

PADRONIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS COM FOCO NA IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS POR MALDI-TOF MS

Milaine Martins Santana Pereira (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Isis Regina Grenier Capoci (Coorientador), Érika Seki Kioshima Cotica (Orientador). E-mail: eskioshima@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde / Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina / Maringá, PR.

Área e Subárea: Farmácia / Análise Toxicológica

Palavras-chave: Fungos; Diagnóstico; Proteínas.

RESUMO

As infecções fúngicas causadas por dermatófitos como *Microsporum canis* têm aumentado como um desafio à saúde pública devido à resistência a tratamentos convencionais e às dificuldades no diagnóstico. A identificação rápida e precisa desses agentes é fundamental para garantir terapias adequadas e reduzir complicações clínicas. A espectrometria de massas por MALDI-TOF MS apresenta-se como alternativa promissora aos métodos tradicionais, oferecendo resultados mais rápidos e específicos, embora sua eficácia dependa da qualidade da extração de proteínas, especialmente em fungos com parede celular espessa. Nesse estudo, foram comparadas diferentes condições de lise (com pérolas grandes, menores e sem pérolas) para a extração de proteínas ribossomais de cepas de *M. canis*, além da quantificação pelo método de Bradford, definindo a concentração mínima necessária para assegurar espectros de alta qualidade e identificação confiável. Em geral, o uso de pérolas menores resultou em maior número de poços identificados com 99,9% de confiança, embora o desempenho varie entre cepas, estabelecendo 0,5 mg/mL como ponto de corte mínimo para identificação reprodutível pelo MALDI-TOF MS.

INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas por dermatófitos, como *Microsporum canis*, continuam sendo um desafio clínico devido à variabilidade fenotípica e à dificuldade no diagnóstico rápido e preciso. Os métodos tradicionais, baseados em morfologia e cultura, são demorados e sujeitos a falhas (BADER, 2013). Nesse contexto, a espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) tem se destacado como alternativa eficiente, oferecendo identificação rápida, acurada e com menor custo (DE CAROLIS *et al.*, 2014). A técnica baseia-se na análise de proteínas ribossomais como marcadores bio-taxonômicos, comparando os espectros obtidos com bibliotecas de referência. Estudos recentes demonstram que ajustes no

protocolo de extração, incluindo o uso de pérolas de vidro e bibliotecas expandidas, podem elevar as taxas de identificação confiável de dermatófitos para patamares superiores a 90% (DA CUNHA *et al.*, 2018; TSAI *et al.*, 2025).

MATERIAIS E MÉTODOS

Identificação por meio da metodologia MALDI-TOF MS

Foram utilizados fungos dermatófitos isolados de pacientes atendidos no Setor de Micologia Médica do LEPAC/ UEM, armazenados na Micoteca do Laboratório de Micologia Médica. Para realização dos testes de identificação dos isolados fúngicos, extraiu-se proteínas ribossomais de colônias fúngicas com raio > 4 cm, cultivadas em PDA (água batata), pelo método de extração utilizando *beads* (pérolas de vidro). A técnica transcorreu da seguinte maneira: adicionou-se 300uL de água esterilizada em Eppendorfs identificados. Em seguida, utilizou-se um *swab*, previamente umedecido em um tubo Falcon, contendo água esterilizada, para coleta da amostra. Depois, adicionou-se 900uL de álcool etílico e centrifugou-se a 10.000 rpm por 3 minutos. Após descartar o sobrenadante, adicionou-se 50uL de ácido fórmico 70%, além de duas pérolas de vidro grandes ou pérolas de tamanhos menores (de acordo com o grupo experimental), seguido de 60 segundos de agitação em vórtex. Logo depois, adicionou-se 50uL de acetonitrila ao eppendorf, sendo novamente agitado por 60 segundos. Após centrifugação adicional a 3400 rpm por 3 minutos, pipetou-se 1uL da amostra em poços do slide e deixou-se secar a temperatura ambiente. Logo após o processo de extração, adicionou-se 1 µL de solução matriz ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) (bioMérieux), aguardando a secagem em temperatura ambiente. Em seguida, registrou-se o slide na Base de Dados VITEK MS e enviou-se em embalagem para processamento no espectrômetro de massas (MALDI-TOF MS) presente no Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) em São José dos Pinhais-PR. Por fim, avaliou-se os resultados por meio do *software* Mylla®, no laboratório de micologia médica no LEPAC-UEM.

Dosagem da proteína extraída

A quantificação das proteínas extraídas dos dermatófitos foi realizada pelo método de Bradford, com o objetivo de determinar a concentração mínima necessária para identificação no MALDI-TOF MS. O ensaio baseia-se na interação do corante Brilliant Blue G com as proteínas, promovendo alteração na absorbância entre 465 e 595 nm, proporcional à concentração presente. Para a curva padrão utilizou-se albumina sérica bovina (BSA) em diferentes diluições (0,1–0,9 mg/mL), e as leituras foram feitas em espectrofotômetro a 595 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliação da eficácia da extração proteica em *Microsporum canis*, foram realizados testes de identificação pelo MALDI-TOF MS em quatro poços por cepa, utilizando três condições experimentais: sem pérolas, com pérolas grandes e com

pérolas menores. Em grande parte das cepas analisadas, observou-se melhor desempenho com o uso de pérolas menores, como nas amostras 7646, 3561, 1399, 5662 e 74, que apresentaram maior número de poços detectados com 99,9% de confiabilidade. Em contrapartida, algumas cepas apresentaram resultados mais consistentes sem o uso de pérolas, como 71, 92 e 1424. Apenas em uma cepa (62), a condição com pérolas grandes mostrou melhor performance. Para a cepa 12808, não houve diferença significativa entre os protocolos, sendo obtida detecção máxima em todos os quatro poços testados. Dessa forma, os resultados indicam que o uso de pérolas menores tende a favorecer a detecção proteica pelo MALDI-TOF MS, embora haja variação no desempenho de acordo com a cepa analisada (Tabela 1).

