



ENEPEX

ENCONTRO DE ENSINO,
PESQUISA E EXTENSÃO

8° ENEPE UFGD • 5° EPEX UEMS

A QUANTIDADE DE CÉLULAS DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida*

PODE INFLUENCIAR A INTEGRIDADE E QUANTIDADE DE DNA

EXTRAÍDO?

Danielly Beraldo dos Santos Silva¹, Luana Mirele Carbonara Rodrigues², Bruno Crispim do Amaral³, Lara Endres da Silva⁴, Kelly Mari Pires de Oliveira⁵, Alexéia Barufatti Grisolia⁵

UFGD/FCBA – Caixa Postal 533, 79.804-970 – Dourados – MS, E-mail: daniellyberaldo@gmail.com.

¹Mestranda do programa de Pós-Graduação em Biologia Geral/Bioprospecção (UFGD/FCBA).

²Mestranda do programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (UFGD/FCS).

³Mestranda do programa de Pós-Graduação em Agronomia (UFGD/FCA).

⁴Doutorando do programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental (UFGD/FACET)

⁵Docentes da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da UFGD.

RESUMO

O objetivo do trabalho foi estabelecer um protocolo de extração de DNA para leveduras do gênero *Candida* baseado em contagem no número de células, visto que o número reduzido de células viáveis na amostra, muitas vezes leva a não eficácia dos protocolos normalmente utilizados para extrair o DNA. Para tanto, as leveduras foram reativadas em caldo *Sabouraud Dextrose* seguido da padronização de diluições seriadas e contagem do número de células em Câmara de Neubauer. Após a reativação, a extração do DNA foi realizada por meio do protocolo a base de solventes orgânicos. A qualidade e concentração do DNA extraído foram determinadas em nanofotômetro. Também foi realizada PCR multiplex de fragmentos da região ITS4 do DNA ribossomal de *Candida* para verificação da viabilidade de amplificação. Com base nas análises estatísticas, a quantidade de células influencia a qualidade do DNA ($p < 0,01$), independente da concentração obtida. O DNA obtido foi considerado viável para utilização em PCR multiplex, demonstrando que o protocolo utilizado foi satisfatório, podendo ser utilizado para diversos fins no que diz respeito a análises moleculares.

Palavras-Chave: DNA, ITS4, PCR multiplex

INTRODUÇÃO

Devido a importância patogênica e por algumas das espécies de leveduras do gênero *Candida* apresentarem poucas variações morfológicas dificultando sua identificação por métodos microbiológicos clássicos, a utilização de técnicas da biologia molecular tem sido descritas para superar as limitações dos métodos de identificação tradicionais e também caracterizar molecularmente estas espécies. Nesse sentido, a extração de DNA é a primeira e principal etapa para se obter alta eficiência nos estudos a nível molecular (MARENGONI *et al.*, 2006), entretanto devido o número reduzido de células viáveis para extração, muitas vezes leva a não eficácia dos protocolos utilizados para extrair o DNA.

Nesse sentido, a busca de métodos de extração de DNA de amostras com números reduzidos de células, que possam ser rápidos, práticos, de menor custo, e eficazes no que tange à quantidade, qualidade e possibilidade de amplificação por PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase), são de extrema importância, visto que os kits comerciais disponíveis, apesar de resultarem em purificações de boa qualidade, tem como desvantagem o alto custo por amostra (ARAUJO *et al.*, 2009). Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi estabelecer um protocolo eficiente de extração de DNA leveduras do gênero *Candida* baseado em contagem do número de células, determinando a quantidade, qualidade e a viabilidade de amplificação do DNA extraído.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados

Os isolados de *Candida spp* utilizados nesta pesquisa foram cedidos pelo Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD/FCBA). As cepas foram previamente identificadas por testes microbiológicos clássicos. Para garantir a pureza e viabilidade dos isolados, os mesmos foram cultivados em Sabouraud Dextrose Agar (SDA) e em CHROMagar *Candida*.

