LETÍCIA BONATO SOUZA SANTOS

Análise filogenética da espécie Trichosporon asahii por sequenciamento multilocus

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Dermatologia Orientador: Dr. João Nobrega de Almeida Júnior

São Paulo 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

```
Santos, Letícia Bonato Souza
Análise filogenética da espécie Trichosporon
asahii por sequenciamento multilocus / Letícia
Bonato Souza Santos. -- São Paulo, 2019.
Dissertação (mestrado) --Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.
Orientadora: João Nobrega de Almeida Júnior.
Descritores: 1.Trichosporon 2.Tipagem molecular
3.Tipagem de sequências multilocus 4.Filogenia
5.Genes 6.Genótipo
USP/FM/DBD-146/19
```

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico este trabalho ao meu marido, Leandro, com quem eu compartilho tudo nessa vida, desde os meus pequenos sonhos até as minhas grandes conquistas.

AGRADECIMENTOS

Muitas mãos se empenharam na realização deste trabalho, de maneira direta ou indireta, por isso existem várias pessoas a quem devo os meus sinceros agradecimentos. Mas eu não poderia deixar de agradecer primeiramente à Deus, pois foi nas mãos Dele que eu entreguei este projeto de mestrado. Hoje eu entendo que Ele, diante dos mais variados acontecimentos, colocou em meu caminho as pessoas por quem eu sinto gratidão e assim permitiu a conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, Marco e Silvia, meus exemplos de união, fé e perseverança. Com eles eu aprendi que nenhuma tempestade (por pior que ela pareça) dura para sempre. Obrigada por sempre batalharem por nós, por priorizarem os meus estudos e por me proporcionarem conforto e paz quando eu mais preciso. O meu amor por vocês é incondicional.

Ao Leandro, meu marido, meu amigo, meu equilíbrio. Obrigada por acreditar em mim, muito mais do que eu mesma acredito, isso me encoraja, me impulsiona e me desafia a ser alguém melhor todos os dias.

À Dra. Gilda Maria Barbaro Del Negro, por quem eu sinto imenso respeito e gratidão. Tamanho comprometimento, mesmo com aqueles que não são oficialmente seus alunos, é raro. Sou eternamente grata por todos os ensinamentos e por sua amizade ao longo dos últimos anos. Obrigada por fazer parte, tão ativamente, deste trabalho e da minha trajetória profissional.

Ao meu orientador, Dr. João Nobrega de Almeida Junior, por todos os ensinamentos durante a execução deste trabalho e pelo empenho e dedicação para concluí-lo.

Aos chefes do LIM53, Prof. Dr. Gil Benard e Prof. Dr. Carlos P. Taborda, por terem permitido e apoiado a execução deste trabalho.

À Lumena, agradeço pelo apoio e dedicação com os meus experimentos.

Aos alunos e funcionários do LIM53, que ao longo desses nove anos, seja através de discussões de trabalho ou conversas descontraídas, tornaram os dias no laboratório tão agradáveis.

Aos professores da UNIFESP, Dr. Arnaldo Lopes Colombo e Dr. Anderson Messias Rodrigues, pelo auxílio com as cepas e análises filogenéticas.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS
LISTA DE FIGURAS
LISTA DE TABELAS
RESUMO
SUMMARY
1 INTRODUCÃO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Perspectiva histórica do gênero Trichosporon e a espécie T. asahii	2
1.2 Epidemiologia das infecções invasivas por <i>T. asahii</i>	4
1.3 Genótipos de <i>T. asahii</i> e sua distribuição mundial	5
1.4 Trichosporon asahii e a suscetibilidade aos antifúngicos 1.4.1 Suscetibilidade aos antifúngicos e os genótipos de T. asahii	8 9
1.5 Fatores de virulência e os genótipos de T. asahii	10
1.6 Tipagem genotípica por sequenciamento multilocus	11
2 JUSTIFICATIVA	13
3 OBJETIVOS	_ 14
4 METODOLOGIA	_ 15
4.1 Centros de Pesquisa envolvidos e aprovação no comitê de ética	15
4.2 Seleção dos isolados	15
4.3 Viabilidade e verificação de pureza dos isolados	16
4.4 Extração do DNA genômico 4.4.1 Quantificação e análise da pureza do DNA dos isolados de <i>T. asahii</i>	17 17
4.5 Seleção dos housekeeping genes e delineamento dos primers	18
 4.6 Padronização das condições de amplificação utilizando os <i>primers</i> delineados 4.6.1 Eletroforese em gel de agarose para análise dos produtos das amplificações 4.6.2 Purificação dos amplificados obtidos nas reações de PCR 	19 19 20
4.7 Sequenciamento de DNA, edição e análise das sequências	20
4.8 Avaliação e seleção final dos <i>loci</i>	20
4.9 Análise filogenética	21
5 RESULTADOS	_ 22
 5.1 Seleção dos <i>loci</i>, delineamento e análise dos <i>primers</i> 5.1.1 Padronização das reações de PCRs e condições de amplificação para os <i>loci</i> selecionados 	22 24
5.2 Depósito das sequências de DNA no banco de dados GenBank	_25
5.3 Análise filogenética	_26
6 DISCUSSÃO	_ 31

7 CONCLUSÕES	36
8 ANEXOS	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-ND	2-nitropropane dioxygenase
AIC	Akaike information criterion
ATP	Copper-exporting ATPase
BIC	Bayesian information criterion
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BLASTn	Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool
CAC1	Acetyl-CoA carboxylase
САМК	Calmodulin-dependent protein kinase
CAP10	Capsular associated protein
CAP59	Capsular associated protein 59
CBS-KNAW	Cepas de referência da coleção Westerndijk Fungal Biodiversity Institute
CDC19	DNA replication licensing factor cdc19
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CinY	CinY protein
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
СҮТ В	Cytochrome B
CYT-PRO	Cytoplasm protein
D-LD	D-lactaldehyde dehydrogenase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
DO	Densidade Óptica
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

GLU OXI	Glucose oxidase
GPD1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GXM	Glucuronoxilomanana
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Univesdidade de São Paulo
Hd	Diversidade Haplotípica
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IFI	Infecções fúngicas invasivas
IGS	Intergenic Spacer
IMT	Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
ITS	Internally Transcribed Spacer
LAC1	Laccase
LEMI	Laboratório Especial de Micologia
LIM	Laboratório de Investigação Médica
MALDI-TOF MS	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry
MAL-SYN	Malate synthase
MLSA	Multilocus sequence analysis
MLST	Multilocus Sequence Typing
MP88	88kDa immunoreactive mannoprotein
MPD1	Protein disulfide isomerase
N-AATSP	N-amino acid transport system protein
NADH	Glutamate synthase
NADPH	Methylenetetrahydrofolate reductase
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDI	Protein disulfide isomerase

PDMF	PDM phosphatase
РЕРТ	Peptidase
РНСР	Phosphate carrier protein
PLB1	Phospholipase
PYR-DEC	Pyruvate decarboxylase
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
rDNA	DNA ribossomal
RPB2	DNA-directed RNA polymerase II subunit
RPN1	Proteasome regulatory particle subunit
SOD1	Cu, Zn superoxide dismutase
ST	Sequence Type
Taq	Thermus aquaticus
TEF1	Translation elongation factor
TOP1	Topoisomerase 1
TOR1	Phosphatidylinositol 3-kinase
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TSR1	Ribosome biogenesis-related protein
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
UPGMA	Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages
URA3	Dihydroorotate dehydrogenase
URA5	Orotidine monophosphate pyrophosphorylase
USP	Universidade de São Paulo
YEPD	Yeast Extract-Peptone-Dextrose
β-TUB	β1-tubulin

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Isolados de Trichosporon asahii analisados no estudo	6
Tabela 2 – Informações sobre os <i>loci</i> que não preencheram os critérios de seleção e fora excluídos do estudo	m 3
Tabela 3 – <i>Primers</i> selecionados para a análise filogenética	4
Tabela 4 – Número de acesso GenBank das sequencias de IGS1 e dos <i>housekeepir</i> genes	g 5
Tabela 5 - Dados das análises filogenéticas e haplotípicas, por locus	0

RESUMO

Santos LBS. Análise filogenética da espécie *Trichosporon asahii* por sequenciamento multilocus [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Nas últimas décadas observou-se um número crescente de relatos de infecções invasivas por Trichosporon em ambientes hospitalares, devido ao aumento da população suscetível e a melhoria dos métodos diagnósticos. Leveduras do gênero Trichosporon, depois de Candida, são as mais relacionadas à infecção fúngica invasiva em pacientes hematológicos, sendo Trichosporon asahii responsável por 90% dos casos. A identificação de espécies de Trichosporon é realizada através do sequenciamento da região IGS1 do DNA ribossomal, técnica considerada padrão-ouro. Através do estudo dos polimorfismos da região IGS1 do DNA ribossomal, diversos genótipos de T. asahii têm sido descritos, entretanto sem relação com a distribuição geográfica, perfil de suscetibilidade aos antifúngicos ou patogenicidade. O presente estudo teve como objetivo padronizar um método de análise por sequenciamento multilocus para a espécie T. asahii, definindo novos genes (loci) para melhor descrever a filogenia da espécie. Foram analisadas 21 cepas de T. asahii de diferentes origens (Brasil, Europa, Ásia) e genótipos (1,3,4,5,6,7). As sequências de genes estruturais (housekeeping genes) dos genomas de T. asahii (CBS2479 e CBS8904) disponíveis no GenBank foram alinhadas e analisadas *in silico* para o delineamento e avaliação dos novos *primers*. Após as reações de PCR e análise das sequências de DNA, quatro novos loci foram selecionados para a análise filogenética multilocus: phosphate carrier protein, topoisomerase 1 (TOP1), beta-1tubulin, copper-exporting ATPase. As árvores filogenéticas demonstraram dois clados bem distintos, com altos valores de bootstraps. Além disso, os genótipos 1 e 3 foram alocados em clados diferentes. Nossos resultados sugerem uma reclassificação genética para a espécie T. asahii. Novos estudos, incluindo um maior número de cepas e outros marcadores genéticos, são necessários para melhor abordar a filogenia atual de T. asahii.

Descritores: *Trichosporon*, tipagem molecular, tipagem de sequências multilocus, filogenia, genes, genótipo

SUMMARY

Santos LBS. Phylogeny of the species *Trichosporon asahii* by multilocus sequence analysis [Dissertation]. São Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo; 2019.

In the last decades there has been a significant increase of the reported cases of invasive fungal infections by Trichosporon in hospital settings, related to the increase of the susceptible population and to the improvement of diagnostic methods. Trichosporon are the most frequent yeast related to invasive fungal infection in hematological patients after Candida, with Trichosporon asahii accounting for 90% of the cases. The gold standard method for Trichosporon species identification is the sequence analysis of the intergenic spacer region 1 (IGS1) from the ribosomal DNA. Based on the polymorphisms of the IGS region of ribosomal DNA, several T. asahii genotypes have been described, without relation with geographical distribution, antifungal susceptibility profile or pathogenicity. The objective of the study was to evaluate a multilocus sequencing method for the T. asahii species, defining new loci to better describe the phylogeny of the species. Twentyone strains of T. asahii from different origins (Brazil, Europe, Asia) and genotypes (1,3,4,5,6,7) were analyzed. Housekeeping genes from T. asahii genomes (CBS2479 and CBS8904) available in *GenBank* were aligned and in silico analyses were carried out to design and evaluate the new primers. After PCR reactions and DNA sequence analysis, four new loci were selected for the multilocus plylogenetic analysis along with the IGS1 region from the rDNA: topoisomerase 1 (TOP1), phosphate carrier protein, beta-1tubulin, copper-exporting ATPase. Phylogenetic trees revealed two well-distinct clades, with high bootstraps values. Moreover, IGS genotypes 1 and 3 strains were split into the different clades. Our results suggest a different genetic background for the species T. asahii. Further studies including more T. asahii strains and other genetic markers are necessary to better address the current phylogeny of T. asahii.

