



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS**

Lilian Cristiane Baeza

**“Análise de genes diferencialmente expressos por
Trichophyton rubrum na presença de queratina e
tipagem molecular”**

Araraquara

2006



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS**

Lilian Cristiane Baeza

**“Análise de genes diferencialmente expressos por
Trichophyton rubrum na presença de queratina e
tipagem molecular”**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara como pré-requisito para obtenção do título de Doutor.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

Araraquara

2006

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Baeza, Lilian Cristiane
B142a Análise de genes diferencialmente expressos por *Trichophyton rubrum*
na presença de queratina e tipagem molecular / Lilian Cristiane Baeza.
Araraquara, 2006.
81 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas.

Orientador: Maria José Mendes Giannini

1.Trichophyton rubrum. 2.Tipagem. 3. RAPD. 4.Análise de diferença representacional (RDA). 5.Micologia I. Giannini, Maria José Mendes, orient.
II. Título.

CDD: 616.969

CAPES:40300005

“Quem deve ser levado em conta não é aquele que censura que denuncia os tropeços dos fortes ou as limitações dos beneméritos; o valor pertence ao homem que está de fato na arena, cujo rosto está desfigurado pela poeira, pelo suor e pelo sangue; que luta valentemente, que erra, falha e torna a falhar; que conhece os grandes entusiasmos, as grandes dedicações; que se empenha numa causa justa e que, quando vence, conhece finalmente a vitória das grandes realizações; e, na pior das hipóteses, se fracassa, será enquanto se aventura magnificamente, de modo que seu lugar nunca será junto àquelas almas timoratas que não conhecem a vitória nem a derrota.”

(Theodore Roosevelt)

A Deus,

Pela vida, pela oportunidade de fazer o que me traz satisfação, por nunca ter me deixado nos momentos de dificuldade e por colocar seus “anjos” em meu caminho. Sei que por mais que eu agradeça suas bênçãos, nunca será o suficiente...

Este trabalho é dedicado à...

Meus pais, Neiva e Manoel,

Pelo exemplo que representam na minha vida e pela presença em todos os momentos, principalmente em meio às inúmeras correrias. Por uma vida de dedicação... Nunca mediram esforços para proporcionar a realização dos meus sonhos... Entre eles a conclusão deste trabalho de doutorado...

A vocês o meu amor incondicional.

Meus irmãos, Marcos e Marcelo e a minha tia, Maria Helena,

Meus grandes amores! Parece que o tempo não passou... A amizade, o carinho, e as coisas “nada a ver” persistem apesar da distância e me confortam em momentos difíceis.

Meu namorado, Ronan,

Que esteve comigo todo esse tempo, que me incentivou sempre, que sofreu comigo a cada adeus e escutou todas as histórias mirabolantes desta fase... A você com muito amor...

A Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini (Zezé)

Uma pessoa justa e competente que a convivência me ensinou a admirar e respeitar. Agradeço pelo constante estímulo e confiança, por oferecer as melhores condições para o desenvolvimento deste trabalho e pela amizade constituída no decorrer destes anos. Muito obrigada!!!

“Não se pode ensinar alguma coisa a alguém, pode-se apenas auxiliá-lo a descobrir por si mesmo.”

(Galileu Galilei)

Agradecimentos

Aos meus queridos “amigos”, que sempre estiveram ao meu lado, com quem dividi todas as alegrias e angustias. **Tirene Pavanelli, Eliana Cainelli, Carol Malaspina, Luís Gustavo Monnazzi, Simone (Nazira), Juliana Monteiro, Danielle Maia** e em especial a **Patrícia Andreotti**, amiga de todos os momentos... A **Ana Marisa Fusco** e **Marcelo Matsumoto**, pelo carinho, incentivo e sugestões... A **Aline Voltan**, pelas ótimas risadas, nossas futilidades e por me aturar... Tudo de bom!!! A vocês com carinho.

A Profa. Dra. **Célia Maria de Almeida Soares**, do Laboratório de Biologia Molecular, da Universidade Federal de Goiás (UFG), que me acolheu em seu laboratório (agradeço esta honra). Seu conhecimento e competência me guiaram nesta empreitada e tornaram possível o desenvolvimento de parte deste trabalho.

Aos meus amigos da UFG, **Alexandre Melo Bailão** e **Clayton Luís Borges** (Claytin), meus “anjos da guarda” nos momentos de dificuldade, dúvida e desespero, que auxiliaram em grande parte dos experimentos do RDA. A **Renata Soares**, que generosamente me acolheu em sua casa durante a minha estada em Goiânia. E a todos os amigos do Laboratório de Biologia Molecular da UFG, **Karinne, Moniquinha, Mônica...**

A duas pessoas muito especiais, **Rosângela Ap. Moraes da Silva (Rô)** e **Elaine Toscano Miranda (Tosca)**, pelos ensinamentos em Micologia, dedicação, paciência e em especial pela amizade e carinho com que sempre me trataram. Muito obrigada!!!

Aos meus queridos companheiros (e ex-companheiros) do Laboratório de Micologia, **Liliana Scorzoni, Julhiany, Tatiane, Susana d'Avila, Rosana Bellan, Fabiana Donofrio, José Nelson, João, Paula Boni, Adriana (Katina), Ana Carolina (Pi), Rosemira, Natália, Karen e Fábio**, pela convivência sempre descontraída, pelos ótimos momentos compartilhados... Vocês foram as pessoas com as quais eu mais convivi nesses últimos anos, e fazem parte de uma fase muito boa da minha vida.

Ao Prof. Dr. **Sandro Roberto Valentini** e aos seus alunos **Luciano, Cleslei, Mariana e Veridiana**, que me ajudaram no início deste trabalho e sempre me socorreram quando meus reagentes acabavam...

Ao **CNPq** pela bolsa concedida.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara, SP. Recebeu auxílio à pesquisa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – (processo nº 05/60015–5), Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico – PADC/FCF/UNESP (processo nº 2005/8–I) e apoio financeiro pessoal do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

ÍNDICE

Lista de siglas, abreviaturas e símbolos	xii
Resumo	xv
Abstract	xvii
Capítulo 1	
1- Introdução e revisão da literatura	01
1.1- Histórico e taxonomia	01
1.2- Dermatofitoses	03
1.3- Ecologia e epidemiologia	04
1.4- Tipagem molecular	08
1.5- Patogenicidade	14
1.6- Expressão diferencial de genes	18
2- Objetivos	23
2.1- Objetivos específicos	23
Capítulo 2	
3.1- Manuscrito 1	24
3.2- Manuscrito 2	32
4- Conclusões	57
5- Anexos	58
5.1 – Metodologia de RDA (Análise de Diferença Representacional)	58
5.1.1- Cultivo de <i>T. rubrum</i> – ativação/repressão gênica	58
5.1.2- Extração de RNA total	58
5.1.3- Reação de RDA	60
5.1.3.1- Síntese de cDNA fita simples	60
5.1.3.2- Síntese de cDNA fita dupla	61

5.1.3.3- Digestão com <i>Sau3AI</i>	61
5.1.3.4- Anelamento do primeiro par de adaptadores	62
5.1.3.5- Ligação do primeiro par de adaptadores	62
5.1.3.6- Teste de ligação do primeiro par de adaptadores	62
5.1.3.7- Primeira subtração	63
5.1.3.8- Primeira amplificação	63
5.1.4- Ligação dos fragmentos em vetor de clonagem	64
5.1.5- Preparo de células competentes para transformação por eletroporação	65
5.1.6- Transformação de células de <i>E. coli</i> por eletroporação	65
5.1.7- Extração de DNA plasmidial em microplaca	66
5.1.8- Seqüenciamento	67
Referências bibliográficas	68

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ω – Ohm

ATCC- *American Typing Collection Culture*

ATP – Adenosina trifosfato

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

pb – Pares de base / *basis pair*

A - Adenina

act – Actina / *actin*

C – Citosina

catP – Catalase P / *catalase isozyme P*

cDNA - Ácido desoxirribonucléico complementar

chs1 - Quitina sintase 1 / *chitin synthase 1*

ddNTP - Didesoxirribonucleosídeo(s) trifosfato(s)

ded1 – RNA helicase DED1 ATP dependente / *ATP-dependent RNA helicase*

DED1

DEPC – Dietilpirocarbonato

dNTP – Desoxirribonucleosídeo(s) trifosfato(s)

DTT – Ditioneitol

EDTA – Ácido etileno diamianino tetracético

EE – EPPS / EDTA

EPPS - [*N*-(2-hydroxyethyl)piperazine-*N'*-3-propanesulfonic acid]

EST – Seqüência expressa / *Espressed Sequence Tags*

G – Guanina

gpa – Proteína G subunidade alfa / *G protein subunit alpha*

GTE – Glicose/ Tris-HCl/ EDTA

hxf – Fator de transcrição homeobox / *homeobox transcription factor*

IPTG – Isopropil-tio- β -D-galactopiranosídeo

LB – Luria-Bertani

memb – Proteína de membrana / *membrane protein*

MIPS – *Munich Information Center for Protein Sequences*

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

RDA – Análise de diferença representacional / *Representational Difference*

Analysis

RNA - Ácido ribonucléico

RNase - Ribonuclease

RT – Transcriptase reversa / *reverse transcriptase*

SDS - Dodecil sulfato de sódio

T - Timina

TBE - Tris / ácido bórico / EDTA

TE - Tris / EDTA

Tris - Tri (hidroximetil) aminometano

X-gal – 5-bromo-4-cloro-3-indoli-B- galactopiranosídeo

zfp – Proteína dedo de zinco / *zinc finger protein*

RESUMO

As dermatofitoses são processos infecciosos de pele, pêlo e unhas muito comuns no mundo inteiro. *Trichophyton rubrum* é o dermatófito mais freqüentemente isolado em lesões superficiais de pele e unha. Estudos envolvendo este patógeno são cada vez mais importantes devido ao aparecimento de linhagens resistentes aos medicamentos antifúngicos disponíveis no mercado e ao comportamento invasivo deste agente em pacientes com o sistema imune comprometido. Estes fatos e poucos estudos levam à necessidade de se ampliar o conhecimento sobre a biologia deste agente. Visando colaborar nesse sentido, o presente trabalho teve dois objetivos centrais: 1) Realizar a tipagem molecular de isolados clínicos de *T. rubrum* com e sem relação epidemiológica por RAPD (Amplificação Randômica de DNA Polimórfico) com duas seqüências randômicas diferentes (denominadas de 1 e 6), bem como a análise dos elementos repetitivos (TRS-1 e TRS-2) do espaço não transcrito (NTS) do DNA ribossomal (DNAr) e 2) Identificar transcritos envolvidos na interação deste patógeno com fonte humana de queratina, através do RDA (Análise de Diferença Representacional). A tipagem molecular foi realizada em 67 isolados clínicos de *T. rubrum*, dos quais 10 foram provenientes de pacientes epidemiologicamente relacionados e 14 de sete pacientes com dois sítios anatômicos infectados. A tipagem por RAPD gerou 12 perfis genotípicos distintos com a seqüência 1, e 11 com a seqüência 6. A análise filogenética mostrou grau de similaridade alto (>90%) entre os isolados clínicos epidemiologicamente relacionados, os demais isolados apresentaram similaridade em torno de 60% com ambas as seqüências. Além disso, esta metodologia demonstrou que a infecção ocorreu por mais de uma cepa, em pacientes com diferentes amostras coletadas de sítios anatômicos diferentes. A amplificação da

região TRS-1 produziu três padrões distintos, o tipo 1 (que possui uma cópia do elemento repetitivo TRS-1) foi o mais comum, englobando 89,5% dos isolados. Em relação à região repetitiva TRS-2, dois padrões foram encontrados. O tipo I representado por um fragmento de 502 pb, que possui duas cópias de TRS-2 foi encontrado em 85% dos isolados. A análise dos elementos repetitivos não foi capaz de discriminar os isolados provenientes de sítios anatômicos diferentes de um mesmo paciente. Portanto, o RAPD mostrou-se mais eficaz na tipagem molecular deste dermatófito. A identificação de transcritos por meio de RDA foi feita em experimentos com RNA do microrganismo previamente cultivado em meio de cultura contendo queratina (*tester*), e em meio sem esta proteína (*driver*). Após hibridizações subtrativas de *tester* e *driver*, os produtos diferencialmente expressos foram clonados e seqüenciados. No total, 344 seqüências foram analisadas através do programa BLASTX, e estas foram divididas em 19 grupos. Destes, 10 apresentaram homologia com ortólogos conhecidos que codificam para fatores de transcrição, transdução de sinais, síntese de proteínas, virulência e defesa celular, entre outros. Alguns dos genes diferencialmente expressos foram confirmados por *dot* e *Northern blot*. A aplicação do RDA permitiu pela primeira vez a identificação de alguns transcritos expressos, provavelmente relacionados à patogênese deste microrganismo.

Palavras chave: *Trichophyton rubrum*; Tipagem molecular; RAPD; Análise de diferença representacional (RDA).

ABSTRACT

Dermatophytosis is common infection process which occurs in skin, hair and nails and *Trichophyton rubrum* is the most frequently isolated dermatophyte. Studies on this pathogen are becoming increasingly important because of frequent reports on resistant strains to antifungal drugs commercially available and the invasive behavior of these agents in immunocompromised patients. These facts, associated with few studies with this agent, indicate the need to expand the information about the fungal biology. As a contribution to this goal, the present study had two central objectives: 1) To compare different methodologies for molecular typing of clinical isolates of *T. rubrum* epidemiologically related and unrelated for RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) with two different random primers (denominated of 1 and 6); as well as the analysis of the repetitive elements (TRS-1 and TRS-2) of the space non-transcribed (NTS) of the ribosomal DNA (DNAr) and 2) To identify transcripts involved in the interaction of this pathogen with human keratin by RDA (Representational Difference Analysis). The molecular typing was carried out for 67 clinical isolates of *T. rubrum*, from which 10 were collected from epidemiologically related patients and 14 from seven patients with two body sites infected. The RAPD analysis yielded 12 individual profiles with primer 1, and 11 with the primer 6. Phylogenetic analysis showed high degree of similarity (>90%) among the epidemiologically related clinical isolates, while the other strains possessed around 60% similarity with both primers. Moreover, this methodology demonstrated that the infection occurred by two different strains, in patients presented different samples. The amplification of region TRS-1 produced three different patterns: type 1 (that it possesses a copy of repetitive element TRS-1) was the most common in 89.5% of the isolates. Two patterns had been found in

TRS-2 analysis. Type I, represented for one fragment 502 bp, which possesses two copies of TRS-2 was found in 85% of the isolates. The uses of repetitive elements are not capable to discriminate isolates derived from two different sites on unique patients. Therefore, the RAPD was the more efficient method to molecular typing of this dermatophyte. The transcript identification by RDA was performed by RNA of the microorganism which was previously cultured in presence of keratin (tester), and absence this protein (driver). After subtractive hybridizations of tester and driver, the differentially expressed products were cloned and sequenced. In the total, 344 sequences were analyzed using program BLASTX, and these were grouped in 19 clusters. From of these, 10 sequences demonstrated homology with orthologues already described, that codify for transcription factors, signals transduction, protein synthesis, virulence and cellular defense. Subsequently, some differentially expressed genes were confirmed by dot and Northern blot. The application of the RDA allowed for the first time the identification of expressed transcripts during the microorganism proliferation that could be related to the *T. rubrum* virulence.

Key words: *Trichophyton rubrum*; Molecular typing; RAPD; Representational difference analysis (RDA).

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Histórico e Taxonomia

Dermatófitos são fungos queratinofílicos estreitamente relacionados, capazes de invadir tecidos queratinizados (pele, pêlos e unhas) e causadores da dermatofitose (comumente conhecida como *tinea* ou *tinha*), em humanos e animais (WEITZMAN & SUMMERBELL, 1.995).

Remak em 1.835 e Hube em 1.837 foram os primeiros a observar e descrever estruturas microscópicas de lesões fávicas. A natureza micótica das estruturas foi reconhecida por Schöenlein em 1.839 (SCHÖENLEIN, 1.839 apud WEITZMAN & SUMMERBELL, 1.995).

No período de 1.841 a 1.844, David Gruby descreveu o agente causal do favo e estabeleceu o contágio natural da doença (GRUBY, 1.841 apud WEITZMAN & SUMMERBELL, 1.995). Em seguida descreveu o parasitismo do tipo ectótrico da barba e do couro cabeludo e o agente etiológico foi denominado de *Microsporum audouinii* (referindo-se aos pequenos esporos ao redor do fio de cabelo) (GRUBY, 1.843 apud WEITZMAN & SUMMERBELL, 1.995). O parasitismo do tipo endótrico do cabelo causado pelo *Herpes (Trichophyton) tonsurans* foi descrito em 1.844 (GRUBY, 1.844 apud WEITZMAN & SUMMERBELL, 1.995).

Em 1.910, Raimond Sabouraud começou a estudar os dermatófitos e os classificou em quatro gêneros: *Achorion*, *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*, baseado nos aspectos clínicos da doença, de suas culturas e das características microscópicas (SABOURAUD, 1.910 apud WEITZMAN & SUMMERBELL, 1.995).

Em 1.934, Chester Emmons (EMMONS, 1.934) modernizou a taxonomia descrita por Sabouraud e estabeleceu a atual classificação dos dermatófitos com

base na morfologia dos esporos, eliminando o gênero *Achorion* e reconhecendo os três gêneros: *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*.

O estado teleomórfico de *Trichophyton (Keratinomyces) ajelloi* descrito por Dawson e Gentles, em 1.959, foi obtido pela técnica da isca de cabelo descrita por Vanbreuseghem, que levou a descoberta da forma perfeita de outros dermatófitos (DAWSON & GENTLES, 1.961). As formas teleomorfas de *Microsporum* e *Trichophyton* foram respectivamente classificadas em dois gêneros *Nannizzia* e *Arthroderma* (AJELLO, 1.977). No entanto, em estudo posterior, Weitzman et al., (1.986) concluíram que devido a diferenças morfológicas mínimas entre eles, foram considerados congêneres, prevalecendo *Arthroderma* por sua descrição prioritária, pertencente ao Reino Fungi; Filo Ascomycota; Ordem Onygenales; Família Arthrodermataceae. A forma anamorfa dos gêneros, *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*, foi incluída na subdivisão-forma Deuteromycotina; Classe-forma dos Hyphomycetes (WEITZMAN & SUMMERBELL, 1.995) e compreendem aproximadamente 22 espécies de *Trichophyton*, 16 de *Microsporum* e duas de *Epidermophyton* (ALY, 1.994). Não há descrição da forma perfeita de *T. rubrum*, entretanto, após análise do transcriptoma deste patógeno, foi encontrado um grande número de genes relacionados ao processo de meiose, além de um gene que codifica uma proteína HMG (grupo de alta mobilidade), que está envolvida com a reprodução sexual em ascomicetos, sugerindo que *T. rubrum* pode possuir o ciclo sexual (WANG et al., 2.006).

T. rubrum foi inicialmente descrito como *Epidermophyton rubrum* por Castellani em 1.910 (CASTELLANI, 1.910 apud RIPPON, 1.988), disseminando-se no final do século 19, após uma epidemia de *tinea corporis* no sudeste da Ásia (RIPPON, 1.988). *T. rubrum* é um dermatófito antropofílico que causa

principalmente lesões na pele e unhas. Ao exame direto do material clínico observa-se a presença de hifas septadas hialinas, muitas vezes artrosporadas. O crescimento das colônias varia de lento a moderado (7 – 14 dias), tem aspecto cotonoso e branco, tornando-se posteriormente aveludadas. O reverso da colônia apresenta pigmentação avermelhada, púrpura. Microconídios são clavados ou piriformes, com 2-3 X 3-5 µm de tamanho disposto ao longo das hifas e produzem raros macroconídios (LACAZ et al., 2.002).

1.2. Dermatofitoses

As dermatofitoses são classificadas de acordo com a localização anatômica da lesão, designada em latim após o termo *tinea* (do latim) ou tinha. Por exemplo, *tinea pedis* (tinha dos pés), *tinea unguium* (tinha das unhas, ou onicomicose), *tinea capitis* (tinha do couro cabeludo), entre outras. Algumas dermatofitoses têm denominação referenciada ao aspecto clínico da lesão (ex. *tinea favosa*, *tinea imbricata*) (RIPPON, 1.988).

O aspecto clínico da dermatofitose varia de acordo com o local da lesão e com o agente etiológico envolvido. Frequentemente produzem lesões circinadas descamativas, eritematosas, às vezes vesiculosas, pustulosas, podendo ou não apresentar hiperqueratose. Nas unhas, o acometimento pode ser subungueal invasivo ou localizado. No couro cabeludo são observadas as formas tonsurantes, com alopecia que regride após a cura, e a fávica, crostosa e pustulosa, que acomete o folículo piloso causando alopecia definitiva (WEITZMAN & SUMMERBELL, 1.995).

1.3. Ecologia e Epidemiologia

Os dermatófitos dividem-se em espécies antropofílicas, zoofílicas e geofílicas de acordo com seu habitat primário (AJELLO, 1.962) e estão entre os poucos fungos causadores de doença transmissível (WEITZMAN & SUMMERBELL, 1.995). As espécies antropofílicas estão primariamente associadas com humanos e raramente causam doenças em animais (MAYR, 1.989). Os zoofílicos usualmente infectam ou estão associados a animais e ocasionalmente atingem os humanos. Os geofílicos estão primariamente associados com materiais em decomposição contendo queratina como, cabelos, pêlos, unhas e chifres, podendo causar infecção em humanos e animais (CHEML, 1.980). Em algumas espécies antropofílicas, acredita-se que os artroconídios possam dissociar-se de células epiteliais no meio ambiente e contaminar novos hospedeiros, gerando uma fonte ambiental de contágio podendo induzir a dermatofitose recorrente em indivíduos de forma isolada ou em agrupamentos dentro de instituições (KANE et al., 1.988; MACKENZIE, 1.961).

A história natural deste grupo de organismos indica que tiveram provavelmente uma origem comum como geofílicos, e paulatinamente foram adaptando-se e passaram a ser associados ao homem e a outros animais (BÁRSENA-ASENSIO & CABO, 1.996).

