



Encontro Internacional  
de Produção Científica  
24 a 26 de outubro de 2017

ISBN 978-85-459-0773-2

## IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *CANDIDA SPP.* EM AMOSTRAS DE PACIENTES COM CÂNCER BUCAL POR MEIO DE PCR – MULTIPLEX

*Alicia Ayumi Kimura*<sup>1</sup>; *Marcela Funaki dos Reis*<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica do Curso de Biomedicina, Centro Universitário Cesumar – UNICESUMAR. alicia.kimura@gmail.com  
<sup>2</sup>Orientadora, Doutora, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, UNICESUMAR. marcela.reis@unicesumar.edu.br

### RESUMO

O objetivo da presente pesquisa será identificar *Candida spp.* em amostras de pacientes diagnosticados com câncer bucal e que frequentam a Clínica Odontológica da Unicesumar – Centro Universitário Cesumar, Maringá – PR por meio de PCR – multiplex. A amostragem será feita através da raspagem da mucosa bucal com swab estéril e descartável, seguida pelo isolamento asséptico em placas de Petri com ágar Sabourand. O DNA para amplificação será extraído pelo método fenol-clorofórmio a partir das culturas das espécies de *Candida*, em seguida passará pela quantificação por meio da corrida em eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo. A identificação ao nível de espécies de *Candida* será baseada na reação em cadeia da polimerase – PCR por nested-multiplex com *touchdown*, na qual o primeiro *round* utilizará os primers universais ITS1 e ITS4 e o segundo *round*, caracterizado como espécie –específico com os primers para *C. albicans* (CALB), *C. tropicalis* (CTR), *C. glabrata* (CGL), *C. krusei* (CKR), *C. parapsilosis* (CPAR). Por fim, será realizada uma corrida eletroforética para a visualização dos resultados da amplificação por PCR e posterior análise estatística. Espera-se, com estes resultados, distinguir as espécies de *Candida* por meio PCR – multiplex e verificar a prevalência em pacientes com câncer bucal.

**PALAVRAS-CHAVE:** Candidíase; Mucosa bucal; Reação em Cadeia da Polimerase.

### 1 INTRODUÇÃO

Os tumores de cabeça e pescoço representam um grande desafio para a saúde pública devido sua significativa incidência e mortalidade, principalmente em países emergentes. Dentre esses tumores, o câncer bucal é considerado o sexto mais incidente e corresponde a aproximadamente 10% das neoplasias malignas diagnosticadas mundialmente (MELO et al., 2010). Devido ao tratamento antineoplásico para câncer bucal podem ocorrer alterações na biota desta região e associada a outros fatores pode favorecer a colonização e infecção por microrganismos oportunistas causadas pela *Candida spp.* (SENA et al., 2009).

As leveduras do gênero *Candida* fazem parte da microbiota normal trato gastrointestinal de indivíduos saudáveis interagindo como colonizadores comensais, entretanto, em situações de alteração na homeostasia da microbiota normal, comprometimento do sistema imunológico ou em uso de medicamentos como de antimicrobianos podem tornar-se patogênicas causando a Candidíase (PEIXOTO et al., 2014; ZHANG et al., 2016).

A candidíase é uma infecção frequentes em pacientes oncológicos e dispõe de manifestações clínicas que variam desde lesões agudas, crônicas e ainda superficiais (COSTA, 2016; SENA et al., 2009) com predisposição a complicações de recuperação lenta e internação prolongada (SIQUEIRA, 2014). *Candida albicans* é considerada a causa primária de candidíase e a principal responsável pelas manifestações clínicas, no entanto a doença pode ser causada por outras espécies e a identificação correta do agente etiológico por vezes é dificultada pelo métodos diagnósticos convencionais (IMABAYASHI et al., 2016; MANZANO, 2016).

O diagnóstico clínico de candidíase é realizado com base na sintomatologia apresentada pelo paciente, contudo apresenta um diagnóstico inconclusivo, já que os sinais e sintomas não são específicos de cada espécie de *Candida*. Para tanto, faz-se necessário o diagnóstico laboratorial realizado por meio da raspagem das lesões e posterior identificação presuntiva e confirmatória (COSTA, 2016; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010). A identificação das leveduras do gênero *Candida* se dá



Encontro Internacional  
de Produção Científica  
24 a 26 de outubro de 2017

ISBN 978-85-459-0773-2

por métodos tradicionais morfológicos e bioquímicos, além da utilização de métodos de cultivo cromogênico (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; MANZANO, 2016). No entanto, associado a um tratamento prolongado com alteração da biodiversidade fúngica pelo uso de antifúngicos, efeitos colaterais, além do desconforto que os agentes tópicos podem causar aos pacientes a identificação das espécies de *Candida* torna-se essencial para uma terapia antifúngica apropriada (IMABAYASHI et al., 2016; MANZANO, 2016; SENA et al., 2009). E dentro deste contexto denota-se problemática para o diagnóstico diferencial das espécies desta levedura em pacientes com câncer bucal (MÍMICA et al., 2009; TARINI et al., 2010). Nesse sentido, o desenvolvimento de métodos moleculares baseado em análise de DNA torna-se imprescindível para a identificação das espécies de *Candida*, pois possibilita, por meio de uma única análise, combinar vários marcadores moleculares espécies-específicos. Contribuindo, portanto, para um diagnóstico mais rápido, sensível e específico, que servirá para direcionar um tratamento mais adequado e eficaz em pacientes que sofrem com candidíase.