Descriptors: *Trichosporon*, molecular typing, multilocus sequence typing, phylogeny, genes, genotype

1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas invasivas vem crescendo nas últimas décadas como importante causa de morbidade e mortalidade devido a diversos fatores, como a emergência de novas doenças, aumento na utilização de tratamentos imunossupressores, desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas e terapêuticas, aumento da sobrevida de pacientes altamente suscetíveis e reconhecimento de novos fungos como potenciais patógenos (1–3).

Trichosporon spp. são basidiomicetos amplamente distribuídos na natureza, e constituem a microbiota permanente do trato gastrointestinal e a microbiota transitória da pele, mucosas e trato respiratório superior em humanos, sendo geralmente associados a infecções superficiais benignas denominadas *Piedra Branca*. Entretanto, em situações de desequilíbrio do hospedeiro, essas leveduras podem evoluir de comensais para agentes de infecções sistêmicas. Infecções disseminadas pelo gênero *Trichosporon* estão relacionadas a pacientes com doenças hematológicas malignas, e podem representar a segunda causa mais comum de infecções fúngicas nesses pacientes (4–8).

Recentemente, foram conduzidos estudos que descreveram mais de 50 novas espécies de *Trichosporon* utilizando técnicas de biologia molecular; entre essas espécies *Trichosporon asahii* é responsável por até 90% das infecções, podendo apresentar grande variedade de manifestações clínicas, desde acometimento cutâneo superficial até quadros sépticos graves em pacientes imunocomprometidos. Além de ser a espécie mais frequente, estudos sugerem que isolados de *T. asahii* são mais virulentos que outras espécies de *Trichosporon* (9–11).

Utilizando ferramentas moleculares, foram observados polimorfismos na região IGS1 entre os isolados de *T. asahii*, e foram descritos diversos genótipos para essa espécie, entretanto, até o momento, os estudos têm demonstrado pouca relação com a distribuição geográfica, perfil de suscetibilidade aos antifúngicos ou patogenicidade (10,12).

1.1 Perspectiva histórica do gênero Trichosporon e a espécie T. asahii

O gênero *Trichosporon* é composto por fungos, predominantemente leveduriformes, que pertencem ao Filo *Basidiomycota*, Subfilo *Agaricomycotina*, Classe *Tremellomycetes*, Ordem *Tremellales*, Família *Trichosporonaceae*. São leveduras artrosporadas amplamente distribuídas na natureza, e podem ser encontradas em diversos animais, substratos como água e solo de diferentes fontes, materiais em decomposição, regiões hipersalinas e excreta de pombos. Leveduras do gênero *Trichosporon* pertencem à microbiota humana permanente do trato gastrointestinal e também da microbiota transitória da pele, mucosa orofaríngea e trato respiratório superior (13–17).

A denominação *Trichosporon* foi utilizada por Beigel, que descreveu o agente de uma infecção benigna do cabelo em 1865 (18). Em 1890, o dermatologista Gustav Behend utilizou a denominação *Trichosporon ovoides* para o agente causador de nódulos brancos na barba de um paciente (18).

Diversos estudos descreveram outras espécies de *Trichosporon*, porém, em 1902, Vuillemin definiu que todas as espécies propostas eram variações de uma mesma espécie, que foi denominada *Trichosporon beigelii* (9).

Ao longo dos anos, o gênero *Trichosporon* correspondeu a uma coleção de diferentes fungos filogeneticamente distintos, mas *T. beigelli* era a única espécie reconhecida. A classificação de *Trichosporon* foi, de certa forma, negligenciada por décadas, e somente foi revisada e recebeu maior atenção dos taxonomistas em 1991 (19). Em 1994, Guéro e colaboradores, através de técnicas de biologia molecular, descreveram

uma nova perspectiva ao táxon, pois as características macromorfológicas, micromorfológicas e fisiológicas apresentavam resultados subjetivos e de pouca reprodutibilidade, devido à heterogeneidade dos isolados (9,20).

Na fase sexuada do ciclo biológico, fungos do gênero *Trichosporon* caracterizamse pela formação de blastoconídios, artroconídios, hifas hialinas septadas e pseudohifas. Algumas espécies possuem outras estruturas morfológicas, úteis na identificação fenotípica, como apressórios, sarcinas e células fusiformes gigantes (12,21).

Trichosporon spp. apresentam grande variabilidade fenotípica inter e intraespecífica quanto à morfologia de suas colônias, que podem apresentar aspecto radial simétrico, de cor branca a creme, de cremoso a seco, e de liso a cerebriforme, podendo ou não apresentar superfície farinácea. Quanto à aplicação de métodos fisiológicos, todas as espécies assimilam carboidratos e fontes de carbono, entretanto não são leveduras fermentadoras. Uma importante característica do gênero *Trichosporon*, assim como outros basidiomicetos, é a capacidade de degradar ureia (12,21–23).

Métodos fenotípicos foram utilizados por muitos anos para identificação desse gênero, entretanto a utilização destes métodos pode apresentar divergências na diferenciação de algumas espécies. Diversos autores sugerem que a identificação baseada em sequencias ribossomais associadas ao sequenciamento de regiões intergênicas são as metodologias mais indicadas para a identificação correta das espécies de *Trichosporon*. Nesse contexto, genes ribossomais representam alvos de regiões de conservação evolutiva consistentes, cujas regiões mais utilizadas são ITS (*Internal Transcriber Spaces*) e IGS (*Intergenic Spaces*) (18,24–26). Atualmente, também estão disponíveis metodologias baseadas em análise proteômica como ferramentas para identificação fúngica, como o MALDI-TOF (27,27,28). Estudos recentes de taxonomia do gênero *Trichosporon*, utilizando técnicas de biologia molecular, abandonaram antigas denominações como *Trichosporon beigelii*, e mais de 50 novas espécies foram descritas, sendo algumas espécies de interesse médico, como *T. asahii, T. inkin, T. asteroides, T. japonicum, T. coremiiforme, T. dohaense, T. lactis, T. faecale* (15,16,29).

1.2 Epidemiologia das infecções invasivas por T. asahii

Nas últimas décadas, a incidência de infecções fúngicas invasivas (IFI) apresentou aumento significativo devido a diversos fatores, como o desenvolvimento de técnicas terapêuticas invasivas, utilização de antibióticos de amplo espectro, número crescente de transplantes hematológicos e de órgãos sólidos, e surgimento de novos e potentes imunossupressores (16,30,31).

Dentre os fungos leveduriformes, *Candida* spp. é o gênero responsável pela maioria das IFI. No entanto, IFI por *Trichosporon* spp. começaram a ganhar evidência, principalmente em pacientes com neutropenia persistente, nos quais a mortalidade pode ser próxima de 100%. O primeiro caso de infecção invasiva por *Trichosporon* foi descrito em 1969, em paciente do sexo feminino de 37 anos, com adenocarcinoma pulmonar e metástases cerebrais secundariamente infectadas; em 2005, Girmenia *et al.* compilaram 287 casos de IFI em pacientes imunodeprimidos publicados até aquela data (18,31,32).

Como citado, *T. asahii* é a espécie mais frequente em amostras clínicas de pacientes de diferentes regiões do mundo. Ruan *et al.*, ao estudarem os casos de tricosporonemia em Taiwan, observaram que a maioria das infecções (76%) foram causadas por essa espécie. Chagas-Neto *et al.* estudaram 22 casos de tricosporonemia entre 1995 e 2004, em hospitais da cidade de São Paulo, e o agente etiológico mais frequente foi *T. asahii*, correspondendo a 68% dos casos (17,24).

Surtos de fungemia nosocomial por *T. asahii* também foram descritos, em alguns casos com mortalidade superior a 75% (33,34). Além de fazer parte da microbiota humana, a espécie foi isolada em fômites hospitalares, o que reforça a hipótese de transmissão horizontal do patógeno (34). Em estudo de revisão sistemática sobre as infecções invasivas por *Trichosporon*, entre 1994 e 2015, J.N. Almeida Júnior e C. Hennequin encontraram pior prognóstico para as infecções causadas por *T. asahii* (47% com desfecho desfavorável), em comparação àquelas relacionadas a outras espécies (31% com desfecho desfavorável, p=0.05) (11).

1.3 Genótipos de T. asahii e sua distribuição mundial

A identificação de espécies de *Trichosporon* pode ser realizada através do sequenciamento de regiões variáveis do DNA ribossomal, como *internal transcriber spacer* (ITS1) entre as regiões 18S e 5.8S, D1/D2 da região 26S, e *intergenic spacer* (IGS1) entre as regiões 28S e 5S, representadas na Figura 1.

Estudos demonstram que o sequenciamento da região IGS1 apresenta melhor potencial discriminativo para as espécies de *Trichosporon*, já que os *amplicons* possuem diferentes tamanhos (600pb a 1000pb), e o número de variações por pares de base foi maior em tal região (35,36).



Figura 1 - Regiões variáveis do DNA ribossomal para identificação de *Trichosporon: internal transcriber spacer* (ITS) e *intergenic spacer* (IGS)

Em 2002, Sugita *et al.* sequenciaram a região IGS1 de isolados obtidos no Japão e Estados Unidos, e observaram polimorfismos entre os isolados de *T. asahii*. Neste estudo foram descritos cinco genótipos diferentes, sendo a maioria dos isolados do Japão (87%) classificados como genótipos 1 ou 3, e a maioria dos isolados dos Estados Unidos classificados como genótipos 3 ou 5 (10).

Em 2004, Sugita *et. al.* reportaram novos casos de fungemia e descreveram dois novos genótipos de *T. asahii*, os genótipos 6 e 7 (12). Assim, novos genótipos têm sido descritos ao longo dos anos, em diferentes países dos continentes europeu, asiático e americano (17,25,37–39).

Rodriguez-Tudela *et al.* sequenciaram a região IGS1 de 18 isolados de pacientes da Argentina, Brasil e Espanha. Neste estudo foram encontrados seis diferentes genótipos. Nos isolados do Brasil e Argentina, os genótipos 1 e 6 foram predominantes, enquanto nos isolados da Espanha foram encontrados todos os genótipos, com exceção do genótipo 2 (40).

Chagas-Neto e colaboradores analisaram a distribuição dos genótipos de *T. asahii* em pacientes com infecção hematogênica em hospitais brasileiros, e observaram o genótipo 1 em 86,7% dos isolados (17).

Em 2010, Kalkanci *et al.* utilizaram o sequenciamento da região IGS1 para descrever a distribuição geográfica dos genótipos de *T. asahii* na Turquia, onde o genótipo 1 foi predominante (79,3%), seguido pelos genótipos 5 (8%), 3 (6,9%), 6 (3,4%) e 4 (1,1%), e o genótipo 9 foi descrito pela primeira vez (37).

