



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

**CICERO PINHEIRO INÁCIO**

**MODELO DE INFECÇÃO *IN VITRO* DA PIEDRA BRANCA, ANÁLISE  
DOS ASPECTOS MORFOLÓGICOS, ULTRAESTRUTURAIIS E  
ABORDAGEM DE IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA DOS AGENTES  
ETIOLÓGICOS**

**RECIFE**

**2015**

**CICERO PINHEIRO INÁCIO**

**MODELO DE INFECÇÃO *IN VITRO* DA PIEDRA BRANCA, ANÁLISE  
DOS ASPECTOS MORFOLÓGICOS, ULTRAESTRUTURAIS E  
ABORDAGEM DE IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA DOS AGENTES  
ETIOLÓGICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

**Orientador:** Prof.<sup>a</sup> Dra. Rejane Pereira Neves

**Co-orientador:** Prof. Dr Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto

**RECIFE**

**2015**

Catálogo na fonte

Elaine Barroso

CRB 1728

**Inácio, Cícero Pinheiro**

**Modelo de infecção *in vitro* da pedra branca, análise dos aspectos morfológicos, ultraestruturais e abordagem de identificação polifásica dos agentes etiológicos/ Cícero Pinheiro Inácio– Recife: O Autor, 2015.**

**75 folhas : Il., fig., tab.**

**Orientadora: Rejane Pereira Neves**

**Coorientador: Reginaldo Gonçalves Lima-Neto**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.**

**Centro de Ciências Biológicas. Biologia de Fungos, 2015.**

Inclui bibliografia

1. Leveduras (fungos) 2. Infecção I. Neves, Rejane Pereira (orientadora) II. Lima-Neto, Reginaldo Gonçalves (coorientador) III. Título

**579.59**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB-2015- 235**

**CICERO PINHEIRO INÁCIO**

**MODELO DE INFECÇÃO *IN VITRO* DA PIEDRA BRANCA, ANÁLISE  
DOS ASPECTOS MORFOLÓGICOS, ULTRAESTRUTURAIIS E  
ABORDAGEM DE IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA DOS AGENTES  
ETIOLÓGICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 20/02/2015

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Rejane Pereira Neves  
Universidade Federal de Pernambuco - (UFPE)

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo  
Universidade Federal de Pernambuco - (UFPE)

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Maria Rabelo de Carvalho Parahym  
Universidade Federal de Pernambuco - (UFPE)

## **Agradecimentos**

Considero que uma das atitudes mais nobres que um homem pode ter é o de poder prestar agradecimento aos seus companheiros, seja pelos pequenos ou grandes gestos de solidariedade oferecidos ao próximo em tempos bons ou vis. Porém, agradecer não é uma tarefa fácil, de modo que podemos falhar por não sermos inteiramente justos com quem deveríamos. Deste modo, seria uma dádiva se dispuséssemos de uma maneira plausível e simplória para fazermos isto, tais como em uma singela equação matemática.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento da pesquisa.

Ao Programa de Pós-graduação de Biologia de Fungos (PPGBF), pelo financiamento da pesquisa.

A coleção de culturas Micoteca URM (UFPE), pelo fornecimento dos isolados de levedura.

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), pela realização das análises por Microscopia Eletrônica de Varredura e pela Espectroscopia de Massa (MALDI-TOF MS).

Aos meus orientadores, Prof.<sup>a</sup> Dra. Rejane Pereira Neves e Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto, pela confiança disposta a mim e por terem me guiado em minha evolução pessoal e profissional.

Aos professores, Dra. Oliane Maria Correia Magalhães e PhD. Armando Marsden Lacerda Filho, pela amizade e apoio profissional.

Aos meus pais, Francisco e Tereza, pela sapiência endereçada ao meu crescimento interior, além de sua profunda dedicação, rigor, amor e paciência dispostos a mim nos momentos mais oportunos.

Aos meus irmãos, que não são poucos (Maria, Ana, Anisia, Marta, Ceíça, Wegilla, José, Jorge e André), por serem meus melhores amigos e, em muitas ocasiões, terem sido meus tutores e mestres.

Aos amigos do Departamento de Micologia, em especial aos do laboratório de Micologia médica.

Aos amigos fiéis, tanto os de épocas imemoriais como aos novos que conquistei. Infelizmente, não poderei citar um por um, porém, sei que aos que faço menção quando lerem estas palavras se verão de tal modo como ao de um reflexo projetado em um espelho.

A todos aqueles que vierem a se beneficiar desta pesquisa; seria uma honra saber que pude contribuir para o conhecimento de outras pessoas.

Me exímio do pesar de não ter mencionado alguém, uma vez que faço destas últimas palavras um profundo agradecimento aos que, por ventura, não foram mencionados nestes agradecimentos.

## RESUMO GERAL

Piedra branca é uma infecção de etiologia fúngica caracterizada pela formação de nódulos restritos a porção extrafolicular dos pelos e cabelos, sendo ocasionada por leveduras do gênero *Trichosporon*. O diagnóstico é clínico e laboratorial micológico, sendo concluído com a identificação precisa do agente etiológico. Esta pesquisa teve como objetivo elaborar um modelo de infecção *in vitro* da piedra branca, analisar os aspectos morfológicos e ultraestruturais dos nódulos e seus agentes, e autenticar taxonomicamente os isolados por meio de uma abordagem de identificação polifásica. A infecção dos cabelos foi induzida utilizando 18 isolados do gênero *Trichosporon*, mantidos na Coleção de Culturas Micoteca URM. Para confirmação taxonômica dos isolados, foi adotada métodos empregados na taxonomia clássica, Espectroscopia de Massa (MALDI-TOF MS) e sequenciamento das regiões ITS (ITS1–5.8s-ITS2), IGS1 (Intergenic spacer) e domínios D1/D2 do rDNA. Foi verificado que 15 (83,33%) dos isolados de levedura foram identificados por meio da Espectrometria de Massa MALDI-TOF MS. Os métodos moleculares foram considerados os mais precisos, possibilitando a identificação dos isolados de levedura como: *T. asahii* (8), *T. faecale* (3), *T. montevideense* (5), *T. mycotoxinivorans* (1) e *Hyphopichia burtonii* (1). Os nódulos típicos foram formados por 12 isolados, seis formaram nódulo atípico (Quatro de *T. asahii* e dois de *T. montevideense*) e dois não formaram nódulo (um de *T. montevideense* e um de *T. faecale*). Os constituintes químicos detectados nos nódulos foram carbono, oxigênio, sódio, cálcio, manganês e magnésio. A consistência friável dos nódulos está relacionada com as baixas concentrações de cálcio e enxofre, conferindo a facilidade de rompimento do nódulo. Neste modelo, foi verificado que temperaturas elevadas e umidade excessiva não estão relacionadas com o desenvolvimento desta tricopatia.

Palavras-chave: Identificação polifásica de leveduras; Piedra branca; *Trichosporon* sp.; Microscopia eletrônica de Varredura.

## ABSTRACT

White piedra is a fungal infection caused by *Trichosporon* species. The clinical condition of this mycosis is the production of white nodules adhered to the hair shaft. The diagnosis takes into account the clinical feature and mycological laboratory results, which is finalized with the precise etiologic agent identification. This research aimed to develop an *in vitro* infection model of white piedra, analyzing the morphological and ultrastructural aspects of nodules and aetiological agents, and to identify the isolates by a polyphase approach. The infection of the hair was induced using 18 isolates of the genus *Trichosporon*, from the Culture Collection Micoteca URM. To taxonomic confirmation of the *Trichosporon* isolates, were adopted methods used in the classical taxonomy, Mass Spectroscopy (MALDI-TOF MS) and sequencing of the ITS (ITS1-5.8s-ITS2), IGS1 (Intergenic spacer) and D1/D2 domains of rDNA regions. A total of 15 (83.33%) yeast isolates were identified by mass spectrometry MALDI-TOF MS. Molecular tools were considered more accurate, allowing the identification of all yeast isolates as: *T. asahii* (8), *T. faecale* (3), *T. montevidense* (5), *T. mycotoxinivorans* (1) and *Hyphopichia burtonii* (1). Typical nodules were formed by 12 isolates, 6 isolates formed atypical nodules (*T. asahii* (4) and *T. montevidense* (2)) and 2 isolates did not form nodules (*T. montevidense* (1) and *T. faecale* (1)). The chemical constituents detected in the nodules were carbon, oxygen, sodium, calcium, manganese and magnesium. The soft consistency of the nodules is associated with the low concentrations of calcium and sulfur, that providing ease disruption of the nodule. In this *in vitro* infection model, it was observed that the temperatures and humidity were not related to the development of this trichoptia.

**Key-words:** White piedra; *Trichosporon* sp.; Yeast identification; Scanning Electron Microscope.

## SUMÁRIO

	PÁG.
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	10
<b>2 OBJETIVO GERAL</b>	12
<b>2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	12
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b>	13
<b>3.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DO CABELO</b>	13
3.1.1 CUTÍCULA DO FIO CAPILAR	15
3.1.2 CÓRTEX E MEDULA DO FIO CAPILAR	15
3.2 HISTÓRICO E CARACTERÍSTICAS GERAIS DA PIEDRA BRANCA	16
3.3 LEVEDURAS DO GÊNERO <i>TRICHOSPORON</i>	19
3.4 LEVEDURAS DO GÊNERO <i>HYPHOPICHIA</i>	23
3.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE PIEDRA BRANCA E IMPORTÂNCIA	23
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	25
4.1 CULTURAS DE <i>TRICHOSPORON</i> SPP.: SELEÇÃO, REATIVAÇÃO E ESTUDOS TAXONÔMICOS	25
4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS DE <i>TRICHOSPORON</i> POR ANÁLISE PROTEÔMICA (MALDI-TOF MS)	26
4.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS LEVEDURAS DO GÊNERO <i>TRICHOSPORON</i>	27
4.4 MODELO DE INFECÇÃO <i>IN VITRO</i> POR <i>TRICHOSPORON</i> SPP.	29
4.5 ANÁLISE DA SIMILARIDADE GENÉTICA (RETROCULTIVO)	30
4.6 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL E ELEMENTAR	30
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	32
5.1 REVISÃO TAXONÔMICA DOS ISOLADOS DE <i>TRICHOSPORON</i>	32
5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>TRICHOSPORON</i> POR ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF MS	36
5.3 SEQUENCIAMENTO DAS REGIÕES ITS E IGS DO RDNA E ANÁLISE FILOGENÉTICA DO GÊNERO <i>TRICHOSPORON</i>	38
<b>5.4 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS LEVEDURAS AVALIADAS</b>	45
5.4.1 <i>TRICHOSPORON ASAHII</i>	45
5.4.2 <i>TRICHOSPORON FAECALE</i>	45
5.4.3 <i>TRICHOSPORON MYCOTOXINIVORANS</i>	46
5.4.4 <i>TRICHOSPORON MONTEVIDEENSE</i>	48
5.4.5 <i>HYPHOPICHIA BURTONII</i>	49
5.5 INFECÇÃO DOS PELOS PELAS LINHAGENS DE <i>TRICHOSPORON</i>	50
5.6 PATOGENIA DA PIEDRA BRANCA	55
5.7 ANÁLISE DA SIMILARIDADE GENÉTICA	58
<b>5.8 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL (MEV)</b>	59
5.8.1 CARACTERÍSTICAS DO CABELO	59
5.8.2 MEV DAS LEVEDURAS	60
<b>6 CONCLUSÕES</b>	64
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	65

## 1 INTRODUÇÃO

Os cabelos são estruturas características de mamíferos e são produzidos em quase todas as regiões corporais, sendo a sustentação conferida pela proteína espiralada  $\alpha$ -queratina (Buffoli et al., 2013). Além de ser relevante esteticamente, possui uma importante função relacionada com a proteção das superfícies corpóreas (Pozebon; Dressler; Curtius, 1999; Lima; Silva, 2007). Todavia, observa-se que o cabelo pode estar sujeito a inúmeras alterações que podem comprometer a sua saúde e características físicas, devido a fatores de origem genética, nutricional, danos de origem físico-química e doenças capilares provocadas por bactérias e fungos (English, 1969; Porter, 1973; Jones; Rivett, 1997; Silva-Santana et al, 2002; Scanavez et al., 2003; Roselino et al., 2008; Finch, 2011).

Das doenças do fio capilar, merece destaque a piedra branca, uma micose ocasionada por espécies de leveduras do gênero *Trichosporon* (Bonifaz et al., 2010). Apesar desta micose ser conhecida desde o século XIX, ainda existe pouco conhecimento a respeito da ecologia e sobre os mecanismos de patogenicidade destas leveduras. Do mesmo modo, é observada a existência de dificuldade diagnóstica e seus fatores predisponentes ainda permanecem desconhecidos. Esses entraves possivelmente contribuem com a baixa frequência de relatos desta doença de etiologia fúngica, fazendo-se crer que ocorra o sub-diagnóstico, ou seja, ela pode ser bem mais incidente, sobretudo em países de clima tropical (Kanitakis et al., 2006; Roselino et al., 2008; Finch, 2011; Cardona et al., 2013).

As leveduras desse gênero podem ser identificadas por vários métodos, como auxonograma e prova enzimática (Middelhoven et al., 2004). Todavia, a análise do rDNA (Dominios D1/D2, região ITS e IGS) são ferramentas mais precisas para a identificação e análise filogenética destes fungos, tendo sido amplamente utilizadas. Ao mesmo tempo, essas análises são necessárias em face ao progresso crescente quanto às novas descobertas na área da taxonomia de leveduras (Sugita et al., 2002; Sugita et al., 2004).

Apesar dos métodos moleculares serem os mais precisos quanto à identificação de leveduras, na clínica médica se faz necessário o emprego de técnicas que sejam, ao mesmo tempo, rápidas e precisas. Deste modo, algumas pesquisas tem destacado a espectrometria de massa MALDI-TOF MS como uma ferramenta precisa com esta finalidade (Kolecka et al., 2013; Almeida Junior et al., 2014).

O método de microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma ferramenta útil na visualização das estruturas que compõem o nódulo de piedra branca, além de poder fornecer

informações quanto aos danos sofridos pelo cabelo e possíveis infecções sinérgicas entre as leveduras do gênero *Trichosporon* e bactérias (Figueras; Guarro, 2000; Roselino et al., 2008). De maneira semelhante, Figueras e Guarro, (1997) demonstraram que alguns elementos químicos são responsáveis pela dureza dos nódulos de piedra preta, como pelo uso de técnicas que utilizam espectrômetros acoplados a MEV. Em contrapartida, é desconhecida a real função dos constituintes químicos presentes nos nódulos de piedra branca, sendo fundamental a sua determinação e estudo.

Há poucos relatos em que o agente etiológico da Piedra foi identificado até o nível de espécie, fato que torna o conhecimento sobre as espécies patogênicas ao homem e sobre a epidemiologia da micose muito limitada. A pesquisa por fatores de virulência nas espécies de *Trichosporon* tem se mostrado importante, sobretudo nos isolados de processos infecciosos, de modo que os fatores relacionados à promoção inicial da aderência das células fúngicas ainda não estão esclarecidos. Em contrapartida, apenas algumas espécies do gênero *Trichosporon* foram isoladas como agentes de piedra branca, sendo que é desconhecido o envolvimento de outras espécies quanto à capacidade de desencadear esta micose.

## 2.1 OBJETIVO GERAL

Induzir e analisar um modelo de infecção *in vitro* da pedra branca e os aspectos morfológicos e ultraestruturais, e identificar, por taxonomia polifásica, os agentes etiológicos.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar, reativar e autenticar taxonomicamente culturas de *Trichosporon* mantidas em coleções de cultura;
- Induzir *in vitro* a formação de pedra branca por culturas de *Trichosporon*;
- Verificar a ocorrência da infecção *in vitro* entre as diferentes espécies de *Trichosporon*;
- Avaliar o período de formação dos nódulos e as características morfológicas dos agentes, pós modelo de infecção;
- Analisar o grau de similaridade genética dos isolados, antes e após a infecção no fio capilar;
- Comparar aspectos ultraestruturais dos nódulos através de microscopia eletrônica;

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DO CABELO

O cabelo é um biopolímero orgânico formado quase que exclusivamente por proteínas, em especial a queratina (Yang; Zhang; Rheinstadter, 2014). Este é formado por estruturas denominadas folículos pilosos, localizados na camada abaixo da derme, a epiderme (Lima; Silva, 2007; Pozebon; Dressler; Curtius, 1999). O crescimento ocorre a partir dos folículos pilosos onde se observa proliferação e diferenciação celular (Lima; Silva, 2007). O folículo é rodeado individualmente por uma extensa rede nervosa bastante ramificada que se estende para as camadas mais superficiais da pele. Da mesma maneira, é bastante vascularizado, fato que permite suprir as necessidades nutricionais de cada órgão folicular (Buffoli et al., 2013).

A estrutura do cabelo é constituída principalmente por  $\alpha$ -queratina, um aminoácido rico em enxofre de conformação helicoidal, que forma uma malha resistente através de ligações dissulfídicas entre os aminoácidos (Jones et al., 1997). Em termos de dimensões, apresenta diâmetro compreendido entre 15 a 120 $\mu$ m e possui três regiões distintas, cutícula, córtex e medula (Lima; Silva, 2007; Velasco et al., 2009; Buffoli et al., 2013). A fibra é formada pela queratinização das células ao longo do crescimento (Lima; Silva, 2007).

O cabelo consiste basicamente de um tecido morto que cresce a uma taxa média de um centímetro por mês. Estudos sugerem que há um fator genético associado que lhe confere características diferenciais, tais como maleabilidade e volume (Velasco et al., 2009). Os cabelos são considerados saudáveis quando possuem brilho natural, textura suave e ausência de pontas duplas. Além disto, o cabelo pode ser liso, ondulado ou crespo e pode apresentar tonalidades variadas de preto, castanho, vermelho e branco (Sinclair, 2007). Contudo, não se sabe ao certo quais fatores estão implicados por contribuir com as diferenças notadas entre indivíduos de etnias variadas, possivelmente ocorra por modificações na estrutura da queratina e assim dos fios capilares (Wade et al., 2013).

O cabelo possui uma importante função sensitiva que está relacionada ao aumento da percepção tátil da pele e pode conferir grande impacto na qualidade de vida. Desordens como a queda de cabelo e hirsutismo são consideradas condições que podem interferir na saúde psicológica, nas relações pessoais e na sexualidade do indivíduo, devido ao aumento ou diminuição da percepção tátil da pele (Buffoli et al., 2013).

Além de ser esteticamente relevante, atua na proteção da cabeça contra a radiação solar por meio do pigmento escuro denominado de melanina, o qual também confere coloração característica aos fios. Ademais, o cabelo também protege o couro cabeludo e o pescoço contra o frio e injúrias físicas (Lima; Silva, 2007; Velasco et al., 2009; Buffoli et al., 2013).

Basicamente, há dois tipos de incorporação de substâncias ao cabelo, sendo denominadas de incorporação endógena e exógena. A primeira ocorre pelo contato de substâncias externas presentes no ar, na água, no uso de cosméticos, suor dentre outros. Os elementos traços encontrados na água podem ser capturados pela membrana celular e ser fixada à molécula de queratina (Sachs, 1997; Velasco et al., 2009). Enquanto que a segunda ocorre pela absorção de nutrientes através da raiz do cabelo, de modo que a quantidade de substâncias absorvidas depende da concentração momentânea dos fluídos biológicos em contato com a raiz do folículo piloso (Velasco et al., 2009).

Durante o crescimento podem ser observadas variações na composição dos elementos químicos presentes nos pelos, devido às diferenças encontradas entre as amostras como gênero do indivíduo, idade, fatores regionais e outros (Pozebon; Dressler; Curtius, 1999; Wołowiec et al., 2013). Os elementos presentes no cabelo podem ser adquiridos tanto de maneira endógena como exógena. Todavia, é difícil afirmar dentre as substâncias presentes no fio capilar qual a via de entrada para a incorporação destes elementos (Chatt; Katz 1988; Velasco et al., 2009). Nesse sentido, foi proposto que o cabelo pudesse ser utilizado para pesquisa de compostos presentes no corpo humano (Flesch, 1945).

Estudos revelam que os principais constituintes presentes no cabelo consistem de proteínas (80%), água (15%), lipídios e outros compostos. Este tecido possui uma ampla variedade de elementos químicos em sua constituição básica, sendo que os macrominerais presentes no cabelo representados principalmente pelo  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ; Ainda, outras substâncias podem ser observadas em menor quantidade, destacando-se o  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^-$ ,  $\text{Cu}$ ,  $\text{Mn}$ ,  $\text{I}$ ,  $\text{Cr}$ ,  $\text{Se}$  e  $\text{Mo}$  que correspondem aos microelementos (Passwater; Cranton, 1985; Velasco et al., 2009).

Os primeiros estudos analíticos do fio capilar foram realizados por Hoppe em 1858, a fim de determinar a presença de Arsênio (As) em corpos de cadáveres (Sachs, 1997). Desde então, a análise do cabelo vem sendo estudado em áreas como toxicologia, criminalística, diagnóstico laboratorial de doenças/distúrbios nutricionais e de doenças que afetam o fio capilar (Pozebon; Dressler; Curtius, 1999). Desta forma, na Dermatoscopia os cabelos são

analisados e, também, as estruturas anexas da pele adjacente e doenças que possam estar relacionadas às alterações do pelo (Miteva; Tosti, 2012).

### 3.1.1 CUTÍCULA DO FIO CAPILAR

A cutícula representa a porção mais externa do cabelo e é formada por camadas de células alongadas e justapostas. Apresenta, ainda, outras regiões sub-lamelares bem delimitadas como a epicutícula, camada A, exocutícula, endocutícula, camada interna, juntamente com o complexo de membrana celular (Smith; Swift, 2002; Buffoli et al., 2013).

A epicutícula é considerada a principal região da cutícula onde se nota a presença de lipídios como o ácido 18-metileicosanóico, o qual atribui um caráter hidrofóbico ao cabelo, com uma alta concentração de cistina. A exocutícula, mais externa e rígida, é composta por uma alta concentração de cistina compondo quase a metade da composição química da cutícula. A endocutícula possui uma pequena quantidade de cistina, que apresenta uma consistência mais macia (Smith; Swift, 2002; Velasco et al., 2009).

### 3.1.2 CÓRTEX E MEDULA DO FIO CAPILAR

O córtex constitui uma região intermediária formada por células queratinizadas e melanizadas que são separadas pelo complexo de membrana celular. Originam extensas fibras conhecidas por microfibras e ocupam a maior área do cabelo que é composta por uma grande quantidade de cistina. Nesta região é encontrado o pigmento escuro melanina (Lima; Silva, 2007; Velasco et al., 2009). A cistina é um aminoácido muito estável, de modo que constitui a razão pela qual o cabelo pode permanecer praticamente intacto mesmo após anos da morte do indivíduo (Velasco et al., 2009).