Assim, o objetivo deste estudo é identificar *Candida* spp. em amostras de pacientes com câncer bucal por meio de PCR – multiplex.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras do estudo serão providas de pacientes diagnosticados com câncer bucal e que frequentam a Clínica Odontológica da Unicesumar – Centro Universitário Maringá, Maringá – Paraná para tratamento odontológico.

A pesquisa seguirá os aspectos éticos conforme a resolução 466/12 (BRASIL, 2012) e o projeto será submetido a apreciação pelo Comitê em Ética da Centro Universitário Cesumar, bem como a Comissão de Ética em Pesquisa – CONEP, via Plataforma Brasil.

Para este fim, como critério de inclusão adotado serão indivíduos maiores de 18 anos de idade, de ambos os sexos e com diagnóstico de câncer bucal confirmado. Os pacientes serão convidados a participar da pesquisa, em seguida será realizado o esclarecimento indicando a finalidade do estudo e depois do aceite será entregue a cada doador de amostra bucal o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE.

A amostragem será realizada por conveniência com o número de indivíduos amostrados determinados de acordo com o número de pacientes que frequentarem a clínica odontológica no período de Agosto a Setembro de 2017 e concordarem em participar da pesquisa.

Para a coleta do material será realizada raspagem da mucosa bucal utilizando Swab estéril e descartável. Em seguida o material coletado será acondicionado em tubos plástico contendo solução salina estéril. Logo após a coleta, o material será encaminhado ao Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular do Centro Universitário Cesumar - Unicesumar para armazenamento a 4°C respeitando o prazo de 24 horas para isolamento em meio de cultivo.

As amostras serão isoladas assepticamente em placas de Petri com ágar Saubourand, preparado de acordo com as instruções do fabricante. As placas inoculadas permanecerão incubadas em estufa microbiológica 37°C ± 1°C durante 24 à 48 horas para o crescimento das colônias.

O DNA para amplificação será extraído a partir das culturas das espécies de *Candida* segundo o método proposto por Crestani (2007), com modificações. As colônias coletadas serão transferidas para a um microtubo contendo 500 µL de tampão de lise celular (NaCl 0,15M; Tris – HCl 50M; EDTA 10mM; SDS – 2%; pH 8 ) e incubação a 65°C por 20 minutos. A desproteção será realizada com 500 µL da solução de fenol saturado-clorofórmio (1:1), agitação em vórtex por 15 minutos e centrifugação a 13 000 r.p.m. A fase aquosa será adicionado 400 µL de fenol saturado,





# Encontro Internacional de Produção Científica

24 a 26 de outubro de 2017

ISBN 978-85-459-0773-2

misturado em vórtex por 5 minutos e centrifugados por 15 minutos a 13000 r.p.m, a fase aquosa formada, será novamente submetida a processo de extração com 400 µL de fenol. Ao sobrenadante será adicionado 1mL de etanol absoluto e a precipitação do DNA ocorrerá sob incubação a -20°C durante 20 minutos. Em seguida será realizada uma nova centrifugação por 15 minutos a 13000 r.p.m., o sedimento será lavado com etanol 70% gelado, e seco a temperatura ambiente e ressuspenso em 80 µL de TE (Tris-HCl 1M, EDTA 0,5M; pH8,0). A suspensão será tratada com 3 µL RNase na concentração de 50 µg/mL por 30 minutos a 37°C. As amostras de DNA extraído serão armazenadas em freezer à 4°C para posterior amplificação.

Os produtos da extração de DNA serão avaliados quanto a pureza e integridade e quantificação por meio de corrida eletroforética em gel de agarose utilizado a metodologia de Kanbe et al. (2002) com modificações. Os produtos serão analisados por meio de corrida em gel de agarose a 0,8% -1,0% corado com brometo de etídeo (0,4 µg/mL). Será utilizado tampão de eletroforese TBE 1X (0,089M Tris-base, 0,089M Ácido bórico, 0,002M EDTA). Para o preparo das amostras e controles positivos serão utilizados 3 µL de *loading dye* (0,25 % de azul de bromofenol, 30 % glicerol) e 5 µL da amostra de DNA. O controle negativo seguirá o mesmo padrão de preparação, no entanto será adicionado 5µL de água ultrapura em substituição a amostra de DNA. Como padrão de peso molecular e de concentração, será utilizado 2 µL do DNA do fago Lambda acrescido de 2 µL do *loading dye*. A distribuição nas canaletas seguirá layout com marcador molecular de 1kb, controles positivos das cinco espécies testadas, amostras a serem testadas e por último o controle negativo. A corrida eletroforética será conduzida por 60 minutos a 80 V.