Os dermatófitos antropofílicos são bem adaptados ao parasitismo humano e produzem geralmente infecção mais branda, tendendo à cronicidade. As espécies zoofílicas e geofílicas, menos adaptadas ao homem, causam infecções mais inflamatórias, de caráter agudo, muitas vezes com formação de vesículas e pústulas (ODOM, 1.992).

Esses fungos queratinofílicos podem manter seu ciclo vital através do contágio inter-humano direto ou indiretamente, pois podem apresentar-se viáveis durante semanas ou meses em material córneo depositado em pisos, assoalhos e outros substratos úmidos (GENTLES, 1.958). Contudo, a transmissão direta das dermatofitoses parece não ocorrer com muita freqüência (GEORG, 1.960), constituindo-se de grande importância sua disseminação através de objetos, pisos úmidos e águas de recreação. Dentre essas fontes de infecção, destacam-se os locais de banheiros públicos (cabines individuais, vestiários, boxes, lava-pés das piscinas) que proporcionam condições de temperatura e umidade adequada à manutenção dos esporos infectantes. Desse modo, a propagação das dermatofitoses, especialmente tinea dos pés, se dá através do chão contaminado com os esporos. Outro aspecto relevante é o uso comum de objetos pessoais, tais como, pentes, toalhas, roupas de banho que podem ser responsáveis pela transmissão de tinea do couro cabeludo e tinea do corpo, respectivamente.

A distribuição geográfica dos dermatófitos mostra-se bastante variável, enquanto alguns são cosmopolitas como *T. rubrum* e *T. tonsurans* (RIPPON, 1.988), outros são mais restritos e sua distribuição depende dos seguintes fatores: adaptação ao meio ambiente, deslocamento humano, convívio com animais domésticos, aspectos sócio-econômicos, sexo, idade e imunidade do hospedeiro, promovendo assim, variações no espectro destes fungos de região para região (LIMA et al., 1.999; ZAIAS & REBELL, 1.996). Dessa forma é importante o conhecimento das espécies dos dermatófitos de uma dada região, durante período de tempo prolongado, permitindo estabelecer as espécies de ocorrência comum, esporádica ou excepcional (LONDERO & RAMOS, 1.989).

Estudos epidemiológicos indicam que os dermatófitos estão entre os

fungos mais freqüentemente isolados, e as dermatofitoses são o terceiro distúrbio de pele em crianças menores de 12 anos e o segundo na população adulta (GREER, 1.994). Vários motivos são aventados para explicar o aumento da incidência destas infecções nas últimas décadas, entre eles: uso abusivo de antibióticos, drogas imunossupressoras e citostáticas, bem como o aparecimento de pacientes com Aids, os quais constituem alvo para o desenvolvimento das dermatofitoses (JOHNSON, 2.000). Aliado a esses fatores, os dermatófitos encontram nas condições de temperatura e umidade do clima tropical, o habitat ideal para sua disseminação (LEITE et al., 1.990).

Tinha das unhas e dos pés são as duas infecções cutâneas provocadas por fungos que prevalecem na população em geral. Embora essas desordens não sejam sérias em termos de mortalidade, danos físicos e/ou psicológicos, elas têm significativa conseqüência clínica, com lesões crônicas, de difícil tratamento, além de problemas estéticos (PEREA et al., 2.000).

Perea et al., (2.000) analisaram a prevalência de tinha das unhas e dos pés na população geral de Madri na Espanha. Tinha das unhas estava presente em 2,8% (4,0% em homens e 1,7% em mulheres) e tinha dos pés em 2,9% (4,2% em homens e 1,7% em mulheres) dos casos. Os agentes etiológicos prevalentes em tinha das unhas foram: *T. rubrum* 82,1%, seguido por *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* 14,3% e *T. tonsurans* 3,5%; já em tinha dos pés, os microrganismos isolados foram: *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* 44,8%, *E. floccosum* 7% e *T. tonsurans* 3,4%.

Mugge et al., (2.006) analisaram 5.077 amostras de unhas. Destas, 54% foram positivas para dermatófitos, leveduras ou outros bolores. Dermatófitos foram responsáveis por 68% dos casos, e *T. rubrum* foi a espécie prevalente, encontrada

em 91% dos casos de dermatofitose.

Estudos epidemiológicos no Brasil têm mostrado o predomínio de *T. rubrum*. Costa et al., (1.999) analisaram 6.068 casos suspeitos de dermatofitose em Goiânia-GO durante o período de 1.993 a 1.997, desses 1.595 (26,3%) foram positivos para dermatófitos. *T. rubrum* foi encontrado em 37,4% dos casos, seguido por *T. mentagrophytes* (36,4%) e *Microsporum canis* (16%). Brilhante et al., (2.000) investigaram 2.297 pacientes com lesões clínicas sugestivas de dermatofitose na cidade de Fortaleza-CE, no período de junho de 1996 a dezembro de 1998 e 534 (23,2%) mostraram-se positivas para dermatófitos. *T. rubrum* foi a espécie prevalente (49,6%), seguido por *T. tonsurans* (34,4%), *M. canis* (7%) e *T. mentagrophytes* (6,2%). Ao correlacionar as espécies isoladas com os respectivos sítios anatômicos, *T. tonsurans* foi o fungo mais isolado de lesões do couro cabeludo (73,9%) e *T. rubrum* em unha do corpo (72,8%).

Outro estudo realizado em Porto Alegre-RS no período de 1.981 a 1.995 mostrou o predomínio de *T. rubrum* em 55,3% das ocorrências, seguido por *T. mentagrophytes* em 21,5% (MEZZARI, 1.998). Em Florianópolis-SC, durante os anos de 1995 a 1996, foram analisados 946 pacientes dos quais 249 apresentaram dermatofitose. A maior incidência foi de *T. rubrum* (58,6%), seguido por *T. mentagrophytes* (25,3%), *E. floccosum* (7,2%), *M. canis* (4,8%), *T. tonsurans* (1,6%) e *T. violaceum* (1,6%) e *M. gypseum* (0,8%) (SANTOS et al., 1.997).

Chinelli et al., (2.003), em estudo realizado na cidade de São Paulo-SP durante os anos de 1.992 a 2.002, mostraram que *T. rubrum* foi o dermatófito mais freqüentemente isolado em 47,8% dos casos e unha do corpo a manifestação clínica mais comum (31,5%). Investigação epidemiológica realizada em sete Instituições públicas da cidade de Araraquara-SP indicou o predomínio de *T.*

rubrum (59%), seguido por *M. canis* (17%), *T. tonsurans* (11%), *T. mentagrophytes* (9%) e *E. floccosum* (4%). Ao correlacionar as espécies isoladas com os respectivos sítios anatômicos, *T. rubrum* foi mais freqüente nas lesões dos interdígitos (81,5%) e *M. canis* nas lesões do couro cabeludo (58,3%), seguido por *T. tonsurans* (41,7%) (BAEZA et al., 2.004).

Siqueira et al., (2.006) investigaram a presença de dermatófitos, em pacientes com e sem lesões sugestivas de dermatofitose. Foram coletadas 280 amostras, das quais 31 (11,1%) apresentaram positividade apenas pelo exame direto, e 20 (7,1%) tiveram, além do exame direto positivo, crescimento de dermatófito, mediante cultivo da amostra biológica. *T. rubrum* foi o dermatófito isolado com maior freqüência (80%), seguido por *T. mentagrophytes* (20%).

1.4. Tipagem molecular

A maioria dos estudos têm apenas verificado a prevalência da doença e seus principais agentes etiológicos, no entanto, sabe-se que para melhor avaliação dos dermatófitos, em nível taxonômico, filogenético e epidemiológico, bem como para caracterizar a própria doença, faz-se necessário o emprego de outros métodos para possíveis correlações com os achados clínicos, laboratoriais e terapêuticos.

A biologia molecular tem sido empregada na tentativa de elucidar estas questões. Várias técnicas foram empregadas como a composição básica do DNA, hibridização DNA-DNA, RFLP (Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição) do DNA mitocondrial (DNAm_t), seqüenciamento da região do espaço interno transcrito (ITS) de hiper-variabilidade, RAPD (Amplificação Randômica de DNA Polimórfico) (KAC, 2.000), seqüenciamento do gene da quitina sintase 1

(*chs1*) (KANO et al., 1.997, 1.999) e amplificação do espaço não transcrito (NTS) do DNA ribossomal (DNAr) (JACKSON et al., 2.000).

No início dos anos 80, métodos baseados no estudo de ácido nucléico foram usados para auxiliar em questões sobre a similaridade entre os dermatófitos. O primeiro estudo genotípico para dermatófitos, verificou a composição básica do DNA cromossomal por gradiente de CsCl de 34 espécies, envolvendo os três gêneros: todas as espécies mostraram conteúdo de G+C variando de 48,7% a 50,3% (DAVIDSON et al, 1.980). Posteriormente, estudos baseados na análise do DNAm foram iniciados, para investigar a filogenia e taxonomia dos dermatófitos. De Bièvre et al., (1.987) estudaram o DNAm de seis isolados de *T. rubrum* usando quatro endonucleases de restrição e, com base nos fragmentos gerados, estes foram divididos em dois grupos (I e II). Nishio et al., (1.992) estenderam o estudo desta análise com cinco endonucleases de restrição, confirmando esses resultados.

A seqüência de nucleotídeos do gene *chs1* de algumas espécies de dermatófitos mostrou em média 95% de similaridade. A análise filogenética da seqüência revelou que *T. rubrum* foi geneticamente distinto de *T. violaceum*, apresentando um sítio de restrição para a enzima *HinFI*, mas sugere que *T. rubrum* var. *nigricans* e *T. raubitschekii* devem ser incluídos como *T. rubrum*, já que a similaridade entre a seqüência de nucleotídeos é de 98% (KANO et al., 2.000).

Faggi et al., (2.001) através da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) *fingerprinting* com um único oligonucleotídeo de seqüência repetida (GACA)₄ produziu padrões distintos para *M. canis*, *M. gypseum*, *T. rubrum*, *T. ajelloi* e *E. floccosum*, entretanto não foram observadas variações intraespecíficas para estas

espécies.

A utilização de 20 marcadores que representavam 57 loci foi analisada por PCR *fingerprinting*, AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados) e RAMD (Amplificação Randômica de DNA Monomórfico) para detecção de polimorfismos em *T. rubrum*, entretanto nenhuma das metodologias empregadas revelou qualquer variação (GRÄSER et al., 1.999).

As espécies antropofílicas são conhecidas por serem principalmente transmitidas por via indireta (escova de cabelo, pente, travesseiro, chapéu, piso de piscina e de salas de ginástica), no entanto a transmissão direta pessoa-pessoa não pode ser excluída. Além disso, quando uma lesão reaparece após o tratamento, particularmente em onicomicose, é desconhecido se é causada pela mesma cepa (recidiva) ou por uma nova (reinfecção). Estudos epidemiológicos detalhados são difíceis pela dificuldade da caracterização dos isolados, devido à falta de técnicas com poder discriminatório alto para determinar a variabilidade das cepas.

Entre essas técnicas, o RAPD tem proporcionado identificação de vários dermatófitos na sua forma anamorfa e teleomorfa, principalmente aqueles com variações nas suas características morfológicas pelos procedimentos convencionais, além de ser um método discriminatório, de fácil execução e interpretação para estudos epidemiológicos (KAC, 2.000).

O RAPD é realizado através do uso de uma única seqüência iniciadora curta (geralmente 9 -10 bases) a qual se hibridiza com afinidade suficiente em seqüências do DNA genômico em baixa temperatura (<40⁰C), o que diminui a estringência, permitindo que um iniciador randômico, que não mostra homologia completa em relação ao DNA molde possa emparelhar com dois a três

nucleotídeos, permitindo a hibridização e iniciando a síntese da fita complementar pela ação da DNA polimerase. Um número definido de produtos de amplificação é gerado, devido ao fato de que seqüências parcialmente complementares à do iniciador estar em fitas opostas no DNA. A diferenciação de vários microrganismos é possível devido à diferenciação no padrão de bandas detectada por eletroforese em gel de agarose (WELSH & McCLELLAND, 1.990; WILLIANS et al., 1.990). Essa metodologia tem sido recentemente usada para diferenciação de isolados em larga escala, de *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e algumas espécies de bactérias (HOWELL et al., 1.999).

Na prática, o RAPD pode distinguir as três espécies de *Trichophyton* mais envolvidos em dermatofitose: *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *T. tonsurans* utilizando-se a seqüência iniciadora (OPAA 11) (LIU et al., 1.996). *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* e var. *interdigitale* também podem ser identificados por amplificação do seu padrão de DNA utilizando a seqüência randômica (OPAA 17) (LIU et al., 1.997b). Além disso, foi bem sucedida a identificação de isolados de *T. rubrum* e *T. interdigitale* atípicos e pleomórficos (KAC et al., 1.999a), indicando que o RAPD pode ser uma ferramenta útil para diagnóstico e atualmente para isolados que apresentam variações fenotípicas. Liu et al., (1.997a), mostraram a produção de padrões de bandas de DNA distintos, entre vários isolados de *Epidermophyton*, espécies de *Microsporum* e espécies e subespécies de *Trichophyton*, empregando dois diferentes decâmeros randômicos. Em outro estudo, a combinação de duas seqüências possibilitou a identificação de 23 das 25 espécies ou subespécies de dermatófitos analisados (LIU et al., 2.000).

Howell et al., (1.999) utilizaram diferentes métodos de tipagem molecular para caracterização de isolados de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*. Todas as

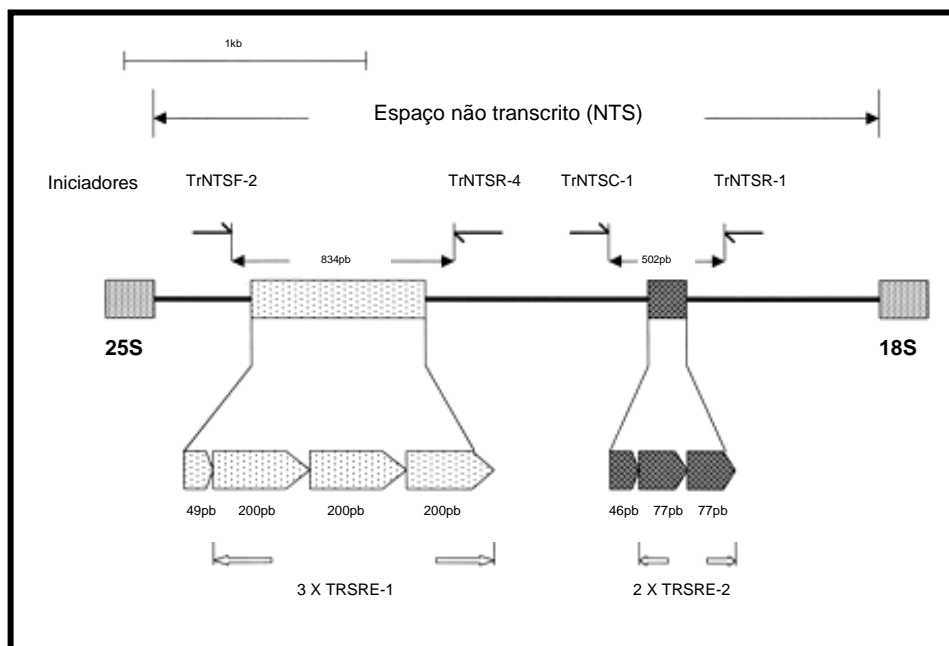
técnicas empregadas (análise com endonucleases de restrição - REA, hibridização com poli (dG-dT), RAPD, amplificação e restrição das regiões 5.8S do DNAr e do espaço interno transcrito foram capazes de diferenciar *T. rubrum* de *T. mentagrophytes*, entretanto, somente o RAPD mostrou variações intraespecíficas entre os isolados de *T. mentagrophytes*.

Kac et al., (1.999b) caracterizaram 46 isolados de fontes humanas e animais do complexo *T. mentagrophytes*, através do RAPD, em que foram testadas 15 seqüências iniciadoras e apenas uma, apresentou bom poder discriminatório. Em 33 isolados, não relacionados (provenientes de três continentes), foram encontrados 23 tipos dos quais, nove possuíam o mesmo padrão (27%). Não foi encontrada predominância de linhagem específica em uma mesma região geográfica. Isolados de *T. interdigitale* de diferentes lesões, de um único paciente, mostraram o mesmo padrão de RAPD, sugerindo uma população de dermatófitos homogênea nas lesões encontradas. Entretanto, a diferença entre os isolados de *T. interdigitale* provenientes de dois pacientes que viviam juntos, questionou a transmissão pessoa-pessoa, neste caso.

Recentemente, a aplicação do RAPD foi descrita para tipagem molecular de *T. rubrum*, utilizando duas seqüências iniciadoras randômicas, em que cinco padrões foram observados entre 10 isolados com cada seqüência empregada (BAEZA & MENDES-GIANNINI, 2.004).

Outra metodologia que possibilitou a diferenciação intra-específica de *T. rubrum* foi a amplificação de elementos repetitivos (TRS-1 e TRS-2) da região do DNA ribossomal do espaço não transcrito (NTS), variações no número de cópias desses elementos foram responsáveis por polimorfismos ao longo da região NTS (Figura 1). Jackson et al., (2.000) encontraram 21 tipos de TRS-1 a partir de 101

isolados clínicos. Kamiya et al., (2.004) observaram 17 tipos de TRS-1 em 252 isolados e Yazdanparast et al., (2.003) utilizando à mesma metodologia, observaram mais de uma cepa de *T. rubrum* causando infecção a partir de um único sítio anatômico.



(JACKSON et al., 2.000)

Figura 1: Representação esquemática da região do espaço não transcrito (NTS) do isolado de *T. rubrum* NCPF 295, mostrando a localização dos elementos repetitivos TRS-1 e TRS-2.

Jackson et al., (1.999) através do RFLP, com a endonuclease de restrição *EcoRI* e como sonda o produto obtido por amplificação da região 18S do DNA e das regiões adjacentes ITS I e II, identificaram 14 perfis genotípicos distintos em 50 isolados de *T. rubrum*. Gupta et al., (2.001) utilizaram a mesma metodologia para a tipagem de 66 isolados seriados de *T. rubrum* provenientes de 16 pacientes com onicomicose por um período de 36 meses, que fizeram uso de terapia antifúngica

oral. Cinco perfis diferentes foram observados entre os isolados, além disso, foi encontrado mais de um perfil nas amostras seqüenciais de um único paciente. Não foi encontrada correlação entre a eficácia do tratamento administrado e o genótipo.

A comparação entre o RAPD e a amplificação de elementos repetitivos (TRS-1 e TRS-2) da região do DNAr do espaço não transcrito foi aplicada para a tipagem de 67 isolados clínicos de *T. rubrum*, dos quais 10 eram epidemiologicamente relacionados e 12 provenientes de seis pacientes com dois sítios anatômicos infectados. A tipagem por RAPD demonstrou que a infecção ocorreu por mais de uma cepa, em pacientes que apresentaram amostras diferentes, no entanto a amplificação das regiões TRS-1 e TRS-2 não apresentaram o mesmo poder discriminatório (BAEZA et al., 2.006).

A caracterização filogenética dos dermatófitos através de técnica padronizada mundialmente pode possibilitar melhor compreensão da dinâmica da infecção, confirmando as cadeias de transmissão aventadas pelas investigações epidemiológicas clássicas, detectar a transmissão em comunidades fechadas, monitorando estes padrões dentro e entre comunidades e regiões. Quando utilizada em conjunto com os métodos convencionais de investigação epidemiológica, os métodos de tipagem molecular têm permitido grandes avanços no conhecimento da transmissão e patogênese das infecções fúngicas (SOLL, 2.000).

1.5. Patogenicidade

O mecanismo de interação fungo-hospedeiro, durante a infecção fúngica cutânea é extremamente complexo. Dermatófitos não fazem parte da microbiota humana da pele, no entanto, eles são bem adaptados para infectar estes locais,

devido ao uso da queratina como fonte de nutriente (OGAWA, et al., 1.998). A propagação das dermatofitoses depende do contato direto ou indireto do fungo com o hospedeiro. O sucesso da infecção depende da capacidade do microrganismo superar os mecanismos de resistência do hospedeiro. Barreiras cutâneas, como integridade da epiderme, efeitos da luz ultra-violeta, competição com a microbiota, presença de ácidos graxos, temperatura, umidade e pH tem importante papel contra a aderência e germinação do artroconídio no extrato córneo (OGAWA, et al., 1.998).

Depois de estabelecido, o microrganismo deve ser capaz de obter nutrientes para o seu desenvolvimento. Proteinases extracelulares e lipases têm papel vital na obtenção de nutrientes além de auxiliar na penetração do fungo no tecido do hospedeiro. A virulência dos dermatófitos está associada com a capacidade deste grupo em degradar proteínas, particularmente queratina (APODACA & McKERROW, 1.989). Queratina é uma proteína secundária, com forma tridimensional de α -hélice (α -queratina) ou de folhas β -pregueadas (β -queratina) que é constituída de aproximadamente 15 aminoácidos, principalmente de um aminoácido sulfurado, a cisteína. É uma proteína fibrosa, sua estrutura tridimensional lhe confere características especiais: microfilamentos com resistência, elasticidade e impermeabilidade à água (FUCHS, 1.995). Estas proteínas são amplamente difundidas na natureza, sendo encontrada no núcleo e citoplasma de quase todas as células de eucariotos superiores. Elas se dividem em proteínas intermediárias do filamento (IFPs) que são encontradas no núcleo e citoplasma da maiorias das células eucarióticas diferenciadas, como, células epiteliais, neurônios, células da glia, unha e cabelo, e em proteínas associadas ao filamento intermediário (IFAPs) (PLOWMAN, 2.006). O seqüenciamento do

genoma humano revelou 54 genes que codificam para queratinas, e 18 destes são expressos por células da pele (PORTER, 2.006).

