

UNIP

Caracterização Fenotípica e Genotípica de *Malassezia* spp. Isoladas
de Conduto Auditivo Externo de Equinos

ANA LÚCIA
ALDROVANDI

2013

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP

***Caracterização Fenotípica e Genotípica de Malassezia spp.
Isoladas de Conduto Auditivo Externo de Equinos***

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Patologia Ambiental e
Experimental da Universidade Paulista – UNIP
para a obtenção do título de Mestre em
Patologia Ambiental e Experimental.

**ANA LÚCIA ALDROVANDI
SÃO PAULO
2013**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	3
4. RESULTADOS.....	6
5. DISCUSSÃO.....	18
6. CONCLUSÕES.....	21
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22

Caracterização Fenotípica e Genotípica de *Malassezia* spp. Isoladas de Conduto Auditivo Externo de Equinos

O presente estudo teve como objetivo identificar espécies do gênero *Malassezia* isoladas do conduto auditivo externo de equinos, através de provas fenotípicas e genotípicas. Foram utilizados 55 animais sadios, 39 (70,9%) machos e 16 (29,1%) fêmeas, de diferentes raças e idades, os quais foram contidos fisicamente. Após limpeza do pavilhão auricular, foi colhido cerúmen de cada conduto, pela introdução de um *swab* estéril. As amostras clínicas (107, pois 03 delas foram descartadas, devido contaminação) foram enviadas ao Laboratório de Biologia Molecular e Celular da Universidade Paulista (UNIP), onde foram semeadas em placas contendo meio de Dixon modificado, as quais permaneceram incubadas a 32°C por até duas semanas, a fim de se detectar o crescimento de colônias. As colônias isoladas foram estudadas macro e micromorfológicamente, para se confirmar a morfologia característica do gênero. A identificação fenotípica em espécies foi baseada em aspectos fisiológicos da levedura, verificando seu comportamento frente a diferentes fontes de lipídios, sendo empregados *Tween* 20, 40, 60 e 80, e *cremophor-EL*, testando-se ainda, produção da enzima catalase e degradação de esculina. *Malassezia* sp foi isolada em 33/55 (60,0%) dos animais e em 52/107 (48,6%) dos condutos. Nos testes fenotípicos, nenhuma das cepas cresceu em ágar Sabouraud dextrose, sendo, portanto, lipodependentes. Todas as cepas produziram a enzima catalase e degradaram esculina. Verificou-se assimilação de *Tween* 20, 40, 60 e 80, ausência de assimilação de *cremophor-EL* em 37/52 (71,2%) das cepas isoladas; as outras 15 cepas apresentaram diferentes padrões de leitura, entretanto, nenhum dos resultados obtidos possibilitou caracterização fenotípica em espécie. Após extração do DNA, através de fervura durante 10 minutos, as amostras foram submetidas à técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e, posteriormente, à técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) nos produtos obtidos da PCR, utilizando-se as enzimas de restrição BstCI e HhaI, caracterizando-se molecularmente *M. nana* 42/52 (80,8%) e *M. slooffiae* 10/52 (19,2%). Duas cepas de cada uma das espécies foram encaminhadas para sequenciamento genético. A análise do sequenciamento da região dos genes 26S rRNA D1/D2 e ITS1-5.8S-ITS2 rRNA

das quatro cepas analisadas confirmou, molecularmente, duas cepas como sendo *M. nana* e as duas como *M.slooffiae*. Neste estudo, *M. nana* foi a principal espécie do gênero *Malassezia* encontrada em conduto auditivo externo de equinos, representando mais de 80% das cepas, não se isolando *M. equina*, como seria esperado. Portanto, novos levantamentos epidemiológicos devem ser realizados em diferentes regiões, a fim de se constatar este achado. Conclui-se que a caracterização genética é imprescindível em estudos com amostras clínicas provenientes de equinos e evidencia-se a necessidade de se ampliar pesquisas que possibilitem maior compreensão do encontro dessas leveduras lipodependentes, e as espécies constituintes da microbiota, uma vez que, em outras espécies animais, já está demonstrado que *Malassezia* spp. podem se constituir em importantes agentes etiológicos de infecções micóticas.

Abstract

Phenotypic and genotypic characterization of *Malassezia* spp isolates from the external ear canal of healthy horses

The present study's major objective was the phenotypic and genotypic identification of *Malassezia* yeasts isolated from the external ear canal of healthy horses. Fifty five horses, 39 (70.9%) males and 16 (29.1%) females, from different breeds and adults were studied. After physical restraint the external ear canal was cleaned and a sterile swab was introduced to collect auricular wax from both ears. A total of 107 samples were cultured into modified Dixon medium and were incubated at 32° C for up to 15 days. Colonies were macro-and-micro morphologic analysed to confirm characteristics of the genus. Phenotypic identification in species was based on physiologic aspects, such as assimilation and growth in different lipid sources, Tween 20, 40 ,60 ,80 and cremophor-EL. Catalase reaction and esculin splitting were also assayed. *Malassezia* sp was isolated in 33/55 (60%) and 52/107 (48.6%) respectively, from animals and ear canals. It was not observed any growth in Sabouraud dextrose agar, confirming the lipid dependant condition. All strains were positive for catalase reaction and capable of splitting esculin. Tween 20, 40, 60 and 80 were assimilated, but not cremophor-EL in 37/52 (71,2%) strains, other 15 strains showed different patterns of assimilation, which did not permit phenotypic speciation. After DNA extraction, samples were submitted to PCR technique (Polymerase Chain Reaction) and the products obtained to RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), using the restriction enzymes: BstCI and HhaI, which permitted the molecular identification of *M. nana* 42/52 (80,8%) and *M. slooffiae* 10/52 (19,2%). Two strains of each species were sent off to genetic sequencing. Sequencing of the genes 26S rRNA D1/D2 e ITS1-5.8S-ITS2 rRNA confirmed that two samples were *M. nana* and two *M. slooffiae*. The results of this study revealed *M. nana* as the most frequently species of *Malassezia* found in the external ear canal of horses, representing over 80% of the strains. No *Malassezia equina* was isolated in this study, differing from what was expected. Genetic characterization is essential in clinical samples obtained from horses. It is mandatory to carry out new surveys in this area, that will permit better

understanding in the distribution of lipid dependent *Malassezia* species in the microbiota of equine external ear canals, and their possible role as etiologic agent of mycotic infections.

Caracterização Fenotípica e Genotípica de *Malassezia* spp. Isoladas de Conduto Auditivo Externo de Equinos

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Malassezia* pertence ao reino Eumycota, divisão Basidiomycota, Classe Hymenomycetes, ordem Tremellales e família Filobasidiaceae (de HOOG *et al.*, 2000). Caracteriza-se por possuir células esféricas ou elipsóides, com brotamento único (de HOOG *et al.*, 2000).

Do ponto de vista fisiológico, essas leveduras são lipofílicas e lipodependentes, pois exigem a presença de ácidos graxos para seu crescimento; *Malassezia pachydermatis* é a única espécie do gênero que não necessita de substâncias lipídicas para o seu desenvolvimento (GUÉHO *et al.*; 1996; MIDGLEY, 2000).

As leveduras do gênero *Malassezia* fazem parte da microbiota de pele e mucosas do homem e dos animais, mas também podem estar envolvidas em vários tipos de enfermidades, que incluem desde afecções cutâneas até sistêmicas (BOND *et al.*, 2000; MIDGLEY, 2000).

Em medicina veterinária, *Malassezia pachydermatis* é a principal espécie do gênero responsável por causar otites externas e dermatites em cães e gatos (GUILLOT e BOND, 1999).

Em outras espécies domésticas e selvagens, essas leveduras têm sido isoladas, tanto da pele de animais sadios (furões, ursos, porcos, cavalos, rinocerontes), como também de processos infecciosos, dermatite em rinocerontes e leões marinhos e otite externa em *ferrets*, porcos e dromedários (apud CHEN e HILL, 2005).

Em 1996, estudos fisiológicos e moleculares determinaram sete espécies no gênero: *M. pachydermatis*, *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. obtusa*, *M. globosa*, *M. restricta* e *M. slooffiae*, sendo *M. pachydermatis* a única espécie não lipodependente (GUÉHO *et al.*, 1996; GUILLOT *et al.*, 1996). A identificação fenotípica dessas leveduras é realizada através de estudos morfológicos macro e microscópicos e de suas características fisiológicas (GUILLOT *et al.*, 1996).

Na última década, foram identificadas e aceitas mais quatro espécies lipodependentes no gênero: *M. dermatis* (SUGITA *et al.*, 2002), *M. japonica* (SUGITA *et al.*, 2003), *M. yamatoensis* (SUGITA *et al.*, 2004) e *M. nana* (HIRAI *et al.*, 2004), totalizando 11 espécies; entretanto, a diferenciação entre essas últimas só pode ser obtida através de caracterização genética (MIRHENDI *et al.*, 2005). Em anos recentes, mais duas espécies lipídio-dependentes, *Malassezia caprae* e *Malassezia equina* foram caracterizadas, a partir da pele sadia de cabras e equinos (CABAÑES *et al.*, 2007), diferenciadas de *M. sympodialis* somente por sequenciamento genético. E, no ano de 2011, uma última espécie foi agregada ao gênero, *M. cuniculi* (CABAÑES *et al.*, 2011).

A otite externa é inflamação que envolve o canal auditivo externo, podendo ser uni ou bilateral. Mesmo não sendo frequente seu relato, a otite nos equinos merece atenção, pois se não tratada, pode se tornar crônica (THOMASSIAN, 2005). Conquanto a maior parte desses processos seja de origem bacteriana, há na literatura casos de otite micótica nesses animais (BENTUBO *et al.*, 2012).

Existem poucos trabalhos no mundo sobre a presença das diferentes espécies de *Malassezia* em microbiota de conduto auditivo externo de equinos. Em outras espécies animais, as pesquisas vêm confirmando que, não somente *M. pachydermatis*, mas outras espécies lipofílicas estão presentes na pele e conduto auditivo (BOND *et al.*, 1996; CRESPO *et al.*, 2002a; CAFARCHIA *et al.*, 2005; NARDONI *et al.*, 2005). No Brasil, a quase totalidade dos estudos realizados em animais, emprega metodologia que possibilita a pesquisa somente de *M. pachydermatis*; entretanto, projetos realizados no país com protocolos experimentais que permitem a detecção de espécies lipodependentes, também corroboraram que *Malassezia* lipodependentes são parte da microbiota e podem causar infecções em animais domésticos e selvagens (DUARTE *et al.*, 1999; COUTINHO *et al.*, 2006; DIZOTTI e COUTINHO, 2007).

Na literatura, alguns trabalhos relatam a ocorrência de *Malassezia* spp. em equinos. Estudo realizado em 2002 descreveu a distribuição dessa levedura no pelame de 12 animais sadios e identificou-se uma nova espécie do gênero, a qual se nomeou tentativamente de *Malassezia equi* (NELL *et al.*, 2002). Em 2002, isolou-se *Malassezia* não lipodependente de cavalo com

alopecia na face, sugerindo que essa levedura fosse similar à *Malassezia pachydermatis*; no entanto, a espécie não foi identificada (PATERSON, 2002).

