultados

A região ITS/DNAr foi amplificada com êxito nas sete espécies utilizando ambos os pares de primers. Os produtos gerados com os primers ITS5 e NL4 foram de aproximadamente 1600pb, enquanto que os primers ITS1 e ITS4 geraram produtos de aproximadamente 700 pb. Os produtos amplificados foram de tamanhos equivalentes para as sete espécies, com variações pequenas em ambos os casos, não permitindo distinção segura entre os gêneros ou espécies (Figuras 1a e 1b). A PCR da região da topoisomerase II utilizando os primers dPsD2 gerou produtos de aproximadamente 2300 pb para todas as espécies (Figura 1c).

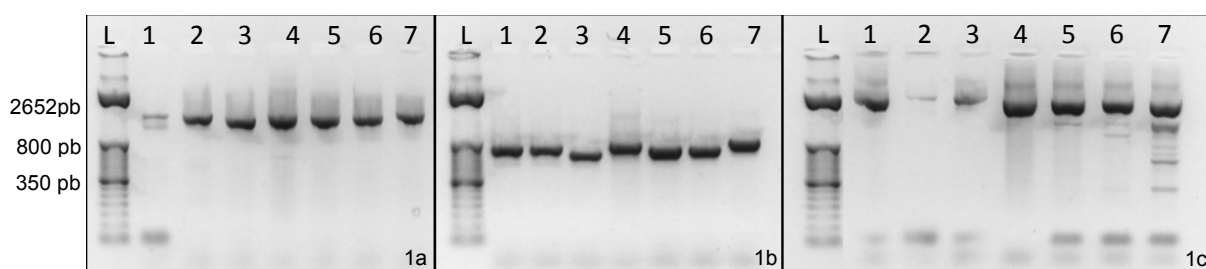


Figura 1. Produtos de PCR da região ITS de sete cepas de dermatófitos obtidos com os primers ITS5 e NL4 (1a) e ITS1 e ITS4 (1b); produtos de PCR do gene da topoisomerase obtidos com os primers dPsD2 (1c). L: Ladder 50pb; 1: *T. rubrum* (TR007/FUAM); 2: *T. violaceum* (TV046/FUAM); 3: *M. gypseum* (MG082/FUAM); 4: *M. canis* (MC084/FUAM); 5: *T. tonsurans* (TT086/FUAM); 6: *T. mentagrophytes* (TM165/FUAM); 7: *E. floccosum* (EF197/FUAM).

Os produtos amplificados da região ITS utilizando os primers ITS5 e NL4 apresentaram poucos sítios de restrição para as três enzimas, revelando no total apenas três ou quatro padrões de RFLP para as sete espécies (Figura 2). A digestão desses produtos com a enzima *DdeI*, produziu perfis únicos para as espécies do complexo *T. rubrum*/*T. violaceum*, para *M. canis* e *M. gypseum*, porém os perfis de *T. mentagrophytes* e *T. tonsurans* foram

idênticos e com pouca diferença do *E. floccosum* (Figura 2a). A enzima *HinfI* gerou perfis únicos para as duas espécies do gênero *Microsporum* e para *E. floccosum*, porém falhou na diferenciação entre as espécies do gênero *Trichophyton* (Figura 2b). Na digestão com a enzima *HaeIII* apenas o *M.gypseum* teve um padrão exclusivo (Figura 2c). Os produtos amplificados com os primers ITS1 e ITS4 apresentaram um número ainda menor de sítios de restrição para as três enzimas (de dois a três), porém o desempenho de cada uma das enzimas na obtenção dos padrões de RFLP foi semelhante ao que foi observado com os produtos amplificados com os primers ITS5 e NL4 (Figuras 3a, 3b e 3c). O gene da topoisomerase II apresentou maior número de sítios de restrição em relação à região ITS, entre quatro a oito sítios para as três enzimas. Os perfis de RFLP gerados pela enzima *DdeI* foram únicos para a maioria das espécies com exceção do *T. mentagrophytes* e *T. tonsurans* (Figura 4a). As digestões utilizando *HinfI* e *HaeIII* produziram perfis de RFLP exclusivos para cada espécie analisada, entretanto, a enzima *HaeIII* produziu perfis mais diferenciados entre todas as espécies, em comparação com a *HinfI*; com esta última, a diferenciação entre *T. tonsurans* e *T. mentagrophytes* se deu mais claramente por apenas um fragmento de restrição (Figuras 4b e 4c). Portanto, verificou-se que o método de PCR-RFLP a partir da amplificação direta do gene da topoisomerase II seguido da digestão com a enzima *HaeIII* teve o melhor desempenho para a distinção das espécies de dermatófitos, tendo sido este o protocolo de escolha para a genotipagem dos 65 isolados clínicos de dermatófitos.

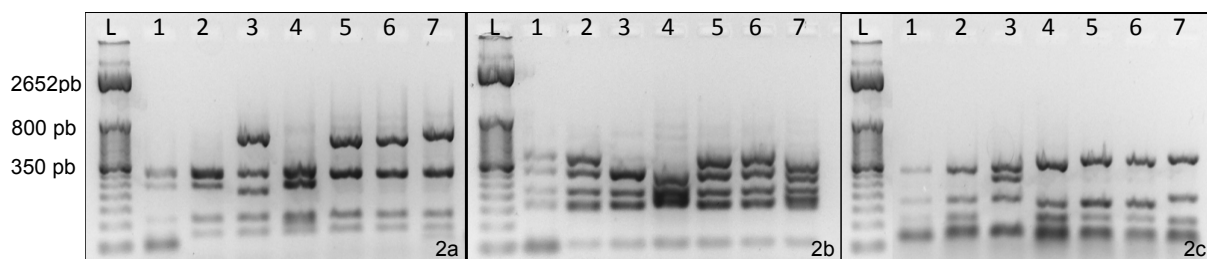


Figura 2. PCR-RFLPda região ITS/DNAr das sete cepas de dermatófitos obtidos com os primers ITS5 e NL4 e digeridos com *DdeI* (2a); *HinfI* (2b) e *HaeIII* (2c)

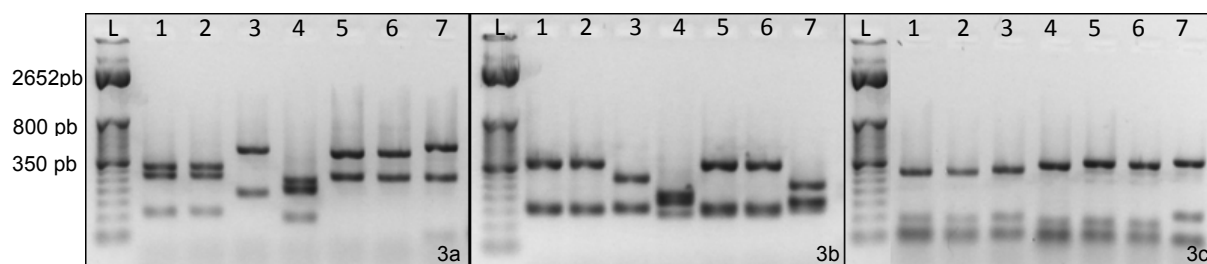


Figura 3. RFLP dos produtos de PCR da região ITS das sete cepas de dermatófitos obtidos com os primers ITS1 e ITS4 e digeridos com *DdeI* (3a); *HinfI* (3b) e *HaeIII* (3c).

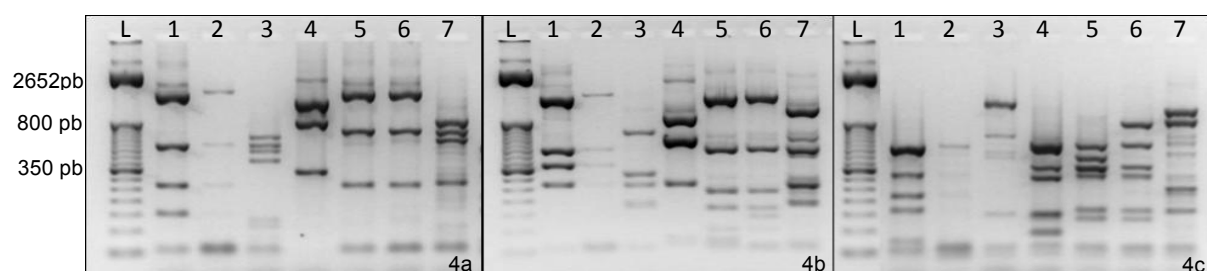


Figura 4. PCR-RFLPda região da topoisomerase II das sete cepas de dermatófitos obtidos com os primers dPsD e digeridos com *DdeI* (4a); *HinfI* (4b) e *HaeIII* (4c). L: Ladder 50pb; 1: *T. rubrum* (TR007/FUAM); 2: *T. violaceum* (TV046/FUAM); 3: *M. gypseum* (MG082/FUAM); 4: *M. canis* (MC084/FUAM); 5: *T. tonsurans* (TT086/FUAM); 6: *T. mentagrophytes* (TM165/FUAM); 7: *E. floccosum* (EF197/FUAM).

