

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL - MG

PAOLA SINGI

**ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DE DNA EM PACIENTES COM E SEM
LESÃO DE BOCA NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

**ALFENAS-MG
2014**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL - MG

PAOLA SINGI

**ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DO DNA EM PACIENTES COM E SEM
LESÃO DE BOCA NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho

**ALFENAS-MG
2014**

Singi, Paola.

Análise do perfil de metilação do DNA em pacientes com e sem lesão de boca na paracoccidiodomicose / Paola Singi. - Alfenas, 2014.

72 f. -

Orientador: Luiz Cosme Cotta Malaquias.

Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) -
Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. Paracoccidiodomicose. 2. Metilação de DNA. 3. Reação em Cadeia da Polimerase. I. Malaquias, Luiz Cosme Cotta. II. Título.

CDD: 616.969

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL - MG

PAOLA SINGI

**ANÁLISE DO PERFIL DO METILAÇÃO DE DNA EM PACIENTES COM E SEM
LESÃO DE BOCA NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

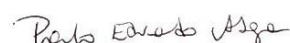
A Banca examinadora, abaixo-assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Mestre em Ciências
Odontológicas da Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias
Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho

Aprovada em: 05/09/2014

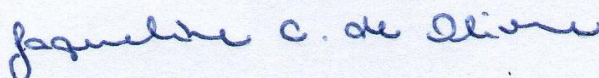
Assinaturas:

Prof. Dr.: Paulo Eduardo Alencar de Souza



Instituição: PUC-Minas

Prof. Dr.: Jaqueline Carvalho de Oliveira



Instituição: Universidade Federal de Alfenas UNIFAL-MG

Prof. Dr.: Luiz Cosme Cotta Malaquias



Instituição: Universidade Federal de Alfenas UNIFAL-MG

À minha família, Júnior, Mariana e Lucca, que me apoiaram incondicionalmente e souberam entender os momentos de ausência como esposa e mãe, obrigada pela infinita paciência.

Aos meus pais Mauro e Ivone (*in memoriam*), e à minha mãe de coração Míriam, que me ensinaram desde pequena que o conhecimento é o tesouro que nunca pode ser tirado de uma pessoa, levarei isso para sempre.

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido Pai, responsável pelo maravilhoso dom da vida, Criador do Universo que esteve comigo durante toda esta caminhada, meu DEUS, agradeço-te por estar aqui hoje e porque o meu sonho realizado nasceu primeiro no Teu coração.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias, que me honrou com a sua orientação, sempre alegre e sorrindo, que com competência e dedicação conduziu este projeto e possibilitou que os desafios fossem superados com mais facilidade. Obrigada.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho pela inestimável ajuda na parte experimental deste projeto.

Aos queridos pacientes, sem os quais nada disto seria possível, meu sincero agradecimento pela contribuição à ciência na tentativa de tornar a vida do semelhante melhor.

Ao Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann que admiro não somente pelo conhecimento, mas, principalmente, pela humildade e carinho com que trata seus alunos e dedicação aos pacientes da Clínica de Estomatologia da Unifal. Que Deus te abençoe.

Ao Dr. Evandro Monteiro de Sá Magalhães por quem tenho infinita admiração, e que graciosamente atendeu todos os nossos pacientes com muita competência e amor e principalmente pelas longas conversas dividindo comigo seu inestimável conhecimento. Obrigada.

Aos meus amigos de fé que estiveram comigo nesta jornada orando e me fortalecendo, principalmente aos queridos Naudinéa e Maurício. Seus conselhos foram muito especiais para mim.

À Unifal e ao Mestrado em Ciências Odontológicas, que me receberam de braços abertos, tenho a honra de dizer que fiz parte desta querida instituição.

Às meninas do Laboratório Central da Unifal, principalmente à Sirlene que esteve doando seu tempo e experiência na coleta das amostras.

Agradeço aos funcionários da Clínica de Estomatologia da Unifal Luciana, d. Luzia, Carlos, Elaine e a todos que foram minha família nestes dois anos.

Aos meus colegas de Mestrado que compartilharam sonhos e expectativas e pela oportunidade de convivermos juntos neste período.

Conhecemos pessoas diariamente, mas existem aquelas que levaremos no nosso coração, pois de alguma forma marcaram nossas vidas. Fernanda, Eduardo, Raissa, Alessandra e Naiara são anjos que Deus colocou na minha vida. Tenho a honra de chamá-los de meus amigos.

Aos meus colegas do Laboratório de Vacinas e à Bianca, que fizeram parte da minha história. Obrigada.

A todos os professores e profissionais do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Unifal por compartilhar seus conhecimentos e dedicar tempo para construir uma ciência forte, mas acima de tudo formar profissionais humanizados.

Este trabalho foi feito com muito carinho não somente para cumprir requisitos científicos, mas para contribuir de alguma forma para que os portadores desta patologia possam ter esperança de um futuro melhor. Agradeço a todos que fizeram parte deste importante período da minha vida e que o crescimento do meu conhecimento possa estar atrelado a constante valorização do ser humano como peça fundamental da nossa história.

RESUMO

Modificações epigenéticas tais como metilação do DNA, constituem um mecanismo especial de regulação da expressão gênica envolvido em muitas situações patológicas. Padrões alterados de metilação do DNA são comuns em cânceres e infecções virais. A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma infecção fúngica sistêmica, causada pelo fungo termo-dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. O Brasil é detentor do maior número de casos na América do Sul. A doença apresenta envolvimento pulmonar primário com disseminação para mucosa oral, pele, sistema retículo-endotelial e glândulas suprarrenais. As lesões orais são caracterizadas por hiperplasia eritematosa finamente granular, salpicadas com hemorragias pontuais chamadas de estomatite moriforme. A finalidade deste estudo foi identificar perfis diferenciais de metilação do DNA em pacientes com e sem lesão oral na PCM. A identificação destes perfis foi baseada na estratégia de MS-AP-PCR (Amplificação arbitrária sensível a metilação). O DNA, extraído do sangue total de pacientes com e sem lesão oral, foi digerido com as enzimas de restrição Hpa II e Msp I. Os produtos da digestão foram amplificados pela técnica de PCR, utilizando iniciadores arbitrários. Foi obtido um perfil diferencial de metilação após a amplificação do DNA de pacientes sem lesão de boca, comparado ao perfil de pacientes com lesão de boca. A banda diferencialmente expressa foi purificada, clonada e os plasmídeos obtidos P5, P6 e P7 foram analisados pelo software PhredPhrap e na ferramenta BLASTN para a obtenção de dados de mapeamento e identidade com as sequências presentes no genoma humano. O fragmento clonado no plasmídeo P5 apresentou similaridade com uma sequência de DNA presente no cromossomo 20, próxima ao gene YTHDF1. Os fragmentos clonados nos plasmídeos P6 e P7 apresentaram similaridade com sequências de DNA presentes no cromossomo 15, sendo que o fragmento P6 apresentou similaridade com uma sequência intrônica do gene RNA binding protein with multiple splicing 2” (RBPMS2) e o fragmento P7 com uma sequência intrônica do gene “diphthamine biosynthesis 6” (DPH6)”. A expressão do gene YTHDF1 em leucócitos foi testada por PCR em tempo real e não houve diferença significativa nos dois grupos de pacientes. Ainda não há descrição na literatura da correlação do gene YTHDF1 com a PCM tornando este estudo inédito e mostrando a importância da análise epigenética para conhecimento dos mecanismos celulares nas condições normais e também patológicas.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose. Metilação de DNA. Reação em Cadeia da Polimerase.

ABSTRACT

Epigenetic changes such as DNA methylation is a specific mechanism for the regulation of gene expression involved in many pathological situations. Altered patterns of DNA methylation are common in cancers and viral infections. Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic fungal infection caused by a thermomorphogenic fungus, *Paracoccidioides brasiliensis*. Brazil is having the largest number of cases in South America. The disease presents primary pulmonary involvement that spreads to oral mucus, skin, reticuloendothelial system, and adrenals. Oral lesions are characterized by erythematous fine granular hyperplasia, and speckled with occasional bleeding called moriform stomatitis. The purpose of this study was to identify profiles of different DNA methylation in patients with and without oral lesions in PCM. The identification of these profiles was based on the strategy of MS-AP-PCR (Methylation-Sensitive arbitrarily Primed PCR). The DNA extracted from whole blood of patients with and without oral lesions was digested with restriction enzymes: Hpa II and Msp I. The digestion products were amplified by PCR (polymerase chain reaction) using arbitrary primers. We obtained a differing profile after amplifying the DNA from patients without mouth lesions compared to the profile of patients with mouth lesions from agarose gel electrophoresis. The differently expressed band was purified and cloned, and the obtained plasmids, P5, P6 and P7, were analyzed by the softwares PhredPhrap and BLASTN tool to obtain mapping data and identify the sequences present in the human genome. The cloned fragment in the plasmid P5 showed similarity with a DNA sequence present in chromosome 20, next to the gene YTHDF1. The fragments cloned in plasmids P6 and P7 showed similarity with the DNA sequences present on chromosome 15, the P6 fragment showed similarity with an intronic sequence from the gene, "RNA binding protein with multiple splicing 2" (RBPMS2), and the P7 fragment showed similarity with the intronic sequence of the gene "diphthamine biosynthesis 6" (DPH6) ".biosynthesis 6" (DPH6)". The YTHDF1 gene expression in leukocytes was tested by real-time PCR and no significant difference were found in both groups of patients. There is no description in the literature relating the YTHDF1 gene with PCM which has shown the importance of study epigenetic for understanding the cellular mechanisms under normal and pathological conditions.