Entre os potenciais fatores de virulência dos dermatófitos, as proteases secretadas, especialmente as queratinolíticas, têm importante função por permitir a degradação da queratina em componentes que são facilmente assimilados (MONOD et al., 2.002).

Duas proteinases queratinolíticas, uma de massa molecular elevada (93 e 71 kDa), e outra menor (27 kDa), foram descritas em *T. rubrum*. As proteinases obtidas têm maior atividade em pH 8,0, exceto a de 27 kDa, cuja atividade é maior em pH 4,5 (APODACA & MCKERROW, 1.989). O isolamento de uma proteinase queratinolítica de 41 kDa ativa em pH ácido (4,5) foi também obtido em *T. mentagrophytes* (TSUBOI et al., 1.989).

A respeito do presumido papel da queratinase na patogênese, poucos estudos têm avaliado sua expressão *in vivo*. Proteases queratinolíticas têm sido caracterizadas molecularmente e estes dados podem ser importantes no conhecimento da patogênese das infecções dermatofíticas (DESCAMPS et al., 2.002).

Genes que codificam para serino protease da família das subtilisinas foram recentemente caracterizados em *M. canis* (DESCAMPS et al., 2.002). Jousson et al., (2.004) induziram a produção de substância com atividade proteolítica em *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *M. canis*, utilizando meio de cultura contendo proteína de soja como fonte de nitrogênio. A inibição de parte da atividade proteolítica por o-fenantrolina, confirmou que metaloproteases (MEP) foram secretadas pelas três espécies. A habilidade destes microrganismos em degradar proteínas de tecidos queratinizados requer a combinação de diferentes proteases

específicas. A expressão *in vivo* da serino protease de 31,5 kDa em *M. canis* (MINGNON et al., 1.998) e da metaloprotease de 43,5 kDa (BROUTA et al., 2.001) foi demonstrada em gatos naturalmente infectados e em cobaias experimentalmente infectadas. Quatro exoproteases, sendo duas aminopeptidases (ruLap1 e ruLap2) e duas dipeptidil-peptidases (ruDppIV e ruDppV) foram identificadas em *T. rubrum*, através de rastreamento de biblioteca genômica, utilizando como sonda, seqüências de *Aspergillus* spp. e *Saccharomyces cerevisiae*. O sinergismo entre as endoproteases (fungalisina e subtilisina), e as exoproteases é provavelmente essencial para a virulência dos dermatófitos (MONOD et al., 2.005).

O sucesso de colonização dos tecidos do hospedeiro pelo fungo é, portanto, um evento complexo, geralmente envolvendo um ligante codificado pelo patógeno (adesinas) e um receptor da célula (OFEK et al., 1.996). A capacidade de aderir às células é atribuída à presença de glicoproteínas contendo manana na parede das células fúngicas (KITAJMA, 2.000). O primeiro estágio da infecção está relacionado ao processo de adesão, que envolve a ligação entre o artroconídio e os queratinócitos. Esquenazi et al., (2.004) através da interação de *T. rubrum* com células epiteliais de ovário de hamster chinês (CHO) mutantes de glicosilação (Lec1 e Lec2 que expressam manose e galactose, respectivamente), demonstraram que os microconídios possuem na sua superfície adesinas que se ligam a estes receptores na célula hospedeira, tendo importante papel na adesão e invasão do fungo durante o processo de infecção.

A produção de Hsp (Proteína de Choque Térmico) protege as células de danos causados pelo estresse que pode ocorrer durante o processo de infecção (BURNIE et al., 2.006). Hsp 70 são descritas como uma família de mais de 10

proteínas altamente conservadas, de massa molecular de aproximadamente 70 kDa. Uma hsp70 foi clonada a partir de uma biblioteca de cDNA derivada de *T. rubrum*. Após análise por *Northern blot*, foi demonstrado que este gene foi expresso constitutivamente por células cultivadas à 27°C e altamente expresso após cultivo à 37°C (REZAIE et al., 2.000).

1.6. Expressão Diferencial de Genes

A disponibilidade do transcriptoma do patógeno e do hospedeiro é um fato promissor no estabelecimento de novos conhecimentos da relação patógeno-hospedeiro. Através da regulação da atividade gênica, cada organismo pode suprir a quantidade necessária de um determinado produto em um momento específico. Acredita-se então, que a maioria dos fenômenos biológicos encontrados em um organismo possa ser explicada pela quantidade do produto gênico. Embora a função gênica seja governada pelo seu produto final, a proteína, várias observações relatam que a quantidade de proteína produzida depende diretamente da quantidade de RNA mensageiro (RNAm) que a codifica. Isso significa que a compreensão das funções celulares sob determinadas condições pode ser obtida através da quantificação dos RNAs mensageiros presentes naquele momento (YAMAMOTO et al., 2.001).

Uma característica vital dos microrganismos é a sua capacidade de adaptação às alterações do ambiente em que se encontra o que envolve a regulação da expressão gênica em resposta aos diferentes sinais ambientais (KATO-MAEDA et al., 2.001).

Nos últimos anos, algumas técnicas têm sido desenvolvidas com o propósito de avaliar a expressão diferencial de genes em um organismo ou célula e

identificá-los (LIANG et al., 1.994; WADA et al., 1.997). Estas técnicas são ferramentas poderosas, que permitem detectar mudanças na expressão dos RNAs mensageiros sem qualquer conhecimento prévio dos genes em questão (PASTORIAN et al., 2.000). Os métodos mais comumente usados para detectar genes diferencialmente expressos, são: RDA (Análise de Diferença Representacional) (LISITSYN et al., 1.993; HUBANK & SCHATZ, 1.994), DD (Diferencial *Display*) (LIANG & PARDEE, 1.992) e SH (Hibridização Subtrativa) (DIATCHENKO et al., 1.996). Basicamente, todos estes métodos foram desenvolvidos para amplificar e isolar seqüências de ácido nucléico, presentes em uma amostra e ausentes (ou expresso em menor extensão) em outra.

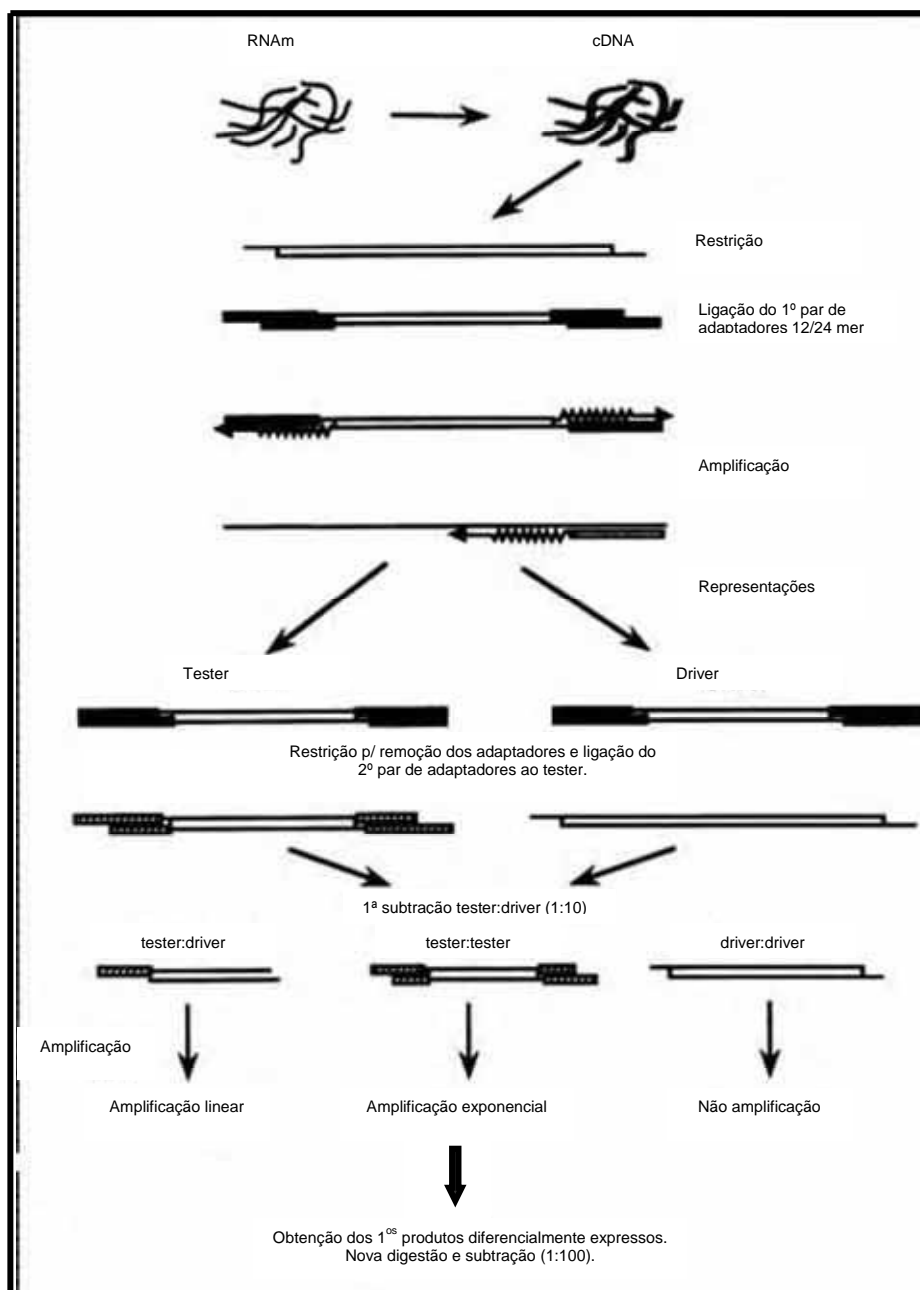
O RDA em sua forma original foi designado para identificar diferenças entre populações de DNA genômico (LISITSYN et al., 1.993). Esta metodologia foi subseqüentemente modificada para permitir a análise de populações de RNAm, sendo uma técnica poderosa e sensível para identificação de genes expressos diferencialmente (HUBANK & SCHATZ, 1.994), e permite o isolamento de seqüências mais e menos expressas em duas populações diferentes de cDNA (DNA complementar). Esta técnica permite a detecção de mudanças na expressão de RNAm por enriquecimento seletivo sem qualquer conhecimento prévio do gene em questão. Esta seria uma vantagem frente aos métodos clássicos, cujo fator limitante para análise dos padrões de expressão é a aplicabilidade somente para genes conhecidos (PASTORIAN et al., 2.000).

A metodologia de RDA, desenvolvida por Lisitsyn et al., (1.993) baseou-se em hibridização subtrativa e enriquecimento cinético, purificando fragmentos de DNA presentes em uma população e ausentes em outra.

A hibridização subtrativa clássica envolve a subtração de DNA de uma das

amostras (*tester*) com grande excesso de outra amostra de DNA (*driver*), de forma que os fragmentos de DNA *tester* formem híbridos predominantemente com os fragmentos do DNA *driver*. A hibridização, geralmente é seguida pela separação das seqüências comuns em *tester* e *driver* da seqüência alvo, usando métodos tais como cromatografia de afinidade. Isto resulta na purificação dos fragmentos de DNA alvo que estão presentes somente na amostra de DNA *tester* (NEDIVI et al., 1.993). Contudo, quanto maiores e mais complexos os genomas ou quanto menor a diferença entre eles, mais difícil seria esta separação. Por isso a hibridização subtrativa foi considerada ineficiente para a comparação de DNA genômico de eucariotos superiores (LISITSYN, 1.995).

No RDA, a complexidade dos genomas foi reduzida através da preparação de porções representativas, denominadas de representações. Estas nos permitem alcançar um maior rendimento durante a etapa de hibridização subtrativa e conseqüentemente, um enriquecimento cinético mais efetivo. Portanto, torna-se importante a escolha da enzima de restrição adequada para gerar fragmentos de DNA de tamanho adequado (LISITSYN, 1.995). O enriquecimento cinético promove uma grande purificação da seqüência alvo. A análise de diferença representacional aplica este princípio através da amplificação por PCR para purificar e amplificar os híbridos formados pelo *tester*. Para que isto ocorra, uma combinação de adaptadores é usada, um com 24 bases não fosforilado é ligado na extremidade 5' do DNA *tester* e outro com 12 que é complementar a este. Em seguida, o adaptador de 24 bases é usado como iniciador permitindo desta maneira que as seqüências de DNA alvo sejam amplificadas seletivamente (Figura 2) (LISITSYN, 1.995).



(HUBANK & SCHATZ, 1.994)

Figura 2: Esquema representativo da metodologia de RDA.

Esta técnica tem-se mostrado útil no estudo de microrganismos de importância humana e veterinária, como na identificação de seqüências específicas do DNA da fêmea de *Schistosoma mansoni* (DREW & BRINDLEY, 1.995), de *Brachyspira hyodysenteriae*, agente etiológico da disenteria suína (ROTHKAMP et al., 2.002), bem como de fatores de virulência de *Escherichia coli*

sorotipo O157, importante patógeno associado à diarreia humana grave (ALLEN et al., 2001). Recentemente, Dutra et al., (2004) com a finalidade de encontrar genes diferencialmente expressos pelo fungo *Metarhizium anisopliae* durante o processo de infecção do carrapato *Boophilus microplus*, utilizaram a metodologia de RDA, comparando o cDNA gerado em meio com cutícula do carrapato e cDNA gerado em meio rico em glicose. Entre 135 clones seqüenciados foram identificadas 34 seqüências e 14 ESTs (*Expressed Sequence Tags*) com ortólogos conhecidos, após comparação com bancos de dados.

Embora freqüentemente aplicada em eucariotos superiores, esta metodologia têm sido pouco aplicada em fungos de interesse médico. Recentemente, Bailão et al., (2006) aplicaram-na para avaliar genes diferencialmente expressos pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, através da infecção em animais e contato com sangue humano. Diferentes transcritos foram identificados em ambas as situações, entre eles, genes relacionados à defesa celular, aquisição de ferro, síntese e remodelagem da parede celular, os quais podem ter importantes implicações no processo de infecção deste patógeno.

Para uma melhor avaliação taxonômica, e epidemiológica, bem como para caracterizar a própria doença, o emprego de métodos de tipagem molecular é importante, para traçar possíveis correlações com achados clínicos, laboratoriais e terapêuticos, uma vez que em nosso país há poucos relatos destes trabalhos. Em dermatófitos e particularmente em *T. rubrum*, poucos estudos têm avaliado a interação fungo-hospedeiro, bem como seus fatores de virulência. O conhecimento dos fatores de virulência deste patógeno pode possibilitar a pesquisa de novos alvos para a ação de fármacos, podendo viabilizar tratamentos mais adequados.

2. OBJETIVOS

Neste trabalho, pretendeu-se identificar transcritos envolvidos na interação deste patógeno com fonte humana de queratina, através do RDA, além de comparar por duas metodologias de tipagem molecular, isolados clínicos com e sem relação epidemiológica.

2.1. Objetivos específicos:

- Determinar a variabilidade genética dos isolados clínicos de *T. rubrum* por amplificação de elementos repetitivos (TRS-1 e TRS-2) da região do DNAr do espaço não transcrito para comparação com a metodologia de RAPD empregando duas seqüências randômicas.
- Identificar possíveis genes envolvidos na interação de *T. rubrum*, através da metodologia de RDA utilizando meio de cultura contendo queratina obtida de epiderme humana, simulando a infecção com hospedeiro.

Sent: Fri, 10 Nov 2006 17:15:21 -0000
Subject: Editor handles MICINF-D-06-00283

Ms. Ref. No.: MICINF-D-06-00283
Title: cDNA REPRESENTATIONAL DIFFERENCE ANALYSIS USED IN THE
IDENTIFICATION OF GENES EXPRESSED BY *Trichophyton rubrum* DURING THE
KERATIN CONTACT
Microbes and Infection

Dear Maria José Mendes Giannini,

Your submission "cDNA REPRESENTATIONAL DIFFERENCE ANALYSIS USED IN
THE IDENTIFICATION OF GENES EXPRESSED BY *Trichophyton rubrum* DURING
THE KERATIN CONTACT" will be handled by Editorial Coordinator Géraldine Camus.

You may check the progress of your paper by logging into the Elsevier
Editorial System as an author at <http://ees.elsevier.com/micinf/>.

Your username is: Mendes-Giannini

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Microbes and Infection

For any technical queries about using EES, please contact Elsevier Author
Support at authorsupport@elsevier.com
Global telephone support is available 24/7:
For The Americas: +1 888 834 7287 (toll-free for US & Canadian customers)
For Asia & Pacific: +81 3 5561 5032
For Europe & rest of the world: +353 61 709190
----- End of Forwarded Message -----

**cDNA REPRESENTATIONAL DIFFERENCE ANALYSIS USED IN THE
IDENTIFICATION OF GENES EXPRESSED BY *Trichophyton rubrum* DURING
THE KERATIN CONTACT**

Author: Lilian Cristiane Baeza ^a

Alexandre Melo Bailão ^b

Clayton Luiz Borges ^b

Maristela Pereira ^b

Célia Maria de Almeida Soares ^b

Maria José Soares Mendes Giannini ^a

^a Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
UNESP, Araraquara, SP, Brazil, CEP 14801-902.

^b Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade
Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil, CEP 74001-970.

Corresponding author: Maria José Soares Mendes Giannini

Tel.: +55 (16) 3301-6556

Fax: +55 (16) 3301-6547

Address : R. Expedicionários do Brasil, 1621

Araraquara - São Paulo - Brazil

CEP - 14801-902

E-mail: giannini@fcar.unesp.br

ABSTRACT

Dermatophytes are adapted to infect keratinized tissues by their ability to utilize keratin as a nutrient source. *Trichophyton rubrum* is an anthropophilic fungus, causing up to 90% of chronic cases of dermatophytosis. The understanding of the complex interactions between the fungus and their host should include the identification of genes expressed during infection. To identify genes involved in the infection process, the representational difference analysis (RDA) was performed using two cDNA populations of *T. rubrum*, one obtained from fungus cultured in the presence of keratin and other generated during fungal growth in minimal medium. Our analysis identified transcripts differentially expressed. Genes related to signal transduction, membrane protein, oxidative stress response, and some putative virulence factors were up-regulated during the contact of the fungus with keratin. A better understanding of this interaction will contribute significantly to our knowledge the infectious process of dermatophytosis.

Keywords: *Trichophyton rubrum*, Representational difference analysis, Infection.

1. INTRODUCTION

Dermatophytoses are among the few fungal diseases that are directly communicable from person to person. Dermatophytes infect mainly healthy individuals, causing infections of keratinized structures, including the skin, hair, and nails [1]. Dermatophytes are not part of the normal human skin microbiot. They are, however, particularly well adapted to infecting this location because, unlike most other microbial pathogens, they can use keratin as a source of nutrients [2]. *Trichophyton rubrum* is the most frequently isolated agent of

dermatophytosis worldwide, accounting for approximately 80% of reported cases of onychomycosis [3]. Since 90% of the chronic dermatophyte infections are caused mainly by *T. rubrum*, and then this pathogen must have evolved mechanisms that evade or suppress cell-mediated immunity [4].

Despite its importance, little is known about the molecular basis of dermatophyte pathogenesis. Studies regarding the structure, expression, and regulation of the genes of *T. rubrum* have been relatively limited because of its nonaggressive and non-life-threatening nature. In host-pathogen interactions, the gene expression of the pathogen is modulated by signals from the host, and understanding the expression patterns may provide insight into the mechanisms of disease [5]. Few potential *T. rubrum* virulence factors have been examined in detail, and most of them are keratinolytic proteases.

The understanding of the complex interactions between the fungus and their host must include the identification of genes expressed during infection. We have utilized an efficient approach for the identification of differentially expressed genes in *T. rubrum*, with involve rapid sets of subtraction by hybridization of cDNA prepared from two cell populations. Representational difference analysis (RDA) is a powerful and sensitive tool for the identification of differentially expressed genes and enables the isolation of both up and down-regulated genes expressed in two different cDNA populations [6]. Recently, this strategy was applied to investigate the differentially expressed genes from human pathogenic fungi *Paracoccidioides brasiliensis* during the host-fungus interaction, revealing a set of candidate genes that *P. brasiliensis* may express to adapt to the host conditions [7].

The aim of the present work was to identify genes differentially expressed in *T. rubrum* cultured in the presence and absence of keratin simulating the host

infection. Our studies provide the first view of *T. rubrum* transcriptional response to host-pathogen interaction.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Strain and culture conditions: *T. rubrum* isolate ATCC 52021 (American Typing Collection Culture) was cultured for 10 days at 25-28 °C in liquid Sabouraud's and transferred for two different cultures media: (i) culture referred to as tester in Cove's medium supplemented with keratin (Sigma) 100 µg/ml, (ii) culture named driver in Cove's medium, both cultivated for 24 hours at room temperature. As a control, a reverse experiment was conducted in which the driver condition was RNA from keratin culture and the tester condition was RNA from minimal medium.

2.2. RNA isolation and cDNA synthesis: Total RNA was extracted from all experimental conditions by using the Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). First-strand cDNA synthesis was performed with reverse transcriptase (RT Superscript III, Invitrogen, Life Technologies) using 1 µg of total RNA. First-strand cDNA was used as template to synthesize the second-strand of cDNA by using the SMART PCR cDNA synthesis kit (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA).

2.3. Subtractive hybridization and generation of subtracted libraries: The cDNA fragments were digested with *Sau3AI* restriction enzyme (Promega, Madison, USA). A subtracted cDNA library was constructed using driver cDNA from fungus cultured in minimal medium and tester cDNA synthesized from RNA extracted from *T. rubrum* cultured in presence of keratin. The resulting products were purified using a GFX kit (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK). The tester-

digested cDNA was ligated to adapters (a 24-mer annealed to a 12-mer). For the generation of the differential products, tester and driver cDNAs were mixed, hybridized at 67 °C for 18 h and amplified by PCR with the 24-mer oligonucleotide primer. Two successive rounds of subtraction and PCR amplification using hybridization tester-driver ratios 1:10 and 1:100 were performed. Adapters were changed between cross-hybridization, and different products were purified using the GFX kit [8, 9].