Na comparação entre os resultados da genotipagem e da fenotipagem dos 65 isolados clínicos verificou-se concordância entre os mesmos. Dois isolados, correspondendo a uma colônia atípica de *T. mentagrophytes* e uma colônia pleomorfisada de *T. rubrum*, que não puderam ser identificadas pelos métodos clássicos, foram genotipadas com sucesso.

A sensibilidade da PCR do gene da topoisomerase II foi de 0,7ng/μL, conforme verificado após análises de diferentes concentrações de DNA da cepa de *T. rubrum* (TR007-FUAM) (Figura 5).

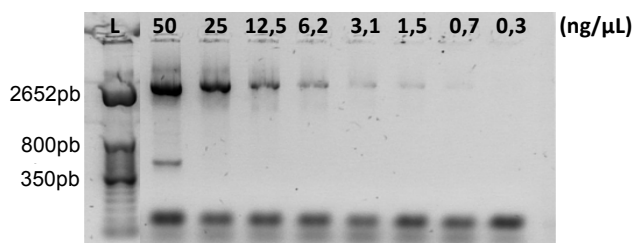


Figura 5. Produtos amplificados do gene da topoisomerase II obtidos com diferentes concentrações de DNA de *T. rubrum* (TR007/FUAM).

Discussão

Diante da grande variabilidade clínica e epidemiológica associada aos agentes das dermatofitoses, a correta identificação da espécie se reveste de grande importância, em especial considerando os quadros de evolução crônica e recidivantes, causados geralmente pelas espécies antropofílicas, muito comuns entre indivíduos adultos. A grande dificuldade terapêutica, obrigando a esquemas prolongados com drogas antifúngicas, bem como seus custos e efeitos colaterais são outras implicações comumente associadas às dermatofitoses causadas por essas espécies [5, 6, 8].

A identificação da espécie é feita por meio do exame de cultura o qual se baseia nas características morfológicas da colônia, entretanto, diversos fatores podem prejudicar a qualidade deste exame e até mesmo inviabilizar a identificação do fungo. A perda da capacidade de esporulação da colônia com o desenvolvimento de colônias atípicas (pleomorfismo), a variabilidade fenotípica intra-específica, e o crescimento associado de fungos contaminantes são os principais problemas enfrentados. Além disso, o tempo necessário para o pleno desenvolvimento da colônia é de aproximadamente 10 a 15 dias [9, 10, 11].

Diversas técnicas para a genotipagem de fungos dermatófitos tem sido propostas por diferentes autores para diferenciação das espécies dermatofíticas, algumas das quais com grande potencial para implantação na rotina laboratorial, como por exemplo, a técnica de

PCR-RFLP. Contudo, a falta de um método padrão ou de consenso para a tipagem de dermatófitos, revela a necessidade de novos estudos que visem a comparação de diferentes protocolos e de estratégias metodológicas, bem como a aplicabilidade da metodologia em rotina laboratorial

No presente estudo sete cepas de dermatófitos representando as sete principais espécies isoladas em um ambulatório de dermatologia tropical na cidade de Manaus-Amazonas/Brasil foram submetidas a testes de tipagem molecular utilizando diferentes protocolos da técnica de PCR-RFLP, nos quais foram avaliadas duas regiões alvo, a região ITS/DNAr e o gene da topoisomerase II. Para a digestão dos produtos amplificados dessas regiões foram testadas três endonucleases: DdeI, *HinfI* e *HaeIII*. Os resultados obtidos revelaram que o gene da topoisomerase II apresentou maior número de sítios de reconhecimento para todas as enzimas testadas, e que a digestão com *HaeII* permitiu a obtenção de perfis únicos e claramente distintos para cada espécie analisada (Figura 4).

O gene da topoisomerase II foi originalmente indicado como um alvo apropriado para a identificação de espécies de dermatófitos por um grupo de pesquisadores que fizeram o seqüenciamento desse gene e a construção de diferentes primers específicos [22, 23]. O sistema de identificação proposto por esses autores baseou-se nas técnicas de PCR e de PCR-RFLP, em que as amostras de DNA foram primeiramente amplificadas utilizando um mix de três primers (dPsD1), comuns para dermatófitos, e os produtos gerados, com 3.390 pb, foram utilizados como DNA molde para a subsequente nested PCR utilizando separadamente os mixes de primers PsT, PsME (com 4 pares de primers cada um) e o par de primers dPsD2 (dDPF2 e dDPR2), todos desenhados para amplificar dentro da região amplificada com dPsD1. De acordo com os autores, a nPCR com PsT produziu produtos específicos para *T. rubrum*, enquanto que PsME produziu produtos específicos para *M. gypseum*, *M. canis* e *E. floccosum*. Os produtos obtidos com dPsD2 foram digeridos testando-se três enzimas de

restrição: *HincI*, *HinfI*, *AflIII* e *PfIMI*, sendo que a enzima *HinfI* produziu perfis distintos para as seis espécies analisadas, destacando os próprios autores que a diferenciação entre *T. mentagrophytes* e *T. tonsurans* se deu por apenas um fragmento de restrição.

Nossos resultados confirmaram que o gene da topoisomerase II é uma região alvo adequada para a diferenciação de dermatófitos em nível de espécie, e que a técnica de PCR-RFLP com a amplificação direta desse gene utilizando o par de primer dPsD2 seguida da digestão dos produtos com a enzima *HaeIII*, é uma ferramenta com grande potencial para uso em rotina laboratorial, dada a sua rapidez, estabilidade reprodutibilidade e alta resolutividade.

Referências

1. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heinz-vaccari EM, Melo NT. Tratado de Micologia Médica. 9a Ed. São Paulo: Sarvier; 2002.
2. Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. Clin Microbiol Rev. 1995; 8:240–59.
3. Scherer WP, Scherer MD. A comparison of results from two mycology laboratories for the diagnosis of onychomycosis: A study of 85 cases in a geriatric population. J Am Podiatr Med Assoc. 2004; 94:528–34.
4. Pierard GE, Pierard-Franchimont C. The nail under fungal siege in patients with type II diabetes mellitus. Mycoses. 2005; 48:339–42.
5. Seebacher C, Bouchara JP, Mignon B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. Mycopathologia. 2008; 166:335–52.
6. Havlickova B, Viktor A, Zaika C, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. Mycoses. 2008; 51:2–15.
7. Abdel-Rahman SM, Talib N, Solidar A. Examining Trichophyton tonsurans genotype and biochemical phenotype as determinants of disease severity in tinea capitis. Med Mycol. 2008; 46:217–23.
8. Gokulshankar S, Ranjitsingh A, Venkatesan G, Ranjith MS, Vijayalakshmi GS, Prabhamanju M, Subashini S. Is moderation of protease production an adaptation of well-defined anthropization in dermatophytes. Indian J Pathol Microbiol. 2010; 53:87–92.
9. Mohanty JC, Mohanty SK, Sahoo RC, Sahoo A, Prahara S. Diagnosis of superficial mycoses by direct microscopy: A statistical evaluation. Indian J. Dermatol Venereol Leprol. 1999; 65:72–4.

10. Scherer WP, Scherer MD. A comparison of results from two mycology laboratories for the diagnosis of onychomycosis: A study of 85 cases in a geriatric population. *J Am Podiatr Med Assoc.* 2004; 94:528–34.
11. Summerbell RC, Cooper E, Bunn U, Francis J, Gupta AK. Onychomycosis: a critical study of techniques and criteria for confirming the etiologic significance of nondermatophytes. *Med Mycol.* 2005; 43:39–59.
12. Dabrowska BA, Saunte MD, Arendrup CM. Five hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of *Trichophyton rubrum*. *J of clin microbiol.* 2007; 45:1200–04.
13. Bontems O, Hauser PM, Monod M. Evaluation of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay for dermatophyte and nondermatophyte identification in onychomycosis. *British J of Dermatology.* 2009;161:791–96.
14. Tambor JH, Guedes RF, Nobrega MP, Nobrega FG. The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of the dermatophyte fungus *Epidermophyton floccosum*. *Curr Genet.* 2006; 49:302–8.
15. Liu D, Coloe S, Baird R, Pedersen J. Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi. *J. Med. Microbiol.* 2000; 49:493–97.
16. Baeza LC, Matsumoto MT, Almeida AM, Mendes-Giannini MJ. Strain differentiation of *Trichophyton rubrum* by randomly amplified polymorphic DNA and analysis of rDNA nontranscribed spacer. *J Med Microbiol.* 2006; 55:429–36, 2006.
17. Liu D, Coloe S, Baird R, Pedersen J. PCR identification of *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* and *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* dermatophytes with a random primer. *J. Med. Microbiol.* 1997; 46:1043–46.
18. Faggi E, Pini G, Campisi E, Bertellini G, Difonzo E, Mancianti F. Application of PCR to Distinguish Common Species of Dermatophytes. *J of clin microbiol.* 2001; 39:3382–85.
19. Pounder JI, Williams S, Hansen D, Healy M, Reece K, Woods GL. Repetitive-sequence-PCR-based DNA fingerprinting using the Diversilab system for identification of commonly encountered dermatophytes. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:2141–47.
20. Jackson CJ, Barton RC, Kelly SL, Evans EG. Species Identification and Strain Differentiation of Dermatophyte Fungi by Analysis of Ribosomal-DNA Intergenic Spacer Regions. *J of Clin Microbiol.* 1999; 931–36.
21. De Baere T, Summerbell R, Theelen B, Boekhout T, Vaneechoutte M. Evaluation of internal transcribed spacer 2-RFLP analysis for the identification of dermatophytes. *J Med Microbiol.* 2010; 59:48–54.
22. Kanbe T, Suzuki Y, Kamiya A, Mochizuki T, Fujihiro M, Kikuchi, A. PCR-based identification of common dermatophyte species using primer sets specific for the DNA topoisomerase II genes. *J Dermatol Sci.* 2003; 32:151–61.