Em pesquisa envolvendo 112 animais domésticos, sendo 50 equinos, verificou-se que a ocorrência das espécies lipídio-dependentes era bem maior que de *M. pachydermatis*, relatando-se o isolamento de *M. furfur*, *M. slooffiae*, *M. obtusa*, *M. globosa*, *M. sympodialis* e *M. restricta*, esta última isolada pela primeira vez de animais (CRESPO *et al.*, 2002b ; BOND e LLOYD, 1997).

Em um grupo com 11 equinos sadios, foram isoladas leveduras do gênero *Malassezia* da microbiota da região intermamária e da área do prepúcio (WHITE *et al.*, 2006).

No Brasil, não há pesquisas publicadas sobre as diferentes espécies de *Malassezia* que podem estar presentes no conduto auditivo de equinos, e somente um relato de otite externa de etiologia micótica, causado por *Trichosporon inkin* nesses animais (BENTUBO *et al.*, 2012). Necessita-se ampliar os estudos nessa área, a fim de uma melhor compreensão do encontro das leveduras do gênero *Malassezia* como constituintes da microbiota, para se determinar as condições em que esses fungos poderiam se constituir em agentes etiológicos de processos infecciosos em equinos.

2. OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo pesquisar a presença de leveduras do gênero *Malassezia* em conduto auditivo externo sadio de equinos, caracterizando fenotípica e geneticamente as espécies isoladas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 55 animais sadios procedentes de associação hípica sediada na cidade de São Paulo, que viviam encocheirados. Desses, 39 (70,9%) eram machos e 16 (29,1%) fêmeas, de diferentes raças e idade adulta. Os animais foram contidos fisicamente.

Após limpeza do pavilhão auricular do animal com gaze embebida em solução de álcool-éter 1:1, foi colhido cerúmen de cada conduto auditivo externo, direito e esquerdo separadamente, pela introdução de um *swab* estéril,

totalizando 107 amostras, uma vez que ocorreu contaminação das amostras colhidas de três condutos, sendo descartadas.

As amostras foram semeadas em placas contendo meio de Dixon modificado (GUILLOT *et al.*, 1996) e permaneceram incubadas a 32°C, por um período de até duas semanas (GUILLOT *et al.*, 1996; MIDGLEY, 2000).

As colônias isoladas foram estudadas macro e micromorfológicamente (técnica de Gram), a fim de se confirmar a morfologia característica do gênero (GUÉHO *et al.*, 1996; GUILLOT *et al.*, 1996) e a identificação fenotípica foi baseada em crescimento em ágar Sabouraud dextrose e outros aspectos fisiológicos da levedura, verificando seu comportamento frente a diferentes fontes de lipídios, sendo empregados *Tween* 20, 40, 60 e 80, e *Cremophor-EL*, e testando-se ainda, produção das enzimas catalase e β -glicosidase (degradação de esculina) (GUILLOT *et al.*, 1996; MAYSER *et al.*, 1997). Todas as provas foram realizadas em duplicata e atribuiu-se aleatoriamente critérios de +, ++ e +++, de acordo com a intensidade de crescimento. *

Para a extração do DNA, o lisado foi obtido dissolvendo-se uma alçada de colônia de *Malassezia* sp em tubo *ependorf* de 1,5mL contendo 200 μ L de água Mili-Q estéril. A suspensão foi homogeneizada em vórtex (alta rotação) e fervida a 100°C durante 10 minutos. O sobrenadante, que continha o DNA, foi transferido a outro tubo *ependorf* e congelado até o momento de uso. **

A seleção dos iniciadores foi baseada na amplificação da região conservada do gene 26S rDNA, conhecido para o gênero *Malassezia*, e suas sequências são: senso, 5'-TAACAAGGATTCCCCTAGTA- 3' e anti-senso, 5'-ATTACGCCAGCATCCTAAG-3' (MIRHENDI *et al.*, 2005).

Para a amplificação da sequência-alvo de DNA, utilizando a técnica de *PCR* (*Polymerase Chain Reaction*), foi empregado o kit *Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen™), em reações com volume final de 50 μ L, de acordo com o seguinte protocolo: 34,3 μ L de água DEPC (dimetil pirocarbonato) estéril; 5,0 μ L de 10X PCR Buffer; 1,0 μ L de 10 mM dNTP (trifosfato deoxinucleosídeo, 0,2 mM concentração final de cada deoxinucleosídeo); 1,5 mM de MgCl₂; 0,2 μ M do iniciador senso (primer 26S Fw); 0,2 μ M do iniciador

* Guého, E. comunicação pessoal, 2009.

** Guillot, J. Comunicação Pessoal, 2009.

anti-senso (primer 26S Rv); uma unidade de *Platinum® Taq DNA Polymerase* e 5,0µL do DNA genômico extraído (lisado). Como controle negativo, utilizou-se água depeec estéril, com o mesmo volume final das amostras.

Os tubos foram incubados em termociclador a 94° C por 5 minutos, para desnaturação inicial do material genético e ativação da enzima. A seguir, foram executados 30 ciclos de amplificação: desnaturação a 94° C por 45 segundos, anelamento a 55° C por 45 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72° C por 7 minutos (MIRHENDI et al., 2005). A temperatura foi mantida a 4° C, após o término da reação e as amostras estocadas a -20° C até o momento do uso.

Para certificar-se da ocorrência da amplificação da sequência desejada (de aproximadamente 580 pares de bases), os produtos da *PCR* foram aplicados em gel de agarose 1,5% diluído em tampão TBE. A eletroforese ocorreu em sistema horizontal contendo tampão TBE na programação de 100 V, por uma hora. O tamanho do fragmento gerado na amplificação foi estimado, tendo como referência marcador de peso molecular de 100 pb (100 pb DNA Ladder; *Norgen, CA*). Após o término da corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio 0,5 µg/mL, durante 15 minutos e a leitura realizada por transiluminação sob luz ultravioleta (*Kodak Gel Logic 212™*), para visualização das bandas formadas.

Para a realização da técnica de *RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)* foram empregadas duas enzimas de restrição, *BtsCI* (Bio Labs®, *Ipswich, MA*) e *HhaI* (Invitrogen™, *Carlsbad, CA*), que possibilitam a diferenciação de 11 espécies do gênero (MIRHENDI et al., 2005). A 21,5µL do produto da *PCR* foi acrescentado 3,5µL (10 unidades) da enzima de restrição (0,5µL de enzima e 3,0µL de tampão), perfazendo volume total de 25µL. Os tubos assim preparados com as duas diferentes enzimas, para cada amostra de produto da *PCR*, foram incubados a 37°C durante três horas (MIRHENDI et al., 2005). Os produtos obtidos na técnica de *RFLP* foram aplicados em gel de agarose 2,0% diluído em tampão TBE e a corrida eletroforética ocorreu em sistema horizontal contendo tampão TBE na programação 100 V, por 1 hora e 30 minutos. Os marcadores de peso molecular e a visualização das bandas no gel foram realizados de acordo com o anteriormente descrito.

Foram escolhidas ao acaso quatro cepas, duas de cada um dos padrões obtidos na técnica de *RFLP*, que foram encaminhadas para sequenciamento genético (*Genomic Engenharia Molecular*), de acordo com o sugerido por Cabañes *et al.*, 2007, para caracterização de espécies provenientes de equinos.

Os produtos de *PCR* foram purificados com *ExoSAP-IT system* (*GE Healthcare Bio-Sciences Ltd – USB Corporation, Cleveland, OH*), de acordo com as instruções do fabricante e quantificados no *Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer* (*Thermo Fisher Scientific Inc, Wilmington, DE*). Para as reações de sequenciamento, 30ng do produto amplificado foi adicionado a 2µL de 5x tampão de sequenciamento (*Applied Biosystems; Carlsbad, CA*), 3,2pmol de *primer*, 2µL de *ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Big Dye v3.1, Applied Biosystems; Carlsbad, CA)* e quantidade de água deprec suficiente para o volume final de 10µL. Os *primers ITS5* e *ITS4* (*Internal Transcribed Spacers*) com as sequências de DNA 5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3' e 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3', respectivamente, foram empregados para o sequenciamento do gene 5.8S. Os *primers* NL1 (5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG3') e NL4 (5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG3') para o gene do RNA ribossomal 26S. O sequenciamento das amostras foi realizado no sequenciador automático ABI-PRISM® modelo 3130XL (*Applied Biosystems, Carlsbad, CA*), utilizando o polímero POP6. As sequências nucleotídicas foram analisadas pelo programa *BLAST* (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.html) para confirmar a especificidade do produto, e posteriormente alinhadas, empregando-se o programa *Clustal X* do *BioEdit* frente às amostras depositadas no *CBS-Knaw (Centraalbureau voor Schimmelcultures Fungal Biodiversity Centre)*. As amostras de referência para as regiões 26S e ITS, respectivamente, foram CBS7956 para *Malassezia slooffiae* e CBS9557 para *Malassezia nana*.

4. RESULTADOS

Os meios de cultivo empregados possibilitaram o isolamento de leveduras do gênero *Malassezia*.

Através da técnica de Gram verificou-se morfologia característica dos fungos, observando-se células leveduriformes ovaladas, com brotamento único, em base larga.

Leveduras do gênero *Malassezia* foram isoladas em 33/55 (60%) animais e em 52/107 (48,6%) amostras clínicas (Tabela 1).

Em relação aos testes fenotípicos para identificação das espécies de *Malassezia*, nenhuma das cepas isoladas cresceu em ágar Sabouraud dextrose, sendo, todas elas *Malassezia* lipodependentes (Tabela 2).

As cepas analisadas produziram a enzima catalase e apresentaram assimilação de *Tween* 20, 40, 60, 80, sem assimilação de *Cremophor-EL* em 37/52 (71,2%) (Figura 1); as outras 15 cepas apresentaram diversos padrões de leitura (Tabela 2).

Quanto ao teste de degradação de esculina, as amostras analisadas apresentaram degradação parcial ou total, não se verificando padrão de comportamento (Figura 2; Tabela 2).

Não foi possível identificar em espécies, através de provas fenotípicas, as cepas isoladas dos equinos.

Obteve-se amplificação dos produtos pela técnica de *PCR*, verificando-se bandas entre 500 e 600 pb (Figura 3).

Na técnica de *RFLP*, os fragmentos obtidos dos produtos da *PCR*, após digestão com as enzimas *BstCI* e *HhaI*, respectivamente, revelaram dois padrões de bandas (Figuras 4 e 5): 42/52 cepas (80,8%) comportaram-se como *M. nana* e 10/52 (19,2%) como *M. slooffiae*. Analisando-se os resultados, pode-se observar também que não houve isolamento de *M. nana* e *M. slooffiae*, em um mesmo animal (Tabela 2).

A análise do sequenciamento da região dos genes 26S rRNA D1/D2 e ITS1-5.8S-ITS2 rRNA das quatro cepas analisadas, confirmou molecularmente duas cepas como sendo *M. nana* e as outras duas como *M. slooffiae* (Figuras 6, 7, 8 e 9).

Tabela 1 - Frequência de *Malassezia* lipodependente em conduto auditivo externo de equinos sadios.