Colombo *et al.* demonstraram, em 2011, a distribuição mundial dos genótipos *de T. asahii*. Não havia grande diversidade de genótipos, com clara predominância do genótipo 1 (Figura 2) (18).



Figura 2 - Distribuição dos genótipos de *T. asahii*, baseados no sequenciamento da região IGS de isolados clínicos provenientes dos Estados Unidos, Espanha, Brasil, Tailândia, Japão e Turquia, segundo Colombo et. al., 2011 (18)

Em 2014 foi realizado o primeiro estudo de diferenciação dos genótipos de *T*. *asahii* por sequenciamento da região IGS1 na Grécia, onde os genótipos 3 e 4 foram predominantes, e dois novos genótipos foram descritos (genótipos 10 e 11) (38).

Montoya e colaboradores conduziram um estudo no México, em 2015, onde foram avaliados 39 isolados de *T. asahii* de diferentes materiais clínicos, como pele, urina, sangue e unha, obtidos no período de 2003 a 2014. Foi reportada a presença de três diferentes genótipos, sendo o genótipo 1 o mais prevalente, seguido pelo genótipo 7 e genótipo 3 (22).

Sabe-se que nos países asiáticos, a infecção por *Trichosporon* é bem descrita no Japão (10,12,29), porém diversos casos envolvendo principalmente a espécie *T. asahii* têm sido descritos em outros países da Ásia. Em 2016 foi conduzido um estudo multicêntrico na Índia, onde foram avaliados 20 isolados de *T. asahii* provenientes de 14 hospitais de diferentes regiões do país, e foi reportado predomínio do genótipo 3, seguido dos genótipos 1 e 7 (41). Mekha *et al.* avaliaram 101 isolados de *T. asahii* provenientes da Tailândia, onde foi descrito predomínio do genótipo 1 (44,5%), seguido pelos genótipos 3 (34,7%) e 6 (17,8%) (42).

Em 2017 foi conduzido o primeiro estudo que avaliou a distribuição dos genótipos de *T. asahii* no continente africano. Sellami *et al.* avaliaram 30 isolados e identificaram quatro genótipos na Tunísia: genótipo 1 (46,4%), genótipo 4 (35,7%), genótipo 7 (14,3%) e genótipo 3 (3,6%) (43).

Em 2019 foi realizado um estudo na China, onde Guo *et al.* avaliaram a distribuição dos genótipos de *T. asahii* utilizando o sequenciamento da região IGS1. Foram avaliados 108 isolados obtidos no período de 2009 a 2016, e foi reportado que o genótipo 1 é predominante (41,7%), seguido por genótipo 4 (31,4%), genótipo 3 (23,1%), genótipo 7 (1,8%), genótipo 5 (0,9%) e genótipo 6 (0,9%) (44).

Apesar da predominância do genótipo 1, a diversidade haplotípica das espécies de *T. asahii* de acordo com sequenciamentos da região IGS1 é ainda maior que a sugerida pela literatura. Dados obtidos pelo Laboratório Especial de Micologia da UNIFESP, em dissertação de mestrado da aluna Elaine Cristina Francisco, sob orientação de Ana Carolina Padovan e Arnaldo Lopes Colombo, mostraram que há pelo menos nove genótipos de *T. asahii* circulantes no Brasil, sendo genótipos 1, 3, 4, 5, 7 e quatro novos genótipos, denominados 13, 14, 15 e 16 (45).

1.4 Trichosporon asahii e a suscetibilidade aos antifúngicos

Atualmente, o tratamento das micoses limita-se a um pequeno grupo de fármacos e diversos estudos reportam o fenômeno de resistência aos antifúngicos. As classes dos antifúngicos disponíveis são divididas pelo mecanismo de ação dos fármacos, e estudos laboratoriais realizados *in vitro* demonstram que isolados de *T. asahii* são resistentes às diversas classes, como os derivados poliênicos (anfotericina B), azólicos (fluconazol e itraconazol) e 5-flucitosina (21). Para o gênero *Trichosporon*, a interpretação dos testes de suscetibilidade aos antifúngicos ainda não está estabelecida pela ausência de pontos de corte interpretativos (18,21). Os pontos de corte epidemiológicos, ou seja, a distribuição das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para os isolados de *T. asahii*, que permite separar os isolados selvagens (*wild-type*) dos isolados com CIMs mais elevadas, que possivelmente desenvolveram resistência aos antifúngicos (*non-wild-type*), ainda não foram estabelecidos. O estabelecimento dos pontos de corte epidemiológicos ou ecológicos é a base preliminar para a definição dos pontos de corte clínicos, que também necessitam de dados de farmacocinética, farmacodinâmica e de ensaios *in vivo*, para serem estabelecidos (18).

Taverna *et al.* observaram que as CIMs de *T. asahii* são maiores quando comparadas a outras espécies de *Trichosporon*. Em revisão sistemática, *T. asahii* demonstrou pior perfil de suscetibilidade para anfotericina B (CIM₉₀ 1-64mg/l versus 1-2 mg/l), voriconazol (CIM₉₀ 0.06-32mg/l versus 0.06-0.5 mg/l) e fluconazol (CIM₉₀ 2-64mg/l versus 1-8mg/l) em comparação às CIMs descritas para as outras espécies (39).

Dados semelhantes foram observados no estudo conduzido por Rastogi *et al.*, onde outras espécies de *Trichosporon* apresentaram CIMs mais baixas para os azólicos, quando comparadas aos isolados de *T. asahii* (41).

1.4.1 Suscetibilidade aos antifúngicos e os genótipos de T. asahii

Rastogi *et al.* avaliaram a suscetibilidade dos genótipos 1, 3 e 7 aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol, voriconazol e posaconazol. Não foram observadas diferenças significativas de suscetibilidade entre os três genótipos de *T. asahii*, porém um isolado caracterizado como genótipo 3 apresentou CIMs elevadas para todos os antifúngicos avaliados (41).

Montoya *et al.* enfatizam a importância da avaliação da suscetibilidade aos antifúngicos *in vitro* para os genótipos de *T. asahii*, pois observaram que a resposta aos antifúngicos pode ser variável entre os isolados, porém não foi estabelecida nenhuma relação entre as diferenças de suscetibilidade e os diferentes genótipos de *T. asahii* (22).

Apesar da grande diversidade de alelos encontrada a partir do sequenciamento da região IGS1 do DNA ribossomal, diversos autores demonstram que não são observadas diferenças significativas de suscetibilidade aos antifúngicos entre os genótipos de *T. asahii* (37–39,46).

1.5 Fatores de virulência e os genótipos de T. asahii

A virulência de um microrganismo pode ser expressa pelo número de mecanismos desenvolvidos para adesão, penetração e multiplicação de um patógeno no hospedeiro (18,22).

Diversos mecanismos de virulência têm sido descritos para o gênero *Trichosporon*, como a produção de glucuronoxilomanana (GXM), produção de exoenzimas e a formação de biofilme (22,47,48).

A produção de glucuronoxilomanana (GXM), componente que representa a maior fração da cápsula mucopolissacarídica, é um fator de virulência bem caracterizado e descrito para o gênero *Cryptococcus*. Este composto também é produzido pelo gênero *Trichosporon* e até o momento, não há dados disponíveis sobre a produção de GXM entre os diferentes genótipos de *T. asahii* (49,50).

Hazirolan *et al.* (47) avaliaram os fatores de virulência de 68 isolados de *T. asahii* provenientes de urina de pacientes hospitalizados. Em nenhum isolado foi observada atividade de proteinase e fosfolipase, mas todos apresentaram atividade de esterase, enzima envolvida na hidrólise de ésteres e no metabolismo lipídico. A atividade

hemolítica e a produção de biofilme foram observadas em 23,5% e 97% dos isolados, respectivamente. Porém, não houve associação entre os fatores de virulência e os genótipos identificados neste estudo.

Dados semelhantes foram descritos em relação à produção de biofilme por Montoya *et al.* (51), que avaliaram 49 isolados de *T. asahii* de diferentes genótipos, e todos foram caracterizados como produtores de biofilme, mas nenhuma associação foi estabelecida entre os diferentes genótipos e a formação de biofilme.

Em 2012, Sun *et al.* (52) conduziram um estudo na China para avaliar os genótipos e a virulência de 23 isolados de *T. asahii*. Neste estudo foram descritos os genótipos 1, 3 e 4, sendo o genótipo 4 mais prevalente. Para avaliação da virulência dos isolados foram realizados ensaios de produção de protease, fosfolipase e hemolisina através da formação de halo em meio de cultura correspondente, bem como a produção de biofilme. A atividade hemolítica e a produção de biofilme foram evidenciadas em todos os isolados, e os autores sugerem que o genótipo 3 pode ser mais patogênico, pois apresentou maior atividade hemolítica e maior produção de biofilme do que os outros genótipos avaliados.

Apesar das diferenças observadas por diversos autores entre os genótipos de *T*. *asahii*, não foi possível estabelecer uma relação entre os fatores de virulência e os genótipos descritos na literatura, demonstrando a necessidade de mais estudos para validar uma possível associação (22,47,48,51,52).

1.6 Tipagem genotípica por sequenciamento multilocus

A tipagem genotípica por sequenciamento multilocus (MLST), originalmente desenvolvida para bactérias, consiste na análise da variação de sequencias de 400-500 pb, de cinco a 10 genes estruturais de cópia única (*house-keeping genes*). Tal técnica tem se mostrado altamente discriminatória para fungos patogênicos como *Candida* spp.,

Coccidioides spp., *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans e Cryptococcus gattii*. Os esquemas de MLST são divulgados para a comunidade científica em bases de dados *online* (http://www.mlst.net/ e http://pubmlst.org/), permitindo uma padronização e posterior comparação dos dados obtidos em escala mundial (53).

Os genótipos e/ou clados provenientes destes esquemas de MLST podem apresentar diferentes expressões fenotípicas em termos de resistência aos antimicrobianos, virulência e patogênese (54). As análises por MLST podem também contribuir para elucidar a ocorrência de recombinações e de espécies crípticas intraespecíficas (54,55).

Dentre os basidiomicetos, esquemas de MLST foram descritos para o gênero *Cryptococcus*. Meyer *et al.* padronizaram MLST para as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, e os *loci* de melhor desempenho discriminatório entre isolados de diferentes origens foram *CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, *URA5* e IGS1 (53). Após tal padronização, estudos com análises por MLST de cepas do gênero *Cryptococcus* geraram novas hipóteses na área clínico-epidemiológica, como ilustrado a seguir: a) a análise MLST de isolados pertencentes ao genótipo VGII permitiu caracterizar o sequence type (ST) 26 da floresta amazônica, linhagem ancestral que se dispersou pelo mundo e que foi posteriormente relacionada a surtos de infecções na região noroeste da América do Norte (56); b) em investigação por MLST de isolados de *C. neoformans* relacionados à meningite criptocócica, em pacientes soropositivos ao HIV de Uganda, foi possível identificar um agrupamento filogenético ou clado dentro do genótipo VNI de *C. neoformans* relacionado à maior virulência e pior prognóstico (57).

O estudo de diferentes *loci* com variabilidade haplotípica que podem ser úteis para o estudo da diversidade genética de *T. asahii* ainda não foi realizado. A investigação e a definição de tais regiões do genoma do *T. asahii* é o primeiro passo para estabelecimento de um esquema de análise do tipo MLST.