23. Kamiya A, Kikuchi A, Tomita Y, Kanbe T. PCR and PCR—RFLP techniques targeting the DNA topoisomerase II gene for rapid clinical diagnosis of the etiologic agent of dermatophytosis. *J of Dermatol Sci.* 2004; 34:35–48
24. Galin HE, Jiawen LI, Ding J, Tan Z. Identification of common species of dermatophytes by PCR-RFLP. *J of Huazhong Univ of Sci and Technol.* 2005; 25:458–60.
25. Kano R, Okabayashi K, Nakamura Y. Differences among chitin synthase 1 gene sequences in *Trichophyton rubrum* and *T. violaceum*. *Med. Mycol.*, 2000; **38**: 47-50.
26. Fréalle E, Rodrigue M, Gantois N, Aliouat CM, Delaporte E, Camus D, Dei-Cas E, Kauffmann-Lacroix C, Guillot J, Delhaes L. Phylogenetic analysis of *Trichophyton mentagrophytes* human and animal isolates base donn MnSOD and ITS sequence comparison. *Microbiology.* 2007; 153:3466–77.
27. Irobi J, Schoofs A, Goossens H. Genetic identification of *Candida* species in HIV-positive patients using the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of its DNA. *Molecular and Cellular Probes.* 1999; 13:401–6.
28. Dobrowolska A, Staczek P, Kaszuba A, Kozłowska M. PCR—RFLP analysis of the dermatophytes isolated from patients in Central Poland. *J of Dermatol Sci.* 2006; 42: 71–74.
29. Bagyalakshmi R, Senthilvelan B, Therese KL, Murugusundram S, Madhavan HN. Application of polymerase chain reaction (PCR) and PCR based restriction fragment length polymorphism for detection and identification of dermatophytes from dermatological specimens. *Indian J Dermatol.* 2008; 53:15–20.
30. Makimura K., T. Mochizuki, A. Hasagawa, K. Uchida, and H. Yamaguchi. Phylogenetic classification of *Trichophyton mentagrophytes* complex strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *J. Clin. Microbiol.* 1998;36:2629–2633.

Aplicação de uma PCR-RFLP, que tem o gene da topoisomerase II como alvo, para a identificação de agentes de dermatofitoses em espécimes clínicos.

Maria Zeli Moreira Frota^{*1}, João Vicente Braga de Souza², Débora Cristina de Lima Fernandes³, Daniel Lúcio Rodrigues Dutra⁴, Aya Sadahiro⁵, Maria Cristina dos Santos⁶

^{1,3} Laboratório de Micologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil

² Laboratório de Micobacteriologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brasil

⁴ Laboratório de Biologia Molecular, Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia “Alfredo da Mata”, Manaus, Brasil

^{5,6} Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil

Resumo

Os dermatófitos compreendem um grupo especializado de fungos capazes de parasitar os tecidos queratinizados da pele, pelos e unhas, causando as dermatofitoses, as quais estão entre as infecções humanas mais comuns em todo o mundo. Diferenças podem ser observadas entre as espécies dermatofíticas quanto ao seu potencial de virulência, localização anatômica geralmente infectada e resposta à terapêutica, além das diferenças epidemiológicas encontradas. Na prática clínica é importante a identificação do agente etiológico em nível da espécie, contudo, vários fatores dificultam a qualidade e a eficiência dos exames convencionais de diagnóstico. Diferentes técnicas moleculares têm sido propostas destacando-se a PCR-RFLP, pela reprodutibilidade, facilidade de execução e baixo custo. No presente estudo foi realizada uma avaliação preliminar da aplicabilidade de um método de PCR-RFLP para a identificação de espécies de dermatófitos diretamente de raspados de lesões de pele, unhas e couro cabeludo, obtidos de pacientes com dermatoses, atendidos em um serviço ambulatorial. Foi realizada a amplificação do gene da topoisomerase II utilizando o primer dPsD2 e, os produtos obtidos foram digeridos com a endonuclease *Hae*III. Apesar de preliminares nossos resultados apontam para uma nova ferramenta molecular com potencial para aplicação no diagnóstico molecular das dermatofitoses diretamente de espécimes clínicos.

Introdução

As dermatofitoses, também designadas de *tineas*, são infecções humanas de elevada prevalência em todo o mundo, acometendo a pele, pêlos e unhas. Com quadros clínicos bastante diversificados, podem acometer pessoas de todas as idades, gênero, classe social e econômica, representando um problema de saúde pública. São causadas por um grupo de fungos filamentosos queratinofílicos estritamente relacionados, denominados de dermatófitos, compreendendo os gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*.

Na prática clínica, o diagnóstico laboratorial das dermatofitoses com a definição específica do agente etiológico é de grande importância, haja vista as diferentes implicações

clínicas e terapêuticas associadas às espécies. Os quadros crônicos, com lesões recidivantes e de maior resistência à terapêutica, estão mais associados às espécies antropofílicas, enquanto que os quadros de evolução aguda, com maior processo inflamatório, resistência à reinfecções e de maior facilidade no tratamento, estão mais associados às espécies zoofílicas e geofílicas, (WAGNER; SOHNLE, 1995; ZAIAS; REBELL, 1996).

No entanto, o diagnóstico laboratorial das dermatofitoses não é oferecido na maioria dos laboratórios, público ou privado. É necessária equipe técnica experiente e devidamente habilitada para a realização dos exames micológicos, direto e de cultura, os quais se fundamentam nas características morfológicas do fungo. O exame direto é mais rápido e tem maior sensibilidade em comparação ao exame de cultura, porém, não permite a definição do agente fúngico. Este exame não permite sequer a confirmação se o agente é um dermatófito, visto que outros fungos filamentosos e hialinos, que podem ser agentes emergentes de dermatomicoses, produzem as mesmas estruturas parasitárias (SUMMERBELL et al., 2005; BONTEMS et al., 2009). O exame de cultura por sua vez, apesar de ser mais específico, tem baixa sensibilidade e é um exame demorado, levando no mínimo 15 dias. A sensibilidade deste exame, especialmente nos casos de *tinea ungueum* e *tinea pedis*, pode ser de apenas 50% ou até menos, em virtude de vários fatores, tais como, as variações fenotípicas de uma mesma espécie e o “pleomorfismo” (perda da capacidade de esporulação in vitro), que podem resultar em colônias macro e microscopicamente atípicas. Outro problema comum é o crescimento de fungos contaminantes, que não possibilita uma certeza quanto ao significado deste resultado, visto que alguns fungos filamentosos não dermatófitos (FFND) podem ser também agentes primários de dermatomicoses, ou apenas contaminantes secundários (GUPTA et al., 2001; SUMMERBELL et al., 2005; DOBROWOLSKA et al., 2006; MONOD et al., 2006; BONTEMS et al., 2009).

Neste cenário, diferentes técnicas moleculares têm sido propostas para a identificação de dermatófitos em nível de espécie. Os métodos fundamentados na técnica da PCR destacam-se pela maior simplicidade de execução e rapidez. A técnica de PCR-RFLP tem sido indicada por vários autores como uma valiosa ferramenta para a diferenciação das espécies dermatofíticas, tendo como alvos principais os genes do DNAr e as regiões espaçadoras internas transcritas (ITS1 e ITS2) (MOCHIZUKI et al., 2003; POUNDER et al., 2005; JACKSON et al., 1999; FREALLE et al., 2007; Bontems et al., 2009; Bagyalakshmi et al., 2008; De Baere et al., 2010). No entanto, muitos dos métodos descritos são complexos

demais para a implementação em rotina, e outros são muito limitados quanto à sua abrangência ou quanto à sua capacidade de discriminação.

Um método de PCR-RFLP utilizando como alvo o gene da topoisomerase II foi proposto por alguns autores para a diferenciação inter-específica de isolados de dermatófitos (KANBE et al., 2003; KAMIYA et al, 2004). Com base neste método, nós propomos em um estudo recente, um protocolo mais simplificado e com maior capacidade de discriminação entre sete espécies de dermatófitos (dados encaminhados para publicação). No presente estudo foi realizada uma avaliação preliminar da aplicabilidade desta metodologia para a identificação de dermatófitos a partir de espécimes clínicos obtidos de pacientes com dermatoses atendidos em um serviço de dermatologia tropical na cidade de Manaus-AM/Brasil.