Cultivo e Diluição

Os isolados foram reativados em caldo *Sabouraud Dextrose* por 48h a 35°C, após, foram repicados em *Chromagar* por 48h a 35°C. Novamente, os isolados foram repicados para *Ágar Sabouraud* por 48h a 35°C. Após, foram transferidas assepticamente três colônias para um tubo *Falcon* contendo 5 mL de caldo *Sabouraud Dextrose*, os mesmos foram colocados no *Shaker* a uma rotação de 50 rpm à temperatura ambiente por 18h. Os tubos de cultivo foram centrifugados por 5 minutos a

5500 rpm, descartado o sobrenadante, e centrifugados novamente por mais 1 minuto para sedimentação das células. Em seguida foi feita padronização por meio de diluições seriadas e contagem do número de células utilizando-se Câmara de Neubauer, conforme a Figura 1.

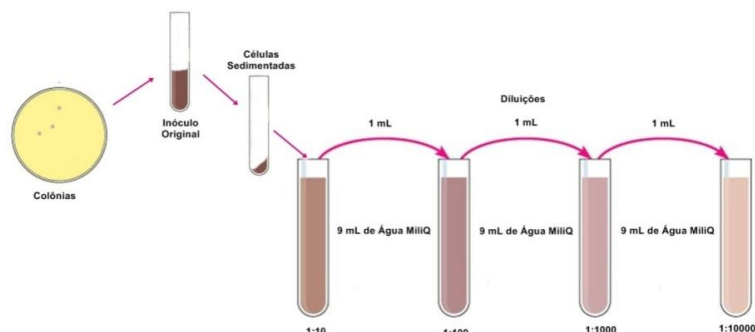


Figura 1. Esquema de diluição seriada de amostra de leveduras

Extração de DNA

Após a contagem das células, os tubos com as leveduras e água milliQ foram centrifugados por 5 minutos a 10000 rpm para sedimentar as células. Em seguida, as células foram ressuspensas em 350µL de tampão PBS e transferidas para microtubos polipropileno de 2mL e acrescentou-se 60µL de β-Mercaptoetanol e 800µL de tampão de extração [3g de CTAB (3%); 5g PVP (5%); 18,68g de NaCl (2N); 10mL de Tris-HCl (100mM); 2mL de EDTA (25mM e pH 8); completar para 100mL de água MiliQ]. Esses microtubos contendo as células e solução foram incubados em banho-maria à 60°C por 1 hora .

Posteriormente foram adicionados 675µL de Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico (25:24:1) e agitou por inversão por 10 minutos, em seguida os microtubos foram centrifugados por 10 minutos a 12.000 rpm/4°C. A fase aquosa foi transferida para outro microtubo de 1,5mL. Adicionou-se 600µL de solução de Acetato de Sódio e álcool absoluto [25µL de Acetato de Sódio (3M e pH 5,2); 625µL de álcool absoluto] e armazenado no freezer por 10 minutos.

Os microtubos foram retirados do freezer e centrifugados por 5 minutos a 12.000rpm/4°C. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 500µL de etanol 70% gelado e homogeneizou-se por inversão. As amostras foram submetidas à centrifugação por 5 minutos a 12.000 rpm/4°C, descartando o sobrenadante. Após esta etapa, os microtubos foram invertidos para a secagem do sedimento sobre papel absorvente por 10 minutos.

Após a secagem, o DNA foi ressuspendido em 100µL de TE pH 8,7 com RNase (Promega®) e incubados em banho-maria (37°C) por 60 minutos sendo posteriormente, armazenados a -20°C. O DNA extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2%, e a pureza e concentração do DNA foram determinadas por meio de densidade óptica em nanofotometro (260/280 nm).

Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Para avaliar a viabilidade do DNA, foi realizada a amplificação de fragmentos da região ITS4 do DNA ribossomal (WHITE *et al.*, 1990), utilizada para identificação molecular das espécies. Para tanto, foi realizada PCR Multiplex em que foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores específicos de quatro espécies distintas de *Candida* (*C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*) conforme descritos por Li *et al.* (2003) e White *et al.* (1990).

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador BIORAD® modelo MyCycler™ Thermal Cycler. As soluções de amplificação foram preparadas em volume final de 25 µL, constituídos por 12,5 µL de PCR Master MIX (Kapa Biosystems®), 1 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (10 pmoles) e 2 µL DNA genômico (10 a 20 ng). o programa de amplificação do termociclador foi: desnaturação inicial de 94°C por 3', 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1', anelamento a 55°C por 1' e extensão a 72°C por 1', seguido da extensão final a 72°C por 5'. Os produtos resultantes das amplificações por PCR Multiplex foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2%.

Análise estatística

O experimento foi alocado em um delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e cinco de repetições. Os dados foram analisados com o auxílio do *Software ASSISTAT* versão 7.7. (SILVA & AZEVEDO, 2006). A comparação de médias foi feita pelo teste Tukey, sendo considerados significativos valores de $P < 0,01$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 foram apresentados as estimativas dos quadrados médios, médias e coeficiente de variação. O coeficiente de variação para a razão foi de 4,66, indicando boa precisão, visto que a magnitude de tal parâmetro foi inferior a 10%.

Tabela 1. Estimativas dos quadrados médios, médias e coeficientes de variação experimental de três parâmetros avaliadas a partir do DNA extraído de leveduras do gênero *Candida*. Dourados/MS, 2014

F.V	G.L	Quadrados médios		
		NCEL	RAZÃO	CONCENT
Diluições	3	6,6149**	0,1236**	3348,2460 ^{ns}
Resíduo	16	0,0313	0,0052	1117,9537
Média	-	0,6871	1,55	48,19
CV%	-	25,75	4,66	69,38

F.V = Fonte de Variação; GL = Grau de Liberdade; NCEL = número de células (10^7 cel/cm³); RAZÃO = razão (260/280 nm); CONCENT = concentração (ng/μL); ** = significativo a (p<0,01) pelo teste F; ^{ns} = não significativo.

Não foi observada diferença significativa entre a concentração conforme observado na Tabela 1. Houve diferença significativa para os parâmetros, número de células e razão, indicando que pelo menos duas médias são estatisticamente diferentes. A diluição 1:10 apresentou melhores valores de absorbância no que diz respeito à razão (média = 1,78), seguido pelas diluições 1:100, 1:1000 e 1:10000 (Tabela 2). Valores de razão de absorbância entre 1,8 e 1,6 são os recomendados no que diz respeito à qualidade do DNA. No entanto valores como 1,4 também podem ser considerados satisfatórios para utilização em PCR conforme descreve Regitano et al. (2001) e Lee et al. (2010).

Tabela 2. Comparação entre as médias de três características a avaliadas a partir do DNA extraído de leveduras do gênero *Candida*. Dourados/MS, 2014

Diluições	Médias		
	NCEL (10^7 cel/cm ³)	RAZÃO (260/280 nm)	CONCENT (ng/μL);
1:10	2,40a	1,78 ^a	84,68a
1:100	0,24a	1,48b	45,26a
1:1000	0,05a	1,46b	38,68a
1:10000	0,03a	1,47b	24,14a

NCEL = número de células (10^7 cel/cm³); RAZÃO = razão (260/280 nm); CONCENT = concentração (ng/μL). Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (p<0,05) pelo teste de Tukey.