2 JUSTIFICATIVA

Segundo o cenário exposto, observamos que a análise dos polimorfismos da região IGS1 do DNA ribossomal dos isolados de *T. asahii* permitiu a descrição de diversos alelos, porém os dados disponíveis na literatura são conflituosos e não obedecem a uma distribuição geográfica bem definida. Até o momento, não foi possível correlacionar os diferentes alelos com os perfis de suscetibilidade aos antifúngicos ou com os fatores de virulência e patogenicidade, justificando a necessidade de novos estudos e desenvolvimento de metodologias que contribuam para a caracterização do perfil filogenético e epidemiológico, bem como sua relação entre os fatores de virulência e suscetibilidade aos antifúngicos dos genótipos que ocorrem em nosso meio.

A avaliação de uma análise multilocus para a espécie *T. asahii* é inédita na literatura, e poderá fornecer novas informações sobre a distribuição dos genótipos, clados, e contribuir para uma correlação clínico-epidemiológica mais sólida. Uma análise filogenética multilocus poderá ser a base para novos métodos para avaliar a diversidade genética de isolados de *T. asahii*.

3 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar a contribuição de um método de análise por sequenciamento multilocus para melhor descrição da filogenia da espécie *T. asahii*, e os objetivos específicos foram:

3.1 Identificar, analisar e descrever novos genes (*loci*) que podem ser utilizados na análise filogenética da espécie *T. asahii*;

3.2 Definir os *loci* com diversidade haplotípica que podem ser úteis para uma análise filogenética aprofundada da espécie;

3.3 Comparar os resultados obtidos de uma análise filogenética multilocus com a genotipagem por sequenciamento da região IGS1 na genotipagem de diferentes cepas de *T. asahii*.

4 METODOLOGIA

4.1 Centros de Pesquisa envolvidos e aprovação no comitê de ética

Este é um estudo que envolveu a parceria entre a Divisão de Laboratório Central do HC-FMUSP, o Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT-USP), o Laboratório Especial da Micologia (LEMI) da UNIFESP e o Laboratório de Micologia do Hospital Saint-Antoine da Universidade Pierre et Marie Curie de Paris, França. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 27 de janeiro de 2016, sob o número de Protocolo de Pesquisa 024/16 (Anexo A).

4.2 Seleção dos isolados

Foram analisadas 21 cepas de *T. asahii* de coleções diferentes: oito da CBS-KNAW (Westerndijk Fungal Biodiversity Institute, Holanda), 10 do Hospital Saint-Antoine da Universidade Pierre et Marie Curie de Paris mantidas na coleção de culturas do LIM53 (IMT-USP), e três do Laboratório Especial de Micologia da Universidade Federal de São Paulo (LEMI-UNIFESP). Todas cepas foram submetidas previamente ao sequenciamento de IGS1 rDNA, e seus genótipos foram classificados conforme descrito por Sugita *et al.* (10). A nomenclatura e características dos isolados foram descritos na Tabela 1.

Nomenclatura do isolado na coleção de cultura	Origem (país de isolamento)	Fonte de isolamento	Genótipo IGS1
FNA01	França	Humano	Genótipo 3
FNA02	França	Humano	Genótipo 1
FNA03	França	Humano	Genótipo 3
FNA04	França	Humano	Genótipo 6
FNA05	França	Humano	Genótipo 3
FSA02	França	Humano	Genótipo 1
FTO01	França	Humano	Genótipo 1
FTO02	França	Humano	Genótipo 4
FHD01	França	Humano	Genótipo 7
FKBCT01	França	Humano	Genótipo 3
CBS2479T	Japão	Humano	Genótipo 1
CBS2530	Brasil	Humano	Genótipo 3
CBS7137	Holanda	Solo	Genótipo 1
CBS7631	França	Humano	Genótipo 1
CBS8640	Itália	Fezes de réptil	Genótipo 5
CBS8972	Israel	Humano	Genótipo 3
CBS8969	Israel	Humano	Genótipo 3
CBS5599	Índia	Humano	Genótipo 1
LEMI5826	Brasil	Humano	Genótipo 1
LEMI9132	Brasil	Humano	Genótipo 1
LEMI9246	Brasil	Humano	Genótipo 1

Tabela 1 – Isolados de Trichosporon asahii analisados no estudo

4.3 Viabilidade e verificação de pureza dos isolados

Antes das análises moleculares, as cepas e isolados mantidos nas coleções de cultura, sob congelamento a -80°C em meio líquido YEPD (*yeast-extract peptone dextrose*, Difco), foram cultivadaos em ágar Sabouraud Dextrose e incubados a 30°C por 48-72 horas. Para a verificação de pureza, os isolados foram semeados por esgotamento em CHROMagar *Candida*® (Difco) e incubados a 30°C por 48 horas.

4.4 Extração do DNA genômico

Após verificação da pureza dos isolados, foram realizadas as extrações de DNA, pelo método descrito por Pontón & Jones (1986) e Van Burik *et al.* (1998), com modificações (58,59).

Inicialmente, foram obtidas suspensões das leveduras em água destilada estéril, e 1mL das suspensões foi centifugado a 13500 rpm por 10 minutos para lavagem das células. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi adicionada uma solução contendo 50mM de Tris e 10mM de EDTA, 250U/mL da enzima liticase (Sigma) e 5% de βmercaptoetanol (Merck). Os tubos foram mantidos a 37°C para digestão da parede celular. Após a incubação, foram adicionados 0,2% de SDS (Sigma) e 200µg/mL da enzima proteinase K (AMRESCO) à suspensão, os tubos foram mantidos a 65°C para lise nuclear e digestão proteica. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 12000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante transferido para um tubo limpo. Ao sobrenadante, foi adicionado isopropanol v/v para precipitação do DNA e a amostra foi mantida a -20°C *overnight*. Após o tempo de incubação a -20°C, a amostra foi centrifugada a 13500 rpm por 20 minutos e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 500µL de etanol 70% ao *pellet* contendo o DNA, e o tubo foi novamente centrifugado a 13500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* final de DNA solubilizado em solução contendo 100mM de Tris e 10mM de EDTA.

4.4.1 Quantificação e análise da pureza do DNA dos isolados de T. asahii

Após a extração de DNA, foram utilizados 2µL para quantificação em espectrofotômetro *Nanodrop* 1000 (Thermo Fisher), com absorbância medida em comprimento de onda de 260nm.

A presença de proteínas e sal foi medida em absorbâncias com comprimento de onda de 280nm e 230nm, respectivamente. A razão entre as leituras DO260/DO280 e DO260/DO230 foi indicativa da pureza do DNA, onde valores entre 1,80 e 2,0 indicam pouca quantidade dos interferentes salinos e/ou proteicos.

Após a quantificação, o DNA foi diluído na concentração de 10ng/µL para ser utilizado nas amplificações.

4.5 Seleção dos housekeeping genes e delineamento dos primers

Neste estudo, foi utilizado como referência o modelo de MLST descrito por Meyer *et al.* (53), que foi padronizado para diferenciar isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Os gêneros *Trichosporon* e *Cryptococcus* são basidiomicetos e apresentam características genéticas, morfológicas e metabólicas em comum, como por exemplo, a produção de GXM já citada anteriormente, e a capacidade de assimilar carboidratos e não fermentar estes compostos. Considerando as semelhanças entre os gêneros, os *loci* polimórficos utilizados no esquema de MLST para *Cryptococcus* foram adotados como ponto de partida para as análises.

Outros genes analisados em estudos filogenéticos para fungos também foram avaliados, bem como genes escolhidos aleatoriamente no genoma de *T. asahii* (60–63). Atualmente o *GenBank* disponibiliza 8.840 sequencias de genes estruturais (*housekeeping genes*), obtidos do genoma de duas cepas de *T. asahii*, CBS2479 (64) e CBS8904 (65). As sequencias extraídas dos genomas das duas cepas de referência foram comparadas e alinhadas utilizando o programa *Clustal Omega*, disponível no website (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/). Em seguida, os primers foram projetados com o software *AmplifX* v.1.7.0 (Aix-Marseille Université), sendo alocados em regiões conservadas desses genes para amplificar fragmentos de 350 a 600 pb. Foram realizadas

análises *in silico* no software *AmplifX*, que forneceu os parâmetros de PCR que foram utilizados inicialmente na padronização das amplificações. Para todos os genes foram selecionados *primers* com temperatura de hibridização semelhantes ($55^{\circ}C - 58^{\circ}C$).

4.6 Padronização das condições de amplificação utilizando os *primers* delineados no estudo

Em relação à concentração dos *primers* e mistura dos reagentes, os testes foram iniciados com concentrações equimolares de *primers* (0,4µM) e foram avaliadas diferentes composições da mistura de reagentes, adicionando-se aos demais componentes substâncias como glicerol (Merck) e dimetilsufóxido (DMSO, Merck) em diferentes concentrações, com o objetivo de melhorar a especificidade e eficiência das amplificações. Para definição das condições de amplificação, foi realizado gradiente de temperatura de hibridização entre 58°C e 61°C para todos os *primers*.

4.6.1 Eletroforese em gel de agarose para análise dos produtos das amplificações

A análise dos produtos das PCRs foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2%, em solução tampão TAE 1X [40 mM TRIS base (Invitrogen), 40 mM ácido acético glacial (Merck) e 2,0 mM EDTA (Life Technologies), pH 8,0, a 80V por 40 minutos. Após as corridas eletroforéticas, os géis foram corados com *GelRed* (Biotium) e registrados em equipamento de fotodocumentação (Uvitec). A estimativa do tamanho do amplificado foi realizada em comparação ao marcador de peso molecular 100pb DNA *Ladder* (Thermo Fischer Scientific).

4.6.2 Purificação dos amplificados obtidos nas reações de PCR

Os produtos das amplificações foram purificados com o kit *Wizard*® *SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) seguindo as orientações do fabricante, e/ou com *Exo-SAP-IT*TM *PCR product cleanup reagent* (Applied Biosystems). Após a purificação, os produtos foram quantificados em gel de agarose a 2%, comparando-se a intensidade das bandas com o marcador de massa molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen).

4.7 Sequenciamento de DNA, edição e análise das sequências

Os isolados foram sequenciados pelo método de terminação da cadeia por dideoxinucleotídeos de Sanger (66). Para as reações de sequenciamento, foram utilizados aproximadamente 100ng dos purificados e 5 pmol/µL dos *primers forward* e *reverse*, em tubos separados. Posteriormente, foram submetidos às reações de sequenciamento utilizando o kit *Big Dye Terminator* v1.1 (Applied Biosystems) no equipamento multiusuário ABI PRISM *Genetic Analyzer* 3500 (Thermo Fisher), localizado no LIM-07 do IMT-USP.

As sequências obtidas foram analisadas e editadas usando o software *Sequence Scanner* v2.0 (Life Technologies) e/ou o software *CodonCode Aligner* (CodonCode Corporation). Apenas os nucleotídeos com *score* de Phred \geq 30 foram incluídas na análise, limitando a possibilidade de incorporar uma base incorreta a \leq 1 em 100 (\geq 99% de precisão). O software *CodonCode Aligner* (CodonCode Corporation) também foi usado para obter as sequências consenso do alinhamento de *forward* e *reverse*.