Materiais e Métodos

Linhagens: Foram utilizadas como padrões sete linhagens pertencentes à coleção de fungos do serviço de Micologia da Fundação de Dermatologia Tropical “Alfredo da Matta” - Manaus-AM compreendendo: *Trichophyton mentagrophytes* (FUAM-TM165), *T. rubrum* (FUAM-TR007), *T. violaceum* (FUAM-TV046), *T. tonsurans* (FUAM-TT086), *Microsporum canis* (FUAM-MC084), *Microsporum gypseum* (FUAM-MG082) e *Epidermophyton floccosum* (FUAM-EF197). A identidade destas linhagens foi validada por sequenciamento da região ITS1 do DNAr (Makimura et al. 1998), utilizando o analisador automático Seq3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

Espécimes clínicos: Foi submetido aos ensaios moleculares um total de 37 espécimes clínicos obtidos prospectivamente, a partir da raspagem superficial de lesões de pacientes com dermatoses, encaminhados para a realização de exames micológicos de rotina na referida Fundação.

Exames micológicos convencionais: Os espécimes clínicos foram analisados por meio do exame direto e de cultura, conforme os procedimentos de rotina. O exame direto foi realizado por meio do clareamento com solução a 20% de hidróxido de potássio, seguido da análise microscópica para a visualização de possíveis estruturas fúngicas presentes na amostra; e para o exame de cultura, as amostras foram semeadas em Agar Sabouraud, adicionado de antibiótico (cloranfenicol), e Agar Micosel (Difco). As culturas foram mantidas em temperatura ambiente durante 15 dias, e quando positivas, repicadas em Agar Batata, a fim de

proporcionar melhores condições de crescimento e esporulação dos dermatófitos. Em seguida procederam-se os estudos macro e micromorfológicos para a definição de gênero e espécie.

Extração de DNA: Para a extração do DNA genômico das cepas de referência e dos espécimes clínicos, as amostras foram submetidas a uma etapa inicial de lise mecânica da parede celular por meio da agitação vigorosa com pérolas de vidro (0,1 a 0,5 mm de diâmetro) em tampão de lise (Tri-HCl 150mM, NaCl 2M, DTAB 12%, EDTA 30mM). Em seguida, o DNA foi purificado utilizando-se o método descrito por GUSTINCICH, et al (1991), conforme segue: incubou-se a mistura durante 15 min. a 72°C e em seguida foi feita a desproteinização com clorofórmio em igual volume; após centrifugação por 5 min foi adicionado ao sobrenadante 1mL CTAB 0,5% (CTAB 0,5%, NaCl 0,3M) para a precipitação do DNA; em seguida foi realizada nova centrifugação a 5 min. e o pellet foi ressuspensão em 300 µL de NaCl 1,2M. O DNA foi precipitado em 750 mL de etanol absoluto gelado e lavado 2x com etanol a 70%. Após a secagem o DNA foi diluído em 50 µL de tampão TE (Tris/HCl 40 mM pH 8,0 e EDTA 2 mM)

Avaliação da concentração, pureza e viabilidade para PCR do DNA obtido

A concentração do DNA genômico obtido das linhagens de referência foi verificada através de leitura em equipamento UV/VISDrop ASP3700 Spectrophotometer (Advanced Technology & Industrial Co., LTD) a um comprimento de onda de 260 nm, observando que uma unidade de absorbância correspondeu a 50 µg/ml. Foram realizadas também leituras em comprimento de onda 280 nm, para determinação do grau de pureza do DNA.

PCR do gene da topoisomerase II: Para a amplificação do gene da topoisomerase II foram utilizados os primers dDPF2 (GTYTGGAAYAAAYGGYCGYGGTATTCC) e dDPR2 (RAAVCCGCGGAACCAKGGCTTCATKGG) descritos por KANBE et al. (2003). A reação foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo solução tampão; 200µM de dNTPs; 1,5mM de MgCl₂; 0,5 µM de cada primer; 3U de Taq polymerase (Platinum Taq DNA polymerase/invitrogen) e 10µL da amostra de DNA dos espécimes clínicos ou 5 µL (50ng/µL) de DNA das cepas de dermatófitos. As condições da reação foram as seguintes: pré-aquecimento a 94°C por 5 min; hibridização a 94°C por 1 min; anelamento a 63°C por 1 min; extensão a 72°C por 2min (45 ciclos); e extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5% acrescido de Sybr Safe DNA Gel Stain

(invitrogen) sob luz UV. Considerou-se a amostra positiva para dermatófito quando um produto específico de 2.380 pb era revelado.

Digestão dos produtos amplificados: Os produtos específicos para dermatófitos, foram submetidos à digestão com 2U da enzima de restrição *HaeIII* a 37°C durante 3 horas, após a sua prévia purificação do gel utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean up System (Promega). Os perfis de RFLP obtidos foram analisados em gel de agarose a 2,5% acrescido de Sybr Safe DNA Gel Stain (invitrogen) sob luz UV.

Resultados

Das trinta e sete amostras analisadas pelos métodos convencionais de diagnóstico micológico, 64,8% foram negativas; 13,5% positivas para candidíase e em apenas 8,1% das amostras confirmou-se infecção por dermatófitos por meio do isolamento do agente em cultura. Nas demais amostras houve crescimento de fungos filamentosos não dermatófitos (FFND), sendo um isolado de *Fusarium sp.* e um *Scytalidium sp.*, ambos considerados agentes emergentes de onicomicoses, e três fungos contaminantes não esporulados sem possibilidade de identificação. Os casos com diagnóstico de candidíase eram de pacientes com onicomicoses em quirodáctilos; e os três casos de dermatofitoses confirmados pelo exame de cultura foram de *tinea capitis*, *tinea pedis* e *tinea corporis*; uma suspeita de *tinea ungueum* positiva no exame direto apresentou o crescimento de fungo filamentoso não dermatófito. O maior número de amostras negativas é devido ao atendimento de pacientes com outras dermatoses e que são encaminhados com frequência ao laboratório de micologia para a realização de diagnóstico diferencial.

Os ácidos nucleicos extraídos das sete linhagens de referência apresentaram concentrações entre 23 a 45 ng/μL e graus de pureza entre 1,7 e 1,9, e foram amplificados com êxito gerando produtos específicos de aproximadamente 2.380 pb. Os resultados da PCR dos DNAs extraídos dos espécimes clínicos estão demonstrados na figura 1. Três amostras

com exames micológicos positivos para dermatófitos (amostras 04, 20 e 22) revelaram produtos de aproximadamente 2.380pb, no entanto, produtos inespecíficos foram também revelados nessas mesmas amostras. Houve falha na amplificação de uma amostra (amostra 11), cujo resultado do exame de cultura revelou o crescimento de *Trichophyton mentagrophytes*. Em quatro amostras com exames micológicos positivos para *Candida* sp. (02, 07, 25 e 32) e em duas que apresentaram crescimento de fungos contaminantes (04 e 19) foram revelados produtos de PCR com tamanhos diferentes dos dermatófitos. Nenhum produto de PCR foi revelado nas amostras negativas e naquelas em que houve o crescimento de *Fusarium* sp. e *Scytalidium* sp (amostras 23 e 29) (Figura 1).

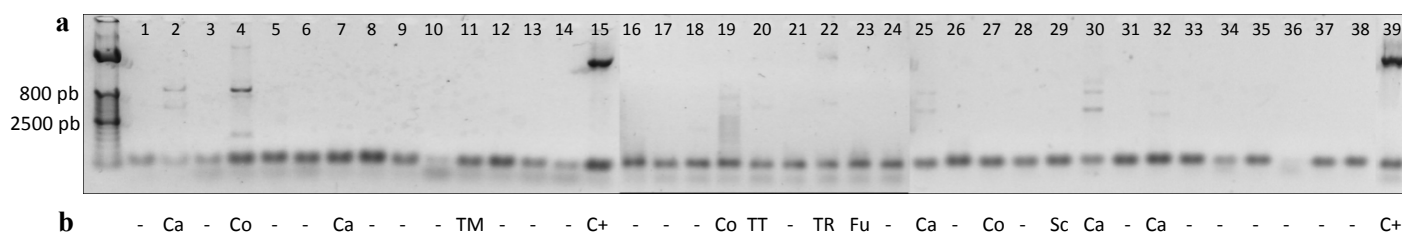


Figura 1. a: Reação de amplificação do gene da topoisomerase II de DNA de espécimes clínicos obtidos de pacientes com dermatoses encaminhados para a realização de exames micológicos. **b:** Resultados obtidos por meio dos exames micológicos dos espécimes clínicos. Ca=*Candida* sp.; Co=Fungo contaminante; TM= *Trichophyton mentagrophytes*; TR= *Trichophyton rubrum*; Fu=*Fusarium* sp; Sc=*Scytalidium* sp.; C+=Cepa de referência de *Trichophyton rubrum* (TR007-FUAM).