After the second subtractive reaction, the finally amplified cDNA pools were cloned directly into the pGEM-T-Easy vector (Promega, Madison, USA). *Escherichia coli* XL1 Blue competent cells were transformed with the ligation products. Selected colonies were picked and grown into deep-well plates. Plasmid DNA was prepared from clones using standard protocols. In order to generate the ESTs, single-pass, 5'-end sequencing of cDNAs by standard fluorescence labeling dye-terminator protocols with T7 flanking vector primer was performed. Samples were loaded onto a MegaBACE 1000 DNA sequencer (GE Healthcare) for automated sequence analysis.

2.4. EST processing pipeline and differential expression analysis: EST sequences were pre-processed using the Phred and Crossmatch (<http://www.genome.washington.edu/UWGC/analysstools/Swat.cfm>) programs. Sequences with at least 100 nucleotides and Phred quality greater or equal to 20 were considered for further analysis. ESTs were screened for vector sequences against the UniVec data, and assembling using the CAP3 program [10]. The filtered sequences were compared against the GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) non-redundant (nr) database from National Center for Biotechnology Information (NCBI) using the BLASTX program [11], cluster of

Orthologus Groups (COG) and Gene Ontology (GO). MIPS (<http://mips.gsf.de/>) and InterPro's databases of protein families, domains and functional sites were used to assign functional categories.

2.5. Dot-blot and Northern-blot analysis: Serial dilutions of plasmid DNA were vacuum spotted in nylon membrane and hybridized to the specific cDNAs labeled by using the Random Prime labeling module (GE Healthcare). Hybridization was detected by Gene Image CDP-Star detection module (GE Healthcare). In the Northern experiments, the RNAs (20 μ g) were fractionated by electrophoresis in 1.2% agarose-formaldehyde gels and transferred to nylon membrane. RNAs were hybridized to the correspondent cDNA probe (Gene Image CDP-Star detection module, GE Healthcare). Probes were labeled by using Random Prime labeling module (GE Healthcare).

3. RESULTS

3.1. Identification of *T. rubrum* genes with differential expression: The RDA approach was performed between the fungus grown in absence of keratin (driver) and the microorganism cultured in presence of keratin (tester). Incubating the tester and driver was performed subtraction hybridization. Different patterns of DNA amplification were observed after two rounds of the subtractive hybridization, as shown in Fig. 1.

A total of 344 clones were successfully sequenced. Using the BLASTX program, 6.98% of the ESTs corresponded to proteins of unknown function, with no matches in databases. In addition, 94.7% of the ESTs had not been described until the moment in *T. rubrum* and 5.3% were described in *T. rubrum*.

3.2. Characterization of the subtracted cDNAs from *T. rubrum* cultured in presence of keratin: The nature of adaptations made by *T. rubrum* in this condition can be inferred by classifying the ESTs into seven groups of functionally related genes. The data illustrated the functional diversity of these highly expressed ESTs, denoting particular functional categories dominating the analysis. The most redundant cDNAs appearing during the contact with keratin were as follows: G protein subunit alpha (*gpa*), ATP-dependent RNA helicase DED1 (*ded1*), homeobox transcription factor (*hxf*), catalase isozyme P (*catP*), zinc finger protein (*zfp*), and membrane protein (*memb*), as shown in Table 1. As control, a reverse experiment cDNA-RDA was conducted in which the driver condition was RNA from keratin culture and the tester condition was RNA from minimal medium, and a total of 33 clones were successfully sequenced. The transcriptional profile did not manifest similarity to that described for *T. rubrum* cultured in presence of keratin (data not shown).

The Fig. 2 depicts the classification of 19 clusters of *T. rubrum* ESTs according to the classification developed at MIPS. As observed, most of the ESTs corresponded to up-regulated cDNAs related to signal transduction, transcription, metabolism and cell defense mechanisms.

3.3. Confirmatory differential expression of *T. rubrum* identified sequences: To corroborate the RDA findings, we initially performed dot blot analysis of *T. rubrum* cDNA-RDA clones. Dot blots displayed a differential hybridization pattern when individual clones were hybridized to labeled cDNAs obtained from the microorganism cultured in the presence and absence of keratin. The level of transcripts corresponding to cDNA clones was altered in the presence of keratin, as shown in Fig. 3A.

Northern blot analysis was employed to evaluate the expression of some upregulated genes. The transcripts of the genes encoding GPA, CATP, ZFP and MEMB were more accumulated in the fungus cultured in presence of keratin (Fig. 3B).

4. DISCUSSION

The initial steps in the pathogenesis of cutaneous infections involve the capacity of the infecting microorganism to overcome physical and innate resistance factors allowing initial adherence, followed by competition with the normal microbial flora and subsequent colonization of the cell surfaces [2]. This study is the first to use RDA analysis to characterize changes in gene expression after contact of *T. rubrum* with keratin, mimicking the infection in the host. The ability of RDA to analyzed sets of differentially expressed genes allows the identification of differential gene expression comparing different culture conditions. Our data can generate a great impact in the establishment of the role of those highly expressed genes in response to host conditions. Many of the genes found here have already been described in orthologous systems and some of them present functional roles during infection process.

In our study, 52.6% of the ESTs identified encoding for transcription and signal transduction; yet, we also identify some factors of virulence that could be related to the growth condition in which the fungus was cultured. On the other hand, Wang et al., [12] constructed 10 different *T. rubrum* cDNA libraries and obtained 11,085 unique ESTs. The ESTs identified encoding putative proteins implicated in primary metabolism, gene expression, post-translation processes and cell structure. A significant proportion of the identified ESTs were matched to

genes involved in transcription and signal transduction, suggesting that *T. rubrum* has an elaborate regulation system.

G protein subunit alpha (gpa)

Heterotrimeric G proteins play crucial roles in the regulation of fungal developmental process, as well as in pathogenicity [13].

This transcript presented most redundancy (112 ESTs) in our experiment, and it was up-regulated during the contact with keratin. Segers & Nuss [14] demonstrated that *CPG-1* of *Cryphonectria parasitica* (one of the three genes encoding G alpha subunits) was essential for regulated growth, pigmentation, sporulation and virulence, indicating that tight regulation of *CPG-1* mediated signaling is required to control these processes. Previous studies have shown that the G alpha subunit GPA-1 in *Cryptococcus neoformans* regulates a variety of cellular functions, including specialized processes such as the production of the antioxidant melanin pigment and the antiphagocytic capsule, two well-established virulence factors in this pathogen [15].

The over expression of *gpa* produced for *T. rubrum* in host-like conditions described here, strongly suggests that GPA plays an important role in the modulation of virulence of this fungus.

Zinc-finger protein (zfp)

Most zinc-containing proteins are transcription factors capable of binding DNA named zinc-finger proteins. They form one of the largest families of transcriptional regulators and are categorized into various classes according to zinc-binding motifs, they function in a wide range of processes, including primary and secondary metabolism and meiosis, regulation of genes involved in the stress

response as well as pleiotropic drug resistance, as demonstrated in human fungal pathogens [16].

In some fungi the ambient pH regulation is performed by the zinc-finger transcription factor, yielding a functional protein responsible for the induction of genes expressing products with optimal activity at alkaline pH and for the repression of those genes with optimal activity at acid pH. In filamentous fungi, it has been demonstrated that *PacC* regulates not only genes coding for secreted enzymes and proteins involved in the synthesis of exported metabolites, but also genes for proteins such as transporters involved in ion homeostasis, salt tolerance and iron uptake [17].

Most of the proteases secreted by dermatophytes are characterized as serine proteases, with optimal activity at around pH 8 to 9. Serine proteinases are required for successful invasion of host cells by pathogens; they have an important role in cleavage of host proteins (e.g. keratin) during the colonization of tissue of the host. Dermatophytes grow logarithmically in the stages of infection, derepressing nonspecific proteolytic enzymes with optimum activity at acid pH whenever a carbon, nitrogen or sulfur source is lacking in the environment, probably because human skin has a weakly acidic pH [18]. The uptake and metabolism of some amino acids, such as glycine, will signal the alkalinization of the milieu, which may lead to the repression of proteases and keratinases with optimal activity at acid pH, and derepression of keratinases with optimal activity at alkaline pH [19]. However, the utilization of some amino acids generating cytoplasmic acetyl CoA by the fungi promotes alkalinization of the growth medium raising the pH up to values as high as 9.0 [20], an ambient in which most of the known keratinolytic proteases have optimal enzymatic activity [21]. A de-

repression of proteolytic enzymes with activity at alkaline pH will allow the occurrence of the disease.

In particular a zinc-finger protein was up-regulated in the analyzed conditions, presumably reflecting its role in the fungal infection. Thus, it is of importance to know the metabolic responses that govern homeostatic pH and extracellular pH sensing, since these mechanisms are possibly involved in the installation, development, and survival of dermatophytes in humans.

Catalase isozyme P (catP)

Polymorphonuclear cells (PMNs) and epidermal cell proliferation and keratinization are likely to play a critical role in the initial host defence by restricting the organisms to the superficial tissue layers and promoting the rapid clearance of the fungus from the site of infection [2].

Reactive oxygen species (ROS) and hydrogen peroxide in particular, have been implicated as playing a central role in the pathogenicity of microbial infections. Moreover, in vitro studies of neutrophil function have showed that hydrogen peroxide effectively kills fungal hyphae of *A. fumigatus* and *Rhizopus oryzae* and that neutrophil-mediated damage of fungal cells is blocked by addition of a commercial catalase [22]. Accordingly, catalase, which is good scavenger of H₂O₂, was considered to be a putative virulence factor of *A. fumigatus* that could counteract the oxidative defence reactions of the host phagocytes [23].

Catalases, which are important in fungal pathogenicity and development, are widespread in aerobic organisms. For example, catalase takes part in *C. albicans* survival from neutrophil attack and within the host. Disruption of the *C. albicans* catalase gene results in higher sensitivity to damage by neutrophils and

to exogenous hydrogen peroxide. The *C. albicans cat1* gene, which encodes a protein with catalase activity, is involved in oxidant susceptibility, its deletion generates cells that are less virulent in the mouse model of acute systemic infection [24].

Moreira et al., [25] have isolated a complete cDNA encoding a peroxisomal catalase of *P. brasiliensis* (PbcatP). PbcatP expression was induced in cells treated with H₂O₂, and the authors speculated that the enzymatic activity was protective against endogenously produced oxygen radicals and exogenous H₂O₂. The authors observed that the protein and its transcript were regulated during *P. brasiliensis* development, increasing during the mycelium-to-yeast transition.

Catalases have an important role in the pathogenicity of *Histoplasma capsulatum*, they are synthesized by yeast cells during exposure to the respiratory burst of neutrophils and macrophages [26]. Paris et al., [27] examined the role of all of the conidial and mycelial catalases of *A. fumigatus*, in the pathogenicity of the fungus and observed the expression of three active catalases, one in conidia and two in mycelium. The conidial catalase does not protect conidia against the oxidative burst of macrophages, but it protects against H₂O₂ *in vitro*.

Neutrophils and monocytes/macrophages appear to be important in the defence against superficial fungal infections. Neutrophils can directly attack and kill pathogens by a variety of mechanisms, these include the production of microbicidal oxidants such superoxide anion, hydrogen peroxide, hypochlorous acid and monochloramine, as well as non-oxidative granule components like cathepsins, defensins, bactericidal/permeability-increasing protein, lactoferrin, lysozyme, elastase and azuricidin. Neutrophils and proliferating epithelial cells also produce the antimicrobial protein, calprotectin, which can inhibit fungal growth by

competing with the microorganisms for zinc [28]. Macrophages have an additional antimicrobial mechanism whereby they can produce the free radical substance, nitric oxide, to inhibit fungal growth [29]. Accumulation of an inflammatory infiltrate below the location of the infecting organisms may prevent them from invading more deeply, thereby helping to confine the organisms to more protected superficial locations. The majority of chronic dermatophyte infections are caused by *T. rubrum*, then, this pathogen must have evolved mechanisms that evade or suppress cell-mediated immunity [4]. The over expression of *catP* produced for *T. rubrum* in the analyzed conditions strongly suggests its role in the fungal infection.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), CNPq, and PADC-FCF-UNESP, who provided the financial support for this project.

REFERENCES

- 1- I. Weitzman, R.C. Summerbell, The Dermatophytes, Clin. Microbiol. Rev. 8 (1995) 240-259.
- 2- H. Ogawa, R.C. Summerbell, K.V. Clemons, T. Koga, Y.P. Ran, A. Rashid, P.G. Sohnle, D.A. Stevens, R. Tsuboi, Dermatophytes and host defence in cutaneous mycoses, Med. Mycol. 36 (1998) 166-173.
- 3- E.G. Evans, Causative pathogens in onychomycosis and the possibility of treatment resistance, J. Am. Acad. Dermatol. 38 (1998) S32-S56.

- 4- J.S. Blake, M.V. Dahl, M.J. Herron, R.D. Nelson, An immunoinhibitory cell wall glycoprotein (mannan) from *Trichophyton rubrum*, *J. Invest. Dermatol.* 96 (1991) 657-661.
- 5- G. Kaufman, I. Berdicevsky, J.A. Woodfolk, B.A. Horwitz, Markers for host-induced gene expression in *Trichophyton* dermatophytosis, *Infect. Immun.* 73 (2005) 6584-6590.
- 6- M. Hubank, D.G. Schatz, Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic. Acids Res.* 22 (1994) 5640-5648.
- 7- A.M. Bailão, A. Schrank, C.L. Borges, V. Dutra, E.E.W.I. Molinari-Madlum, M.S.S. Felipe, M.J.S. Mendes-Giannini, W.S. Martins, M. Pereira, C.M.A. Soares, Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: Representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis, *Microbes Infect.* (2006) (*in press*).
- 8- V. Dutra, L. Nakazato, L. Broetto, I.S. Schrank, M.H. Vainstein, A. Schrank, Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle, *Res. Microbiol.* 155 (2004) 245-251.
- 9- K. Pastorian, L. Hawel III, C.V. Byus, Optimization of cDNA representational difference analysis for the identification of differentially expressed mRNAs, *Anal. Biochem.* 283 (2000) 89-98.
- 10- X. Huang, A. Madan, CAP3: A DNA sequence assembly program, *Genome Res.* 9 (1999) 868-877.

- 11- S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman, Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 3389-3402.
- 12- L. Wang, L. Ma, W. Leng, T. Liu, L. Yu, J. Yang, L. Yang, W. Zhang, Q. Zhang, J. Dong, Y. Xue, Y. Zhu, X. Xu, Z. Wan, G. Ding, F. Yu, K. Tu, Y. Li, R. Li, Y. Shen, Q. Jin, Analysis of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* expressed sequence tags, *BMC Genomics.* 7 (2006) 255-267.
- 13- M. Bolker, Sex and crime: heterotrimeric G proteins in fungal mating and pathogenesis, *Fung. Genet. Biol.* 25 (1998) 143-156.
- 14- G.C. Segers, D.L. Nuss, Constitutively activated G alpha negatively regulates virulence, reproduction and hydrophobin gene expression in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*, *Fung. Genet. Biol.* 38 (2003) 198-208.
- 15- J.A. Alspaugh, J.R. Perfect, J. Heitman, *Cryptococcus neoformans* mating and virulence are regulated by the G-protein alpha subunit GPA1 and cAMP, *Genes Dev.* 11 (1997) 3206-3217.
- 16- S. MacPherson, M. Larochelle, B. Turcotte, A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70 (2006) 583-604.
- 17- M.A. Peñalva, H.N. Arst Jr, Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66 (2002) 426-446.
- 18- J.E. Cutler, Putative virulence factors of *Candida albicans*, *An. Rev. Microbiol.* 45 (1991) 187-218.

- 19- G. Apodaca, J.H. McKerrow, Regulation of *Trichophyton rubrum* proteolytic activity, *Infect. Immun.* 57 (1989) 3081-3090.
- 20- G. Thedei, T.H. Doubowetz, A. Rossi, Effect of carbon source and extracellular pH on the acidification of the culture medium and phosphatase excretion in *Neurospora crassa*, *Br. J. Med. Biol. Res.* 27 (1994) 1129-1134.
- 21- F. Brouta, F. Descamps, T. Fett, B. Losson, C. Gerday, B. Mignon, Purification and characterization of a 43.5 kDa keratinolytic metalloprotease from *Microsporum canis*, *Med. Mycol.* 39 (2001) 269-275.
- 22- R.D. Diamond, R.A. Clark, Damage to *Aspergillus fumigatus* and *Rhizopus oryzae* hyphae by oxidative and nonoxidative microbicidal products of human neutrophils *in vitro*, *Infect Immun.* 38 (1982) 487-495.
- 23- A.J. Hamilton, M.D. Holdom, Antioxidant systems in the pathogenic fungi of man and their role in virulence, *Med. Mycol.* 37 (1999) 375-389.
- 24- D.R. Wysong, L. Christin, A.M. Sugar, P.W. Robbins, R.D. Diamond, Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene, *Infect. Immun.* 66 (1998) 1953-1961.
- 25- S.F. Moreira, A.M. Bailão, M.S. Barbosa, R.S.A. Jesuíno, M.S. Felipe, M. Pereira, C.M.A. Soares, Monofunctional catalase P of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification, characterization, molecular cloning and expression analysis, *Yeast.* 21 (2004) 173-182.

- 26- C.H. Johnson, M.G. Klotz, J.L. York, V. Kruft, J.E. McEwen, Redundancy, phylogeny and differential expression of *Histoplasma capsulatum* catalases, *Microbiology*. 148 (2002) 1129-1142.
- 27- S. Paris, D. Wysong, J.P. Debeaupuis, K. Shibuya, B. Philippe, R.D. Diamond, J.P. Latge, Catalases of *Aspergillus fumigatus*, *Infect. Immun.* 71 (2003) 3551-3562.
- 28- P.G. Sohnle, B.L. Hahn, V. Santhanagopalan, Inhibition of *Candida albicans* growth by calprotectin in the absence of direct contact with the organisms, *J. Infect. Dis.* 174 (1996) 1369-1372.
- 29- J.A. Alspaugh, D.L. Granger, Inhibition of *Cryptococcus neoformans* replication by nitrogen oxides supports the role of these molecules as effectors of macrophage-mediated cytostasis, *Infect. Immun.* 59 (1991) 2291-2296.

LEGENDS

Figure 1: RDA products analyzed by gel electrophoresis. Products of the first and second rounds of subtraction performed by using as tester the cDNA obtained from RNA of *T. rubrum* cultured in the presence of keratin (lanes 1 and 3, respectively). Products of the first and second rounds of subtraction performed by using as tester the cDNA obtained from RNA of *T. rubrum* cultured in Cove's medium without keratin (lanes 2 and 4, respectively). M: molecular markers 1 Kb (Invitrogen, CA, USA). Numbers on the right indicate size in bp.

Figure 2: Functional classification of *T. rubrum* ESTs derived from RDA experiment. This classification was based on BLASTX homology of each EST against the GenBank nr-database at a significant homology cut-off of $\leq 1e-05$ and MIPS functional annotation scheme. Each functional class is represented as a color-coded segment and expressed as a percentage of the total number of ESTs in each library.

Figure 3: Validation of the cDNA-RDA results. (A) Dot blot analysis of *T. rubrum*. DNAs of individual clones were prepared and several dilutions were blotted (1-6). Panel a- Individual clones hybridized to the labeled cDNA obtained from *T. rubrum* cultured in the presence of keratin. Panel b- Individual clones hybridized to the labeled cDNA obtained from *T. rubrum* cultured in the absence of keratin. The clones were: G protein subunit alpha (*gpa*), ATP-dependent RNA helicase DED1 (*ded1*), homeobox transcription factor (*hxf*), catalase isozyme P (*catP*), zinc finger protein (*zfp*), membrane protein (*memb*), and actin (*act*) as control. (B) Expression

patterns of genes obtained by cDNA-RDA analyzed by Northern blot of total RNA of *T. rubrum* extracted after culture in the presence (1) and absence of keratin (2). Total RNA was fractionated on a 1.2% formaldehyde agarose gel and hybridized to the cDNA inserts of *gpa*, *catP*, *zfp*, *memb* and actin (*act*) as the loading control.

