

PRESENÇA DE DNA DE *Paracoccidioides* spp. EM SOLO DO BIOMA PAMPA BRASILEIRO

JOSIARA FURTADO MENDES¹; VANICE RODRIGUES POESTER²; TCHANA MARTINEZ BRANDOLT³; CAROLINA LITCHINA BRASIL⁴; MELISSA ORZECOWSKI XAVIER⁵; MÁRIO CARLOS ARAÚJO MEIRELES⁶

¹ Universidade Federal de Pelotas (UFPeL) – josiara.mds@hotmail.com

² Universidade Federal do Rio Grande (FURG) – vanicerp@gmail.com

³ FURG – tchanabrandolt@hotmail.com

⁴ UFPeL – carolinalitchinabrasil@hotmail.com

⁵ FURG – melissaxavierfurg@gmail.com

⁶ UFPeL – meireles@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A Paracoccidioidomicose (PCM) vem sendo descrita desde 1942 no Rio Grande do Sul (RS) (CAMPOS et al., 1942), no entanto os processos ecológicos que envolvem o agente *Paracoccidioides* (*P. brasiliensis* e *P. lutzii*) ainda não foram totalmente esclarecidos. Seu nicho ecológico ainda não foi determinado, o que impede um melhor conhecimento da forma e do local mais específico em que os indivíduos são infectados pelo patógeno. Acredita-se que estes micro-organismos tenham seu habitat localizado no solo, embora não haja comprovação devido à dificuldade de isolar o agente do ambiente, e ao grande período de latência que a doença pode apresentar (ARANTES et al., 2013; 2016).

Há menos de 10 anos foi possível evidenciar na literatura que a PCM tem alta prevalência também nas cidades do extremo sul do RS, com cerca de 100 casos diagnosticados somente nas últimas duas décadas (SOUZA et al., 2014). Ainda hoje a grande maioria dos estudos sobre a PCM no RS se restringem a região Metropolitana de Porto Alegre, sendo estudos no Bioma Pampa escassos (LONDERO, 1990; ROBERTO et al., 2016). Elucidar dados sobre os agentes da PCM nestas outras regiões do estado irá ajudar a compreender sua ecologia como um todo, fazendo com que essa doença ainda hoje negligenciada ganhe uma maior visibilidade. Sendo assim, este estudo teve como objetivo relatar a detecção do DNA de *Paracoccidioides* spp. em amostras de solo da cidade de Bagé, no Bioma Pampa, Rio Grande do Sul, Brasil.

2. METODOLOGIA

Foram incluídos no estudo três Haras da cidade de Bagé, RS, nos quais haviam animais soropositivos para anticorpos anti-*Paracoccidioides* detectados em estudos prévios. A área total dos haras foi avaliada, sendo coletadas amostras de solo de todos os piquetes, buscando pontos mais próximos aos cursos d'água. De cada haras foram coletados 10 *pools* de amostras (300g cada), sendo cada *pool* correspondente a 20 coletas, totalizando 30 *pools* de amostras de solo referentes a 600 pontos coletados. Os pontos de coleta foram definidos com auxílio de um GPS, a fim de cobrir toda a área previamente determinada, e as amostras foram coletadas em frascos estéreis com auxílio de trado, a uma profundidade de 10 cm, armazenadas em temperatura ambiente, e enviadas ao Laboratório de Micologia da FAMED-FURG para realização dos testes de biologia molecular.

Após 30 dias de armazenamento, as amostras foram processadas para extração de DNA utilizando o Kit de Extração de DNA do solo da Norgen Biotek®

(Canadá) de acordo com as instruções do fabricante. A detecção de DNA de *Paracoccidioides* spp. foi realizada a partir da técnica de *Nested* PCR utilizando os *primers* panfungal ITS4 e ITS5 como *primers* externos e PBITS-E e PBITS-T como *primers* internos (TERÇARIOLI et al., 2007; ARANTES et al., 2013). As reações foram realizadas em 25µL do *mix* da reação: 18.05 µL de água ultrapura, 2.5 µL de tampão 10x, 0,75 µL de Mg₂Cl₂ (50mM), 0.5 µL de cada primer ITS 4 e ITS5, 0.5 µL de DNTP (10mM) e 0.2 µL da Platinum Taq polimerase (Invitrogen®) mais 2 µL do DNA extraído. A amplificação foi realizada no termociclador Eppendorf®. O ciclo térmico para ITS4/ITS5 foi: um ciclo inicial à 94°C/5 minutos, seguido de 25 ciclos à 94°C/1 minuto, 60°C/2 minutos e 72°C/2 minutos e um ciclo final à 72°C/7 minutos. Para os *primers* internos PBITS-E/PBITS-T as condições foram semelhantes, com exceção da temperatura de anelamento que foi de 62°C. Os produtos da PCR foram avaliados em gel de agarose 1,5% com marcador de 100 pb (Ladder®) sendo visualizado em transluminador de luz UV. Foram consideradas positivas aquelas amostras que resultaram em visualização de banda com aproximadamente 424pb. Como controle positivo foi utilizado DNA da cepa Pb18 extraído *in house*, e uma amostra de DNA previamente negativa foi utilizada como controle negativo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 30 *pools* de amostras de solo processados, dez (33,33%) foram positivos para *Paracoccidioides* spp. (Figura 1), sendo dois (20%) do Haras 1, seis (60%) do Haras 2 e dois (20%) do Haras 3 (p=0,09).

