

UTILIZAÇÃO DA BIOINFORMÁTICA NA DIFERENCIAÇÃO MOLECULAR DE TRICHOPHYTON RUBRUM, TRICHOPHYTON MENTAGROPHYTES E TRICHOPHYTON VERRUCOSUM

Sidney Pinto da Silva¹, Alessandro Aforali².

1 Acadêmico do curso de Tecnologia em Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba, PR);

2 Laboratório de Genômica do Instituto Carlos Chagas (ICC) – PR – Brasil, Prof. Msc. Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba, PR); Pesquisador IV do O BOTICÁRIO

Endereço para correspondência: Alessandro Aforali, alessandro@tecpar.br

RESUMO: Os fungos do gênero *Trichophyton* são grandes responsáveis por dermatofitoses e onicomicoses em humanos. Com o suporte de ferramentas de bioinformática, objetivou-se diferenciar *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton verrucosum*. A análise foi realizada a partir do banco de dados do *National Center of Biotechnology Information*; pela pesquisa de similaridade entre seqüências elegeu-se os genes que codificam a RNA polimerase II e a Cisteína Dioxigenase. Análises comparativas (programa Primer BLAST) evidenciaram regiões passíveis de se construir oligos (iniciadores) específicos para as espécies devido à ocorrência de diferenças na sequência de aminoácidos.

Palavras-chave: *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton verrucosum*, bioinformática.

ABSTRACT: The fungi of the genus *Trichophyton* are largely responsible for dermatophytosis and onychomycosis in humans. With the support of bioinformatics tools aimed to differentiate *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton verrucosum*. The analysis was performed from the database of *National Center of Biotechnology Information*; search for similarity between sequences was chosen from the genes encoding the RNA polymerase II and Cysteine Dioxygenase. Comparative analysis (BLAST program Primer) revealed regions which can be constructed oligos (primers) specific for the species due to the occurrence of differences in amino acid sequence.

Keywords: *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton verrucosum*, bioinformatics.

INTRODUÇÃO

Durante muito tempo, os fungos foram considerados como vegetais e, somente a partir de 1969, passaram a ser classificados em um reino à parte, o reino fungi (WHITTAKER, 1969).

Os fungos apresentam características que os diferem de plantas: não sintetizam clorofila, não tem celulose na sua parede celular e não armazenam amido como substância de reserva. São seres vivos eucarióticos, com um só núcleo, como as leveduras, ou multinucleados, como se observa entre os fungos filamentosos ou bolores. Nutrem-se de matéria orgânica morta, fungos saprofíticos, ou vivos, fungos parasitários (MATIAS & MARTINS, 2004).

Dentre os fungos patogênicos os gêneros *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* são os principais causadores de dermatofitoses, acometendo tanto animais quanto seres humanos (RIPPON, 1988).

O gênero *Trichophyton* possui 26 espécies, entre elas algumas que parasitam animais como *Trichophyton verrucosum* e *Trichophyton equinum*.

Para o diagnóstico dos dermatófitos é necessário após a obtenção da amostra o exame microscópico e o cultivo, processos que envolvem varias etapas, muita mão de obra e gasto de tempo.

No exame microscópico direto o material colhido deve ser tratado com clarificantes, como o hidróxido de potássio (potassa) em uma concentração de 10- 30%, para que as estruturas fúngicas presentes possam ser adequadamente visualizadas ao microscópio (HALDANE & ROBART, 1990).

Vários autores têm utilizado o branco de calcoflúor na solução de potassa (HAGEAGE & HARRINGTON, 1984). Este reagente liga-se à parede fúngica tornando os elementos fúngicos fluorescentes sob luz ultravioleta, facilitando assim a sua observação. HALDANE & ROBART (1990) compararam a sensibilidade do uso de potassa com ou sem calcoflúor no exame microscópico direto de raspados de pele com o objetivo de avaliar a sua sensibilidade e especificidade de cada método para o diagnóstico de dermatofitoses e concluíram que o uso do calcoflúor não aumentou a sensibilidade e especificidade do exame microscópico direto. Além disso, a utilização do calcoflúor exige que a amostra seja observada em microscópio de fluorescência, aumentando assim, os custos deste teste.

Os dermatófitos em geral apresentam morfologia semelhante entre si ao exame microscópico direto. Em pele e unhas o aspecto mais observado é o da presença de

filamentos micelianos septados de tamanho variável e que podem estar ramificados (RIPPON, 1988).