4.8 Avaliação e seleção final dos loci

Os seguintes critérios foram utilizados para selecionar os *loci* de melhor desempenho: (a) a reação de PCR específica do gene foi capaz de amplificar todas as

diferentes cepas de *T. asahii*, utilizando apenas um par de *primers*; (b) reprodutibilidade das reações de PCR, ou seja, reações de PCR bem sucedidas na maioria dos experimentos; (c) o gene selecionado teve que apresentar polimorfismos de DNA (pelo menos 3 haplótipos) para ser considerado útil na análise filogenética.

Todas as seqüências geradas foram depositadas no banco de dados GenBank.

4.9 Análise filogenética

Após o alinhamento das sequências consenso, utilizando o software MEGA 7.0, a análise dos *loci* selecionados foi realizada e as sequências foram concatenadas, foi aplicado o método de máxima verossimilhança (*Maximum Likelihood*) para inferir a distância filogenética entre os diferentes ramos.

Considerando o critério de interferência Bayesiano (BIC) e o critério de informação de Akaike (AIC), o melhor modelo foi estimado para cada conjunto de dados utilizando as ferramentas disponíveis no software MEGA 7.0. A análise de confiabilidade de cada nó das árvores filogenéticas foi verificada pelo método de reamostragem bootstrap (1000 réplicas) (67). Sequências de DNA de cepas de referência de *Trichosporon faecale* CBS4828 (JXYK00000000.1), *Trichosporon inkin* CBS5585 (JXYM00000000.1) e *Trichosporon ovoides* CBS7556 (JXYN00000000.1) foram utilizadas como grupos externos para as análises filogenéticas. Todas as posições com GAPs não foram incluídos na análise. As semelhanças entre árvores filogenéticas foram avaliadas pelo cálculo do índice de congruência no site: http://www.ese.u-psud.fr/bases/upresa/pages/devienne/index.html (68). As diversidades dos nucleotídeos (π) e do haplótipo (Hd) foram estimadas com o software DnaSP versão 5.10.

5 RESULTADOS

5.1 Seleção dos loci, delineamento e análise dos primers

Inicialmente foram selecionados os loci descritos em análises multilocus para fungos, como CAP59, GPD1, LAC1, SOD1, URA5 e RPB2. Outros *loci* foram selecionados aleatoriamente, a partir do alinhamento entre os dois genomas de T. asahii disponíveis no *GenBank*. Após essa seleção, os primers foram projetados com o software AmplifX v.1.7.0. No total, foi delineado pelo menos um par de *primers* para os 35 *loci*.

Após as análises das reações de PCR e análise das sequencias obtidas após o sequenciamento de DNA, 31 *loci* foram excluídos do presente estudo, pois não se enquadram nos três critérios de seleção (descritos no item 4.9) estabelecidos para a análise de desempenho dos *loci*. As informações sobre os *loci* excluídos do estudo, bem como o critério de exclusão, foram descritas na Tabela 2.

Quatro loci preencheram os critérios de inclusão e foram selecionados para a análise filogenética: *topoisomerase* 1 (TOP1), β -1-tubulin, phosphate carrier protein, copper-exporting ATPase. O nome dos primers, a descrição das sequências forward e reverse, a temperatura de hibridização sugerida pelo software AmplifX e o tamanho dos produtos de amplificação estão descritos na Tabela 3.

Nomenclatura do <i>primer</i>	Proteína	Critério de exclusão
	2-nitropropane dioxygenase	Locus conservado, poucos sítios polimórficos
CAC1	Acetyl-CoA carboxylase	Reações de PCR inespecíficas
CAMK	Calmodulin-dependent protein kinase	Falha na reação de PCR
CAP10	Capsular associated protein	Locus conservado, poucos sítios polimórficos
CAP59	Capsular associated protein 59	Tamanho da sequência (300pb)
CDC19	DNA replication licensing factor cdc19	Locus conservado, poucos sítios polimórficos
CinY	CinY protein	Falha na reação de PCR
CYT B	Cytochrome B2, precursor	Locus conservado, poucos sítios polimórficos
CYT-PRO	Cytoplasm protein	Muitos sítios polimórficos mas poucos alelos
D-LD	D-lactaldehyde dehydrogenase	Locus conservado, poucos sítios polimórficos
GLU OXI	Glucose oxidase	Locus conservado, poucos sítios polimórficos
GPD1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Falha na reação de PCR
LAC1	Laccase	Falha na reação de PCR
MAL-SYN	Malate synthase	Falha na reação de PCR
MP88	88 kDa immunoreactive mannoprotein	Tamanho da sequência (350pb)
MPD1	Protein disulfide isomerase	Locus conservado, poucos sítios polimórficos
N-AATSP	N amino acid transport system protein	Sítios polimórficos mas poucos alelos
NADPH	Methylenetetrahydrofolate reductase	Sítios polimórficos mas poucos alelos
PDI	Protein disulfide isomerase	Locus conservado, poucos sítios polimórficos
PDMF	PDM phosphatase	Reações de PCR inespecíficas
PEPT	Peptidase	Reações de PCR inespecíficas
PLB1	Phospholipase	Falha na reação de PCR
PYR-DEC	Pyruvate decarboxylase	Locus conservado, poucos sítios polimórficos
RPN1	Proteasome regulatory particle subunit	Locus conservado, poucos sítios polimórficos
RPB2	DNA-directed RNA polymerase II subunit	Sítios polimórficos mas poucos alelos
SOD1	Cu, Zn superoxide dismutase	Falha na reação de PCR
TEF1	Translation elongation factor	Reações de PCR inespecíficas
TOR1	Phosphatidylinositol 3-kinase	Reações de PCR inespecíficas
TSR1	Ribosome biogenesis-related protein	Reações de PCR inespecíficas
URA3	Dihydroorotate dehydrogenase	Reações de PCR inespecíficas
URA5	Orotidine monophosphate pyrophosphorylase	Reações de PCR inespecíficas

Tabela 2 – *Loci* que não preencheram os critérios de seleção (descritos no item 4.9) e foram excluídos do estudo

Locus	Sequência do primer	Temperatura hibridização	Produto PCR (pb)
β1-tubulin	βTUB-F 5'- GCCCCGACAACTTTGTCTTT-3'	55°C	636
	βTUB-R 5'- TCTTGGCGTCGAACATTTGC-3'	56°C	050
Copper-exporting ATPase	ATP-F 5'-CTTCCATCGCAATGCTGGTT-3'	55°C	551
	ATP-R 5'-TGATGTCATCGCCTTCGAGT-3'	55°C	551
Phosphate carrier protein	PHCP-F 5'-CAGCAATCATGTCCGACAGA -3'	54°C	664
	PHCP-R 5'-CGAACTTGGCCATGGTGTA -3'	54°C	004
Topoisomerase 1	TOP1-F 5'- CGCACTTCTCAAGGCTGGTAAT-3'	57°C	280
	TOP1-R 5'- GGACGTCAAGCCGAATGTCA -3'	57°C	300

Tabela 3 – Primers selecionados para a análise filogenética

5.1.1 Padronização das reações de PCRs e condições de amplificação para os quatro *loci* selecionados

Foi definida a composição dos reagentes para as reações de PCR, conforme descrito a seguir, para a amplificação dos quatro *loci* selecionados: 1x PCR buffer (KCl 30 mM, TRIS 10 mM pH 8,3) (Invitrogen), 200 μM de dNTP (Invitrogen), 0,4μM dos *primers forward* e *reverse*, 1,5 mM de MgCl2, 1,25U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 20ng de DNA. Para definição das condições de amplificação, foi realizado gradiente de temperatura de hibridização entre 56°C e 61°C para os pares de *primers* dos quatro *loci*. Os resultados obtidos demonstraram que as condições de melhor desempenho foram: denaturação inicial de 5 minutos à 95°C, seguida de 35 ciclos de 45 segundos à 60°C e 45 segundos à 72°C.

A composição dos reagentes e as condições de amplificação descritas foram adotadas para as reações de PCR dos quatro os *loci* selecionados, possibilitando a realização de uma ou mais reações, simultaneamente, no mesmo termociclador.

5.2 Depósito das sequências de DNA no banco de dados *GenBank*

Todas as sequências de DNA geradas no presente estudo, de IGS1 e dos quatro *housekeeping genes*, foram depositadas no banco de dados *GenBank*, conforme descrito na Tabela 4.

Nomenclatura do isolado	IGS1	Beta-1- tubulin	Topoisomerase 1	Phosphate carrier protein	Copper- exporting ATPase
FNA01	MK737679	MK729151	MK729172	MK737698	MK737719
FNA02	MK737680	MK729152	MK729173	MK737699	MK737720
FNA03	MK737681	MK729153	MK729174	MK737700	MK737721
FNA04	MK737682	MK729154	MK729175	MK73701	MK737722
FNA05	MK737683	MK729155	MK729176	MK737702	MK737723
FSA02	MK737684	MK729156	MK729177	MK737703	MK737724
FTO01	MK737685	MK729157	MK729178	MK737704	MK737725
FTO02	MK737686	MK729158	MK729179	MK737705	MK737726
FHD01	MK737687	MK729159	MK729180	MK737706	MK737727
FKBCT01	MK737688	MK729160	MK729181	MK737707	MK737728
CBS2479T	ALBS01000282.1*	MK729161	MK729182	MK737708	MK737729
CBS2530	EU934803.1	MK729162	MK729183	MK737709	MK737730
CBS7137	MK737689	MK729163	MK729184	MK737710	MK737731
CBS7631	MK737690	MK729164	MK729185	MK737711	MK737732
CBS8640	MK737691	MK729165	MK729186	MK737712	MK737733
CBS8972	MK737692	MK729166	MK729187	MK737713	MK737734
CBS8969	MK737693	MK729167	MK729188	MK737714	MK737735
CBS5599	MK737694	MK729168	MK729189	MK737715	MK737736
LEMI5826	MK737695	MK729169	MK729190	MK737716	MK737737
LEMI9132	MK737696	MK729170	MK729191	MK737717	MK737738
LEMI9246	MK737697	MK729171	MK729192	MK737718	MK737739

Tabela 4 – Número de acesso GenBank das sequencias de IGS1 e dos housekeeping genes

* Sequência obtida do genoma.

5.3 Análise filogenética

Após o sequenciamento da região IGS1 rDNA, a rede haplotípica foi composta por 21 isolados e cepas de referência de *T. asahii*, classificados como genótipos 1, 3, 4, 5, 6 e 7. Foram analisados 646 nucleotídeos no alinhamento das sequências de IGS1, e a diversidade haplotípica obtida neste *locus* foi Hd= 0,761. A árvore filogenética de IGS1 revelou dois ramos principais, com valores de bootstrap de 92 e 100%, separando os genótipos 1 e 3, respectivamente. Os genótipos 4, 5, 6 e 7 formaram ramos individuais com valores de bootstrap acima de 80% (Figura 3a).

A árvore filogenética de *topoisomerase 1* apresentou dois ramos principais, os valores de bootstrap variaram de 68 a 98%. Foi demonstrado que cepas do mesmo genótipo foram alocadas em ramos distintos, como observado entre os genótipos 1 e 3, os outros genótipos 4, 6 e 7 foram agrupados em um único ramo (Figura 3b). A diversidade haplotípica obtida neste *locus* foi Hd=0,775.