Key words: Paracoccidioidomycosis. Methylation of DNA. Polymerase chain reaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Forma miceliana do fungo <i>P. brasiliensis</i> encontrada na natureza a 25°C.....	19
Figura 2 -	Forma de leveduras observadas ao MO (microscópio óptico).....	20
Figura 3 -	Aspecto radiográfico característico da PCM.....	23
Figura 4 -	Manifestações orais da PCM.....	25
Figura 5 -	PCM forma crônica disseminada.....	25
Figura 6 -	Corte histológico de lesão em pele na PCM.....	27
Figura 7 -	Aspecto das lesões de pele após tratamento.....	30
Figura 8 -	Adição do grupo metil (CH ₃) a molécula de citosina.....	32
Figura 9 -	Representação esquemática das alterações epigenéticas	34
Figura 10 -	Perfil diferencial de metilação do DNA pela técnica de MS-AP-PCR	46
Figura 11 -	PCR para seleção de clones recombinantes.....	47
Figura 12 -	Gel de eletroforese com os clones de interesse referentes as posições P5, P6 e P7 retirados e purificados do PCR de colônia.....	48
Figura 13 -	A - Localização genômica dos fragmento sequenciado referente ao clone P5.....	52
Figura 13 -	B - Localização genômica dos fragmento sequenciado referente ao clone P6.....	53
Figura 13 -	C - Localização genômica dos fragmento sequenciado referente ao clone P7.....	54
Figura 14 -	A - Conteúdo de CG do fragmento correspondente ao gene YTHDF1 (A) e ao clone P5, de acordo com ferramenta CpG Plot....	55
Figura 14 -	B - Conteúdo de CG do fragmento correspondente ao gene RBPMS2 (B) e ao clone P6, de acordo com ferramenta CpG Plot...	56
Figura 14 -	C - Conteúdo de CG do fragmento correspondente ao gene DPH6 (C) e ao clone P7, de acordo com ferramenta CpG Plot.....	57
Figura 15 -	Valores individuais e média da expressão relativa do gene YTHDF1/GAPDH	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Caracterização da amostra de pacientes com paracoccidioidomicose com e sem lesão de boca quanto ao gênero, profissão, tabagismo e etilismo	39
Tabela 2 -	Caracterização dos pacientes com paracoccidioidomicose quanto à condição com relação ao tratamento na coleta da primeira amostra de sangue	40
Tabela 3 -	Fragmentos obtidos por MS-AP-PCR e identificação dos mesmos por homologia	50

LISTA DE SIGLAS

BLAST	- Basic Local Alignment Search Tool
CIE	- Contraímunoelctroforese
CpG PLOT	- Software utilizado em bioinformática para identificar e traçar ilhas CpG na sequência de nucleotídeos.
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DNMT	- Enzima DNA metiltransferase
DPH6	- Diphthamine biosynthesis 6
E.coli top10	- Bactéria <i>Escherichia coli</i> top10
ELISA	- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EBP	- Estradiol binding protein
GAPDH	- Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
EV	- Endovenosa
HE	- Hematoxilina-eosina
Hpa II	- <i>Haemophilus parainfluenzae</i>
IDD	- Imunodifusão dupla
LB	- <i>Luria Bertani</i>
MMLV-RT	- Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
MS-AP-PCR	- Methylation-Sensitive Arbitrarily Primed Polimerase Chain Reaction
Msp I	- <i>Moraxella sp</i>
<i>P. brasiliensis</i>	- <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PCM	- Paracoccidioidomicose
PCR	- Polimerase Chain Reaction
PS2	- <i>Phylogenetic species 2</i>
PS3	- <i>Phylogenetic species 3</i>
qPCR	- PCR em tempo real
RBPMs2	- RNA binding protein with multiple splicing 2
RNA	- Ácido ribonucleico
S1 (Pb18)	- <i>Species 1</i>
Taq	- Bactéria <i>Thermus aquaticus</i>

- TCLE** - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- TE** - Tris EDTA
- UV** - Ultravioleta
- VO** - Via oral
- YTHDF1** - YTH Domain Family, Member 1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	HISTÓRICO	17
2.2	MORFOLOGIA DO <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	18
2.3	ECOLOGIA	20
2.4	EPIDEMIOLOGIA.....	21
2.5	PATOLOGIA	22
2.6	DIAGNÓSTICO	26
2.6.1	Diagnóstico laboratorial	26
2.7	TRATAMENTO	28
2.8	EPIGENÉTICA E METILAÇÃO DO DNA.....	30
3	OBJETIVOS	37
3.1	OBJETIVO GERAL	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1	PACIENTES.....	38
4.2	OBTENÇÃO DO DNA GENÔMICO.....	40
4.3	ANÁLISE DO PERFIL DIFERENCIAL DE METILAÇÃO PELA TÉCNICA DE MS-AP-PCR	41
4.4	RECUPERAÇÃO DE BANDAS DIFERENCIALMENTE METILADAS A PARTIR DE GÉIS DE ÁGAROSE.....	42
4.5	CLONAGEM.....	42
4.6	EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL EM PEQUENA ESCALA (Miniprep).....	43
4.7	SEQUENCIAMENTO DO DNA E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS ...	43
4.8	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE YTHDF1 POR PCR EM TEMPO REAL	44
5	RESULTADOS	46
5.1	ANÁLISE DO PERFIL DIFERENCIAL DE METILAÇÃO PELA TÉCNICA DE AMPLIFICAÇÃO ARBITRÁRIA SENSÍVEL A METILAÇÃO	46
5.2	RECUPERAÇÃO DE BANDAS DIFERENCIALMENTE METILADAS A PARTIR DE GÉIS DE ÁGAROSE.....	47
5.3	EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL EM PEQUENA ESCALA (MINIPREP) ...	48
5.4	SEQUENCIAMENTO DO DNA E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS ...	49
5.5	EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE YTHDF1	58
6	DISCUSSÃO	59

7	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS	65
	APÊNDICE	70
	ANEXO	72

1 INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica humana cujo agente etiológico é o *Paracoccidioides brasiliensis*, fungo termodimórfico, com uma distribuição geográfica restrita à América Latina (FORTES et al., 2011; NUCCI, COLOMBO, QUEIROZ-TELLES, 2009).

A PCM é uma das micoses sistêmicas mais importantes, sendo o Brasil, detentor do maior número de casos na América do Sul. A doença apresenta envolvimento pulmonar primário podendo ocorrer disseminação para mucosa oral, pele, sistema retículo-endotelial e glândulas suprarrenais. Os sinais e sintomas da doença podem ser muito diversos, provocando dificuldade de estabelecimento de um diagnóstico rápido. Em cerca de 30 a 50% dos pacientes ocorrem manifestações orais, o que caracteriza a PCM como doença de extrema importância na Odontologia. Diante da diversidade de manifestações clínicas, e do desconhecimento dos fatores que determinam a presença ou ausência de lesões orais e utilizando os inúmeros progressos que advém da caracterização e do conhecimento dos genes e sua funcionalidade no genoma humano, este trabalho propõe correlacionar a importância do estudo de fatores genéticos envolvidos na patogênese da PCM. Abordando especificamente, um evento epigenético, chamado metilação do DNA.

O estudo de mecanismos epigenéticos são importante para compreensão tanto dos processos fisiológicos quanto dos patológicos, e este estudo visa investigar se existem alterações no padrão de metilação que podem estar relacionadas com a PCM em dois grupos de pacientes que se apresentavam com e sem lesões orais.

A epigenética engloba alterações nos padrões de expressão gênica que são mediadas por mecanismos que não afetam a sequência primária do DNA (BAYLIN; OHM, 2006). As principais modificações epigenéticas são metilação do DNA e acetilação de histonas, que constituem um mecanismo especial de regulação da expressão gênica envolvido em muitas situações patológicas (FACKLER et al., 2004; USHIJIMA, 2005; RANDO, 2006). Padrões alterados de metilação do DNA e acetilação de histonas são comuns em muitas doenças humanas. A metilação do

DNA é a modificação epigenética melhor caracterizada até o momento exercendo grande importância no silenciamento e regulação gênica. Em eucariotos, ela é encontrada predominantemente no carbono da posição 5 da citosina seguida da guanina no dinucleotídeo CpG. Esta modificação é biologicamente relevante quando ocorre em regiões ricas em dinucleotídeos CpG conhecidas como ilhas CpG (HERMAN et al., 1996). Estima-se que o número total de ilhas CpG no genoma humano seja maior do que 37 mil, sendo que 35% destas são mapeadas em regiões promotoras (HAN; ZHAO, 2009). A metilação do DNA nas ilhas CpG, presentes nas regiões promotoras, resulta em silenciamento gênico devido à inibição estérica da ligação dos complexos de transcrição às suas regiões regulatórias (BERNSTEIN; MEISSNER; LANDER, 2007) ou pelo recrutamento de proteínas que se ligam às sequências CpG metiladas iniciando modificações epigenéticas coordenadas na cromatina (ESTELLER, 2007).