O cultivo dos dermatófitos é realizado rotineiramente em meio de ágar Sabouraud dextrosado contendo inibidores bacterianos e fúngicos como cloranfenicol e cicloheximide (CLAYTON & MIDGLEY, 1989). Outro tipo de meio recomendado para o cultivo rotineiro de dermatófitos é o agar extrato de malte (RICHARDSON & EVANS, 1989). A temperatura ótima de crescimento situa-se na faixa de 25 a 30°C. Nestas condições os dermatófitos crescem num período de uma a três semanas. Para a correta identificação da espécie do dermatófito, devem ser avaliadas as características macro e micromorfológicas das colônias e, em alguns casos, critérios fisiológicos e nutricionais (LACAZ *et.al*, 1991). O estudo da morfologia inclui características macroscópicas como coloração da superfície e do reverso da colônia, topografia, textura e velocidade de crescimento. Além disso, fragmentos da colônia devem ser corados (geralmente com lactofenol azul de algodão) e examinados ao microscópio para a presença de elementos característicos como modificações de hifas, macro e microconídeos . Algumas vezes pode ser necessária a realização de repiques das colônias para meios que favoreçam a formação de conídeos, como ágarbatata ou lactrimel (KAMINSKI, 1985). Ensaio adicional incluem o teste de uréase (PHILPOT, 1967) e teste de perfuração de pelo “in vitro” (AJELLO & GEORG, 1957) para diferenciação das espécies *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* e cultivo em grãos de arroz para diferenciação de espécies de *Microsporum*. Além disso, algumas espécies de dermatófitos que são menos freqüentes na rotina laboratorial, apresentam requerimentos nutricionais especiais de maneira que, para o seu isolamento, é necessário que os mesmos sejam acrescentados ao meio de isolamento. Assim, o *Trichophyton equinum* necessita de ácido nicotínico enquanto que o *Trichophyton verrucosum* necessita de inositol e tiamina para o seu crescimento (SHADOWY & PHILPOT, 1980).

O objetivo deste trabalho é diferenciar *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton verrucosum* através de ferramentas de bioinformática buscando regiões específicas de DNA genômico que possam ser amplificadas através da PCR, oferecendo mais uma opção de análise utilizando métodos mais específicos e sensíveis de diagnóstico molecular.

MATERIAL E MÉTODOS

As ferramentas da bioinformática mais utilizadas são os bancos de dados e programas computacionais disponíveis na *internet*, ponto de partida na análise de seqüências de DNA (BAYAT, 2002). Este instrumento é capaz de proporcionar análises mais velozes na análise de DNAs diferentes e no processo comparativo de variabilidades e na previsão de resultados de análises (GASPARINO, 2008).

O trabalho foi constituído por análise computacional (*in silico*) compreendendo buscas em bancos de dados de seqüências gênicas no GenBank do *National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, USA - NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) por genes que estivessem presentes nas espécies em estudo (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton verrucosum*), porém escolhendo seqüências que possam diferir de outras espécies caso essa possua genes que codifiquem a mesma proteína.

Escolha do gene de interesse

A escolha foi baseada na similaridade entre as seqüências de genes que codificam RNA polimerase II e Cisteína dioxigenase utilizando a ferramenta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Para a escolha das seqüências foram estabelecidos alguns critérios. Não foram utilizadas seqüências de DNA muito semelhantes ao DNA humano e seqüências comumente utilizadas para genotipagem, sempre obedecendo aos parâmetros estatísticos.

Análise comparativa entre seqüências foi realizada através do programa BLAST 2 SEQUENCE - bl2seq (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi).

Desenho dos oligos

Iniciadores (*primers*) específicos para *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton verrucosum* foram projetados através de um programa na tentativa de se obter o melhor desempenho na reação desencadeada pela polimerase para os produtos estabelecidos. O programa utilizado para esta análise foi o *Primer-BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e as seqüências utilizadas para análise foram do gene da cisteína dioxigenase para as espécies *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton verrucosum* e a seqüência da RNA polimerase II para *Trichophyton rubrum*. Os parâmetros fornecidos para que o programa pudesse sugerir

pares de iniciadores foram: tamanho do produto amplificado entre 100 pb e 1000 pb, Tm entre 57°C a 63°C e verificar a especificidade contra o humano.