	Número Absoluto	%
Total de Animais	55	100
Total de Amostras	107	100
Machos	39	70,9
Fêmeas	16	29,1
Animais Positivos	33	60
Animais Negativos	22	40
Condutos Positivos	52	48,6
Condutos Negativos	55	51,4
Total de Cepas	52	48,6
<i>Malassezia</i> Lipodependente	52	100

Tabela 1 - Características gerais da população de equinos sadios estudada, resultados dos testes fenotípicos e PCR-RFLP das cepas de *Malassezia* spp. isoladas

Animal	Conduto	Sexo	Raça	Idade	Sabouraud Dextrose	20	40	Tween 60	80	C	Catalase	Esculina	RFLP- BstCI	RFLP-HhaI	Espécie
1 - ANGELITO	OD ¹	F ³	BH ⁴	17a ⁵	Negativo	anel ++	anel++	cresc++, pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo +	<200 e 400pb	200 e <300pb	<i>M. nana</i>
	OE ²				Negativo	anel ++	anel++	cresc++, pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo +	<200 e 400pb	200 e <300pb	<i>M. nana</i>
2 - AUGURIO	OD	M ⁶	Árabe	18a	Negativo	anel ++	anel++	cresc++, pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo+	<200 e 400pb	200 e <300pb	<i>M. nana</i>
	OE				Negativo	anel ++	anel++	cresc++, pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo+	<200 e 400pb	200 e <300pb	<i>M. nana</i>
3 - BRUNA	OD	M	BH	12a	Negativo	anel ++	anel++	cresc++, pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo+	<200 e 400pb	200 e <300pb	<i>M. nana</i>
	OE				Negativo	anel ++	anel++	cresc++, pt	cresc+++	+	Positivo	Positivo+	<200 e 400pb	200 e <300pb	<i>M. nana</i>
4 - CASVEL	OD	M	BH	5a	Negativo	anel ++	anel++	cresc++, pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo+	<200 e 400pb	200 e <300pb	<i>M. nana</i>
	OE				Negativo	anel ++	anel++	cresc++, pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo+	<200 e 400pb	200 e <300pb	<i>M. nana</i>
5 - CASQUINHA	OD	M	BH	11a	Negativo	anel ++	anel++	cresc++, pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo+	<200 e 400pb	200 e <300pb	<i>M. nana</i>
6 - CHARMOSA	OD	M	BH	4a	Negativo	anel ++	anel++	cresc++, pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo+	<200 e 400pb	200 e <300pb	<i>M. nana</i>
	OE				Negativo	anel ++	anel++	cresc++, pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo +	<200 e 400pb	200 e <300pb	<i>M. nana</i>
7 - CHUPETA	OD	M	BH	10a	Negativo	anel ++	anel++	cresc++, pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo+	<200 e 400pb	200 e <300pb	<i>M. nana</i>
	OE				Negativo	anel ++	anel++	cresc++, pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo++	<200 e 400pb	200 e <300pb	<i>M. nana</i>
8 - CHIMBICA	OD	M	BH	26a	Negativo	cresc++	cresc++	cresc+++	-	-	Positivo	Positivo+++	>500 e <600pb	>100 e <300pb	<i>M. slooffiae</i>
	OE				Negativo	anel ++	cresc+++	cresc+++	cresc++	+	Positivo	Positivo++	>500 e <600pb	>100 e <300pb	<i>M. slooffiae</i>
9 - CASBELO	OD	M	Pônei	8a	Negativo	cresc+/	cresc ++, p	cresc+++,pt	cresc++	+	Positivo	Positivo++	<200 e 400pb	200 e <300pb	<i>M. nana</i>
	OE				Negativo	cresc+/	cresc ++, p	cresc+++,pt	cresc++	+	Positivo	Positivo+++	<200 e 400pb	200 e <300pb	<i>M. nana</i>
10 - COTTAN	OD	M	Pônei	10a	Negativo	anel ++	anel++	cresc++, pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo +	<200 e 400pb	200 e <300pb	<i>M. nana</i>
11 - DARA	OD	M	BH	9a	Negativo	anel ++	anel++	cresc++, pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo++	<200 e 400pb	200 e <300pb	<i>M. nana</i>
12 - DAMA DA NOITE	OD	M	BH	12a	Negativo	anel ++	anel++	cresc++, pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo +	<200 e 400pb	200 e <300pb	<i>M. nana</i>
13 - FANCY	OD	M	BH	13a	Negativo	anel ++	anel++	cresc++, pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo++	<200 e 400pb	200 e <300pb	<i>M. nana</i>
	OE				Negativo	anel ++	anel++	cresc++, pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo++	<200 e 400pb	200 e <300pb	<i>M. nana</i>
14 - FLICK	OD	F	Pônei	10a	Negativo	anel ++	anel++	cresc++, pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo +	<200 e 400pb	200 e <300pb	<i>M. nana</i>
	OE				Negativo	anel ++	anel++	cresc++, pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo++	<200 e 400pb	200 e <300pb	<i>M. nana</i>
15 - JOHN	OD	M	PSI ⁷	11a	Negativo	cresc+/	cresc ++, p	cresc+++,pt	cresc++	+	Positivo	Positivo+++	<200 e 400pb	200 e <300pb	<i>M. nana</i>
	OE				Negativo	cresc+/	cresc ++, p	cresc+++,pt	cresc++	+	Positivo	Positivo+++	<200 e 400pb	200 e <300pb	<i>M. nana</i>
16 - LORD AMADEUS	OD	M	BH	7a	Negativo	anel ++	anel++	cresc++, pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo+++	<200 e 400pb	200 e <300pb	<i>M. nana</i>
17 - MR SIMPLES	OD	F	BH	9a	Negativo	cresc++	cresc++	cresc+++	cresc++	-	Positivo	Positivo+++	>500 e <600pb	>100 e <300pb	<i>M. slooffiae</i>
	OE				Negativo	cresc++	cresc++	cresc+++	cresc++	-	Positivo	Positivo++	>500 e <600pb	>100 e <300pb	<i>M. slooffiae</i>

continua

continuação

18 - MONALISA	OD	F	PSI	12a	Negativo	anel ++	anel++	cresc++	pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo +	<200 e 400pb	200 e <300pb	M. nana
	OE				Negativo	anel ++	anel++	cresc++	pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo+++	<200 e 400pb	200 e <300pb	M. nana
19 - MISS BRASIL	OE	M	Mangalarga	16a	Negativo	cresc++	cresc++	cresc+++		cresc++	-	Positivo	Positivo+++	>500 e <600pb	>100 e <300pb	M. slooffiae
20 - NAIL	OD	F	BH	10a	Negativo	anel ++	anel++	cresc++	pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo+++	<200 e 400pb	200 e <300pb	M. nana
21 - NERUS	OE	M	PSI	15a	Negativo	cresc++	cresc++	cresc+++		cresc++	-	Positivo	Positivo +	>500 e <600pb	>100 e <300pb	M. slooffiae
22 - ORIENTE	OD	F	PSL ³	11a	Negativo	anel ++	anel++	cresc++	pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo +	<200 e 400pb	200 e <300pb	M. nana
23 - PELÉ	OE				Negativo	anel ++	anel++	cresc++	pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo++	<200 e 400pb	200 e <300pb	M. nana
24 - ROMANTIC	OD	F	BH	11a	Negativo	anel ++	anel++	cresc++	pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo++	<200 e 400pb	200 e <300pb	M. nana
	OD	M	BH	14a	Negativo	anel ++	anel++	cresc++	pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo++	<200 e 400pb	200 e <300pb	M. nana
25 - ROMENA	OE	M	BH	9a	Negativo	anel ++	anel++	cresc++	pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo++	<200 e 400pb	200 e <300pb	M. nana
26 - SETE	OD	M	BH	11a	Negativo	cresc++	cresc++	cresc+++		cresc++	-	Positivo	Positivo +	>500 e <600pb	>100 e <300pb	M. slooffiae
	OE				Negativo	cresc++	cresc++	cresc+++		cresc++	-	Positivo	Positivo++	>500 e <600pb	>100 e <300pb	M. slooffiae
27 - SULTÃO	OD	M	BH	14a	Negativo	anel ++	anel++	cresc++	pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo++	<200 e 400pb	200 e <300pb	M. nana
	OE				Negativo	anel ++	anel++	cresc++	pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo++	<200 e 400pb	200 e <300pb	M. nana
28 - SOBERBO	OD	M	BH	8a	Negativo	anel ++	anel++	cresc++	pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo +	<200 e 400pb	200 e <300pb	M. nana
29 - SL SELETO	OE	M	BH	11a	Negativo	anel ++	anel++	cresc++	pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo +	<200 e 400pb	200 e <300pb	M. nana
30 - SHUTER	OD	M	BH	14a	Negativo	anel ++	cresc++	cresc+++		cresc++	+	Positivo	Positivo++	>500 e <600pb	>100 e <300pb	M. slooffiae
	OE				Negativo	cresc++	cresc++	cresc+++		cresc++	-	Positivo	Positivo++	>500 e <600pb	>100 e <300pb	M. slooffiae
31 - SUTRY	OD	F	BH	12a	Negativo	anel ++	anel++	cresc++	pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo +	<200 e 400pb	200 e <300pb	M. nana
	OE				Negativo	anel ++	anel++	cresc++	pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo +	<200 e 400pb	200 e <300pb	M. nana
32 - 165	OD	F	Árabe	10a	Negativo	anel ++	anel++	cresc++	pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo++	<200 e 400pb	200 e <300pb	M. nana
	OE				Negativo	anel ++	anel++	cresc++	pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo++	<200 e 400pb	200 e <300pb	M. nana
33 - 169	OE	M	BH	8a	Negativo	anel ++	anel++	cresc++	pt	cresc+++	-	Positivo	Positivo++	<200 e 400pb	200 e <300pb	M. nana

1. OD = ouvido direito; 2. OE = ouvido esquerdo; 3. F = fêmea; 4. BH = Brasileiro de Hipismo; 5. a = anos; 6. M = macho; 7. PSI = Puro Sangue Inglês; 8. PSL = Puro Sangue Lusitano.
pt= precipitação; + pouco crescimento; ++ crescimento; +++ crescimento intenso, - negativo.