A medula do fio capilar também é constituída por camadas de células que formam estruturas cilíndricas, localizadas na porção central do pelo. Apresenta uma grande quantidade de lipídios e pouca concentração de cistina. Suas células podem estar desidratadas e preenchidas por ar, fato que pode interferir na cor e brilho dos cabelos. Todavia, é observada apenas nas terminações do cabelo, embora nem sempre possa estar presente (Lima; Silva, 2007; Velasco et al., 2009).

A patogênese de muitas desordens do cabelo ainda é pouco conhecida, como também, existem poucas opções terapêuticas com a finalidade de tratar tais doenças

(Pozebon et al., 1999; Frank et al., 2013; Natali; Tosti, 2014). Em se tratando das micoses do fio capilar, as infecções fúngicas surgem como importantes agentes causadoras de variadas manifestações clínicas. O acometimento pode ser restrito as camadas mais superficiais ou a regiões mais profundas. Deste modo, a piedra branca tem surgido como uma micose de grande relevância, pelo fato de haver intempéries quanto ao diagnóstico, dificuldade de tratamento e modo de desenvolvimento em relação ao local do pelo afetado, como a cutícula, córtex ou medula (Diniz; Souza Filho, 2005; Fernandes et al., 2012; Cardona et al., 2013).

### 3.2 HISTÓRICO E CARACTERÍSTICAS GERAIS DA PIEDRA BRANCA

A piedra branca foi inicialmente descrita por Beigel em 1865 e é caracterizada como uma infecção crônica formada por nódulos aderidos à cutícula do cabelo (Ellner et al., 1990). O agente etiológico causador desta infecção pertence ao gênero *Trichosporon* que compreende um grupo de leveduras, representado principalmente pelas espécies *T. cutaneum*, *T. inkin* e *T. ovoides* (Bonifaz et al., 2010).

A princípio, esta micose foi denominada de tinha nodosa, trichomycose nodosa, trichosporose e, posteriormente, piedra (Arêa Leão, 1940). Esta última denominação foi um termo proposto por Osario e Posada-Arango em 1876 para uma infecção relatada na Colômbia conhecida pelo nome de “Mal de tierra” (Bonifaz et al., 2010; Desai; Nadkarni, 2012; Cardona et al., 2013).

Esta micose assume um caráter cosmopolita, de modo que a doença foi então relatada em diversos países, tais como Estados Unidos da América (USA), países da Europa e da África, Japão, Kuwait, Tailândia, Rússia, Índia, Paraguai, Argentina e Brasil (Figueras; Guarro, 2000; Cardona et al., 2013). No Kuwait, no período compreendido entre 1986-1998, os casos relatados foram observados apenas em mulheres. Todavia, a incidência da doença pode variar segundo o sexo e a idade, e de um país a outro (Kubec; Dvorak; Alsaleh, 1998). Esta micose pode, em raras exceções, originar reações pruriginosas intensas na pele (Nora et al., 2002).

No Brasil ocorre com mais frequência no norte do país, acometendo homens e mulheres de qualquer idade (Khandpur; Reddy, 2002; Magalhães et al., 2008). Pontes e colaboradores (2002) notificaram os primeiros casos da doença no município de João Pessoa, Paraíba, Brasil. Dos 23 episódios da doença, apenas três acometeram os pacientes do sexo

masculino. Diniz e Souza Filho, (2005) reportaram 15 casos de piedra branca no estado do Espírito santo, que acometeram apenas mulheres.

O primeiro relato de piedra branca na região genital ocorreu em um homem com 34 anos de idade, proveniente da Europa Central (Schwinn et al., 1996). Este sítio da doença é a apresentação mais comum, de modo que é menos frequente em cabelos do couro cabeludo (Taj-Aldeen et al., 2004). Ambas as formas podem acometer qualquer indivíduo, independente do sexo ou idade (Diniz; Souza Filho, 2005).

De ocorrência preferencialmente tropical, a infecção possivelmente está relacionada ao hábito do uso de produtos oleosos que, aliados às condições ambientais, como clima quente e úmido, favoreçam o desenvolvimento da doença. Também foi sugerido que fatores individuais de cada indivíduo, o contato com materiais contaminados e animais infectados podem transmitir esta condição clínica (Figueras; Guarro, 2000; De Hoog, 2000; Roselino et al., 2008; Ríos; Rojas; Hincapié, 2012). Ainda, fatores relacionados com a sudorese excessiva, hábitos como prender os cabelos molhados ou úmidos, o uso de cremes e condições de base do indivíduo (imunodeficiências), estão intimamente ligados ao desenvolvimento desta tricopatía (Ríos; Rojas; Hincapié, 2012).

Fatores também associados ao desenvolvimento da doença podem incluir a falta de higiene pessoal, o baixo nível socioeconômico da população e ao hábito de tomar banhos em águas paradas (Kubec; Dvorak; Alsaleh, 1998; Youker et al., 2004; Richini-Pereira et al., 2012). A transmissão sexual também foi considerada, porém, é incerto se estes fatores influenciam de fato na patogênese da doença e na sua capacidade de transmissão interpessoal (Saxena et al., 2012; Ríos, Rojas; Hincapié, 2012).

Segundo Ellner et al. (1990), a piedra branca surge como resultado de uma infecção sinérgica entre o fungo inicialmente considerado como *T. beigeli* e a bactérias do gênero *Corynebacterium*, sendo observado invasão das regiões da cutícula e córtex do cabelo. Figueras e Guarro (2000) sugerem que pelo fato da bactéria ser sempre vista na periferia do nódulo ela não seria o invasor primário, apesar de haver um sinergismo mútuo entre a bactéria e a levedura. Segundo Taj-Aldeen, (2004) a bactéria *Brevibacterium mcbrellneri* poderia também estar relacionada no desenvolvimento desta tricopatía.

O fato da piedra branca apresentar uma clínica semelhante à de outras tricopatías indica a necessidade da realização do diagnóstico diferencial com os casos de pediculose e tricobacteriose, uma infecção causada por bactérias Gram positivas do gênero *Corynebacterium* (Roselino et al., 2008; Finch, 2011). Além destas infecções, Morales

Cardona et al. (2013), destacam ainda a tricolor nodosa, moniletrix, tricoptilosis, dermatite seborréica e a tinea capitis como condições diferenciais.

Desai e Nadkarni (2013) relataram um caso de infecção mista em uma paciente que apresentou lesões provocadas por *Trichosporon* sp. e *Piedraia hortae*, causando simultaneamente piedra branca e piedra preta. Os fungos acometeram uma mulher mulçumana adepta do uso do hijab e os autores denominam o presente achado como uma condição rara e, também, como nova forma de piedra. Esta mesma condição foi observada por Khatu; Poojary; Nagpur, (2013).

Taj-Aldeen et al. (2004), descreveram um caso de piedra branca com lesão extensa, em uma mulher de 28 anos ocasionado por *Trichosporon inkin* associada com *Candida parapsilosis* que apresentou um grande crescimento no isolamento primário em meio de cultivo. Todavia, os autores não relataram se a associação destas duas leveduras influenciou na patogênese da piedra.

Youker et al. (2004), observaram ao exame clínico do cabelo de uma paciente diminutos pontos brancos os quais, a microscopia direta, mostraram se tratar de nódulos delicados aderidos ao redor dos cabelos, constituídos por artrósporos e hifas. Em Sabouraud's dextrose agar (SDA), houve o crescimento de culturas de tonalidades que variaram do branco ao amarelo.

Segundo alguns pesquisadores, a piedra branca pode ocasionar perda de cabelo, estando este fato relacionado à aparente capacidade das leveduras do gênero *Trichosporon* de degradar a queratina, causando sua quebra (Kubec; Dvorak; Alsaleh, 1998; Khandpur; Reddy, 2002; Desai; Nadkarni, 2012), ou pela capacidade da infecção de se estender para outras regiões do cabelo, como o córtex (Ellner et al., 1990). Contudo, outros autores sugerem que esta infecção compromete apenas a cutícula do pelo (Figueras; Guarro, 2000; Bonifaz et al., 2010; Saxena; Uniyal; Bhatt, 2012).

Wan-qing et al.(1991) descreveram, pela primeira vez um caso atípico de piedra branca ocasionada por um fungo filamentosos hialino denominado de *Cephalosporium acremonium*. O caso foi descrito em uma criança do sexo feminino que apresentou nódulos brancos distribuídos de maneira irregular em tornos dos fios dos cabelos. As concreções dos nódulos eram rígidas e brancas, sendo formados por hifas e esporos do fungo em questão, não sendo isolado *Trichosporon*.

### 3.3 LEVEDURAS DO GÊNERO *Trichosporon*

O gênero *Trichosporon* pertence ao Reino *Fungi*, Filo *Basidiomycota*, Classe *Hymenomycetes*, Ordem *Trichosporonales*, Família *Trichosporonaceae*. Compreende um grupo de fungos leveduriformes anamorfos, com características morfológicas e genéticas distintas (Middelhoven et al., 2004).

Esse gênero foi proposto em 1890 para designar o agente etiológico da piedra colombiana, conceituada como uma micose superficial, cujo agente etiológico foi denominado por Behrend como *T. giganteum*. Desde então os estudos serviram de base para a inclusão dos agentes causadores de piedra (Chagas-Neto; Chaves; Colombo, 2008).

A origem do nome *Trichosporon* se baseia na junção de duas palavras de origem grega: *Trichos* que significa cabelo e *Sporon* que remete a esporo. Esta denominação se deve a infecção fúngica caracterizada pela formação de nódulos ao longo do eixo do cabelo (Chagas-Neto; Chaves; Colombo, 2008; Colombo; Padovan; Chaves, 2011).

Os estudos realizados por Parreira Horta permitiram a distinção entre os tipos de piedra: a branca e preta. Desse modo, o fungo filamentosso demácio causador da piedra preta foi posteriormente incluído no gênero *Piedraia* devido às suas características taxonômicas peculiares, e a piedra branca causada pelas leveduras do gênero *Trichosporon* (Arêa Leão, 1940; Chagas-Neto; Chaves; Colombo, 2008; Richini-Pereira et al., 2012).

O gênero *Trichosporon* foi considerado inicialmente como representado por uma única espécie, sendo atribuída a esta várias denominações (Arêa Leão, 1940). Assim, o agente da piedra branca foi intitulado por Rabenhorst em 1867 de *Pleurococcus beigeli* e em 1980 este fungo passou a ser chamado de *T. ovoides* por Behrend. Vuillemin (1902) observou lesões nodulares presentes em cabelos de peruca, obtendo em cultura o fungo causador da lesão denominando-o de *T. beigeli*. Porém, esta denominação entrou em sinonímia com *T. cutaneum*, de modo que este constitui um nome taxonômico válido e a primeira não mais representa um epíteto específico de valor taxonômico (Figueras; Guarro, 2000).

Como características utilizadas na identificação do gênero, são avaliadas a presença de artroconídios, blastoconídios e micélio hialino. Todas as espécies degradam uréia e algumas podem exibir pseudohifas e apressórios (Chagas-Neto; Chaves; Colombo, 2008; Bentubo et al., 2013). Deste modo, os padrões de assimilação de açúcares, resistência a cicloheximida e crescimento a 37° C tem sido os critérios mais comumente utilizados na

identificação das espécies de *Trichosporon*, além do uso de marcadores moleculares (Barnett; Payne; Yarrow, 2000; De Hoog, 2000; Taj-Aldeen et al., 2004).

Baseado em análises moleculares do rDNA, Guého et al. (1992) propuseram que o gênero *Trichosporon* fosse formado por 19 espécies distintas. Middelhoven et al. (2004), a partir dos resultados obtidos por meio de análises das regiões LSU, D1/D2, ITS do rDNA, e de testes não empregados usualmente na taxonomia de leveduras (Ácido úrico, etilamina, L-4-hydroxiprolina, tiramina e L-fenilalanina como fontes de carbono e nitrogênio, poligalacturonato, quinato, 4-etilfenol, fluoroglucinol, 2,3-dihidroxibenzoato, orcinol, L-ramnose e eritritol e o parâmetro da temperatura máxima de crescimento), consideraram o gênero como um grupo monofilético, com exceção de *T. pullulans*. Ao mesmo tempo, os referidos autores sugeriram a distribuição das espécies em quatro clados (Gracile, Cutaneum, Ovoides e Porosum).

O termo *pullulans* foi proposto inicialmente para um organismo leveduriforme que foi isolado de uma fábrica de cerveja, e que foi posicionado no gênero *Trichosporon*. Todavia, a partir de análises das sequências parciais da região ITS, dos domínios D1/D2 e das pequenas subunidades do rDNA, apontaram que esta espécie é distante filogeneticamente dos demais membros deste gênero. Deste modo, esta espécie foi posicionada em um novo gênero, que é formado unicamente pela espécie *Guehomyces pullulans* (Lindner) Fell e Scorzetti. Esta espécie apresenta maiores semelhanças com os membros do grupo *Cystofilobasidiales*, que engloba gêneros diversos e distintos como *Mrakia*, *Cystofilobasidium*, *Xanthophyllomyces*, *Phaffia*, *Udeniomyces* e *Cryptococcus* (Fell; Scorzetti, 2004).

O gênero está sob constante revisão sendo que atualmente é formado por 51 espécies, das quais 16 estão envolvidas em quadros clínicos. Atualmente, há a necessidade da correta caracterização dessas leveduras para que haja uma melhora no tratamento antifúngico, tendo em vista que os isolados de *T. asahii* podem apresentar uma resistência maior a Anfotericina B quando comparado aos triazóis (Taverna et al., 2014). Todavia, as demais espécies do gênero são mais resistentes aos triazóis. Nesse sentido, variações de sensibilidade entre os isolados podem ser identificadas por testes padronizados de sensibilidade a antifúngicos e por meio da análise da variabilidade genética das cepas (Bossche, 1997; Schaller et al., 2005).

Fuentefria et al. (2008), estudando uma levedura produtora da proteína *Killer* isolada a partir do intestino de insetos, verificaram se tratar de uma espécie do gênero *Trichosporon*

e, através do sequenciamento das regiões D1/D2, LSU do rDNA, a mesma foi denominada de *T. insectorum*. A partir do estudo de 25 espécies do gênero *Trichosporon*, Sugita et al. (2002) concluíram que os Loci 26S e 5S do rDNA constituem em regiões mais confiáveis na distinção filogenética das espécies desse gênero quando comparadas com a região ITS.

As espécies do gênero *Trichosporon* encontram-se amplamente distribuídas na natureza, sem predileção por ambientes específicos e, ocasionalmente, podem compor a microbiota alóctone do homem (Chagas-Neto, et al., 2008; Percival et al., 2011; Bentubo et al., 2013). Nesse contexto, *T. cutaneum* (Somenzi; Ribeiro; Menezes, 2006) e *T. asahii* (Menezes et al., 2012) foram citadas como integrantes da microbiota cutânea de humanos.

Dentre as diferentes espécies de *Trichosporon*, apenas seis estão mais envolvidas em quadros clínicos, estando incluídas nesse universo: *Trichosporon asahii*, *T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. inkin*, *T. mucoides* e *T. ovoides* (Richini-Pereira et al., 2012). No entanto, Sugita et al. (2002) citam as espécies *T. domesticum* e *T. montevidense* como importantes agentes causadoras de quadros alérgicos e nos casos de peritonite por hipersensibilidade (Davies; Thornton, 2014).

Particularmente, os relatos de piedra branca têm sido comumente atribuídos às espécies de *T. cutaneum*, *T. inkin* e *T. ovoides*, sendo esta última associada com a piedra da região pubiana (Sugita et al., 1995; Colombo; Padovan; Chaves, 2011). Os isolados de *T. asahii* e *T. mucoides* estão mais relacionadas com quadros de infecções sistêmicas (Hickey et al., 2009). *T. asteroides* e *T. cutaneum* são relatadas como causadoras de infecções sistêmicas e de outros tipos de infecções como onicomicosis e casos de piedra branca (Figueras; Guarro, 2000; Taj-Aldeen, et al., 2004; Carvalho et al., 2008; Richini-Pereira et al., 2012; Bentubo et al., 2013; Davies; Thornton, 2014).

Ademais, as espécies de *Trichosporon* apresentam diferenças quanto ao tipo de infecção que podem produzir (Taj-Aldeen et al., 2004), tendo sido relatadas causado quadros clínicos superficiais como onicomicoses, dermatites e piedra branca (Bentubo et al., 2013). Podem provocar ainda otomicoses, ceratite micótica, pneumonia, endocardite, encefalite, envolvimento renal e infecções disseminadas, sendo que nesses casos estas infecções são denominadas de trichosporonoses (Diniz; Souza Filho, 2005; Kumar et al., 2013; Vázquez-González et al. 2013).

O envolvimento do gênero *Trichosporon* também foi descrito em reações alérgicas do tipo pneumonites, originando lesões eritematosas e/ou necróticas em indivíduos com infecções graves (Desai; Nadkarni, 2012; Davies; Thornton, 2014). Em pacientes

imunocomprometidos pode ainda ocasionar infecções sistêmicas de mau prognóstico sendo comumente causada por *T. asahii* (Ellner et al., 1990; Somenzi; Ribeiro; Menezes, 2006; Davies; Thornton, 2014). Nestes casos, a identificação do agente etiológico e a determinação da sensibilidade antifúngica tornam-se indispensáveis para a aplicação do tratamento apropriado (Figueras; Guarro, 2000; Menezes et al., 2012).

Infecções por espécies de *Trichosporon* possuem uma alta taxa de mortalidade em doenças invasivas, ficando como segundo agente etiológico de fungemia, após as espécies de *Candida*. Assim, o diagnóstico precoce e preciso é fundamental para o estabelecimento da terapêutica adequada (Davies; Thornton, 2014). Em se tratando da piedra branca, não há nenhum comprometimento da vida.

Fallahi et al. (2012), relataram um caso atípico de lesões nos pés, as quais denominaram de tinea pedis, acometendo uma mulher de 29 anos de idade sem nenhuma condição de base. Contudo, as manifestações clínicas foram causadas por *T. faecale*. Todos os testes realizados deram suporte na identificação desta espécie como o agente desta micose. Em cultura, as colônias apresentaram um aspecto fissurado, brilhante e de coloração branca e bege. O exame microscópico da cultura revelou a presença de hifas septadas, arthroconídios e blastoconídios. De modo semelhante, outros trabalhos documentaram que espécies de *Trichosporon* podem ser agentes de *Tineas* (Oliveira et al., 2004; Chagas-Neto; Chaves; Colombo, 2008). Sendo que as espécies *T. inkin* e *T. jirovici* são as mais relatadas com quadros de infecções dermatofíticas (Hickey et al., 2009).

A capacidade de virulência e patogenicidade de *Trichosporon* relacionada com a promoção inicial da aderência das células fúngicas ainda encontra-se pouco esclarecida, o mesmo acontece com a piedra branca, em que os trabalhos ainda são insipientes. Neste sentido, talvez seja devido à intensa modificação da hidrofobicidade da superfície dos pelos e atuação de alguns constituintes químicos, bem como a ocorrência de sinergismo entre este fungo e bactérias do gênero *Corynebacterium*. Contudo, está bem estabelecido que o primeiro passo para o estabelecimento desta tricopatia denominada de piedra branca é a capacidade de aderência ao pelo (Ellner, et al., 1990; Figueiras; Guarro, 1997; Diniz; Souza Filho, 2005).

### 3.4 LEVEDURAS DO GÊNERO *Hyphopichia*

O gênero *Hyphopichia* está inserido dentro do Reino *Fungi*, Filo *Ascomycota*, Família *Ascoideaceae*. Este gênero é formado por fungos heterotáticos produtoras de ascos e ascósporos, sendo a espécie tipo deste gênero *Hyphopichia burtonii* (Boidin et al.) Arx & van der Walt (1976). As hifas são septadas e esses microrganismos possuem células conidiogênicas denticuladas produtoras de blastoconídios (Von Arx; Van Der Walt, 1976; Groenewald; Smith, 2010).

Esse fungo leveduriforme é um habitante comum do solo, além de já ter sido isolado de alimentos, animais e do trato intestinal e da pele humana (Von Arx; Van Der Walt, 1976). Foi demonstrado que *H. burtonii* é um patógeno de morcegos que possui a capacidade de lesionar a pele de indivíduos vivos (Simpson et al., 2013). Por outro lado, há escassos relatos desta espécie como agente de micose em humanos (Todaro; Germano; Criseo, 1983), porém, a sua patogenicidade é discutida (Guo et al., 2013).

### 3.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE PIEDRA BRANCA E OPÇÕES TERAPÊUTICAS

O diagnóstico laboratorial da piedra branca é confirmado apenas pela observação direta dos nódulos presentes na região extrafolicular dos pelos, com a presença dos seus elementos fúngicos característicos. Contudo, é indispensável a identificação dos agentes a nível de espécie, uma vez que para este fim são utilizados critérios morfológicos, provas bioquímicas, de aglutinação de antígeno e técnicas moleculares para esta finalidade (Figueras; Guarro, 2000; Magalhães et al., 2008; Cardona et al., 2013).

Os materiais clínicos obtidos dos sítios das lesões podem ser corados (Giemsa, Wright, PAS) ou preparados com solução de hidróxido de potássio (KOH) para observação à microscopia direta. Para o isolamento e identificação do agente é necessário realização da cultura do material (Kubec; Dvorak; Alsaleh, 1998; Vázquez-González et al., 2013).

O tratamento mais eficaz preconizado pela Academia Americana de Dermatologia envolve a tricotomia dos pelos e/ou cabelos afetados. Todavia, esta forma de tratamento não é aceito pelos acometidos, sobretudo pelas mulheres devido a razões estéticas. Também são utilizadas aplicações tópicas a base de antifúngicos sem, contudo, apresentar um resultado satisfatório ou por não possibilitarem a cura total (Khandpur; Reddy, 2002; Saxena; Uniyal;

Bhatt, 2012). Para Vázquez-González et al. (2013), o tratamento da pedra branca depende da apresentação clínica da doença e da espécie envolvida, uma vez que algumas espécies têm apresentado resistência ao fluconazol.

Segundo Taj-Aldeen et al. (2004), o uso de econazol e cetoconazol de aplicações diárias apresenta bons resultados. Todavia, Youker et al. (2004), observaram que a doença responde apenas casualmente a este tipo de tratamento. Os autores tem aconselhado o uso de antibacterianos devido a um possível comprometimento associado de bactérias.