Análise de restrição

As seqüências dos produtos de PCR do *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton verrucosum* foram analisadas pelo programa *NEBcutter* V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>). Foi elaborado um mapa de restrição com base nas enzimas que reconheciam e digeriam as seqüências de DNA.

Os mapas de restrição foram comparados entre si para que se pudessem identificar possíveis enzimas a serem utilizadas no diagnóstico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o processo de levantamento de dados, foram escolhidos os genes da RNA polimerase II para *Trichophyton rubrum* e da Cisteína Dioxigenase para *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton verrucosum*. Não foi possível utilizar somente o gene da RNA polimerase II porque na espécie *Trichophyton mentagrophytes* somente o seqüenciamento do exon 1 está disponível no banco de dados e esta parte do gene é exatamente igual na espécie *Trichophyton schoenleinii*.

As seqüências de DNA obtidas do Genbank por intermédio das análises previamente descritas foram para *Trichophyton rubrum* identificado pelo número de acesso AF107795.1, *Trichophyton mentagrophytes* GU139238.1 e *Trichophyton verrucosum* XM_003019206.1. O tamanho da seqüência do gene de *Trichophyton rubrum* é de 3327 pb, *Trichophyton mentagrophytes* 660 pb e *Trichophyton verrucosum* 930 pb.

A submissão das seqüências selecionadas ao programa Primer BLAST resultou em quatro seqüências de iniciadores anterógrados (F) e quatro iniciadores retrógrados (R) para *Trichophyton rubrum* e duas seqüências de iniciadores anterógrados (F) e dois iniciadores retrógrados (R) para *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton verrucosum*.

TABELA 1 – Lista dos oligos iniciadores (*primers*)

Nº do primer/ <i>espécie</i>	Sequência dos primer 5' → 3'	Temperatura de anelamento em °C	CG%	Tamanho do produto (pb)
1 – <i>T. rubrum</i>	F - GCGCTCGGACGCCGTTATGT	60,18	65,00	733
1 - <i>T. rubrum</i>	R - CACGCCCGGCATCGGTGAAT	60,11	65,00	
2 – <i>T. rubrum</i>	F - GTGCGCTCGGACGCCGTTAT	60,18	65,00	497
2 – <i>T. rubrum</i>	R - AGGCTCGCTTGGGGTACCGA	59,61	65,50	
3 – <i>T. rubrum</i>	F - TCGTCGTATTCCGCGCGCTT	59,58	60,00	814
3 – <i>T. rubrum</i>	R - GGCTCGCTTGGGGTACCGAC	59,49	70,00	
4 – <i>T. rubrum</i>	F - CGTATTCCGCGCGCTTGGTG	59,39	65,00	321
4 – <i>T. rubrum</i>	R - AGCGCACATTGAAGCAGGCG	58,59	60,00	
5 – <i>T. menta</i>	F - TCAGTGCCGTCCTTGGACCGT	60,11	61,90	306
5 – <i>T. menta</i>	R - TGTCCTGCTCTGGCCAGTCGT	59,84	61,90	
6 – <i>T. menta</i>	F - TGGACCGTCGTCGGGCCTTG	61,14	70,00	109
6 – <i>T. menta</i>	R - TGCCAACGCATATCGCTGCCA	59,78	57,14	
7 – <i>T. verr</i>	F - TCAGTGCCGTCCTTGGACCGT	60,11	61,90	435
7 – <i>T. verr</i>	R - TGTCCTGCTCTGGCCAGTCGT	59,84	61,90	
8 – <i>T. verr</i>	F - TGGACCGTCGTCGGGCCTTG	61,14	70,00	109
8 – <i>T. verr</i>	R - TGCCAACGCATATCGCTGCCA	59,78	57,14	

GC% = porcentagem de guanina e citosina na seqüência do iniciador; F = iniciador anterógrado (*forward*); R= iniciador retrógrado (*reverse*).

A Tabela 1 apresenta a lista dos iniciadores anterógrados e retrógrados selecionados pelo programa numerados de 1 a 8 para cada espécie, juntamente à porcentagem de guaninas e citosinas presente na seqüência dos iniciadores e temperatura ideal de anelamento, sendo que os tamanhos dos produtos oriundos das limitações previstas pelos iniciadores variaram de 321 pb a 733 pb para *Trichophyton rubrum*, 109 pb a 306 pb para *Trichophyton mentagrophytes* e 109 pb a 435 pb para *Trichophyton verrucosum*. A importância na definição dos iniciadores dita o sucesso ou fracasso da amplificação por PCR. A projeção correta dos iniciadores pode significar economia de tempo e gastos (SHARROCKS, 1994).