Em genes transcricionalmente ativos, essas ilhas são normalmente não metiladas. Entretanto, elementos repetitivos (DNA satélite e transposons) e a região promotora de alguns genes caracterizados por ausência de expressão são geralmente metiladas na maioria dos tecidos (ESPADA; ESTELLER, 2010). Como a metilação do DNA é uma marca epigenética herdável, a manutenção e a transmissão precisa desses padrões às células filhas é um processo essencial do ciclo celular. Portanto, a identificação dos perfis anormais de metilação não só em ilhas CpG, mas também em regiões adjacentes, está se tornando uma ferramenta importante para a compreensão tanto da expressão gênica normal como em diferentes doenças. O conhecimento dos eventos moleculares que iniciam e mantêm o silenciamento epigenético pode levar ao desenvolvimento de novas abordagens relacionadas à identificação de marcadores diagnósticos e prognósticos para as doenças humanas (BAYLIN; OHM, 2006; POLO; ALMOUZNI, 2005).

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesse capítulo serão descritos alguns estudos que demonstram as características do fungo, tipos de doença e diagnósticos, entre outras informações de importância na PCM.

2.1 HISTÓRICO

A PCM é uma infecção fúngica bem conhecida pelos pesquisadores brasileiros. Os estudos desta moléstia são constantes e crescentes, devido ao grande número de casos e gravidade. A PCM foi descrita pela primeira vez no Brasil pelo médico Adolpho Lutz (1855-1940), em 1908. Com o título “Uma mycose pseudococcidica localizada na bocca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas”. Nesse artigo ele relata aspectos clínicos, histopatológicos e micológicos de dois casos de pacientes apresentando lesões orais (MARQUES, 2008). O Dr. Lutz descreveu a doença como patologia grave e apresentando ulcerações extensas, com destruição da mucosa e véu palatino entre outras manifestações. Em 1910, o médico parasitologista italiano, Alfonso Splendore (1871-1953) descreveu minuciosamente a morfologia do fungo e até então, acreditava-se que a localização primitiva das lesões era a mucosa oral; sintomas como dificuldade de alimentação, aumento da secreção salivar e cansaço progressivo eram relatados na maioria dos casos (LACAZ, 2002).

Splendore também analisou quatro casos de PCM, descrevendo com perfeição as características clínicas das lesões orais. Nesse período inicial não existiam drogas eficazes para tratamento e a doença era quase sempre fatal. A partir de 1930, ocorrem avanços nos estudos nas áreas de imunologia e bioquímica e surgem drogas para tratamento da infecção. Ainda em 1930, criou-se o gênero *Paracoccidioides* e foi confirmada a espécie *brasiliensis*, nomeada por Splendore (LACAZ, 2002).

Após a observação de outros casos na América do Sul, a doença passou a se chamar blastomicose sul-americana; outras denominações utilizadas foram

doença de Lutz e doença de Lutz-Splendore-Almeida. Apenas em 1971 adotou-se o nome paracoccidioidomicose, durante a reunião de micologistas do continente americano em Medellín, Colômbia (LACAZ, 2002).

2.2 MORFOLOGIA DO *Paracoccidioides brasiliensis*

Os fungos são organismos de vida livre e saprobiótica, e agentes comuns em todo ecossistema. Desempenham papel fundamental na natureza, sendo um dos constituintes das cadeias e teias alimentares, pela decomposição da matéria orgânica. Estes microrganismos possuem importante papel na saúde dos animais, porque causam desde micoses classificadas como cutâneas até sistêmicas. Apesar de existirem aproximadamente 100.000 espécies fúngicas, apenas um pequeno grupo causa micose sistêmica humana. Os fungos dimórficos são responsáveis pela maior parte das infecções fúngicas sistêmicas de humanos e outros mamíferos (SANTOS et al., 2011).

Na temperatura menor que 28°C, o fungo apresenta forma micelial e microscopicamente são encontrados filamentos finos, septados, com esporos terminais ou intercalares (FIGURA 1).

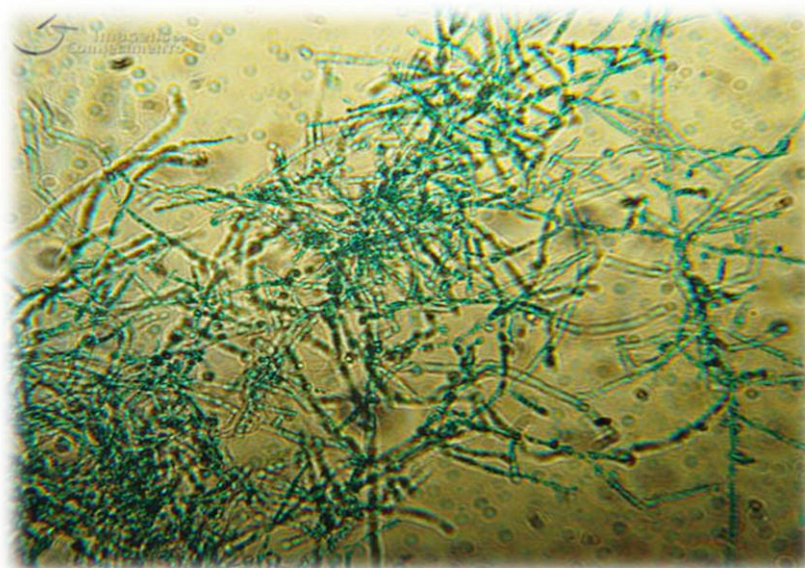


Figura 1 - Forma miceliana do fungo *P. brasiliensis* encontrada natureza a 25°C.

Fonte: [https://www2.ufmg.br/imagensdoconhecimento/ImagensAreas/Ciencias-Biologicas/Enzima-Patricia-Campi/\(image\)838](https://www2.ufmg.br/imagensdoconhecimento/ImagensAreas/Ciencias-Biologicas/Enzima-Patricia-Campi/(image)838)

Na forma parasitária encontrada a 37°C nos tecidos infectados, quando observado ao microscópico, o fungo apresenta um padrão de células leveduriformes relativamente grandes (podendo atingir 5 a 25 μm no seu maior diâmetro), com parede espessa, birrefringente. A reprodução é assexuada, caracterizada por múltiplos brotamentos originados por evaginações das células-mães (FIGURA 2). Este processo termodimórfico é reversível e está relacionado a capacidade de adaptação às mudanças das condições ambientais, sendo que a conversão da fase micelial para levedura permite sobrevivência do fungo e sua invasão aos tecidos do hospedeiro (RESTREPO et al., 2011; SAN-BLAS; BURGER, 2011). O estímulo básico é a temperatura, mas fatores nutricionais e do hospedeiro também podem interferir nesse processo.



Figura 2 - Forma de leveduras observadas ao MO (microscópio óptico).

Fonte: <http://acd.ufrj/LabImgBio/Micologia/mico018>

2.3 ECOLOGIA

O nicho ecológico do fungo não está completamente esclarecido. Sugere-se que ele viva saprobicamente na natureza, pois já foi isolado do solo, água e plantas (CONTI-DIAZ, 2007; RESTREPO; MCEWEN; CASTANEDA, 2001). Ambientes próximos a rios ou solos argilosos com grande umidade promovem condições nutricionais de temperatura e pouca competição, ideais à sobrevivência do micélio no meio ambiente.

Poucos isolados do fungo no solo sugerem que este não seja o habitat permanente do patógeno, e supõe que o mesmo resida por tempo variável nestes locais (CONTI-DIAZ, 2007). Alguns tipos de solo são mais adequados para a produção de conídios. Esse fato interfere na resistência do fungo e sua capacidade infectiva (THEODORO et al., 2005).

Por outro lado, as descobertas de hospedeiros silvestres naturais como o tatu de nove bandeiras (*Dasypus novemcinctus*) e o cão (*Canis familiaris*) podem ampliar ainda mais o círculo de sobrevivência do parasita (SILVA-VERGARA et al., 2000).

2.4 EPIDEMIOLOGIA

Taxonomicamente o *Paracoccidioides brasiliensis* é classificado no Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Pleomycetes, Ordem Onigenales, Família Onygenacea, Gênero *Paracoccidioides* e Espécie *brasiliensis* (SAN-BLAS; NINO-VEGA; ITURRIAGA, 2002).

De acordo com recentes dados moleculares, também pertencem a família Onygenacea os seguintes agentes de micoses sistêmicas: *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Coccidioides posadasii* e *Histoplasma capsulatum*. Esse grupo de fungos está associado com desenvolvimento de doenças relacionadas com hospedeiros mamíferos (NUCCI; COLOMBO; QUEIROZ-TELLES, 2009).

Existem três tipos de subespécies de *P. brasiliensis*: PS1 (PB 18), que ocorre no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela; PS2 no Brasil e Venezuela (espécie com menor virulência) e PS3 na Colômbia (NUCCI; COLOMBO; QUEIROZ-TELLES, 2009; SAN-BLAS; NINO-VEGA; ITURRIAGA, 2002).

A PCM é doença de notificação compulsória em alguns estados brasileiros como Minas Gerais, conforme a Resolução SES de Minas Gerais Nº 3244, de 25 de abril de 2012 (MINAS GERAIS, 2012), mas ainda é difícil estabelecer sua real prevalência devido a falta de dados epidemiológicos. Estima-se que mais de 10 milhões de pessoas possam estar infectadas, mas sem apresentar sinais clínicos da doença (NUCCI; COLOMBO; QUEIROZ-TELLES, 2009).