Saxena; Uniyal; Bhatt (2012) encontraram efeito antifúngico significativo de óleos essenciais (*Cymbopogon winterians*, *Mentha piperita*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Melaleuca alternifolia* and *Eucalyptus globulus*) frente a isolados de *Trichosporon ovoides*.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do CCS/UFPE e as atividades só foram iniciadas mediante a aprovação. O projeto foi cadastrado na Plataforma Brasil com o seguinte número de Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE): 22718013.0.0000.5208.

### 4.1 CULTURAS DE *Trichosporon*: SELEÇÃO, REATIVÇÃO E ESTUDOS TAXONÔMICOS

As amostras foram solicitadas à Coleção de Culturas Micoteca URM ([www.ufpe.br/micoteca](http://www.ufpe.br/micoteca)), do Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), de acordo com a espécie e origem do substrato. Os isolados foram posteriormente avaliados quanto a viabilidade e características taxonômicas para seleção e uso dos testes.

### Características taxonômicas

Para verificação da viabilidade, fragmentos das culturas conservadas em óleo mineral foram transferidos para caldo glicosado e mantidos a 28°C ( $\pm 2^\circ$ ). Em seguida, foram semeadas em Sabouraud Dextrose Agar- SDA (Difco) para realização do estudo das características taxonômicas (Prova da uréase, assimilação de fontes de carbono e nitrogênio), de acordo com os critérios de Barnett; Payne; Yarrow, (2000) e De Hoog, (2000).

Foram retirados fragmentos dos isolados com 72 horas de crescimento em tubos com SDA, e inoculados no centro de placas de Petri contendo Ágar extrato de Malte e mantidas a temperatura de 28°C ( $\pm 2^\circ$ ) e 37°C por sete dias, para posterior avaliação dos aspectos macroscópicos.

### Hidrólise da ureia

Os isolados de *Trichosporon* com 48 horas de crescimento foram semeados em ágar ureia de Christensen e incubados a 28°C ( $\pm 2^\circ$ ), durante sete dias. Após esse período, foram avaliadas quanto a capacidade de produção da urease, através da mudança da cor amarela para o rosa. Esse teste será utilizado para confirmação em nível de gênero dos isolados analisados.

### Assimilação de fontes de Carbono (Auxonograma)

A levedura foi semeada em SDA a 28°C ( $\pm 2^\circ$ ) por 72 horas e, após o crescimento da levedura, foi preparado uma suspensão de células (0,5 na escala de MacFarland) em tubos de vidro contendo 9 mL de uma solução de água com extrato de levedura (YE). Em seguida, foi realizado o plaqueamento em profundidade (*pour plate*) da suspensão e, após a solidificação do meio, foram adicionados separadamente os açúcares e os compostos nitrogenados. As placas foram incubadas a 28°C ( $\pm 2^\circ$ ) por até três dias, sendo realizada uma leitura das placas para a avaliação de halo ao redor da fonte testada, indicando a utilização e crescimento pelo isolado avaliado.

## 4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS DE *Trichosporon* POR ANÁLISE PROTEÔMICA (MALDI-TOF MS)

Os isolados de *Trichosporon* que foram identificados por meio dos métodos clássicos para a identificação das leveduras foram submetidos à análise por espectrometria de massa (MALDI-TOF Autoflex III Bruker Laser nd:yag smartbeam, Bruker Daltonics Inc., USA/Germany).

As culturas foram repicadas em YAPD (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 20 g/L de glicose) e incubados a 28°C ( $\pm 2^\circ$ ) por 48 horas. Em seguida, um fragmento da colônia foi transferido para tubos do tipo Eppendorf contendo 0,3mL de água destilada esterilizada, em seguida foram agitadas em vortex e centrifugadas a 13.000g. O sobrenadante foi desprezado e ao tubo foi adicionado 0.9 mL de etanol puro, agitado e centrifugado a 13.000g por 2 min. O sobrenadante foi descartado sendo o pellet seco a temperatura de 28°C ( $\pm 2^\circ$ ) e, em seguida, ressuspendido em 50  $\mu$ L de ácido fórmico a 70%

com 50 $\mu$ L de acetonitrila. A última etapa foi seguida pela agitação em vortex e centrifugação a 13.000g for 2 min (Yaman; Akyar; Can, 2012; Leli, et al. 2013).

Foram colocados 1,5 $\mu$ L da suspensão, em duplicata, sobre placas de leitura e postas a secar a temperatura de 28°C ( $\pm$ 2°). Logo após a evaporação do líquido, foi adicionado 0,5 $\mu$ L da solução matrix (75mg/mL de 2,5-ácido dihidroxibenzóico [DHB] em etanol/água/acetonitrila [1:1:1] com 0,03% de ácido trifluoroacético [TFA]) e misturadas. As cepas de *Escherichia coli* e *Trichophyton rubrum* foram utilizadas como controle. (Putignani et al., 2010; Van Veen; Claas; Kuijper, 2010).

Os espectros para determinação do perfil proteico dos isolados foram gerados por meio de um laser de nitrogênio (337 nm). Os valores de massa das proteínas ribossomais da cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  foi utilizada para calibração. A variação de massa (2.000 a 20.000 Da) foi registrado utilizando um pulso linear de 104 ns com voltagem de +20 kV. Os espectros foram gerados pela soma de 20 disparos de laser e 50 perfis produzidos por amostra, produzindo um total de 10.800 disparos de laser somados por espectro. Os dados obtidos foram exportados para o software MALDI Biotyper 2.0 sendo que as identidades estão baseadas unicamente nos picos espectrais.

#### 4.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS LEVEDURAS DO GÊNERO *Trichosporon*

A extração e a quantificação do DNA dos isolados utilizados durante o experimento foram adaptados de Fredricks, Smith and Meier (2005). As espécies de *Trichosporon* foram crescidas a 37 °C por 48 h em placas de Petri contendo SDA (Difco). A massa celular foi transferida para tubos de microcentrifuga contendo pérolas de vidro, sendo adicionado em seguida 1,5mL de CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) pré-aquecido a 65°C. Os tubos foram agitados em aparelho do tipo FastPrep® (BIO 101, Farmingdale, New York, USA) por 1min a uma velocidade de 5,5m/s e, então, incubados a 65 °C por 1 h. Foi usado álcool clorofórmio-isoamílico para desproteínizar o extrato celular, seguido pela precipitação do DNA com álcool isopropanol, lavagem com etanol a 70% e ressuspendido em água ultrapura esterilizada. Em seguida, o DNA foi mantido a -20°C até o momento das análises.

A identificação foi realizada através do sequenciamento das regiões ITS (IDT, Commercial park, Coralville, Iowa, USA), IGS1 (Exxtend, São Paulo, Brazil) do rDNA.

Além destes primers, para o isolado URM1080 foi sequenciado o Domínio D1/D2. Os primers utilizados nas reações de PCR estão listados na tabela 1:

Tabela 1: Primers utilizados nas reações de PCR.

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>	
ITS	ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' ITS4 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	White; Bruns; Lee, 1990
IGS1	26SF 5'-ATCCTTTGCAGACGACTTGA-3' 5SR 5'-AGCTTGACTTCGCAGATCGG-3'	Sugita et al., 2002
D1/D2	NL1 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3' NL4 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG3'	Kurtzman; Robnett, 1998
ISSR	(GTG) <sub>5</sub> 5'- GTGGTGGTGGTGGTG-3'	Ali et al., 1996

O parâmetro de ciclagem utilizado para amplificação da região IGS1 foi a seguinte: Desnaturação inicial a 94 °C por 3 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 57 °C por 30 s, seguida de extensão a 72 °C por 1 min, com uma extensão final a 72 °C por 10 min. O parâmetro de ciclagem utilizada para a região ITS (ITS1–5.8s-ITS2) foi a seguinte: Desnaturação inicial a 95 °C por 7 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 min, anelamento a 57 °C por 2 min, seguida de extensão a 72 °C por 1 min, com uma extensão final a 72 °C por 10 min. Para o domínio D1/D2 do rDNA, foi utilizado o seguinte parâmetro de ciclagem: Desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 s, anelamento a 56 °C por 30 s, seguida de extensão a 72 °C por 1 min, com uma extensão final a 72 °C por 1 min. As reações foram realizadas em volumes finais de 25 µL. Os produtos obtidos nas reações de PCR foram purificados com o uso GenJET PCR Purification kit (Fermentas, UK). O sequenciamento foi realizado na Plataforma de Sequenciamento – LABCEN/CCB (UFPE).

As sequências geradas foram utilizadas para a pesquisa de padrões similares depositadas no banco de dados do NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) do GenBank, pelo uso da ferramenta BLASTn. Os amplicons gerados através do sequenciamento das regiões ITS e IGS1 foram alinhadas e editadas pelo programa MEGA 5, juntamente com as obtidas na base de dados do GenBank. A construção da árvore filogenética foi realizada pelo programa MEGA 5 com base no método de Neighbor Joining (NJ), Máxima verossimilhança (MV) e Máxima Parcimônia (MP), com um total de 5000 reamostragens de bootstrap

(Tamura et al., 2011). Foi considerado como critério para identificação final em nível de espécie um score igual ou superior a 99%.

#### 4.4 MODELO DE INFECÇÃO *in vitro* POR *Trichosporon* spp.

As amostras de cabelo utilizado no experimento foram provenientes de um indivíduo masculino de 27 anos de idade, branco, de boas condições de saúde e sem histórico de uso de produtos químicos no cabelo. O mesmo possuía cabelos crespos e de cor castanha.

O processo de infecção *in vitro* do fio capilar foi adaptado de Macedo et al., (2005). Fios de cabelo humano, desprovidos de tratamento químico, foram cortados com tesoura esterilizada com aproximadamente 1,0 cm de comprimento e pesados 0,05g em balança analítica (BelEngineering, Monza, Monza e Brianza, Italy). Este substrato foi acondicionado em placas de Petri de maneira homogênea e, esterilizados em autoclave (120°C por 15 min). Sob as mesmas condições, tubos contendo 2mL de água destilada sem antibiótico foram esterilizados. Ainda, uma porção dos cabelos esterilizados foi inoculado em SDA e um tubo teste semeado para controle de esterilização.

Foram preparadas suspensões dos isolados de *Trichosporon* em 2,0 mL de água destilada esterilizada, às concentrações de  $10^3$  e  $10^6$  células/mL (NCCLS, 2002). Em seguida, para cada suspensão, uma alíquota de 0,5 mL das suspensões foi vertida separadamente sobre os fios de cabelo contidos nas placas de Petri, sendo uma placa mantida a temperatura de 28°C ( $\pm 2^\circ$ ) e a outra a 37°C.

O experimento foi acompanhado durante intervalos de cinco dias até o 30º dia, sendo o processo de infecção avaliado através da observação macroscópica dos pelos e preparação de lâminas de vidro contendo parte dos cabelos possivelmente infectados. Sobre estas, foi adicionado solução aquosa a 20% de Hidróxido de Potássio (KOH), para análise em microscópio óptico, para a constatação do processo de infecção pelo fungo (Diniz; Souza Filho, 2005). Concomitantemente, outra porção dos pelos foram inoculados em meio SDA contido em placas de Petri (retrocultivo), sendo que o tempo de crescimento da cultura foi acompanhado por um período de sete dias a temperatura de 28°C ( $\pm 2^\circ$ ). Após o surgimento das culturas, estas foram purificadas e analisadas quanto à similaridade genética.

#### 4.5 ANÁLISE DA SIMILARIDADE GENÉTICA (RETROCULTIVO)

Os oligonucleotídeos utilizados como primers foram aqueles com sequências de repetições simples (Ali et al., 1986). Os fragmentos de DNA polimórficos das espécies analisadas foram amplificados em reações de PCR com o uso do primer GTG<sub>5</sub> (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3') (Bioneer, Daedeok-gu, Daejeon, South Korea).

As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 25 uL contendo 25 ng do DNA molde, 1X Taq buffer (Invitrogen life technologies), 0.75 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM de dNTPs (Fermentas, UK), 0.25 μM dos primers oligonucleotídeos e 0.1 U de Taq DNA polimerase (Fermentas, UK).

As amostras foram amplificadas em termociclador seguindo o protocolo: desnaturação inicial por 5 minutos a 93 °C; desnaturação por 20 segundos a 93 °C, anelamento por 45 segundos a 55 °C, extensão por 90 s a 72°C. Esta foi seguida por um ciclo de extensão final de 6 minutos a 72 °C. Os tubos com as amostras foram mantidos a 4 °C antes da análise. Trinta e dois ciclos de amplificação foram aplicados para todos os primers e as amostras passaram pelo processo de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-acetate-EDTA TAE [pH 8,0] a 100 V por 30 minutos, corados com GelRed™ (Biotium, Hayward, USA), visualizados com luz ultravioleta e fotografados. O padrão de bandas das pistas do DNA genômico entre os isolados originais e os obtidos no retrocultivo foi comparado (Rodrigues et al., 2004).

#### 4.6 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL E ELEMENTAR

O material biológico (leveduras, cabelos infectado e não infectado) foi fixado com solução tampão de Glutaraldeído a 2,5% por 12 horas a 4°C e em seguida procedeu-se a lavagem do material com tampão cacodilato de sódio a 0,2M (3x por 10 minutos). Em seguida, as amostras foram fixadas com ósmio a 50% durante uma hora, desidratadas pela imersão em solução de acetona e submetidas ao ponto crítico. Em seguida, as amostras foram montadas em *stubs* e metalizadas com o equipamento Leica EM SDC500 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) (Figueras; Guarro, 1997; Corbari et al., 2008; Iturrieta-Gonzalez et al., 2014). As micrografias foram obtidas com um microscópio eletrônico de varredura (SEM; Quanta 200 FEG), que possui três modos operacionais de vácuo: alto vácuo; baixo vácuo e modo ambiental. O MEV estava equipado com

espectrômetro de dispersão de energia (EDS), e operava com uma voltagem de 200 V a 30 kV possuindo uma corrente do feixe maior do que 100 nA, com aumento na ordem de 12 vezes (Distância de trabalho mais longa) a 1.000.000x em alto e baixo vácuo.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 REVISÃO TAXONÔMICA DOS ISOLADOS

Foram obtidos pela coleção de cultura da Micoteca URM, UFPE 18 isolados pertencentes ao gênero *Trichosporon*, sendo três (16,67%) isolados de *T. asahii*, quatro (22,22%) *T. beigelii*, três (16,67%) de *T. cutaneum*, dois (11,11%) *T. inkin*, quatro (22,22%) *T. ovoides* e dois (11,11%) *T. pullulans*. Das linhagens associadas aos seus números de identificações, foi possível verificar o ano de estoque e substratos de isolamento como sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2. Linhagens de *Trichosporon* da Coleção de Cultura Micoteca URM, UFPE em relação ao ano de preservação e substrato de origem.

Espécie	Isolado URM	Ano de depósito	Substrato/Hospedeiro
<i>Trichosporon asahii</i>	6356	2011	Sangue
<i>T. asahii</i>	6074	2009	Cérebro
<i>T. asahii</i>	5781	2008	Escamas epidérmicas
<i>T. beigelii</i>	4437	2002	Solo de praia
<i>T. beigelii</i>	4251	2000	Sangue
<i>T. beigelii</i>	4250	2000	Sangue
<i>T. beigelii</i>	1080	1958	Cabelo
<i>T. cutaneum</i>	6295	2011	Escamas ungueais
<i>T. cutaneum</i>	6073	2009	Pulmão
<i>T. cutaneum</i>	5743	2008	Úlcera de Córnea
<i>T. inkin</i>	6261	2010	Secreção traqueal
<i>T. inkin</i>	5973	2009	Escamas ungueais
<i>T. ovoides</i>	6763	2012	Transplante renal
<i>T. ovoides</i>	6293	2011	Escamas ungueais
<i>T. ovoides</i>	6292	2011	Escamas ungueais
<i>T. ovoides</i>	6291	2011	Escamas ungueais
<i>T. pullulans</i>	4259	2000	Secreção orofaríngea
<i>T. pullulans</i>	3963	1998	Polpa de manga

Dentre os substratos de origem, 16 isolados de leveduras foram recuperados como agentes de micoses em processos infecciosos acometendo o homem. Destas leveduras, um isolado (URM1080) foi obtido a partir da infecção do fio capilar e duas (URM3963 e URM4437) foram isoladas do ambiente. Foram depositados dez (55,55%) isolados há menos de cinco anos na Coleção de Cultura URM, sendo que apenas cinco foram incorporados à coleção em um período maior que dez anos. A espécie mais antiga (URM1080) foi depositada no ano de 1958 e foi isolada como agente infecção do fio capilar. Verificou-se

assim, que o tempo de estocagem das leveduras do gênero *Trichosporon* pode ser superior a 16 anos, sem perda da viabilidade e aspectos taxonômicos típicos do gênero.

Todos os isolados estavam preservados em óleo mineral (Sherf, 1943), sendo que este método mostrou-se eficiente para a estocagem das leveduras, uma vez que manteve a viabilidade e características morfofisiológicas. De acordo com Nakasone et al. (2004), o período de armazenamento das culturas de *Trichosporon* pode ser superior a 32 anos. Resultados semelhantes foram obtidos por Maciel; Mota, (2007) os quais verificaram que o tempo de estocagem para alguns fungos pode ser maior do que 53 anos.

Dos 18 isolados analisados no estudo, 14 apresentaram colônias de coloração creme e quatro exibiram coloração branca e/ou creme quanto a temperatura de crescimento foi de 37°C. O aspecto das colônias de 13 isolados foi o mesmo nas duas temperaturas, prevalecendo o aspecto cerebriforme. Porém, cinco isolados exibiram uma alteração na morfologia da cultura quando se alterou a temperatura de crescimento (Tabela 3). Foi observado que os isolados apresentaram crescimento diferenciado a depender da temperatura de exposição. No entanto, foi visível que a temperatura de 28°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) foi a ideal para o desenvolvimento das colônias. Todavia, o isolado URM4437 não apresentou alterações no crescimento, sendo observado que o diâmetro de crescimento foi semelhante em ambas às temperaturas.

Tabela 3: Aspectos das colônias de *Trichosporon* crescidas em ágar extrato de malte, após confirmação taxonômica.

Espécie	Isolado	Crescimento a 28°C (± 2°C)			Crescimento a 37°C		
		Cor	Largura	Aspecto da colônia	Cor	Largura	Aspecto da colônia
<i>Trichosporon asahii</i>	6356	Branca	4,0 cm	Cerebriforme	Branca	2,5 cm	Cerebriforme
	6074	Branca	3,1 cm	Cerebriforme	Branca	1,7 cm	Cerebriforme
	5781	Creme	4,4 cm	Cerebriforme	Creme	3,3 cm	Cerebriforme
	6295	Creme	4,0 cm	Rugosa	Creme	2,1 cm	Crateriforme
	5743	Creme	4,6 cm	Cerebriforme	Creme	3,2 cm	Rugosa/ Elevada
	6261	Branca	4,0 cm	Cerebriforme	Branca	3,0 cm	Cerebriforme
	5973	Creme	4,6 cm	Cerebriforme	Branca/ Creme	3,2 cm	Cerebriforme
	6763	Branca/ Creme	4,4 cm	Cerebriforme	Branca/ Creme	3,5 cm	Cerebriforme
<i>T. faecale</i>	4250	Creme	2,7 cm	Rugosa	Creme	1,4 cm	Rugosa
	4259	Creme	3,6 cm	Cerebriforme	Branca	1,9 cm	Cerebriforme
	3963	Creme	3,2 cm	Cerebriforme	Creme	1,9 cm	Cerebriforme
<i>T. montevidense</i>	6291	Creme	4,4 cm	Cerebriforme	Creme	1,8 cm	Rugosa
	4251	Creme	3,7 cm	Cerebriforme	Creme	1,9 cm	Cerebriforme
	6073	Creme	1,9 cm	Lisa/ Elevada	Creme	0,7 cm	Lisa/ Elevada
	6293	Creme	3,7 cm	Cerebriforme	Creme	1,9 cm	Rugosa
	6292	Creme	4,8 cm	Cerebriforme	Creme	1,3 cm	Cerebriforme
<i>T. mycotoxinivorans</i>	4437	Creme	4,5 cm	Rugosa	Branca	4,3 cm	Rugosa
<i>Hyphopichia burtonii</i>	1080	Creme	2,9 cm	Plana	Creme	1,1 cm	Rugosa

Podemos observar que estas características conferem com o que vem sendo descrito por diversos autores para o gênero *Trichosporon* (Area Leão, 1941; Barnett; Payne; Yarrow, 2000; De Hoog, 2000; Middelhoven et al., 2004). Nossos resultados discordam de outros autores que notaram um melhor crescimento dos isolados de procedência clínica a temperatura de 35°C (Li et al., 2005; Guého et al., 1992). Isto pode sugerir que a capacidade

de crescimento a que as diferentes espécies foram mantidas não possui relação com o substrato de origem dessas leveduras.

No presente estudo, foi verificado que os testes fenotípicos e bioquímicos que foram realizados para a identificação dessas leveduras foram inconclusivos para a confirmação taxonômica dos isolados. Esta dificuldade de identificação, representado pelos métodos bioquímicos e fenotípicos, vem sendo relatados por outros estudos que afirmam a importante realização de testes moleculares para identificação das espécies de *Trichosporon* (Rodriguez-Tudela, 2005; Taverna et al., 2014). Ademais, a taxonomia dessas leveduras está em constante mudança, de modo que a revisão dessas espécies é necessária para que permaneçam condizentes com as novas descobertas e alterações taxonômicas (Sugita et al., 2004).

Segundo a literatura especializada, o gênero *Trichosporon* é caracterizado pela presença de artroconídios, blastoconídios, hifas hialinas e pseudo-hifas (Chagas-Neto, Chaves e Colombo, 2008; Bentubo et al., 2013). Além disso, as leveduras do gênero *Trichosporon* podem crescer em diferentes faixas de temperatura (De Hoog, 2000; Barnett; Payne; Yarrow, 2000). De acordo com as características observadas por Area e Leão (1941), as leveduras deste gênero podem ter diferentes aspectos quando crescidos em diferentes meios de cultivo (ágar cenoura, ágar czapeck, ágar batata), sendo que em ágar Malte e ágar Glicosado as colônias possuem aspectos semelhantes. No estudo descritivo de isolados do gênero *Trichosporon* realizado por Guého et al. (1992), o ágar malte foi o meio utilizado para as descrições micromorfológicas das leveduras.

Em relação ao perfil fenotípico dos isolados de *Trichosporon*, a assimilação de alguns açúcares tem sido citada como prova diferencial entre isolados de importância médica dos de origem ambiental e diferentes temperaturas de crescimento, como: (I) capacidade de assimilação de L-arabinose, melibiose, myo-inositol e sorbitaol, (II) crescimento a 35°C, (III) além das características macroscópicas e microscópicas das leveduras (De Hoog, 2000; Guého, et al., 1994).