Analisando as posições de anelamento dos iniciadores nas seqüências dos genes, foi verificada uma preferência na construção dos oligos para a região central da seqüência do gene para RNA polimerase II de *T. rubrum* e do gene da cisteína dioxigenase de *T. mentagrophytes*, observada no gráfico dos resultados do programa *Primer-BLAST* (FIGURAS 1 e 2). Esta região preferencial é devido a uma menor conservação entre as seqüências existente no banco de dados de outras espécies. Detalhes como estes da análise global realizada pelo programa *BLAST* ditam a eficiência da PCR e, por este motivo a bioinformática é uma ferramenta robusta essencial e atualmente sem substitutos (GASPARINO, 2008).

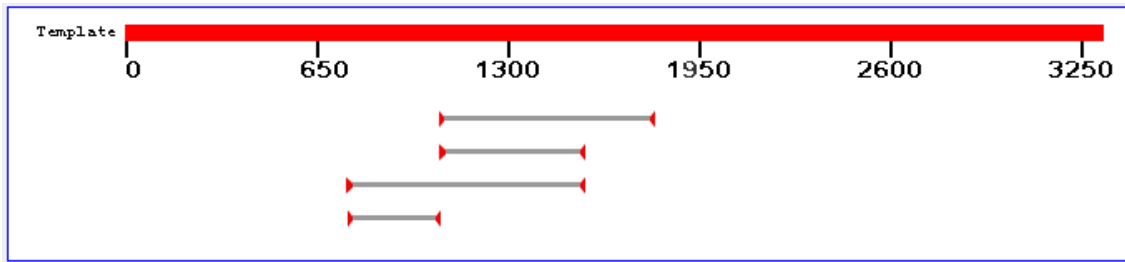


FIGURA 1 – Gráfico de resultados do programa *Primer-BLAST* das seqüências molde (*template*) do gene que codifica a RNA polimerase II do *T. rubrum*. As setas mostram as posições dos iniciadores. As quatro seqüências evidenciam os possíveis produtos na amplificação.

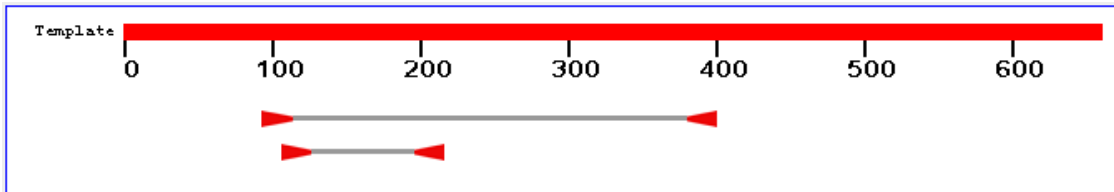


FIGURA 2 – Gráfico de resultados do programa *Primer-BLAST* das seqüências molde (*template*) do gene que codifica a Cisteina Dioxygenase do *T. mentagrophytes* e *T. verrucosum*. As setas mostram as posições dos iniciadores. As duas seqüências evidenciam os possíveis produtos na amplificação.

Os iniciadores mostrados em negrito na TABELA 1 foram selecionados para análise subsequente para se obter a seqüência do produto a serem utilizados na análise por restrição. Estes iniciadores resultam em produtos de tamanho de 733 pb para *T. rubrum*, 306 pb para *T. mentagrophytes* e 435 pb para *T. verrucosum*. Um dos critérios da escolha destes iniciadores é baseada na avaliação da diferença da temperatura de anelamento (T_m) dos iniciadores anterógrados e retrógrados. Sabe-se que temperaturas que divergem muito entre os iniciadores prejudicam a eficiência da reação e dificultam a padronização das condições de amplificação. Outro critério adotado foi avaliar a diferença do tamanho do possível produto amplificado, podendo assim, se possível aplicação de amplificação em sistemas multiplex (vários iniciadores) discriminá-los em gel de agarose.