A PCM tem ampla distribuição e já foi descrita em 14 países. do México (20⁰N) até Argentina (35⁰S), incluindo Panamá e Bolívia. Chile e ilhas do Caribe não foram atingidos. A maioria dos casos ocorre no Brasil, seguido da Colômbia, Venezuela e Argentina. A PCM pode ser considerada também doença do viajante para pessoas que viveram ou estiveram em regiões endêmicas (NUCCI; COLOMBO; QUEIROZ-TELLES, 2009).

A doença é autóctone da América do Sul, sendo encontrados no Brasil cerca de 80% dos casos. A distribuição da doença no Brasil ocorre de forma irregular e relaciona-se com condições de agricultura e clima (BRASIL, 2009). Exceto Chile, Guianas, Suriname e ilhas do Caribe, a doença vem desde o México até a Argentina (SILVA et al., 2004). A PCM apresenta cerca de 200 mortes por ano, com uma taxa de mortalidade de 1,45 casos por milhão/habitantes. A PCM é a oitava causa de

mortalidade por doenças infecciosas no Brasil, constituindo um importante problema de saúde pública devido ao alto potencial incapacitante e quantidade de mortes prematuras que provoca. (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

2.5 PATOLOGIA

A PCM é uma micose sistêmica humana, cujo agente etiológico é o *Paracoccidioides brasiliensis*. A infecção ocorre pela inalação dos propágulos do micélio (forma encontrada na temperatura menor que 28°C na natureza) que irão se instalar nos alvéolos pulmonares e se transformar na forma patológica leveduriforme, que ocorre nos tecidos do hospedeiro na temperatura de 37°C (SCHAECHTER et al., 2002).

A PCM infecção ocorre geralmente nas primeiras duas décadas de vida (FORTES et al., 2011) e pode se resolver espontaneamente, ou o fungo pode se manter latente por muitos anos e sofrer reativação, provavelmente por deficiências no sistema imune. Estudos apontam tabagismo, alcoolismo e carências nutricionais como possíveis contribuintes para estabelecimento da PCM doença (RODRIGUEZ; CASTRO, 1987).

A PCM doença ocorre predominantemente em trabalhadores de zona rural e estudos relacionam atividades agrícolas, como plantação de café, ao acometimento da patologia. Porém, como o nicho ecológico do fungo não é totalmente conhecido, dificulta o real estabelecimento das condições de contaminação.

A PCM doença acomete principalmente indivíduos do sexo masculino, dos 30 aos 50 anos em fase produtiva, sendo adquirida principalmente por via inalatória (FORTES et al., 2011). O primeiro sítio de infecção é o pulmonar, podendo se apresentar como doença pulmonar crônica, com tosse, dispnéia, febre, perda de peso e hemoptise (SCULLY; MONTEIL; SPOSTO, 1998). O exame radiológico do tórax pode evidenciar infiltrado interstício-alveolar preferencialmente em lobos inferiores e áreas centrais (FIGURA 3). O fungo pode ser eliminado por células do hospedeiro imunologicamente competente ou pode ocorrer disseminação linfática ou hematogênica para outros órgãos, como: pele, mucosas, baço entre outros (RESTREPO et al., 2011; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).



Figura 3 - Aspecto radiográfico característico da PCM.

Nota: Padrão de comprometimento na área central do pulmão chamado de “asa de borboleta”.

Fonte: http://www.agevisa.ro.gov.br/?page_id=1549

Fatores relacionados ao *P. brasiliensis* como virulência, patogenicidade e composição antigênica e ao hospedeiro como suscetibilidade genética, faixa etária, sexo, tabagismo, etilismo, desnutrição e deficiência do sistema imunológico, estão associados a manifestações clínicas da doença (LONDERO, 1982; MAMONIE; BLOTTA, 2005).

Um dos aspectos importantes da relação parasita e hospedeiro é o efeito dos hormônios no dimorfismo do fungo. Estudos mostraram que o 17-beta-estradiol é capaz de inibir a transição de micélio para levedura (CAMARGO; FRANCO, 2000; NUCCI; COLOMBO; QUEIROZ-TELLES, 2009).

Análises transcricionais descreveram um gene preferencialmente expresso na fase leveduriforme do *P. brasiliensis* que codifica uma proteína de ligação ao estradiol (RESTREPO et al., 1984). A proteína de ligação ao estradiol (EBP) possui interação seletiva ao estradiol no citoplasma e acredita-se que isto iniba a transição micélio-levedura e talvez explique a baixa incidência da PCM em mulheres (FELIPE et al., 2005).

Esta patologia é de grande importância na Odontologia, pois em muitos casos ocorrem manifestações orais, e o dentista comumente é o profissional que irá ter o primeiro contato com a doença. A mucosa oral fornece um ambiente rico em proteínas e com pouca variação climática, facilitando o crescimento do fungo (BISINELLI et al., 2001). As lesões orais clássicas são caracterizadas por hiperplasia eritematosa finamente granular salpicadas com hemorragias pontuais chamadas de

estomatite moriforme, conforme figura 4. Essa lesão, também denominada pápulo-erosiva, é uma estomatite exulcerada, de lenta evolução, podendo apresentar ulceração mais profunda; predominando na região labial da mucosa jugal, gengivas, palato e língua (neste local podem assemelhar-se a carcinomas), podendo ocorrer sangramento, mobilidade dos dentes e sintomatologia dolorosa (BISINELLI et al., 2001).

A PCM pode ocorrer de duas formas clínicas:

- a) Aguda ou subaguda (juvenil);
- b) Crônica (adulto).

A forma aguda ou subaguda da PCM afeta crianças de ambos os sexos, jovens e adultos com menos de 30 anos, representa menos de 10% dos casos e envolve principalmente o sistema retículo-endotelial. As manifestações clínicas mais comuns são febre, perda de peso, linfadenomegalia e em alguns casos hepatoesplenomegalia e disfunção da medula óssea. A progressão da doença é rápida e em poucos meses sem tratamento o paciente pode ter sérias dificuldades de recuperação (NUCCI; COLOMBO; QUEIROZ-TELLES, 2009).

A forma crônica afeta principalmente adultos do sexo masculino, com envolvimento pulmonar frequente; geralmente ocorre progressão lenta dos sinais e sintomas da doença, e não é incomum que estes pacientes só procurem ajuda após alguns meses do início da doença (NUCCI; COLOMBO; QUEIROZ-TELLES, 2009; SILVA et al., 2004). Porém quando ocorre a disseminação para a mucosa oral, esta leva o paciente a procurar imediatamente o consultório odontológico devido a sintomatologia extremamente dolorosa das lesões (FIGURA 4).

A doença pode ocorrer em um único órgão (unifocal) ou em vários órgãos (multifocal) (FIGURA 5).

A disseminação pode ocorrer por via linfática ou hematogênica para todos os órgãos, mas geralmente ocorre envolvimento pulmonar e de mucosa oral e orofaringe, pele, linfonodos e adrenal. Menos frequente são os acometimentos do sistema nervoso central, ossos, olhos e sistema cardiovascular. A doença é incapacitante e pode deixar sequelas como insuficiência respiratória crônica e doença de Addison (NUCCI; COLOMBO; QUEIROZ-TELLES, 2009).

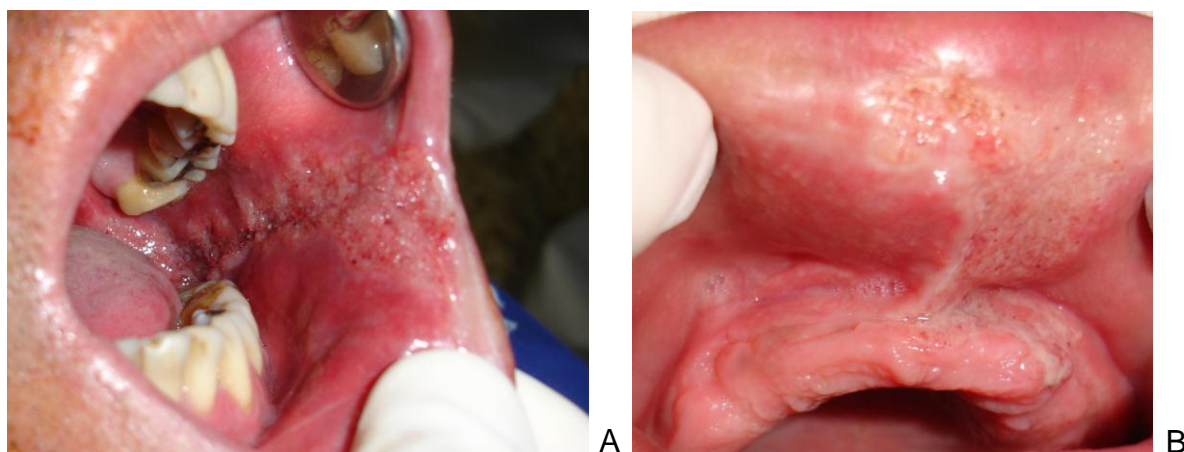


Figura 4 - Manifestações orais da PCM.

