

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DO COMPLEXO *Fusarium solani* RELEVANTE NA PRÁTICA CLÍNICA LABORATORIAL

Felipe Antonio Carvalho da Costa (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Marielen Ribeiro T. da Silva (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Lenisa Vieira Vilegas, Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça, Terezinha Inez Estivalet Svidzinski (Co-orientadora) e Erika Seki Kioshima (Orientador)
e-mail: eskioshima@gmail.com.

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

Área e subárea: Farmácia – Análise Toxicológica

Palavras-chave: *Fusarium solani*, identificação molecular e bioinformática

Resumo

O gênero *Fusarium* por muito tempo foi conhecido como fitopatógeno atualmente tem causado infecções graves em indivíduos imunodeficientes. Assim deve ser identificado rapidamente para viabilizar um tratamento correto dos pacientes. Contudo, o diagnóstico laboratorial atual baseado na morfologia deste fungo, depende muito da experiência do laboratorista. As técnicas de identificação molecular, por sua vez, apresentam alta confiabilidade e agilidade, possibilitando a classificação em espécie e o estudo epidemiológico. Através do método RFLP-PCR, o presente estudo amplificou a região ITS do DNAr utilizando os primers ITS1 e ITS4 e analisou a possibilidade de clivagem com diferentes endonucleases (*EcoRI*, *MvaI*, *HhaI*, *HinfI*, *MboI* e *XhoI*) a fim de diferenciar duas espécies de *Fusarium* frequentes na prática clínica: *F. solani* e *F. oxysporum*. A análise demonstrou que algumas enzimas (*MvaI* e *MboI*) poderão ser utilizadas na diferenciação das espécies.

Introdução

Os microrganismos pertencentes ao gênero *Fusarium* são causadores de inúmeros problemas atualmente, tanto na agricultura quanto para a saúde, principalmente em pacientes imunossuprimidos. É evidente que as infecções localizadas por esses fungos ubíquos são indubitavelmente relacionadas com o estado imunológico, sendo que algumas espécies estão mais relacionadas as infecções humanas, sendo a identificação em nível a esse nível necessária por razões biológicas e epidemiológicas (Coleman et al., 2016; Ma et al., 2013).

Dentro do grande gênero *Fusarium*, tornou-se habitual agrupar as espécies estreitamente relacionadas ou linhagens com pouca ou nenhuma diferença morfológica nos chamados complexos de espécies. Atualmente, sabe-se que a maioria dos isolados clínicos pertence ao complexo de espécies de *Fusarium solani* (FSSC) (NUCCI et al., 2015). Dentro deste complexo seis entidades estão descritas no Atlas de Fungos causadores de micoses: *F.*

falciforme (FSSC3+4), *F. keratoplasticum* (FSSC2), *F. lichenicola* (FSSC16), *F. petroliphilum* (FSSC1), *F. pseudensiforme* e *F. solani sensu stricto* (FSSC5) (de Hoog, 2011).

A identificação das espécies de *Fusarium* no diagnóstico micológico é fundamentado em características morfológicas. Tal técnica é demorada e arrisca-se na imprecisão para diferenciar as espécies, não sendo possível atingir a especificação dentro das espécies de um complexo. Métodos moleculares são mais rápidos e precisos e se mostram eficientes e ideais para o reconhecimento desses microrganismos. Desta forma, há um grande interesse no desenvolvimento de procedimentos padronizados que atendam a demanda da rotina laboratorial para o diagnóstico micológico associando métodos de biologia molecular, que poderão aumentar a confiabilidade na investigação das diferentes espécies de *Fusarium*, permitindo assim o diagnóstico precoce.

Materiais e métodos

Revisão na Literatura

Uma pesquisa na base de dados Pubmed foi realizada buscando artigos científicos com identificação molecular das espécies do complexo *F. solani*. Os critérios para inclusão dos artigos foram a publicação ser dos últimos 5 anos, conter totalmente ou parcialmente informação sobre a técnica de identificação e a pesquisa ter identificado *F. solani*.