Figura 1 – Padrão predominante de assimilação de lipídeos : *Tween 20* (alto)(crescimento em anel); sentido horário: 40, (crescimento em anel), 60 (crescimento), 80 (crescimento intenso) e *Cremophor-EL* (centro) negativo.
Amostra: 18 - Monalisa OD

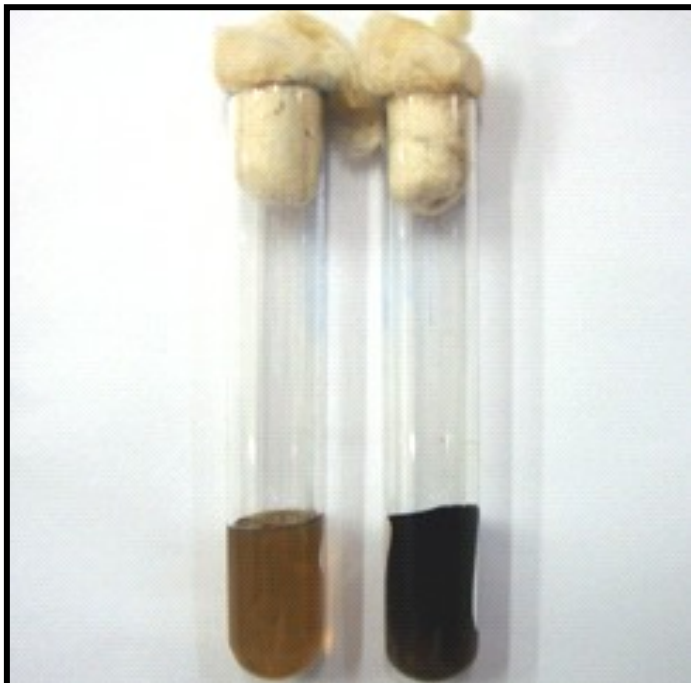


Figura 2 – Degradação de esculina positiva (D) e controle negativo (E).
Amostra: 18 - Monalisa OD

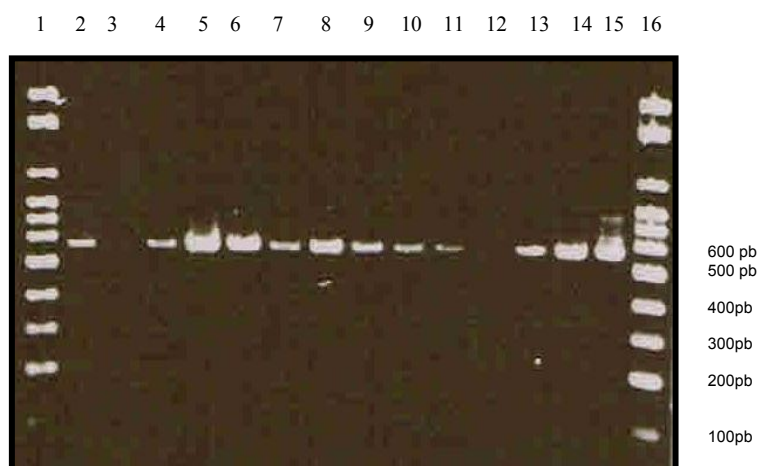


Figura 3 - Produtos de amplificação por PCR.

1 e 16: padrão de peso molecular – 100pb;

2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14 e 15: cepas de *Malassezia* sp – bandas entre 500 e 600pb;

3 e 12: ausência de amplificação.



Figura 4 – Produtos da digestão da enzima BstCI por PCR-RFLP.

1 e 16: padrão de peso molecular – 100 pb

2, 5, 6, 8, 9, 10 e 11: *M. nana* (<200 pb e 400 pb) ;

3 e 4: *M. slooffiae* (>500 pb e <600 pb);

7,12,13,14 e 15: brancos.

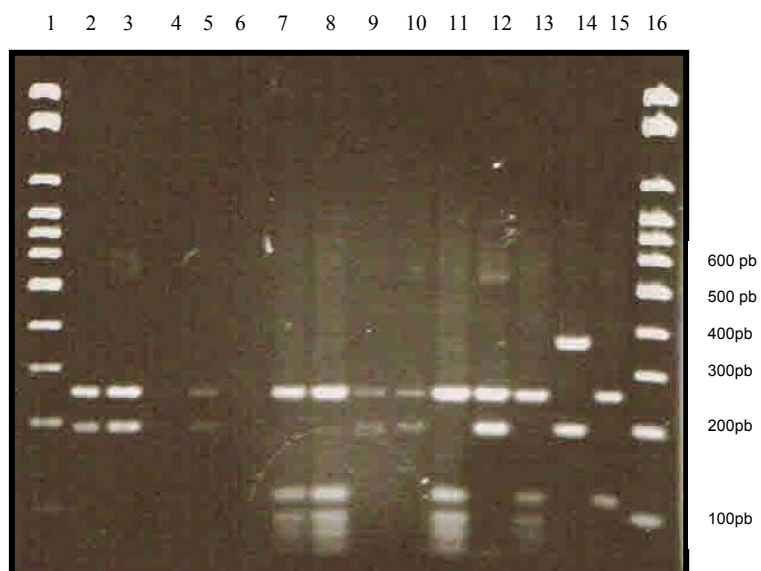


Figura 5 – Produtos da digestão da enzima HhaI por PCR-RFLP.

1 e 16: padrão de peso molecular – 100 pb
 2, 3, 5, 9, 10 e 12: *M. nana* (200 pb e <300pb);
 7, 8, 11 e 13: *M. slooffiae* (>100pb e <300 pb);
 4 e 6: brancos;
 14: *M. furfur* (200pb e <400pb) (CBS 1878);
 15: *M. sympodialis* (>100pb e < 300pb) (CBS7222)