Figure 1

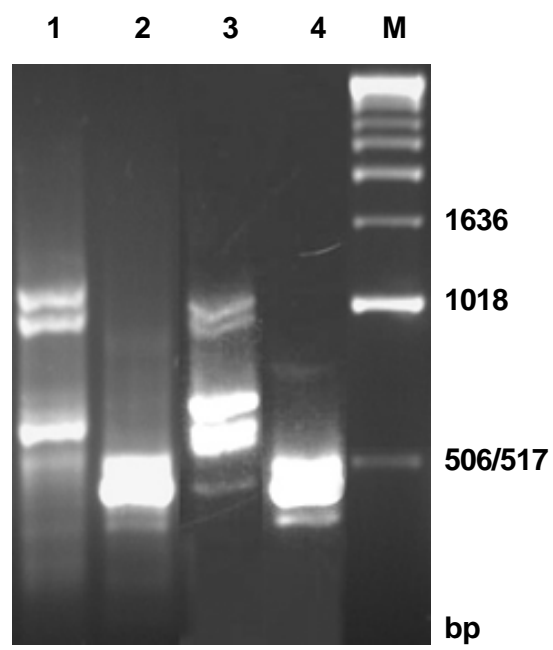


Figure 2

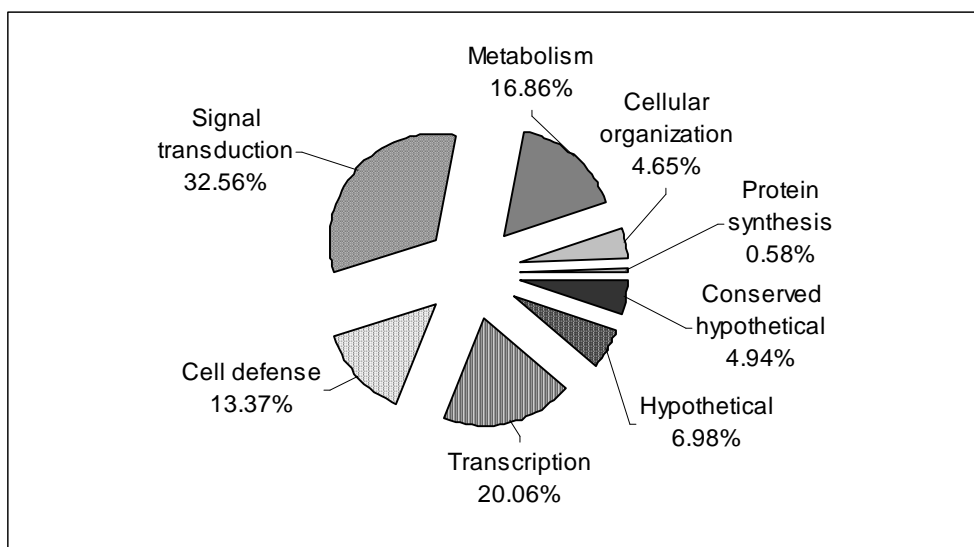


Figure 3

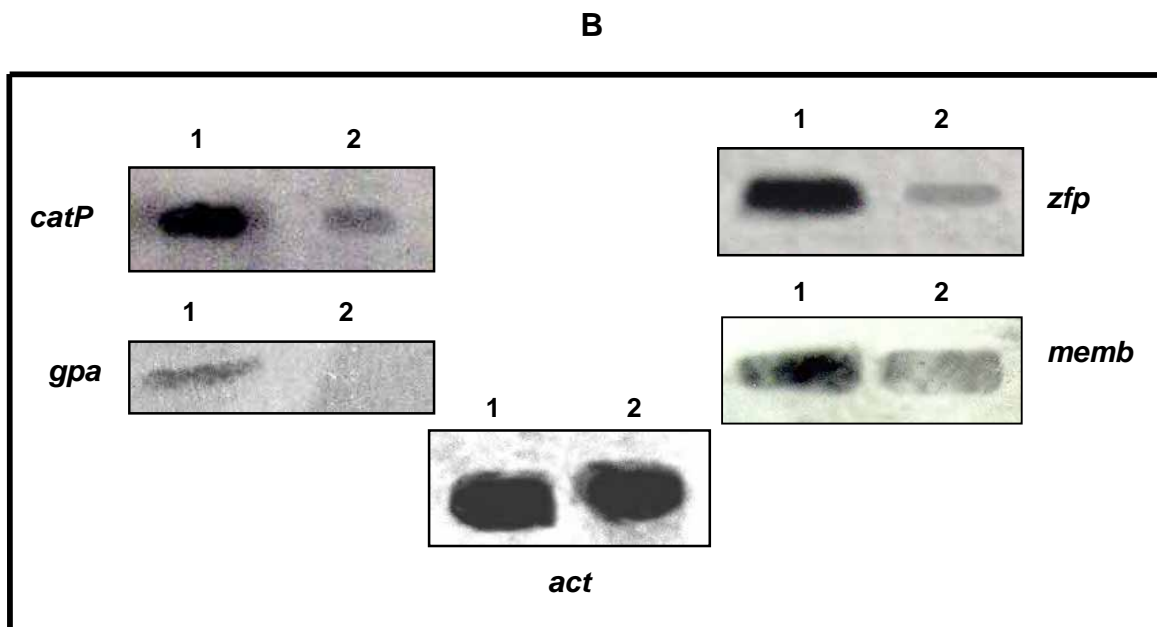
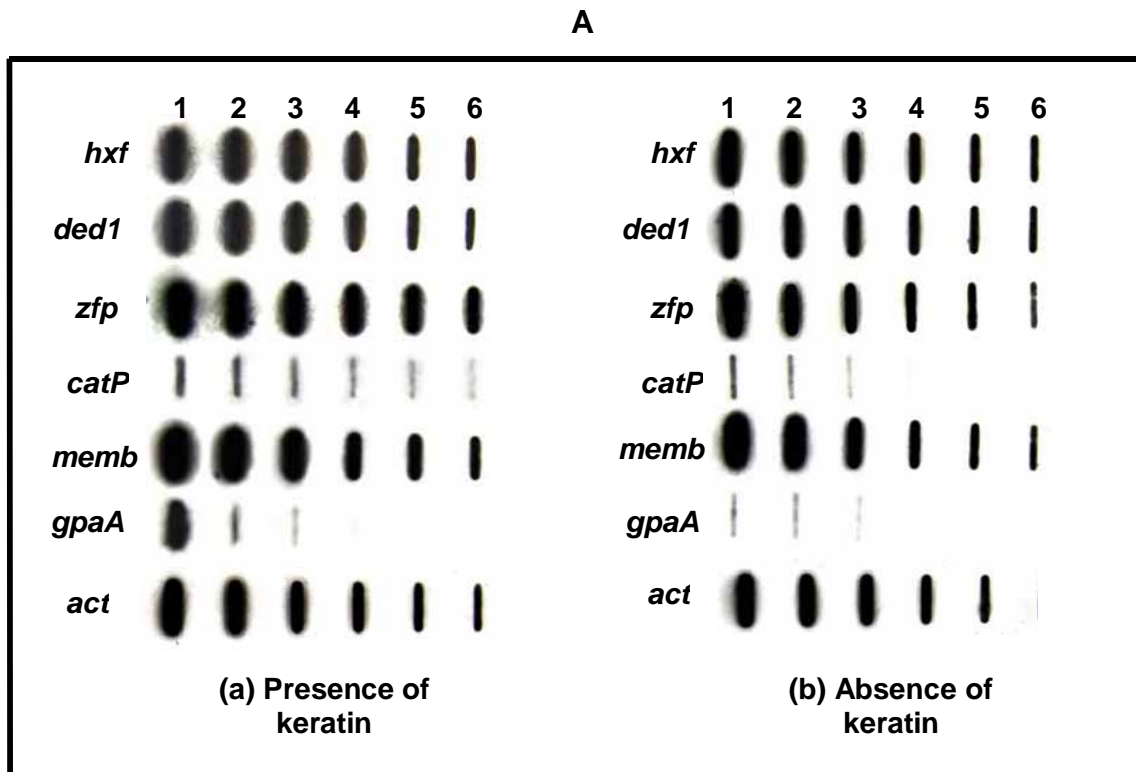


Table 1. ESTs with high abundance in *T. rubrum* cultured in the presence of keratin.

MIPS Category	Gene product	Best hit/accession number ^a	e-value	Redundancy
Transcription	Zinc finger protein ^c	<i>Aspergillus fumigatus</i> /CAD29608	3e-10	19
	Transcription factor bZIP ^b	<i>Aspergillus fumigatus</i> /XP747348	3e-47	2
	Transcription factor homeobox ^{b, c}	<i>Aspergillus fumigatus</i> /XP752424	9e-30	48
Cell rescue, defense and virulence	Catalase isozyme P ^{b, c}	<i>Ajellomyces capsulatus</i> /AAN28380	1e-100	43
	30 kDa heat shock protein	<i>Trichophyton rubrum</i> /AAV33735	6e-14	3
Cellular communication/signal transduction	G protein subunit alpha ^{b, c}	<i>Penicillium chrysogenum</i> /ABH10690	3e-95	112
Metabolism	Probable ATP-dependent RNA helicase DED1 ^{b, c}	<i>Neurospora crassa</i> /CAB88635	1e-84	51
	Formate dehydrogenase ^b	<i>Coccidioides immitis</i> /EAS37296	1e-72	7
Cellular organization	Membrane protein ^{b, c}	<i>Cryptococcus neoformans</i> /AAW43081	1e-12	16
Protein synthesis	Nonribosomal peptide synthetase ^b	<i>Aspergillus fumigatus</i> /XP752404	3e-33	2
Unclassified protein	Conserved hypothetical protein ^b	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP661692	8e-39	10
	Conserved hypothetical protein ^b	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP680743	1e-30	2
	Conserved hypothetical protein ^b	<i>Aspergillus nidulans</i> /XP662070	2e-07	5

Hypothetical protein ^b	-	-	1
Hypothetical protein ^b	-	-	3
Hypothetical protein ^b	-	-	4
Hypothetical protein ^b	-	-	3
Hypothetical protein ^b	-	-	12
Hypothetical protein ^b	-	-	1

^a Accession number at GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

^b Novel genes detected in *T. rubrum*.

^c Validated up-regulated transcripts.

4. CONCLUSÕES

- Os ensaios de RAPD mostraram-se de grande utilidade para estudos epidemiológicos de *T. rubrum*. Este método foi capaz de relacionar isolados epidemiologicamente relacionados bem como aqueles diferentes e pode assim demonstrar infecção por mais de um isolado em pacientes que apresentaram diferentes amostras.
- A tipagem das regiões repetitivas TRS-1 e TRS-2 apresentaram poder discriminatório menor provavelmente por esta região ser mais conservada no genoma, além disso, os isolados empregados neste estudo foram oriundos de uma área geográfica limitada. Portanto, o RAPD mostrou-se mais eficaz na tipagem molecular deste dermatófito.
- A utilização do RDA para análise de cDNAs diferencialmente expressos em diferentes condições de cultivo de *T. rubrum* mostrou ser uma técnica muito eficaz. Os resultados permitiram a identificação de transcritos expressos na presença de queratina, os quais, após confirmação por *dot* e *Northern blot* mostraram maior expressão.
- Dos transcritos identificados com homologia reconhecida, 89,47% não foram anotados até o presente para *T. rubrum*, inclusive alguns fatores de virulência.

5. ANEXOS

5.1 – Metodologia de RDA (Análise de Diferença Representacional):

5.1.1- Cultivo de *T. rubrum* – ativação/repressão gênica:

Foi utilizada a cepa de *T. rubrum* ATCC 52.021 (*American Typing Collection Culture*). O fungo foi cultivado em ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol 0,05% à temperatura ambiente por 10 dias, em seguida foi adicionada à cultura 3 mL de solução salina estéril (0,85%), esta suspensão foi retirada com auxílio de pipeta *Pasteur* e transferida para um *Erlenmeyer* contendo meio de Sabouraud líquido acrescido de cloranfenicol 0,05% e incubado à temperatura ambiente por sete dias. Para extração de RNA total a massa micelial foi transferida para dois novos frascos e cultivada a temperatura ambiente por 24 horas: situação (i) a cultura referida como *driver* foi cultivada em meio líquido mínimo (Cove, 1.966) e a cultura designada como *tester* foi cultivada em meio líquido mínimo contendo solução de queratina obtida de epiderme humana (Sigma) 100 µg/mL; situação (ii) cultura designada como *driver* foi cultivada em meio líquido mínimo contendo solução de queratina obtida de epiderme humana e a cultura referida como *tester* foi cultivada em meio líquido mínimo (Cove, 1.966).

5.1.2- Extração de RNA total:

Todo procedimento envolvendo RNA foi realizado em condições livre de RNases. Cerca de dois gramas de micélio foram macerados com nitrogênio líquido até obtenção de um pó fino. Após, os mesmos foram transferidos para um tubo e foi seguido o protocolo de extração de RNA total descrito por Sokolowisky et al., (1.990). Ao micélio previamente macerado foi adicionado 7 mL de Trizol (Invitrogen) e ½ volume de pérolas de vidro, este foi agitado em vortex por 20

minutos e deixado em repouso à temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida centrifugado a 1.000 g por 10 minutos a 4°C. A parte superior foi transferida para um novo tubo e foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio para 0,75 mL de Trizol recuperado, agitado novamente, mantido em repouso por 10 minutos e centrifugado a 1.000 g por 10 minutos a 4°C. A fase aquosa foi retirada e adicionou-se a esta uma mistura de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) (v/v), seguindo-se agitação e repouso por mais 10 minutos. Após centrifugação, a parte superior foi transferida para um novo tubo, e então foram acrescentados 0,25 mL de isopropanol e 0,25 mL de solução de citrato de sódio 0,4 M e cloreto de sódio 0,8 M para 0,75 mL de Trizol inicial, após repouso, centrifugou-se a 1.000 g por 30 minutos a 4°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com etanol 75%, seco e dissolvido em água milli-Q estéril tratada com DEPC 0,01% (dietilpirocarbonato). A concentração do RNA foi determinada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 260 nm (SAMBROOK & RUSSEL, 2.001), este foi aliqotado e estocado à -80°C. A integridade foi determinada em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X (Tris-base 90 mM; ácido bórico 90 mM; EDTA 2 mM pH 8,0), corado pelo brometo de etídio e observado à luz ultra-violeta (Figura 1).

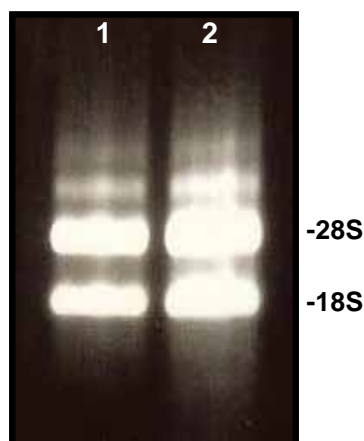


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 1% do RNA total de *T. rubrum* ATCC 52.021. **1:** RNA extraído após cultivo em meio com queratina; **2:** RNA extraído após cultivo em meio sem queratina.

5.1.3- Reação de RDA:

Foi seguido o protocolo descrito por Pastorian et al., (2.000) modificado por Dutra et al., (2.004):

5.1.3.1- Síntese de cDNA fita simples:

A síntese da primeira fita de cDNA foi feita em uma reação contendo 1 μg de RNA total e 2 μL da seqüência iniciadora (5'-AGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3') (10 pmol/ μL). Esta mistura foi aquecida por 2 minutos a 72°C e em seguida foi acrescentado 2 μL da seqüência iniciadora (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT₍₃₀₎N₁N, onde N=A, C, G ou T; N₁=A, G ou C) (10 pmol/ μL), 2 μL de uma mistura de dNTPs (10 mM), 2 μL de RNaseOUT (40 U/ μL) (Invitrogen), 0,4 de DTT (100 mM), 1,2 μL de cloreto de magnésio (50 mM), 2 μL da enzima transcriptase reversa (200 U/ μL) (RT

Superscript III - Invitrogen) e 4 μL de tampão 5X (Tris-HCl 250 mM pH 8,3; KCl 375 mM; MgCl_2 15 mM). Esta reação foi aquecida durante 1 hora e trinta minutos a 42°C . Após este período foram adicionados 80 μL de TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM pH 8,0) e aquecida por mais 7 minutos a 72°C .

5.1.3.2- Síntese de cDNA fita dupla:

Para síntese da segunda fita de cDNA foi utilizado 3 μL da primeira fita, 2 μL da seqüência iniciadora (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3') (10 pmol/ μL), 10 μL de tampão 10 X (Tris- SO_4 600 mM pH 8,9, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 180 mM), 2 μL de uma mistura de dNTPs (10 mM), 2 μL de sulfato de magnésio (50 mM), 2 μL de *Taq* Hi-Fi (Invitrogen) e água milli-Q estéril tratada com DEPC 0,01% para volume final de 100 μL . As condições de amplificação foram as seguintes: um ciclo inicial por 1 min/ 95°C , seguido por 20 ciclos de desnaturação por 15 seg/ 95°C , anelamento por 30 seg/ 55°C , extensão por 5 min/ 68°C e um ciclo final de extensão por 7 minutos a 68°C . A integridade foi determinada em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X corado pelo brometo de etídio e observado à luz ultra-violeta.

5.1.3.3- Digestão com *Sau3AI*:

1 μg da fita dupla de cDNA de ambos *tester* e *driver* foram digeridos com 1 μL da enzima *Sau3AI* (10 U/ μL) (Promega), 5 μL de tampão B (Tris-HCl 60 mM pH 7,5; NaCl 500 mM; MgCl_2 60 mM; DTT 10 mM), e água milli-Q estéril para volume final de 50 μL durante 3 horas e trinta minutos a 37°C . Posteriormente, a reação foi purificada através do kit GFX (GE Healthcare), quantificada a 260 nm e visualizada em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X corado pelo brometo de etídio e observado à luz ultra-violeta.

5.1.3.4- Anelamento do primeiro par de adaptadores:

Os produtos da digestão da amostra *tester* (300 ng) foram ligados ao primeiro par de adaptadores RBam12 (5'-GATCCGTTTCATG-3') e RBam24 (5'-ACCGACGTCGACTATCCATGAACG-3') (500 pmol/ μ L), nas seguintes condições: 55°C/20min; 54°C/10min; 53°C/1min; 52°C/1min; 50°C/1min; 45°C/5min; 40°C/5min; 30°C/5min; 25°C/5min; 20°C/3min; 15°C/5min; 10°C/5min; 4°C/30min.

5.1.3.5- Ligação do primeiro par de adaptadores:

Após anelamento foram adicionados 1 μ L de ligase (5 U/ μ L) (Fermentas), 3 μ L de tampão ligação 10X (Tris-HCl 400 mM; MgCl₂ 100 mM; DTT 100 mM; ATP 5 mM) e 3 μ L de ATP (10 mM) (Invitrogen), por 18 horas a 16°C e em seguida a reação foi purificada através do GFX (GE Healthcare).

5.1.3.6- Teste de ligação do primeiro par de adaptadores:

Para confirmar a ligação dos adaptadores foi feito o teste utilizando-se: 0,5 μ L da reação de ligação, 5 μ L de uma mistura de dNTPs (1 mM), 2,5 μ L de tampão 10X (Tris-SO₄ 600 mM pH 8,9; (NH₄)₂SO₄ 180 mM), 2 μ L de cloreto de magnésio (50 mM), 0,5 μ L de *Taq* Hi-Fi (Invitrogen) e água milli-Q estéril para volume final de 25 μ L, nas seguintes condições: um ciclo inicial por 1 min/95°C, seguido por 25 ciclos de desnaturação por 45 seg/95°C e extensão por 4 min/72°C e um ciclo final por 10 min/72°C. A reação foi aplicada em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X, corado pelo brometo de etídio e observado à luz ultra-violeta.

5.1.3.7- Primeira subtração:

Para primeira subtração *tester* (cDNA digerido e ligado aos adaptadores) e *driver* (cDNA digerido) foram misturados na proporção de 1:10, acrescido de 50 µL de acetato de amônio 7,5 M e 375 µL de etanol absoluto, a reação foi incubada por 3 horas à -20°C. Posteriormente, esta foi centrifugada a 30.000 g por 30 minutos e lavada com etanol 70%. O precipitado foi ressuspendido em 4 µL de tampão EE 3X (EPPS 30 mM (Sigma) pH 8,0; EDTA 3 mM), aquecido por 95°C/2min. Em seguida, esta foi transferida para um tubo contendo 1,5 µL de NaCl 5 M, coberta com óleo mineral e incubada nas seguintes condições: 95°C/3min; 67°C/24h. Após este período foram adicionados 40 µL de água milli-Q estéril.

5.1.3.8- Primeira amplificação:

Foi feita uma reação contendo 10,4 µL de tampão 10X (Tris-SO₄ 600 mM pH 8,9; (NH₄)₂SO₄ 180 mM), 8,3 µL de cloreto de magnésio (50 mM), 5,2 µL de uma mistura de dNTPs e água milli-Q estéril para volume final de 93,4 µL. Foram retirados 10 µL desta reação e adicionado 0,5 µL de *Taq* Hi-Fi (Invitrogen) e reservado, ao restante foram adicionados 0,1 µL da seqüência iniciadora RBam24 e 6 µL da subtração, esta foi aquecida durante 2 minutos a 72°C, em seguida foi adicionado o restante da reação e aquecido por mais 5 minutos a 72°C, seguido de: 1 ciclo inicial de 1min/95°C, seguido por 7 ciclos de 45seg/95°C; 4min/72°C e um ciclo final de 10min/72°C.

Posteriormente uma nova PCR foi feita, em que 6 µL da primeira foram utilizados como molde para uma segunda reação realizada nas mesmas condições da anterior, entretanto esta foi amplificada 30 vezes. Como controle negativo foi utilizado a mesma mistura exceto o produto de ligação. A reação foi aplicada em

gel de agarose 2% em tampão TBE 1X, corado pelo brometo de etídio e observado à luz ultra-violeta.

O produto final foi purificado e digerido com a enzima de restrição *Sau3AI* para remoção dos adaptadores e uma nova purificação foi feita. A segunda ligação foi feita usando-se os adaptadores NBam12 (5'-GATCCTCCCTCG-3') e NBam24 (5'-AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAG-3') que foram anelados e ligados aos produtos da primeira amplificação, nas mesmas condições da primeira reação de anelamento e ligação (itens 5.1.3.4 e 5.1.3.5), esta foi purificada novamente antes da segunda subtração.

A segunda subtração foi realizada de acordo com o item 5.1.3.7, entretanto na proporção de 1:100 de *tester* (produtos da segunda ligação) e *driver*. A amplificação foi feita através da seqüência NBam24, seguindo-se o protocolo descrito anteriormente. Os produtos foram purificados e verificados em gel de agarose 2% em tampão TBE 1X, corado pelo brometo de etídio, observado à luz ultra-violeta em seguida foi feita a clonagem.

5.1.4- Ligação dos fragmentos em vetor de clonagem:

Os fragmentos de interesse foram ligados ao vetor de clonagem pGEM-T-Easy (Promega), na proporção de 1:5 (vetor/inserto). A reação de ligação foi efetuada em 1 µL de tampão ligase (1X), 1 µL de T4 DNA ligase, 1 µL de ATP num volume final de 10 µL. Após incubação a 16°C/18h, esta foi precipitada e a transformação foi realizada em células de *Escherichia coli* XL1 *blue* (Stratagene).

5.1.5- Preparo de células competentes para transformação por eletroporação:

Uma colônia de *E. coli* XL1 *blue* (Stratagene) foi inoculada em 10 mL de meio LB (Luria-Bertani) líquido por 18 horas a 37°C. Em seguida, foram inoculados 5 mL deste pré-inóculo em 500 mL de meio LB, incubado a 37°C sob agitação até atingir uma D.O de 0,35-0,4 em comprimento de onda de 550 nm. A cultura foi então resfriada em banho de gelo por 30 minutos e centrifugada a 3.000 g por 15 minutos a 4°C. As células foram ressuspensas em 450 mL de água milli-Q estéril gelada, centrifugadas a 3.000 g por 15 minutos a 4°C e adicionado 200 mL de água gelada e submetidas a uma nova centrifugação. Em seguida foram adicionados 10 mL de glicerol 10% gelado às células, seguindo-se nova centrifugação. O centrifugado foi ressuspensado em aproximadamente 2 mL de glicerol 10% (3×10^{10} céls./mL), em seguida estas foram aliqüotadas, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C.