Tendo em vista a diversidade do grupo, estas provas podem não ser suficientes para classificar os membros do gênero *Trichosporon* em nível de espécie, uma vez que isolados de espécies diferentes podem exibir variações insuficientes nos perfis de assimilação dos açúcares e semelhanças nas características macroscópicas e micro-morfológicas (Middelhoven et al., 2004; Li et al., 2005; Rodriguez-Tudela et al., 2005; Almeida Junior et al., 2014).

Pesquisas apontam que pode haver discordâncias quanto a não confirmação taxonômica de isolados depositados em Coleções de Cultura, devido ao emprego de testes mais precisos (Lima; Borba, 2001; Lima et al., 2004; Borman et al., 2006). Assim, se faz necessário a realização de revisões taxonômicas mais acurados de isolados depositados com *Trichosporon* sp., assim, possibilitando esclarecer eventuais dúvidas quanto à identidade destas leveduras (Hickey et al., 2009).

## 5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE *Trichosporon* POR ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF MS

Todos os 18 isolados foram submetidos à análise por espectrometria de massa MALDI-TOF MS. Desses, dez isolados apresentaram um score de identificação maior ou igual a 2,00 e seis (33,33%) possuíram um score compreendido entre 1,700 a 1,999 (Tabela 4). Deste modo, oito (44,44%) isolados foram identificados como *T. asahii*, quatro (22,22%) como *T. montevidense*, três (16,67%) como *T. faecale* e um (5,55%) como *T. mycotoxinivorans*. A identificação de 15 dos 16 isolados estava condizente com os dados obtidos pela análise das sequencias das regiões ITS e IGS do rDNA. Todavia, não foram obtidos picos de identificação para dois isolados (URM1080 e URM6295) e um deles foi identificado erroneamente como *T. asahii* (URM6293), uma vez que não foi consistente com os resultados da identificação molecular. Apesar de seis isolados não terem apresentado um bom score de identificação (< 2), os dados foram compatíveis com os resultados obtidos pela análise genética.

Tabela 4: Isolados utilizados no estudo, demonstrando a identificação de acordo com a metodologia de Espectroscopia de Massa MALDI-TOF MS.

Linhagem obtida na Micoteca	Número de depósito	MALDI-TOF MS	Score
<i>Trichosporon asahii</i>	6356	<i>T. asahii</i>	2,11
<i>T. asahii</i>	6074	<i>T. asahii</i>	1,99
<i>T. asahii</i>	5781	<i>T. asahii</i>	2,13
<i>T. beigelii</i>	4437	<i>T. mycotoxinivorans</i>	2,00
<i>T. beigelii</i>	4251	<i>T. montevideense</i>	2,07
<i>T. beigelii</i>	4250	<i>T. faecale</i>	2,01
<i>T. beigelii</i>	1080	---	---
<i>T. cutaneum</i>	6295	---	---
<i>T. cutaneum</i>	6073	<i>T. montevideense</i>	1,87
<i>T. cutaneum</i>	5743	<i>T. asahii</i>	2,19
<i>T. inkin</i>	6261	<i>T. asahii</i>	1,95
<i>T. inkin</i>	5973	<i>T. asahii</i>	2,15
<i>T. ovoides</i>	6763	<i>T. asahii</i>	2,14
<i>T. ovoides</i>	6293	<i>T. asahii</i>	2,21
<i>T. ovoides</i>	6292	<i>T. montevideense</i>	1,83
<i>T. ovoides</i>	6291	<i>T. montevideense</i>	2,19
<i>T. pullulans</i>	4259	<i>T. faecale</i>	1,94
<i>T. pullulans</i>	3963	<i>T. faecale</i>	1,99

De acordo com o manual do fabricante (BRUKER Daltonik MALDI), os perfis gerados são agrupados em três categorias, sendo que os valores gerados variam em uma escala de 0 a 3. Os scores compreendidos entre 1,700 a 1,999 dão suporte para identificação em nível de gênero e aqueles valores entre 2,000 e 3,000 indicam uma provável identificação da espécie da levedura.

A Espectrometria de massa (MALDI-TOF MS) tem sido utilizada para o diagnóstico microbiológico fungos obtidos diretamente dos meios de cultura (Leli et al., 2013). Este método tem surgido como uma ferramenta precisa e rápida para a identificação de leveduras e fungos filamentosos (Kolecka et al., 2013). Como principais vantagens da utilização deste método, podem ser citados: (I) Possui um preparo simples das amostras; (II) Não necessita de coloração; (III) Necessidade de pouco volume da amostra; (IV) Obtenção de resultados rápidos e (V) Baixo custo (Martinez-Lamas et al., 2011).

A Espectroscopia de Massa MALDI-TOF MS é atualmente uma ferramenta que apresenta uma alta especificidade utilizada para identificação de isolados de *Trichosporon* em nível de espécie. Entretanto, os resultados são altamente dependentes da qualidade das bibliotecas presentes nos equipamentos utilizados e do método empregado na extração das proteínas (Almeida Junior et al., 2014).

Nossos resultados discordam dos obtidos por Kolecka et al. (2013), que relataram que esta técnica pode não ser capaz de identificar corretamente os isolados que apresentarem scores abaixo de dois, principalmente entre as espécies com uma grande proximidade filogenética. Os testes foram realizados em triplicata para cada isolado, sendo que foram obtidos diferentes scores para isolados da mesma espécie. Essa diferença poderia ser atribuída à ampla variabilidade de padrões morfológico das leveduras em cultura (Almeida Junior et al., 2014).

### 5.3 SEQUENCIAMENTO DAS REGIÕES ITS E IGS1 DO rDNA E ANÁLISE FILOGENÉTICA DO GÊNERO *Trichosporon*

Para a realização dos estudos filogenéticos, foram analisados 16 isolados de *Trichosporon* spp. provenientes da Micoteca URM, 16 sequências obtidas no *GenBank* e duas cepas utilizadas como grupos externos, de modo que totalizaram 34 sequências alinhadas da região ITS. A amplificação da região ribossomal ITS1-5.8S-ITS2, originou amplicons de DNA de tamanhos compreendidos entre 354 a 537pb para os isolados. A busca por sequências similares no *GenBank*, através da ferramenta BLAST, gerou resultados satisfatórios que exibiram um coeficiente de identidade  $\geq 99\%$ . Todavia, o DNA do isolado URM6291 não foi amplificado.

Foi observado que a análise da região ITS não proporcionou a diferenciação em nível de espécie dos isolados de *Trichosporon* utilizados no estudo. Todas as sequências dos isolados identificados como *T. montevidense* foram agrupadas conjuntamente, obtendo-se um número de bootstrap de 99%. Os três isolados de *T. faecale* também foram agrupados juntos obtendo-se um número de bootstrap de 95%. Porém, o mesmo não foi observado para dois isolados *T. asahii* (URM6074 e URM5743) que foram alinhados separadamente.

Os isolados de *T. faecale* estavam muito próximos das cepas de *T. asahii*, possivelmente devido a sua grande proximidade filogenética (Bootstrap 99%) observada na árvore (Figura 07). Isto pode estar relacionado com o alto índice de similaridade das sequências (Similaridade  $\geq 99\%$ ) observado entre outros isolados de *Trichosporon* usados na construção da árvore (*T. japonicum* NRO73263, *T. asteroides* NRO73241, *T. coremiiforme* NRO73249, *T. faecale* NRO73242). O mesmo foi observado por Taverna et al. (2014), sendo que os autores também verificaram que as sequências obtidas para a região ITS também

eram muito similares (similaridade  $\geq 99\%$ ). Deste modo, isto poderia justificar o porquê do alinhamento dos isolados de *T. faecale* juntos aos de *T. asahii* utilizados nesta pesquisa.

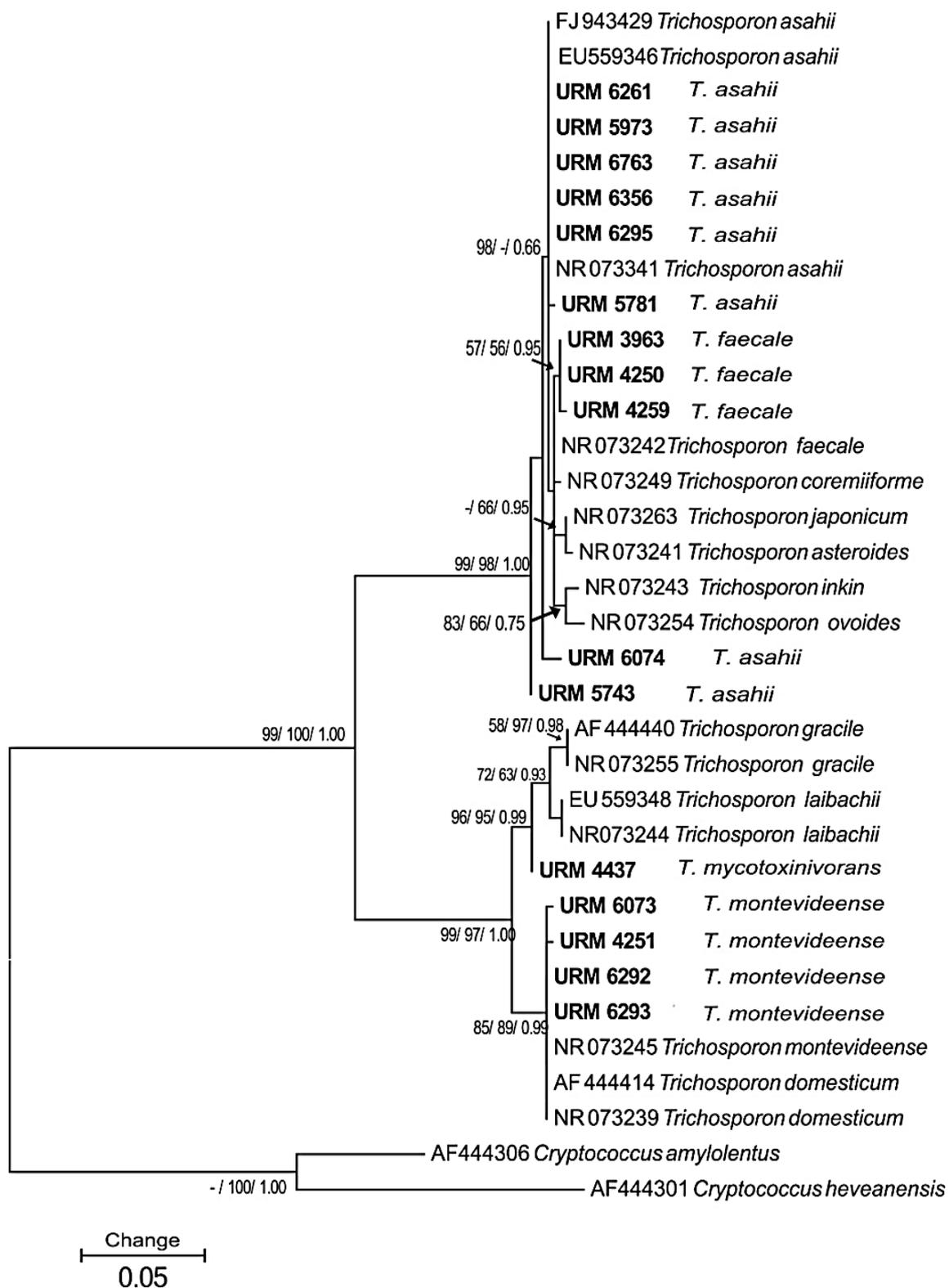


Figura 07: Árvore filogenética dos isolados de *Trichosporon*. Análise de Neighbor joining, Máxima verossimilhança e Inferência bayesiana, foram inferidas através das sequências parciais da região ITS usando o soft MEGA 5.0. Valores de bootstrap originados a partir de 5.000 repetições estão indicados nos nós. *Cryptococcus amyloletus* e *Cryptococcus heveanensis* foram utilizados como grupo externo.

A região ITS do rDNA é muito homóloga, sendo que a similaridade desta região tem implicado diretamente na ideia de um grupo monofilético para o gênero *Trichosporon*. Apesar de alguns estudos indicarem que a análise da região ITS ser confiáveis na distinção de leveduras em nível de espécie (Sugita et al., 2002; Middelhoven et al., 2004; Li et al., 2005), tem se observado que não é uma ferramenta capaz de diferenciar espécies que possuem uma maior proximidade filogenética (Gueho et al., 2002; Gueho et al., 2004; Avin et al., 2014). Isto estaria relacionado com o fato de essa região do rDNA possuir apenas 1% de nucleotídeos diferentes nas espécies mais semelhantes. Observamos que apenas a análise desta região do rDNA pode não ser uma ferramenta suficientes para a determinação da identidade dos isolados de *Trichosporon* (Almeida Junior et al., 2014).

Em relação a região IGS do rDNA, os produtos das reações originaram sequencias de tamanhos compreendidos entre 570 a 780pb. Foram utilizadas 16 sequências provenientes do *GenBank* e duas cepas controle na construção da árvore. Apenas foram consideradas, para a construção da árvore filogenética (Figura 08), aquelas sequências que apresentaram um coeficiente de identidade  $\geq 99\%$ . Foram sequenciados o rDNA da região IGS1 de 17 isolados, porém o rDNA do isolado URM1080 não o foi.

Todos os isolados utilizados no estudo (*Trichosporon asahii*, *T. faecale*, *T. montevideense* e *T. mycotoxinivorans*) apresentaram sequências com valores de similaridade  $\geq 99\%$  com as sequencias de suas espécies correspondentes obtidas no banco de dados do *GenBank*. Observou-se que para outras espécies a porcentagem de similaridade foi  $<85\%$ . De acordo com as análises realizadas, as espécies que foram estudados no estudo estão posicionadas no clado Gracile (*Trichosporon mycotoxinivorans* e *T. montevideense*) e Ovoides (*T. asahii* e *T. faecale*) como previamente propostos pela literatura especializada (Middelhoven et al., 2004; Molnar et al., 2004).

As regiões IGS são porções não codificadoras do rDNA posicionadas entre as regiões 28S, 5S e 18S (Avin et al., 2014). O emprego deste marcador em estudos filogenéticos foi aplicado para o estudo de poucos fungos (*Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Filobasidiella neoformans*, *Neotyphodium lolii*, *Collybia fusipes* e *Trichosporon* spp), e tem se destacado por distinguir espécies com uma grande proximidade filogenética (Sutar et al., 2004; Taverna et al., 2014).

Atualmente, a análise da região IGS do rDNA constitui uma das ferramentas mais confiáveis para a distinção de espécies de *Trichosporon*, principalmente por ela possuir uma maior variedade genética do que o gene 28S do rRNA e as sequencias da região ITS (Sugita

et al., 2002; Sugita et al., 2004). Em um estudo realizado por Davies; Thornton, (2014), os autores julgaram necessária a diferenciação das espécies de *Trichosporon* implicadas em casos de micoses, através do sequenciamento desta região do DNA ribossomal.

Apesar da região IGS1 ainda ser pouco utilizado com a finalidade de identificar isolados de *Trichosporon*, ela oferece um maior suporte para a confirmação das identidades destas leveduras. Além de ter a vantagem de excluir possíveis influências ambientais e de poder detectar uma maior diversidade genética (Buso, 2005). Atualmente, esta região é muito utilizada para separação de espécies de *Trichosporon* por genótipos (Sugita et al., 2002; Sugita et al., 2004; Iturrieta-Gonzalez et al., 2014; Taverna et al., 2014).

De maneira geral, os dados obtidos através do sequenciamento das regiões ITS e IGS estavam em consonância, sendo desta forma os isolados identificados em nível de espécie. Esses marcadores, em conjunto, permitiram a identificação de forma eficiente para os isolados utilizados no estudo, sendo que a região IGS apresentou uma maior especificidade quando comparada com a região ITS. Assim, não foram notadas diferenças no alinhamento das sequências de ITS para os isolados de *T. asahii* e *T. faecale*, enquanto que na árvore das sequências de IGS foram formados dois grupos bem suportados.

A maioria dos trabalhos que analisaram sequências dessas duas regiões do DNA ribossomal descreveram resultados semelhantes (Sugita et al., 2002; Sugita et al., 2004; Avin et al., 2014; Taverna et al., 2014). Entretanto, não é aconselhado o uso de apenas um tipo marcador para a determinação da identidade das espécies de *Trichosporon* (Middelhoven et al., 2004; Hickey et al., 2009).

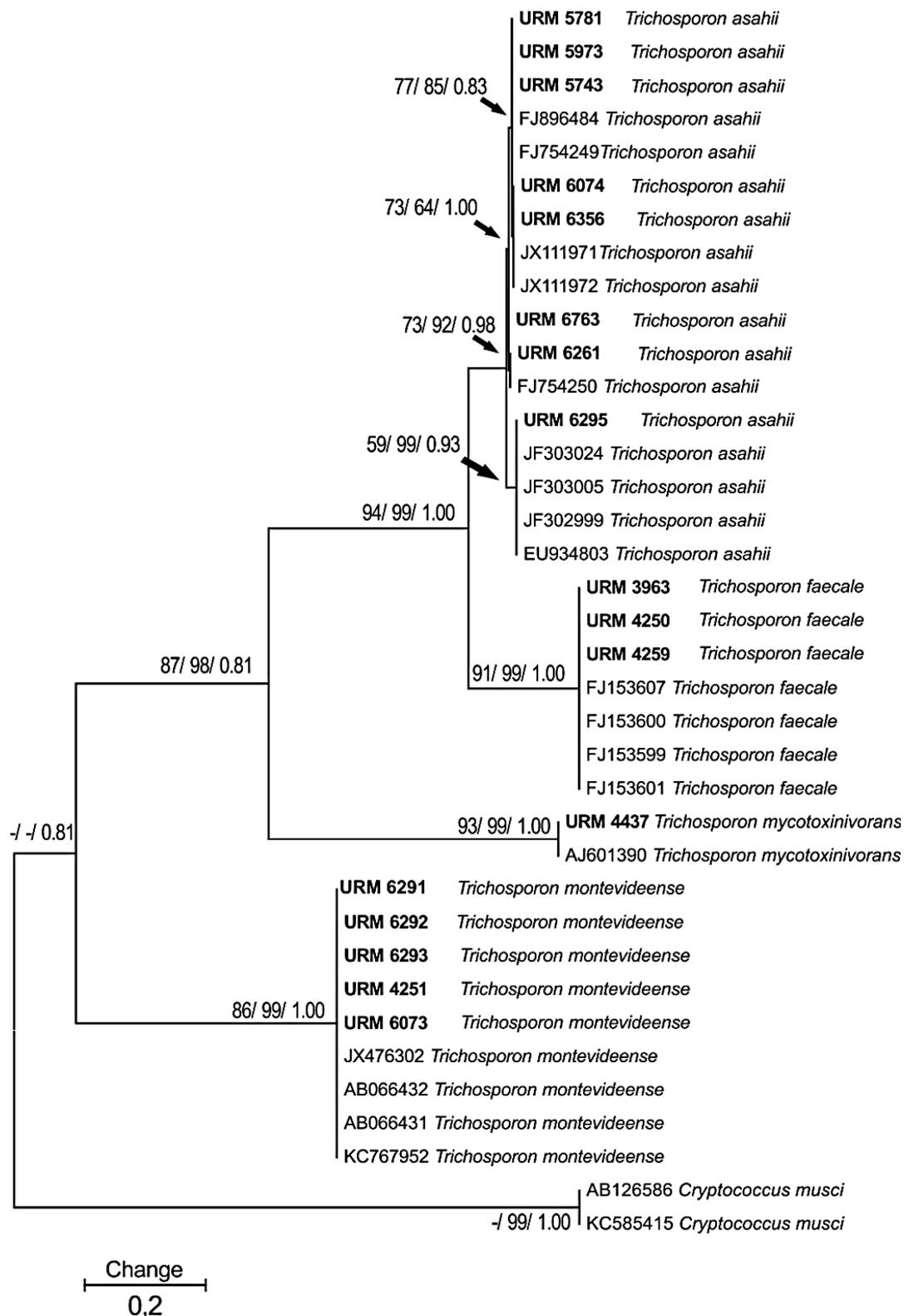


Figura 08: Árvore filogenética dos isolados de *Trichosporon* preservados na Micoteca URM. Análise de Neighbor joining, Máxima verossimilhança e Inferencia bayesiana, foram inferidas através das sequências parciais da região IGS usando o soft MEGA 5.0. Valores de bootstrap que foram originados a partir de 5.000 repetições são indicados nos nós. *Cryptococcus musci* foram utilizados como grupo externo.

Deste modo, a realização do sequenciamento das regiões ITS, IGS1 além do uso da ferramenta de identificação por espectroscopia de Massa MALDI-TOF MS permitiram a confirmação da identidade taxonômica dos isolados utilizados no estudo. Esses métodos permitiram identificar os isolados depositados como *Trichosporon* sp., como espécies de *Trichosporon asahii* (8 isolados), *T. faecale* (3 isolados), *T. montevidense* (5 isolados) e *T. mycotoxinivorans* (1 isolado). Além disto, um isolado que estava depositado como *T. pulullans* (URM1080) não foi capaz de hidrolisar ureia, sendo que após revisão taxonômica por métodos moleculares verificou-se que este isolado não pertencia ao gênero *Trichosporon*, e sim se tratar do fungo *Hyphopichia burtonii* através do sequenciamento das regiões ITS e LSU (Tabela 5).

Tabela 5: Identificação polifásica dos Isolados utilizados no estudo por meio da Espectroscopia de Massa MALDI-TOF MS e sequenciamento das regiões ITS e IGS1.