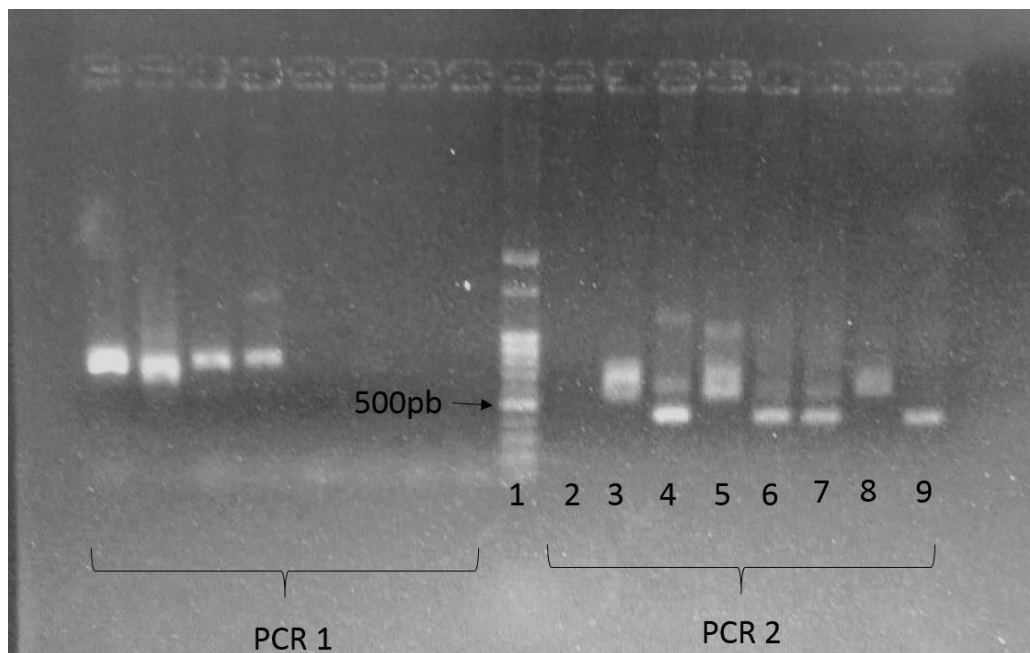


Figura 1: Gel de agarose dos produtos da *Nested*-PCR de cinco amostras de solo (1= marcador de 100pb; 2= branco; 3= controle negativo; 4= controle positivo; 5 e 8= amostras negativas; 6,7 e 9 amostras positivas para *Paracoccidioides* spp. com aproximadamente 424pb).

Este estudo comprova pela primeira vez a presença de DNA de *Paracoccidioides* spp. em solo do RS. Considerando a estimativa de que 50% dos habitantes rurais de áreas endêmicas já foram expostos aos agentes da PCM

(SHINAKAI-YASUDA et al., 2006), este achado torna-se de extrema relevância na medida em que aproximadamente 1,6 milhões de habitantes gaúchos residem e trabalham na região rural do estado. No Bioma Pampa 46% desses habitantes trabalham com pecuária e 30% com agricultura familiar e, devido essa atividade podem ser inseridos no grupo de risco para PCM, já que atuam diretamente com o solo (BRASIL, 2017).

Regiões consideradas reserváreas do *Paracoccidioides* spp. correspondem a locais de alta pluviosidade (1300 – 2000 mm) e temperaturas amenas (10 – 25°C) (LONDERO et al., 1990). O Pampa gaúcho apresenta características compatíveis com estas descritas como ideais para o desenvolvimento do fungo na sua fase sapróbia, com precipitações regularmente distribuídas ao longo do ano (medias mensais de 104mm³ a 142mm³) e temperatura média anual de 18°C. No entanto, apresenta comumente períodos de geadas no inverno (FEE, 2012), o que não pôde ser considerado como um fator impeditivo determinante para a inexistência do *Paracoccidioides* spp. em nossa região. Assim, nosso estudo corrobora com outros autores que descrevem que a distribuição geográfica de *Paracoccidioides* spp. vem se expandindo no Brasil, e que as espécies *P. brasiliensis* e *P. lutzii* não estão mais restritas a determinadas regiões do país como acreditava-se anteriormente; podendo inclusive estar distribuídas por todo território nacional (ROBERTO et al., 2016; ARANTES et al., 2016).

