

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO DE DNA DE *Paracoccidioides* spp. COM FOCO NO DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA DIFERENCIAÇÃO ENTRE ESPÉCIES

Caroline Franco Domingues da Silva (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Isis Regina Grenier Capoci, Érika Seki Kioshima Cotica (Orientador), e-mail: ra112890@uem.br.

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

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS III – Microbiologia – Micologia

Palavras-chave: fungos, paracoccidioidomicose, micoses.

Resumo:

A paracoccidioidomicose (PCM) é micose sistêmica causada por fungos do gênero *Paracoccidioides*, sendo descritas atualmente duas espécies: complexo *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. A PCM tem se constituído como relevante problema de saúde pública. Cultura, sorologia ou histopatologia tem sido as ferramentas para o diagnóstico da PCM, no entanto, não é capaz de distinguir as espécies deste gênero, que somente é possível por métodos moleculares. O objetivo deste trabalho foi a padronização da técnica de extração de DNA do *Paracoccidioides* spp., com foco na implementação da metodologia de identificação molecular das diferentes espécies deste gênero para conhecimento da epidemiologia da nossa região. Foi realizado busca na literatura e o protocolo de extração padronizado foi o *fenol: clorofórmio: álcool*. A eletroforese em gel de agarose foi utilizada para avaliar as condições da técnica. O protocolo padronizado foi eficiente mostrando DNA de qualidade e sem contaminação de RNA. Esta técnica poderá ser utilizada como parte inicial do diagnóstico molecular e diferenciação de espécies, assim como os oligonucleotídeos selecionados *in silico* também neste trabalho.

Introdução

A PCM é uma micose sistêmica de caráter granulomatoso restrita à América Latina, que até pouco tempo tinha como único agente etiológico a espécie *Paracoccidioides brasiliensis*. Novas pesquisas e avanços moleculares, no entanto, permitiram a separação do gênero *Paracoccidioides* em cinco espécies, sendo elas *P. brasiliensis*, *P. lutzii*, *P. americana*, *P. restrepiensis* e *P. venezuelensis* (TURISSINI et al., 2017). Mesmo possuindo diferenças genéticas, ainda não se elucidou os aspectos clínicos particulares de cada espécie. Por definição, há duas manifestações clínicas principais: a forma aguda ou subaguda (juvenil) e a forma crônica unifocal ou multifocal (BLOTTA et al., 1999).

O diagnóstico da PCM é feito por métodos que permitem a visualização da presença do fungo nos tecidos, como o exame micológico direto, porém existem algumas limitações nessas técnicas, pois não possibilitam a identificação da espécie

(PERENHA-VIANA et al., 2012). As técnicas moleculares possibilitam essa diferenciação, porém essas ferramentas ainda não fazem parte do diagnóstico laboratorial. O sequenciamento de DNA é o ponto de partida e protocolos de extração devem ser padronizados. O objetivo deste trabalho é padronizar a técnica de extração de DNA da forma leveduriforme de *Paracoccidioides* spp., com foco na implementação da metodologia de identificação de suas diferentes espécies.

Materiais e Métodos

Revisão de literatura

Revisão feita através de artigos científicos na base de dados do *National Center for Biotechnology Information National* (PubMed; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os descritores empregados na pesquisa foram: *Paracoccidioides*; Molecular Diagnostic Techniques; Diagnostic Techniques and Procedures; DNA Primers; Sequence Analysis DNA. Também foram definidos os critérios de inclusão e exclusão da pesquisa e a categorização dos estudos, levando em conta informações relevantes e análise crítica dos dados extraídos.

Elaboração do protocolo de extração de DNA

A partir da coleta feita na pesquisa bibliográfica, uma base de dados de artigos sobre a temática definida foi contruída utilizando o software Notion (www.notion.so). A partir desses dados coletados e organizados, a técnica de extração para padronização foi escolhida levando em consideração aspectos como: uso em leveduras de *Paracoccidioides* spp., relevância da técnica, materiais necessários (possível aquisição ou não) e disponibilidade de equipamentos na UEM.

Padronização da técnica de extração de DNA para levedura de Paracoccidioides spp.

O protocolo padronizado foi da técnica de extração utilizando *fenol: clorofórmio: álcool*. A eletroforese em gel de agarose (0,8% em TBE) foi utilizada para avaliar as condições da técnica de extração, verificando se houve o resultado esperado.

Desenho e validação in silico dos oligonucleotídeos iniciadores

Pensando em uma etapa futura para esse trabalho, nós propusemos também o desenho de oligonucleotídeos iniciadores e a validação *in silico* dos mesmos, uma vez que já tínhamos que buscar na literatura como extrair o DNA do fungo, aproveitamos para analisar também se nos artigos teriam oligonucleotídeos que pudessem diferenciar as espécies, ou precisaríamos desenhá-los desde o início. O programa Primer-BLAST, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, foi utilizado para avaliar a especificidade dos oligonucleotídeos selecionados para detecção de espécies de *Paracoccidioides*.

