

TESTE DE DIAGNOSTICO POSITIVO E NEGATIVO DO *Paracoccidioides brasiliensis* POR NANOSSONDAS DE OURO FUNCIONALIZADAS COM SEQUÊNCIA GÊNICA RIBOSSOMAL

Maiara Lima Castilho¹, Maria Angélica G. Cardoso¹, Renata A. Canevari¹, Claudia B. L. Campos², Airton A. Martin¹, Leandro Raniero¹

¹Universidade do Vale do Paraíba - UNIVAP/Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica - IP&D, Av. Shishima Hifumi, 2911 - Urbanova - São José dos Campos/SP - CEP: 12244-000,

²Unviersidade Federal de São Paulo – UNIFESP, Rua Talim, 330 - Vila Nair - São José dos Campos/SP - CEP: 12231-280.

maiara.engbiomedica@gmail.com

Resumo – O *Paracoccidioides brasiliensis* (*Pb*) é um fungo termo-dimórfico que causa a paracoccidioidomicose. A doença afeta principalmente os pulmões, podendo ser disseminada pela via hematogênica. A grande dificuldade de tratar tal enfermidade é o diagnóstico correto da doença, pois existe uma ampla variedade de tipos de fungos e também a similaridade dos sintomas com o de outras doenças como a tuberculose. De fato, a identificação de uma determinada espécie de fungo além de ser um processo dispendioso, na maioria dos casos não tem 100% de confiabilidade, apesar dos avanços tecnológicos. Neste âmbito, a nanotecnologia agrega novas formas de análises, mais rápidas e precisas, na identificação de microrganismos, por meio de uma sequência genética específica combinada a nanopartículas metálicas. Esta tecnologia é o que se tem de mais atual em termos de diagnóstico de doenças, pois é um método que permite identificar a presença de um fragmento genético ou proteína, com precisão utilizando-se uma quantidade mínima de amostra. Este trabalho tem como objetivo identificar sequências genéticas do *Pb* através do uso de nanossondas de ouro para fins de diagnóstico da doença.

Palavras-chave: Nanossonda de ouro, *Paracoccidioides brasiliensis*, Diagnóstico, Gene ribossomal

Área do Conhecimento: Engenharia Biomédica

Introdução

A nanotecnologia associada à biotecnologia tem grande potencial na melhoria da qualidade de vida da população, com desenvolvimento de medicamentos mais eficientes e novos métodos de diagnosticar doenças. Explorar estes recursos é uma estratégia chave para acelerar o desenvolvimento desta ciência, focando em pesquisas voltadas para a escala atômica, com idéias inovadoras, motivando pesquisas em áreas multidisciplinares (Roco et al., 2002).

Nos diagnósticos clínicos e laboratoriais de amostras biológicas existem várias possibilidades de melhorar as diversas modalidades de diagnóstico e tratamento com a inserção da nanotecnologia, por meio de sistemas mais simples, de baixo custo e com a possibilidade de quantificar pequenas amostras de material de forma rápida e viável.

O uso do ácido desoxirribonucléico (DNA) na identificação de doenças vem sendo amplamente explorado. A tecnologia de nanopartículas combinada ao DNA está sendo estudada com uma nova forma de diagnóstico, menos dispendiosa que os demais, mais rápida e com grande

potencial de aplicação. O método baseia-se nas propriedades ópticas (ressonância plasmônica) de nanopartículas metálicas, sendo influenciada também pela sua geometria e tamanho (Baptista et al., 2005, 2006 e 2008 e Doria et al., 2007).

Estas nanossondas permitem o estudo de seqüência genéticas expressas nos indivíduos, no caso específico do *P. brasiliensis* contribuirá na identificação correta do fungo.

O *P. brasiliensis* é um fungo termo-dimórfico que causa a paracoccidioidomicose (PCM) (revisado por Borges-Walmsley et al., 2002). Os países que apresentam maior incidência da doença são o Brasil, Argentina, Venezuela e Colômbia. No Brasil as áreas endêmicas são as regiões subtropicais, principalmente onde as atividades agrícolas são predominantes como o Sudeste, Sul e o Centro-Oeste (Restrepo et al., 2001).

A infecção humana pelo *Pb* ocorre normalmente através da inalação ou contato de tecidos lesados com conídios da forma miceliana do fungo que crescem no solo, água e plantas (San-Blas et al., 2002). O principal órgão afetado é o pulmão, podendo a doença ser disseminada, posteriormente, pela via hematogênica.

O diagnóstico micológico da PCM consiste na identificação da forma leveduriforme típica do Pb através do exame direto de lesões cutâneas ou de lavados brônquicos, escarros e biópsias de pulmão dos pacientes. Entretanto, muitas vezes o exame micológico não é capaz de mostrar a presença do fungo. Uma vez que os sintomas são parecidos ao de outras doenças fúngicas ou de bactérias, como é o caso da *Mycobacterium tuberculosis* causadora da tuberculose.