Isolado Micoteca URM	URM ID	Identificação pela metodologia do MALDI-TOF MS	Identificação através do sequenciamento da região ITS	Identificação através do sequenciamento da região IGS1
<i>Trichosporon asahii</i>	6356	<i>T. asahii</i>	<i>T. asahii</i>	<i>T. asahii</i>
<i>T. asahii</i>	6074	<i>T. asahii</i>	<i>T. asahii</i>	<i>T. asahii</i>
<i>T. asahii</i>	5781	<i>T. asahii</i>	<i>T. asahii</i>	<i>T. asahii</i>
<i>T. beigelii</i>	4437	<i>T. mycotoxinivorans</i>	<i>T. mycotoxinivorans</i>	<i>T. mycotoxinivorans</i>
<i>T. beigelii</i>	4251	<i>T. montevidense</i>	<i>T. montevidense</i>	<i>T. montevidense</i>
<i>T. beigelii</i>	4250	<i>T. faecale</i>	<i>T. faecale</i>	<i>T. faecale</i>
<i>T. beigelii</i>	1080*	---	---	---
<i>T. cutaneum</i>	6295	---	<i>T. asahii</i>	<i>T. asahii</i>
<i>T. cutaneum</i>	6073	<i>T. montevidense</i>	<i>T. montevidense</i>	<i>T. montevidense</i>
<i>T. cutaneum</i>	5743	<i>T. asahii</i>	<i>T. asahii</i>	<i>T. asahii</i>
<i>T. inkin</i>	6261	<i>T. asahii</i>	---	<i>T. asahii</i>
<i>T. inkin</i>	5973	<i>T. asahii</i>	<i>T. asahii</i>	<i>T. asahii</i>
<i>T. ovoides</i>	6763	<i>T. asahii</i>	<i>T. asahii</i>	<i>T. asahii</i>
<i>T. ovoides</i>	6293	<i>T. asahii</i>	<i>T. montevidense</i>	<i>T. montevidense</i>
<i>T. ovoides</i>	6292	<i>T. montevidense</i>	<i>T. montevidense</i>	<i>T. montevidense</i>
<i>T. ovoides</i>	6291	<i>T. montevidense</i>	---	<i>T. montevidense</i>
<i>T. pullulans</i>	4259	<i>T. faecale</i>	<i>T. faecale</i>	<i>T. faecale</i>
<i>T. pullulans</i>	3963	<i>T. faecale</i>	<i>T. faecale</i>	<i>T. faecale</i>

\* O isolado URM1080 (*Hyphopichia burtonii*) foi identificado pelo sequenciamento dos domínios D1/D2 do rDNA.

## 5.4 CARACTERÍSTICAS DAS LEVEDURAS AVALIADAS

### 5.4.1 *Trichosporon asahii* Akagi

Após sete dias de crescimento em ágar extrato de malte, as colônias mostraram tonalidades de branco a creme e, ainda exibirem ambas as cores na mesma colônia. Estas apresentaram crescimento moderado, além de franjados proeminentes e possuíam aspecto cerebriforme com topografia das colônias elevadas. Fissuras nas zonas marginais da colônia estavam presentes. O maior diâmetro de crescimento foi de 4,6 cm, a temperatura de 28°C ( $\pm 2^\circ$ ), e o menor de 1,7 cm a 37°C (Figura 2). Ao exame microscópico da cultura foi evidenciada a presença de hifas hialinas, artroconídios alongados e em forma de barril e blastoconídios ovais ou alongados sem apresentar brotação lateral (Figura 02). Todos os isolados dessa espécie foram obtidos de processos infecciosos do homem, causando quadros clínicos diversos. Os achados macroscópicos das colônias diferiram dos demais isolados utilizados nesta pesquisa.

As espécies de desse gênero apresentam crescimento rápido, sendo que suas colônias são secas, de coloração branca ou creme podendo ter um aspecto farináceo, além de possuírem as zonas marginais fissuradas. Ao exame microscópico da cultura, podem ser observados blastoconídios em brotação única e artroconídios em forma de barril, com a ausência de células apressórias. Como características diferenciais, pode ser citada a capacidade de assimilação de L-arabinose e a não assimilação de melibiose e todos os isolados podem crescer a 37°C (Barnett; Payne; Yarrow, 2000; De Hoog, 2000).

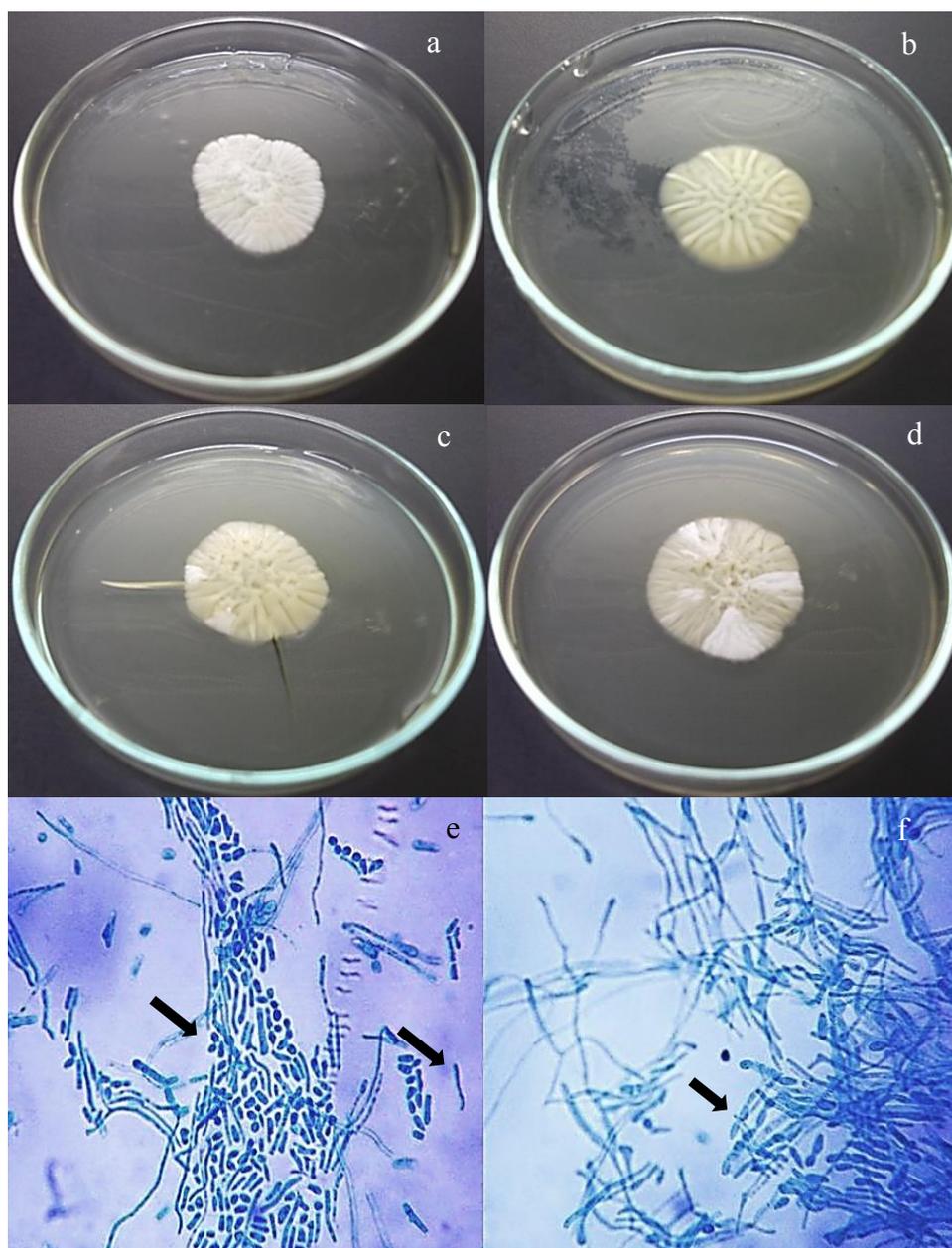


Figura 02: Macroscopia de *Trichosporon asahii* [URM6261 (a), URM5743 (b), URM5781 (c), URM6763 (d)] em ágar extrato de malte após sete dias de crescimento a 37°C apresentando aspectos cerebriforme e colônias brancas (a), creme (b) e com as duas cores (c; d). O exame da cultura evidenciou a presença de hifas, artroconídios e blastoconídios (e; f).

#### 5.4.2 *Trichosporon faecale* (Bat. & J.S. Silveira) E. Guého & M.T. Sm. 1992

Com sete dias de crescimento, no meio ágar extrato de malte, as colônias mostraram tonalidades de branco, creme e amarelo. Estas apresentaram crescimento discreto e colônias

com aspecto cerebriforme/enrugada. O maior diâmetro de crescimento foi de 3,6 cm (28°C ( $\pm 2^\circ$ )), e o menor de 1,4 cm (37°C). Ao exame microscópico da cultura foi evidenciado a presença de hifas hialinas. Foram observados artroconídios alongados e blastoconídios ovais (Figura 03). Foram analisados três isolados, as quais a análise das sequências parciais da região ITS, indicaram que esses isolados são muito similares aos de *T. asahii*. Todavia, os dados obtidos pela inferência das sequências parciais da região IGS e os aspectos morfológicos das cultura mostraram diferenças. Desta forma, foi possível inferir que estas características são de grande relevância taxonômica, pois permitiram a diferenciação específica nos isolados de *Trichosporon*.

As espécies apresentam colônias de coloração branca ou creme podendo ter um aspecto butiroso. Possuem reprodução vegetativa por desarticulação dos artroconídios e brotação, com a ausência de células apressórias. Essa levedura é produtora de amido e já foram isoladas a partir de fezes de humanos (Barnett; Payne; Yarrow, 2000).

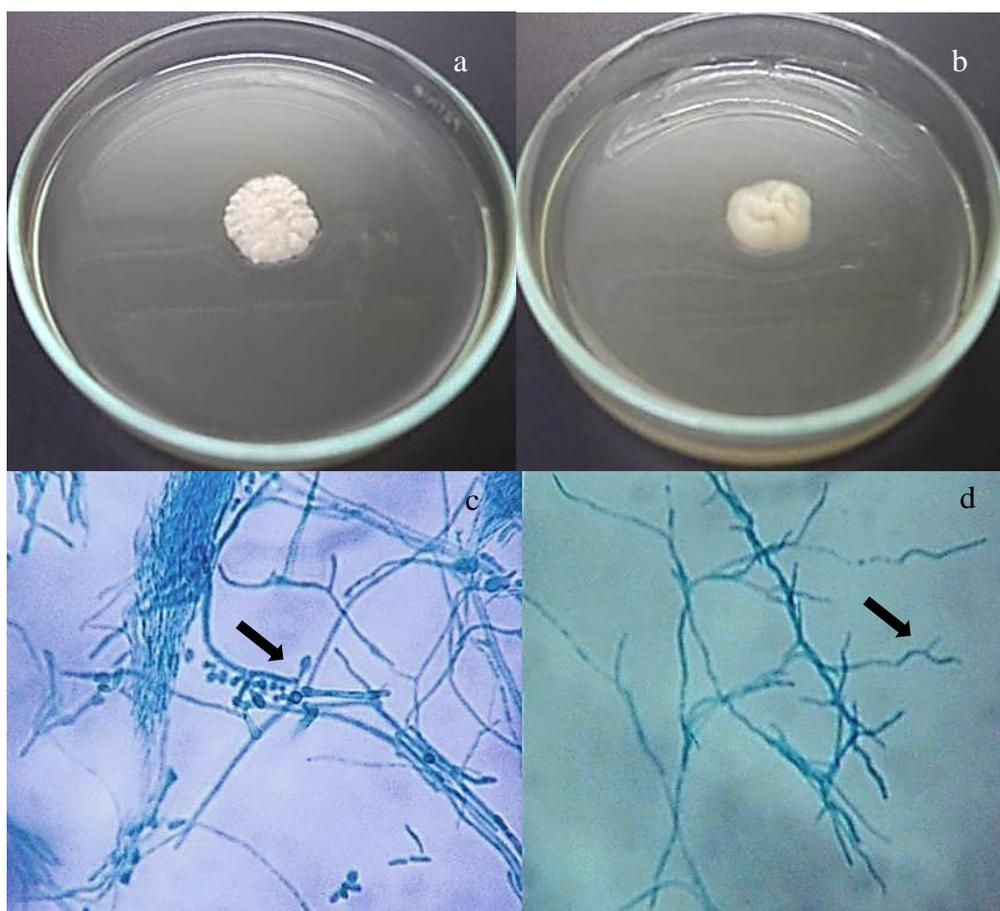


Figura 03: Macroscopia das colônias de *Trichosporon faecale* [URM3963 (a), URM4259 (b)] em ágar extrato de malte com sete dias de crescimento a 37°C. c) Observa-se a presença de poucos artroconídios, blastoconídios e filamentos delicados (aumento de 400x).

#### 5.4.3 *Trichosporon mycotoxinivorans* O. Molnár, Schatzm. & Prillinger 2004

Após sete dias de crescimento em ágar extrato de malte, a colônia exibiu coloração branca. O isolado apresentou um crescimento acentuado, sendo o diâmetro da colônia foi de 4,5 cm a temperatura de 28°C ( $\pm 2^\circ$ ), e 4,3 cm a 37°C. As culturas apresentaram elevação discreta na região central, sendo observada a presença de franjas distais que não foram notadas com três dias de crescimento. Ao exame microscópico da cultura, foram observadas hifas septadas delicadas com numerosos arthroconídios alongados, sem a presença de conídios laterais e poucos blastoconídios (Figura 04). A cepa foi isolada de areia da praia e apresentou o mesmo crescimento em ambas as faixas de temperatura testadas (4,4 cm), sendo observado uma variação na coloração da cultura de bege (T 28°C ( $\pm 2^\circ$ C)) para o branco (37°C).

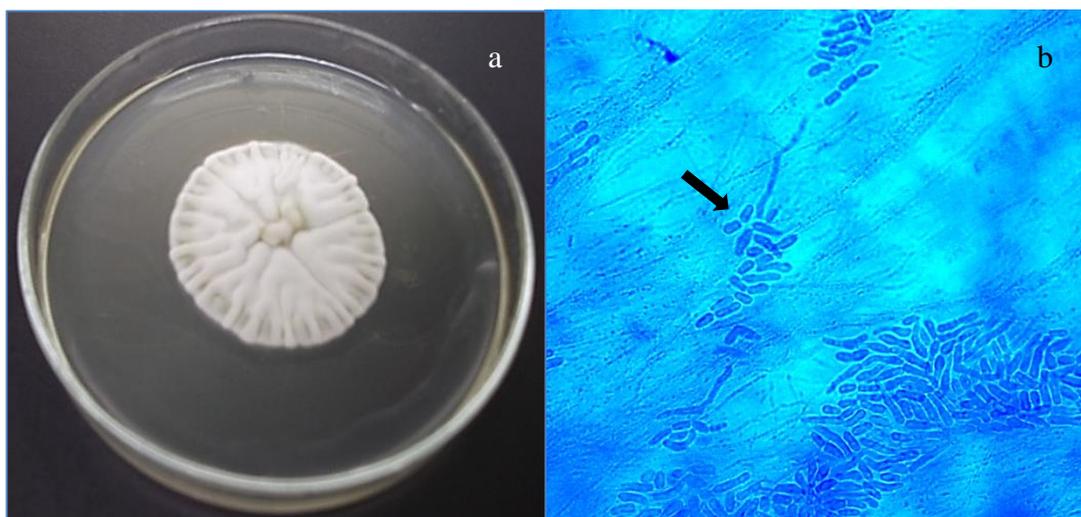


Figura 04: a) Macroscopia da colônia de *Trichosporon mycotoxinivorans* (URM4437) em ágar extrato de malte com sete dias de crescimento a 37°C. b) Observa-se a presença de numerosos arthroconídios alongados com filamentos delicados (aumento de 400x).

#### 5.4.4 *Trichosporon montevidense* (L.A. Queiroz) E. Guého & M.T. Sm.

Aos sete dias de crescimento em meio ágar extrato de malte, as colônias mostraram tonalidades de amarelo. Houve diferenças marcantes de crescimento entre os isolados, sendo que exibiram um diâmetro de 4,8 a temperatura 28°C ( $\pm 2^\circ$ ), e 0,7 cm a 37°C. Não foi observado fissuras nas zonas marginais da colônia e ela apresentava um aspecto liso. Ao

exame microscópico da cultura, foi observada a presença de hifas septadas com o predomínio de arthroconídios alongados. Foi notado, também, a presença de hifas espiraladas e poucos blastoconídios que exibiam crescimento lateral (Figura 05).

Os isolados dessa espécie apresentam colônias de coloração branca ou creme podendo ter um aspecto membranoso. Ao exame microscópico da cultura, podem ser observados blastoconídios em brotação única e arthroconídios em forma de barril, com a ausência de células apressórias. Essas espécies estão amplamente distribuídas na natureza, como fontes de água, excrementos e vegetais (Barnett; Payne; Yarrow, 2000).

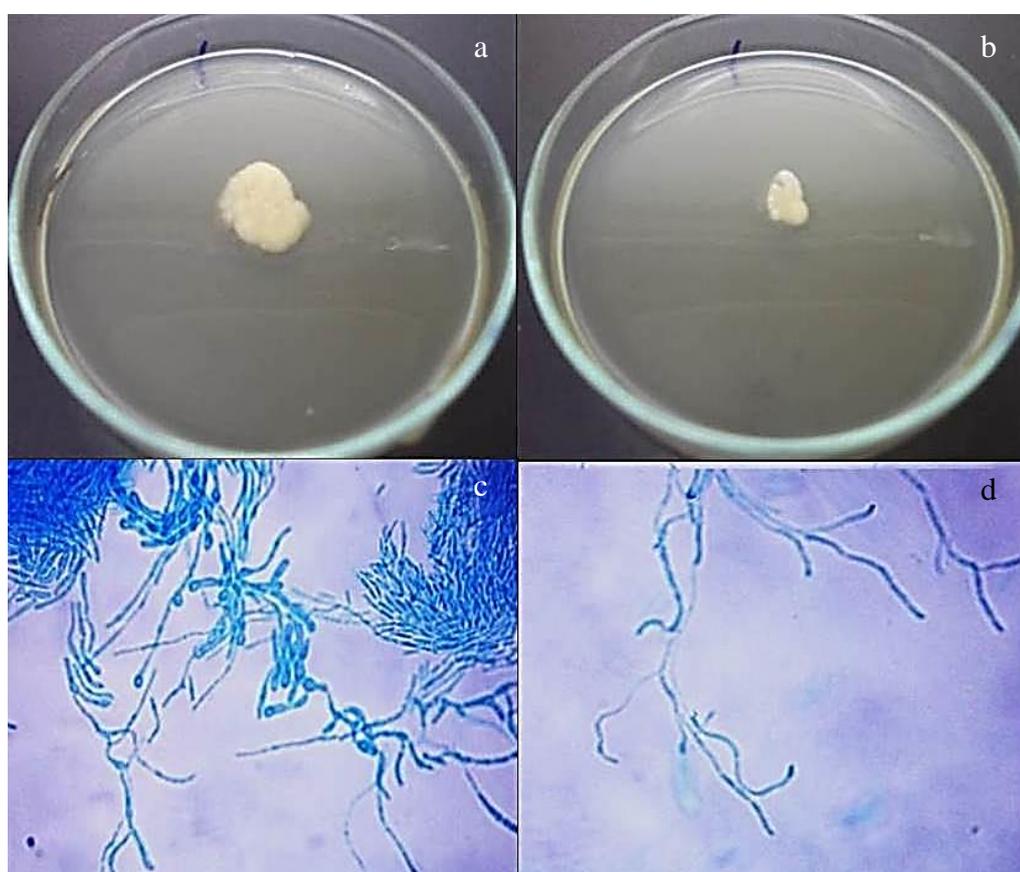


Figura 05: Macroscopia das colônias de *Trichosporon montevidense* [URM4251 (a), URM6292 (c)] em ágar extrato de malte com sete dias de crescimento (a; b) a 37°C. Ao exame microscópico da cultura foi observado a presença de hifas espiraladas (c; d) (aumento de 400x).

#### 5.4.5 *Hyphopichia burtonii* (Boidin et al.) Arx & van der Walt (1976)

As colônias, após sete dias de crescimento em de ágar extrato de malte, exibiram tonalidades de creme apresentando superfície plana ou enrugada. O diâmetro de crescimento

foi de 2,9 cm a 28°C ( $\pm 2^\circ$ ), e de 1,1 cm a 37°C. O isolado não foi capaz de hidrolisar ureia. Não foi observado fissuras nas zonas marginais das colônias que apresentavam aspecto liso. Ao exame microscópico, foram observados a presença de blastoconídios redondos, ovais, cilíndricos e filamentos micelianos hialinos. O micélio apresentava hifas dicotômicas, dentículos e células fragmentadas (Figura 06).

Os isolados dessa espécie apresentam colônias de coloração branca ou creme podendo ter um aspecto butiroso ou membranosa. Os isolados apresentam hifas septadas e dicotomicamente ramificadas. Os conídios são isolados ou formados em cadeias acropetais, e de forma oval ou clavada, podendo ter ainda blastoconídios. Em sua forma perfeita, podem ter ascos que contém de dois a quatro ascósporos de forma hemisférica (Arx & van der Walt, 1976).

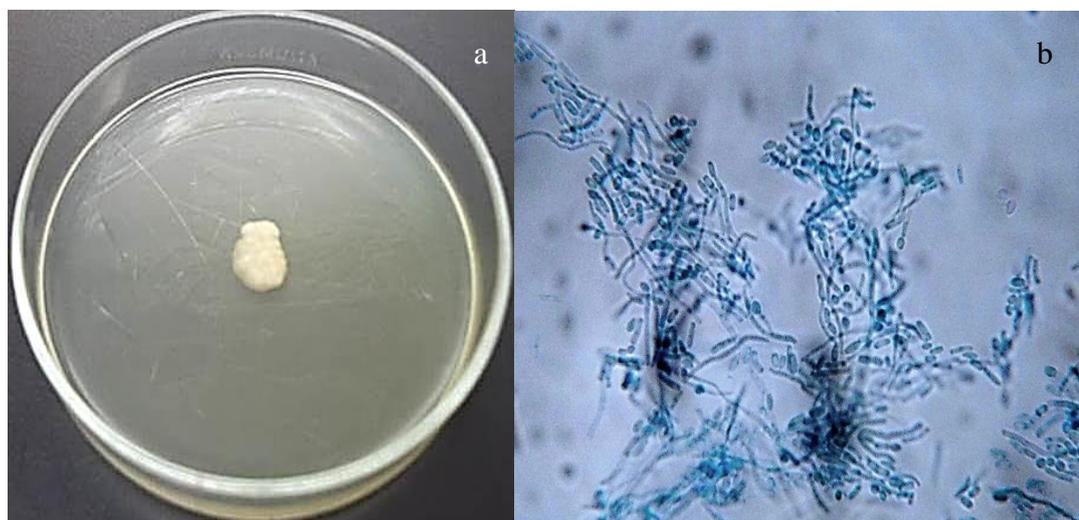


Figura 06: Macroscopia das colônias de *Hyphopichia burtonii* (URM1080) em ágar extrato de malte com sete dias de crescimento (a) a 37°C. Ao exame microscópico da cultura foi observado a presença de hifas e blastoconídios (b) (aumento de 400x).

### 5.5 INFECÇÃO DOS PELOS PELAS LINHAGENS DE *Trichosporon*

Neste modelo de infecção *in vitro* desenvolvido para a pedra branca, foi estudado além da doença seus agentes. Ao longo do experimento, as placas não foram hidratadas, sendo que após o sexto dia de incubação não mais havia umidade aparente no interior destas. Nas quatro situações testadas, 15 (88,23%) dos isolados testados foram capazes de desenvolver um quadro compatível com a pedra branca.