Tabela 1 Resultados obtidos na identificação de fungo dermatófito *Microsporium canis* por MALDI-TOF MS pela utilização do protocolo sem pérolas de vidro, com pérolas grandes e pérolas menores.

CEPAS	SEM PÉROLAS	PÉROLAS GRANDES	PÉROLAS MENORES	RESULTADO
7646	3 poços (99.9%)	0 poços (99.9%)	4 poços (99.9%)	melhor detecção pérolas menores
3561	2 poços (99.9%)	2 poços (99.9%)	4 poços (99.9%)	melhor detecção pérolas menores
12808	4 poços (99.9%)	4 poços (99.9%)	4 poços (99.9%)	sem efeito significativo
1399	3 poços (99.9%)	3 poços (99.9%)	4 poços (99.9%)	melhor detecção pérolas menores
5662	3 poços (99.9%)	0 poços (99.9%)	4 poços (99.9%)	melhor detecção pérolas menores
71	4 poços (99.9%)	4 poços (99.9%)	2 poços (99.9%)	melhor detecção sem pérolas
92	3 poços (99.9%)	1 poço (99.9%)	1 poço (99.9%)	melhor detecção sem pérolas
74	3 poços (99.9%)	1 poços (99.9%)	4 poços (99.9%)	melhor detecção pérolas menores
1424	4 poços (99.9%)	2 poços (99.9%)	1 poço (99.9%)	melhor detecção sem pérolas
62	2 poços (99.9%)	3 poços (99.9%)	0 poços (99.9%)	melhor detecção pérolas grandes

A quantificação de proteínas pelo método de Bradford revelou concentrações variando de menos de 0,3 mg/mL até acima de 0,9 mg/mL nos isolados de *Microsporium canis*. Valores elevados resultaram em espectros de boa qualidade e identificações consistentes pelo MALDI-TOF MS, enquanto concentrações inferiores a 0,3 mg/mL estiveram associadas a falhas. O uso de pérolas grandes reduziu a concentração detectada, ao passo que pérolas menores proporcionaram valores mais estáveis (0,6–1,0 mg/mL) e identificações confiáveis. Assim, definiu-se 0,5 mg/mL como ponto de corte mínimo para garantir espectros de qualidade e confiança $\geq 99,9\%$ (Figura 1).

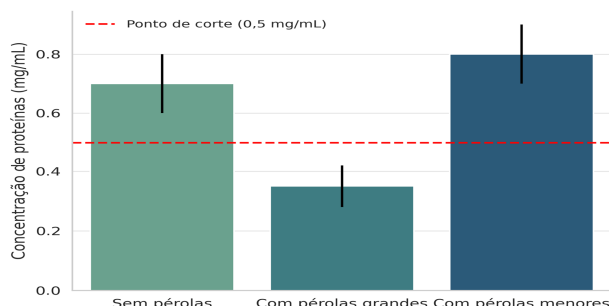


Figura 1 - Quantificação de proteínas pelo método de Bradford. Protocolos de extração.

CONCLUSÕES

O uso de pérolas menores favoreceu a extração de proteínas e a identificação de *Microsporum canis* pelo MALDI-TOF MS. A quantificação por Bradford definiu 0,5 mg/mL como concentração mínima necessária para espectros de qualidade e identificação confiável.

AGRADECIMENTOS

Ao laboratório de Micologia Médica da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e à agência de fomento à educação - CNPq.

REFERÊNCIAS

BADER, O. MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology. **Proteomics**, v. 13, n. 5, p. 788–799, 2013. doi: 10.1002/pmic.201200468. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23281260/>. Acesso em: 25 ago. 2025.

DE CAROLIS, E. *et al.* Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 9, p. 1081–1088, 2014. doi: 10.3855/jidc.4318. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25212072/>. Acesso em: 21 ago. 2025.

DA CUNHA, K. C. *et al.* Fast identification of dermatophytes by MALDI-TOF/MS using direct transfer of fungal cells on ground steel target plates. **Mycoses**, v. 61, n. 9, p. 691–697, 2018. doi: 10.1111/myc.12810. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29762871/>. Acesso em: 24 ago. 2025.

TSAI, T. F. *et al.* Identification of challenging dermatophyte species using MALDI-TOF MS. **Journal of Fungi (Basel)**, v. 11, n. 2, p. 107, 2025. doi:

34º Encontro Anual de Iniciação Científica
14º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior



12 e 13 de novembro de 2025

10.3390/jof11020107. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40141214/>.
Acesso em: 24 ago. 2025.