Para a identificação ao nível de espécies de *Candida* seguirá a metodologia proposta por Taira (2014) baseada na nested-multiplex do tipo *touchdown* (ROUX, 2009). No primeiro *round* de amplificação serão utilizados os *primers* universais ITS1 e ITS4 (Tabela 1).

Tabela 1: Sequências de *primers* para PCR-Multiplex.

<b>Primer</b>	<b>Sequência</b>	<b>Amplicon</b>
ITS1/4	F: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCCGG-3' R: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	Variável
CALB1/2	F: 5'-TTTATCAACTTGTACACACCAGA-3' R: 5'-ATCCCGCCTTACCACTACCG-3'	272pb
CGL1/2	F: 5'-TTATCACACGACTCGACACT-3' R: 5'-CCCACATACTGATATGGCCTACAA-3'	423pb
CPAR3/2	F: 5'-GCCAGAGATTAACCAACCA-3' R: 5'-CCTATCCATTAGTTTATACTCCGC-3'	297pb
CTR1/2	F: 5'-CAATCCTACCGCCAGAGGTTAT-3' R: 5'-TGGCCACTAGCAAATAAGCGT-3'	357pb
CKR2/3	F: 5'-ACTACTGCGTGAGCGGAA-3' R: 5'-AAAAAGTCTAGTTCGCTCGG-3'	362pb

F= Forward, R= Reverse, CALB: *C. albicans*, CGL= *C. glabrata*, CPAR= *C. parapsilosis*, CTR= *C. tropicalis*, CKR= *C. krusei*, pb=pares de bases. Adaptado a partir de Del Negro (2008)

Serão preparado 25 µL de reação contendo tampão da enzima 1X, 200 µM de dNTPs, 0,2 µM dos *primers*, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,25 U da enzima Taq DNA polimerase e 50 ng de DNA dos pacientes de câncer bucal. O programa de ciclagem será desnaturação inicial de 5 minutos à 95°C, seguida de 35 ciclos de desnaturação por 45 segundos à 95°C, anelamento por 45 segundos à 50°C e extensão por 45 segundos 72°C, com extensão final de 5 minutos à 72°C. O segundo *round* de amplificação será caracterizado como espécie –específico baseado no emprego dos *primers* para cada espécie de *Candida* (Figura 1). Nesta reação serão preparados 25 µL com tampão da enzima 1X, 200 µM de dNTPs, *primers* nas concentrações de 0,20 µM de CALB, 0,12 CTR, 0,30 µM CGL, 0,20 µM de CKR, e 0,15 µM de CPAR, 1,5 µM de MgCl<sub>2</sub>, 1,25 U da Taq DNA-polimerase, 5% de DMSO e 2 µL do produto do primeiro *round* de amplificação na diluição de 1:100. O programa de



ciclagem do segundo *round* será desnaturação inicial de 5 minutos à 95°C, seguida de 10 ciclos de desnaturação 45 segundos à 95°C, anelamento *touchdown* por 45 segundos à 67-58°C (temperatura decrescente de 1°C por ciclo) e extensão por 45 segundos à 72°C. Em seguida mais 20 ciclos de desnaturação por 45 segundos à 95°C, anelamento à 58°C, extensão por 45 segundos à 72°C, e uma extensão final por 5 minutos à 72°C.

Para visualização dos resultados da PCR será novamente utilizada a metodologia de Kanbe et al. (2002) com marcador de peso molecular (*Ladder*) de 100pb. Em seguida serão aplicadas as amostras de estudo.

Todas as análises serão realizadas em duplicatas e os parâmetros de pureza, integridade, e os resultados da amplificação serão analisados por ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey a  $p > 0,05$  de significância.

### 3 RESULTADOS ESPERADOS

Neste estudo, serão identificadas as espécies de *Candida* encontradas em amostras de pacientes com câncer bucal por meio de PCR – multiplex. Para tanto é esperado que a coleta das espécies de *Candida* a partir de amostras bucais destes pacientes e que a extração do DNA forneça material de qualidade para posterior análise molecular. Assim, será possível distinguir as espécies de *Candida* por meio de PCR – multiplex através deste material obtido. Em vista disso, é esperado ao final do procedimento e análise dos dados resultantes, sejam verificadas quais as espécies de *Candida* são comumente relacionadas a infecções oportunistas em pacientes com câncer bucal, além de identificar a espécie prevalente.

### REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da saúde. **Resolução N°466**. Conselho nacional de saúde e comissão nacional de ética em pesquisa, p.1-12, 2012. Acesso em: 18 de Jun. de 2017. Disponível em: <<http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012/Reso466.pdf>>.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2016 Incidência de câncer no Brasil. INCA, 2015.
- COSTA, K. R. A. D. ***Candida albicans*: uma revisão de literatura**. Aparecida de Goiânia: Faculdade Alfredo Nasser – Instituto de Ciências da Saúde, 2016, 5 p.
- CRESTANI, J. **Isolamento e caracterização de leveduras de uma mamadeira e a sua correlação com um caso clínico de criptococose**. 128f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2007.
- GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatologia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **J Bras Patol Med Lab**. v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.
- IMABAYASHI, Y.; MORIYAMA, M.; TAKESHITA, T.; IEDA, S.; HAYASHIDA, J. N.; TANAKA, A.; MAEHARA, T.; FURUKAWA, S.; OHTA, M.; KUBOTA, K.; YAMAUCHI, M.; ISHIGURO, N.; YAMASHITA, Y.; NAKAMURA, S. Molecular analysis of fungal populations in patients with oral candidiasis using next-generation sequencing. **Nature**. v. 6, n. 28110, p. 1-8, 2016.
- KANBE, T.; HORII, T.; ARISHIMA, T.; OZEKI, M.; KIKUCHI, A. PCR-based identification of pathogenic *Candida* species using primer mixes specific to *Candida* DNA topoisomerase II genes. **Yeast**. v. 29, p. 973-989, 2002.





Encontro Internacional  
de Produção Científica  
24 a 26 de outubro de 2017

ISBN 978-85-459-0773-2

MANZANO, M. I. **Identificação molecular por nested-PCR de *Candida* sp. em mucosa bucal de pacientes atendidos em clínica odontológica.** 17f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação de Biomedicina) – Unicesumar - Centro Universitário Cesumar. Maringá, 2016.

MELO, L. D. C.; SILVA, M. C. D.; BERNARDO, J. M. D. P.; MARQUES, E. B.; LEITE, I. C. G. Perfil epidemiológico de casos incidentes de câncer de boca e faringe. **RGO.** v. 58, n. 3, p. 351-355, 2010.

MÍMICA, L. M. J.; UEDA, S. M. Y.; MARTINO, M. D. V.; NAVARINI, A.; MARTINI, I. J. Diagnóstico de infecção por *Candida*: avaliação de testes de identificação de espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade. **J Bras Patol Med Lab.** v. 45, n. 1, p. 17-23, 2009.

PEIXOTO, J. V.; ROCHA, M. G.; NASCIMENTO, R. T. L.; MOREIRA, V. V.; KASHIWABARA, T. G. B. *Candidíase* – uma revisão de literatura. **BJSCR.** v. 8, n. 2, p. 75-82, 2014.

ROUX, K. H. Optimization and troubleshooting in PCR. **CSH Protocols.** v. 4, n. 4, p. 1-6, 2009.

SENA, M. F. D.; GONDIM, L. A. M.; SOUZA, G. C. D. A.; FERREIRA, M. A. F.; LIMA, K. C.

Tratamento de candidíase oral em pacientes com câncer de cabeça e pescoço: uma revisão sistemática. **AMRIGS.** v. 53, n. 3, p. 241-245, 2009.

SIQUEIRA, J. D. S. S.; BATISTA, S. A.; JUNIOR, A. S.; FERREIRA, M. F.; AGOSTINI, M.; TORRES, S. R. *Candidíase* oral em pacientes internados em UTI. **RBO.** v. 71, n. 2, p. 176-9, 2014.

TAIRA, C. L.; OKAY, T. S.; DELGADO, A. F.; CECCON, M. E. J. R.; ALMEIDA, M. T. G. D.; NEGRO, G. M. B. D. A multiplex nested PCR for the detection and identification of *Candida* species in blood samples of critically ill paediatric patients. **BMC Infectious Diseases.** v. 14, n. 406, p. 1-7, 2014.

TARINI, N. M. A.; WAHID, M. H.; IBRAHIM, F.; YASMON, A.; DJAUZI, S. Development of multiplex-PCR assay for rapid detection of *Candida* spp. **Med. J. Indones.** v. 19, n. 2, p. 83-88, 2010.

ZHANG, J.; HUNG, G. C.; NAGAMINE, K.; LI, B.; TSAI, S.; LO, S. C. Development of *Candida*-Specific Real-Time PCR assays for the detection and identification of eight medically important *Candida* species. **Microbiology Insights.** v. 9, p. 21-28, 2016.