5.1.6- Transformação de células de *E. coli* por eletroporação:

Uma aliqüota de 20 µL de células competentes foi descongelada em banho de gelo e recebeu a adição de 2 µL do sistema de ligação (item 5.1.4). Esta mistura foi então colocada em uma cubeta de 0,2 cm previamente gelada. A cubeta foi colocada no aparelho *Cell Porator E. coli Pulser* (Gibco) programado com os seguintes parâmetros: 2,5 mV e 125 Ω. Após o pulso as células foram recolhidas com 1 mL de meio SOC (SAMBROOK & RUSSEL, 2.001) e incubadas por 1 hora a 37°C. A suspensão foi plaqueada em ágar LB acrescido de 100 µg/mL de ampicilina, IPTG (isopropil-tio-β-D-galactopiranosídeo) e X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-B-galactopiranosídeo), nas concentrações de 0,1 mM e 30 µg/mL,

respectivamente, e incubada por 18 horas a 37°C para a seleção de clones recombinantes.

5.1.7- Extração de DNA plasmidial em microplaca:

As colônias positivas foram crescidas em 1 mL de meio *Circle Grow* (Bio 101 Systems) contendo 50 µg/mL de ampicilina em microplacas com 96 poços, por 22 horas, 50 g a 37°C. Após este período 100 µL dos clones cultivados foram transferidos para placas tipo ELISA, adicionado v/v de glicerol 50% e estocadas a -80°C. O restante do crescimento foi centrifugado a 2.000 g por 6 minutos, o sobrenadante foi descartado e 240 µL de solução GTE (glicose 50 mM; Tris-HCl 25 mM pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0) foram adicionados a cada poço. A microplaca foi submetida à agitação em vortex e novamente centrifugada 2.000 g por 9 minutos. O sobrenadante foi descartado e 80 µL de solução GTE foram adicionados a cada poço. Após agitação em vortex as suspensões foram transferidas para uma placa tipo ELISA (fundo redondo) contendo 2 µL de RNase (10 mg/mL). Em seguida, 80 µL de NaOH 0,2 N; SDS 1% foram adicionados a cada poço, a placa foi homogeneizada por inversão e mantida à temperatura ambiente por 10 minutos, seguindo-se adição de 80 µL de acetato de potássio 3 M foram adicionados a cada poço. Após homogeneização por inversão, a reação foi mantida à temperatura ambiente por 10 minutos. Após esse período, as placas foram incubadas a 90°C por 30 minutos e em seguida resfriadas em banho de gelo e centrifugada a 2.000 g por 9 minutos. A reação foi transferida para um sistema contendo uma placa Millipore (MAGV N22) no topo de uma placa tipo ELISA (fundo cônico), o qual foi centrifugado a 2.000 g por 6 minutos. O sistema foi desmontado, e a etapa seguinte consistiu na precipitação do DNA. Para tanto, 100

μL de isopropanol foram adicionados ao filtrado, em seguida a placa foi centrifugada a 2.000 g por 45 minutos. O precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuspendido em água milli-Q estéril.

5.1.8- Seqüenciamento:

O seqüenciamento foi realizado pelo método de Sanger et al., (1.977) utilizando o seqüenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences), as reações foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás - UFG. Foram utilizados os kits *DYEnamic ET* e *Dye Terminator Cycle Sequencing* (Amersham Biosciences), seguindo os protocolos recomendados pelo fabricante, utilizando o oligonucleotídeo T7 *forward promoter* em que se utilizou um ciclo inicial por 2seg/95°C seguido de 34 ciclos a 10seg/ 95°C, 15seg/50°C, 1min/60°C. A seqüência nucleotídica foi determinada através da incorporação de dideoxynucleotídeos (ddNTP) terminadores e foram analisadas e avaliadas automaticamente através dos cromatogramas gerados e interpretados pelo *software MegaBACE 1000 sequencer* convertidos em seqüência de DNA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJELLO, L. Present day concepts in the dermatophytes. **Mycopathol. Mycol. Appl.**, v.17, p.315-324, 1.962.

AJELLO, L. Taxonomy of the dermatophytes: a review of their imperfect and perfect states. In K. Iwata (ed), Recent advances in medical and veterinary mycology. **University of Tokyo Press**, p. 289-297, 1.977.

ALLEN, N.L.; HILTON, A.C.; BETTS, R.; PENN, C.W. Use of representational difference analysis to identify *Escherichia coli* O157-specific DNA sequences. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 197, p. 195-201, 2.001.

ALY, R. Ecology and epidemiology of dermatophyte infections. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.31, p. S21-25, 1.994.

APODACA, G., MCKERROW, J.H. Regulation of *Trichophyton rubrum* proteolytic activity. **Infect. Immun.**, v. 57, p. 3.081-3.090, 1.989.

BAEZA, L.C.; MATSUMOTO, M.T.; ALMEIDA, A.M.F.; MENDES-GIANNINI M,J.S. Strain differentiation of *Trichophyton rubrum* by randomly amplified polymorphic DNA and analysis of rDNA nontranscribed spacer. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, p. 429-436, 2.006.

BAEZA, L.C.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Strain differentiation of *Trichophyton rubrum* by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 46, p. 339-441, 2.004.

BAEZA, L.C.; REZENDE, J.F.; SILVA, R.A.M.; MIRANDA, E.T.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Epidemiologia das dermatofitoses em instituições públicas de Araraquara-SP. **Rev. Cien. Farmac.**, v. 25, p. 119-124, 2.004.

BAILÃO, A.M.; SCHRANK, A.; BORGES, C.L.; DUTRA, V.; MOLINARI-MADLUM E.E.W.I.; FELIPE M.S.S.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; MARTINS, W.S.; PEREIRA, M.; SOARES, C.M.A. Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: Representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. **Microbes Infect.**, (in press) 2.006.

BÁRCENA ASENSIO, M.C.; CABO, J.F.G. Ecología de los dermatofitos. **Rev. Iber. Micol.**, v. 13, p. 47-54, 1.996.

BRILHANTE, R.S.N.; PAIXÃO, G.C.; SALVINO, K.; DIÓGENES, M.J.N.; BANDEIRAS, S.P.; ROCHA, M.F.G.; SANTOS, J.B.F.; SIDRIM, J.J.C. Epidemiologia e ecologia das dermatofitoses na cidade de Fortaleza: o *Trichophyton tonsurans* como importante patógeno emergente da *tinea capitis*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 33, p. 417-425, 2.000.

BROUTA, F.; DESCAMPS, F.; FETT, T.; LOSSON, B.; GERDAY, C.; MIGNON, B. Purification and characterization of a 43.5kDa keratinolytic metalloprotease from *Microsporum canis*. **Med. Mycol.**, v. 39, p. 269-275, 2.001.

BURNIE, J.P.; CARTER, T.L.; HODGETTS, S.J.; MATTHEWS, R.C. Fungal heat-shock proteins in human disease. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 30, p. 53-88, 2.006.

CASTELLANI, A. Observation on a new species found in *tinea cruris*. **Br. J. Dermatol.**, v. 5, p. 148-150, 1.910 apud RIPPON, J. W. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. **Med. Mycol.**, 3^a ed. W.B. Saunders, Philadelphia, 1.988.

CHINELLI, P.A.V.; SOFIATTI, A.A.; NUNES, R.S.; MARTINS, J.E.C. Dermatophyte agents in the city of São Paulo, from 1.992 to 2.002. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.45, p. 259-263, 2.003.

CHMEL, L. Zoophilic Dermatophytes and Infections in Man. **Med. Mycol.**, v. 8 (suppl.), p. 61-66, 1.980.

COSTA, T.R.; COSTA, M.R.; SILVA, M.V.; RORIGUES, A.B.; FERNADES, O.F.; SOARES, A.J.; SILVA, M.R. The etiology and epidemiology of dermatophytoses in Goiania, GO, Brazil. **Rev. Soc. Med. Trop.**, v. 32, p. 367-371, 1.999.

COVE, D.J. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Biochem. Biophys Acta.**, v. 113, p. 51-56, .1966.

DAVIDSON, F. D.; MACKENZIE, D. W. R.; OWEN, R. J. Deoxyribonucleic acid base compositions of dermatophytes. **J. Gen. Microbiol.**, v. 118, p. 465-470, 1.980.

DAWSON, C.O.; GENTLES, J.C. The perfect states of *Keratinomyces ajelloi* Vanbreuseghem, *Trichophyton terrestre* Durie & Frey and *Microsporum nanum* fuentes. **Sabouraudia**, v. 1, p. 49-57, 1.961.

DE BIÈVRE, C.; DAUGUET, C.; NGUYEN, V. H.; IBRAHIM-GRANET, O. Polymorphism in mitochondrial DNA of several *Trichophyton rubrum* isolates from clinical specimens. **Ann. Inst. Pasteur Microbiol.**, v. 138, p. 719-727, 1.987.

DESCAMPS, F.; BROUTA, F.; MONOD, M.; ZAUGG, C.; BAAR, D.; LOSSON, B.; MINGNON, B. Isolation of a *Microsporum canis* gene family encoding three subtilisin-like proteases expressed *in vivo*. **J. Invest. Dermatol.**, v. 119, p. 830-835, 2.002.

DIATCHENKO, L.; LAU, Y.F.; CAMPBELL, A.P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K.; GURSKAYA, N.; SVERDLOV, E.D.; SIEBERT, P.D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 93, p. 6.025-6.030, 1.996.

DREW, A.C.; BRINDLEY, P.J. Female-specific sequences isolated from *Schistosoma mansoni* by representational difference analysis. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 71, p. 173-181, 1.995.

DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; BROETTO, L.; SCHRANK, I. S.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle. **Res. Microbiol.**, v. 155, p. 245-251, 2.004.

EMMONS, C.W. Dermatophytes: Natural groupings based on the form of the spores and accessory organs. **Arch. Dermatol. Syphilol.**, v. 30, p. 337-362, 1.934.

ESQUENAZI, D.; ALVIANO, C.S.; DE SOUZA, W.; ROZENTAL, S. The influence of surface carbohydrates during in vitro infection of mammalian cells by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Res. Microbiol.**, v. 155, p. 144-153, 2.004.

FAGGI, E.; PINI, G.; CAMPISI, E.; BERTELLINI, C.; DIFONZO, E.; MANCIANTI, F. Application of PCR to distinguish common species of dermatophytes. **J. Clin. Microb.**, v. 39, p. 3.382-3.385, 2.001.

FUCHS, E. Keratins and the skin. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v. 11, p. 123-53, 1.995.

GENTLES, J. C. Experimental ringworm in guinea pigs: oral treatment with griseofulvin. **Nature**, v. 182, p. 476, 1.958.

GEORG, L.K. Epidemiology of dermatophytoses sources of infection modes of transmission and epidemicity. **Annals. N. Y. Acad. Science**, v. 89, p. 69-77, 1.960.

GRÄSER, Y., KÜHNISCH, J., PRESBER, W. Molecular markers reveal exclusively clonal reproduction in *Trichophyton rubrum*. **J. Clin. Microb.**, v. 37, p. 3.713-3.717, 1.999.

GREER, D.L. An overview of common dermatophytes. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 31, p. 112-116, 1.994.

GRUBY, D. Recherches sur la nature, le siège et le développement du porrigo decalvans ou phytoalopécie. **C. R. Acad. Sci.**, v. 17, p. 301-302, 1.943, apud WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R.C. The Dermatophytes. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 8, p. 240-259, 1.995.

GRUBY, D. Recherches sur les cryptogames qui constituent la maladie contagieuse du cuir chevelu décrite sous le teigne tondante (Mahon), *Herpes tonsurans* (Cazenave). **C. R. Acad. Sci.**, v. 18, p. 583-585, 1.844, apud WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R.C. The Dermatophytes. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 8, p. 240-259, 1.995.

GRUBY, D. Sur le mycodermes qui constituent la teigne faveuse. **C. R. Acad. Sci.**, v. 13, p. 309-312, 1.941, apud WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R.C. The Dermatophytes. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 8, p. 240-259, 1.995.

GUPTA, A. K.; KOHLI, Y.; SUMMERBELL, R. C. Variation in restriction fragment length polymorphisms among serial isolates from patients with *Trichophyton rubrum* infections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 3.260-3.266, 2.001.

HOWELL, S. A.; BARNARD, R. J.; HUMPHREYS, F. Application of molecular typing methods to dermatophyte species that cause skin and nail infections. **J. Med. Microb.**, v. 48, p. 33-40, 1.999.

HUBANK, M.; SCHATZ, D.G. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. **Nucleic. Acids Res.**, v. 22, p. 5.640-5.648, 1.994.

JACKSON, C. J.; BARTON, R. C.; EVANS, G. V. Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 931-936, 1.999.

JACKSON, C.J.; BARTON, R.C.; KELLY, S.L.; EVANS, E.G.V. Strain identification of *Trichophyton rubrum* by specific amplification of subrepeat elements in the ribosomal DNA nontranscribed spacer. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 4.527-4.534, 2.000.

JOHNSON, R. A. HIV disease: mucocutaneous fungal infections in HIV disease. **Clin. Dermatol.**, v. 18, p. 411-422, 2.000.

JOUSSON, O.; LÉCHENNE, B.; BONTEMS, O.; CAPOCCIA, S.; MIGNON, B.; BARBLAN, J.; QUADRONI, M.; MONOD, M. Multiplication of an ancestral gene encoding secreted fungalsin preceded species differentiation in the dermatophytes *Trichophyton* and *Microsporum*. **Microbiology**, v. 150, p. 301-310, 2.004.

KAC, G. Molecular approaches to the study of dermatophytes. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 329-336, 2.000.

KAC, G. ; BOUGNOUX, M. E. ; FEUILHADE, M. ; SENÉ, S. ; DEROUIN, F. Différentiation d'isolates de *Trichophyton rubrum* et de *Trichophyton interdigitale* par la technique de Random amplification of polymorphic DNA. **J. Mycol. Méd.**, v. 9, p. 39-41, 1.999a.

KAC, G.; BOUGNOUX, M.E.; FEUILHADE, M.; SENÉ, S.; DEROUIN, F. Genetic diversity among *Trichophyton mentagrophytes* isolates using random amplified polymorphic DNA method. **Br. J. Dermatol.**, v.140, p. 839-844, 1.999b.

KAMIYA, A.; KIKUCHI, A.; TOMITA, Y.; KANBE, T. PCR and PCR-RFLP techniques targeting the DNA topoisomerase II gene for rapid clinical diagnosis of the etiologic agent of dermatophytosis. **J. Dermatol. Sci.**, v. 34, p. 35-38, 2.004.

KANE, J.; LEAVITT, E.; SUMMERBELL, R.C.; KRAJDEN, S.; KASATIYA, S.S. An outbreak of *Trichophyton tonsurans* dermatophytosis in a chronic care institution for the elderly. **Eur. J. Epidemiol.**, v. 4, p. 144-149, 1.988.

KANO, R.; NAKAMURA, Y.; WATANABE, S.; TSUJIMOTO, H.; HASEGAWA, A. Phylogenetic relation of *Epidermophyton floccosum* to the species of *Microsporum* and *Trichophyton* in chitin syntase1 (*chs1*) gene sequences. **Mycopathol.**, v. 146, p. 111-113, 1.999.

KANO, R.; NAKAMURA, Y.; WATARI, T.; WATANABE, S.; TAKAHASHI, H.; TSUJIMOTO, H.; HASEGAWA, A. Phylogenetic analysis of 8 dermatophyte species using chitin synthase 1 gene sequences. **Mycoses**, v. 40, p. 411-414, 1.997.

KANO, R.; OKABAYASHI, K.; NAKAMURA, Y.; OOKA, S.; KASHIMA, M.; MIZOGUCHI, M.; WATANABE, S.; HASEGAWA, A. Differences among chitin synthase I gene sequences in *Trichophyton rubrum* and *T. violaceum*. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 47-50, 2.000.

KATO-MAEDA, M.; GAO Q.; SMALL, P. M.; Microarray analysis of pathogens and their interaction with hosts. **Cell. Microbiol.**, v. 3, p. 713-719, 2.001.

KITAJIMA Y. Structural and biochemical characteristics of pathogenic fungus: cell walls, lipids and dimorphism, and action modes of antifungal agents. **Nippon Ishinkin. Gakkai. Zasshi.**, v. 41, p. 211-217, 2.000.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. Micologia de Micologia Médica Lacaz. Editora Sarvier, 9^a edição, São Paulo, 2.002.

LEITE, R. M. S.; FOGAÇA, S. A.; SANTOS, M.G.; MAIA, H. C. A. Dermatofitose em Brasília. **Hfa Publicação Técnica e Científica**, v. 5, p. 29-42, 1.990.

LIANG, P.; PARDEE, A.B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, v. 257, p. 967-971, 1.992.

LIANG, P.; ZHU, W.; ZHANG, X.; GUO, Z.; O'CONNELL, R.P.; AVERBOUKH, L.; WANG, F.; PARDEE, A.B. Differential display using one-base anchored oligo-dT primers. **Nucleic Acids Res.**, v. 22, p. 5.763-5.764, 1.994.

LIMA, E.O.; OLIVEIRA, N.M.C.; GUERRA, M.F.L.; PONTES, Z.B.V.S.; CARVALHO, M.F.F.P.; SANTOS, J.P. Frequência de dermatofitoses em João Pessoa-Paraíba-Brasil. **Anais Bras. Dermatol.**, v. 74, p. 127-132, 1.999.

LISITSYN, N. A. Representational difference analysis: finding the difference between genomes. **Trends Genet.**, v. 11, p. 303-307, 1.995.

LISITSYN, N.; LISITSYN, N.; WIGLER, M. Cloning the differences between two complex genomes. **Science**, v. 259, p. 946-951, 1.993.

LIU, D., COLOE, S., BAIRD, R., PEDERSEN, J. PCR Identification of *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* and *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* dermatophytes With a Random Primer. **J. Med. Microbiol.**, v. 46, p. 1.043-1.046, 1.997b.

LIU, D.; COLOE, S.; BAIRD, R.; PEDERSEN, J. Molecular determination of dermatophyte fungi using the arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Br. J. Dermatol.**, v. 137, p. 351-355, 1.997a.

LIU, D.; COLOE, S.; BAIRD, R.; PEDERSEN, J. Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi. **J. Med. Microbiol.**, v. 49, p. 493-497, 2.000.

LIU, D.; COLOE, S.; PEDERSEN, J.; BAIRD, R. Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction to differentiate *Trichophyton* dermatophytes. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 136, p. 147-150, 1.996.

LONDERO, A.T.; RAMOS, C.D. Agentes de dermatofitoses humanas no interior do Estado do Rio Grande do Sul no período de 1960-1987. **Anais Bras. Dermatol.**, v. 64, p. 161-164, 1.989.

MACKENZIE, D.W.R. The extra-human occurrence of *Trichophyton tonsurans* var. *sulfureum* in a residential school. **Sabouraudia**, v. 1, p. 58-64, 1.961.

MAYR, A. Infections with Humans in the household transmit to dogs and cats. **Zentralbl. Bakteriologie. Mikrobiologie. Hygiene. Ser.**, v. 87 (B1), p. 508-526, 1.989.

MEZZARI, A. frequency of dermatophytes in the metropolitan area of Porto Alegre, RS, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 40, p. 71-76, 1.998.

MIGNON, B.; SWINNEN, M.; BOUCHARA, J.; HOFINGER, M.; NIKKELS, A.; PIERARD, G.; GERDAY, C.; LOSSON, B. Purification and characterization of a 31.5 kDa keratinolytic subtilisin-like serine protease from *Microsporum canis* and evidence of its secretion in naturally infected cats. **Med. Mycol.**, v. 36, p. 395-404, 1.998.

MONOD, M.; CAPOCCIA, S.; LECHENNE, B.; ZAUGG, C.; HOLDOM, M.; JOUSSON, O. Secreted proteases from pathogenic fungi. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 292, p. 405-419, 2.002.

MONOD, M.; LÉCHENNE, B.; JOUSSON, O.; GRAND, D.; ZAUGG, C.; STÖCKLIN, R.; GROUZMANN, E. Aminopeptidases and dipeptidyl-peptidases secreted by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Microbiology**, v. 151, p. 145-155, 2.005.

MUGGE, C.; HAUSTEIN, U.F.; NENOFF, P. Causative agents of onychomycosis - a retrospective study. **J. Dtsch. Dermatol. Ges.**, v. 4, p. 218-228, 2.006.

NEDIVI, E.; HEVRONI, D.; NAOT, D.; ISRAELI, D.; CITRI, Y. Numerous candidate plasticity-related genes revealed by differential cDNA cloning. **Nature**, v. 363, p. 718-722, 1.993.

NISHIO, K.; KAWASAKI, M.; ISHIZAKI, H. Phylogeny of the genera *Trichophyton* using mitochondrial DNA analysis. **Mycopathologia**, v. 117, p. 127-132, 1.992.

ODOM, R. Pathophysiology of dermatophyte infections. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 28, p. S1-S7, 1.992.

OFEK, I.; KAHANE, I.; SHARON, N. Toward anti-adhesion therapy for microbial diseases. **Trends Microbiol.**, v. 4, p. 297-299, 1.996.

OGAWA, H.; SUMMERBELL, R.C.; CLEMONS, K.V.; KOGA, T.; RAN, Y.P.; RASHID, A.; SOHNLE, P.G.; STEVENS, D.A.; TSUBOI, R. Dermatophytes and host defense in cutaneous mycoses. **Med. Mycol.**; v. 36, p. 166-173, 1.998.

PASTORIAN, K.; HAWEL III, L.; BYUS, C.V. Optimization of cDNA representational difference analysis for the identification of differentially expressed mRNAs. **Anal. Biochem.** v. 283, p. 89-98, 2.000.