Nota: A) Paciente apresentando lesões na mucosa jugal.

B) Lesões na mucosa labial, fundo de vestibulo e rebordo alveolar.

Fonte: Clínica de Estomatologia da Unifal.



Figura 5 - PCM forma crônica disseminada.

Fonte: GARCIA, et al. (2014, p.168)

2.6 DIAGNÓSTICO

Este capítulo apresenta as formas de diagnóstico da PCM.

2.6.1 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico definitivo da PCM é baseado na visualização e reconhecimento microscópico de elementos fúngicos sugestivos de *P.brasiliensis*, a partir de biópsia ou exame histopatológico de amostras oriundas de tecidos suspeitos, raspado de lesões, secreções ou fluidos (CAMARGO; FRANCO, 2000; MENDES-GIANNINI; DEL NEGRO; GONÇALVES, 2010). As amostras mais comuns são provenientes do trato respiratório, gânglios e lesões mucocutâneas (NUCCI; COLOMBO; QUEIROZ-TELLES, 2009).

O isolamento do fungo pode ser obtido através de cultura utilizando meios seletivos ou não seletivos, que requerem tempo de crescimento prolongado usualmente acima de 30 dias. Além disso, este método pode ser limitado pelo crescimento de bactérias contaminantes potencialmente presentes em fluidos orgânicos (NUCCI; COLOMBO; QUEIROZ-TELLES, 2009; RESTREPO et al., 2011). Em relação aos testes diagnósticos, o padrão ouro encontra-se na observação direta do fungo em cortes histológicos oriundos de biópsia, o que confere ao dentista importante papel no diagnóstico precoce da PCM, pela facilidade de acesso às lesões orais. Na figura 6 pode ser observada formação granulomatosa com células gigantes multinucleadas e infiltrados polimorfonucleares, em espécime oriunda de biópsia tecidual.

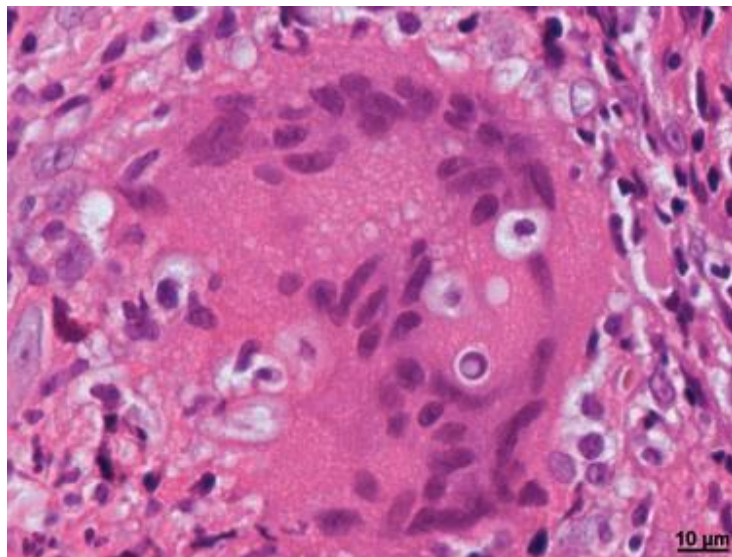


Figura 6 - Corte histológico de lesão em pele na PCM.

Nota: Reação granulomatosa em lesão de pele com várias células gigantes contendo numerosos fungos leveduriforme. HE, x 1000).

Fonte: GARCIA et al. (2014, p.169).

Diversos testes sorológicos estão disponíveis, incluindo imunodifusão dupla (IDD), contraimunoeletroforese (CIE), ensaio imunoenzimático (ELISA), *DotBlot*, *Western Blot*, entre outros. Esses testes mostram diferentes taxas de sensibilidade e especificidade e possível reatividade cruzada com outros fungos, especialmente o *Histoplasma capsulatum* (CAMARGO, 2008; NUCCI; COLOMBO; QUEIROZ-TELLES, 2009). Os testes sorológicos como a IDD apresentam grande valor na detecção da doença e acompanhamento do tratamento. A IDD qualitativa e quantitativa é a prova sorológica mais frequentemente utilizada para o diagnóstico inicial de pacientes suspeitos de PCM. Trata-se de teste de elevada especificidade e sensibilidade (65 a 100%) dependendo do tipo de antígeno utilizado. Quando se utiliza a gp43 como antígeno os resultados mostram que o teste de IDD atinge sensibilidade e especificidade de 84,3% e 98,9% respectivamente (CAMARGO, 2008).

O desenvolvimento de métodos moleculares tem sido implementados na última década. Através da técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR) ou suas variantes, o *P. brasiliensis* pode ser detectado para fins de diagnóstico com elevada sensibilidade e especificidade (RESTREPO et al., 2011). Embora bastante promissora, essa metodologia necessita de mais estudos para ser incluída na rotina laboratorial (MENDES-GIANNINI; DEL NEGRO; GONÇALVES, 2010) e, devido ao

alto custo, estes métodos são realizados mais comumente em centros de referência. Em virtude disso, o diagnóstico da PCM ainda é baseado na visualização dos elementos fúngicos por métodos clássicos que incluem observação direta microscópica, cultura, exame histopatológico de tecidos e sorologia (NUCCI; COLOMBO; QUEIROZ-TELLES, 2009).

2.7 TRATAMENTO

A PCM é uma doença de progressão lenta e de diagnóstico muitas vezes tardio. Quando não tratada pode causar graves sequelas e óbitos. Constitui um importante problema de saúde pública, dificultado pela falta de dados epidemiológicos e de campanhas de prevenção. Apresenta semelhança com outras infecções granulomatosas, como a tuberculose, o que pode levar a diagnóstico e tratamento tardios (MARQUES et al., 2007; RESTREPO; GÓMEZ; TOBÓN, 2012).

Não há consenso sobre a duração ideal do tratamento com antifúngico nos casos de PCM, mas várias publicações preconizam que a detecção de anticorpos circulantes específicas é um parâmetro importante para definir a hora de parar tratamento (SILVA et al., 2004).

O tratamento proposto pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2010) é o seguinte:

- a) ITRACONAZOL: 200 mg/dia, logo após uma das principais refeições, em única tomada, por 6 a 9 meses, nas formas leves, e 12 a 18 meses, nas formas moderadas. É considerada a droga de escolha;
- b) SULFAMETOXAZOL + TRIMETOPRIM: 800/160mg/dia, Via Oral (VO), 12/12 horas, na ausência de imunodepressão, 12 meses nas formas leves, e 18 a 24 meses, nas formas moderadas;
- c) Para crianças é recomendado o seguinte tratamento: Trimetoprim, 8 a 10mg/kg e Sulfametoxazol, 40 a 50 mg/kg, VO, de 12/12 horas, seguindo o mesmo tempo de uso dos adultos;
- d) ANFOTERICINA B – 1 mg/kg/dia, endovenoso, diluído em 50 ml de soro glicosado a 5%, não ultrapassando a dose máxima diária de

50 mg, ou solução EV de Sulfametoazol/Trimetoprim, na dose de 2 ampolas de 8/8 horas até a melhora clínica do paciente, quando então passa a receber medicação VO.

A Anfotericina B é nefrotóxica e apresenta inúmeros efeitos colaterais, necessitando de longo período de hospitalização para sua administração. O seu mecanismo de ação é mediante ligação ao ergosterol da membrana plasmática da célula fúngica, alterando sua permeabilidade (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

Os derivados azólicos (cetoconazol, fluconazol e itraconazol) atuam por inibição da síntese do ergosterol da membrana plasmática da célula fúngica. São menos tóxicos, porém apresentam custo mais elevado (SHIKANAI-YASUDA et al. 2006).

O tratamento da PCM geralmente é longo, pode ter recidivas e necessita da colaboração do paciente e de resposta imune eficiente. Os pacientes precisam de acompanhamento por longos períodos mesmo na ausência de sintomas e término da medicação. Os casos mais graves devem ser tratados em ambiente hospitalar e o paciente poderá conviver com as sequelas muitas vezes graves e incapacitantes (FIGURA 7). Os critérios de cura geralmente considerados são: o desaparecimento de sinais clínicos e radiográficos da doença e a negatização dos títulos de anticorpos (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

São fatores limitantes no estabelecimento do tratamento: a desnutrição presente na maioria dos casos; o alcoolismo e tabagismo; o baixo nível econômico e social; o acesso e custo das drogas efetivas e o tratamento prolongado (CAMPOS, 2006).

A cidade de Alfenas-MG desde 27 de novembro de 2013 aprovou o Projeto de Lei nº 4.475 resultante da dissertação do pneumologista, Dr. Evandro Monteiro de Sá Magalhães, que garante a população acesso gratuito ao tratamento e medicação preconizada pelo Ministério da Saúde, tornando o município pioneiro nesta abordagem (ALFENAS, 2013).



Figura 7 - Aspecto das lesões de pele após tratamento.

Nota: Paciente tratado em ambiente hospitalar utilizando Anfotericina B e Itraconazol. Notar as sequelas da doença (cicatrizes).

Fonte: GARCIA et al. (2014, p.170).