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      10      20      30      40      50      60      70      80
AY743606Ms -----TAAC AAGGATTCCC CTAGTAACGG CGAGCGAAGC GGAAGAGCT CAAATTTGAA AGCTGGCACC
Chim_NL-1 -----TAAC AAGGATTCCC CTAGTAACGG CGAGCGAAGC GGAAGAGCT CAAATTTGAA AGCTGGCACC
Chim_NL-4 -CGGAGGAAA AGAACTAAC AAGGATTCCC CTAGTAACGG CGAGCGAAGC GGAAGAGCT CAAATTTGAA AGCTGGCACC
Sete_NL-1 -----TACGG CGAGCGAAGC GGAAGAGCT CAAATTTGAA AGCTGGCACC
Sete_NL-4 GCGGAGAAA AGAACTAAC AAGGATTCCC CTAGTAACGG CGAGCGAAGC GGAAGAGCT CAAATTTGAA AGCTGGCACC
Clustal Co *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      90      100     110     120     130     140     150     160
AY743606Ms TCCGGTGTC GCGTTGTAAT TTCGAGACGT GTTTCCGCG TGGCGCCATG GACAAGTTCC CTGGAATGGG ACATCGTAGA
Chim_NL-1 TCCGGTGTC GCGTTGTAAT TTCGAGACGT GTTTCCGCG TGGCGCCATG GACAAGTTCC CTGGAATGGG ACATCGTAGA
Chim_NL-4 TCCGGTGTC GCGTTGTAAT TTCGAGACGT GTTTCCGCG TGGCGCCATG GACAAGTTCC CTGGAATGGG ACATCGTAGA
Sete_NL-1 TCCGGTGTC GCGTTGTAAT TTCGAGACGT GTTTCCGCG TGGCGCCATG GACAAGTTCC CTGGAATGGG ACATCGTAGA
Sete_NL-4 TCCGGTGTC GCGTTGTAAT TTCGAGACGT GTTTCCGCG TGGCGCCATG GACAAGTTCC CTGGAATGGG ACATCGTAGA
Clustal Co *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      170     180     190     200     210     220     230     240
AY743606Ms GGGTAAAAA CCGTACTTG CCATGGACGT ACCATGCTTT GCGATACACG CTCCAAGAGT CGAGTAGTTT GGGATTGCTG
Chim_NL-1 GGGTAAAAA CCGTACTTG CCATGGACGT ACCATGCTTT GCGATACACG CTCCAAGAGT CGAGTAGTTT GGGATTGCTG
Chim_NL-4 GGGTAAAAA CCGTACTTG CCATGGACGT ACCATGCTTT GCGATACACG CTCCAAGAGT CGAGTAGTTT GGGATTGCTG
Sete_NL-1 GGGTAAAAA CCGTACTTG CCATGGACGT ACCATGCTTT GCGATACACG CTCCAAGAGT CGAGTAGTTT GGGATTGCTG
Sete_NL-4 GGGTAAAAA CCGTACTTG CCATGGACGT ACCATGCTTT GCGATACACG CTCCAAGAGT CGAGTAGTTT GGGATTGCTG
Clustal Co *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      250     260     270     280     290     300     310     320
AY743606Ms CTCAAAAATG GTGGTAGACT CCATCTAAAG CTAATATATCG GGGAGAGACC GATAGCGAAC AAGTACCGTG AGGGAAGAT
Chim_NL-1 CTCAAAAATG GTGGTAGACT CCATCTAAAG CTAATATATCG GGGAGAGACC GATAGCGAAC AAGTACCGTG AGGGAAGAT
Chim_NL-4 CTCAAAAATG GTGGTAGACT CCATCTAAAG CTAATATATCG GGGAGAGACC GATAGCGAAC AAGTACCGTG AGGGAAGAT
Sete_NL-1 CTCAAAAATG GTGGTAGACT CCATCTAAAG CTAATATATCG GGGAGAGACC GATAGCGAAC AAGTACCGTG AGGGAAGAT
Sete_NL-4 CTCAAAAATG GTGGTAGACT CCATCTAAAG CTAATATATCG GGGAGAGACC GATAGCGAAC AAGTACCGTG AGGGAAGAT
Clustal Co *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      330     340     350     360     370     380     390     400
AY743606Ms GAAAAGCACT TTGGAAGAG AGTTAAAAGT ACGTGAAATT GTCGAAATGG AAGCGCTTGA AGTCAGCCAT GCGGCTGGGG
Chim_NL-1 GAAAAGCACT TTGGAAGAG AGTTAAAAGT ACGTGAAATT GTCGAAATGG AAGCGCTTGA AGTCAGCCAT GCGGCTGGGG
Chim_NL-4 GAAAAGCACT TTGGAAGAG AGTTAAAAGT ACGTGAAATT GTCGAAATGG AAGCGCTTGA AGTCAGCCAT GCGGCTGGGG
Sete_NL-1 GAAAAGCACT TTGGAAGAG AGTTAAAAGT ACGTGAAATT GTCGAAATGG AAGCGCTTGA AGTCAGCCAT GCGGCTGGGG
Sete_NL-4 GAAAAGCACT TTGGAAGAG AGTTAAAAGT ACGTGAAATT GTCGAAATGG AAGCGCTTGA AGTCAGCCAT GCGGCTGGGG
Clustal Co *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      410     420     430     440     450     460     470     480
AY743606Ms ACTCACCTTG GCGTCTCGCT GAGGGTATTT CTCAGTAGC AAGTCAGCAT TGGTTTGC GGCCGGAGAA GGGTCCAGGG
Chim_NL-1 ACTCACCTTG GCGTCTCGCT GAGGGTATTT CTCAGTAGC AAGTCAGCAT TGGTTTGC GGCCGGAGAA GGGTCCAGGG
Chim_NL-4 ACTCACCTTG GCGTCTCGCT GAGGGTATTT CTCAGTAGC AAGTCAGCAT TGGTTTGC GGCCGGAGAA GGGTCCAGGG
Sete_NL-1 ACTCACCTTG GCGTCTCGCT GAGGGTATTT CTCAGTAGC AAGTCAGCAT TGGTTTGC GGCCGGAGAA GGGTCCAGGG
Sete_NL-4 ACTCACCTTG GCGTCTCGCT GAGGGTATTT CTCAGTAGC AAGTCAGCAT TGGTTTGC GGCCGGAGAA GGGTCCAGGG
Clustal Co *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      490     500     510     520     530     540     550     560
AY743606Ms AAGGTGGCAC CCTCGGGTGT GTTATAGCCC TGGACTGGAT ACGGCGCGGC GGACCAAGGA ACGCAGTGTG CCCTCGTGGC
Chim_NL-1 AAGGTGGCAC CCTCGGGTGT GTTATAGCCC TGGACTGGAT ACGGCGCGGC GGACCAAGGA ACGCAGTGTG CCCTCGTGGC
Chim_NL-4 AAGGTGGCAC CCTCGGGTGT GTTATAGCCC TGGACTGGAT ACGGCGCGGC AGACCAAGGA ACGCAGTGTG CCCTCGTGGC
Sete_NL-1 AAGGTGGCAC CCTCGGGTGT GTTATAGCCC TGGACTGGAT ACGGCGCGGC AGACCAAGGA ACGCAGTGTG CCCTCGTGGC
Sete_NL-4 AAGGTGGCAC CCTCGGGTGT GTTATAGCCC TGGACTGGAT ACGGCGCGGC AGACCAAGGA ACGCAGTGTG CCCTCGTGGC
Clustal Co *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| .
      570     580     590     600     610     620
AY743606Ms GGGTCTTCGG ACACCTTCAC ACTTAGGATG CTGGCGTAAT -----
Chim_NL-1 GGGTCTTCGG ACACCTTCAC ACTTAGAATG CTGGCGTAAT GGCTTTAAGC GGCCCGTCTT G
Chim_NL-4 GGGTCTTCGG ACAC----- -----
Sete_NL-1 GGGTCTTCGG ACACCTTCAC A-----
Sete_NL-4 GGGTCTTCGG ACAC----- -----
Clustal Co *****

```

Figura 6 – Alinhamento da sequência dos genes 26S rRNA D1/D2 primers NL1 e NL4. cepa padrão/ CBS7956 *M.slooffiae*; Chim NL-1; Chim NL-4; Sete NL-1; Sete NL-4.

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      10      20      30      40      50      60      70      80
EF140671M. -----CCCC TAGTAACGGC GAGCGAAGCG GGAAGAGCTC AAATTTTGAA
Angel_NL-1 -----C GAGCGAAGCG GGAAGAGCTC AAATTT-GAA
Angel_NL-4 -----TAG CGGAGGAAAA GAAACTAACA AGGATTCCCC TAGTAACGGC GAGCGAAGCG GGAAGAGCTC AAATTT-GAA
Mona_NL-1 -----CG GGAAGAGCTC AAATTT-GAA
Mona_NL-4 ATCAATAAG CGGAGGAAAA GAAACTAACA AGGATTCCCC TAGTAACGGC GAGCGAAGCG GGAAGAGCTC AAATTT-GAA
Clustal Co          **      *      *      *      *      *      *

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      90      100     110     120     130     140     150     160
EF140671M. AGCTTGGCGC CTTCCGGCGT CGCGTTGTAA TCTCGAGACG TGTTTTCCGT GCGGCGCTAT GGACAAGTCC CTTGGAACAG
Angel_NL-1 AGCT-GGCGC CTTCCGGCGT CGCGTTGTAA TCTCGAGACG TGTTTTCCGT GCGGCGCTAT GGACAAGTCC CTTGGAACAG
Angel_NL-4 AGCT-GGCGC CTTCCGGCGT CGCGTTGTAA TCTCGAGACG TGTTTTCCGT GCGGCGCTAT GGACAAGTCC CTTGGAACAG
Mona_NL-1 AGCT-GGCGC CTTCCGGCGT CGCGTTGTAA TCTCGAGACG TGTTTTCCGT GCGGCGCTAT GGACAAGTCC CTTGGAACAG
Mona_NL-4 AGCT-GGCGC CTTCCGGCGT CGCGTTGTAA TCTCGAGACG TGTTTTCCGT GCGGCGCTAT GGACAAGTCC CTTGGAACAG
Clustal Co      ***      *      *      *      *      *      *      *

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      170     180     190     200     210     220     230     240
EF140671M. GGCATCGTAG AGGGTAAAA TCCCGTACTT GCCATGGATG TACCGTGCTT TGTGATACAC GCTCTAAGAG TCGAGTTGTT
Angel_NL-1 GGCATCGTAG AGGGTAAAA TCCCGTACTT GCCATGGATG TACCGTGCTT TGTGATACAC GCTCTAAGAG TCGAGTTGTT
Angel_NL-4 GGCATCGTAG AGGGTAAAA TCCCGTACTT GCCATGGATG TACCGTGCTT TGTGATACAC GCTCTAAGAG TCGAGTTGTT
Mona_NL-1 GGCATCGTAG AGGGTAAAA TCCCGTACTT GCCATGGATG TACCGTGCTT TGTGATACAC GCTCTAAGAG TCGAGTTGTT
Mona_NL-4 GGCATCGTAG AGGGTAAAA TCCCGTACTT GCCATGGATG TACCGTGCTT TGTGATACAC GCTCTAAGAG TCGAGTTGTT
Clustal Co      *****      *      *      *      *      *      *      *

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      250     260     270     280     290     300     310     320
EF140671M. TGGGATTGCA GCTCAAAATG GGTGGTAGAC TCCATCTAAA GCTAAATATC GGGGAGAGAC CGATAGCGAA CAAGTACCGT
Angel_NL-1 TGGGATTGCA GCTCAAAATG GGTGGTAGAC TCCATCTAAA GCTAAATATC GGGGAGAGAC CGATAGCGAA CAAGTACCGT
Angel_NL-4 TGGGATTGCA GCTCAAAATG GGTGGTAGAC TCCATCTAAA GCTAAATATC GGGGAGAGAC CGATAGCGAA CAAGTACCGT
Mona_NL-1 TGGGATTGCA GCTCAAAATG GGTGGTAGAC TCCATCTAAA GCTAAATATC GGGGAGAGAC CGATAGCGAA CAAGTACCGT
Mona_NL-4 TGGGATTGCA GCTCAAAATG GGTGGTAGAC TCCATCTAAA GCTAAATATC GGGGAGAGAC CGATAGCGAA CAAGTACCGT
Clustal Co      *****      *      *      *      *      *      *      *

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      330     340     350     360     370     380     390     400
EF140671M. GAGGGAAAGA TGAAGAAGCAC TTTGGAAAGA GAGTTAAAGG TACGTGAAAT TGTCGAAAGG GAAGCGCTTG AAGTCAGCCA
Angel_NL-1 GAGGGAAAGA TGAAGAAGCAC TTTGGAAAGA GAGTTAAAGG TACGTGAAAT TGTCGAAAGG GAAGCGCTTG AAGTCAGCCA
Angel_NL-4 GAGGGAAAGA TGAAGAAGCAC TTTGGAAAGA GAGTTAAAGG TACGTGAAAT TGTCGAAAGG GAAGCGCTTG AAGTCAGCCA
Mona_NL-1 GAGGGAAAGA TGAAGAAGCAC TTTGGAAAGA GAGTTAAAGG TACGTGAAAT TGTCGAAAGG GAAGCGCTTG AAGTCAGCCA
Mona_NL-4 GAGGGAAAGA TGAAGAAGCAC TTTGGAAAGA GAGTTAAAGG TACGTGAAAT TGTCGAAAGG GAAGCGCTTG AAGTCAGCCA
Clustal Co      *****      *      *      *      *      *      *      *

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      410     420     430     440     450     460     470     480
EF140671M. TGCTGCGCGG ACTCAGCCCG GCTGATGCCT GGTGTATTTC CCAGCAGCAA GCCAGCATGG ATTTGGGTTC CCGGAGAAGG
Angel_NL-1 TGCTGCGCGG ACTCAGCCCG GCTGATGCCT GGTGTATTTC CCAGCAGCAA GCCAGCATGG ATTTGGGTTC CCGGAGAAGG
Angel_NL-4 TGCTGCGCGG ACTCAGCCCG GCTGATGCCT GGTGTATTTC CCAGCAGCAA GCCAGCATGG ATTTGGGTTC CCGGAGAAGG
Mona_NL-1 TGCTGCGCGG ACTCAGCCCG GCTAATGCCT GGTGTATTTC CCAGCAGCAA GCCAGCATGG ATTTGGGTTC CCGGAGAAGG
Mona_NL-4 TGCTGCGCGG ACTCAGCCCG GCTAATGCCT GGTGTATTTC CCAGCAGCAA GCCAGCATGG ATTTGGGTTC CCGGAGAAGG
Clustal Co      *****      *      *      *      *      *      *      *

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      490     500     510     520     530     540     550     560
EF140671M. GCACGAGGAA TGTGGCACTT CGTGTGTGTT AAGCCTCGTG CTGGATACGG CGAGCTGGAT CCAGGAACGC AGTGTGCCTC
Angel_NL-1 GCACGAGGAA TGTGGCACTT CGTGTGTGTT AAGCCTCGTG CTGGATACGG CGAGCTGGAT CCAGGAACGC AGTGTGCCTC
Angel_NL-4 GCACGAGGAA TGTGGCACTT CGTGTGTGTT AAGCCTCGTG CTGGATACGG CGAGCTGGAT CCAGGAACGC AGTGTGCCTC
Mona_NL-1 GCACGAGGAA TGTGGCACTT CGTGTGTGTT AAGCCTCGTG CTGGATACGG CGAGCTGGAT CCAGGAACGC AGTGTGCCTC
Mona_NL-4 GCACGAGGAA TGTG-CACTT CGTGTGTGTT AAGCCTCGTG CTGGATACGG CGAGCTGGNT CCAGGAACGC AGTGTGCCTC
Clustal Co      *****      *      *      *      *      *      *      *

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      570     580     590     600     610     620     630
EF140671M. TGGCGGGTCT TCGGACACCT T-----
Angel_NL-1 TGGCGGGTCT TCGGACACCT TCACACTTAG GATGCTGGCG TAATGGCTTT AAGCGGCCCG T-----
Angel_NL-4 TGGCGGGTCT TCGGACAC-- TCACACTTAG GATGCTGGCG TAATGGCTTT AAGCGGCCCG TCTTGAAACA CGG
Mona_NL-1 TGGCGGGTCT TCGGACACCT TCACACTTAG GATGCTGGCG TAATGGCTTT AAGCGGCCCG T-----
Mona_NL-4 TGGCGG---- TCACACTTAG GATGCTGGCG TAATGGCTTT AAGCGGCCCG T-----
Clustal Co      *****      *      *      *      *      *      *

```

Figura 7 – Alinhamento da sequência dos genes 26S rRNA D1/D2 NL1 e NL4.
 cepa padrão CBS9557 *M. nana*; Angel NL1; Angel NL-4; Mona NL-1 Mona NL-4.