Resultados e Discussão

Na revisão bibliográfica foram encontrados dois artigos, sendo um deles “A New Duplex PCR-Assay for the Detection and Identification of *Paracoccidioides* Species” (PINHEIRO et al., 2021) e o outro “Phylogenetic Analysis Reveals a High Level of Speciation in the *Paracoccidioides* genus” (TEIXEIRA et al., 2009). Ambos os artigos versam sobre identificação e diferenciação de espécies através de técnicas moleculares, porém, são metodologias que requeriam reagentes que não tínhamos no laboratório. Assim, optamos pelo método clássico de extração de DNA que existe em nosso laboratório, porém para outras leveduras, padronizando para o fungo de nosso interesse. Uma cepa de *Paracoccidioides* (Pb01) pertencente a micoteca do Laboratório de Micologia Médica foi utilizada para a extração. A metodologia feita em duplicata (DNA1 e DNA2) utilizou beads de vidro e tampão TRIS para romper a célula fúngica, e após tratamento com os reagentes fenol, clorofórmio, álcool para extração do DNA. O resultado da técnica pode ser observada pela eletroforese em gel de agarose (0,8% em TBE) na figura 1. O gel se mostrou de qualidade, não apresentando degradação (sem arraste) e não há sinais de presença de RNA na amostra, pois não há uma banda na parte inferior do gel. O DNA1 apresentou 792,29 ng – 1,95 (razão A260/280) e o DNA 2 apresentou 729,00 ng – 1,85 (razão A260/280).

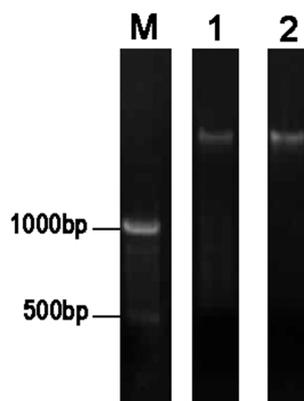


Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose da extração de DNA de *Paracoccidioides* (pb01). M: marcador, 1: DNA1 e 2: DNA2

O desenho de oligonucleotídeos iniciadores usados nesse projeto foram extraídos do artigo de Pinheiro *et al.* (2021), que atingiram as exigências pré-definidas do que seria considerado um bom iniciador e passou pelas análises definidas na metodologia desse trabalho (Figuras 2 e 3).

Os oligonucleotídeos para *P. brasiliensis*: TCG TGA TAT AGA CAG CAC CGT TG (Forward) e ACG AAC CAT CAA ATC GCG AAC CTA (reverse) (Figura 2). E os oligonucleotídeos para *P. lutzii*: CTT CAT GGC GCC CAA GGA CTT (Forward) e GAC TCC GCT AAG TCT GTC CTT AGG C (reverse) (Figura 3).

Primer pair 1

	Sequence (5'-3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TCGTGATATAGACAGCACCGTTG	23	60.49	47.83	4.00	4.00
Reverse primer	ACGAACCATCAATCGCGAACCTA	24	62.93	45.83	6.00	2.00

Products on target templates
>XM_010764774.1 Paracoccidioides brasiliensis Pb18 hypothetical protein partial mRNA

product length = 308
Forward primer 1 TCGTGATATAGACAGCACCGTTG 23
Template 693 715
Reverse primer 1 ACGAACCATCAATCGCGAACCTA 24
Template 1000 977

Figura 2 – Análise do *Primer Blast* para os oligonucleotídeos iniciadores de *P. brasiliensis*.

Primer pair 1

	Sequence (5'-3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CTTCATGGCCCAAGGACTT	21	63.27	57.14	6.00	4.00
Reverse primer	GACTCCGCTAAGTCTGCTTAGGC	25	64.38	56.00	6.00	3.00

Products on target templates
>XM_002792442.2 Paracoccidioides lutzii Pb01 glucan 1,3-beta-glucosidase (PAAG_05770), partial mRNA

product length = 142
Forward primer 1 CTTCATGGCCCAAGGACTT 21
Template 762 782
Reverse primer 1 GACTCCGCTAAGTCTGCTTAGGC 25
Template 903 879

Figura 3 – Análise do *Primer Blast* para os oligonucleotídeos iniciadores de *P. lutzii*.

Conclusões

O protocolo padronizado para a extração de DNA de formas leveduriformes de *Paracoccidioides* spp. foi eficiente. Esta técnica poderá ser utilizada como parte inicial do diagnóstico molecular e diferenciação de espécies, assim como os oligonucleotídeos selecionados.

Agradecimentos

A Fundação Araucária, ao Laboratório de Micologia Médica da UEM.

Referências

- BLOTTA, M. H. S. L. et al. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 61, n. 3, p. 390–394, 1999.
- PERENHA-VIANA, M. C. Z. et al. Serological diagnosis of paracoccidioidomycosis through a Western blot technique. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 19, n. 4, p. 616–619, abr. 2012.
- PINHEIRO, B. G. et al. A new duplex pcr-assay for the detection and identification of paracoccidioides species. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 3, p. 1–20, 1 mar. 2021.
- TEIXEIRA, M. M. et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the Paracoccidioides genus. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 52, n. 2, p. 273–283, ago. 2009.
- TURISSINI, D. A. et al. Species boundaries in the human pathogen Paracoccidioides. **Fungal Genetics and Biology**, v. 106, p. 9–25, 1 set. 2017.