2.8 EPIGENÉTICA E METILAÇÃO DO DNA

Os constantes desenvolvimentos no campo da biologia molecular têm fornecido ferramentas importantes no conhecimento das diversas patologias e elucidando mecanismos celulares até então desconhecidos. Um importante campo da biologia que trata especialmente das modificações que ocorrem no DNA e nas proteínas a ele associadas é a chamada epigenética.

A epigenética é definida como estudo das alterações transmitidas durante a replicação gênica, sem contudo modificar a sequência primária de bases do DNA, que é o ponto inicial para compreensão do programa genético. Alterações que ocorrem associadas à cadeia primária são descritas como modificações epigenéticas, e são essenciais para a harmonia das funções celulares (BERNSTEIN; MEISSNER; LANDER, 2007; OLIVEIRA et al., 2010).

Diante disso, a ciência procura hoje, uma visão mais abrangente destas mudanças epigenéticas que determinam como a informação genética atua nos mais

variados estágios de maturação celular, em diferentes tipos de células, dentro do padrão da normalidade e também nas diferentes patologias (BERNSTEIN; MEISSNER; LANDER, 2007).

Como exemplo de mecanismos epigenéticos, temos a metilação do DNA e as modificações das histonas, que podem influenciar reações químicas associadas ao DNA ou promover alterações na conformação espacial da cromatina levando a importantes mudanças, complexas e interativas, que podem influenciar a expressão gênica e são referidas como um verdadeiro “código epigenético” (ECKHARDT et al., 2006).

As mudanças epigenéticas são baseadas num conjunto de processos moleculares que podem ativar, reduzir ou desabilitar completamente a atividade dos genes através da metilação de citosinas no DNA, remodelação da estrutura da cromatina (em particular a acetilação ou metilação das histonas) e regulação de expressão gênicas mediados por pequenas ou micro moléculas de RNA (RNA de interferência e RNA não-codificantes). Estas diferentes classes de processos não são independentes, mas, normalmente regulam a atividade gênica em um complexo agindo conjuntamente (BERGER, 2007).

O mecanismo epigenético mais bem estudado até o momento é a metilação do DNA (ESTELLER, 2007; JAENISCH; BIRD, 2003). Este processo pode ser molecularmente descrito como a adição do grupamento metil no carbono 5' de citosinas adjacentes a guaninas, nos chamados dinucleotídeos CpG (FIGURA 8) (BIRD et al., 2002).

Estas regiões ricas em dinucleotídeos CG, conhecidas como ilhas CpG, na maioria dos genes são regiões não metiladas, embora em alguns casos parece ocorrer metilação tecido específica durante o desenvolvimento (BIRD, 2002; ESTELLER, 2007). O principal interesse em encontrar ilhas CpG é que estas podem servir como marcadores de genes. A metilação associada a ilhas CpG em regiões promotoras desempenha um papel importante na regulação gênica e carcinogênese (HAN; ZHAO, 2009; HERMAN et al., 1996).

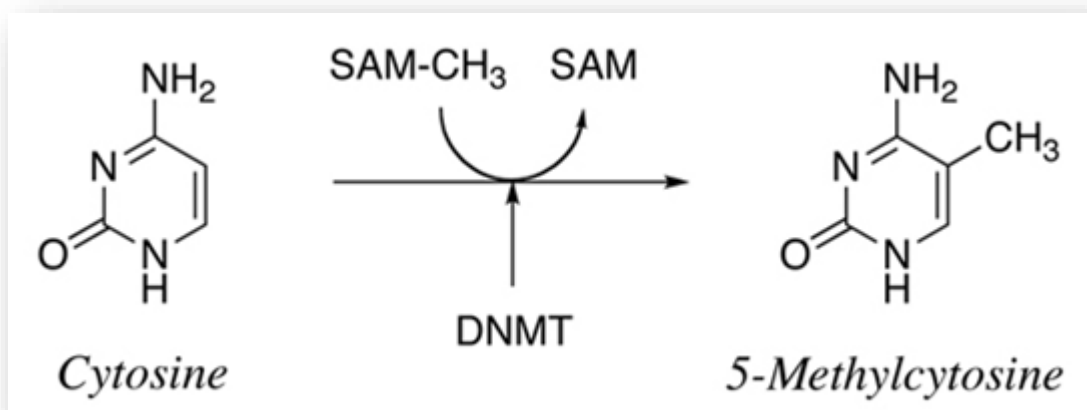


Figura 8 - Adição do grupo metil (CH₃) a molécula de citosina.

Nota: A reação ocorre através da ação de enzimas DNA metiltransferase (DNMT) formando 5-metilcitosina.

Fonte: <http://www-medchem.ch.cam.ac.uk>

De um modo geral, a presença de metilação em sequências promotoras ou regulatórias está correlacionada com a inativação ou com o silenciamento gênico (NAKAO, 2001). Esse evento tem sido associado com numerosos processos biológicos, incluindo “imprinting” genômico (BIRD, 2007), regulação da transcrição de genes e transposons (PASZKOWSKI; WHITHAM, 2001), expressão diferencial dos genes, diferenciação celular, inativação da cromatina, carcinogênese e inativação gênica (GONZALGO; JONES, 1997). Em eucariotos, geralmente há uma correlação negativa entre a metilação do DNA e a expressão gênica (HOLLIDAY, 1987).

A expressão gênica é regulada pela interação do DNA com fatores de transcrição, mas, a metilação nos resíduos de citosina pode afetar a acessibilidade para sequências regulatórias específicas do DNA, de maneira direta, quando citosinas metiladas estiverem dentro destas sequências ou indiretamente, pela mudança na estrutura da cromatina, a qual modifica a interação normal dos fatores de transcrição (EHRlich; EHRlich, 1993).

Com relação às características espaciais da cromatina existem duas situações: eucromatina, onde a estrutura do DNA está aberta e a transcrição está ativa; e heterocromatina onde ocorre uma condição inversa, a cromatina está condensada e apresenta inativação da transcrição. As enzimas envolvidas neste processo incluem entre outras, DNA metiltransferases (DNMTs), histona desacetilases (HDACs), histonas acetilases, metiltransferases de histonas e a

MECP2 (proteína-2 de ligação ao metil CpG). Alterações nos padrões epigenéticos normais podem desregular os padrões de expressão do gene resultando em alterações celulares. Em regiões com cromatina ativa, o DNA encontra-se não metilado e com altos níveis de histonas acetiladas, enquanto que regiões com cromatina inativa possuem DNA metilado e histonas desacetiladas (FIGURA 9). Estas modificações reversíveis garantem que o gene seja expresso ou silenciado de acordo com o desenvolvimento, sinalização bioquímica, dieta, alterações hormonais e medicações (RODENHISER; MANN, 2006).

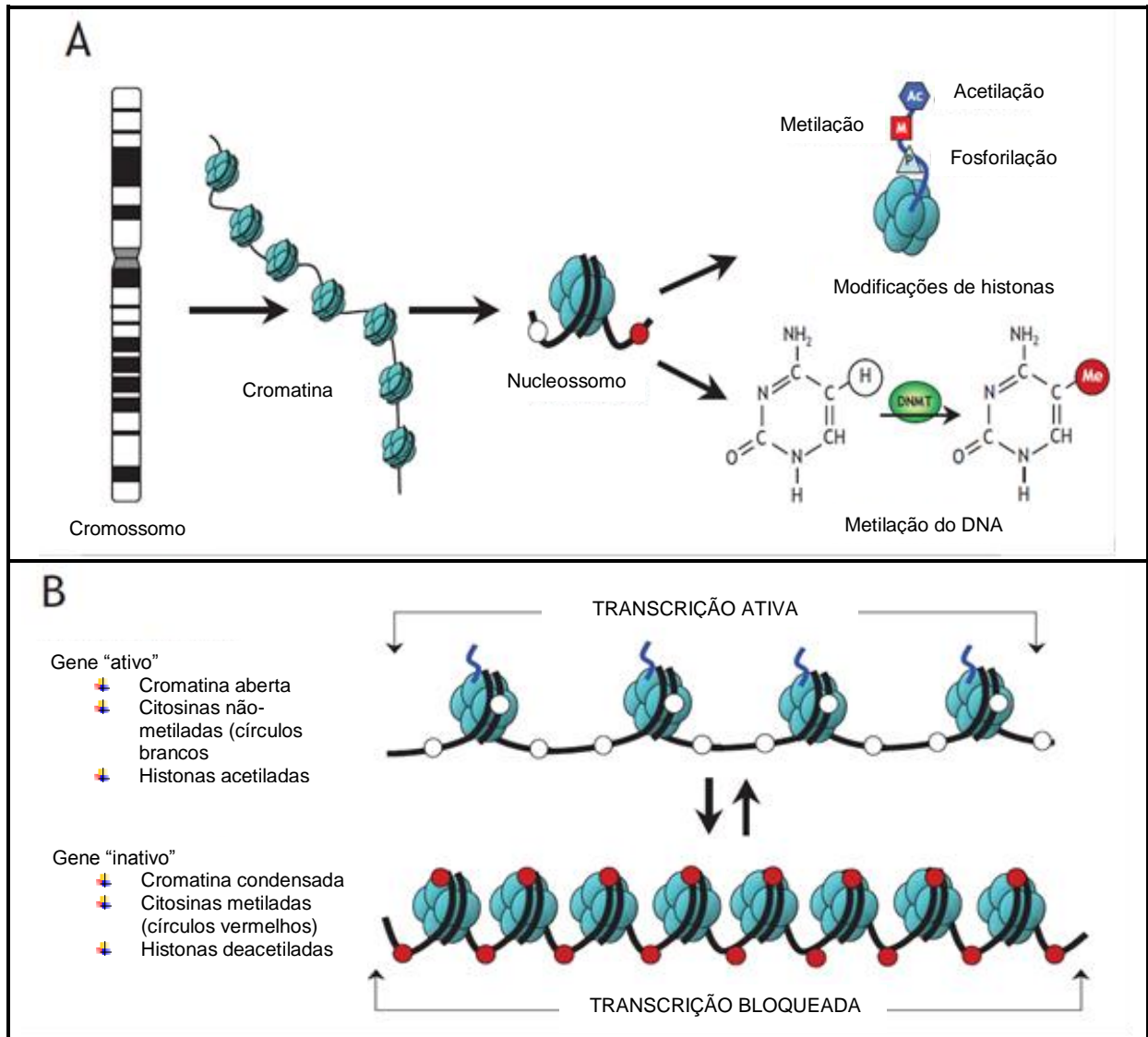


Figura 9 - Representação esquemática das alterações epigenéticas.