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      10      20      30      40      50      60      70      80
AY387146 M  -----TGCCTGGG GTATTTGAGA TACGCACGCG GGGTTTGAGA TACGCACGCT ACACAACGTG CCTCTCCCCC AATCCACTAT
Chim ITS-5  --TGCCTGGG GTATTTGAGA TACGCACGCG AACAACGTGC CTCTCCCCCA ATCCACTATT CTCCACAAAC CCTGTGCATT
Chim ITS-4  -----TGCCTGGG GTATTTGAGA TACGCACGCG AACAACGTGC CTCTCCCCCA ATCCACTATT CTCCACAAAC CCTGTGCATT
Sete ITS-5  -----TGCCTGGG GTATTTGAGA TACGCACGCG AACAACGTGC CTCTCCCCCA ATCCACTATT CTCCACAAAC CCTGTGCATT
Sete ITS-4  -----TGCCTGGG GTATTTGAGA TACGCACGCG AACAACGTGC CTCTCCCCCA ATCCACTATT CTCCACAAAC CCTGTGCATT
Clustal Co  -----TGCCTGGG GTATTTGAGA TACGCACGCG AACAACGTGC CTCTCCCCCA ATCCACTATT CTCCACAAAC CCTGTGCATT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      90      100     110     120     130     140     150     160
AY387146 M  TTATCCACAA ACCCTGTGCA CCGTGTGGAA GCG--CGTTT GGATTGCTTA ATGGCG--T CCGGGCGCCT TCCTTCTCTA
Chim ITS-5  GTAAGGGAAG TTGTTGGGTT GCGAATGGCG GCCTTTACCG GGTCTGCTTG TTTGGAA--T CCGCCTTCCT TTTCTCTCTG
Chim ITS-4  GTAAGGGAAG TTGTTGGGTT GCGAATGGCG GCCTTTACCG GGTCTGCTTG TTTGGAA--T CCGCCTTCCT TTTCTCTCTG
Sete ITS-5  GTAAGGGAAG TTGTTGGGTT GCGAATGGCG GCCTTTACCG GGTCTGCTTG TTTGGAA--T CCGCCTTCCT TTTCTCTCTG
Sete ITS-4  ---GGGAAG TTGTTGGGTT GCGAATGGCG GCCTTTACCG GGTCTGCTTG TTTGGAA--T CCGCCTTCCT TTTCTCTCTG
Clustal Co  *      **      **      **      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      170     180     190     200     210     220     230     240
AY387146 M  AAAAAACACG ATGTTTGTAT GAACGTGATG GATGTTGGTT CACAACCAAC GAACAAA-- CACAACCTTC GACAACGGAT
Chim ITS-5  AAAAA-CACGC ATGTTTGTAT GAACGTGAGA AGCGTTGGTT CACAACCAAC AAACAAAAA CACAACCTTC GACAACGGAT
Chim ITS-4  AAAAA-CACGC ATGTTTGTAT GAACGTGAGA AGCGTTGGTT CACAACCAAC AAACAAAAA CACAACCTTC GACAACGGAT
Sete ITS-5  AAAAA-CACGC ATGTTTGTAT GAACGTGAGA AGCGTTGGTT CACAACCAAC AAACAAAAA CACAACCTTC GACAACGGAT
Sete ITS-4  AAAAA-CACGC ATGTTTGTAT GAACGTGAGA AGCGTTGGTT CACAACCAAC AAACAAAAA CACAACCTTC GACAACGGAT
Clustal Co  ****      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      250     260     270     280     290     300     310     320
AY387146 M  CTCTTGTTTC TCCCATCGAT GAAGAACGCA GCGAAACGCG ATAGGTAATG TGAATTGCAG AATTCCGTGA ATCATCGAAT
Chim ITS-5  CTCTTGTTTC TCCCATCGAT GAAGAACGCA GCGAAACGCG ATAGGTAATG TGAATTGCAG AATTCCGTGA ATCATCGAAT
Chim ITS-4  CTCTTGTTTC TCCCATCGAT GAAGAACGCA GCGAAACGCG ATAGGTAATG TGAATTGCAG AATTCCGTGA ATCATCGAAT
Sete ITS-5  CTCTTGTTTC TCCCATCGAT GAAGAACGCA GCGAAACGCG ATAGGTAATG TGAATTGCAG AATTCCGTGA ATCATCGAAT
Sete ITS-4  CTCTTGTTTC TCCCATCGAT GAAGAACGCA GCGAAACGCG ATAGGTAATG TGAATTGCAG AATTCCGTGA ATCATCGAAT
Clustal Co  *****      *****      *****      *****      *****      *****      *****      *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      330     340     350     360     370     380     390     400
AY387146 M  CTTTGAACGC ACCTTGCCTC CTGTGGTATT CCGCAGAGCA TGCCTGTTTG AGTGCCGTGA AATCTCTCCC CCCAAGTGGT
Chim ITS-5  CTTTGAACGC ACCTTGCCTC CTGTGGTATT CCGCAGAGCA TGCCTGTTTG AGTGCCGTGA AATCTCTCCC CCCAAGTGGT
Chim ITS-4  CTTTGAACGC ACCTTGCCTC CTGTGGTATT CCGCAGAGCA TGCCTGTTTG AGTGCCGTGA AATCTCTCCC CCCAAGTGGT
Sete ITS-5  CTTTGAACGC ACCTTGCCTC CTGTGGTATT CCGCAGAGCA TGCCTGTTTG AGTGCCGTGA AATCTCTCCC CCCAAGTGGT
Sete ITS-4  CTTTGAACGC ACCTTGCCTC CTGTGGTATT CCGCAGAGCA TGCCTGTTTG AGTGCCGTGA AATCTCTCCC CCCAAGTGGT
Clustal Co  *****      *****      *****      *****      *****      *****      *****      *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      410     420     430     440     450     460     470     480
AY387146 M  G-----TTTGTATAGS ACGCTACGCG GCGGCGGAGG TTGGATGAGC GTCGTGCCTA CCGCGCTTGG TAGGCTCGCT
Chim ITS-5  GT-----TTG TATATCTAGS ACGCTACGCG GCGGCGGAGG TTGGATGAGC GTCGTG--C CTGCTTCCGG TAGGCTCGCT
Chim ITS-4  GT-----TTG TATATCTAGS ACGCTACGCG GCGGCGGAGG TTGGATGAGC GTCGTG--C CTGCTTCCGG TAGGCTCGCT
Sete ITS-5  GTGCTGTTTG TATATCTAGS ACGCTACGCG GCGGCGGAGG TTGGATGAGC GTCGTG-GC CTGCTTCCGG TAGGCTCGCT
Sete ITS-4  GTGCTGTTTG TATATCTAGS ACGCTACGCG GCGGCGGAGG TTGGATGAGC GTCGTG-GC CTGCTTCCGG TAGGCTCGCT
Clustal Co  *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      490     500     510     520     530     540     550     560
AY387146 M  CGAAAAGCAT GAGCGCTT-G AGAACAATTG TCGCCTGTGA GAGCAGGCGG GGCAGAACAG GTGAGCGAAT GCTTCTCCTC
Chim ITS-5  CGAAAAGCAT GAGCGCTTTG GAGACACTTG TCGCCTGTGA GAGCAGGCGG GGCAGAGCAG GTGAGCGAAG GCTTCTCTCT
Chim ITS-4  CGAAAAGCAT GAGCGCTTTG GAGACACTTG TCGCCTGTGA GAGCAGGCGG GGCAGAGCAG GTGAGCGAAG GCTTCTCTCT
Sete ITS-5  CGAAAAGCAT GAGCGCTTTG GAGACACTTG TCGCCTGTGA GAGCAGGCGG GGCAGAGCAG GTGAGCGAAG GCTTCTCTCT
Sete ITS-4  CGAAAAGCAT GAGCGCTTTG GAGACACTTG TCGCCTGTGA GAGCAGGCGG GGCAGAGCAG GTGAGCGAAG GCTTCTCTCT
Clustal Co  *****      *****      *      *****      *****      *****      *****      *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      570     580     590     600     610     620     630     640
AY387146 M  C---GGAGAA GCGGCCACCG GTCTGCGTGT GCGCATGGCA TGATACGTTT CTTGCTATGT GTGGCGCGCA AACCCCATCT
Chim ITS-5  CACGGGAGAA GCGGCCACCG GTCTGCGTGT GCGCATGGCA TGATACGTTT CTTGCTATGT GTGGC-CGCG GCCAGTCTTG
Chim ITS-4  CACGGGAGAA GCGGCCACCG GTCTGCGTGT GCGCATGGCA TGATACGTTT CTTGCTATGT GTGGC-CGCG GCCAGTCTTG
Sete ITS-5  CACGGGAGAA GCGGCCACCG GTCTGCGTGT GCGCATGGCA TGATACGTTT CTTGCTATGT GTGGC-CGCG -----
Sete ITS-4  CACGGGAGAA GCGGCCACCG GTCTGCGTGT GCGCATGGCA TGATACGTTT CTTGCTATGT GTGGC-CGCG GCCAGTCTTG
Clustal Co  *      *****      *****      *****      *****      *****      *****      *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      650     660     670     680     690     700     710
AY387146 M  GGGTTAGTAG CTCTTT-GCT TCTGGCGTGA TCTCG-TGTG CGCTTCGAAT CGCACAGCCC TCTCTTCAC-
Chim ITS-5  GG-----TCTCTTTGCT TCTGGCGTGA TCTCGGTGTG CGCTTCCAAT GGCACAGCCC TCTCTTCACT
Chim ITS-4  GGGTTAGTAG CTCTTTGCT TCTGGCGTGA TCTCGGTGTG CGCTTCCAAT GGCACAGCCC TCTCTTCACT
Sete ITS-5  GGGTTAGTAG CTCTTTGCT TCTGGCGTGA TCTCGGTGTG CGCTTCCAAT GGCACAGCCC TCTCTTCACT
Sete ITS-4  GGGTTAGTAG CTCTTTGCT TCTGGCGTGA TCTCGGTGTG CGCTTCCAAT GGCACAGCCC TCTCTTCACT
Clustal Co  GGGTTAGTAG CTCTTTGCT TCTGGCGTGA TCTCGGTGTG CGCTTCCAAT GGCACAGCCC TCTCTTCACT--

```

Figura 8 – Alinhamento da sequência dos genes ITS1-58S-ITS2 rRNA ITS5 e ITS4. cepa padrão CBS7956 *M.slooffiae*; Chim ITS-5; Chim ITS-4; Sete ITS5; Sete ITS -4.

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      10      20      30      40      50      60      70      80
EF140666M. -----AGCC ATACGGATAT GCAAAACTGC
Ang ITS-5 -----ATCA TTAGTGAAGC ATGGGCAGCC ATAAGGATAT GCAAAACTGC
Ang ITS-4 TCGTAACAAG GTTCTCTAG GTGAACCTGC AGAAGGATCA TTAGTGAAGC ATGGGCAGCC ATAAGGATAT GCAAAACTGC
Mona ITS-5 -----ATCA TTAGTGAAGC ATGGGCAGCC ATACGGATAT GCAAAACTGC
Mona ITS-4 --GTAACAAG GTTCTCTAG GTGAACCTGC AGAAGGATCA TTAGTGAAGC ATGGGCAGCC ATACGGATAT GCAAAACTGC
Clustal Co          **** * * * * *

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      90      100     110     120     130     140     150     160
EF140666M. GTGTCCCTGG CGCCTAACCC ACTATATCCA CTTAACCCCT GTGCACTGTG TCGGGATGCG ATGATTGTTC ATTGCGTCCG
Ang ITS-5 GTGTCCCTGG CGCCTAACCC ACTATATCCA CTTAACCCCT GTGCACTGTG TCGGGATGCG ATGATTGTTC ATTGCGTCCG
Ang ITS-4 GTGTCCCTGG CGCCTAACCC ACTATATCCA CTTAACCCCT GTGCACTGTG TCGGGATGCG ATGATTGTTC ATTGCGTCCG
Mona ITS-5 GTGTCCCTGG CGCCTAACCC ACTATATCCA CTTAACCCCT GTGCACTGTG TCGGGATGCG ATGATTGTTC ATTGCGTCCG
Mona ITS-4 GTGTCCCTGG CGCCTAACCC ACTATATCCA CTTAACCCCT GTGCACTGTG TCGGGATGCG ATGATTGTTC ATTGCGTCCG
Clustal Co *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      170     180     190     200     210     220     230     240
EF140666M. CCCAAGTATA AACTCGTATG GTTGTATGTA CGTGGAAAAA GTAGGACAAA CCTACGAACC AAACACAAC TTCGACAACG
Ang ITS-5 CCCAAGTATA AACTCGTATG GTTGTATGTA CGTGGAAAAA GTAGGACAAA CCTACGAACC AAACACAAC TTCGACAACG
Ang ITS-4 CCCAAGTATA AACTCGTATG GTTGTATGTA CGTGGAAAAA GTAGGACAAA CCTACGAACC AAACACAAC TTCGACAACG
Mona ITS-5 CCCAAGTATA AACTCGTATG GTTGTATGTA CGTGGAAAAA GTAGGACAAA CCTACGAACC AAACACAAC TTCGACAACG
Mona ITS-4 CCCAAGTATA AACTCGTATG GTTGTATGTA CGTGGAAAAA GTAGGACAAA CCTACGAACC AAACACAAC TTCGACAACG
Clustal Co *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      250     260     270     280     290     300     310     320
EF140666M. GATCTCTTGG TTCTCCCATC GATGAAGAAC GCAGCGAAAC GCGATAGGTA ATGTGAATTG CAGAATTCCG TGAATCATCG
Ang ITS-5 GATCTCTTGG TTCTCCCATC GATGAAGAAC GCAGCGAAAC GCGATAGGTA ATGTGAATTG CAGAATTCCG TGAATCATCG
Ang ITS-4 GATCTCTTGG TTCTCCCATC GATGAAGAAC GCAGCGAAAC GCGATAGGTA ATGTGAATTG CAGAATTCCG TGAATCATCG
Mona ITS-5 GATCTCTTGG TTCTCCCATC GATGAAGAAC GCAGCGAAAC GCGATAGGTA ATGTGAATTG CAGAATTCCG TGAATCATCG
Mona ITS-4 GATCTCTTGG TTCTCCCATC GATGAAGAAC GCAGCGAAAC GCGATAGGTA ATGTGAATTG CAGAATTCCG TGAATCATCG
Clustal Co *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      330     340     350     360     370     380     390     400
EF140666M. AATCTTTGAA CGCAACTTGC GCTCCATGGT ATTCCGTGGA GCATGCCTGT TTGAGTGCCG CGAATTCTCC CTCCCATGCG
Ang ITS-5 AATCTTTGAA CGCAACTTGC GCTCCATGGT ATTCCGTGGA GCATGCCTGT TTGAGTGCCG CGAATTCTCC CTCCCATGCG
Ang ITS-4 AATCTTTGAA CGCAACTTGC GCTCCATGGT ATTCCGTGGA GCATGCCTGT TTGAGTGCCG CGAATTCTCC CTCCCATGCG
Mona ITS-5 AATCTTTGAA CGCAACTTGC GCTCCATGGT ATTCCGTGGA GCATGCCTGT TTGAGTGCCG CGAATTCTCC CTCCCATGCG
Mona ITS-4 AATCTTTGAA CGCAACTTGC GCTCCATGGT ATTCCGTGGA GCATGCCTGT TTGAGTGCCG CGAATTCTCC CTCCCATGCG
Clustal Co *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      410     420     430     440     450     460     470     480
EF140666M. GGTGGCCGCA AGGCCGGAGC GTGGCGGTTA GGGGTAGGAT GGGTGCCCTG CCTGGCGGCT TGGACCGCTA GGCTCGCCCG
Ang ITS-5 GGTGGCCGCA AGGCCGGAGC GTGGCGGTTA GGGGTAGGAT GGGTGCCCTG CCTGGCGGCT TGGACCGCTA GGCTCGCCCG
Ang ITS-4 GGTGGCCGCA AGGCCGGAGC GTGGCGGTTA GGGGTAGGAT GGGTGCCCTG CCTGGCGGCT TGGACCGCTA GGCTCGCCCG
Mona ITS-5 GGTGGCCGCA AGGCCGGAGC GTGGCGGTTA GGGGTAGGAT GGGTGCCCTG CCTGGCGGCT TGGACCGCTA GGCTCGCCCG
Mona ITS-4 GGTGGCCGCA AGGCCGGAGC GTGGCGGTTA GGGGTAGGAT GGGTGCCCTG CCTGGCGGCT TGGACCGCTA GGCTCGCCCG
Clustal Co *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      490     500     510     520     530     540     550     560
EF140666M. AAATGCATAA GCGCCAGGAC CCTCGCTACT GCTCTCTAGG GAAGAGCAGC CGAGCGACCG CTGAGCATGG CATGATACGT
Ang ITS-5 AAATGCATAA GCGCCAGGAC CCTCGCTACT GCTCTCTAGG GAAGAGCAGC CGAGCGACCG CTGAGCATGG CATGATACGT
Ang ITS-4 AAATGCATAA GCGCCAGGAC CCTCGCTACT GCTCTCTAGG GAAGAGCAGC CGAGCGACCG CTGAGCATGG CATGATACGT
Mona ITS-5 AAATGCATAA GCGCCAGGAC CCTCGCTACT GCTCTCTAGG GAAGAGCAGC CGAGCGACCG CTGAGCATGG CATGATACGT
Mona ITS-4 AAATGCATAA GCGCCAGGAC CCTCGCTACT GCTCTCTAGG GAAGAGCAGC CGAGCGACCG CTGAGCATGG CATGATACGT
Clustal Co *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      570     580     590     600     610     620     630     640
EF140666M. CATTTGTCTAT GTGTGGGCGG CCGGACGGAG AGGTGTCTGC TTTATAACAA GCCCTTTT- -
Ang ITS-5 CATTTGTCTAT GTGTGGGCGG CCGGACGGAG AGGTGTCTGC TTTATAACAA GCCCTTTT- -
Ang ITS-4 CATTTGTCTAT GTGTGGGCGG CCGGACGGAG AGGTGTCTGC TTTATAACAA GCCC-----
Mona ITS-5 CATTTGTCTAT GTGTGGGCGG CCGGACGGAG AGGTGTCTGC TTTATAACAA GCCCTTTT- -
Mona ITS-4 CATTTGTCTAT GTGTGGGCGG CCGGACGGAG AGGTGTCTGC TTTATAACAA GCCCTTTT- -
Clustal Co *****

      ....|....| ....|....|
      650     660     670
EF140666M. -----
Ang ITS-5 AGGATCACCC GCTGAACCTTA AGCATATCAT
Ang ITS-4 AGGATCACCC GCTGAACCTTA AGCAT-----
Mona ITS-5 AGGATCACCC GCTGAACCTTA AGCAT-----
Mona ITS-4 AGGATCACCC GCTGAACCTTA AGCAT-----
Clustal Co -----