PEREA, S.; RAMOS, M.J.; GARAU, M.; GONZALEZ, A.; NORIEGA, A.R.; PALACIO, A.D. Prevalence and risk factors of tinea unguium and tinea pedis in the general population in Spain. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, p.3.226-3.230, 2.000.

PLOWMAN, J.E. The proteomics of keratin proteins. **J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, (in press), 2.006.

PORTER, R.M. The new keratin nomenclature. **J. Invest. Dermatol.**, v. 126, p. 2.366-2.368, 2.006.

RIPPON, J. W. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. **Med. Mycol.**, 3^a ed. W.B. Saunders, Philadelphia, 1.988.

REZAIIE, S.; BAN, J.; MILDNER, M.; POITSCHKEK, C.; BRNA, C.; TSCHACHLER, E. Characterization of a cDNA clone, encoding a 70 kDa heat shock protein from the dermatophyte pathogen *Trichophyton rubrum*. **Gene**. v. 241, p. 27-33, 2.000.

ROTHKAMP, A.; STROMMENGER, B.; GERLACH, G.F. Identification of *Brachyspira hyodysenteriae* - specific DNA fragments using representational difference analysis. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 210, p. 173-179, 2.002.

SABOURAUD, R. **Les Teignes**. Masson, Paris, 1.910. apud WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R.C. The Dermatophytes. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 8, p. 240-259, 1.995.

SCHÖENLEIN, J.L. Zur pathogenie der impetigines. **Arch. Anat. Physiol. Wiss. Med.**, p. 82, 1839, apud WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R.C. The Dermatophytes. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 8, p. 240-259, 1.995.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, 2.001.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain termination inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, p. 5.463-5.467, 1.977.

SANTOS, J.I.; NEGRI, C.M.; WAGNER, D.C.; PHILIPPI, R.; NAPPI, B.P.; COELHO, M.P. Some aspects of dermatophytoses seen at university hospital in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 39, p. 137-140, 1.997.

SIQUEIRA, E.R.; FERREIRA, J.C.; MAFFEI, C.M.; CANDIDO, R.C. Occurrence of dermatophyte, in nails, feet and hands of university students. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, p. 269-271. 2.006.

SOKOLOWISKY, V.; KALDENHOFF, R.; RICCI, M.; RUSSO. Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa* . **Fungal Genet. Newsl.**, v. 37, p. 41, 1.990.

SOLL, D.R. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. **J. Clin. Microbiol.**, v. 13, p. 332-370, 2.000.

TSUBOI, R.; KO, T.; TAKAMORI, K.; OGAWA, H. Isolation of keratinolytic proteinase from *Trichophyton mentagrophytes* with enzymatic activity at acidic pH. **Infect. Immun.**, v. 57, p. 3.479-3.483, 1.989.

WADA, J.; KUMAR, A.; OTA, K.; WALLNER, E.I.; BATLLE, D.C.; KANWAR, Y.S. Representational difference analysis of cDNA of genes expressed in embryonic kidney. **Kidney Int.**, v. 51, p. 1.629-1.638, 1.997.

WANG, L.; MA, L.; LENG, W.; LIU, T.; YU, L.; YANG, J.; YANG, L.; ZHANG, W.; ZHANG, Q.; DONG, J.; XUE, Y.; ZHU, Y.; XU, X.; WAN, Z.; DING, G.; YU, F.; TU, K.; LI, Y.; LI, R.; SHEN, Y.; JIN, Q. Analysis of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* expressed sequence tags. **BMC Genomics**, v. 11, p. 255, 2.006 (in press).

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R.C. The Dermatophytes. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 8, p. 240-259, 1.995.

WEITZMAN, I., Mc GINNIS, M.R., PADHYE, A.A., AJELLO, L. The genus *Arthroderma* and its later synonym *Nannizia*. **Mycotaxon.**, v. 25, p. 505-518, 1.986.

WELSH, J.; McCLELLAND. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, p. 7.213-7.218, 1.990.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKY, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, p. 6.531-6.535, 1.990.

YAMAMATO, M.; WAKATSUKI, T.; HADA A.; RYO, A. Use of serial analyses of gene expression (SAGE). **J. Immunol. Methods**, v. 250, p. 45-66, 2.001.

YAZDANPARAST, Y.; JACKSON, C.J.; BARTON, R.C.; EVANS, E.G.V. Molecular strain typing of *Trichophyton rubrum* indicates multiple strain involvement in Onychomycosis. **Brit. J. Dermatol.**, v. 148, p. 51-54, 2.003.

ZAIAS, N.; REBELL, G. Chronic dermatophytoses syndrome due to *Trichophyton rubrum*. **Int. J. Dermatol.**, v. 35, p. 614-617, 1.996.

Strain differentiation of *Trichophyton rubrum* by randomly amplified polymorphic DNA and analysis of rDNA nontranscribed spacer

Lilian Cristiane Baeza, Marcelo Teruyuki Matsumoto,
Ana Marisa Fusco Almeida and Maria José Soares Mendes-Giannini

Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Rua Expedicionários do Brasil, 1621, Araraquara, SP, CEP 14801-902, Brazil

Correspondence

Maria José Soares
Mendes-Giannini
giannini@fcar.unesp.br

Trichophyton rubrum is the most common pathogen causing dermatophytosis. Molecular strain-typing methods have recently been developed to tackle epidemiological questions and the problem of relapse following treatment. A total of 67 strains of *T. rubrum* were screened for genetic variation by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis, with two primers, 5'-d[GGTGCGGGAA]-3' and 5'-d[CCCGTCAGCA]-3', as well as by subrepeat element analysis of the nontranscribed spacer of rDNA, using the repetitive subelements TRS-1 and TRS-2. A total of 12 individual patterns were recognized with the first primer and 11 with the second. Phylogenetic analysis of the RAPD products showed a high degree of similarity (> 90%) among the epidemiologically related clinical isolates, while the other strains possessed 60% similarity. Specific amplification of TRS-1 produced three strain-characteristic banding patterns (PCR types); simple patterns representing one copy of TRS-1 and two copies of TRS-2 accounted for around 85% of all isolates. It is concluded that molecular analysis has important implications for epidemiological studies, and RAPD analysis is especially suitable for molecular typing in *T. rubrum*.

Received 8 July 2005

Accepted 30 November 2005

INTRODUCTION

Dermatophyte infections are thought to be most common form of human contagious fungal disease. *Trichophyton rubrum* is the most frequently isolated agent of dermatophytosis worldwide, accounting for approximately 80% of reported cases of onychomycosis (Evans, 1998).

The identification of *T. rubrum* at the strain level might help considerably in the treatment and prophylaxis of dermatophytosis. Molecular typing could be particularly useful in solving epidemiological questions, for example revealing infective routes, common sources of infection and areas of dissemination, as well as determining whether the original isolate is responsible for reinfection or a new strain has been acquired.

Molecular biology techniques, such as PCR, RFLP, randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis and Southern blotting, have led to dramatic progress in distinguishing among species and strains. In the case of *Trichophyton*, RAPD succeeded in distinguishing *T. rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton tonsurans* (Liu *et al.*, 1996), whereas intraspecific variability was only detected by this method in the *T. mentagrophytes* group (Kac *et al.*,

1999). Gräser *et al.* (2000) investigated 96 *T. rubrum* strains from 4 continents by PCR fingerprinting, amplified fragment length polymorphism and random amplified monomorphic DNA markers. These strains display various colony morphologies, yet none of the methods revealed any polymorphism. RFLP was used for molecular genotyping of *T. rubrum* from patients with onychomycosis and a total of 5 types were observed among 66 serial isolates of *T. rubrum* collected from 16 patients. In six patients, more than one type was observed in successive samples. However, the isolation of a different genotype from a nail could not be interpreted as due to infection by a novel strain (Gupta *et al.*, 2001). It is not impossible that individual dermatophytosis patients may be infected by multiple strains, especially patients with a *T. rubrum* nail infection who have a genetic predisposition making them vulnerable to this organism (Faergemann *et al.*, 2005; Zaias *et al.*, 1996). However, Jackson *et al.* (2000) described intraspecific variation in *T. rubrum* strains by the amplification of tandemly repetitive subelements (TRS-1) from the rDNA nontranscribed spacer (NTS) region, 21 TRS-1 PCR types being recognized in 101 clinical isolates. In addition, Kamiya *et al.* (2004) observed 17 TRS-1 PCR types in 252 clinical isolates. Yazdanparast *et al.* (2003) also reported two or more *T. rubrum* strain types from an infectious site when five colonies per culture were selected for typing, the strains being analysed by a PCR-based typing method of varying numbers of repetitive

Abbreviations: NTS, nontranscribed spacer; RAPD, randomly amplified polymorphic DNA.

elements in the NTS of rRNA gene repeats, suggesting that in nail infections multiple strains are involved. In contrast, Rad *et al.* (2005) isolated only a single strain type from patients with tinea pedis and proposed a monotypic aetiology for tinea pedis. Recently, we reported the use of RAPD analysis with six different random primers for *T. rubrum* molecular typing; two of the six primers (numbered 1 and 6) reflected intraspecific polymorphism, and five patterns were observed among the ten strains tested, with each of the two primers (Baeza & Mendes-Giannini, 2004).

The aim of the present work was to study genotypic variability within *T. rubrum* by RAPD analysis with the random primers 1 and 6, as well as by subrepeat element analysis of the NTS of rDNA, using the repetitive subelements TRS-1 and TRS-2, to differentiate epidemiologically related and unrelated isolates.

METHODS

Dermatophyte isolates. The 67 strains of *T. rubrum* and details of their origins are listed in Table 1. All isolates were recovered from humans with clinical lesions. The majority of the patients (68%) were aged between 10 and 39 years; of the patients with tinea pedis, 75% were in this age range, as were 62.9% of the patients with onychomycosis, while 22.3% of all the patients were >50 years old. There were epidemiological associations between the isolates 1 to 13, collected from patients who lived together in a public institution (an orphanage), and seven pairs of isolates were derived from two different sites on single patients. The remaining strains were epidemiologically unrelated.

The clinical samples were isolated in the Clinical Mycology Laboratory of the School of Pharmacy, UNESP, Sao Paulo State University, Araraquara, Brazil, and identified to species level using standard mycological procedures (Summerbell & Kane, 1997).

Isolation of fungal DNA. All isolates were grown on Sabouraud's dextrose agar (Difco) supplemented with chloramphenicol, 0.05% (w/v), and incubated at 25 °C for 10 days. Liquid nitrogen was added to 1–2 g of mycelium in a mortar, and the cells were ground finely with a pestle. Genomic DNA was extracted as described by Del Sal *et al.* (1989) with a few modifications. In brief, the mycelial powder was transferred to an Eppendorf tube and 500 µl lysis buffer (10 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 1% SDS, 100 µg proteinase K ml⁻¹) was added. The mixture was incubated for 1 h at 37 °C, 200 µl 5 mol l⁻¹ NaCl was added and the contents incubated for 10 min at 65 °C. After that, 100 µl 10% (w/v) cetyltrimethylammonium bromide (CTAB; Sigma) was added and incubation continued for a further 20 min at 65 °C. The solution was treated with RNase A (Roche) at a final concentration of 50 µg ml⁻¹ for 1 h at 37 °C, and then extracted with an equal volume of phenol/chloroform/isoamyl alcohol [25:24:1 (v/v)], and centrifuged at 12 000 g for 15 min at 4 °C. This procedure was repeated three times. The DNA was precipitated with two volumes of ice-cold 2-propanol at -20 °C for 20 min, washed twice in 500 µl 70% ethanol, air dried, and resuspended in 100 µl TE buffer (40 mM Tris/HCl pH 8.0, 2 mM EDTA). DNA concentration was estimated by measuring the absorbance at 260 nm.

RAPD. The following decamer oligonucleotides of arbitrary sequence were used as single primers in the RAPD experiments: primer 1, 5'-d[GGTGC GGGAA]-3', and primer 6, 5'-d[CCC GTCAGCA]-3' from the Ready-To-Go RAPD analysis beads kit (Amersham Pharmacia Biotech). Amplification reactions were performed in 25 µl volumes

containing 50 ng template DNA and a lyophilized mixture of reaction buffer (30 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM Tris pH 8.3), 0.4 mM (each) dNTP, 2.5 µg BSA, 25 pmol primer and thermostable polymerases (Ampli Taq DNA polymerase and Stoffel fragment). The samples were overlaid with sterile light mineral oil (Sigma) and amplification was performed in a thermal cycler (Perkin-Elmer; 9700) as follows: an initial denaturation of 5 min at 95 °C was followed by 45 cycles consisting of denaturation for 1 min at 95 °C, annealing for 1 min at 36 °C and extension for 2 min at 72 °C, and then a final extension for 10 min at 72 °C. Amplification products were separated by electrophoresis in 2% agarose gels, visualized by staining with ethidium bromide and photographed under UV.

RAPD profiles were analysed by GelCompar software (version 2.0; Applied Maths). The similarity coefficient (S_{AB}) between band patterns for a given pair of isolates A and B was computed by the formula $S_{AB} = 2E / (2E + a + b)$, where E is the number of common bands in the patterns of A and B, a is the number of bands in pattern A with no correlates in pattern B, and b is the number of bands in pattern B with no correlates in pattern A. Dendrograms based on S_{AB} values were generated by the unweighted pair group method with arithmetic means (UPGMA), implemented in the GelCompar software.

PCR assay for strain characterization. Following the method for strain characterization of *T. rubrum* described by Jackson *et al.* (2000), two primer pairs (flanking sequences from the NTS located between the 18S and 25S regions) were used to amplify two novel tandemly repetitive subelements: TRS-1, containing a 27 bp palindromic sequence, and TRS-2. Primers TrNTSF-2 (5'-ACCGTATTA-AGCTAGCGCTGC-3') and TrNTSR-4 (5'-TGCCACTTCGATTAG-GAGGC-3') were used to amplify TRS-1, and primers TrNTSR-1 (5'-CTCAGTCGAACCGTGAGGC-3') and TrNTSC-1 (5'-CGAGACCACGTGATACATGCG-3') were used to amplify TRS-2.

These amplification reactions were carried out in reaction buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris/HCl pH 9.0, 0.1% Triton X-100) with 2.0 mM magnesium chloride, containing each dNTP at 0.25 mM (dATP, dCTP, dGTP and dTTP), 50 pmol each primer, 1.25 U *Taq* polymerase (BioTools) and approximately 20 ng template DNA. The final reaction volume was made up to 50 µl with pure water. The amplification of TRS-1 was carried out in a thermal cycler with an initial denaturation for 2 min at 94 °C, followed by 30 cycles consisting of denaturation for 0.5 min at 94 °C, annealing for 0.5 min at 58 °C and extension for 3 min at 72 °C, and then a final extension for 10 min at 72 °C. The conditions for amplification of TRS-2 were: initial denaturation for 1 min at 94 °C, followed by 30 cycles consisting of denaturation for 0.5 min at 94 °C, annealing for 0.5 min at 55 °C and extension for 2 min at 72 °C, with a final extension step for 10 min at 72 °C. Amplification products were separated by electrophoresis in 2% agarose gels, visualized by staining with ethidium bromide and photographed in UV light.

RESULTS

RAPD analysis

Two random primers were used to amplify DNA polymorphisms within *T. rubrum*. RAPD profiles were assigned according to major bands. All visible and well-defined bands were identified visually and confirmed by software. Dendrograms were used to determine the relatedness of isolates on the basis of these RAPD bands. The analysis with primer 1 yielded 12 profiles among the 67 isolates. The mean S_{AB} value of the isolates was 0.737 ± 0.173 . Three groups were

Table 1. Human clinical isolates and PCR types for the 67 strains of *T. rubrum* analysed

Patients indicated by p (tinea pedis), o (onychomycosis), cr (tinea cruris) and co (tinea corporis) had two different sites of infection. U, epidemiologically unrelated; R, epidemiologically related.

Strain (patient no.)	Diagnosis	Age	Link	TRS-1 PCR type	TRS-2 PCR type
01	Tinea pedis	13	R	1	I
02	Tinea pedis	23	R	1	I
05	Tinea pedis	44	R	1	II
06	Onychomycosis	22	R	1	I
08	Tinea pedis	20	R	1	I
09	Tinea pedis	9	R	1	I
10	Tinea pedis	16	R	1	I
12 ^P	Tinea pedis	24	R	1	I
12 ^O	Onychomycosis		R	1	I
13	Tinea pedis	26	R	1	I
1017	Tinea pedis	18	U	1	I
1021	Tinea pedis	36	U	1	I
1022	Tinea pedis	16	U	1	I
1023 ^P	Tinea pedis	60	U	1	I
1023 ^O	Onychomycosis		U	1	I
1029	Onychomycosis	24	U	1	II
1030	Tinea pedis	39	U	1	I
1033 ^P	Tinea pedis	9	U	2	I
1033 ^O	Onychomycosis		U	2	I
1035	Tinea pedis	19	U	1	I
1042 ^P	Tinea pedis	30	U	1	I
1042 ^O	Onychomycosis		U	1	I
1044	Tinea pedis	20	U	1	II
2044	Tinea corporis	19	U	1	II
2060	Tinea cruris	35	U	1	I
2088	Onychomycosis	29	U	1	I
2160	Onychomycosis	28	U	1	I
2219	Onychomycosis	29	U	1	II
2230	Onychomycosis	33	U	1	I
2232	Tinea pedis	11	U	2	I
2236	Onychomycosis	58	U	1	II
2242	Tinea pedis	32	U	1	I
2249	Onychomycosis	50	U	2	I
2255	Tinea pedis	20	U	1	I
2264 ^{CR}	Tinea cruris	17	U	1	I
2264 ^{CO}	Tinea corporis		U	1	I
2266	Tinea corporis	28	U	1	I
2273	Tinea pedis	47	U	1	II
2278	Tinea manuum	42	U	1	I
2283	Tinea pedis	48	U	1	I
2284	Onychomycosis	14	U	1	I
2291 ^P	Tinea pedis	30	U	1	I
2291 ^O	Onychomycosis		U	1	I
2292	Tinea pedis	32	U	1	I
2309	Onychomycosis	38	U	1	I
2325	Onychomycosis	10	U	1	I
2379	Tinea pedis	23	U	1	I
2391	Onychomycosis	30	U	1	I
2392	Onychomycosis	41	U	1	II
2393	Onychomycosis	13	U	1	I
2395	Onychomycosis	61	U	1	I

Table 1. cont.

Strain (patient no.)	Diagnosis	Age	Link	TRS-1 PCR type	TRS-2 PCR type
2396	Tinea pedis	51	U	1	I
2412	Onychomycosis	52	U	1	I
2413	Tinea pedis	51	U	3	I
2418	Onychomycosis	45	U	1	I
2419	Onychomycosis	61	U	3	I
2422	Onychomycosis	33	U	1	I
2423	Onychomycosis	44	U	1	II
2424	Onychomycosis	20	U	1	II
2455	Tinea manuum	55	U	3	I
2459	Tinea manuum	74	U	1	I
2460	Tinea pedis	39	U	1	I
2471	Tinea pedis	18	U	1	I
2472	Tinea pedis	11	U	1	I
2479	Tinea pedis	21	U	1	I
2480 ^p	Tinea pedis	12	U	1	I
2480 ⁿ	Onychomycosis		U	1	I

formed, I, II and III, with 60% similarity. The group I isolates had 80% similarity and were distributed into two subgroups, IA and IB, which included 45 (67.2%) of the isolates. The ten isolates strongly related epidemiologically had >95% similarity. Nine of these had similarity coefficients of 100%, being genotypically identical with an S_{AB} value of 1.00, while one, isolated from patient 2, had a value of 0.923. Among the seven patients represented by two samples each that were isolated from different body sites, three patients (1023, 1033 and 1042) had identical profiles at both sites. The strains from patient 2264 were included in two different groups, IB and III, the similarity between the isolates being 60%; strains from patient 2291 were in the subgroups IA and IB, with 80% similarity, and strains from patient 2480 were in two groups, II and III, the similarity value being 60% (Fig. 1).

The 11 RAPD profiles obtained with primer 6 were clustered in three main groups (IA, IB and III), with a similarity coefficient of about 60%. The mean S_{AB} value for the isolates was 0.732 ± 0.184 . The similarity coefficient of group I strains (IA and IB) was 85%. Isolates from the ten epidemiologically related patients were divided into two clusters with high overall homogeneity (92%); eight of these isolates showed S_{AB} values of 1.00, representing identical strains, while the S_{AB} value of isolates 6 and 8 and the others was found to be 0.933. To assess the genetic similarity of the seven patients each represented by two samples isolated from different body sites, S_{AB} values between each pair of isolates obtained with the two primers were computed and listed in Table 2. A total of 6 (3 pairs) of the 14 isolates from these patients showed differences between the paired isolates, and were distributed as follows: strains of patient 2264 were included in 2 different clusters within the same group, IA, the similarity coefficient between these isolates being 90%; strains from patient 2291 were in the groups IB and

III, with 60% similarity; strains from patient 2480 were in 2 subgroups, IA and IB, the similarity value being 80% (Fig. 2).

Strain typing of *T. rubrum* by specific amplification of the TRS-1 and TRS-2 repeat regions

Three TRS-1 types (1, 2 and 3) were observed among the isolates studied (Fig. 3a). One pattern, PCR type 1, was the most common, representing 60 (89.5%) out of 67 strains; it was followed by PCR type 2 (4 out of 67 strains; 6.0%) and PCR type 3 (3 out of 67 strains; 4.5%). Only one PCR type (1) was recognized among all 10 epidemiologically related isolates taken from patients living together in a public institution (an orphanage). The strains isolated from two different body sites on the same patient had identical profiles (Table 1).

In the NTS region containing TRS-2, two PCR types were found (I and II) (Fig. 3b). A single 502 bp product representing two complete copies of TRS-2 (PCR type I) was obtained from the majority of strains tested (57 out of 67 strains; 85%). The smaller fragment, with a length equivalent to one 77 bp TRS-2 repeat unit, was found in 15% of strains, all of them having a single copy of TRS-2 (PCR type II). The distribution of TRS-2 types recovered from the patients who lived together showed that one isolate (patient 5) was PCR type II and the rest were PCR type I. The strains isolated from different sites on the same patient had identical patterns (PCR type I) (Table 1).