Os nódulos formados eram similares em todos os aspectos (quanto à forma e dureza) aos nódulos provenientes de pacientes. Seis (Quatro de *T. asahii* e dois de *T. montevidense*) isolados causaram uma infecção em menor intensidade, não chegando a formar um nódulo maduro e dois não formaram nódulo, sendo um de *T. montevidense* (Isolado 4251) e um de *T. faecale* (Isolado 3963). Nesse caso, as estruturas fúngicas chegaram a formar extensos emaranhados de hifas da levedura sobre os cabelos, que não contribuiu para a formação do nódulo. O tempo de estocagem dessas leveduras foi outro dado importante, uma vez que mesmo leveduras preservadas por longos períodos não apresentavam perda de seu potencial de virulência (Tabela 6).

Tabela 6: Isolados de levedura envolvidos na formação dos nódulos de pedra branca, transcorridos 30 dias de infecção.

Isolado Micoteca URM	URM ID	Infecção	Nódulo imaturo	Nódulo maduro
<i>T. asahii</i>	6356		+	
<i>T. asahii</i>	6074			+
<i>T. asahii</i>	5781			+
<i>T. asahii</i>	5743			+
<i>T. asahii</i>	6261			+
<i>T. asahii</i>	5973		+	
<i>T. asahii</i>	6763		+	
<i>T. asahii</i>	6295		+	
<i>T. faecale</i>	4259			+
<i>T. faecale</i>	3963	+		
<i>T. faecale</i>	4250			+
<i>T. montevidense</i>	6073		+	
<i>T. montevidense</i>	4251	+		
<i>T. montevidense</i>	6293		+	
<i>T. montevidense</i>	6292			+
<i>T. montevidense</i>	6291			+
<i>T. mycotoxinivorans</i>	4437			+
<i>Hyphopichia burtonii</i>	1080			+

Quanto aos aspectos macroscópicos dos nódulos, estes apresentaram desde uma coloração hialina a uma tonalidade mais escura. Os nódulos apresentaram diferenças significativas quanto aos tamanhos e a dimensão, podendo ter de 200 a 600  $\mu\text{m}$  de comprimento por 120 a 200  $\mu\text{m}$  de largura. Nas regiões marginais dos nódulos foram observados blastoconídios, artroconídios e micélio hialino (Figura 11).

Essa diferença na coloração poderia estar relacionada com a variedade de cores que os nódulos de pedra branca podem exibir, como as tonalidades de branco, vermelha e marrom (Kalter et al., 1986). Quanto às dimensões, os nódulos de pedra branca podem ter

dimensões de 3-8mm, muito menores quando comparados aos obtidos em nosso modelo experimental (Cardona et al., 2013). Possivelmente, essa discrepância nas dimensões está relacionada com a cronificação da infecção.

Podemos verificar que isolados de *Trichosporon faecale*, *T. montevidense* e *T. micotoxinivorans*, proveniente de amostra diversas, foram capazes de produzir nódulos de piedra branca. Sabe-se que algumas cepas de *Trichosporon* são mais patogênicas ao homem, todavia, o conhecimento sobre a virulência dos isolados ambientais ainda é pouco conhecido. Nesse cenário, espécies de *Trichosporon faecale*, *T. montevidense* já vem sendo relatadas como agentes de micoses oportunistas em humanos. *T. micotoxinivorans*, uma espécie isolada principalmente do ambiente que possui a habilidade de degradar micotoxinas, tem atualmente ganhando destaque por ser um agente de micose profunda (Molnar et al., 2004; Hickey et al., 2009; Hirschi et al., 2012; Almeida Junior et al., 2014; Kröner et al., 2013). Todavia, essas espécies nunca foram relatadas como agentes de piedra branca.

A infecção ocorreu de forma lenta, sendo que o intervalo de tempo decorrido entre o contato com a levedura até a formação do nódulo foi de aproximadamente 30 dias. Nos primeiros cinco dias da infecção foram observadas poucas estruturas do fungo aderidas ao substrato. No décimo dia de infecção, foi possível observar uma infecção similar ao tipo ectotrix. No 15º dia foi notada a presença dos nódulos em estágio inicial de desenvolvimento e no 25º dia a presença dos nódulos propriamente ditos aderidos à porção extrafolicular dos cabelos.

Para Cardona et al. (2013) a infecção dá-se de maneira rápida, sendo acompanhada pelo crescimento do pelos. À medida que estes crescem, os nódulos se formam e endurecem, de modo que ocorre invasão da camada cuticular. Entretanto, não podemos afirmar se existe correlação entre o crescimento dos cabelos e o desenvolvimento da piedra branca. Possivelmente, o desenvolvimento desta condição está mais relacionado com as características inerentes a cada isolado de *Trichosporon*.

Não foram observadas diferenças quanto à capacidade de causar a infecção em relação às variáveis temperatura e concentração das suspensões utilizadas no processo de infecção. Durante todo o experimento os fios de cabelo não foram hidratados, sendo assim, é possível que a umidade excessiva não seja um fator significativo para o desenvolvimento desta micose. Do mesmo modo, podemos inferir que a temperatura não possui relação com o surgimento desta micose, tendo em vista a levedura pode formar o nódulo nas duas faixas de temperatura testadas. A partir dos resultados obtidos, observou-se que apenas a levedura

em contato com os cabelos é capaz de formar nódulos de piedra branca. Sendo assim, o nódulo talvez atue como um mecanismo de resistência frente às condições adversas ao meio em que as leveduras estão inseridas. De acordo com a maioria dos relatos, a piedra possui uma íntima associação com a alta temperatura e umidade, condições típicas de regiões tropicais (Diniz; Souza Filho, 2003; Roselino et al., 2008).

Em relação a possíveis fontes de infecção, vários relatos têm sugerido que a piedra branca é adquirida através de banhos em fontes de água (Kubec; Dvorak; Alsaleh, 1998; Richini-Pereira et al., 2012). Esta premissa possivelmente esteja correta, uma vez que leveduras do gênero *Trichosporon* podem ser adquiridas a partir de ambientes aquáticos (Youker et al., 2004). Neste caso, a água atuaria possivelmente como um veículo de transmissão desses agentes e não como condição única para o aparecimento da piedra.

Kalter et al. (1986) observaram que a piedra branca possui um alto índice de remissão, todavia, o quadro é agravado nos períodos mais quentes do ano. Cardona et al. (2013) observaram que a temperatura média de 28°C constitui a faixa ideal para o desenvolvimento da maioria dos fungos. Os mesmos autores descreveram um caso de piedra branca acometendo uma mulher jovem proveniente da cidade de Bogotá, em que a temperatura média local se situava em 14°C.

Em face às condições analisadas, podemos sugerir que a falta de higiene, o uso de cremes para cabelo, a sudorese, imunodeficiências e transmissão sexual (Youker et al., 2003; Taj-Aldeen et al., 2004; Roselino et al., 2008; Figueras; Guarro, 2000; Diniz; Souza Filho, 2005; Bonifaz et al., 2010; Colombo et al., 2011; Richini-Pereira et al., 2012; Ríos; Rojas; Hincapié, 2012; Cardona et al., 2013), não são fatores relacionados com o desenvolvimento da piedra branca, uma vez que apenas a levedura em contato com o cabelo foi capaz de produzir o nódulo. Todavia, não temos subsídios para afirmar se essas condições podem influenciar na severidade da infecção. Possivelmente, as leveduras do gênero *Trichosporon* podem ser adquiridas a partir de outras fontes, como de animais infectados, e vir a desencadear o aparecimento desta micose.

Muito pouco se sabe da real influência que algumas bactérias podem exercer quanto ao desenvolvimento da piedra branca. Todavia, alguns trabalhos reataram que esta micose fosse o resultado de uma infecção sinérgica entre as espécies de *Trichosporon* e bactérias dos gêneros *Corynebacterium* (Ellner et al., 1990) ou a espécie *Brevibacterium mcbrellneri* (Taj-Aldeen, 2004). Segundo Kalter, (1998) para o surgimento desta micose talvez possa existir um mixo entre bactérias e fungos presentes nos nódulos, uma vez que os pacientes

apresentavam uma clinica compatível com o quadro, porém a cultura era negativa para fungos. Entretanto, as bactérias possivelmente atuam apenas como colonizadores secundários à infecção, uma vez que foi obtido um quadro similar a piedra branca apenas com os agentes desta micose.

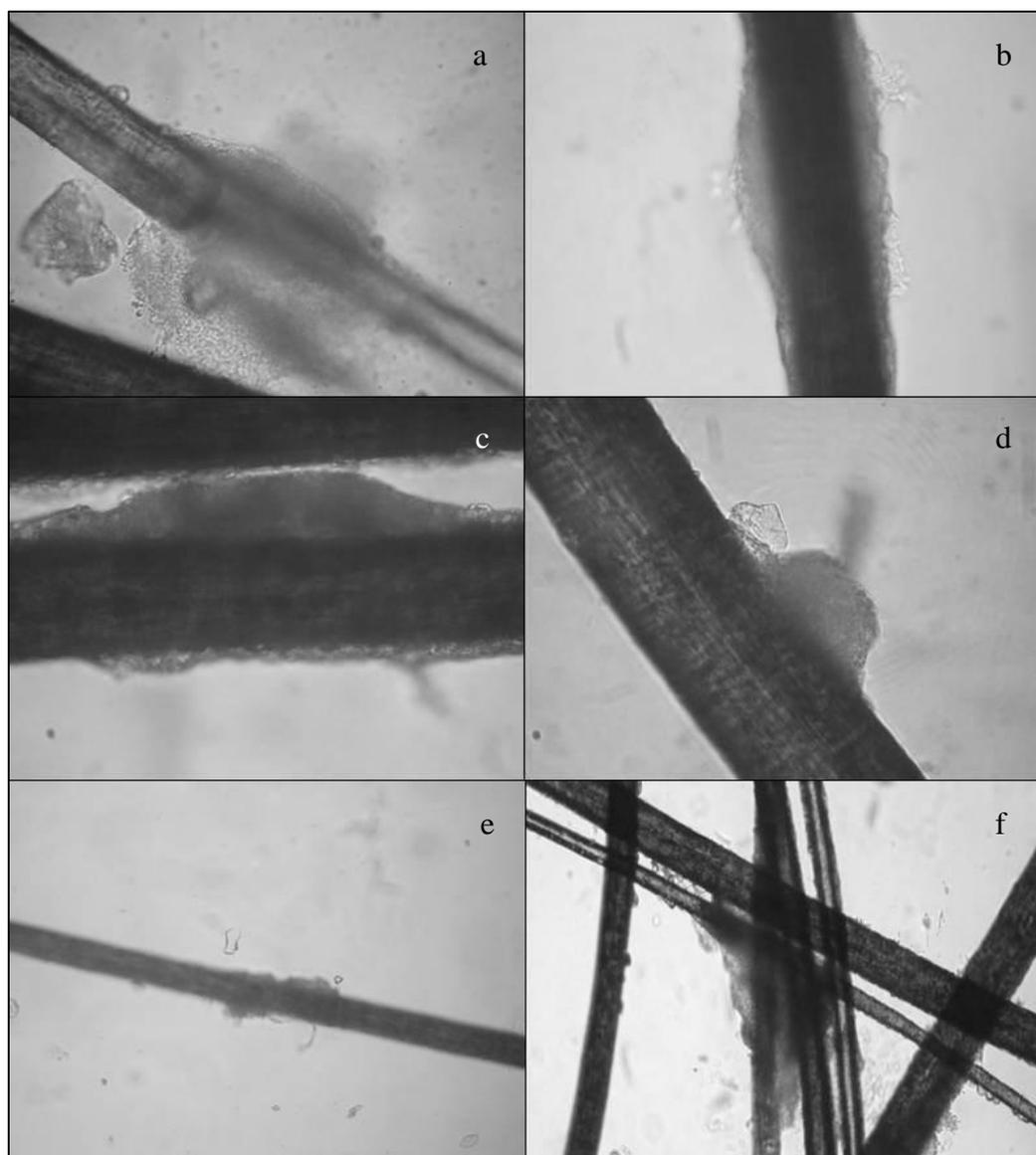


Figura 11: Nódulos de *Trichosporon asahii* (a), *T. faecale* (b), *T. montevidense* (c), *T. mycotoxinivorans* (d) e infecção causada pela espécie *Hyphopichia burtonii* (e, f).

## 5.6 PATOGENIA DA PIEDRA BRANCA

A fim de descrever o processo de formação dos nódulos, a infecção foi caracterizada em quatro estágios: (I) Contágio: Inicialmente, para que a infecção se inicie faz-se necessário que os pelos entrem em contato com algum propágulo da levedura. Quando isto ocorre, a levedura pode crescer absorvendo apenas os nutrientes presentes no cabelo. (II) Adesão: Com o sucesso da infecção a levedura começará a se proliferar ao longo do eixo do cabelo. Os propágulos infectantes da levedura aderidos a este substrato podem ser representados tanto por artroconídios, blastoconídios como pelo micélio da levedura. Todavia, há uma tendência dos blastoconídios e artroconídios prevalecerem com o progresso da infecção. (III) A medida que a infecção avançou a levedura preencheu toda a região extrafolicular do cabelo. Nesta etapa da infecção, ainda podem ser discriminados os limites de uma célula a outra. (IV) No último estágio, houve a formação de um nódulo maduro e compacto. Neste ponto, os limites de uma célula a outra não puderam ser discriminados, como se houvesse sido excretado um material extracelular que envolveu toda a periferia do nódulo (Figuras 12 e 13).

O agrupamento e manutenção das estruturas fúngicas unidas, possivelmente foi ocasionado pela excreção de um material extracelular, produzido pelas estruturas da levedura (Magalhães et al., 2008). Essa capacidade de liberar substâncias extracelulares não é restrita aos agentes da piedra branca, podendo ser observado nos casos de tricobacterioses (Salim; Zahra, 2014) e na piedra preta (Figueiras; Guarro, 2000). O fungo *Piedraia Hortae* secreta um material semelhante, sendo considerado o possível responsável pela manutenção da integridade do nódulo (Figueiras; Guarro, 1997), e por garantir a permanência da infecção, mesmo em condições adversas (Figueiras; Guarro, 2000).

De acordo com Kalter et al. (1986), as leveduras do gênero *Trichosporon* podem provocar danos na cutícula dos pelos. Os autores concluíram que a infecção independe do tipo de cabelo ou da cor dos indivíduos. Para chegar a essas conclusões, eles infectaram os fios de cabelos com a espécie *Trichosporon beigelli* e desprezaram sobre os fios, contidos em placas de Petri, 25mL de uma solução de água com extrato de levedura e as incubaram a uma temperatura de 30°C. O experimento foi acompanhado por três semanas, sendo que não foram notadas diferenças quanto à taxa de infecção nem na capacidade de mantê-la. A levedura foi capaz de lesionar a cutícula do fio capilar além de serem formados agregados das células de leveduras e bactérias.

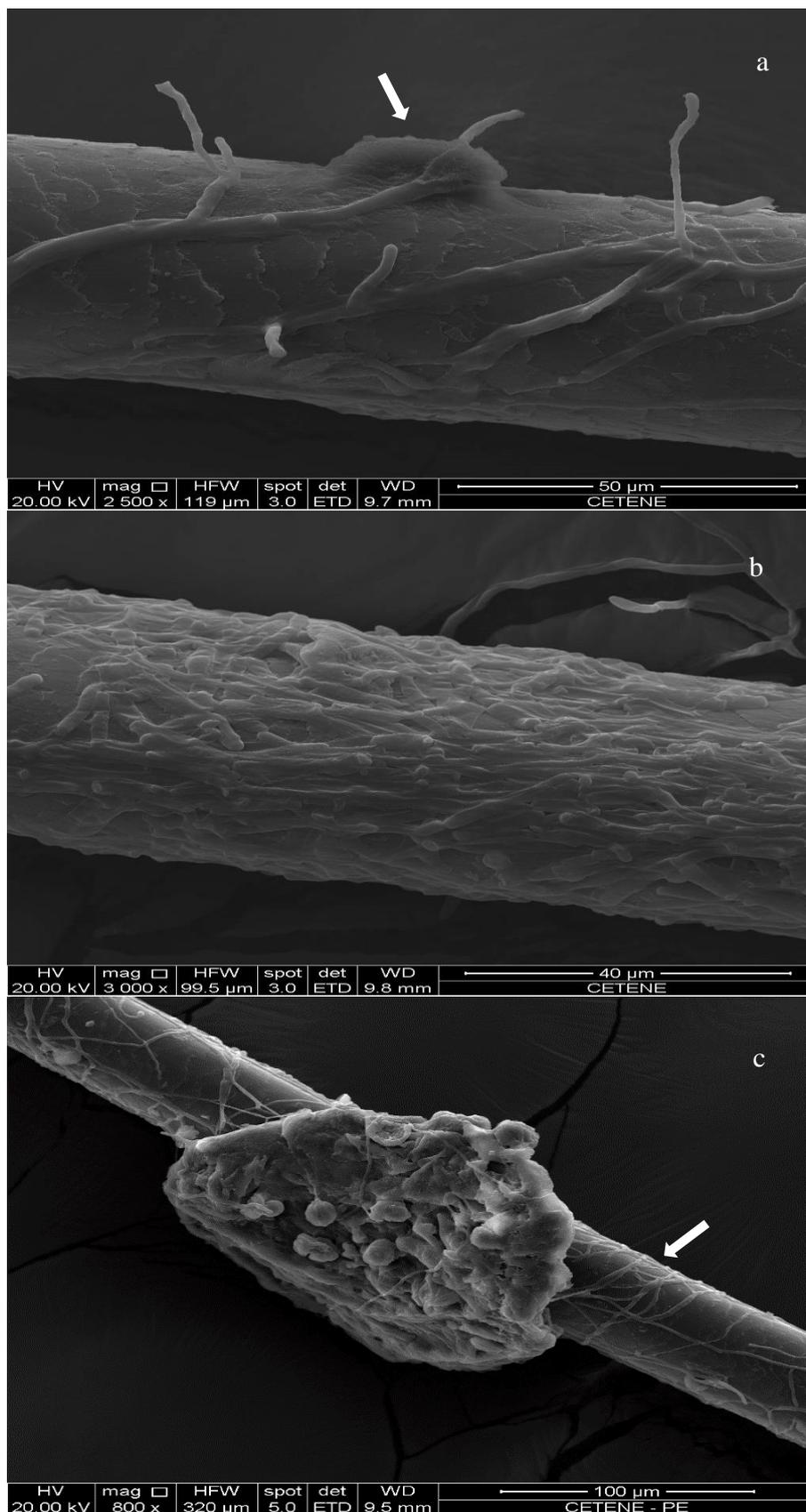


Figura 12: Microscopia eletrônica de varredura mostrando os estágios da infecção do fio capilar provocado pela espécie de *Trichosporon asahii*. Estágio inicial exibindo lesão na cutícula do cabelo (a), estágio intermediário (b) e o nódulo maduro (c).

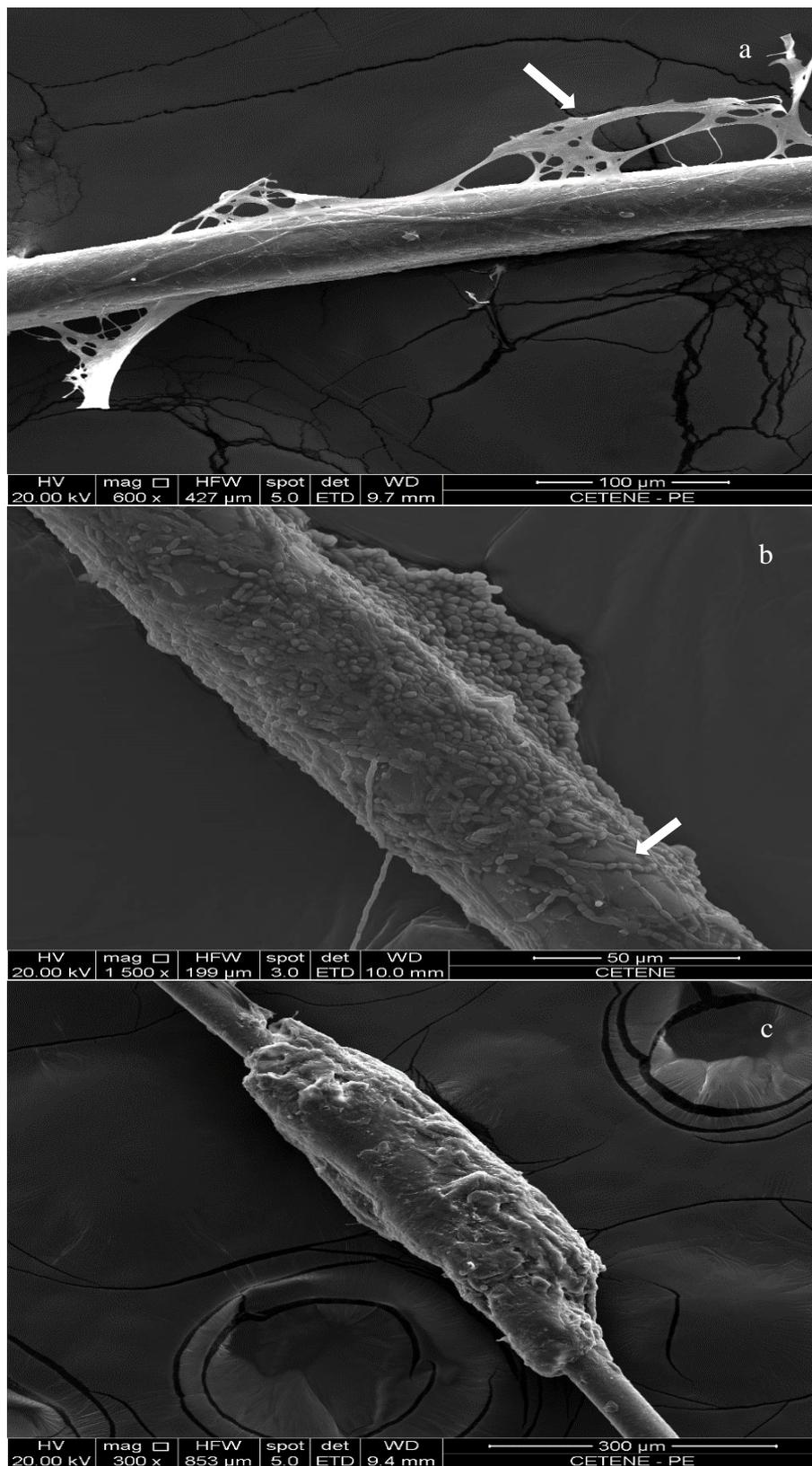


Figura 13: Micrografias (MEV) exibindo os diferentes aspectos da infecção provocado por *Trichosporon montevidense*, mostrando o cabelo infectado com emaranhados de hifas (a), nódulo imaturo com a presença de danos na cutícula do cabelo (b) e nódulo completo (c).