As propriedades únicas de nanopartículas metálicas numa ampla gama de áreas onde nos últimos dez anos foram intensamente estudadas. Particularmente, nanopartículas anisotrópicas de metais nobres (ouro e prata) vêm recebendo muita atenção devida suas propriedades ópticas. Suas aplicações baseiam-se em três características fundamentais da resposta óptica de nanoestruturas metálicas: a alta sensibilidade a mudanças na vizinhança química local; a localização dos campos eletromagnéticos da radiação incidente abaixo do limite de difração e a subsequente geração de campos próximos de alta intensidade (Túlio Costa, 2008). Essas propriedades possibilitam a sua aplicação no campo da biologia, especialmente na biologia molecular. As nanopartículas recobertas por receptores moleculares têm permitido a fabricação de nanossensores específicos e de alta sensibilidade para diferentes biomoléculas como o DNA, proteínas, etc.

Estas sondas permitem o estudo de seqüência genéticas expressas nos indivíduos, no caso específico do *P. brasiliensis* permitirá a identificação correta do fungo, uma vez que os sintomas são muito parecidos com os de outras doenças fúngicas ou até bacterianas.

Metodologia

A síntese de nanopartículas de ouro baseou-se numa solução de cloreto de Ouro (HAuCl_4) sintetizada através da diluição de 240mg de HAuCl_4 e 0,5051g de citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), mantendo a temperatura a 98°C por uma hora. A solução coloidal resultante da síntese química foi caracterizada por microscopia eletrônica de transmissão.

As células de levedura do isolado 18 de *P. brasiliensis* foram previamente crescidas por 4 a 5 dias em meio sólido YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de dextrose), à 37°C .

A fim de se extrair o DNA, as colônias fúngicas foram coletadas com o auxílio de uma alça de platina e as células foram conservadas e armazenadas a -80°C ou imediatamente processadas pelo método descrito por Cisalpino et al (1998).

Aproximadamente 10ml de células do fungo foram lisadas mecanicamente por maceração em gral, na presença de nitrogênio líquido, até a formação de um pó. Este foi ressuscitado em 25ml de uma solução 50mM de Tris, 100mM de EDTA, 5% de sarcosil, 20mg/ml de proteinase K. A solução foi homogeneizada cuidadosamente por 10 minutos em um Potter-Elvehjem para completar a lise celular, incubada por 2h a 56°C e centrifugada para deposição dos debris celulares. O DNA do sobrenadante foi purificado com pelo menos duas extrações de fenol : clorofórmio : álcool isoamílico (50 : 49 : 1) (Invitrogen™). Um volume de isopropanol foi adicionado ao sobrenadante que foi mantido durante a noite a -20°C , para facilitar a precipitação do DNA, o qual foi lavado com álcool 80% por 3 vezes e seco em speed-vac. O precipitado seco foi ressuscitado em TE (0,5ml), mantido a 65°C por 10 minutos, e tratado com RNase (100mg/ml) por 1 hora, a 37°C . O produto final foi analisado por espectrofotometria e em gel de agarose.

Como o genoma do *P. brasiliensis* em quase sua totalidade já é conhecido, escolhemos a seqüência de RNA ribossomal do fungo para estudo e amplificação (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Os "primers" (iniciadores) da reação de amplificação foram desenhados no programa PRIMER3. As reações em cadeia da polimerase foram realizadas por meio de um termociclador automático, com bloco de aquecimento com gradiente linear (Biocycler™, modelo MJ96G).

A quantidade e a qualidade dos produtos amplificados foram mensurados por meio da eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio e revelados pela luz ultravioleta. A confirmação da especificidade do fragmento de DNA amplificado foi analisada por meio de sua comparação com um marcador padrão de peso molecular conhecido (100pb DNA ladder - Invitrogen™).

Para a fabricação das nanossondas foram utilizados os oligonucleotídeos desenhados na região amplificada (Sigma Aldrich™). Estas seqüências possuem um grupo tiol protegido contra oxidação, que resulta na formação de dímeros.

A fabricação das nanossondas teve como referência as concentrações iniciais de nanopartículas e oligonucleotídeos encontradas na literatura (J. Liu e Yi Lu, 2006; James J. Storhoff, 1997; P. Baptista, 2005). Toda a vidraria utilizada neste processo foi limpa com uma solução de ácido nítrico em ácido clorídrico, na proporção de 1:3.

O teste do diagnóstico positivo/negativo foi feito utilizando um volume de 20µl de nanossonda adicionou-se 20µl do fragmento amplificado do

DNA: 1) sequência complementar (teste positivo); e 2) sequência não complementar (teste negativo).