Os produtos amplificados de 2.380 pb revelados nas amostras 04, 20 e 22 foram purificados do gel de agarose utilizando kit comercial (Promega) e submetidos a uma re-amplificação nas mesmas condições da primeira reação de PCR. A digestão destes produtos com a endonuclease *Hae*III revelou perfis de RFLP de *T. tonsurans* na amostra 20 e de *T. rubrum* na amostra 22, concordando com os resultados obtidos nos exames de cultura. A amostra 04 não foi compatível com nenhuma das sete linhagens de referência e também não foi possível o isolamento deste dermatófito devido ao problema de contaminação no exame de cultura. Neste ensaio de RFLP a amostra 21 foi incluída como controle negativo (Figura 2).

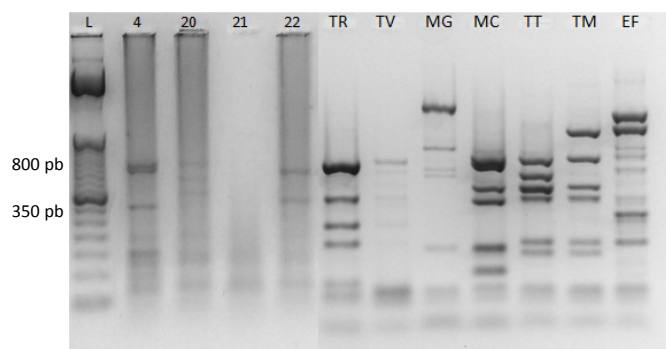


Figura 2. L= ladder 50pb; 4, 20 e 22= PCR-RFLP de produtos amplificados do gene da topoisomerase específicos para dermatófitos de espécimes clínicos após purificação do gel e reamplificação; 21= amostra negativa. Cepas padrão: TR=*T. rubrum*; TV: *T. violaceum*; MG= *M. gypseum*; MC= *M. canis*; TT= *T. tonsurans*; TM=*T. mentagrophytes*; EF= *E. floccosum*.

Discussão

A importância da definição específica do agente etiológico e as limitações dos exames micológicos convencionais têm despertado um crescente interesse na área do diagnóstico molecular das dermatofitoses, e considerável avanço já pode ser observado. Contudo, deflagra-se ainda a necessidade da busca de metodologias mais simplificadas, rápidas e com melhor capacidade de discriminação entre as principais espécies de dermatófitos, e preferencialmente, que sejam capazes de identificar o agente etiológico a partir do espécime clínico.

Neste estudo, apesar de preliminar, e do número reduzido de amostras analisadas, os resultados obtidos reforçam que o gene da topoisomerase II é uma região muito promissora para ser utilizada como alvo para a obtenção de perfis de RFLP espécie-específicos de dermatófitos, em concordância com os estudos de Kanbe et al (2003) e Kamiya et al (2004). Estes autores utilizaram PCR nested para a amplificação do gene da topoisomerase II de isolados de dermatófitos, e indicaram a endonuclease *HinfI* para a digestão dos produtos.

Em uma revisão recente na literatura científica não encontramos nenhum estudo utilizando a técnica de PCR-RFLP do gene da topoisomerase II para a identificação de dermatófitos em nível de espécie, a partir de espécimes clínicos. Bagyalakshmi et al. (2008) utilizaram duas técnicas de PCR-RFLP das regiões 18SDNAr e ITS para o diagnóstico

molecular de dermatofitoses a partir de raspados de lesões superficiais, segundo os autores ambos os métodos permitiram a identificação das três espécies de dermatófitos presentes nas amostras. A partir de amostras de raspados de unhas de pacientes com onicomicose, Bontems et al. (2009) estabeleceram uma metodologia de PCR-RFLP da região 28SDNAr para a identificação de *Trichophyton sp.* e FFND. De acordo com os autores, a utilização da técnica de PCR-RFLP em DNAs extraídos diretamente de espécimes clínicos permitiu definir se o FFND isolado em cultura era de fato o agente infeccioso da onicomicose e, discriminar a presença de *Trichophyton* e de contaminantes transitórios. Monod et al (2006) destacaram os métodos de PCR-sequenciamento e PCR-RFLP da região 28S para a identificação de agentes infecciosos em onicomicoses.

É importante considerar que um dos principais problemas ainda enfrentados para o diagnóstico molecular diretamente de espécimes clínicos é a concentração de DNA fúngico obtido na extração, a qual pode variar de acordo com a intensidade de parasitismo na amostra e o método de extração utilizado.

Em estudo recente, após a análise de diferentes métodos de PCR-RFLP para a diferenciação de sete espécies de dermatófitos, verificamos que o gene da topoisomerase II, em comparação com os genes do DNAr e regiões ITS, apresentou maior número de sítios de reconhecimento para as três endonucleases testadas, incluindo *DdeI*, *HinI* e *HaeIII*, sendo que, com esta última enzima, os perfis de RFLP foram diferenciados com maior clareza (dados encaminhados para publicação).

Dos trinta e sete espécimes clínicos analisados, a PCR-RFLP utilizando esta metodologia foi capaz de detectar e identificar três amostras positivas para dermatófitos e de gerar um perfil característico para as amostras de *Candida* e para FFND. O protocolo apresentado neste trabalho é inovador apontando para uma nova ferramenta molecular com

potencial para aplicação no diagnóstico molecular das dermatofitoses diretamente de espécimes clínicos.

Referências

1. Bagyalakshmi R, Senthilvelan B, Therese KL, Murugusundram S, Madhavan HN. Application of polymerase chain reaction (PCR) and PCR based restriction fragment length polymorphism for detection and identification of dermatophytes from dermatological specimens. *Indian J Dermatol*. 2008; 53:15–20.
2. Bontems O, Hauser PM, Monod M. Evaluation of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay for dermatophyte and nondermatophyte identification in onychomycosis. *British J of Dermatology*. 2009;161:791–96.
3. De Baere T, Summerbell R, Theelen B, Boekhout T, Vaneechoutte M. Evaluation of internal transcribed spacer 2-RFLP analysis for the identification of dermatophytes. *J Med Microbiol*. 2010; 59:48–54.
4. Dobrowolska A, Staczek P, Kaszuba A, Kozłowska M. PCR—RFLP analysis of the dermatophytes isolated from patients in Central Poland. *J of Dermatol Sci*. 2006; 42: 71–74.
5. Fréalle E, Rodrigue M, Gantois N, Aliouat CM, Delaporte E, Camus D, Dei-Cas E, Kauffmann-Lacroix C, Guillot J, Delhaes L. Phylogenetic analysis of *Trichophyton mentagrophytes* human and animal isolates base donn MnSOD and ITS sequence comparison. *Microbiology*. 2007; 153:3466–77.
6. Gupta AK, Cooper EA, Macdonald P, Summerbell RC. Utility of inoculum counting in the clinical diagnosis of onychomycosis caused by nondermatophytic filamentous fungi. *J Clin Microbiol*. 2001; 39:2115–21.
7. Gustincich S, Manfioletti G, Del Sal G, Schneider C, Carninci P. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques*. 1991; 11(3):298–302.
8. Jackson CJ, Barton RC, Kelly SL, Evans EG. Species Identification and Strain Differentiation of Dermatophyte Fungi by Analysis of Ribosomal-DNA Intergenic Spacer Regions. *J of Clin Microbiol*. 1999; 931–36.

9. Kanbe T, Suzuki Y, Kamiya A, Mochizuki T, Fujihiro M, Kikuchi, A. PCR-based identification of common dermatophyte species using primer sets specific for the DNA topoisomerase II genes. *J Dermatol Sci.* 2003; 32:151–61.

10. Kamiya A, Kikuchi A, Tomita Y, Kanbe T. PCR and PCR—RFLP techniques targeting the DNA topoisomerase II gene for rapid clinical diagnosis of the etiologic agent of dermatophytosis. *J of Dermatol Sci.* 2004; 34:35–48

11. Makimura K., T. Mochizuki, A. Hasagawa, K. Uchida, and H. Yamaguchi. Phylogenetic classification of *Trichophyton mentagrophytes* complex strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *J. Clin. Microbiol.* 1998;36:2629–2633

12. Monod M, Bontems O, Zaugg, C, Fast and reliable PCR / sequencing /RFLP assay for identification of fungi in onychomycoses. *J Med Microbiol.* 2006; 55:1211-16.

13. Pounder JI, Williams S, Hansen D, Healy M, Reece K, Woods GL. Repetitive-sequence-PCR-based DNA fingerprinting using the Diversilab system for identification of commonly encountered dermatophytes. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:2141–47.

14. Summerbell RC, Cooper E, Bunn U, Francis J, Gupta AK. Onychomycosis: a critical study of techniques and criteria for confirming the etiologic significance of nondermatophytes. *Med Mycol.* 2005; 43:39–59.

15. Wagner DK, Sohnle PG. Cutaneous defenses against Dermatophytes and yeasts. *Clin. Microbiol.* 1995; 8:317-35.

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

6. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, concluímos que:

6.1 Para a extração do DNA de fungos dermatófitos, a maceração do micélio mantido em diferentes condições de temperatura, e a agitação vigorosa do mesmo com pérolas de vidro, não demonstraram diferenças significativas entre si, em termos de rendimento e pureza do DNA obtido. No entanto, para a aplicação em rotina, considerando a importância dos critérios de produtividade; risco de contaminação, tempo, e facilidade de execução, a estratégia da agitação vigorosa em vortex com pérolas de vidro apresenta maiores vantagens.