```

Figura 9 – Alinhamento da sequência dos genes ITS1-58S-ITS2 rRNA ITS5 e ITS4. cepa padrão CBS9557 *M.nana*; Angel ITS-5; Angel ITS-4; Mona ITS-5; Mona ITS-4.

5. DISCUSSÃO

Os métodos empregados nesta pesquisa, preconizados por grande parte dos pesquisadores, possibilitaram o isolamento adequado das leveduras (CRESPO *et al.*, 2000; GUÉHO *et al.*, 1996; MIDGLEY, 2000).

No presente estudo, verificou-se alta porcentagem de isolamento de leveduras do gênero *Malassezia* nos animais (60%) e nas amostras de cerúmem (48,6%). A frequência de *Malassezia* lipodependente observada na microbiota dos condutos auditivos foi similar, ou até mesmo superior, àquelas referidas por outros pesquisadores, que relataram a presença dessa levedura na microbiota cutânea de equinos (CRESPO *et al.*, 2002b; NELL *et al.*, 2002; WHITE *et al.*, 2006). Essa alta frequência de isolamento revelou que as leveduras lipodependentes são integrantes da microbiota fúngica do conduto auditivo dos equinos pesquisados neste estudo.

Deve-se ressaltar que não houve isolamento de *M. pachydermatis*, considerada a principal espécie da microbiota cutânea de animais (GUILLOT e BOND, 1999).

Em anos recentes, as espécies lipodependentes do gênero têm sido isoladas de pele e mucosas de animais sadios (CAFARCHIA *et al.*, 2005; COUTINHO *et al.*, 2006), assim como de animais com infecção (CAFARCHIA *et al.*, 2005; CRESPO *et al.*, 2002a; NARDONI *et al.*, 2005;).

A otite externa é considerada uma afecção grave, porém de baixa incidência em equinos e a presença de *Malassezia* spp. em microbiota de conduto auditivo sugere a possibilidade dessas leveduras causarem processos infecciosos, como ocorre em outras espécies domésticas (CAFARCHIA *et al.*, 2005; CRESPO *et al.*, 2002a; DIZOTTI e COUTINHO, 2007; NARDONI *et al.*, 2005), e já relatado em infecções cutâneas nesses animais (PATERSON, 2002).

Os fatores ligados à transição de *Malassezia* spp. de organismos comensais a patógenos são pouco compreendidos, mas aparentemente, refletem nos mecanismos físicos, químicos e imunológicos normais, que restringem a colonização cutânea (CAFARCHIA *et al.*, 2005). Assim, sob circunstâncias de modificação do ecossistema da pele, as leveduras desse gênero multiplicam-se demais e adquirem caráter patogênico, sendo

consideradas fungos oportunistas (CAFARCHIA *et al.*, 2005; NARDONI *et al.*, 2004).

Ao se analisar o comportamento das cepas na assimilação ou não dos lipídeos testados, o crescimento frente à *Tween* 20, 40, 60 e 80, e ausência frente ao *Cremophor-EL*, reportaria a três espécies: *M. sympodialis*, *M. nana* e *M. equina*; entretanto, o padrão de crescimento obtido neste estudo divergiu do esperado para essas três espécies, uma vez que na interpretação dessas provas também são analisadas a intensidade de crescimento, crescimento em anel e formação de halo de precipitação, demonstrando o quanto elas podem ser subjetivas. Acrescente-se ainda, que *M. equina* e *M. slooffiae* não degradam esculina e as cepas testadas neste projeto produziram a enzima β -glicosidase, o que resultou em degradação de esculina por todas elas.

Embora essas técnicas fossem capazes de reconhecer 7 espécies do gênero (GUILLOT *et al.*, 1996), os testes fenotípicos não são adequados e suficientes quando se estão pesquisando as 14 espécies existentes, necessitando-se de complementação com provas moleculares. Portanto, há a necessidade de se obter e padronizar outros testes fenotípicos, a fim de que possam ser utilizados em laboratórios de diagnóstico clínico.

Em vista do exposto, para a caracterização de espécies têm-se utilizado métodos genéticos, em particular *RFLP*, que propicia a diferenciação de 11, dentre as 14 espécies lipodependentes (MIRHENDI *et al.*, 2005).

Na técnica de *PCR-RFLP*, ao ser submetido à clivagem com uma enzima, o produto de amplificação é cortado em sítios de restrição, gerando fragmentos de diversos tamanhos e, conseqüentemente, originando bandas de diferentes pesos moleculares, observadas em gel de eletroforese.

O perfil de bandas gerado através de *PCR-RFLP* permitiu identificar todas as cepas em duas espécies, *M. nana* e *M. slooffiae*. Entretanto, em equinos foi identificada espécie de *Malassezia* (*M. equina*) que, até o momento, só pode ser caracterizada através de sequenciamento do gene 26S rRNA (CABAÑES *et al.*, 2007).