Resultados

A figura 1 mostra algumas imagens representativas de nanopartículas de ouro em diferentes ampliações.

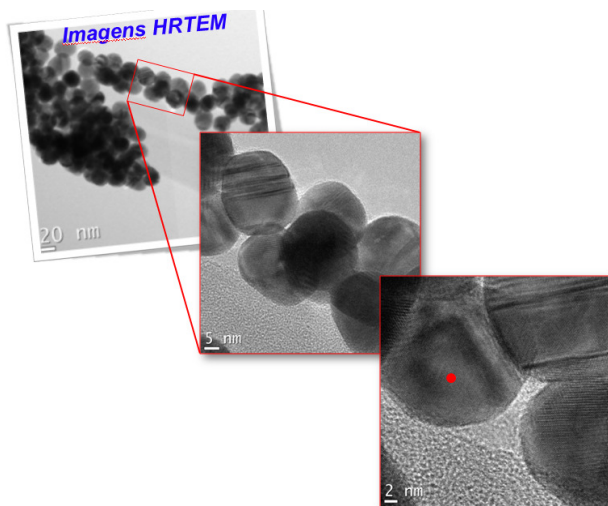


Figura 1: Imagens das nanopartículas de ouro obtidas pelo HRTEM em três ampliações de 20nm, 5nm e 2nm. (colaboração com Divisão de Metrologia de Materiais do INMETRO, Xerém-RJ)

Após a extração, a amostra de DNA foi submetida a análise de sua concentração e pureza determinadas através da leitura de absorbância em 260 nm (UV - Concentração do DNA em mg/ml=Absx100x50µg/ml) e em 280 nm (quantificação de proteínas) no espectrofotômetro (NanoDrop Thermo Scientific 2000).

Tabela 1:Quantificação e pureza do DNA do *Pb*.

Sample ID	ng / µL	A260	A280	260/280	260/230
<i>Pb</i>	4016	91,981	46,193	1,99	1,75

A figura 2 mostra o DNA de *Pb* extraído, em gel de agarose, cuja banda principal é de alto peso molecular sem degradação.

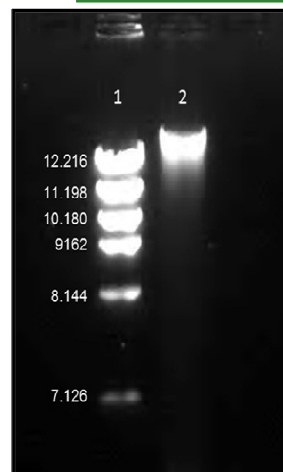


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. 1) Marcador 1Kb; 2) DNA total *Pb*.

A figura 3 mostra o fragmento de RNA ribossomal de *Pb* após a reação de amplificação em cadeia (PCR), em gel de agarose, o OLITS (Ribossomal).

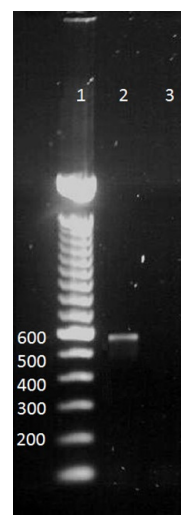


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. 1) Marcador de 100pb; 2) GP27 e 3) Controle.

O teste positivo/negativo do diagnóstico do *Pb* foi obtido com sucesso como apresentado na figura 4 .

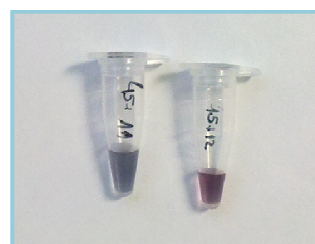


Figura 4: Teste Positivo (Cor Vermelha) e Negativo (Cor Azul) do *Pb*.

Discussão

O tamanho médio das nanopartículas foi calculado utilizando a microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM). Nas imagens é possível observar que a síntese possibilitou a formação de nanopartículas de ouro uniformes e com formato "esférico". Este resultado foi de extrema importância para seguir com as outras etapas do projeto (Figura1).

O protocolo de extração utilizado mostrou-se eficiente, pois foi encontrada uma concentração alta de DNA. A razão entre os picos a 260nm por 280nm mostra a pureza do DNA extraído, sendo os valores aceitáveis na faixa entre 1,8 a 2,0. Portanto, o protocolo possibilitou uma extração eficiente e de qualidade mostrado na tabela 1.

A banda superior no gel de agarose, de maior intensidade, indica uma concentração grande de DNA. Enquanto, o rastro indica o RNA presente na amostra, devido ao grande número de núcleos presentes nos fungos. A banda a esquerda representa o marcador molecular (Ladder) de 1kb, que é utilizado como referência (Figura 2).