A árvore filogenética de β -1-tubulin apresentou valores de bootstrap de 65 a 86% e demonstrou três ramos, e também separou as cepas de genótipo 1 e 3 em subgrupos distintos (Figura 3c). A diversidade haplotípica foi de Hd=0,750.

A árvore filogenética de *Phosphate carrier protein* apresentou bootstrap de 55 a 99%, Hd=0,681 e revelou dois ramos principais e todas as cepas do genótipo 1 foram alocadas no mesmo ramo, foi observado que as cepas do genótipo 3 também foram dispostas no mesmo agrupamento, com exceção da cepa FKBC01, que foi alocada junto com o genótipo 1 (Figura 3d).

Para *Copper-exporting ATPase* os valores de bootstrap apresentados foram de 98 a 99% e Hd=0,659, e revelou dois ramos principais, com cepas de mesmo genótipo alocadas em ramos diferentes, como já observado nas outras árvores para o genótipo 1 e 3 (Figura 3e). As árvores filogenéticas com os *loci* concatenados separaram as cepas de *T*. *asahii* em dois clados principais, apresentando valores de bootstrap de 89 e 94%. A árvore concatenada com todos os 5 *loci* demonstrou uma distribuição similar das cepas de *T*. *asahii* com os dois principais clados separados por valores de bootstrap de 55 e 79%, conforme apresentado na Figura 4.



Figura 3 – a) Filograma derivado de alinhamento de sequências da região intergênica do DNA ribossomal (646 pb); b) Filograma derivado de alinhamento de sequências do *locus Topoisomerase-1* (378pb); c) Filograma derivado de alinhamento de sequências do *locus β-1-tubulin* (636pb); d) Filograma derivado de alinhamento de sequências do *locus phosphate carrier protein* (683pb); e) Filograma derivado de alinhamento de sequências do *locus Copper-exporting ATPase* (551pb); Posições com gaps foram eliminadas da análise. Escala foi criada a partir do método *maximum composite likelihood* para inferir distância filogenética entre os diferentes ramos. Genótipos de *Trichosporon faecale* e *Trichosporon inkin* foram extraídos do *GenBank* e o número das sequências estão explícitos na árvore. CBS=cepas de referência da coleção Westerndijk Fungal Biodiversity Institute.



Figura 4 – a) Filograma derivado de alinhamento de sequências concatenadas de quatro *loci*, incluindo *topoisomerase 1, β-1-tubulin, phosphate carrier protein e copper-exporting ATPase*; b) Filograma derivado de alinhamento de sequências concatenadas de cinco *loci*, sendo região intergênica do DNA ribossomal, *topoisomerase 1, β-1-tubulin, phosphate carrier protein e copper-exporting ATPase*. Escala foi criada a partir do método *maximum composite likelihood* para inferir distância filogenética entre os diferentes ramos. Genótipos de *Trichosporon faecale* e *Trichosporon inkin* foram extraídos do *GenBank* e o número das sequências estão explícitos na árvore. CBS=cepas de referência da coleção Westerndijk Fungal Biodiversity Institute.

As análises estatísticas mostraram similaridade topológica congruente entre os filogramas. A análise filogenética revelou diversidade de haplótipos semelhante para cada um dos cinco *loci*: 0,761 para IGS1, 0,775 para TOP1, 0,681 para PHCP, 0,750 para β -*1-tubulina* e 0,66 para ATP.

A diversidade de haplótipos atingiu 0,986 e 0,989 quando a análise filogenética foi realizada com quatro (sem IGS) e cinco *loci* concatenados, respectivamente. As informações detalhadas sobre as análises filogenéticas estão disponíveis na Tabela 5.

Locus/Região	IGS1*	TOP1¶	PHCP§	$\mathbf{BT1}^{\dagger}$	ATP [‡]	MLSA 4 ^{§§}	MLSA 5 ^{††}
Melhor modelo	K2+I	T92+G+I	T92+G	TN93+G	T92+I	T92+G+I	T92+G+I
N° de sítios	646	378	683	636	551	2248	2894
Sítios conservados	303	297	491	578	370	1736	2039
Sítios variáveis	334	81	186	58	181	506	840
Sítios informativos**	133	51	84	27	93	255	388
Polimorfismos de sítio isolado	191	30	96	31	88	245	436
Diversidade nucleotídeos (π)	0,07843	0,03950	0,03926	0,01341	0,05894	0,03675	0,04519
Número de haplotipos (h)	9	7	8	7	6	21	22
Diversidade haplotípica (Hd)	0,761	0,775	0,681	0,7500	0,6594	0,986	0,989

Tabela 5 - Dados das análises filogenéticas e haplotípicas, por locus

* IGS1= intergenic spacer 1 region from the ribosomal DNA; [¶] TOP1= topoisomerase I gene; PHCP= phosphate carrier protein gene; [†]BT1= β 1-tubulin; [‡]ATP= copper-exporting ATPase gene; ^{§§}MLSA4= análise de sequenciamento multilocus dos genes concatenados sem IGS1; ^{††} MLSA5= análise de sequenciamento multilocus com todos os genes cinco genes concatenados, incluindo IGS1; ** sítios informativos ou *parsimony informative sites*, polimorfismos presentes em mais de uma das sequências

6 DISCUSSÃO

Desde o advento das técnicas de sequenciamento de DNA, em meados dos anos 80, as sequências de biomoléculas, como DNA e proteínas, têm sido as principais fontes de dados para os estudos filogenéticos e vêm auxiliando na elucidação de várias questões biológicas. Nos últimos anos, o desenvolvimento das ferramentas de biologia molecular aumentou a disponibilidade de métodos capazes de identificar os microrganismos de maneira mais rápida e confiável. Atualmente, a identificação rápida e acurada continua sendo o principal objetivo dos estudos de taxonomia, porém a quantidade de dados gerados através da aplicação de tecnologias baseadas em PCR e sequenciamento de DNA contribuem também para o entendimento sobre a dinâmica da transmissão de doenças, rastreamento de sua dispersão global e a evolução genética dos diferentes patógenos, e podem fornecer informações sobre padrões específicos de virulência, patogenicidade e suscetibilidade a antimicrobianos (53,56,61,69).

Sporothrix schenckii, anteriormente considerado o único agente da esporotricose humana e animal, foi recentemente reclassificado como um complexo de espécies. Com o objetivo de compreender a ecoepidemiologia da esporotricose felina e sua relação com a esporotricose humana, foi conduzido um estudo utilizando os *loci calmodulin* (CAL) e *translation elongation factor-1 alpha* (EF1 α) em cepas brasileiras de diversas regiões geográficas. Os resultados demonstraram que a epidemia brasileira de esporotricose possui pelo menos duas fontes distintas, e sugere que os gatos representam um grande hospedeiro e a principal fonte de infecções por *S. brasiliensis* em gatos e humanos no Brasil, reforçando a importância das análises de genotipagem na epidemiologia das infecções (69).

Para o gênero *Cryptococcus*, diversos esquemas de MLST foram descritos e os resultados demonstraram uma reclassificação entre as espécies. Em relação ao sorotipo A de *C. neoformans*, a análise multilocus foi capaz de identificar três subpopulações geneticamente distintas, denominadas VNI, VNII e VNB. A partir desses resultados, foi observado que os grupos VNI e VNII são difundidos em diversas regiões do mundo, enquanto o grupo VNB é exclusivo de Botswana (61). A compreensão da taxonomia e da filogenia de *Cryptococcus gattii* também avançou com a aplicação de métodos moleculares. A América do Sul é a fonte provável dos tipos moleculares virulentos de C. gattii VGII que surgiram na América do Norte, e apesar de *C. gattii* compartilhar os principais mecanismos de virulência com *C. neoformans*, os subtipos VGIIa e VGIIb manifestam diferentes fenótipos de virulência, também foi observado que os isolados de *C. gattii* VGII podem apresentar maiores CIMs de fluconazol quando comparados aos outros genótipos. Tais fatos demonstram a importância da análise genotípica na determinação de fatores de virulência e suscetibilidade aos antifúngicos, pois esses fatores impactam diretamente na conduta clínica e na sobrevida dos pacientes infectados (70).

Em relação à espécie *T. asahii*, Sugita *et al.* conduziram uma investigação pioneira em 2001 sobre a diversidade genética de 44 isolados ambientais e 42 isolados clínicos dos EUA e Japão (29). Através de análises de amplificação aleatória do DNA polimórfico (RAPD), os isolados ambientais e clínicos de *T. asahii* apresentaram perfis distintos. Além disso, os perfis genéticos dos isolados clínicos foram agrupados em dois ramos bem definidos (71). Apesar das limitações da análise RAPD, pois essa técnica apresenta baixa reprodutibilidade, foi possível observar a primeira análise da diversidade genética da espécie *T. asahii*. Após a reclassificação da espécie, foi possível observar que os isolados clínicos adaptados ao hospedeiro humano podem ter sofrido um processo evolutivo diferente quando comparado com organismos ambientais (9,20).

Recentemente, a classe *Tremellomycetes* foi reclassificada a partir de estudos do RNA ribossomal e de sequencias parciais de quatro genes codificadores de proteinas, incluindo *RPB1*, *RPB2*, *translation elongation factor 1α* e *cytochrome B*. Através dessa análise, diversas espécies foram reclassificadas, por exemplo o *T. cutaneum*, que foi transferido para o gênero *Cutaneotrichosporon*, enquanto *T. asahii*, principal agente causador de tricosporonose, foi mantido no gênero *Trichosporon* (72,73).

Diversos estudos demonstraram que *T. asahii* é um fungo que pode ter sofrido processo evolutivo adaptativo, mesmo sendo considerado haploide, pois está presente na microbiota humana da pele e trato gastrointestinal (74–76). Alguns autores sugerem que pode ocorrer translocação, provocando a disseminação de *T. asahii* do intestino para a corrente sanguínea. Cho *et al.*, demonstraram que as cepas encontradas nas fezes de pacientes saudáveis foram condizentes com as cepas isoladas de pacientes com infecção invasiva, sugerindo que o *T. asahii* que coloniza a pele e o trato gastrointestinal pode estar associado ao desenvolvimento de tricosporonose profunda, dessa forma a associação com isolados ambientais é pouco provável (75).

Conforme descrito anteriormente, observamos que a análise dos polimorfismos da região IGS1 do DNA ribossomal forneceu uma classificação genotípica dos isolados de *T. asahii*, porém as informações obtidas até o momento são conflituosas e não obedecem a uma distribuição geográfica bem definida. É notável a predominância mundial dos genótipos 1, 3 e 4 em diferentes países. Alguns autores descreveram que o genótipo 3 apresenta maior virulência, porém outros autores atribuíram essa característica ao genótipo 4. Enquanto Sun *et al.* (52) descreveram que os isolados do genótipo 3 eram mais capazes de produzir biofilme e hemolisinas, Montoya *et al.* (51) não encontraram características de virulência específicas para este genótipo. Além disso, a genotipagem de isolados de *T. asahii* através da análise de IGS1 tem sido aplicada na investigação de

surtos, porém apresenta resultados menos discriminatórios quando comparados a outros métodos de tipagem genética, como rep-PCR (34,71). Portanto, uma melhor compreensão da estrutura genética da população de isolados de *T. asahii* faz-se necessária, e novas abordagens de tipagem molecular, além da análise de sequencias de IGS1 rDNA, devem ser investigadas, justificando a padronização da análise de sequenciamento multilocus deste estudo.