Observando a seqüência dos iniciadores escolhidos para *T. verrucosum* e *T. mentagrophytes* foi verificado que os mesmos são iguais, porém amplificam produtos de tamanho com diferença de 129 pb entre eles. A vantagem da escolha destes óligos é que os mesmos iniciadores poderiam ser utilizados para a diferenciação e o diagnóstico das espécies em questão, reduzindo o custo na síntese de outro par de óligo específico para uma das espécies, diminuição do número de testes para a padronização e diminuir o custo do teste diagnóstico.

Análises das enzimas de restrição

Durante a análise foram comparadas as enzimas que cortavam seqüências de DNA dos produtos gerados pela amplificação sendo também explanada a especificidades do local de corte entre as bases e número de fragmentos gerados após a digestão.

Para todas as espécies foram sugeridas enzimas que reconhecem e clivam apenas uma vez a seqüência amplificada. Na espécie *T. rubrum* o programa *NEBcutter* listou 50 enzimas sendo sugerida a enzima *TseI* que após clivagem gera dois fragmentos, um de 250 e outro de 483 pb. Na espécie *T. mentagrophytes* das 46 enzimas listadas foi sugerida a *BssSI*, que possivelmente pode gerar um fragmento de 93 pb e outro de 213 pb, enquanto na espécie *T. verrucosum* das 37 enzimas listadas foi sugerida a *BsoBI* que após clivagem poderá apresenta um fragmento de 130 e outro de 305 pb. A escolha destas enzimas foi baseada na possível diferenciação durante a visualização em gel de agarose dos fragmentos gerados entre as espécies, excluindo enzimas que reconhecem sítios ricos em citosina e guanina, por se tratarem de ilhas CpG e serem potencialmente metiladas, podendo alterar o resultado.



FIGURA 3 – Ilustra a seqüência amplificada na espécie *T. rubrum*, a clivagem pela enzima *TseI*, tamanho dos fragmentos e a visualização em gel de agarose.