Reproducibility and stability of the methods

To evaluate the stability of the methods, each sample of genomic DNA was amplified in duplicate in repeated PCRs at different times. To test for reproducibility, the DNAs

Dice(Opt:1.50 %) (Tol:3.0 %-3.0 %) (H>0.0 % S>0.0 %) [0.0 %-100.0 %]

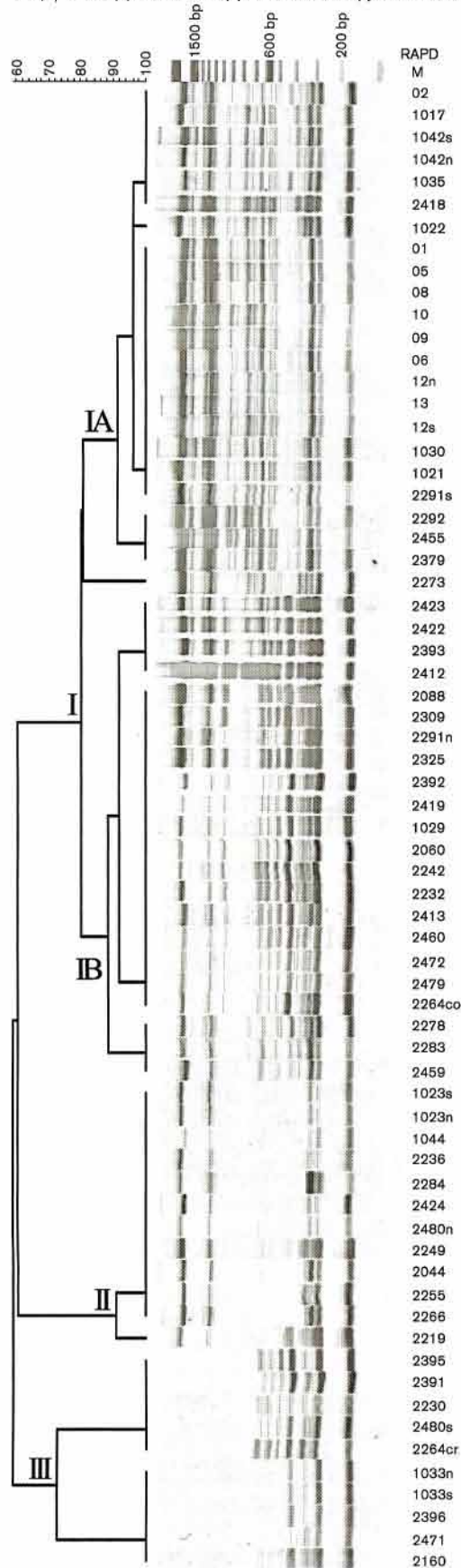


Table 2. Genetic similarity between strains from patients with two samples isolated from different body sites

p, Tinea pedis; o, onychomycosis; cr, tinea cruris; co, tinea corporis.

Strain pair (patient no.)	S_{AB} primer 1	S_{AB} primer 6
12 ^P /12 ^O	1.00	1.00
1023 ^P /1023 ^O	1.00	1.00
1033 ^P /1033 ^O	1.00	1.00
1042 ^P /1042 ^O	1.00	1.00
2264 ^{CR} /2264 ^{CO}	0.750	0.889
2291 ^P /2291 ^O	0.750	0.750
2480 ^P /2480 ^O	0.500	0.545
	Mean S_{AB} =	Mean S_{AB} =
	0.857 ± 0.196	0.883 ± 0.176

from 14 isolates were extracted from 2 independent cultures. All amplifications were done with rigorously standardized concentrations of reagents, the same thermal cycler and the same cycling conditions. RAPD profiles showed identical band patterns (data not shown) and reproducibility was 100 % (Fig. 4). In the typing by specific amplification of the TRS-1 and TRS-2 repeat regions, reagents from different sources were used, *Taq* polymerase (Invitrogen) and MasterMix (Eppendorf), giving identical results (data not shown).

DISCUSSION

Molecular typing of dermatophytes could provide new insights into the epidemiology, population biology and pathogenicity of these fungi. Techniques for the detection of intra-specific variation have long been sought, in order to allow population genetics studies of *Trichophyton* species, especially of *T. rubrum*, the predominant species in most isolates.

However, anthropophilic (human-specific) dermatophyte species are products of recent evolutionary adaptive radiation events (Harmsen *et al.*, 1995; Summerbell *et al.*, 1997) and also have a restricted ecological niche, resulting in species with unusually high degrees of genetic uniformity (Summerbell *et al.*, 1999). Studies by Gräser *et al.* (2000) have further highlighted the uniformity in the *T. rubrum* complex by comparing the morphological and physiological features with the results of sequencing of the internal transcribed spacer (ITS) region of the ribosomal operon, PCR fingerprinting and amplified fragment length polymorphism analysis.

In order to improve epidemiological monitoring, it is important to follow standardized methods. Here we describe the application of RAPD analysis with two random primers,

Fig. 1. Dendrogram of the RAPD patterns obtained from *T. rubrum* isolates with random primer 1. M, molecular mass marker (Gibco; 100 bp).

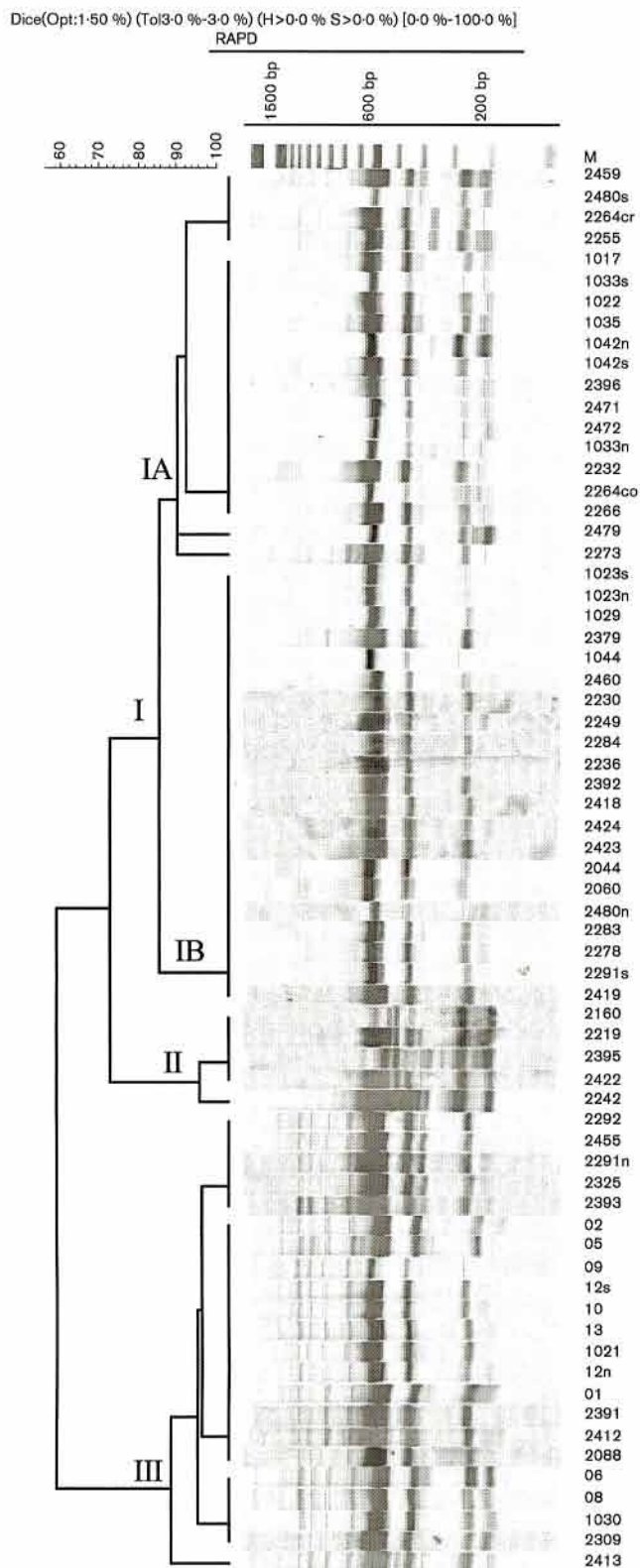


Fig. 2. Dendrogram of the RAPD patterns obtained from *T. rubrum* isolates with random primer 6. M, molecular mass marker (Gibco; 100 bp).

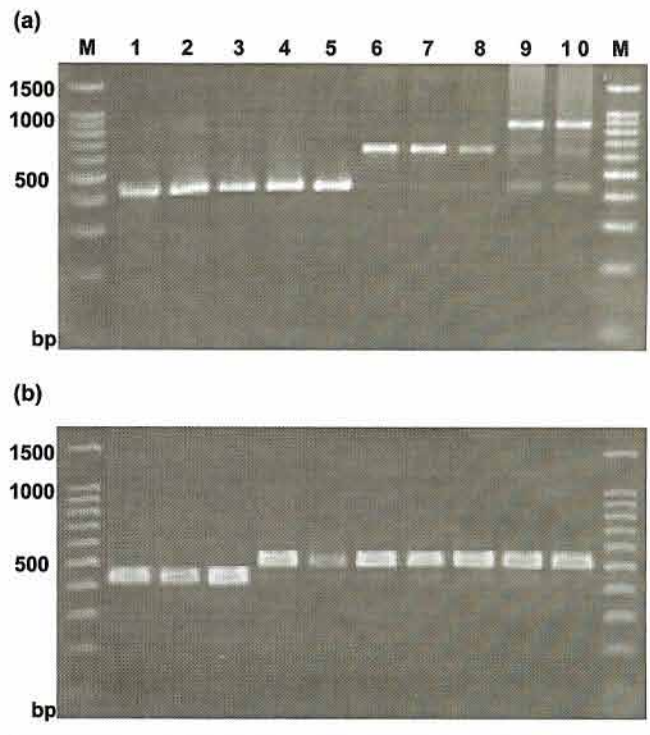


Fig. 3. (a) Amplification of the TRS-1 subrepeat element produced 3 PCR types from 67 clinical isolates of *T. rubrum*. Lanes: M, molecular mass marker (Promega; 100 bp); 1, strain 02; 2, strain 1029; 3, strain 2044; 4, strain 2060; 5, strain 2291; 6, strain 1033; 7, strain 2232; 8, strain 2249; 9, strain 2413; 10, strain 2455. (b) Amplification of the TRS-2 subrepeat element produced 2 PCR types from 67 clinical isolates of *T. rubrum*. Lanes: M, molecular mass marker (Promega; 100 bp); 1, strain 1044; 2, strain 2044; 3, strain 2236; 4, strain 02; 5, strain 1021; 6, strain 2230; 7, strain 2255; 8, strain 2292; 9, strain 2412; 10, strain 2418.

as well as subrepeat element analysis of the NTS region of rDNA. RAPD analysis has demonstrated enormous success in fungal infection studies (Soll, 2000). However, the main problem is the reproducibility, not only among laboratories, but also within a laboratory over time. Artfactual variation can occur as a result of small differences in the primer:template concentration ratio, the temperatures during amplification and the concentration of magnesium in the reaction mixture (Ellsworth *et al.*, 1993). In contrast to most of the results in the literature, in this study we showed identical band patterns and a reproducibility of 100%. These results were obtained from a lyophilized mixture, with standardized concentrations of the reagents and the same thermal cyler for all the RAPD reactions.

The intraspecific polymorphism achieved in our study contrasts with what has been demonstrated in most of the available literature on the use of RAPD. Zhong *et al.* (1997) examined 30 isolates of *T. rubrum* by RAPD analysis and found that 22 strains were indistinguishable and 8 showed very minor differences, while Liu *et al.* (1996), using

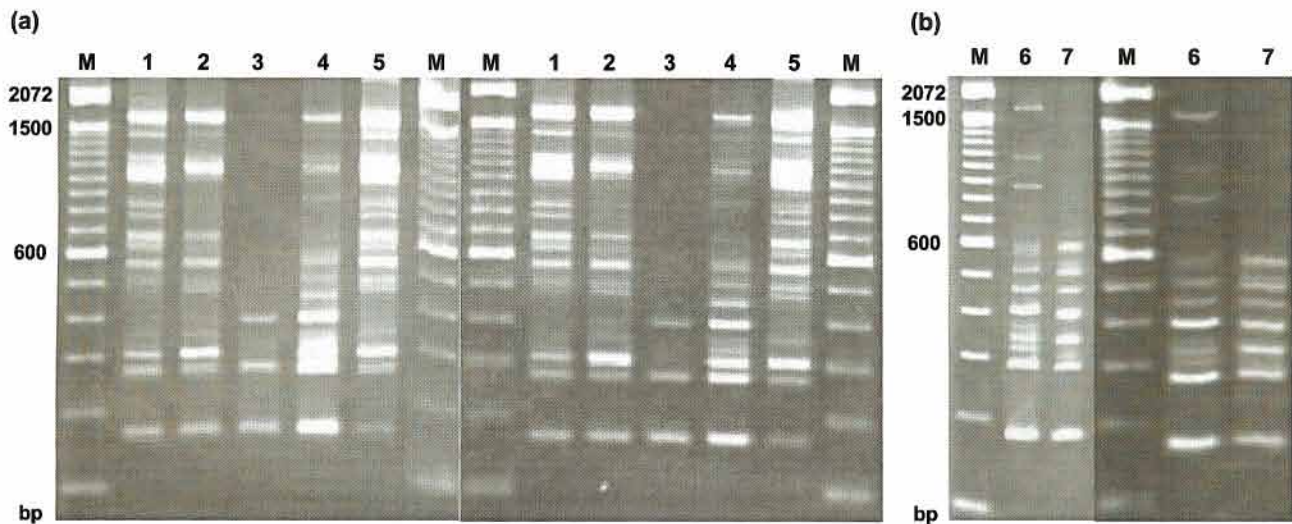


Fig. 4. (a) Comparison of RAPD patterns obtained using primer 1 from clinical isolates of *T. rubrum* amplified in repeated PCRs at different times. Lanes: M, molecular mass marker (Gibco; 100 bp); 1, strain 2292; 2, strain 2379; 3, strain 2396; 4, strain 2413; 5, strain 2455. (b) Comparison of RAPD patterns obtained using primer 1 from clinical isolates of *T. rubrum* amplified from genomic DNA extracted from two independent cultures. Lanes: M, molecular mass marker (Gibco; 100 bp); 6, strain 2060; 7, strain 2264^{CO}.

arbitrarily primed PCR, reported no differences between 8 strains of *T. rubrum*. The sequences employed in our study probably hybridize with less-conserved regions of the genomic DNA and generate a larger degree of polymorphism.

Epidemiologically related *T. rubrum* strains showed profiles that differed only in one band. Dendrogram analysis, irrespective of the primer, generated similarity coefficients > 90 %, demonstrating that these isolates are highly related. These isolates came from an orphanage, where the use of common bathrooms, towels and shoes and recreational area may have provided ideal conditions for the proliferation of a single or small number of particularly anthropophilic or pathogenic *T. rubrum* clones. The S_{AB} value for these isolates was > 0.90. According to Chong *et al.* (2003), an S_{AB} value of 0.80–0.99 represents highly similar (but not identical) strains, suggesting that these infections were caused by a single strain that underwent microevolution.

Interestingly, of the seven patients that yielded two samples from separate infected sites, three showed different profiles at the two sites, with each primer. These lesions may be due to infection by two different strains. Yazdanparast *et al.* (2003) detected two or more *T. rubrum* strains involved in nail infection by analysis of the variation in numbers of repetitive elements in the NTS region of the rDNA. By contrast, no variation was observed in RAPD analysis of pairs of *T. mentagrophytes* strains from foot skin and nail lesions (Kac *et al.*, 1999).

T. rubrum has subrepeat elements in the rDNA and it has been demonstrated that variations in the copy number of these elements are useful for strain identification (Jackson *et al.*, 2000). In our study, three TRS-1 PCR types (1, 2 and

3) were found and 60 strains (89.5 %) were classified as PCR type 1, a higher proportion than that (75 %) reported for the most common type seen by Jackson *et al.* (2000), and the total number of types was considerably lower than in their work (21 PCR patterns, of which only 6 types were straightforward). One explanation for this pattern assumes that multiplication of the number of copies of TRS-1 by unequal crossover is a rare event (Jackson *et al.*, 2000). The other class (TRS-2) was less variable, with just two different types, and 85 % of all strains examined showed two complete copies of TRS-2 in the amplification product.

One reason for this limited range of common PCR types may relate to the presumed asexual nature of *T. rubrum*, as genomic diversity at the rDNA locus may be restricted by the absence of sexual recombination. Also, the strains used in this study were isolated from a limited area in Brazil and may have resulted from the rapid proliferation of a limited number of comparatively undifferentiated clones, reflected in the restricted number of prevalent PCR types reported here. This distribution pattern may also involve strain types that may possess enhanced infectivity, invasiveness or other virulence characteristics.

Although intraspecies strain variability was observed by analysis of the NTS of rDNA, this typing system may not be very useful in relapse and reinfection studies, since it has a low discrimination index. On the other hand, our results from RAPD analysis demonstrate the substantial molecular diversity present in the genome of *T. rubrum*, and interstrain variations may subsequently be identified. This technique provides a valuable tool for strain typing and epidemiology of disease caused by these organisms.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), CNPq, PADCF-FCF-UNESP and FUNDUNESP, who provided the financial support for this project.

REFERENCES

- Baeza, L. C. & Mendes-Giannini, M. J. S. (2004). Strain differentiation of *Trichophyton rubrum* by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **46**, 339–341.
- Chong, P. P., Lee, Y. L., Tan, B. C. & Ng, K. P. (2003). Genetic relatedness of *Candida* strains isolated from women with vaginal candidiasis in Malaysia. *J Med Microbiol* **52**, 657–666.
- Del Sal, G., Manfioletti, G. & Schneider, C. (1989). The CTAB-DNA precipitation method: a common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. *Biotechniques* **7**, 514–519.
- Ellsworth, D. L., Rittenhouse, K. D. & Honeycutt, R. L. (1993). Artfactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *Biotechniques* **14**, 214–217.
- Evans, E. G. (1998). Causative pathogens in onychomycosis and the possibility of treatment resistance: a review. *J Am Acad Dermatol* **38**, S32–S56.
- Faergemann, J., Correia, O., Nowicki, R. & Ro, B.-I. (2005). Genetic predisposition – understanding underlying mechanisms of onychomycosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **19** (suppl. 1), 17–19.
- Gräser, Y., Kuijpers, A. F. A., Presber, W. & Hoog, G. S. (2000). Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* complex. *J Clin Microbiol* **38**, 3329–3336.
- Gupta, A. K., Kohli, Y. & Summerbell, R. C. (2001). Variation in restriction fragment length polymorphisms among serial isolates from patients with *Trichophyton rubrum* infection. *J Clin Microbiol* **39**, 3260–3266.
- Harmsen, D., Schwinn, A., Weig, M., Brocker, E. B. & Heesemann, J. (1995). Phylogeny and dating of some pathogenic keratinophilic fungi using small subunit ribosomal RNA. *J Med Vet Mycol* **33**, 299–303.
- Jackson, C. J., Barton, R. C., Kelly, S. L. & Evans, E. G. V. (2000). Strain identification of *Trichophyton rubrum* by specific amplification of subrepeat elements in the ribosomal DNA nontranscribed spacer. *J Clin Microbiol* **38**, 4527–4534.
- Kac, G., Bougnoux, M. E., Feuilhade De Chauvin, M., Sené, S. & Derouin, F. (1999). Genetic diversity among *Trichophyton mentagrophytes* isolates using random amplified polymorphic DNA method. *Br J Dermatol* **140**, 839–844.
- Kamiya, A., Kikuchi, A., Tomita, Y. & Kanbe, T. (2004). PCR and PCR-RFLP techniques targeting the DNA topoisomerase II gene for rapid clinical diagnosis of the etiologic agent of dermatophytosis. *J Dermatol Sci* **34**, 35–38.
- Liu, D., Coloe, S., Pedersen, J. & Baird, R. (1996). Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction to differentiate *Trichophyton* dermatophytes. *FEMS Microbiol Lett* **136**, 147–150.
- Rad, M. M., Jackson, C., Barton, R. C. & Evans, E. G. V. (2005). Single strains of *Trichophyton rubrum* in cases of tinea pedis. *J Med Microbiol* **54**, 725–726.
- Soll, D. R. (2000). The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *J Clin Microbiol* **13**, 332–370.
- Summerbell, R. C. & Kane, J. (1997). Physiological and other special tests for identifying dermatophytes. In *Laboratory Handbook of Dermatophytes*, pp. 45–79. Edited by J. Kane & R. Summerbell. Belmont, CA: Star Publishing.
- Summerbell, R. C., Li, A. & Haugland, R. (1997). What constitutes a functional species in the asexual dermatophytes? *Microbiol Cult Collect* **13**, 29–37.
- Summerbell, R. C., Haugland, R. A., Li, A. & Gupta, A. K. (1999). rRNA gene internal transcribed spacer 1 and 2 sequences of asexual, anthropophilic dermatophytes related to *Trichophyton rubrum*. *J Clin Microbiol* **37**, 4005–4011.
- Yazdanparast, Y., Jackson, C. J., Barton, R. C. & Evans, E. G. V. (2003). Molecular strain typing of *Trichophyton rubrum* indicates multiple strain involvement in onychomycosis. *Br J Dermatol* **148**, 51–54.
- Zaias, N., Tosti, A., Rebell, G. & 8 other authors (1996). Autosomal dominant pattern of distal subungual onychomycosis caused by *Trichophyton rubrum*. *J Am Acad Dermatol* **34**, 302–304.
- Zhong, Z., Li, R., Li, D. & Wang, D. (1997). Typing of common dermatophytes by random amplification of polymorphic DNA. *Jpn J Med Mycol* **38**, 239–246.