Meyer *et al.* (53) descreveram um esquema de MLST utilizando os loci *CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *SOD1* e *URA5* para a genotipagem de isolados de *Cryptococcus* spp. No presente estudo, os cinco genes foram avaliados, porém não foram selecionados, pois apresentaram baixo número de sítios polimórficos (*locus* conservado), baixa reprodutibilidade ou reação inespecífica.

A ordem *Trichosporonales* abriga diversas espécies que apresentam valor clínico, além de agrícola e biotecnológico. Em 2015, Takashima *et al.*, conduziram um estudo propondo um conjunto de genes e a construção de uma árvore filogenética com alta resolução, a fim de examinar a diversidade evolutiva em *Trichosporonales*. Diversos genes, como *phosphatidylinositol 3-kinase* (TOR1) e *glutamate synthase* (NADH) apresentaram um bom desempenho (62). Discordando dos resultados deste estudo, pois o *locus TOR1* foi avaliado e apresentou-se inespecífico na diferenciação intraespecífica dos isolados de *T. asahii*, sendo excluído do estudo. Outros *loci* descritos na literatura, em análises multilocus de fungos, foram avaliados no presente estudo, porém não foram selecionados para a análise filogenética, como o *RPB2* e *cytochrome B*, utilizados na reclassificação da classe *Tremellomycetes* (72,73). Para *T. asahii* estes loci não apresentaram resultados satisfatórios.

Na literatura recomenda-se a análise de 5 a 10 *loci* para análises do tipo MLST, e uma avaliação de pelo menos 50 cepas com diversidade haplotípica para cálculo do índice discrimintatório (53,54,60,61,63). Apesar deste estudo não ter estabelecido um esquema de MLST para *T. asahii*, os *loci* selecionados apresentaram diversidade haplotípica similar à região IGS1 do rDNA e podem ser úteis para análises filogenéticas futuras. A diversidade haplotípica das sequencias concatenadas foi elevada e superior à diversidade haplotípica da região IGS1. Sendo assim, os resultados demonstrados confirmam que o sequenciamento da região IGS1 não fornece dados suficientes para a classificação genotípica da espécie *T. asahii* e análises multilocus podem contribuir para o melhor conhecimento filogenético dessa espécie. Foi observado que, quando os isolados de *T. asahii* foram submetidos à análise multilocus proposta neste estudo, a distribuição dos genótipos IGS1 de *T. asahii* foi diferente. Isolados classificados como mesmo genótipo de IGS1 (genótipos 1 e 3), quando submetidos à análise multilocus foram alocados em agrupamentos distintos, mostrando que há diversidade entre os isolados do mesmo genótipo e confirmando que o MLST pode ser útil no estudo da filogenia de *T. asahii*.

Uma limitação do estudo foi que as cepas analisadas foram, em sua maioria, de origem humana, e a avaliação de isolados ambientais pode contribuir para o entendimento de fenômenos biológicos adaptativos e evolutivos da espécie. Outra limitação que deve ser citada é a pequena variedade de genótipos IGS1 dos isolados analisados, no presente estudo foram incluídos apenas os genótipos 1, 3, 4, 5, 6 e 7, e atualmente mais de 15 genótipos já foram descritos.

Os resultados apresentados no presente estudo sugerem uma nova classificação genética de *T. asahii*, possibilitando o desenvolvimento de novos estudos incluindo um maior número de cepas e outros marcadores genéticos para melhor abordar a filogenia atual dessa espécie.

7 CONCLUSÕES

No presente estudo, a análise multilocus demonstrou diferenças na distribuição de cepas de mesmo genótipo de IGS1, como observado entre as cepas do genótipo 1 e 3, sugerindo uma nova classificação genética da espécie *T. asahii*.

Os resultados obtidos demonstram que uma análise multilocus pode contribuir para o melhor conhecimento da espécie *T. asahii*, bem como suas características de virulência, suscetibilidade e distribuição geográfica.

Apesar deste estudo não ter estabelecido um esquema de MLST para *T. asahii*, os *loci* selecionados apresentaram diversidade haplotípica similar à região IGS1 do rDNA podendo ser utilizado como ferramenta alternativas no conhecimento da diversidade genética de isolados de *T. asahii*.

Anexo A

MEDICINA

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 27/01/2016, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 024/16 intitulado: "PADRONIZAÇÃO DE TIPAGEM DE ISOLADOS DA ESPÉCIE TRICHOSPORON ASAHII POR SEQUENCIAMENTO MULTILOCUS" apresentado pelo Departamento de DERMATOLOGIA

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: João Nobrega de Almeida Júnior Pesquisador (a) Executante: Letícia Bonato Souza Santos

CEP-FMUSP, 28 de Janeiro de 2016.

ligtoine

Profa. Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira Coordenador Comitê de Ética em Pesquisa

Comité de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina e-mail: <u>cep.fm@usp.br</u>

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ibáñez-Martínez E, Ruiz-Gaitán A, Pemán-García J. Update on the diagnosis of invasive fungal infection. Rev Espanola Quimioter Publicacion Of Soc Espanola Quimioter. setembro de 2017;30 Suppl 1:16–21.

2. Enoch DA, Yang H, Aliyu SH, Micallef C. The Changing Epidemiology of Invasive Fungal Infections. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2017;1508:17–65.

3. Durga CS, Gupta N, Soneja M, Bhatt M, Xess I, Jorwal P, et al. Invasive fungal infections in critically ill patients: A prospective study from a tertiary care hospital in India. Drug Discov Ther. 2018;12(6):363–7.

4. Odero V, Galán-Sánchez F, García-Agudo L, García-Tapia AM, Guerrero-Lozano I, Rodríguez-Iglesias MA. [Fungemia due to Trichosporon asahii in a patient with hematological malignancy]. Rev Iberoam Micol. março de 2015;32(1):59–61.

5. Alby-Laurent F, Dollfus C, Ait-Oufella H, Rambaud J, Legrand O, Tabone M-D, et al. Trichosporon: another yeast-like organism responsible for immune reconstitution inflammatory syndrome in patients with hematological malignancy. Hematol Oncol. dezembro de 2017;35(4):900–4.

6. Asada N, Uryu H, Koseki M, Takeuchi M, Komatsu M, Matsue K. Successful treatment of breakthrough Trichosporon asahii fungemia with voriconazole in a patient with acute myeloid leukemia. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 15 de agosto de 2006;43(4):e39-41.

7. Hazırolan G. [An overview on Trichosporon asahii and its infections]. Mikrobiyol Bul. outubro de 2012;46(4):707–15.

8. Ramírez-Soto MC, Andagua-Castro J, Quispe MA, Aguilar-Ancori EG. Cases of white piedra of the hair on the American continent: a case report and a systematic literature review. J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV. janeiro de 2019;33(1):e14–6.

9. Guého E, de Hoog GS, Smith MT. Neotypification of the genus Trichosporon. Antonie Van Leeuwenhoek. maio de 1992;61(4):285–8.

10. Sugita T, Nakajima M, Ikeda R, Matsushima T, Shinoda T. Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of Trichosporon species. J Clin Microbiol. maio de 2002;40(5):1826–30.

11. Nobrega De Almeida Júnior J, Hennequin C. Invasive Trichosporon Infection: A systematic review on a re-emerging fungal pathogen. Infect Dis. 2016;7:1629.

12. Sugita T, Ikeda R, Nishikawa A. Analysis of Trichosporon isolates obtained from the houses of patients with summer-type hypersensitivity pneumonitis. J Clin Microbiol. dezembro de 2004;42(12):5467–71.

13. Stursová M, Zifčáková L, Leigh MB, Burgess R, Baldrian P. Cellulose utilization in forest litter and soil: identification of bacterial and fungal decomposers. FEMS Microbiol Ecol. junho de 2012;80(3):735–46.

14. Wu Y, Du P-C, Li W-G, Lu J-X. Identification and molecular analysis of pathogenic yeasts in droppings of domestic pigeons in Beijing, China. Mycopathologia. setembro de 2012;174(3):203–14.

15. Hamad I, Sokhna C, Raoult D, Bittar F. Molecular detection of eukaryotes in a single human stool sample from Senegal. PloS One. 2012;7(7):e40888.

16. Corbo MR, Lanciotti R, Albenzio M, Sinigaglia M. Occurrence and characterization of yeasts isolated from milks and dairy products of Apulia region. Int J Food Microbiol. 19 de setembro de 2001;69(1–2):147–52.

17. Chagas-Neto TC, Chaves GM, Melo ASA, Colombo AL. Bloodstream infections due to Trichosporon spp.: species distribution, Trichosporon asahii genotypes determined on the basis of ribosomal DNA intergenic spacer 1 sequencing, and antifungal susceptibility testing. J Clin Microbiol. abril de 2009;47(4):1074–81.

18. Colombo AL, Padovan ACB, Chaves GM. Current knowledge of Trichosporon spp. and Trichosporonosis. Clin Microbiol Rev. outubro de 2011;24(4):682–700.

19. Kemker BJ, Lehmann PF, Lee JW, Walsh TJ. Distinction of deep versus superficial clinical and nonclinical isolates of Trichosporon beigelii by isoenzymes and restriction fragment length polymorphisms of rDNA generated by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. agosto de 1991;29(8):1677–83.

20. Guého E, Improvisi L, de Hoog GS, Dupont B. Trichosporon on humans: a practical account. Mycoses. fevereiro de 1994;37(1–2):3–10.

21. Chagas-Neto TC, Chaves GM, Colombo AL. Update on the genus Trichosporon. Mycopathologia. setembro de 2008;166(3):121–32.

22. Montoya AM, Sánchez González A, Palma-Nicolás JP, Gómez-Treviño A, González JG, González GM. Genotyping, extracellular compounds, and antifungal susceptibility testing of Trichosporon asahii isolated from Mexican patients. Med Mycol. junho de 2015;53(5):505–11.

23. Walsh TJ, Groll A, Hiemenz J, Fleming R, Roilides E, Anaissie E. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. março de 2004;10 Suppl 1:48–66.

24. Ruan S-Y, Chien J-Y, Hsueh P-R. Invasive trichosporonosis caused by Trichosporon asahii and other unusual Trichosporon species at a medical center in Taiwan. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 1° de julho de 2009;49(1):e11-17.

25. Guo L-N, Xiao M, Kong F, Chen SC-A, Wang H, Sorrell TC, et al. Three-locus identification, genotyping, and antifungal susceptibilities of medically important Trichosporon species from China. J Clin Microbiol. novembro de 2011;49(11):3805–11.

26. Rodriguez-Tudela JL, Diaz-Guerra TM, Mellado E, Cano V, Tapia C, Perkins A, et al. Susceptibility patterns and molecular identification of Trichosporon species. Antimicrob Agents Chemother. outubro de 2005;49(10):4026–34.

27. de Almeida JN, Favero Gimenes VM, Francisco EC, Machado Siqueira LP, Gonçalves de Almeida RK, Guitard J, et al. Evaluating and Improving Vitek MS for Identification of Clinically

Relevant Species of Trichosporon and the Closely Related Genera Cutaneotrichosporon and Apiotrichum. J Clin Microbiol. 2017;55(8):2439–44.

28. Siqueira LPM, Gimenes VMF, de Freitas RS, Melhem M de SC, Bonfietti LX, da Silva AR, et al. Evaluation of Vitek MS for Differentiation of Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii Genotypes. J Clin Microbiol. janeiro de 2019;57(1).