Precisamente por se tratar de amostras clínicas provenientes de equinos, foram escolhidas, aleatoriamente, duas cepas de cada uma das

espécies, que foram enviadas para sequenciamento genético, a fim de confirmação da identificação obtida por *RFLP*.

O sequenciamento genético confirmou que as espécies caracterizadas por *RFLP*, realmente se tratavam de *M. nana* e *M. slooffiae*. As sequências obtidas nas quatro cepas analisadas foram comparadas com o banco de dados do CBS (www.cbs.Knaw.nl/), que mantém e disponibiliza os perfis genéticos dos fungos e sua identificação em espécies, sendo atualmente o banco de depósito de fungos mais confiável. ***

Os resultados obtidos e corroborados pelo sequenciamento são surpreendentes, uma vez que não se isolou *M. equina* nos animais estudados e *M. nana* representou mais de 80% das cepas isoladas. Poderia se inferir que *M. nana* seria a espécie mais prevalente em microbiota de conduto auditivo externo de equinos, e não *M. equina*; porém, deveria se ampliar a amostragem, com levantamentos epidemiológicos em várias regiões, a fim de se confirmar esses dados, uma vez que todos os animais estudados estavam alocados em uma única instituição e submetidos às mesmas condições de manejo.

M. nana também já foi isolada de gatos acometidos por otite externa e de bovinos com e sem otite, sugerindo fazer parte da microbiota de algumas espécies animais, não tendo sido isolada do homem (HIRAI *et al.*, 2004).

Embora não haja no Brasil pesquisas publicadas sobre as diferentes espécies de *Malassezia* em microbiota de conduto auditivo de equinos, o que impede o cotejamento dos resultados, estudos em outros países comprovaram a participação desses microrganismos como agentes de dermatite (PATERSON, 2002) e pertencentes à microbiota cutânea desses animais (CRESPO *et al.*, 2002b; NELL *et al.*, 2002; WHITE *et al.*, 2006).

Outro aspecto a ser relatado é que laboratórios de diagnóstico veterinário utilizam meios de cultura sem fontes lipídicas, não possibilitando o crescimento de *Malassezia* lipodependente, e, obtendo-se assim resultados falso-negativos. Provavelmente, essa é a causa da imensa maioria das publicações no país referir apenas *M. pachydermatis* em microbiota e causando infecções em animais.

*** de Hoog, S. Comunicação Pessoal, Berlim, 2012.

Neste projeto, a técnica *PCR-RFLP* foi capaz de identificar genotipicamente as espécies de *Malassezia* com alta precisão e confiabilidade. Utilizando apenas *PCR* e duas enzimas de restrição, esta técnica mostrou-se eficaz, simples e rápida, e talvez possa ser aplicada na rotina dos laboratórios clínicos.

Conclui-se que a caracterização genética é imprescindível em estudos com amostras clínicas provenientes de equinos e evidencia-se, a necessidade de se ampliar pesquisas que possibilitem maior compreensão do encontro dessas leveduras lipodependentes, e as espécies constituintes da microbiota, uma vez que, em outras espécies animais, já está demonstrado que *Malassezia* spp. podem se constituir em importantes agentes etiológicos de infecções micóticas.

6. CONCLUSÕES

Neste estudo, *M. nana* foi a principal espécie do gênero *Malassezia* encontrada em conduto auditivo externo de equinos, representando mais de 80% dos isolados.

Há necessidade de se ampliar os levantamentos epidemiológicos sobre a presença de *Malassezia* spp. em microbiota de equinos, para se verificar se *M. nana* é a principal espécie do gênero da superfície cutânea desses animais, e não *M. equina*.

As técnicas fenotípicas não se mostraram adequadas para a identificação de espécies de *Malassezia* lipodependentes provenientes de equinos.

As técnicas moleculares se mostraram imprescindíveis na identificação de *Malassezia* spp. nesta pesquisa. Dentre as empregadas, se recomendaria *RFLP*, por ser de execução e interpretação mais simples, e menos custosa que o sequenciamento genético.

Os laboratórios de diagnóstico clínico veterinário devem estar obtendo resultados falso-negativos ao pesquisar agentes etiológicos de otites/dermatites micóticas em equinos, uma vez que as técnicas por eles empregadas não permitem o isolamento de cepas lipodependentes, que se constituíram na totalidade dos isolados neste projeto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENTUBO, H.D.L.; ALDROVANDI, A.L.; CAVALCANTI, S.D.B.; COUTINHO, S.D.; FISCHMAN, O. Equine external otitis due *Trichosporon inkin* in Brazil. *Mycoses*, v. 55, supl. 4, p.151, 2012.

BOND, R.; FERGUSON, E. A.; CURTIS, C.F.; CRAIG, J.M.; LLOYD, D.H. Factors associated with elevated cutaneous *Malassezia pachydermatis* populations in dogs with pruritic skin disease. **J. Small Anim. Pract.**, v. 37, p. 103-7, 1996.

BOND, R.; LLOYD, D.H. Skin and mucosal populations of *Malassezia pachydermatis* in healthy and seborrhoeic Basset Hounds. **Vet. Dermatol.**, v. 8, p. 101-6, 1997.

BOND, R.; LAMPORT, A.I.; LLOYD, D.H. Colonisation status of *Malassezia pachydermatis* on the hair and in the hair follicle of healthy beagle dogs. **Res. Vet. Sci.**, v.68, p. 291-293, 2000.

CABAÑES, J.; THEELEN, B.; CASTELLÁ, G.; BOECKHOUT, T. Two new lipid-dependent *Malassezia* species from domestic animals. **FEMS Yeast Res.**, v.7, p. 1064-1076, 2007.

CABAÑES, J.; VEGA, S.; CASTELLÁ, G. *Malassezia cuniculi* sp. nov., a novel yeast species isolated from rabbit skin. **Med. Mycol.**, v.49, p. 40–48, 2011.

CAFARCHIA, C. ; GALLO, S. ; CAPELLI, G. ; OTRANTO, D. Occurrence and population size of *Malassezia* spp. in the external ear canal of dogs and cats both healthy and with otitis. **Mycopathologia**, v.160, p. 143-149, 2005.

CBS-Knaw Fungal Biodiversity Centre. Disponível em: <http://www.cbs.knaw.nl/>. Acesso em 26 de setembro de 2012.

CHEN, T.; HILL, P.B. The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. **Vet. Dermatol.**, v. 16, p. 4-26, 2005.

COUTINHO, S. D.; FEDULLO, J. D.; CORRÊA, S. H. Isolation of *Malassezia* spp. from cerumen of wild felids. **Med. Mycol.**, v.44; p. 383-387, 2006.

CRESPO, M.J.; ABARCA, M.L.; CABAÑES, F.J. Atypical lipid-dependent *Malassezia* species isolated from dogs with otitis externa. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 2382-5, 2000.

CRESPO, M.J.; ABARCA, M.L.; CABAÑES, F.J. Occurrence of *Malassezia* spp. in the external ear canals of dogs and cats with and without otitis externa. **Med. Mycol.**, v. 40, p. 115-21, 2002a.

CRESPO, M.J.; ABARCA, M.L.; CABAÑES, F. J. Occurrence of *Malassezia* spp. in horses and domestic ruminants. **Mycoses**, v.45, p. 333-337, 2002b.

DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUEIRAS, M.J. **Atlas of clinical mycology**. Würzburg: University of Würzburg, 2000. CD-ROM, version 2004.11.

DIZOTTI, C.E.; COUTINHO, D.A. Isolation of *Malassezia pachydermatis* and *M. sympodialis* from the external ear canal of cats with and without otitis externa. **Acta Vet. Hung.**, v. 55, p. 471-477, 2007.

DUARTE, E.R.; MELO, M.; HAHN, R.; HAMDAN, J. Prevalence of *Malassezia* spp. in the ears of asymptomatic cattle and cattle with otitis in Brazil. **Med. Mycol.**, v. 37, p. 159-62, 1999.

GUÉHO, E.; MIDGLEY, G.; GUILLOT, J. The genus *Malassezia* with description of four new species. **Ant. Leeuwen.**, v. 69, p. 337-55, 1996.

GUILLOT, J.; GUÉHO, E.; LESOURD, M.; MIDGLEY, G.; CHÉVRIER, G.; DUPONT, B. Identification of *Malassezia* species. **J. Mycol. Méd.**, v. 6, p. 103-10, 1996.

GUILLOT, J.; BOND, R. *Malassezia pachydermatis*: a review. **Med. Mycol.**, v. 37, p. 295-306, 1999.

HIRAI, A.; KANO, R.; MAKIMURA, K.; DUARTE, E.R.; HAMDAN, J.S.; LACHANCE, M.A.; YAMAGUCHI, H.; HASEGAWA, A. *Malassezia nana* sp nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 54, p. 623-7, 2004.

MAYSER, P.; HAZE, P.; PAPAVALASSILIS, C.; PICKEL, M.; GRUENDER, K.; GUÉHO, E. Differentiation of *Malassezia* species: selectivity of Cremophor EL, castor oil and rinoleic acid for *M. furfur*. **Br. J. Dermatol.**, v. 137, p. 208-13, 1997.

MIDGLEY, G. The lipophilic yeasts: state of the art and prospects. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 9-16, 2000.

MIRHENDI, H., MAKIMURA, K., ZOMORODIAN, K., YAMADA, T., SUGITA, T. ; YAMAGUCHI, H. A simple PCR-RFLP method for identification and differentiation of 11 *Malassezia* species. **J. Microbiol. Meth.**, v.61, p. 281-284, 2005.

NARDONI, S.; MANCIANTI, F.; RUM, A.; CORAZZA, M. Isolation of *Malassezia* species from healthy cats and cats with otitis. **J. Fel. Med. Surg.**, v. 7, p. 141-5, 2005.

NELL, A.; JAMES, S. A.; BOND, C. J.; HUNT, B.; HERRTAGE, M. E. Identification and distribution of a novel *Malassezia* species yeast on normal equine skin. **Vet. Rec.**, v.150, p. 395-398, 2002.

PATERSON, S. Identification of *Malassezia* from a horse's skin. **Equine Vet. Educ.**, v. 14, p. 121-125, 2002.

SUGITA, T., TAKASHIMA, T., SHINODA, T., SUTO, H., UNNO, T., TSUBOI, R., OGAWA, H., NISHIKAWA, A. New species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 1363-7, 2002.

SUGITA, T., TAKASHIMA, T., KODAMA, M., TSUBOI, R., NISHIKAWA, A. Description of a new species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 4695-9, 2003.

SUGITA, T., TAJIMA, M., TAKASHIMA, M., AMAYA, M.; SAITO, M.; TSUBOI, R., NISHIKAWA, A. A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. **Microbiol. Immunol.**, v. 48, p. 579-83, 2004.

THOMASSIAN, A. Afecções dos ouvidos e anexos. In: _____. **Enfermidades dos cavalos**. 4. ed, São Paulo: Livraria Varela, 2005, p.443-444.

WHITE, S.D.; VANDENABEELE, S.I.J.; DRAZENOVICH, N.L.; FOLEY, J.E. *Malassezia* species isolated from the intermammary and preputial fossa areas of horses. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 20, p. 395-398, 2006.

www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.html. Acesso em 26 de setembro de 2012.