## 5.7 ANÁLISE DA SIMILARIDADE GENÉTICA

A similaridade genética dos isolados de *Trichosporon* utilizados para infectar os cabelos e seus correspondentes que foram recuperados do retrocultivo, foi confirmada pelo uso do marcador específico (GTG<sub>5</sub>) para a região ISSR do DNA, através da Reação em cadeia da polimerase (PCR). Foram gerados diferentes padrões de bandas, sendo que estas apresentaram de um a quatro fragmentos nas pistas do gel de agarose (figura 09). O uso deste marcador permitiu a discriminação de cinco grupos, sendo que os isolados de *T. asahii* e *T. faecale* exibiram o mesmo padrão de bandas. Dois isolados não foram amplificados nesta reação (URM1080 e URM4250).

Os marcadores para as Regiões Microsatélite podem diferenciar com eficácia espécies de leveduras através dos padrões de bandas geradas, além de permitir observar variabilidade entre os isolados (Thanos et al., 1996; Pagnocca et al., 2010). Esses dados são apoiados por outros pesquisadores, os quais observaram que o uso desses marcadores podem originar padrões de bandas perfeitamente sobreponível (Pini et al., 2003), permitindo diferenciar cepas morfológicamente similares que são recuperadas do retrocultivo (Passo et al., 2001). Partindo deste pressuposto, pode-se inferir que o alto coeficiente de similaridade observado, sugere uma alta proximidade taxonômica entre os isolados originais e os obtidos no retrocultivo.

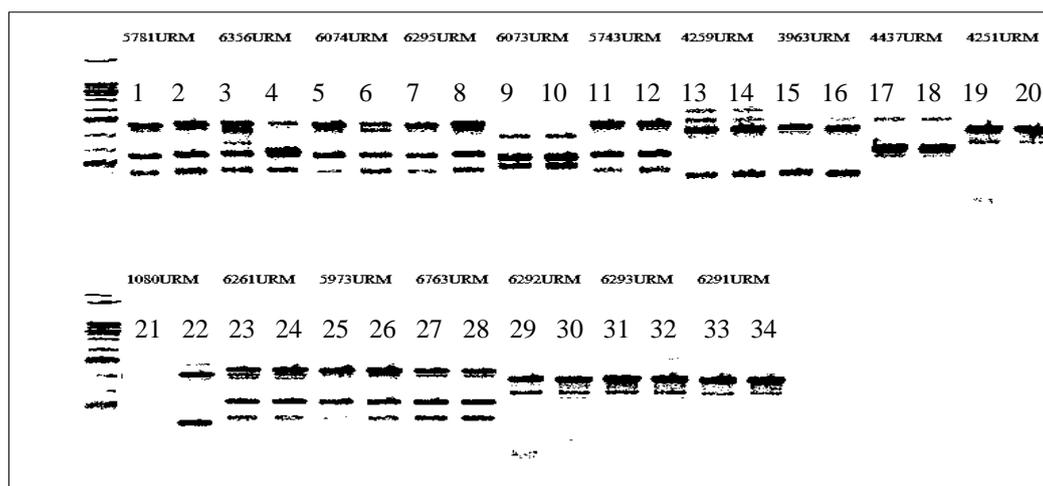


Figura 09: Perfil de amplificação da região GTG<sub>5</sub>. Na banda M está discriminado o marcador molecular de 1 Kb. As linhas de números ímpares representam o DNA dos fungos utilizados para infectar o cabelo e as linhas pares o DNA recuperado no retrocultivo.

## 5.8 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL (MEV)

### 5.8.1 CARACTERÍSTICAS DO CABELO

À microscopia eletrônica de varredura do cabelo pode-se observar que não possuía danos aparentes na camada cuticular. Esta região era bem delimitada, apresentando células achatadas que dispostas em tapete. O processo de esterilização não alterou as características morfológicas da cutícula, uma vez que não foram observados danos as células cuticulares (Figura 10). Pode-se notar que as características da camada cuticular estão condizentes com o que é descrito na literatura (Smith; Swift, 2002; Buffoli et al., 2013).

De maneira semelhante, os dados obtidos pela espectroscopia dos cabelos revelaram que os mesmos constituintes químicos detectados no momento da análise foram os mesmos presentes antes e depois do processo de autoclavagem das amostras. Os elementos químicos presentes foram o carbono (C), em maior quantidade, seguido pelo enxofre (S), oxigênio (O), cálcio (Ca) e o potássio (K), como representado na Figura 10. Nossos resultados foram diferentes dos obtidos por Figueras e Guarro (1997), sendo que os autores observaram que o enxofre era o principal elemento químico presente no cabelo. Nesse sentido, estudos tem demonstrado que a proporção dos elementos químicos presentes nas amostras pode ser bastante variável. Essas diferenças notadas talvez estejam relacionadas com a técnica empregada na determinação das substâncias presentes nas amostras, com o tipo de cabelo, fatores nutricionais do indivíduo, condições clínicas diversas e poluição pelo ambiente (Figueras; Guarro, 1997; Pozebon et al., 1999; Velasco et al., 2009; Wołowiec et al., 2013).

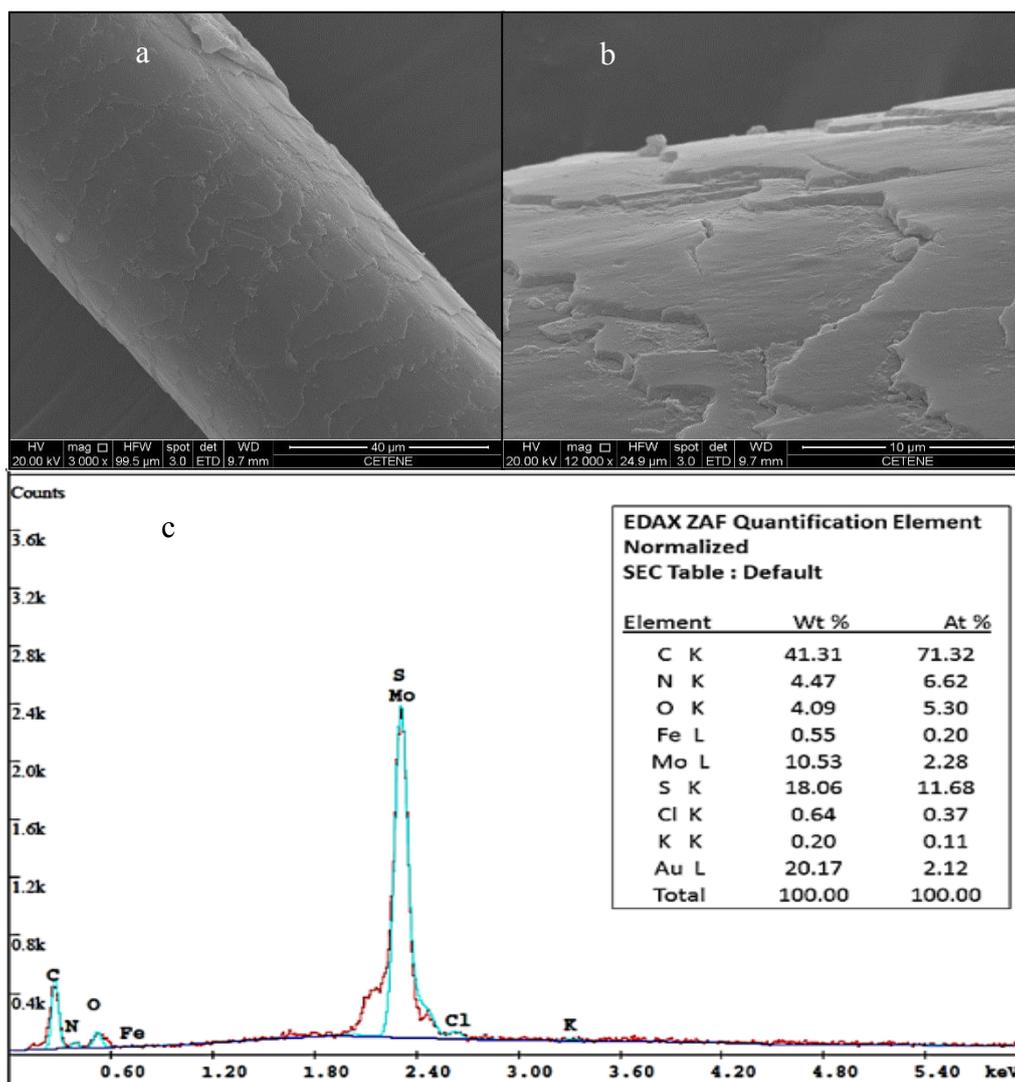


Figura 10: Micrografia (MEV) do fio de cabelo com aumento de 3.000x (a) e de 12.000x (b), exibindo a superfície do fio capilar, e composição química detalhada dos fios cabelos (c), exibindo os espectros e a proporção no cabelo dos elementos químicos.

### 5.8.2 MEV DAS LEVEDURAS

As fotomicrografias das leveduras do gênero *Trichosporon* evidenciaram com clareza as estruturas típicas do gênero mostrando também o processo de desarticulação dos artroconídios e blastoconídios. Assim, a região de origem dessas estruturas pode-se notar uma cicatriz bem delimitada e com a presença de projeções emergindo deste local. É interessante observar que a maioria dos propágulos das leveduras deu origem a uma única célula, porém, estas também podem apresentar brotação dupla. Os artroconídios apresentaram tanto a forma barril, como cilindro alongado, os blastoconídios exibiram um formato arredondado e/ou oval (Figura 01).

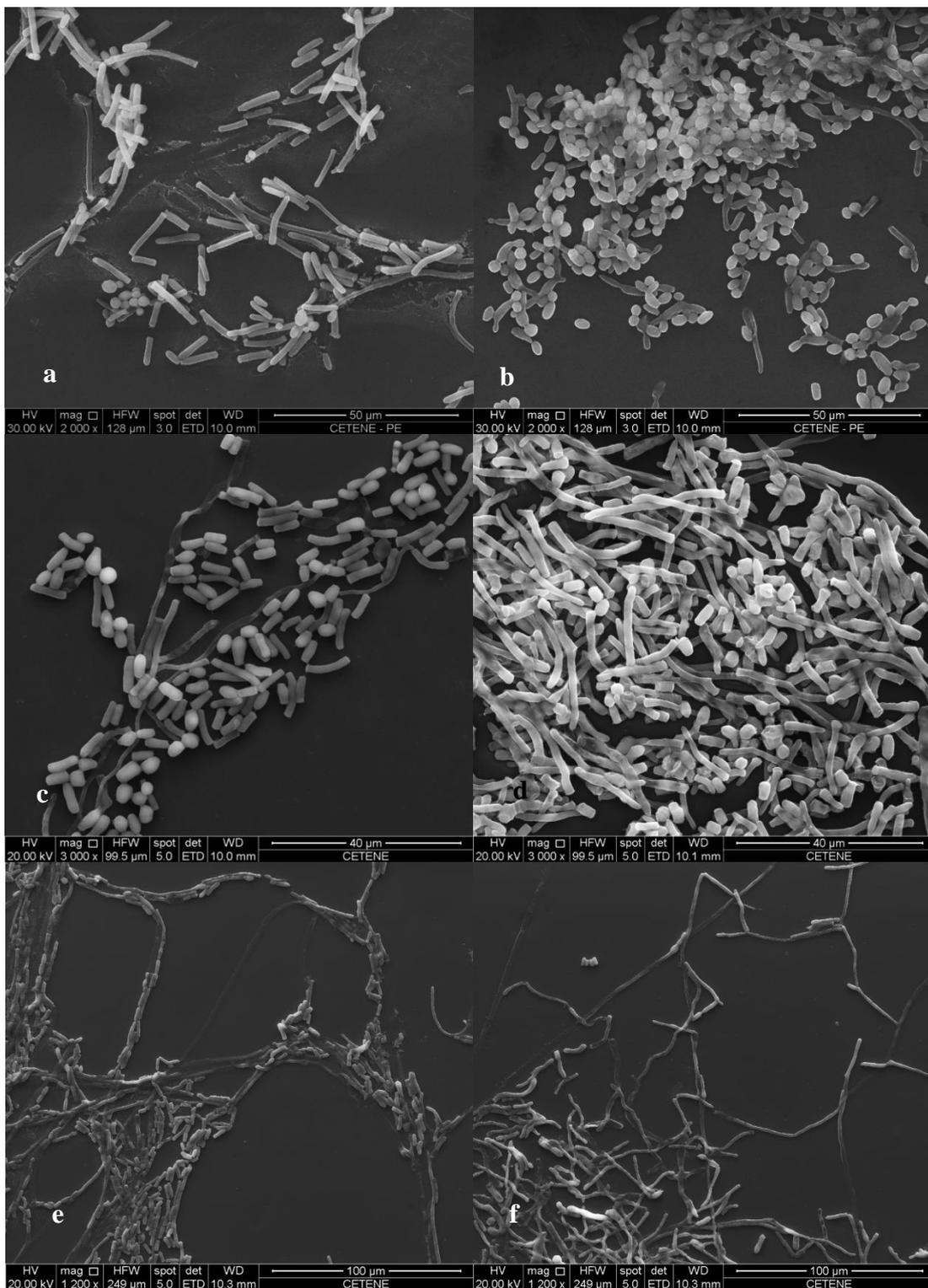


Figura 01: Micrografia eletrônica de varredura exibindo a micromorfologia dos isolados de *Trichosporon asahii*. (a, b), *T. faecale* (c) e *T. montevidense* (d) e o isolado de *Hyphopichia burtonii* (e, f).

A análise dos constituintes químicos (EDS) revelou que em todos os isolados de levedura os principais constituintes químicos presentes nas amostras foram o carbono (C),

oxigênio (O), sódio (Na), cálcio (Ca), manganês (Mn) e o magnésio (Mg). A ausência de nitrogênio nas amostras talvez esteja relacionada com a sua perda durante o processamento das amostras (Chen; Wang, 2008). Os elementos silício, oxigênio e cálcio também são constituintes da lâmina de vidro em que as amostras foram montadas (Doostmohammadi et al., 2011). Além destes, o ósmio, ouro e cromo foram originados do processamento das amostras (Figura 01).

A espectroscopia dos nódulos exibiu perfis diferenciados quando comparados aos espectros obtidos do cabelo e das leveduras. A análise demonstrou que os principais constituintes químicos presentes nos nódulos foram o carbono (C), oxigênio (O) e sódio (Na). Além destes, foi detectada a presença de enxofre e Cálcio nos nódulos, todavia em concentrações muito baixas.

Técnicas que visam analisar os elementos químicos presentes em amostras biológicas têm sido empregadas no estudo de vários microrganismos, com o intuito de determinar as etapas de formação das partículas minerais e suas funções fisiológicas (Corbari et al., 2008; Figueiras; Guarro, 1997). Os elementos químicos fósforo, enxofre e cálcio estão presentes nos pigmentos de melanina e auxiliam no sequestro de íons e formação de mucopolissacarídeos polianiónicos (Figueiras; Guarro, 1997). De acordo com Dadachova et al. (2007), a melanina apresenta um predomínio de C, N, O e S, sendo o último encontrado em uma proporção de 1 a 12% (Dadachova et al, 2007). Deste modo, esses constituintes são os possíveis responsáveis pela natureza rígida dos nódulos de pedra preta (Figueiras; Guarro, 1997). Assim, a consistência macia dos nódulos da pedra branca possivelmente está relacionada com a baixa concentração desses elementos no pseudoparênquima dos nódulos. Isto explicaria a natureza friável dos nódulos de pedra branca diferentemente dos nódulos de pedra preta.

Pelo observado, podemos supor que a matriz extracelular é muito relevante quanto à capacidade de formação dos nódulos. Essa substância é depositada de maneira gradual, de modo que quanto mais desenvolvido for o nódulo, mais perceptível é a sua presença. Possivelmente, a matriz extracelular é uma das responsáveis pela manutenção da integridade do nódulo. Deste modo, é necessário a realização de estudos mais aprofundados para se conhecer sua natureza química e importância relacionada com a virulência das leveduras do gênero *Trichosporon*.

O material extracelular juntamente com os íons atua como um cimento com a função de manter o pseudoparênquima compacto, além de livrá-lo das adversidades ambientais.

Assim, o nódulo atua como uma estrutura de resistência que se desenvolve lentamente, de modo que pequenas quantidades de nutrientes garantem a sobrevivência dos agentes (Figueiras; Guarro, 1997).

Em alguns casos, observou-se dano aparente na cutícula do cabelo. A levedura pode penetrar a cutícula e/ou degradar a região adjacente à infecção. Porém, não se pôde afirmar até qual camada do cabelo as leveduras podem adentrar. Várias hipóteses foram levantadas quanto à capacidade de invasão dos cabelos pelas espécies de *Trichosporon*. De acordo com Ellner et al. (1990) esta invasão possivelmente seria facilitada pelo efeito proteolítico das bactérias do gênero *Corynebacterium*. Para outros autores, as leveduras poderiam provocar a queda de cabelo, decorrente do enfraquecimento deste tecido (Khandpur; Reddy, 2002; Desai; Nadkarni, 2012). Porém, vários relatos não descreveram tais comprometimentos, sendo a infecção restrita a camada superficial do cabelo (Figueras; Guarro, 2000; Bonifaz et al., 2010; Saxena; Uniyal; Bhatt, 2012).

## 6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados alcançados, foram levantadas as seguintes conclusões:

- É necessário o isolamento em cultura para determinação do agente etiológico da piedra branca.
- Para a identificação das espécies de *Trichosporon* devem ser analisadas as sequencias parciais da região IGS1 do rDNA.
- Os produtos obtidos pelo sequenciamento da região ITS e a espectroscopia de Massa MALDI-TOF MS podem ser empregadas na identificação de espécies de *Trichosporon*.
- A umidade e alta temperatura não possuem relações diretas com o desenvolvimento desta micose.
- As espécies de *Trichosporon faecale*, *T. montevideense* e *T. mycotoxinivorans* são agentes de piedra branca.
- A espécie *Hyphopichia burtonii* pode ser agente de piedra branca.
- A matrix extracelular, que é secretada pelas leveduras do gênero *Trichosporon*, é uma das responsáveis por manter a integridade do estroma dos nódulos.
- O fácil desprendimento das estruturas do nódulo de piedra branca está relacionado com os baixos níveis de enxofre (S) fosforo (P) e cálcio (Ca).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali, S.C.R.; Muller, J.T.E. DNA fingerprinting by oligonucleotide probes specific for simple sequence repeats. **Human Genetics**. v. 4, p. 239–243, 1986.
- Almeida Junior, J.N.; Figueiredo, D.S.; Toubas, D.; Del Negro, G.M.; Motta, A.L.; Rossi, F., et al. Usefulness of matrix-assisted laser desorption ionisation-time-of-flight mass spectrometry for identifying clinical *Trichosporon* isolates. **Clin Microbiol Infect**. v. 20, n. 8: p. 784-90, 2014
- Arêa Leão, A.E. Considerações sobre os Thallosporados. O gênero *Trichosporon*. “*Trichosporon minor*” n. sp. produtor de Piedra axilar. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 35, p. 729-758, 1940.
- Barnett, J.A.; Payne, R. W.; Yarrow, D. **Yeast: characteristics and identification**. 3 ed. Cambridge: University press, 1139p, 2000.
- Bentubo, H.D.L.; Gambale, W.; Fischman, O. Caracterização laboratorial e comportamento cromogênico de leveduras do gênero *Trichosporon*. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde**. v. 15, p. 69-74, 2013.
- Bonifaz, A.; Gómez-Daza, F.; Paredes, V; Ponce, R.M. Tinea versicolor, tinea nigra, white piedra, and black piedra. **Clinics in Dermatology**. v. 28, p. 140-145, 2010.
- Bossche, H.V. Mechanisms of antifungal resistance. **Revista Iberoamericana de Micologia**. v. 14, p. 44-49, 1997.
- Buffoli, B.; Rinaldi, F.; Labanca, M.; Sorbellini, E.; Trink, A.; Guanziroli, E. et al. The human hair: from anatomy to physiology. **International Journal of Dermatology**. v. 53, p. 31-41, 2013.
- Buso, G.S.C. **Marcadores moleculares e análise filogenética**. 1º ed. EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília. p. 22, 2005.
- Cardona, C.A.M.; Ramirez, A.O.J.; Hortúa, C.V.; Figueroa, C.T. Piedra negra y Piedra blanca: Aspectos diferenciales. **Infectio**. v. 17, p. 106-110, 2013.
- Carvalho, A.M.R.; Melo, L.R.B.; Moraes, V.L.; Neves, R.P. Invasive *Trichosporon cutaneum* infection in an infant with wilms tumor. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 39, p. 1-2, 2008.
- Chen C.; Wang J. Investigating the interaction mechanism between zinc and *Saccharomyces cerevisiae* using combined SEM-EDX and XAFS. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 79, n. 2: p. 293-9, 2008.
- Chatt, A.; Katz, S.A. **Hair analysis, applications in the biomedical and environment science**. VCH Publishers, New York, 1998.