29. Sugita T, Ichikawa T, Matsukura M, Sueda M, Takashima M, Ikeda R, et al. Genetic diversity and biochemical characteristics of Trichosporon asahii isolated from clinical specimens, houses of patients with summer-type-hypersensitivity pneumonitis, and environmental materials. J Clin Microbiol. julho de 2001;39(7):2405–11.

30. Makela P, Leaman D, Sobel JD. Vulvovaginal trichosporonosis. Infect Dis Obstet Gynecol. 2003;11(2):131–3.

31. Kontoyiannis DP, Torres HA, Chagua M, Hachem R, Tarrand JJ, Bodey GP, et al. Trichosporonosis in a tertiary care cancer center: risk factors, changing spectrum and determinants of outcome. Scand J Infect Dis. 2004;36(8):564–9.

32. Pappas PG. Opportunistic fungi: a view to the future. Am J Med Sci. setembro de 2010;340(3):253–7.

33. Vashishtha VM, Mittal A, Garg A. A fatal outbreak of Trichosporon asahii sepsis in a neonatal intensive care Unit. Indian Pediatr. setembro de 2012;49(9):745–7.

34. Fanfair RN, Heslop O, Etienne K, Rainford L, Roy M, Gade L, et al. Trichosporon asahii among intensive care unit patients at a medical center in Jamaica. Infect Control Hosp Epidemiol Off J Soc Hosp Epidemiol Am. junho de 2013;34(6):638–41.

35. Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobón AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 1° de setembro de 2010;51(5):561–70.

36. Miceli MH, Lee SA. Emerging moulds: epidemiological trends and antifungal resistance. Mycoses. novembro de 2011;54(6):e666-678.

37. Kalkanci A, Sugita T, Arikan S, Yucesoy M, Ener B, Otag F, et al. Molecular identification, genotyping, and drug susceptibility of the basidiomycetous yeast pathogen Trichosporon isolated from Turkish patients. Med Mycol. fevereiro de 2010;48(1):141–6.

38. Arabatzis M, Abel P, Kanellopoulou M, Adamou D, Alexandrou-Athanasoulis H, Stathi A, et al. Sequence-based identification, genotyping and EUCAST antifungal susceptibilities of Trichosporon clinical isolates from Greece. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. agosto de 2014;20(8):777–83.

39. Taverna CG, Córdoba S, Murisengo OA, Vivot W, Davel G, Bosco-Borgeat ME. Molecular identification, genotyping, and antifungal susceptibility testing of clinically relevant Trichosporon species from Argentina. Med Mycol. maio de 2014;52(4):356–66.

40. Rodriguez-Tudela JL, Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Bernal-Martinez L, Cuenca-Estrella M. Genotype distribution of clinical isolates of Trichosporon asahii based on sequencing of intergenic spacer 1. Diagn Microbiol Infect Dis. agosto de 2007;58(4):435–40.

41. Rastogi V, Honnavar P, Rudramurthy SM, Pamidi U, Ghosh A, Chakrabarti A. Molecular characterisation and antifungal susceptibility of clinical Trichosporon isolates in India. Mycoses. agosto de 2016;59(8):528–34.

42. Mekha N, Sugita T, Ikeda R, Nishikawa A, Autthateinchai R, Poonwan N, et al. Genotyping and antifungal drug susceptibility of the pathogenic yeast Trichosporon asahii isolated from Thai patients. Mycopathologia. janeiro de 2010;169(1):67–70.

43. Sellami H, Trabelsi H, Neji S, Amouri I, Cheikhrouhou F, Makni F, et al. First genotype identification of Trichosporon asahii in Sfax, Tunisia. J Med Microbiol. abril de 2017;66(4):397–401.

44. Guo L-N, Yu S-Y, Hsueh P-R, Al-Hatmi AMS, Meis JF, Hagen F, et al. Invasive Infections Due to Trichosporon: Species Distribution, Genotyping, and Antifungal Susceptibilities from a Multicenter Study in China. J Clin Microbiol. fevereiro de 2019;57(2).

45. Francisco, EC. Análise da diversidade intraespecífica de Trichosporon asahii e Trichosporon faecale por biologia molecular e MALDI-TOF MS [Dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2015.

46. Xia Z, Yang R, Wang W, Cong L. Genotyping and antifungal drug susceptibility of Trichosporon asahii isolated from Chinese patients. Mycopathologia. março de 2012;173(2–3):127–33.

47. Hazirolan G, Koçak N, Karagöz A. Sequence-based identification, genotyping and virulence factors of Trichosporon asahii strains isolated from urine samples of hospitalized patients (2011-2016). J Mycol Medicale. setembro de 2018;28(3):452–6.

48. Almeida AA de, Crispim B do A, Grisolia AB, Svidzinski TIE, Ortolani LG, Oliveira KMP de. Genotype, antifungal susceptibility, and biofilm formation of Trichosporon asahii isolated from the urine of hospitalized patients. Rev Argent Microbiol. março de 2016;48(1):62–6.

49. Fonseca FL, Frases S, Casadevall A, Fischman-Gompertz O, Nimrichter L, Rodrigues ML. Structural and functional properties of the Trichosporon asahii glucuronoxylomannan. Fungal Genet Biol FG B. julho de 2009;46(6–7):496–505.

50. Karashima R, Yamakami Y, Yamagata E, Tokimatsu I, Hiramatsu K, Nasu M. Increased release of glucuronoxylomannan antigen and induced phenotypic changes in Trichosporon asahii by repeated passage in mice. J Med Microbiol. maio de 2002;51(5):423–32.

51. Montoya AM, Elizondo-Zertuche M, Treviño-Rangel R de J, Becerril-García M, González GM. Biofilm formation and antifungal susceptibility of Trichosporon asahii isolates from Mexican patients. Rev Iberoam Micol. março de 2018;35(1):22–6.

52. Sun W, Su J, Xu S, Yan D. Trichosporon asahii causing nosocomial urinary tract infections in intensive care unit patients: genotypes, virulence factors and antifungal susceptibility testing. J Med Microbiol. dezembro de 2012;61(Pt 12):1750–7.

53. Meyer W, Aanensen DM, Boekhout T, Cogliati M, Diaz MR, Esposto MC, et al. Consensus multi-locus sequence typing scheme for Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii. Med Mycol. 2009;47(6):561–70.

54. Lott TJ, Frade JP, Lockhart SR. Multilocus sequence type analysis reveals both clonality and recombination in populations of Candida glabrata bloodstream isolates from U.S. surveillance studies. Eukaryot Cell. abril de 2010;9(4):619–25.

55. Teixeira MM, Theodoro RC, Nino-Vega G, Bagagli E, Felipe MSS. Paracoccidioides species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. PLoS Pathog. outubro de 2014;10(10):e1004397.

56. Hagen F, Ceresini PC, Polacheck I, Ma H, van Nieuwerburgh F, Gabaldón T, et al. Ancient dispersal of the human fungal pathogen Cryptococcus gattii from the Amazon rainforest. PloS One. 2013;8(8):e71148.

57. Wiesner DL, Moskalenko O, Corcoran JM, McDonald T, Rolfes MA, Meya DB, et al. Cryptococcal genotype influences immunologic response and human clinical outcome after meningitis. mBio. 2012;3(5).

58. Ponton J, Jones JM. Analysis of cell wall extracts of Candida albicans by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot techniques. Infect Immun. setembro de 1986;53(3):565–72.

59. Van Burik JA, Myerson D, Schreckhise RW, Bowden RA. Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens. J Clin Microbiol. maio de 1998;36(5):1169–75.

60. Debourgogne A, Gueidan C, Hennequin C, Contet-Audonneau N, de Hoog S, Machouart M. Development of a new MLST scheme for differentiation of Fusarium solani Species Complex (FSSC) isolates. J Microbiol Methods. setembro de 2010;82(3):319–23.

61. Litvintseva AP, Thakur R, Vilgalys R, Mitchell TG. Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of Cryptococcus neoformans var. grubii (serotype A), including a unique population in Botswana. Genetics. abril de 2006;172(4):2223–38.

62. Takashima M, Manabe R, Iwasaki W, Ohyama A, Ohkuma M, Sugita T. Selection of Orthologous Genes for Construction of a Highly Resolved Phylogenetic Tree and Clarification of the Phylogeny of Trichosporonales Species. PloS One. 2015;10(8):e0131217.

63. O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG, Magnon KC, Cox PA, Revankar SG, et al. Genetic diversity of human pathogenic members of the Fusarium oxysporum complex inferred from multilocus DNA sequence data and amplified fragment length polymorphism analyses: evidence for the recent dispersion of a geographically widespread clonal lineage and nosocomial origin. J Clin Microbiol. novembro de 2004;42(11):5109–20.

64. Yang RY, Li HT, Zhu H, Zhou GP, Wang M, Wang L. Draft genome sequence of CBS 2479, the standard type strain of Trichosporon asahii. Eukaryot Cell. novembro de 2012;11(11):1415– 6.

65. Yang RY, Li HT, Zhu H, Zhou GP, Wang M, Wang L. Genome sequence of the Trichosporon asahii environmental strain CBS 8904. Eukaryot Cell. dezembro de 2012;11(12):1586–7.

66. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. Biotechnol Read Mass. 1992;24:104–8.

67. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol. dezembro de 2013;30(12):2725–9.

68. de Vienne DM, Giraud T, Martin OC. A congruence index for testing topological similarity between trees. Bioinforma Oxf Engl. 1° de dezembro de 2007;23(23):3119–24.

69. Rodrigues AM, de Melo Teixeira M, de Hoog GS, Schubach TMP, Pereira SA, Fernandes GF, et al. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of Sporothrix brasiliensis in feline sporotrichosis outbreaks. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(6):e2281.

70. Chen SC-A, Meyer W, Sorrell TC. Cryptococcus gattii infections. Clin Microbiol Rev. outubro de 2014;27(4):980–1024.

71. Treviño M, García-Riestra C, Areses P, García X, Navarro D, Suárez FJ, et al. Emerging Trichosporon asahii in elderly patients: epidemiological and molecular analysis by the DiversiLab system. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. setembro de 2014;33(9):1497–503.

72. Liu X-Z, Wang Q-M, Göker M, Groenewald M, Kachalkin AV, Lumbsch HT, et al. Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. Stud Mycol. junho de 2015;81:85–147.

73. Sugita T, Cho O, Takashima M. Current Status of Taxonomy of Pathogenic Yeasts. Med Mycol J. 2017;58(3):J77–81.

74. Takashima M, Sriswasdi S, Manabe R-I, Ohkuma M, Sugita T, Iwasaki W. A Trichosporonales genome tree based on 27 haploid and three evolutionarily conserved "natural" hybrid genomes. Yeast Chichester Engl. 2018;35(1):99–111.

75. Cho O, Matsukura M, Sugita T. Molecular evidence that the opportunistic fungal pathogen Trichosporon asahii is part of the normal fungal microbiota of the human gut based on rRNA genotyping. Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis. outubro de 2015;39:87–8.

76. Zhang E, Sugita T, Tsuboi R, Yamazaki T, Makimura K. The opportunistic yeast pathogen Trichosporon asahii colonizes the skin of healthy individuals: analysis of 380 healthy individuals by age and gender using a nested polymerase chain reaction assay. Microbiol Immunol. julho de 2011;55(7):483–8.