Apesar de não ter ocorrido diferenças significativas entre as concentrações do DNA, o método de extração utilizado foi capaz de proporcionar DNA de qualidade, com concentrações e pureza satisfatórias para utilização em PCR multiplex de fragmentos da região ITS4 do DNA ribossomal de *Candida*, visto que o DNA foi amplificado independente do número de células em que foi extraído. Entretanto deve-se levar em consideração que os produtos amplificados provenientes na diluição 1:10 foram os que apresentaram bandas mais nítidas (Figura 2). A análise estatística revelou que as combinações, número de células e qualidade do DNA, apresentaram diferenças importantes entre si, evidenciando que o número de células deve ser levado em consideração para que se obtenha um DNA com melhor qualidade.

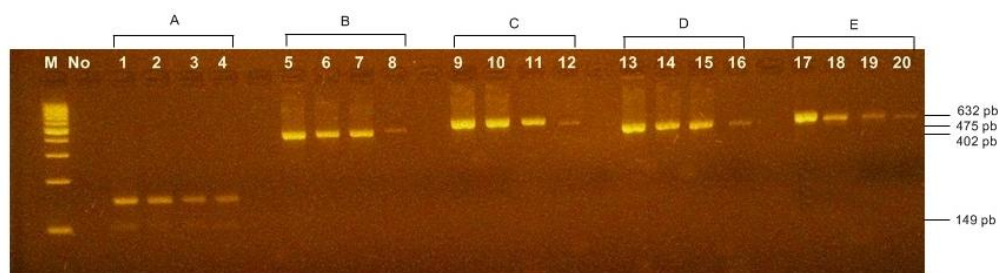


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 2% de fragmentos de PCR Multiplex. M = Marcador de peso Molecular de 100pb. No = Controle Negativo da Reação. Colunas 1, 5, 9, 13, 17 = Diluição 1:10. Colunas 2, 6, 10, 14, 18 = Diluição 1:100. Colunas 3, 7, 11, 15, 19 = Diluição 1:1000. Colunas 4, 8, 12, 20 = Diluição 1:10000. A = *Candida tropicalis* (149pb), B = *Candida albicans* (402pb), C e D = *Candida krusei* (475pb), E = *Candida glabrata* (632pb).

CONCLUSÕES

A quantidade de células influencia a qualidade do DNA, independente da concentração obtida, e o protocolo desenvolvido para extração de DNA de leveduras do gênero *Candida* demonstrou ser satisfatório podendo ser utilizado para diversos fins no que diz respeito a análises moleculares.

AGRADECIMENTOS

À UFGD pelo apoio logístico, a FUNDECT e a CAPES pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Araújo FR, Ramos CAN, Luíz HL, Péres IAHS, Oliveira RHM, Souza IIF, Russi LS. Avaliação de um protocolo de extração de DNA genômico a partir de sangue total. Comunicado técnico – Campo Grande (MS): Embrapa. 2009.
- Lee JH, Park Y, Choi JR, Lee EK, Kim HS. Comparisons of three automated systems for genomic DNA extraction: In a clinical diagnostic laboratory. Yonsei Med J, Seoul. 2010; 51(1):104-10.
- Li YL, Leaw SN, Chen JH, Chang HC, Chang TC. Rapid Identification of Yeasts Commonly Found in Positive Blood Cultures by Amplification of the Internal Transcribed Spacer Regions 1 and 2. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2003.
- Marengoni NG, Machado MRF, Gasparino E. Extração de DNA genômico em tecidos sólidos de peixes teleósteos. Seminário: ciências agrárias, Londrina (PR). 2006; 27 (1): 99-106.
- Regitano LCA. Extração de dna para aplicação em reação em cadeia da polimerase (PCR). In: Regitano LCA & Coutinho LL. Biologia molecular aplicada à produção animal. Brasília (DF): Embrapa Informação Tecnológica. 2001:180-86.
- Silva, F de AS, Azevedo CAV de A. New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software. In: World Congress on Computers in Agriculture, 4, Orlando-FL-USA: Anais... Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2006. p. 393-396.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p. 315-322 In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. INNIS, MA, GELFAND, DH, SNINSKY, JJ, WHITE, TJ Academic Press, Inc., New York. 1990.