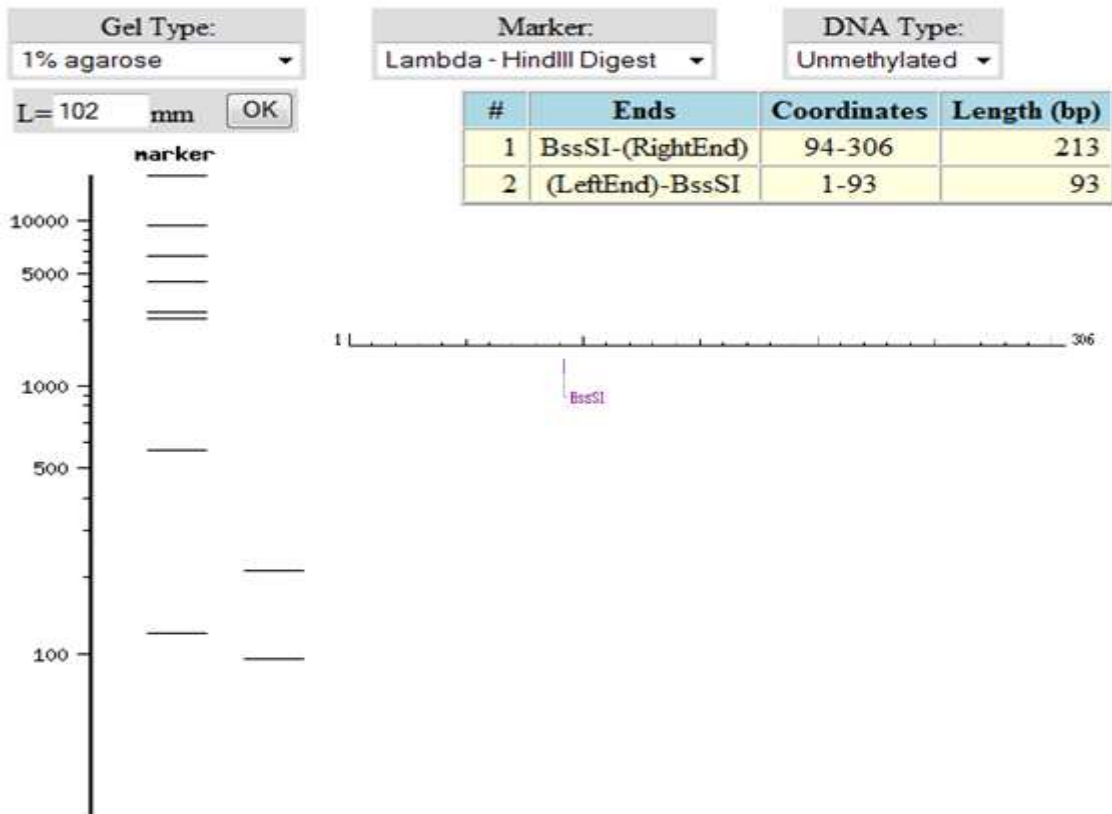


FIGURA 4 – Ilustra a seqüência amplificada na espécie *T. mentagrophytes*, a clivagem pela enzima BssSI, tamanho dos fragmentos e a visualização em gel de agarose.

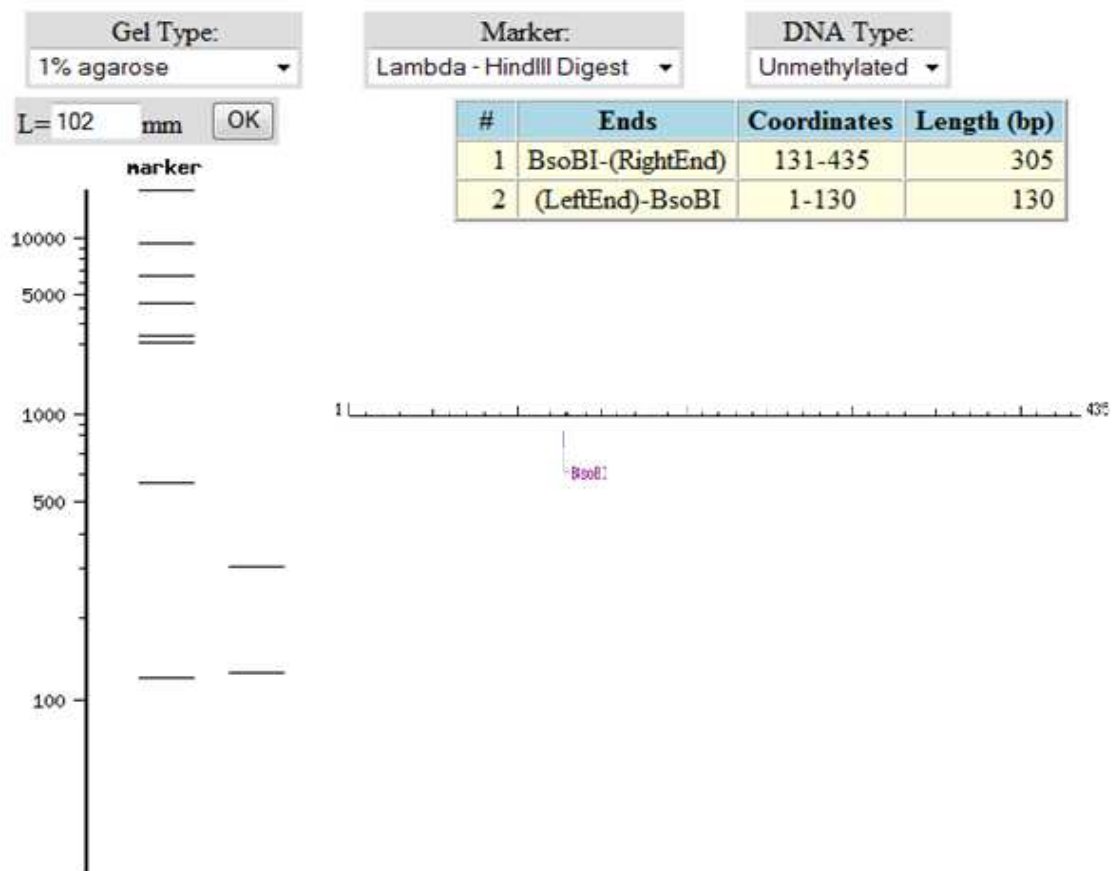


FIGURA 4 – Ilustra a sequencia amplificada na espécie *T. verrucosum*, a clivagem pela enzima BsoBI, tamanho dos fragmentos e a visualização em gel de agarose.