6.2 Na etapa de separação do DNA, a comparação entre três protocolos, sendo um de separação em coluna de sílica utilizando kit comercial; um de separação por fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, e um de separação por sais e CTAB, não demonstrou diferenças significativas considerando a concentração e pureza do DNA obtido.

Quanto aos critérios operacionais este último protocolo demonstrou maior simplicidade metodológica em relação ao método convencional de fenol clorofórmio, sendo uma excelente alternativa para uso em rotina em substituição ao uso de kits comerciais.

6.3 O gene da topoisomerase II revelou-se uma região alvo adequada para a diferenciação de espécies de dermatófitos por meio da técnica de RFLP-PCR, em concordância com estudos anteriores. A amplificação direta desse gene com os primers dPsD2 e digestão com a endonuclease *HaeIII* para a identificação de sete espécies de dermatófitos, constitui-se em uma nova estratégia metodológica.

6.4 O novo método de PCR-RFLP do gene da topoisomerase II descrito no presente trabalho permitiu concordância com os métodos de fenotipagem após a análise molecular de sessenta e cinco isolados clínicos de dermatófitos, e foi capaz de identificar dois isolados sem possibilidade identificação pelos métodos convencionais.

6. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, concluímos que:

6.1 Para a extração do DNA de fungos dermatófitos, a maceração do micélio mantido em diferentes condições de temperatura, e a agitação vigorosa do mesmo com pérolas de vidro, não demonstraram diferenças significativas entre si, em termos de rendimento e pureza do DNA obtido. No entanto, para a aplicação em rotina, considerando a importância dos critérios de produtividade; risco de contaminação, tempo, e facilidade de execução, a estratégia da agitação vigorosa em vortex com pérolas de vidro apresenta maiores vantagens.

6.2 Na etapa de separação do DNA, a comparação entre três protocolos, sendo um de separação em coluna de sílica utilizando kit comercial; um de separação por fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, e um de separação por sais e CTAB, não demonstrou diferenças significativas considerando a concentração e pureza do DNA obtido.

Quanto aos critérios operacionais este último protocolo demonstrou maior simplicidade metodológica em relação ao método convencional de fenol clorofórmio, sendo uma excelente alternativa para uso em rotina em substituição ao uso de kits comerciais.

6.3 O gene da topoisomerase II revelou-se uma região alvo adequada para a diferenciação de espécies de dermatófitos por meio da técnica de RFLP-PCR, em concordância com estudos anteriores. A amplificação direta desse gene com os primers dPsD2 e digestão com a endonuclease *HaeIII* para a identificação de sete espécies de dermatófitos, constitui-se em uma nova estratégia metodológica.

6.4 O novo método de PCR-RFLP do gene da topoisomerase II descrito no presente trabalho permitiu concordância com os métodos de fenotipagem após a análise molecular de sessenta e cinco isolados clínicos de dermatófitos, e foi capaz de identificar dois isolados sem possibilidade identificação pelos métodos convencionais.

6.5 Os ensaios realizados para a identificação de dermatófitos a partir dos espécimes clínicos, apesar de preliminares, indicaram um potencial promissor do novo método de RFLP-PCR do gene da topoisomerase II para o diagnóstico molecular das dermatofitoses direto de amostras biológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. *Imunologia Celular e Molecular*. 6nd ed. Elsevier – Rio de Janeiro, 2008.

ABDEL-RAHMAN, S. M. Trichophyton tonsurans exocellular protease expression: correlation with clinical presentation in tinea capitis. **Clin Exp Dermatol**. v.27, p. 268-71, 2002.

ABDEL-RAHMAN, S. M.; TALIB, N.; SOLIDAR, A. Examining Trichophyton tonsurans genotype and biochemical phenotype as determinants of disease severity in tinea capitis. **Med Mycol**, v. 46, p.217-223, 2008.

AJELLO, L. Present day concepts in the dermatophytes. **Mycopathol. Mycol**. v. 17, p.315-324, 1962.

AJELLO, L. Milestones in the history of medical mycology: the dermatophytes, p. 3-11. In K. Iwata (ed.), Recent advances in medical and veterinary mycology. **University of Tokyo Press**, Tokyo, 1977.

ALJABRE, S. H. M.; RICHARDSON, M. D.; SCOTT, E. M.; SHANKLAND, G. S. Germination of Trichophyton mentagrophytes on human stratum corneum in vitro. **J Med Vet Mycol**. v.30, p.145-152, 1992.

APODACA, G.; MCKERROW, J. H. Regulation of Trichophyton rubrum proteolytic activity. **Infect Immun**. v.57, p.3081-90, 1998a.

ARENAS, R. *Tinea manuun*. Epidemiological and Mycological data ou 366 cases. **Gac. Med. Mex.**, v. 127, p. 435-8, 1991.

BARAN, R.; HAY, R.; HANEKE, E.; TOSTI, A. Onychomycosis: The Current Approach to Diagnosis and Therapy, 2nd ed. Abingdon, U.K.: Taylor and Francis, 2006.

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.

BAGYALAKSHMI R, SENTHILVELAN B, THERESE KL, et al. Application of polymerase chain reaction (PCR) and PCR based restriction fragment length polymorphism for detection and identification of dermatophytes from dermatological specimens. *Indian J Dermatol.*, 53:15–20, 2008.

BETTELLI, E.; CARRIER, Y.; GAO, W.; KORN, T.; STROM, T. B.; OUKKA, M.; WEINER, H. L.; KUCHROO, V. K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cells. **Nature**, v.441, p.235-238, 2006.

BIRREN, B. *Fungal Genome Initiative: A White Paper for Fungal Genomics*. July 10, 2004. Available at: <http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/fgi/July2004FGIWP.pdf>. Acesso em: 10 Set. 2010.

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.

BONTEMS, O.; HAUSER, P. M.; MONOD, M. Evaluation of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay for dermatophyte and nondermatophyte identification in onychomycosis. **British Journal of Dermatology**, v.161, p.791–796, 2009.

BORMAN, A. M.; LINTON, C. J.; CAMPBELL, M.; CK, S. J.; et al. Ultra-rápida preparação do DNA genômico total a partir de isolados de fungos filamentosos e leveduras utilizando Whatman FTA tecnologia de papel filtro - um DNA reutilizável sistema de arquivamento. **Med. Mycol.**, v.44, p. 389-398, 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.

CHABASSE, D. Les dermatophytes : d'où viennent-ils? Comment sont-ils devenus des parasites? Dermatophytes: Where do they come from? How did they turn to parasites? **Journal de Mycologie Médicale**, v.18, p.27-35, 2008.

CHENG, F. C.; JIANG, N. Extremamente rápido de extração de DNA de bactérias e leveduras. **Biotechnol.Lett.**, v.28, p.55-59, 2006.

CHMEL, L. Zoophilic dermatophytes and infections in man. **Med.Mycol.**, v.8, p.61-66, 1980.

COSTA, M.; PASSOS, X. S.; SOUZA, L. K. H. Epidemiologia e etiologia das dermatofitoses em Goiânia, GO, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 35(1): 19-22, jan-fev, 2002.

CLEMONS, K. V.; SCHAR, G.; STOVER, E. P.; et al. Dermatophyte-hormone relationships: Characterizations of progesterone binding specificity and growth inhibition in the genera *Trichophyton* and *Microsporum*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 26, p. 2110-15, 1988.

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.

CURRAH, R. S. Taxonomy of the Onygenales: Arthrodermataceae, Gymnoascaceae, Myccotrichaceae and Onygenaceae. **Mycotaxon.**, v.24, p.1-216, 1985.

DE BAERE, T.; SUMMERBELL, R.; THEELEN, B. Evaluation of internal transcribed spacer 2-RFLP analysis for the identification of dermatophytes. **J Med Microbiol.**, 59:48–54, 2010.

DEI CAS, E.; VERNES, A. Parasitic adaptation of pathogenic fungi to mammalian hosts. **CRC Crit Rev Microbiol.** v.13, p.173-218, 1986.

DENIS, C. M.; MAZARS, E.; GUYOT, K.; ODBERG-FERRAGUT, C.; VISCOGLIOSI, E.; DEI-CAS, E.; WAKEFIELD, A. E. Genetic divergence at the locus of six different formae speciales of *Pneumocystis carinii*. **Med Mycol.**, v.38, p.289-300, 2000.

DOBROWOLSKA, A.; STACZEK, P.; KASZUBA, A.; KOZŁOWSKA, M. PCR—RFLP analysis of the dermatophytes isolated from patients in Central Poland. **J of Dermatol Sci.** v.42, p. 71–74, 2006.

DUEK, L.; KAUFMAN, G.; ULMAN, Y.; BERDICEVSKY, I. The pathogenesis of dermatophyte infections in human skin sections. **J Infect.**, v.48, p.175-80, 2004.

