

PADRONIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL E AVALIAÇÃO DE METODOLOGIA MOLECULAR PARA O DIAGNÓSTICO DE DERMATÓFITOS NA ROTINA LABORATORIAL DE MICOLOGIA MÉDICA

Marina Cristina Gadêlha (PIBIC/CNPq), Marielen Ribeiro T. da Silva, Ellen Miazima, Melyssa Negri, Erika Seki Kioshima, Terezinha Inez Estivalet Svidzinski(Orientador), e-mail: mcr.gadelha@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde, Maringá,
PR.

Ciências Biológicas, Microbiologia

Palavras-chave: Dermatófito, extração, DNA

Resumo:

Dermatófitos são fungos queratinofílicos encontrados em todo o mundo, que podem infectar a pele, cabelo e unhas. O diagnóstico laboratorial de dermatófitos é baseado em microscopia direta, testes bioquímicos e cultura. Entretanto, essas metodologias são demoradas e precisam de pessoal qualificado. Métodos moleculares são importantes ferramentas para a identificação, pois são rápidas, sensíveis e auxiliam no preciso diagnóstico laboratorial. O objetivo do presente projeto foi selecionar três técnicas de extração de DNA para aplicabilidade na rotina laboratorial. Primeiramente foi realizado uma revisão de literatura sobre técnicas de extração de material genético e diagnóstico molecular e destas, foram selecionadas metodologias para elaboração de protocolos afim de comparar a eficiência de cada um. Os isolados utilizados foram *Microsporium gypseum* ATCC MG40005, *Trichophyton rubrum* INCQS TR40051 e *T. mentagrophytes* ATCC 40004. Na revisão de literatura foram avaliados dez artigos, destes três metodologias foram selecionadas para extração de DNA. O método que apresentou maior eficiência foi o utilizado no protocolo dois, que utilizava "beads", sonicação e proteinase K. Entretanto os protocolos devem ainda ser aprimorados para obter melhor qualidade de produto final.

Introdução

As dermatomicoses, popularmente conhecidas como micoses, são doenças ocasionadas por fungos que acometem pele, unhas e pelos. Atualmente, vêm sendo amplamente estudadas devido ao fato de serem ponto de entrada para infecções oportunistas, principalmente em indivíduos imunocomprometidos (Wille et al., 2009). O diagnóstico micológico requer exame microscópico direto e cultura, a fim de identificar com precisão o gênero de fungos e a espécie. No entanto, este diagnóstico convencional é muitas vezes demorado devido ao atraso do crescimento do fungo, e até

mesmo o não crescimento nas culturas, apresentando desvantagens ao atribuir uma resposta precisa e rápida para os médicos (Petinataud et al., 2015).

Devido a esta grande importância na busca de um diagnóstico mais rápido, testes complementares vêm sendo desenvolvidos para auxiliar a distinguir dermatofitoses de outras doenças. Entre eles, as técnicas de biologia molecular, uma alternativa que oferece ferramentas modernas e rápidas para melhorar o diagnóstico microbiológico tradicional (Petinataud et al., 2015).

Entretanto, apesar da crescente utilização destas técnicas, testes moleculares ainda não são validados para diagnóstico de doenças fúngicas, devido principalmente à falta de padronização das metodologias. Outro desafio é a extração de DNA, o que é especialmente crítico em fungos. Tanto a extração como o diagnóstico devem ser executadas por protocolo de fácil manuseio e boa eficiência, através de um teste molecular manual ou utilizando um ensaio comercial que fornece um método padronizado e emprega reagentes de qualidade (Zhang, 2013).

Objetivo

O objetivo deste projeto foi selecionar técnicas moleculares para aplicabilidade na rotina laboratorial a fim de realizar a identificação das principais espécies que causam dermatofitose e padronizar técnica para a extração de DNA a partir de dermatófitos isolados de amostras de pacientes atendidos no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá.

Materiais e métodos

Revisão de literatura

Para a revisão de literatura, foi realizada a busca dos descritores e palavras-chave (extraction, DNA, filamentous fungi, dermatophytes) nas bases de dados da Scientific and Electronic Library Online (SciELO) e National Center for Biotechnology Information - NCBI, U.S. National Library of Medicine (PubMed). Aplicando critérios de inclusão e exclusão (período de publicação de 2010 a 2016 e conter protocolo de extração de DNA de fungos em geral). Os artigos selecionados foram contextualizados de maneira sucinta e sistematizada. As informações relevantes foram organizadas em formato de tabela.

Micro-organismos

Foram utilizados *Microsporum gypseum* ATCC (American Type Collection Culture) MG40005, *Trichophyton rubrum* INCQS TR40051 e *T. mentagrophytes* ATCC 40004. Estes fungos estão armazenados na Micoteca do Laboratório de Micologia Médica e foram gentilmente cedidos pela Fundação FIOCRUZ. Para a extração de DNA os fungos foram previamente crescidos em Sabouraud Dextrose Agar (SDA), raspados,

ressuspensos em solução salina 0,9%, filtrados e ajustados para uma concentração de 1×10^6 conídios/mL.