- Chagas-Neto, T.C.; Chaves, G.M.; Colombo, A.L. Update on the Genus *Trichosporon*. **Mycopathologia**. v. 166, p. 121–132, 2008.
- Colombo, A.L.; Padovan, A.C.B.; Chaves, G.M. Current Knowledge of *Trichosporon* spp. and Trichosporonosis. **American Society for Microbiology**. v. 24, p. 682–700, 2011.
- Corbari, L.; Cambon-Bonavita, M.A.; Long, G.J.; Grandjean, F.; Zbinden, M.; Gaill, F. et al. Iron oxide deposits associated with the ectosymbiotic bacteria in the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*. **Biogeosciences**. v.5, p. 1295–1310, 2008.
- Dadachova, E.; Bryan, R.A.; Huang, X.; Moadel, T.; Schweitzer, A.D.; Aisen, P.; Nosanchuk, J.D.; Casadevall, A. Ionizing Radiation Changes the Electronic Properties of Melanin and Enhances the Growth of Melanized Fungi. **PLoS One**. v. 2, n. 5: p. 457, 2007.
- Davies, G.E.; Thornton, C.R. Differentiation of the emerging human pathogens *Trichosporon asahii* and *Trichosporon asteroides* from other pathogenic yeasts and moulds by using species-specific monoclonal antibodies. **PLoS One**. v. 9, p. 1-9, 2014.
- De Hoog, G.S., Guarro, J., Figueras, M.J. and Gené, J. (2000) **Atlas of Clinical Fungi**. 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands and Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain, 1124 pp.
- Diniz, L.M.; Filho, J.B.S. Estudo de 15 casos de pedra branca observados na Grande Vitória (Espírito Santo - Brasil) durante cinco anos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 80, p. 49-52, 2005.
- Desai, D.H.; Nadkarni, N.J. Piedra: an ethnicity-related trichosis? **International Journal of Dermatology**. v. 53, n. 8, p. 1008-11, 2014.
- Doostmohammadi, A.; Monshi, A.; Fathi, M.H.; Karbasi, S.; Braissant, O.; Daniels, A.U. Direct cytotoxicity evaluation of 63S bioactive glass and bone-derived hydroxyapatite particles using yeast model and human chondrocyte cells by microcalorimetry. **J Mater Sci Mater Med**. v. 22, n. 10: p. 2293-300, 2011.
- Ellner, K.M.; McBride, M.E.; Kalter, D.C.; Tschen, J.A.; Wolf JR, J.E. White piedra: evidence for a synergistic infection. **British Journal of Dermatology**. v. 123, n. 3, p. 355-63, 1990.
- English, M.P. Destruction of hair by *Chrysosporium keratinophilum*. **Transactions of the British Mycological Society**. v. 52, n. 2, p. 247-55, 1969.
- Fallahi, A.A.; Moazeni, M.; Noorbakhsh, F.; Kordbacheh, P.; Zaini, F.; Mirhendi, H. et al. A case report of tinea pedis caused by *Trichosporon faecale* in Iran. **Medical Mycology: Case Reports**. v. 1, n. 1, p. 49–51, 2012.
- Fell, J.W.; Scorzetti, G. Reassignment of the basidiomycetous yeasts *Trichosporon pullulans* to *Guehomyces pullulans* gen. nov., comb. nov. and *Hyalodendron lignicola* to

- Trichosporon lignicola* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 54, p. 995–998, 2004.
- Fernandes, S.; Macias, V.C.; Araújo, T.; Fernandes, C.; Vieira, R.; Silvestre, M.J. et al. *Tinea capitis* no adulto – um diagnóstico a Considerar? **Revista da Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia**. v. 70, n. 2, p. 233-37, 2012.
- Figueras, M.J.; Guarro, J. 1997. X-ray microanalysis of black piedra. **Antonie Van Leeuwenhoek**. v. 72, n. 4, p. 275-81, 1997.
- Figueras, M.J.; Guarro, J. Ultrastructural aspect of the keratinolytic activity of piedra. **Revista Iberoamericana de Micología**. v. 17, p.136-141, 2000.
- Finch, J. Case of trichomycosis axillaris and erythrasma. **Journal of Drugs in Dermatology**. v. 10, n. 12, p. 1472-3, 2011.
- Flesch, P. **Physiology and Biochemistry of the Skin**. S. Rothman (Ed.). University of Chicago Press, Chicago. p. 601-661, 1945.
- Fredricks, D.N.; Smith, C.; Meier, A. Comparison of Six DNA Extraction Methods for Recovery of Fungal DNA as Assessed by Quantitative PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, n. 10, p. 5122–28, 2005.
- Fuentefria, A.M.; Suh, S.O.; Landell, M.F.; Faganello, J.; Schrank, A.; Vainstein, M.H. et al. *Trichosporon insectorum* sp. nov., a new anamorphic basidiomycetous killer yeast. **Mycological Research**. v. 112, p. 93-9, 2008.
- Groenewald, M.; Smith, M.Th. Re-examination of strains formerly assigned to *Hyphopichia burtonii*, the phylogeny of the genus *Hyphopichia*, and the description of *Hyphopichia pseudoburtonii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 60, p. 2675–80, 2010.
- Gueho, E.; Smith, M.T.H.; De Hoog, G.S.; Billongrande, G.; Christen, R.; Batenburg-Van Der Vegte, W.H. Contributions to a revision of the genus *Trichosporon*. **Antonie Van Leeuwenhoek**. v. 61, n. 4, p. 289-316, 1992.
- Guo, K.X.; Li, W.G.; Peng, Z.F.; Shu, X.H.; Xiao, N.Q.; Li, D.D. et al. Intestinal *Pichia burtonii* associated with Qiweibaizhusan. **International Journal of Pharmaceutical Science Invention**. v. 2, n. 9, p. 26-33, 2013.
- Hickey, P.W.; Sutton, D.A.; Fothergill, A.W.; Rinaldi, M.G.; Wickes, B.L.; Schmidt, H.J. et al. *Trichosporon mycotoxinivorans*, a Novel Respiratory Pathogen in Patients with Cystic Fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 47, n. 10, p. 3091–7, 2009.
- Hirschi, S.; Letscher-Bru, V.; Pottecher, J.; Lannes, B.; Jeung, M.Y.; Degot, T. et al. Disseminated *Trichosporon mycotoxinivorans*, *Aspergillus fumigatus*, and *Scedosporium apiospermum* Coinfection after lung and liver transplantation in a cystic fibrosis patient. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 50, n. 12, p. 4168-70, 2012.

- Iturrieta-Gonzalez, I.A.; Padovan, A.C.B.; Bizerra, F.C.; Hahn, R.C.; Colombo, A.L. Multiple Species of *Trichosporon* Produce Biofilms Highly Resistant to Triazoles and Amphotericin B. **PLoS ONE**. v. 9, n. 10, p. 1-10, 2014.
- Jones, L.N.; Rivett, D.E. The role of 18-methyleicosanoic acid in the structure and formation of mammalian hair fibers. **Micron**. v. 28, n. 6, p. 469-85, 1997.
- Jones, L.N.; Simon, M.; Watts, N.R.; Booy, F.P.; Steven, A.C.; Parry, D.A.D. Intermediate filament structure: hard á-keratin. **Biophysical Chemistry**. v. 68, p. 83-93, 1997.
- Kalter, D.C.; Tschen, J.A.; Cernoch, P.L.; McBride, M.E.; Sperber, J.; Bruce, S. et al. Genital white piedra: Epidemiology, microbiology, and therapy. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v. 14, n. 6, p. 982-93, 1986.
- Khandpur, S.; Reddy, B.S. Itraconazole therapy for white piedra affecting scalp hair. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v. 47, n. 3, p. 415-8, 2002.
- Kanitakis, J.; Persat, F.; Piens, M. A.; Picot, S.; Claudy, A. Black piedra: report of a French case associated with *Trichosporon asahii*. **International Journal of Dermatology**. v. 45, n. 10, p. 1258–60, 2006.
- Khatu, S.S.; Poojary, S.A.; Nagpur, N.G. Nodules on the Hair: A Rare Case of Mixed Piedra. **International Journal of Trichology**. v. 5, n. 4, p. 220–3, 2013.
- Kolecka, A.; Khayhan, K.; Groenewald, M.; Theelen, B.; Arabatzis, M.; Velegraki, A. et al. Identification of medically relevant species of arthroconidial yeasts by use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 51, n. 8, p. 2491–500, 2013.
- Kröner, C.; Kappler, M.; Grimmelt, A.C.; Laniado, G.; Würstl, B.; Griese, M. The basidiomycetous yeast *Trichosporon* may cause severe lung exacerbation in cystic fibrosis patients – clinical analysis of *Trichosporon* positive patients in a Munich cohort. **BioMed Central Pulmonary Medicine**. v. 13, p. 1-10, 2013.
- Kubec, K.; Dvorak, R.; Alsaleh, Q.A. Trichosporosis (white piedra) in Kuwait. **International Journal of Dermatology**. v. 37, p. 186–187, 1998.
- Kumar, S.; Bandyopadhyay, M.; Mondal, S.; Pal, N. A rare case of urinary tract infection due to *Trichosporon asahii*. **Journal of Global Infectious Diseases**. v. 3, n. 3, p. 309–10, 2013.
- Kurtzman, C.P.; Robnett, C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 73, p. 331– 371, 1998.
- Leli, C.; Cenci, E.; Cardaccia, A.; Moretti, A.; D’Alò, F.; Pagliochini, R. et al. Rapid identification of bacterial and fungal pathogens from positive blood cultures by MALDI-TOF MS. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 303, p. 205–209, 2013.

- Lima, E.C.; Silva, C.L.C. Cabelo como Matriz Analítica Alternativa para a determinação de drogas de abuso. **NewsLab**. v. 82, p. 156-69, 2007.
- Macedo, D.P.C.; Neves, R.P.; Magalhães, O.M.C.; Souza-Motta, C.M.; Queiroz, L.A. Pathogenic aspects of *Epidermophyton floccosum* langeron et milochevitch as a possible aethiological agent of tinea capitis. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 36, p. 36-37, 2005.
- Magalhães, A.R.; Mondino, S.S.B.; Silva, M.; Nishikawa, M.M. Morphological and biochemical characterization of the aetiological agents of white piedra. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 103, p. 786-90, 2008.
- Menezes, E.A.; Marinho, J.A.S.; Angelo, M.R.F.; Cunha, M.C.S.O.; Cunha, F.A.; Vasconcelos Júnior, A.A. Isolation and antifungal susceptibility testing of *Trichosporon asahii* in Ceará, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**. v. 54, n. 1, p. 1-3, 2012.
- Middelhoven, W.J.; Scorzeti, G.; Fell, J.W. Systematics of the anamorphic basidiomycetous yeasts genus *Trichosporon* Behrend with the description of five novel species: *Trichosporon vadense*, *T. smithiae*, *T. dehoogii*, *T. scarabueorum* and *T.gamsii*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 54, p. 975-86, 2004.
- Miteva, M.; Tosti, A. Hair and scalp dermatoscopy. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v. 67, p. 1040–8, 2012.
- Molnar, O.; Schatzmayr, G.; Fuchs, E.; Prillinger, H. *Trichosporon mycotoxinivorans* sp. nov., a new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 27, p. 661–71, 2004.
- Nakasone, K.K.; Stephen, W.P.; Jong, S.C. **Preservation and distribution of fungal cultures**. Elsevier Academic Press. p. 37-47. 2004.
- NCCLS. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras**; Norma Aprovada, Segunda Edição. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, 2002.
- Nora, A.B. Zoppas, B.A.; Stefani, M.; Ribeiro, R.G.; Bombel, M.G. Piedra Branca Extragenital: Relato de um caso no RS. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. Rio de Janeiro. v. 77, n. 4, p. 473-7, 2002.
- Pagnocca, F.C.; Legaspe, M.F.C.; Rodrigues, A.; Ruivo, C.C.C.; Nagamoto, N.S.; Bacci Jr. et al. Yeasts isolated from a fungus-growing ant nest, including the description of *Trichosporon chiarellii* sp. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 60, p. 1454–9, 2010.

- Passo, C.L.; Pernice, I.; Celeste, A.; Perdichizzi, G.; Todaro-Luck, F. Transmission of *Trichosporon asahii* oesophagitis by a contaminated endoscope. **Mycoses**. v. 44, p. 13-21, 2001.
- Passwater, R.; Cranton E. **Trace elements, hair analysis and nutrition**. New Canaan, Connecticut: Keats Publishing Inc. 1983.
- Percival, S.L.; Emanuel, C.; Cutting, K.F.; Williams, D.W. Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection. **International Wound Journal**. v. 9, n. 1, p. 14–32, 2012.
- Pini, G.; Faggi, E.; Donato, R.; Fanci, R. Isolation of *Trichosporon* in a hematology ward. **Mycoses**. v. 48, p. 45–9, 2003.
- Porter, P.S. Genetic disorders of hair growth. **The Journal of Investigative Dermatology**. v. 60, p. 493–502, 1973.
- Pozebon, D.; Dressler, V.L.; Curtius, A.J. Análise de cabelo: uma revisão dos procedimentos para a determinação de elementos traço e aplicações. **Química Nova**. v. 22, n. 6, p. 838-46, 1999.
- Putignani, L.; Del Chierico, F.; Onori, M.; Mancinelli, L.; Argentieri, M.; Bernaschi, P. et al. MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping of clinically relevant fungi. **Molecular BioSystems**. v. 7, n.3, p. 620-9, 2010.
- Richini-Pereira, V.B.; Camargo, R.M.P.; Bagagli, E.; Marques, S.A. White piedra: molecular identification of *Trichosporon inkin* in members of the same family. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 45, n. 3, p. 402-4, 2012.
- Ríos, X.; Rojas, R.F.; Hincapié, M.L. Ocho casos de piedra blanca en población pediátrica. **Rev Asoc Colomb Dermatol**. v. 20, n. 2, p. 175-180, 2012.
- Roselino, A.M.; Seixas, A.B.; Thomazini, J.A.; Maffei, C.M.L. An outbreak of scalp white piedra in a brazilian children day care. **Revista do instituto de Medicina Tropical**. v. 50, n. 5, p. 307-9, 2008.
- Rodrigues, C.C.; Höfling, J.F.; Boriollo, M.F.G.; Rodrigues, J.A.O.; Azevedo, R.A.; Gonçalves, R.B. et al. SDS-page and numerical analysis of *candida albicans* from human oral cavity and other anatomical sites. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 35, p. 40-7, 2004.
- Rodriguez-Tudela, L.J.; Diaz-Guerra, T.M.; Mellado, E.; Cano, V.; Tapia, C.; Perkins, A. et al. Susceptibility patterns and molecular identification os *Trichosporon* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 49, p. 4026-34, 2005.
- Salim, G.; Zahra, M.F. Trichobacteriosis: contribution of dermoscopy. **Dermatology Online Journal**. v. 20, n. 9, 2014.

- Saxena, S.; Uniyal, V.; Bhatt, R.P. Inhibitory effect of essential oils against *Trichosporon ovoides* causing piedra hair infection. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 43, n. 4, p. 1347-54, 2012.
- Scanavez, C.; Silveira, M.; Joekes, I. Human hair: color changes caused by daily care damages on ultra-structure. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. v. 28, p. 39-52, 2003.
- Sachs, H. History of Hair Analysis. **Forensic Science International**. v. 84, p. 7-16, 1997.
- Schaller, M.; Borelli, C.; Korting, H. C.; Hube, B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. **Mycoses**. v. 48, n.6, p. 65-377, 2005.
- Schwinn, A.; Ebert, J.; Hamm, H.; Bröcker, E.B. White genital piedra. **Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete**. v. 47, n. 8, p. 638-41, 1996.
- Sherf A F. A method for maintaining *phytonomas sepedonica* in culture for long periods without transfer. **Phytopathology**. v. 33, p. 330-2, 1943.
- Silva-Santana, S.C.; Diniz, A.S.; Lóla, M.M.F.; Oliveira, R.S.; Silva, S.M.M.; Oliveira, S.F. et al. Parameters of evaluation of zinc nutritional status: comparison between zinc hair rates and serum alkaline phosphatase in preschoolers of the Municipality of João Pessoa, Paraíba. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**. v. 2, n. 3, p. 275-82, 2002.
- Sinclair, R.D. Healthy Hair: What Is it? **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**. v. 12, p. 2-5, 2007.
- Smith, J.R.; Swift, J.A. Lamellar subcomponents of the cuticular cell membrane complex of mammalian keratin fibres show friction and hardness contrast. **Journal of Microscopy**. v. 206, p. 182-93, 2002.
- Simpson, V.R.; Borman, A.M.; Fox, R.I.; Mathews, F. Cutaneous mycosis in a Barbastelle bat (*Barbastella barbastellus*) caused by *Hyphopichia burtonii*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 25, n. 4, p. 551-4, 2013.
- Somenzi, C.C.; Ribeiro, T.S.; Menezes, A. Características Particulares da Micologia Clínica e o Diagnóstico Laboratorial de Micoses Superficiais. **NewsLab**. v. 77, p. 106-18, 2006.
- Sugita T, Nishikawa A, Shinoda T *et al.* Taxonomic Position of Deep-Seated, Mucosa-Associated, and Superficial Isolates of *Trichosporon cutaneum* from Trichosporonosis Patients. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 33, p. 1368-70, 1995.
- Sugita, T.; Nakajima, M.; Ikeda, R.; Matsushima, T.; Shinoda, T. Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of *Trichosporon* species. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, n. 5, p. 1826-30, 2002.

- Sugita, T.; Ikeda, R.; Nishikawa, A. Analysis of *Trichosporon* isolates obtained from the houses of patients with summer-type hypersensitivity pneumonitis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, n. 12, p. 5467–71, 2004.
- Taj-Aldeen, S.J.; Al-Ansari, H.I.; Boekhout, T.; Theelen, B. Co-isolation of *Trichosporon inkin* and *Candida parapsilosis* from a scalp white piedra case. **Medical Mycology**. v. 42, p. 87-92, 2004.
- Taverna, C.G.; Cordoba, S.; Murisengo, O.A.; Vivot, W.; Davel, G.; Bosco-Borgeat, M.E. Molecular identification, genotyping, and antifungal susceptibility testing of clinically relevant *Trichosporon* species from Argentina. **Medical Mycology**. v. 52, n. 4, p. 356-66, 2014.
- Thanos, M.; Schonian, G.; Meyer, W.; Schweynoch, C.; Graser, Y.; Mitchell, T. G. et al. Rapid identification of *Candida* species by DNA fingerprinting with PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 34, n. 3, p. 615-21, 1996.
- Todaro, F.; Germano, D.; Criseo G. An outbreak of Tinea pedis and Tinea cruris in a tyre factory in Messina, Italy. **Mycopathologia**. v. 83, p. 25-7, 1983.
- Van Veen, S.Q.; Claas, E.C.J.; Kuijper, E.J. High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 48, n. 3, p. 900-7, 2010.
- Vázquez-González, D.; Perusquía-Ortiz, A.M.; Hundeiker, M.; Bonifaz, A. Opportunistic yeast infections: candidiasis, cryptococcosis, trichosporonosis and geotrichosis. **Journal of the Germany Society of Dermatology**. v. 11, n. 5, p. 381-93, 2013.
- Velasco, M.V.R.; Dias, T.C.S.; Freitas, A.Z.; Júnior, N.D.V.; Pinto, C.A.S.O.; Kaneko, T.M.; Baby, A. R. 2009. Hair fiber characteristics and methods to evaluate hair physical and mechanical properties. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 45, n.1, p. 153-162.
- Vilgalys, R.; Hester, M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. **Journal of Bacteriology**. v. 172, n. 8, p. 4238–46, 1990.
- Von Arx, J.A.; Van Der Walt, J.P. The ascigerous state of *Candida chodatii*. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 42, p. 309 – 14, 1976.
- Yaman G.; Akyara I.; Can S. Evaluation of the MALDI TOF-MS method for identification of *Candida* strains isolated from blood cultures. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 73, n.1, p. 65–7, 2012.
- Yang, F.C.; Zhang, Y.; Rheinstadter, M.C. The structure of people's hair. **PeerJ**. DOI 10.7717/peerj.619; p. 1-19, 2014.

- Youker, S.R.; Andreozzi, R.J.; Appelbaum, P.C.; Credito, K.; Miller, J.J. White piedra: Further evidence of a synergistic infection. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v. 49, n. 4, p. 746-9, 2003.
- Wan-qing, L.; You-Sheng, X.; Pei-ming, C.; De-ying, X.; Ji-Zhong, Z.; Quing-Tao, C. *Cephalosporium acremonium* A new strain of fungus causing white piedra. **Chinese Medical Mycology**. v.100, n. 5; 425-7, 1991.
- Wade, M.; Tucker, I.; Cunningham, P.; Skinner, R.; Bell, F.; Lyons, T. et al. Investigating the origins of nanostructural variations in differential ethnic hair types using X-ray scattering techniques. **International Journal of Cosmetic Science**. v. 35, n. 5, p. 430–41, 2013.
- White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. In PCR Protocols: A guide to Methods and Applications. San Diego, U.S.A.: Academic Press. p. 315-22, 1990.
- Wolowiec, P.; Michalak, I.; Chojnacka, K.; Mikulewicz, M. Hair analysis in health assessment. *Clinica chimica acta*; **International Journal of Clinical Chemistry**. v. 419, p. 139–17, 2013.

## ANEXOS

## Experimental white piedra: a robust approach to ultrastructural analysis, scanning electron microscopy and etiological discoveries

Cícero P. Inácio<sup>1</sup>, Ana Paula S. Rocha<sup>1</sup>, Renan do N. Barbosa<sup>1</sup>, Neiva T. Oliveira<sup>1</sup>, Josineide C. Silva<sup>2</sup>, Reginaldo G. de Lima-Neto<sup>3</sup>, Danielle Patrícia C. Macêdo<sup>4</sup> and Rejane P. Neves<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Mycology, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil; <sup>2</sup>Strategic Center for Northeast Technologies, Recife, Brazil;

<sup>3</sup>Department of Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil; <sup>4</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

Correspondence: Rejane P. Neves, PhD, Department of Mycology, Federal University of Pernambuco (UFPE), Laboratory of Medical Mycology, Recife, Brazil. Tel.: +55 081 2126 8580, Fax: +55 081 2126 8580, e-mail: rejadel@pq.cnpq.br and rejadel@yahoo.com.br

**Abstract:** White piedra is a fungal infection characterized by nodules comprised of *Trichosporon* species and restricted to the extrafollicular portion of the hair shaft. The diagnosis is based on clinical and mycological characteristics, and must be confirmed with a precise identification of the etiological agent. This research aimed to develop an *in vitro* infection model of white piedra and analyze its morphological and ultra-structural aspects. In the process, hair infection was induced using eight isolates of the genus *Trichosporon* maintained in the Culture Collection Micoteca URM. The ITS and IGS1 regions were sequenced for taxonomic confirmation. Scanning Electron Microscope (SEM) was performed at the Strategic Center for Northeast Technologies (CETENE). The scanning electron microscope was equipped with an Energy Dispersion Spectrometer (EDS). The *Trichosporon* isolates were identified as *Trichosporon asahii* (6) and *Trichosporon*

*montevideense* (2) by internal transcript spacer (ITS) region and intergenic spacer 1 region (IGS1) sequencing. All eight strains were used to induce the *in vitro* hair infection, and nodules formed after the incubation period. Temperature variations and high humidity were not observed to be related to the development of this hair disease. The main chemical constituents detected in the nodules were carbon, nitrogen and oxygen, as well as a low level of sulfur. The absence of calcium, combined with the low level of sulfur, might explain the soft nature of the white piedra nodules. This study demonstrated that several *Trichosporon* species may be responsible for causing white piedra.

**Key words:** energy dispersion spectrometer – experimental white piedra – scanning electron microscope – *Trichosporon* sp.

Accepted for publication 8 October 2015

Download PDF

Add to Library

Supplements 1

Related Articles