ELEWSKI, B. E.; EL CHARIF, M.; COOPER, K. D.; GHANNOUM, M.; BIRBAUM, J. E. Reactivity to trichophytin antigen in patients with onychomycosis: effect of terbinafine. **J AM Acad Dermatol.**, v.46, n.3, p.371-5, 2002.

EL-NAGHY, M. A.; MAGHAZY, S. N.; FADL-ALLAH, E. M.; EL-GENDY, Z. K. Fungistatic action of natural oils and fatty acids on dermatophytic and saprophytic fungi. **Zentralbl Mikrobiol.**, v.147, p.214-220, 1992.

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.

FAGGI, E.; PINI, G.; CAMPISI, E.; BERTELLINI, G.; DIFONZO, E.; MANCIANTI, F. Application of PCR to Distinguish Common Species of Dermatophytes. **Journal of clinical microbiology.** p.3382-3385, 2001.

FAGGI E, PINI, G.; CAMPISI, E. Uso de esferas magnéticas para extrair DNA de fungos. **Micoses**, v.48, p.3-7, 2005.

FRÉALLE E, RODRIGUE M, GANTOIS N, et al. Phylogenetic analysis of *Trichophyton mentagrophytes* human and animal isolates base domn MnSOD and ITS sequence comparison. *Microbiolog*, 153:3466–77, 2007.

FREDRICKS, D. N.; SMITH, C.; MEIER, A. Comparação de seis métodos de extração de DNA para a recuperação de DNA de fungos, avaliada por PCR quantitativo. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, p.5122-5128, 2005.

FOSS, N. T.; POLON, D. P.; TAKADA, M. H.; FOSS-FREITAS, M. C. Dermatoses em pacientes com diabetes mellitus. **Rev. Saúde Pública**, v.39, n.4, 2005.

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.

FUJITA, S.; TEZUKA, M.; KAISE, A.; ITO, M. Simultaneous demonstrations of infecting fungi and DNA-synthesizing epithelialcells in the skin. **Mycoses**, v.36, p.267-269, 1993.

FULLER, C. L. Changing face of tinea capitis in Europe. **Infectious Diseases**, v.22, p.115-118, 2009.

GALIN, H. E.; JIAWEN, L. I.; DING, J.; TAN, Z. Identification of common species of dermatophytes by PCR-RFLP. **Journal of Huazhong University of Science and Technology**, v.25, n.4, p. 458-460, 2005.

GEORG, L. K. Epidemiology of the dermatophytoses: sources of infection, modes of transmission and epidemicity. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 1960; v.89, p.69-77, 1960.

GEORG, L. K. Ecology and diagnostic problems of fungal zoonoses. **Ind. Med. Surg.**, v.33, p.308-10, 1964.

GINTER-HANSELMAYER, G.; WEGER, W.; ILKIT, M.; SMOLLE, J. Epidemiology of tinea capitis in Europe: current state and changing patterns. **Mycoses**, v.50 (Suppl 2), p.6-13, 2007.

GRAPPEL, S. F.; BISHOP, C. T.; BLANK, F. Immunology of dermatophytes and dermatophytosis. **Bacteriol. Rev.**, v.38, p. 222-50, 1974.

GRASER, Y.; SCOTT, J.; SUMMERBELL, R. The New Species Concept in Dermatophytes-a Polyphasic Approach. **Mycopathologia**, v.166, p.239-256, 2008.

GOKULSHANKAR, S.; RANJITSINGH, A.; VENKATESAN, G.; RANJITH, M. S.; VIJAYALAKSHMI, G. S.; PRABHAMANJU, M.; SUBASHINI, S. Is moderation of protease production an adaptation of well-defined anthropization in dermatophytes. **Indian J Pathol Microbiol.**, v.53, p.87-92, 2010.

GUPTA, A. K.; COOPER, E. A.; MACDONALD, P.; SUMMERBELL, R. C. Utility of inoculum counting in the clinical diagnosis of onychomycosis caused by nondermatophytic filamentous fungi. **J Clin Microbiol.**, v.39, p.2115-21, 2001.

GUSTINCICH S, MANFIOLETTI G, DEL SAL G, SCHNEIDER C, CARNINCI P. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. **Biotechniques**, v.11, n.3, p.298-302, 1991.

HAY, R. J. Failure of treatment in chronic dermatophyte infections. **Post. Med. J.**, v. 55, p.608-10, 1979.

HAVLICKOVA, B.; VIKTOR, A.; ZAIKA, C.; FRIEDRICH, M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. **Mycoses**, v.51 (Suppl. 4), p.2-15, 2008.

IROBI, J.; SCHOOF, A.; GOOSSENS, H. Genetic identification of *Candida* species in HIV-positive patients using the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of its DNA. **Molecular and Cellular Probes**. V.13, p.401-6, 1999.

IWEN, P. C.; HINRICHS, S. H.; RUPP, M. E. Utilization of the internal transcribed space region as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens, **Med. Mycol.**, v.40, p.87-109, 2002.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, 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. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 4527- 4534, 2000.

JONES, H. E. The atopic-Dermatophytosis Syndrome. **Acta Dermat. Venereol. Suppl.**, v. 92, p. 81, 1980.

JONES, H. E. Immune response and host resistance of humans to dermatophyte infections. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.28, p.12-18, 1993.

KAMIYA, A.; KIKUCHI, A.; TOMITA, Y.; KANBE T. PCR and PCR—RFLP techniques targeting the DNA topoisomerase II gene for rapid clinical diagnosis of the etiologic agent of dermatophytosis. **J of Dermatol Sci.** v.34, p.35-48, 2004.

KANBE, T.; SUZUKI, Y.; KAMIYA, A.; MOCHIZUKI, T.; FUJIHIRO, M.; KIKUCHI, A. PCR-based identification of common dermatophyte species using primer sets specific for the DNA topoisomerase II genes. **J Dermatol Sci.**, v.32(2), p.151-161, 2003.

KANE, J.; SUMMERBELL, R.; SIGLER, L.; KRAJDEN, S.; LAND, G. Laboratory Handbook of Dermatophytes. **Belmont Star Publishing Company**, 1997.

KANO, R.; NAKAMURA, Y.; WATARI, T.; WATANABE, S.; TAKAHASHI, H.; TSUJIMOTO, H.; HASEGAWA, A. Molecular analysis of chitin synthase 1 (*CHS 1*) gene sequences of *Trichophyton mentagrophytes* complex and *T. rubrum*. **Curr. Microbiol.**, v.37, p.236-239, 1998.

KANO, R.; OKABAYASHI, K.; NAKAMURA, Y.; OOKA, S.; KASHIMA, M.; MIZOGUCHI, M.; WATANABE, S.; HASEGAWA, A. Differences among chitin synthase 1 gene sequences in *Trichophyton rubrum* and *T. violaceum*. **Med. Mycol.**, v.38, p.47-50, 2000.

KARAKOUSIS, A.; TAN, L.; ELLIS, D.; ALEXIOU, H.; WORMALD, P. J. An assessment of the efficiency of fungal DNA extraction methods for maximizing the detection of medically important fungi using PCR. **Journal of microbiological methods**, v.65, p.38-48, 2006.

KOUTANTOS, D. Radicais e prefixos gregos em português. http://www.eduportal.gr/files/bigf/lexeis_3pdf. Acesso em 20 de agosto de 2010.

KUSTARK, E. **Imunology of fungal diseases**. New York: Marcel Dekker, v.47, 1989.

KUSHWAHA, R. K. S.; GUARRO, J. Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi. **Revista Iberoamericana de Micologia**, p.174, 2000.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. **Medical Micology**. USA: Willians; Wilkings, 1992.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. 1992. Dermatophytoses, p. 105-161. In K. J. Kwon-Chung and J. E. Bennett (ed.), **Medical mycology**-1992. Lea; Febiger, Philadelphia, Pa.

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.

LIU, D.; COLOE, S.; BAIRD, R.; PEDERSEN, J. PCR identification of *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* and *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* dermatophytes with a random primer. **J. Med. Microbiol.**, v.46, p.1043-1046, 1997.

LIU, D.; COLOE, S.; BAIRD, R.; PEDERSEN, J. Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi. **J. Med. Microbiol.**, v.49, p.493-497, 2000.

LOFFLER, J.; HEBART, H.; SCHUMACHER, U.; REITZE, H.; EINSELE, H. Comparison of Different Methods for Extraction of DNA of Fungal Pathogens from Cultures and Blood. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.3311-3312, 1997.

MACURA, A. B. Dermatophyte infections. **Int J Dermatol.**, v.32, p. 313-23, 1993.

MAKIMURA, K. T.; MOCHIZUKI, A.; HASAGAWA, K.; UCHIDA, H.; YAMAGUCHI. Phylogenetic classification of *Trichophyton mentagrophytes* complex strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. **J. Clin. Microbiol.** v.36, p.2629-2633, 1998.

MANIAN, S.; SREENIVASAPRASAD, S.; MILLS, P. R. DNA extraction method for PCR in mycorrhizal fungi. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.33, p.307 - 310, 2001.

MARY, P. The epidemiology of animal ringworm in man. **English British Journal of Dermatology**. v.86, p.78 - 87, 1972.