Nota: A) A fita de DNA enrolada no octâmero de histonas formando nucleossomos, que são as unidades formadoras do cromossomo. As proteínas histonas podem sofrer modificações como acetilação, metilação e fosforilação. Já o DNA sofre apenas a metilação, através da ação de enzimas DNMT (DNA metiltransferases).

B) Modificações reversíveis no estado da cromatina que influenciam a expressão gênica: Genes ativos são expressos quando a cromatina está aberta e genes inativados quando a cromatina está fechada. Círculos brancos representam citosinas não-metiladas e círculos vermelhos citosinas metiladas.

Fonte: Adaptado de RODENHISER; MANN (2006, p.342).

O interesse pela metilação do DNA tem se acentuado em função da evidência de que a perda do grupo metil durante o desenvolvimento poderia levar à ativação de genes específicos, ou ao contrário, quando os promotores dos genes são alvos de hipermetilação, podendo resultar no silenciamento gênico (BIRD et al., 2002; JONES; BAYLIN, 2002).

A metilação não ocorre isoladamente sendo associada com outras alterações epigenéticas como modificações das histonas, que podem interagir entre si e com também com a metilação do DNA (BERNSTEIN; MEISSNER; LANDER, 2007). Modificações das histonas e metilação do DNA têm papel fundamental na organização da arquitetura nuclear (ESTELLER, 2007).

Para que ocorra a manutenção dessas reações a nível molecular deve existir uma fonte renovável de doação do radical metil, que provêm da alimentação e são principalmente metionina, folato, colina e vitamina B12 (ULREY et al., 2005).

Pesquisas recentes tentam responder questões desconhecidas sobre o câncer utilizando uma abordagem epigenética (ESTELLER, 2007). Alterações na metilação do DNA são frequentemente vistas em células tumorais, e estas mudanças podem ser vistas em regiões chamadas ilhas CpG ou próximo a região dos promotores ou primeiros exons dos genes. As ilhas CpG são normalmente desmetiladas em células normais e excessivamente metiladas em genes supressores de tumor o que pode resultar em repressão da transcrição (BAYLIN; OHM, 2006; HERMAN et al., 1996; OLIVEIRA et al., 2010).

A metodologia utilizada neste trabalho foi baseada na técnica de MS-AP-PCR proposta por Liang e colaboradores (2002) para se detectar padrões alterados de metilação entre tumores primários, tecidos normais e linhagem de células. Esta técnica tem grande aplicabilidade na pesquisa do câncer porque promove a construção de um perfil de metilação e também o isolamento de sequências específicas associadas com estas mudanças.

Estas abordagens são particularmente importantes não somente para identificar genes supressores de tumor, mas também para encontrar padrões que possam ser utilizados no diagnóstico e prognóstico da doença. No entanto, o que dificulta a interpretação da metilação diferencial é que estas dependem da região genômica, e as funções das ilhas CpG em alguns locais específicos não foram totalmente esclarecidas (USHIJIMA, 2005).

Já se sabe que o perfil de metilação do DNA humano é uma característica herdável e que pode influenciar a expressão de diversos genes envolvidos no câncer mas, que ainda não foram descritos na PCM, tornando este estudo inédito para essa patologia. Portanto, a análise do perfil de metilação diferencial entre as diferentes manifestações clínicas e a identificação das regiões hiper ou hipometiladas

envolvidas podem fornecer evidências genéticas para elucidação dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nesta doença.

3 OBJETIVOS

Nesse capítulo serão determinadas as razões para esse estudo.

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificação dos perfis diferenciais de metilação do DNA de pacientes com paracoccidiodomicose com e sem lesões bucais baseada na estratégia de amplificação arbitrária sensível a metilação (MS-AP-PCR - Methylation-Sensitive Arbitrarily Primed PCR).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetos específicos desta pesquisa são os seguintes:

- a) Identificação de bandas diferencialmente metiladas obtidas por amplificação de DNA genômico de pacientes com PCM com e sem lesão de boca com enzimas de restrição específicas e amplificação por PCR com iniciadores aleatórios, clonagem e sequenciamento;
- b) identificação de genes diferentemente metilados em promotores e estudo da sua associação com a presença ou ausência de lesão de boca em pacientes com PCM;
- c) avaliação e quantificação da expressão do gene YTHDF1 por PCR em tempo real nos grupos com presença e ausência de lesões orais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesse capítulo serão descritos os meios utilizados nesse estudo, como: materiais, infraestrutura e as técnicas laboratorial e estatística utilizadas.

4.1 PACIENTES

Foram selecionadas amostras de 18 pacientes, sendo que dez pacientes apresentavam lesão oral, os quais foram diagnosticados na Clínica de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alfenas; os demais pacientes foram encaminhados por médicos pneumologistas e infectologistas da cidade de Alfenas e região.

O período em análise foi de janeiro de 1995 a outubro de 2012. As informações demográficas (sexo, idade, endereço) e clínicas (sintomatologia e curso da doença) foram arquivadas. Foi incluída no estudo toda amostra com diagnóstico confirmado da PCM, seja por exame direto (biópsia ou cultura) ou indireto (sorologia). Os critérios de exclusão foram informações clínicas e laboratoriais não acessíveis. O contato com os pacientes que apresentavam lesões orais foi feito através de carta solicitando sua presença na Clínica de Estomatologia da UNIFAL-MG; já com o grupo de pacientes sem lesões orais foi feito contato telefônico e visita em suas residências para entrevista. Dos pacientes que concordaram em participar da pesquisa foi obtido TCLE (APÊNDICE A), feita anamnese e exame físico e em seguida, coletado 5 mL de sangue heparinizado para extração do DNA.

O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Alfenas com número da aprovação: CAAE: 15998613.0.0000.5142 (ANEXO A).

Com relação as características dos pacientes a maioria era do gênero masculino (14 pacientes). Houve pequena diferença entre os que relataram serem lavradores ou realizarem outras atividades profissionais, porém os não lavradores, relataram contato esporádico com a lavoura, principalmente panha do café. A maioria apresentou hábitos tabagistas e cerca de 55,56% declaram não possuir

hábitos etilistas (TABELA 1). A condição dos pacientes com relação ao tratamento quimioterápico é mostrado na Tabela 2.

Tabela 1 - Caracterização da amostra de pacientes com PCM com e sem lesão de boca quanto ao gênero, profissão, tabagismo e etilismo.

Variável		PCM com lesão oral	%	PCM sem lesão oral	%	Total	%
Gênero	Masculino	7	70	7	87,5	14	77,78
	Feminino	3	30	1	12,5	4	22,22
	Total	10	100	8	100	18	100
Profissão	Lavrador	6	60	4	50	10	55,55
	Outros	4	40	4	50	8	44,45
	Total	10	100	8	100	18	100
Tabagismo	Sim	10	100	7	87,5	17	94,44
	Não	0	0	1	12,5	1	5,56
	Total	10	100	8	100	18	100
Etilismo	Sim	5	50	3	37,5	8	44,44
	Não	5	50	5	62,5	10	55,56
	Total	10	100	8	100	18	100

Fonte: do autor

Tabela 2 - Caracterização dos pacientes com paracoccidioidomicose quanto à condição com relação ao tratamento na coleta da primeira amostra de sangue.

Variável		PCM com lesão oral	PCM sem lesão oral	Total	%
Pacientes não tratados	Masculino	3	1	4	66,67
	Feminino	2	0	2	33,33
	Total	5	1	6	100
Pacientes em tratamento	Masculino	2	1	3	75
	Feminino	0	1	1	25
	Total	2	2	4	100
Pacientes tratados	Masculino	2	5	7	87,5
	Feminino	1	0	1	12,5
	Total	3	5	8	100

Fonte: do autor.

4.2 OBTENÇÃO DO DNA GENÔMICO

O DNA genômico dos pacientes com diagnóstico confirmado foi extraído do sangue total utilizando o Kit Wizard Genomic DNA Purification (PROMEGA) conforme orientações do fabricante. O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm em espectrofotômetro do tipo Nanodrop 2000 (THERMO SCIENTIFIC) para posterior utilização na reação de PCR.