A PCR foi realizada com êxito, pois foi possível obter a amplificação do gene específico do *Pb* propostos pelo trabalho. A figura 3 mostra os resultados da eletroforese em gel agarose, no qual se pode observar os tamanhos específicos dos fragmentos dos genes quando comparado com o marcador padrão.

Para as análises do teste positivo/negativo após 98 tentativas no qual foram alterados as concentrações e volume para a obtenção do resultado final, onde se pode observar a mudança na coloração, para o positivo mantendo a mesma tonalidade de cor e para o negativo mudando de vermelho para o azul (Figura 4). A concentração ideal foi de 20ng/μl de DNA teste, para concentrações menores, não foi possível determinar a cor corretamente.

As mudanças de absorção ocasionada pela reação química entre o DNA teste e as nanossondas. No teste negativo existe uma aglomeração das nanossondas que muda o espectro de absorção. O aumento de tamanho causado por esta aglomeração resulta na mudança do confinamento quântico, que passa a limitar os comprimentos de onda na região do vermelho. Portanto, a luz mais energética passa pelo líquido dando uma coloração azulada. Enquanto que no teste positivo a coloração inicial das nanossondas é mantida - vermelha. Neste caso, este confinamento de energia acontece para os comprimentos de onda mais energéticos, permitindo que a luz na região do vermelho passe livremente.

Conclusão

As sínteses de Nanopartículas de ouro foram obtidas em suspensão coloidal. As nanopartículas de ouro mostraram uma maior estabilidade química viabilizando a sua utilização. A extração e amplificação do DNA do fungo *Pb* foi alcançada com sucesso, que foi um passo fundamental para testar as nanossondas.

Os resultados mostraram a viabilidade da aplicação das nanossondas na identificação de uma sequência genética. A mudança de cor foi visível sem a necessidade de equipamentos no processo de detecção.

Referências

- BORGES-WALMSLEY, M.I.; CHEN, D.; SHU, X.; WALMSLEY, A.R. The patho biology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol.*, v. 10, p. 80-87, 2002.
- CANO, M.I.; CISALPINO, P.S.; GALINDO, I.; RAMIREZ, J.L.; MORTARA, R.A.; DA SILVEIRA, J.F. Electrophoretic karyotypes and genome sizing of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol.*, v. 36, p. 742-747, 1998.
- G. DORIA, R. FRANCO, P. BAPTISTA, "Nanodiagnosics: fast colorimetric method for single nucleotide polymorphism/mutation detection", *IET Nanobiotechnology*, Volume 1 (4), 2007, Pages 53-57.
- JAMES J. STORHOFF, ROBERT ELGHANIAN, ROBERT C. MUCIC, CHAD A. MIRKIN, AND ROBERT L. LETSINGER; One-Pot Colorimetric Differentiation of Polynucleotides with Single Base Imperfections Using Gold Nanoparticle Probes, 1997.
- J.LIU & YI LU, Preparation of aptamer-linked gold nanoparticle purple aggregates for colorimetric sensing of analytes, Published online 27 June 2006, doi: 10.1038/nprot.2006.38.
- MIHAIL C. ROCO E WILLIAM SIMS BAINBRIDGE, em "Converging Technologies for Improving Human Performance", National Science Foundation, Department of Commerce, NSF/DOC-sponsored report, Arlington, Virginia, 2002.
- P. BAPTISTA, G. DORIA, D. HENRIQUES, E. PEREIRA, R. FRANCO, "Colorimetric detection of eukaryotic gene expression with DNA-derivatized gold nanoparticles", *Journal of Biotechnology* Volume 119, 2005, Pages 111-117.

- P.V. BAPTISTA, M. KOZIOL-MONTEWKA, J. PALUCH-OLEK, G. DORIA, R. FRANCO, "Gold-Nanoparticle-Probe-Based Assay for Rapid and Direct Detection of Mycobacterium tuberculosis DNA in Clinical Samples", *Clinical Chemistry*, Volume 52, 2006, Pages 1433-1434.

- P. BAPTISTA, E. PEREIRA, P. EATON, G. DORIA, A. MIRANDA, I. GOMES, P. QUARESMA, R. FRANCO. "Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods", *Analytical and Bio analytical Chemistry*, Volume 391, 2008, Pages 943-950.

- RESTREPO, A.; MCEWEN, J.G.; CASTANEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far is solving the riddle. *Med. Mycol.*, v. 39, p. 233-241, 2001.

- SAN-BLAS, G.; NINO-VEJA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med. Mycol.* v. 40, p. 225-242, 2002.

- TULIO COSTA RIZUTI DA ROCHA, tese de doutorado: "Nanopartículas metálicas anisotrópicas: Mecanismo de formação e aplicação ópticas", Universidade Estadual de Campinas, Campinas – São Paulo, 2008.