MARTO, P. G.; AGUDO, L. G.; PEREZ, A. E.; GILDE, F. S.; LINARES, M. Y. Dermatofitosis por hongos antropofilicos em Cádiz (1997–2008). **Actas Dermo-Sifiliograficas**, v.101, n.3, p.242-247, 2010.

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.

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.

MIDGLEY, G.; MOORE, M. K.; COOK, J. C., et al. Micology of nail disorders. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 31, p.68-74, 1994.

MOHANTY, J. C.; MOHANTY, S. K.; SAHOO, R. C.; SAHOO A.; PRAHARA, S. Diagnosis of supercial mycoses by direct microscopy: A statistical ebaluation. **Indian J. Dermatol Verenereiol Leprol**. v.65, p.72-4, 1999.

MONOD, M.; BONTEMS, O.; ZAUGG, C.; et al. Fast and reliable PCR/sequencing /RFLP assay for identification of fungi in onychomycoses. **J Med Microbiol.**, v.55, p.1211-16, 2006.

MORIELLO, K. A. Treatment of dermatophytosis in dogs and cats: review of published studies. **Veterinary Dermatology**. v.15, p.99-107, 2004.

MOCHIZUKI, T., M. KAWASAKI, H. ISHIZAKI, and K. MAKIMURA. Identification of several clinical isolates of dermatophytes based on the nucleotide sequence of internal transcribed spacer 1 (ITS 1) in nuclear ribosomal DNA. **J. Dermatol.** **26**:276–281, 1999.

MOCHIZUKI, T.; ISHIZAKI, H.; BARTON, M.K.M., et al. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Ribosomal DNA Intergenic Regions Is Useful for Differentiating Strains of *Trichophyton mentagrophytes*. **Journal of Clinical Microbiology**, Oct., p. 4583–4588, 2003.

MULLER, F. M. C.; WERNER, K. E.; KASAI, M.; FRANCESCONI, A.; CHANOCK, S. J.; WALSH, T. J. Rapid extraction of genomic DNA from medically important yeasts and filamentous fungi by high-speed cell disruption. **J Clin Microbiol.**, v.36, p.1625-1629, 1998.

NEGRONI, R. Historical aspects of dermatomycoses. **Clinics in Dermatology**, v. 28, p.125-132, 2010.

ODOM, R. B. Common superficial fungal infections in immunosuppressed patients. **J Am Acad Dermatol.**, v.31, p.56-9, 1994.

PIERARD, G. E.; PIERARD-FRANCHIMONT, C. The nail under fungal siege in patients with type II diabetes mellitus. **Mycoses**, v.48, n.5, p.339-342, 2005.

POUNDER, J. I.; WILLIAMS, S.; HANSEN, D.; HEALY, M.; REECE, K.; WOODS, G. L. Repetitive-sequence-PCR-based DNA fingerprinting using the Diversilab system for identification of commonly encountered dermatophytes. **J Clin Microbiol.**, v.43, n.5, p.2141-2147, 2005.

RADFORD, S. A.; JOHNSON, E. M.; LEEMING, J. P.; MILLAR, M. R.; CORNISH, J. M.; FOOT, A. B. M.; WARNOCK, D. W. Molecular epidemiological study of *Aspergillus fumigatus* in a bone marrow transplantation unit by PCR amplification of ribosomal intergenic spacer sequences. **J. Clin. Microbiol.** v.36, p.1294-1299, 1998.

REIS, C. M. S.; GASPAR, A. P. A.; GASPAR, N. L.; LEITE, R. M. S. Estudo da flora dermatofítica na população do Distrito Federal. **An Bras Dermatol.**, v.67, p.103-11, 1992.

RIPPON, J. W. The Pathogenic Fungi and Pathogenic Actinomycetes. **Medical Mycology**, 3rd edn. Philadelphia: W.B. Saunders, p. 169-275, 1988.

ROGER, D., KILKENNY, M., MARKS, R. The descriptive epidemiology of *tinea pedis* in the community Australas. **J. Dermatol.**, v. 37, p. 178-84, 1996.

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.

SAMBROOK J, RUSSELL DW. 2001. Rapid isolation of yeast DNA Molecular Cloning. **A Laboratory Manual**. v.6, p.31-32, 2001.

SCHERER, W. P.; MCCREARY, J. P.; HAYES, W. W. The diagnosis of onychomycosis in a geriatric population: a study of 450 cases in South Florida. **J Am Podiatr Med Assoc.**, v.91, p.456-464, 2001.

SCHERER, W. P.; SCHERER, M. D. A comparison of results from two mycology laboratories for the diagnosis of onychomycosis: A study of 85 cases in a geriatric population. **J Am Podiatr Med Assoc.**, v.94, p.528-34, 2004.

SEEBACHER, C.; BOUCHARA, J. P.; MIGNON, B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. **Mycopathologia**, v.166, p.335-352, 2008.

SHELLEY, E. D.; SHELLEY, W. B.; SCHAFER, R. L. Generalized *Trichophyton rubrum* infection in congenital ichthyosiform erythroderma. **J. Am. Acad. Dermatol. (stockh)**, v. 20, p. 1133-4, 1989.

SVEJGAARD, E. L. Epidemiology of dermatophytes in Europe. **Int J Dermatol.**, v.34, p.525-8, 1995.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Edit. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004.

SYMPANIA, M. F. Dermatophytes: Their taxonomy, ecology and pathogenicity Dermatophytes: *In* R. K. S. Kushawaha; J. Guarro, Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi. **Revista Iberoamericana de Micologia**, p. 1-12, Bilbao, Spain, 2000.

SPIEWAK, R. Zoophilic and geophilic fungi as a cause of skin disease in farmers. **Ann Agric Environ Med.**, v.5, p.97-102, 1998.

SUMMERBELL, R.C.; COOPER, E.; BUNN, U.; et al. Onychomycosis: a critical study of techniques and criteria for confirming the etiologic significance of nondermatophytes. **Med Mycol.**, v.43, p.39-59, 2005.

TABART, J.; BALDO, A.; VERMOUT, S.; NUSGENS, B.; LAPIERE, C.; LOSSON, B.; MIGNON, B. Reconstructed interfollicular feline epidermis as a model for *Microsporum canis* dermatophytosis. **J Med Microbiol.** v.56, p.971-5, 2007.

TAMBOR, J. H.; GUEDES, R. F.; NOBREGA, M. P.; NOBREGA, F. G: The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of the dermatophyte fungus *Epidermophyton floccosum*. **Curr Genet.**, v.49(5), p.302-308, 2006.

TIETZ, H. J.; KUNZELMANN, V.; SCHOENIAN, G. Changes in the fungal spectrum of dermatomycoses. **Mycoses**, v.38 (Suppl. 1), p.33-9, 1995.

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.

VIANI, F. C.; DOS SANTOS, J. I.; PAULA, C. R.; LARSON, C. E.; GAMBALE, W. Production of extracellular enzymes by *Microsporum canis* and their role in its virulence. **Med Mycol.**, v.39, p.463-8, 2001.

VILANI-MORENO, F. R.; ARRUDA, M.A.P.; CLARO, S.G.; MARCOS, E.V.C.; URA, S. Dermatophytosis: association between ABO blood groups and reactivity to the trichophytin. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v.41 n.5, 1999.

WAGNER, D. K.; SOHNLE, P. G. Cutaneous defenses against Dermatophytes and yeasts. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.8, p.317-35, 1995.

WEITZMAN, I.; MCGINNIS, M.; PADHYE, A. A.; AJELLO, L. The genus *Arthroderma* and its later synonym *Nannizzia*. **Mycotaxon.**, v.25, p.505-18, 1968.

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

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315-322. *In* M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (ed.), PCR protocols: a guide to methods and applications. **Academic Press**, Inc., New York, N. Y., 1990.

WILSON, B. B.; DEUEL, B.; MILLS, T. A. Atopic dermatitis associated with dermatophyte infection and *Trichophyton* hypersensitivity. **Cutis**, v. 51, p. 191-2, 1993.

WILLIAMSON, E. C.; LEEMING, J. P.; PALMER, H. M.; STEWARD, C. G.; WARNOCK, D.; MARKS, D. I.; MILLAR, M. R. Diagnosis of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients by polymerase chain reaction. **Br J Haematol.**, v.108, p.132-139, 2000.

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

WU, Y.; YANG, J.; YANG, F.; LIU, T.; LENG, W.; CHU, Y.; JIN, Q. Recent dermatophyte divergence revealed by comparative and phylogenetic analysis of mitochondrial genomes. **BMC Genomics**, v.10, p.238, 2009.

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

ZAITS, C.; MARQUES, S. A.; RUIZ, L. R. B.; SOUZA, V. M. **Compêndio de Micologia Médica**. Rio de Janeiro: MEDSI; p.81-4, 1998.

ZIENICK, H. C.; KARTING, H. C.; LUKAES, A. Dermatophytosis in children and adolescents: epidemiological, clinical and microbiological aspects changing with age. **J. Dermatol.**, v. 18, p. 438-46, 1991.