Extração do DNA

A padronização da extração de DNA foi realizada com um isolado de *F. keratoplasticum* (ATCC 36031). O fungo foi repicado em YEPD e mantidos a 25°C, por 7 a 10 dias. Após o crescimento, as células fúngicas foram coletadas em água MiliQ e centrifugadas a 4000 rpm, 10 min. As células foram rompidas com pérolas de vidro e zircônio, em tampão de lise (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM NaCl; 0,5 mM EDTA pH 8,0; SDS 1%; 2,5 mM CaCl₂) e vórtex por 30 min, intercalando banho de gelo a cada minuto. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm/10 min/4°C e ao sobrenadante coletado foi adicionado proteinase K, e incubado por 2h a 52°C. O DNA foi extraído com volumes iguais de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). O DNA genômico foi precipitado com etanol P.A gelado (-80°C, 24h). Depois, foi ressuspenso em tampão Tris-EDTA (pH 8,0). A integridade do DNA extraído foi analisado em eletroforese em gel de agarose 2% e as bandas foram analisadas em transiluminador.

Amplificação por PCR

Os primers iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') foram utilizados para amplificar a região ITS. As reações de PCR foram preparadas para um volume final de 25 µL, contendo 30 ng de DNA genômico, tampão de PCR, 10 mM dNTP, 50 mM MgCl₂, 5 U de Taq. Polimerase (invitrogen), H₂O MiliQ q.s.p, 10 pmol de

cada primer, sendo utilizado 45 ciclos. Os amplicons foram visualizados em gel de agarose 2%.

Bioinformática

As sequências das seis espécies do complexo *Fusarium solani* foram obtidas e comparadas utilizando a ferramenta BLAST 2.0 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Por meio do programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), ao menos 10 sequencias de cada espécie, foram analisadas por alinhamento múltiplo a fim de identificar padrões conservados e possíveis sítios de clivagem para as enzimas de restrição: *EcoRI*, *MvaI*, *HhaI*, *HinfI*, *MboI* e *XhoI*.

Resultados e Discussão

Cerca de 23 artigos foram analisados para o período de 2013 a 2018, sendo o sequenciamento das regiões ITS (Internal transcribed spacer) e EF-1 α (Fator de alongação -1 α) a metodologia mais utilizada, também foram citadas as técnicas de Perfil de amplificação randômica de DNA polimórfico (RAPD), análise de microssatélite, Nested PCR e PCR/RFLP (Polimorfismo no Comprimento de Fragmento de Restrição). Inicialmente foi padronizado a extração de DNA da cepa padrão de *F. keratoplasticum*, uma das espécies do complexo *F. solani*. Como é possível observar na **Figura 1A**, o DNA genômico foi purificado com qualidade pela metodologia empregada e a região de ITS foi amplificada com sucesso (~500 bp).