CONCLUSÃO

As ferramentas de bioinformática possibilitaram análises robustas sugerindo possíveis métodos diferenciais entre as espécies *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton verrucosum* utilizando seqüências oriundas de banco de dados. Os genes sugeridos para a diferenciação das três espécies são do gene para a RNA polimerase II e cisteína dioxigenase. Os tamanhos dos produtos estão adequados a serem utilizados de forma prática na amplificação por PCR, visto que seqüências muito extensas são mais difíceis de serem amplificadas.

Análises através das enzimas de restrição selecionaram as enzimas *TseI* e *BssSI* e *BsoBI* como sendo potencialmente utilizáveis gerando fragmentos diferenciais entre as espécies e sendo enzimas que não reconhecem sítios ricos em citosina e guanina, ilhas CpG, minimizando alterações no resultado devido a metilações.

As vantagens dos óligos propostos para as espécies *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* é que os mesmos iniciadores poderiam ser utilizados para a diferenciação e o diagnóstico das espécies em questão, reduzindo o custo na síntese de outro par de iniciadores específico para uma das espécies, diminuição do número de testes para a padronização e diminuir o custo do teste diagnóstico.

Apesar de o trabalho proposto visar uma análise *in silico*, as ferramentas de bioinformática contribuem significativamente para selecionar possíveis testes *in vitro* com maior taxa de segurança, garantindo melhores resultados. Contudo, uma análise mais robusta poderá ser feita quando o genoma desses microorganismos estiver finalizado, abrangendo de forma completa os diversos genes entre as espécies trabalhadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJELLO, L.; GEORG, L. K. In vitro hair cultures for differentiating between atypical isolates of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 8:3-17, 1957.
- BAYAT, A. Bioinformatics: science, medicine and the future clinical review. *BMJ*, London, v. 324, n. 7344, p. 1018-1022, 2002.
- CLAYTON, Y. M.; MIDGLEY, G.; Identification of agents of superficial mycoses. Richardson, M. D.; Evans, E. G.V.; Culture and isolation of fungi. In: Evans, E. G.V.; Richardson, M. D. *Medical Mycology - a practical approach*. IRL Press, Oxford, 1989.
- GASPARINO, E.; OSÓRIO, P. S.; SOARE, S M. A. M; SOMMER, D.; BLANCKL, D.V; LUIZETTIL, F.; Uso da bioinformática na diferenciação molecular da *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba díspar*. Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil. *Acta Sci. Health Sci. Maringá*, v. 30, n. 2, p. 101-106, 2008.
- HAGEAGE, G. L.; HARRINGTON, B. J.; Use of calcoflúor white in clinical mycology. *Lab. Med.* 15:109-112, 1984.
- HALDANE, D. J. M.; ROBERT, E.; A comparison of calcofluor white, potassium hydroxide, and culture for the laboratory diagnosis of superficial fungal infection. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, 13: 337-339, 1990.
- KAMINSKI, G. W.; The routine use of modified Borelli's Lactrimel agar (MBLA). *Mycopathology*, 91:57-59, 1985.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; *Micologia Médica*. Sarvier, 8ª ed., São Paulo, 1991.
- MARTINS, J. E. C.; MELO, N. T.; HEINS-VACCARI, E. M.; *Atlas de micologia médica*, Barueri, SP.: Manole, 2005, 170p
- MATIAS, O. & MARTINS, P.; *Biologia 11 – Biologia e Geologia 11ºAno*. Areal Editores. (2004).
- NCBI – National Center for Biotechnology Information. Genbank. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 02 abr. 2010.
- PHILPOT, C.; The differentiation of *Trichophyton mentagrophytes* from *Trichophyton rubrum* by a single urease test. *Sabouraudia*, 5:189-193, 1967.
- RICHARDSON, M. D.; EVANS. Culture and isolation of fungi. In: Evans, E. G.V.; Richardson, M. D. *Medical Mycology - a practical approach*. IRL Press, Oxford, 1989.
- RIPPON, J. W.; *Medical mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actomycetes*. WB Saunders, 3rd, Philadelphia, 1988.

SHARROCKS, A.D. The design of primers for PCR. CRC Press Inc, Boca Raton, v.2, n. 1, p. 5-10, 1994.

SHADOWY, H. J.; PHILPOT, C. M.; Utilization of standard laboratory methods in the laboratory diagnosis of problem dermatophytes. Am. J. Clin. Pathol., 74:197-201, 1980.

WHITTAKER, R.H.; New concepts of kingdoms of organisms. Science, 163, 150-160, 1969.