Padronização da extração de DNA

Tendo como base dois artigos (Balini *et al.* 2015 e Chang *et al.* 2016) com conteúdo relevante para extração de fungos filamentosos, foram elaborados três protocolos de extração de DNA, utilizando: *beads* e proteinase K (P1); sonicação, *beads*, proteinase K (P2); *kit* comercial *Qiamp DNA mini kit* (P3). A quantificação e análise do DNA foram determinadas por espectrofotometria (NanoK Kasvi) e por eletroforese em gel de agarose, respectivamente. O gel foi visualizado em detector de luz ultravioleta e fotografado no fotodocumentador (U.V.P. Bioimaging Systems EC3).

Resultados e Discussão

Foram levantados um total de dez artigos que continham informações sobre extração de DNA e identificação de dermatófitos. A partir das pesquisas sobre técnicas de extração, foram selecionados seis protocolos. Dentre eles, três utilizaram *kits* comerciais (*kit* FastDNA®, Fungi /Yeast Genomic DNA *kit*®, *kit* Purelink, Invitrogen®), e quatro empregaram técnicas convencionais (Balini *et al.*, 2015; Mendes *et al.*, 2012; Prieto *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2016). Sendo assim, a partir dos artigos de Chang *et al.* 2016, Balini *et al.* 2015 e do *kit* comercial *Qiamp DNA mini kit* foram determinados três protocolos de extração de DNA (P1, P2 e P3). Os resultados obtidos em relação a quantificação de cada protocolo encontram-se organizados na Tabela 01.

Tabela 01 – Quantificação do DNA extraído das cepas de fungos dermatófitos através da execução de dois protocolos manuais e um *kit* comercial.

	P1			P2			P3		
ATCC	Concentração de DNA** (ng/μL)	DO* 260	Relação da DO* 260/280	Conc. DNA** (ng/μL)	DO* 260	Rel. DO* 260/280	Conc DNA** (ng/μL)	DO* 260	Rel. DO* 260/280
TR40051	1	0,02	3,17	não realizado			7,7	0,15	1,66
TM40004	2,1	0,04	0,89	17,63	0,35	50,08	6,6	0,13	0,97
micélio ^{TM#}	não realizado			63,63	1,27	50,10	não realizado		
MG40005	20	0,4	1,79	não realizado			6	0,12	1,29

*Densidade óptica. **Valor obtido através da fórmula: (OD260 × 50 × fator de diluição).

#MicélioTM: Realizado a extração com o micélio total de TM40004. P1: protocolo um que utilizou *beads* e proteinase K; P2: protocolo dois que utilizou a sonicação, *beads* e proteinase K; P3: protocolo três que utilizou o *kit* comercial *Qiamp DNA mini kit*.

Em relação à concentração de DNA obtido após aplicação das técnicas, foi possível observar que o P2 foi o mais efetivo. Além disso, no P2 foi utilizado o micélio total, e não uma padronização de conídios 10^6 , como nos protocolos anteriormente utilizados.

Já em relação a quantidade de DNA, indicada pela leitura DO 260, os protocolos P2 e P3 demonstraram-se mais efetivos do que o P1. Este resultado pode ter sido devido às razões citadas anteriormente do P2, e devido à eficiência do *kit* comercial.

Por último, a interpretação da razão DO 260/280 nos indica a contaminação do nosso DNA por proteínas. Aqui é possível observar que, apesar da taxa de concentração e quantidade do DNA serem elevadas no P2, a contaminação por proteínas também foi alta. Podemos observar que apesar da quantidade baixa de DNA, o P3 é o que possui menor contaminação. Importante destacar que essas são dificuldades comuns aos autores consultados e de todos que buscam empregar metodologias moleculares para identificação de fungos filamentosos.

Conclusões

Pode-se observar que, das três metodologias testadas, o P2 utilizando o micélio fúngico foi o mais efetivo e de menor custo. Entretanto, mais experimentos devem ser realizados para confirmar esta eficiência, e novos ajustes devem ser realizados a fim de diminuir a contaminação por proteínas. Deve-se levar em conta que, por ser um trabalho de padronização, mais estudos devem ser realizados para elucidar a eficácia das metodologias testadas, e também para aumentar a eficácia dos métodos.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq e ao laboratório de Micologia Médica da UEM

Referências

BALINI, L. C. *et al.* Identificação, pela técnica de PCR-RFLP, de *Aspergillus* spp. isolados de grãos de soja e milho. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 4, n. 2, 2015.

CHANG, S. *et al.* Polyphasic approach including MALDI-TOF MS/MS analysis for identification and characterisation of *Fusarium verticillioides* in Brazilian corn kernels. **Toxins**, v. 8, n. 3, p. 54, 2016.

PETINATAUD, D. *et al.* Molecular diagnosis of onychomycosis. **J Mycol Med.** 2014 Dec;24(4):287-95.

ZHANG, S. X. Enhancing molecular approaches for diagnosis of fungal infections. **Future Microbiol.** 2013 Dec;8(12):1599-611.

WILLE, M. P., *et al.* Epidemiologia das dermatomicoses em população da periferia de Araraquara-SP, Brasil. **Rev Bras Clin Med**, vol. 7, p. 296-297, 2009.