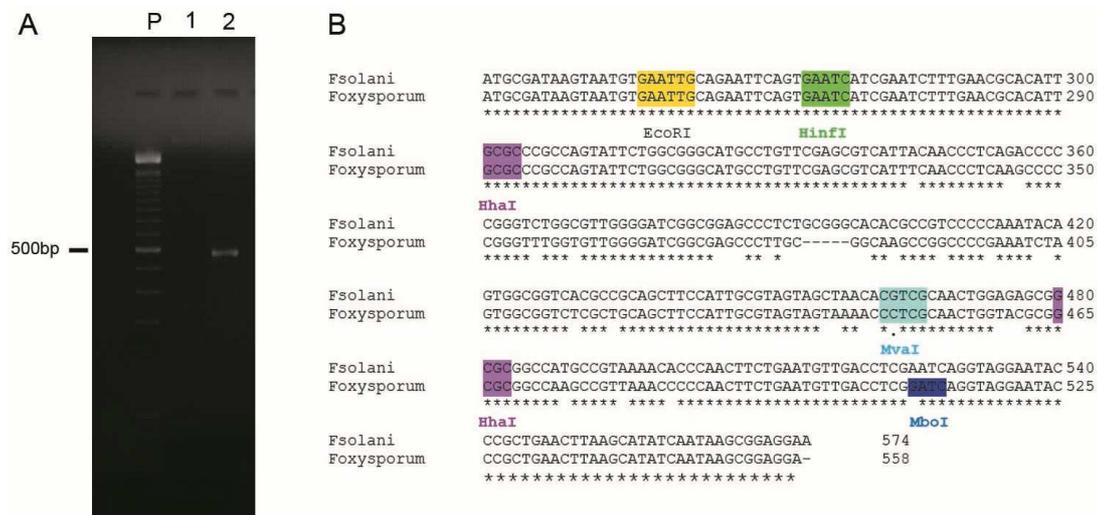


Figura 1 - (A) Análise do DNA em gel de agarose 2%. P: 100 pb; 1: ITS ~500 pb; 2: DNA genômico. A região ITS foi obtida a partir da amplificação do gDNA pelos primers ITS1 e ITS4, através da técnica de PCR. (B) alinhamento das sequências de *F. solani* e *F. oxysporum* e as regiões de clivagem pelas enzimas de restrição.

Com intuito de avaliar a possibilidade de aplicação da técnica de PCR/RFLP, uma análise de bioinformática foi realizada com intuito de avaliar o possível perfil de fragmentos gerados após a clivagem da região ITS com diferentes enzimas de restrição. Várias sequências foram analisadas com intuito de

identificar uma região e enzima de restrição, dentre as que temos disponíveis no laboratório para padronização do PCR/RFLP. No entanto, devido a similaridade entre as sequências apenas duas enzimas mostram sítios de restrição diferentes entre as espécies de *F. solani* e *F. oxysporum* (**Figura 1B**). As sequências das seis espécies pertencentes ao complexo *F. solani* também foram analisadas, porém o poder discriminatório desta técnica foi limitado, não havendo diferenças significativas no padrão de fragmentos gerados. Todavia, foi verificada diferenças na região de ~400 pb que poderá ser alvo de estudos na busca de outras endonucleases que possam diferenciar estas espécies.

Conclusões

A aplicação da técnica de RFLP-PCR com as enzimas de restrição *MvaI* e *MboI*, possivelmente possibilitará a diferenciação das espécies de *F. solani* e *F. oxysporum*, levando a um diagnóstico seguro e confiável. Esse aperfeiçoamento possibilitará laudos rápidos e concretos para investigação epidemiológica e desenvolvimento no tratamento de fusarioses.

Agradecimentos

Agradecemos a todos os integrantes do Laboratório de Micologia Médica da Universidade Estadual de Maringá que tenham contribuído de alguma forma para o presente estudo e a Fundação Araucária, pelo incentivo à pesquisa científica. Aos professores, cuja paciência e instruções foram essenciais para efetivação dessa produção.

Referências

Coleman JJ. **The *Fusarium solani* species complex: ubiquitous pathogens of agricultural importance.** Mol Plant Pathol. 2016. 17(2):146-58.

Nucci F, Nouér SA, Capone D, Anaissie E, Nucci M. **Fusariosis.** Semin Respir Crit Care Med. 2015. 36(5): 706-14.

Ma LJ, Geiser DM, Proctor RH, Rooney AP, O'Donnell K, Trail F, Gardiner DM, Manners JM and Kazan K. **Fusarium pathogenomics.** Annu Rev Microbiol. 2013. 67: 399-416.

De Hoog GS, Guarro J, Geñe J, Figueras MJ. **Atlas of Clinical Fungi.** 3rd ed. Utrecht, Netherlands: Centraalbureau oor Schimmelcultures. 2011.