Os solos incluídos neste estudo caracterizavam-se por textura argilosa, cobertura vegetal natural e/ou semeada (pastagem) e áreas úmidas, com presença de açudes e pequenos cursos de água. Dados estes que vão ao encontro do descrito na literatura relacionando a presença do patógeno no meio ambiente com locais em que há proximidade a cursos d'água (TERÇARIOLI et al., 2007, ARANTES et al., 2013; 2016). A presença de tatus (*Dasypodidae*), considerados como possíveis portadores assintomáticos da PCM (RICHINI-PEREIRA et al., 2009), foi relatada nas zonas de mata em torno dos haras.

Tendo em vista que o isolamento do fungo diretamente do solo é difícil de ser realizado especialmente devido a se tratar de um micro-organismo de crescimento lento, técnicas moleculares tornam-se essenciais para o conhecimento da ecoepidemiologia de *Paracoccidioides* spp. no ambiente. Os *primers* utilizados neste estudo compreendem as regiões gênicas de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, portanto as amostras positivas neste trabalho serão posteriormente sequenciadas para definição das espécies fungicas.

4. CONCLUSÕES

O DNA de *Paracoccidioides* spp. foi detectado em 33,33%% das amostras de solo estudados. Este estudo representa um passo importante, mostrando pela primeira vez a detecção do DNA de *Paracoccidioides* spp. em solo do sul do Rio Grande do Sul, Brasil, e instiga estudos adicionais para uma melhor compreensão da ecoepidemiologia de agentes de PCM nesta área caracterizada pelo Bioma Pampa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARANTES, T.D.; THEODORO, R.; TEIXEIRA, M.D.M.; BOSCO, S.D.M.G.; BAGAGLI, E. Environmental Mapping of *Paracoccidioides* spp. in Brazil Reveals New Clues into Genetic Diversity, Biogeography and Wild Host Association. **PLoS Neglect Tropical diseases**, Califórnia v.5, n.10, p. doi: 10.1371/journal.pntd.0004606, 2016.

ARANTES, T.D.; THEODORO, R.C.; MACORIS, S.A.G.; BAGAGLI, E. Detection of *Paracoccidioides* spp. in environmental aerosol samples. **Medical Mycology**, Oxford, v.1, n.51, p.83-92, 2013.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. **Biomás. Pampa**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomás/pampa>. Acessado em agosto de 2017.

CAMPOS EC. Sobre dois casos de granuloma paracoccidióidico no Rio Grande do Sul. **Arquivos do Departamento Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul**, RS, v.12, n.3, p.71-77, 1942.

FUNDAÇÃO DE ECONOMIA E ESTATÍSTICA (FEE) [<http://www.fee.rs.gov.br/>]. **Rio Grande do Sul, Brasil**. Disponível em: http://www.fee.rs.gov.br/feedados/consulta/unidades_geo.asp>. Acessado em: setembro 2017.

LONDERO, A.T.; RAMOS, C.D. Paracoccidioidomicose. Estudo clínico e micológico de 260 casos observados no interior do Estado do Rio Grande do Sul. **Jornal de Pneumologia**, Brasília, v.16, n.4, p.129-132, 1990.

RICHINI-PEREIRA, V.B.; BOSCO, S, M.; THEODORO, R.C.; BARROZO, L.; PEDRINI, S.C.; ROSA, P.S.; BAGAGLI, E. Importance of the xenarthrans in the ecoepidemiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **BMC Research Notes**, London, v. 42, n.2, p.228, 2009.

ROBERTO, T.N; RODRIGUES, A.M.; HAHN, R.C.; DE CAMARGO, Z.P. Identifying *Paracoccidioides* phylogenetic species by PCR-RFLP of the alpha-tubulin gene. **Medical Mycology**. Oxford, v.54, n.3, p.240-247, 2016.

SHIKANAI-YASUDA, M.A.; TELLES-FILHO, Q.; MENDES, R.P.; COLOMBO, A.L.; MORETTI, M.L. Guidelines in paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 39, n.3, p.297-310, 2006.

SOUZA, S.P.; JORGE, V.M.; XAVIER, M.O. Paracoccidioidomycosis in southern Rio Grande do Sul: A retrospective study of histopathologically diagnosed cases. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.45, n.1, p.243-247, 2014.

TERÇARIOLI, G.R.; BAGAGLI, E.; REIS, G.M.; THEODORO, R.C.; BOSCO, S.D.E.; MACORIS, A.S. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. **BMC Microbiology**, London, v.92, n.7, p.1-8, 2007.