4.3 ANÁLISE DO PERFIL DIFERENCIAL DE METILAÇÃO PELA TÉCNICA DE MS-AP-PCR

Existem diversas ferramentas que detectam padrões alterados do DNA, dentre estas destaca-se a PCR utilizando iniciadores (primers) arbitrários, esta técnica não requer o conhecimento de uma sequência prévia para amplificação. Variações desta técnica incluem o ensaio utilizado neste trabalho MS-AP-PCR que foi realizada de acordo com estudo de Liang et al. (2002). Após purificação do DNA de pacientes com e sem lesão de boca, o procedimento foi a digestão com a enzima endonuclease HpaII que reconhece e cliva o sítio de restrição CCGG não metilado, mas que não atua sobre este sítio quando a citosina interna encontra-se metilada (CmCGG) e a enzima endonuclease MspI, que reconhece o mesmo sítio de restrição e cliva tanto na presença, quanto na ausência da metilação. A metilação diferencial é observada pela amplificação de uma banda específica no DNA digerido com HpaII e ausência de amplificação no DNA digerido com MspI. A comparação direta do conjunto de fragmentos amplificados entre as diferentes amostras acontece após a separação por eletroforese em gel de agarose a 1%.

Assim sendo, a análise de MS-AP-PCR foi conduzida para comparar o perfil diferencial de metilação existente entre as amostras de pacientes da PCM com e sem lesão de boca. Aproximadamente 1 µg de DNA proveniente das amostras de cada grupo foi digerida isoladamente a 37°C durante 16 horas com as enzimas de restrição MspI e HpaII (100U). Em seguida, as amostras foram submetidas a amplificações empregando-se um 3 oligonucleotídeos iniciadores randômicos de 20 mers conjuntamente (random 01: 5' - AAC TCC CAC TCC AAC CCC GG - 3'; random 02: 5' - AAC TCC CAC TCC AAC CCG CG - 3'; random 03: 5' - AAC TCC CAC TCC AAC CGC GC - 3'). As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo 25 pmol de cada iniciador, 200 µM de dNTPs, 1X tampão (20 mM de Tris-HCl pH 8.4, 50 mM de KCl), 1,5 mM de MgCl₂ e 1U de Taq DNA Polymerase (INVITROGEN). As condições da amplificação foram: 1 ciclo a 94°C por 2 minutos, 5 ciclos a 94°C por 30 segundos, 40°C por 1 minuto e 72°C por 90 segundos, 30 ciclos a 94°C por 15 segundos, 55°C por 15 segundos e 72°C por 1 minuto, 1 ciclo a 72°C por 4 minutos.

Os produtos de amplificação foram separados após eletroforese em gel de agarose a 1% não-desnaturante e visualizados em filtro UV e fotografados. As bandas candidatas à metilação diferencial foram identificadas pela comparação direta entre os produtos amplificados a partir do DNA obtido de pacientes com e sem lesão de boca.

4.4 RECUPERAÇÃO DE BANDAS DIFERENCIALMENTE METILADAS A PARTIR DE GÉIS DE AGAROSE

As bandas diferencialmente metiladas foram cortadas e transferidas para um novo tubo de 1,5 mL acrescido de 100 µL de TE estéril e posteriormente purificadas segundo o protocolo descrito no Kit Wizard PCR Preps DNA purification (PROMEGA). O fragmento de DNA recuperado foi amplificado por PCR nas mesmas condições empregadas anteriormente descritas na seção 4.3. O produto desta reação de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose na presença de Gel Red™ (BIOTIUM) e as bandas visualizadas por sistema de fotodocumentação (QUANT, CAPTURE).

4.5 CLONAGEM

Os fragmentos amplificados foram purificados pelo kit Wizard SV Gel PCR Clean-up System (PROMEGA) e utilizados para clonagem em vetor pGEM-T Easy Vector System (PROMEGA) segundo protocolo indicado pelo fabricante. Os plasmídeos recombinantes foram utilizados para transformar células competentes *E. coli* Top 10. Os clones recombinantes (colônias brancas) foram transferidos para tubos de 0,5 mL contendo 200 µL de meio Luria Bertani (LB) contendo ampicilina a 100 µg/mL e incubadas a 37°C por 5-6 horas. Após a incubação, uma nova reação de PCR foi realizada utilizando como amostra o sobrenadante de cada tubo de cultura. As condições da reação foram: tampão 1X (20 mM de Tris-HCl pH 8.4, 50 mM de KCl), 1,5 mM de MgCl₂, 125 µM de cada dNTP, 133 nM de cada oligonucleotídeos e 0,5U de Taq DNA Polymerase (INVITROGEN), em um volume

final de 15 µL. As condições de amplificação foram: 1 ciclo a 95°C por 3 minutos, 35 ciclos a 95°C por 45 segundos, 55°C por 40 segundos e 72°C por 55 segundos, 1 ciclo a 72°C por 7 minutos. Os produtos da amplificação foram avaliados após eletroforese em gel de agarose a 1% corados com gel RED.

4.6 EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL EM PEQUENA ESCALA (Miniprep)

Para a extração do DNA plasmidial em pequena escala dos clones de interesse, 100 µL da suspensão bacteriana foram inoculados em tubos de 15 mL contendo 5 mL de meio LB e o antibiótico de seleção e incubados sob agitação a 37°C por no mínimo 18 horas. Após este tempo foi utilizado o kit Wizard™ Plus Minipreps DNA Purification System (PROMEGA) para a obtenção dos plasmídeos recombinantes, sob protocolo estabelecido pelo fabricante.

4.7 SEQUENCIAMENTO DO DNA E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS

Os plasmídeos recombinantes foram enviados para empresa especializada em sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo. O sequenciamento foi feito pelo método de dideoxi, descrito por Sanger et al.(1977), em sequenciador automático capilar Mega Bace 1000 (GE HEALTHCARE), utilizando o kit Dyanamic™ ET Dye Terminator (MegaBACE™) (GE HEALTHCARE), obedecendo às condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante. Cada plasmídeo foi sequenciado uma vez em cada orientação, totalizando assim, duas reações de sequenciamento para cada amostra.

Os dados do sequenciamento foram avaliados quanto à sua qualidade no software Phred/Phrap (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Depois de excluída a sequência do vetor, somente foi considerada na análise, aquelas sequências que mostraram similaridade com regiões genômicas humanas quando analisadas nas ferramentas BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>), e as sequências que possuem 90% das bases do fragmento sequenciado apresentando um score de qualidade de no mínimo 15. Este score de qualidade é

amplamente utilizado para se excluir artefatos do sequenciamento e diminuir a probabilidade da determinação incorreta de bases.

As sequências obtidas foram avaliadas segundo parâmetros que definem uma ilha CpG, bem como a sua posição relativa no genoma humano a genes conhecidos e/ou ilhas CpG já caracterizadas (http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_cpplot/).

4.8 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE YTHDF1 POR PCR EM TEMPO REAL

Após o sequenciamento e identificação do gene YTHDF1, foram coletadas novas amostras de sangue venoso de 16 pacientes com PCM para procedimento de extração de RNA de leucócitos e avaliação da expressão do gene de interesse.

O RNA total foi obtido por meio de kit (NORGEN BIOTEK CORPORATION) segundo recomendação do fabricante. O protocolo envolveu primeiramente a lise dos leucócitos e adição de etanol 95%, seguida de passagem através de coluna e lavagem, eluição do RNA e posterior armazenamento -20°C . Foi realizado eletroforese em gel de agarose a 1% para confirmação da extração do RNA.

A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando 10 μL de RNA em um volume final de 20 μL contendo 5 μL de tampão da enzima 5x, 2 μL de dNTPs, 1 μL de transcriptase reversa (MMLV), e 2 μL de água de injeção. As condições de amplificação foram: 1 ciclo a 70°C por 5 minutos; 1 ciclo de 42°C por 60 minutos; 1 ciclo de 72°C por 15 minutos. O cDNA foi estocado a -20°C para posterior amplificação.

A reação de amplificação do cDNA foi feita em um volume final de 50 μL , sendo 5 μL de tampão 10x, 1,25 de MgCl_2 , 2 μL de cDNA, 1 μL de dNTPs, 1 μL de YTHDF1reverse, 1 μL de YTHDF1forward, 0,25 de Taq e 38,5 de água de injeção.

As reações de PCR em tempo real foram feitas em duplicata na presença de sybr green (LUDWIG BIOTECNOLOGIA) utilizando o aparelho para PCR em tempo real ABI Prism 7500 (APPLIED BIOSYSTEM).

As reações de PCR em tempo real utilizaram 5 μL de cDNA, 1 μL a 0,5 μM do iniciador senso, 1 μL a 0,5 μM do iniciador anti-senso, 10 μL de 1X qPCR-SYBR-

Green mix e H₂O qsp 20 µL. A quantificação da expressão de cada gene foram feitas usando curvas padrão relativas obtida de diluições seriadas de produtos de PCR obtidos para cada par de iniciadores (TABELA 3). O gene relevante teve sua expressão normalizada utilizando os níveis de expressão do gene constitutivamente expresso GAPDH.

O resultado da amplificação foi expresso como valores individuais e média do valor do gene alvo/gene constitutivo. Diferença estatística entre a expressão do gene YTHDF1 entre o grupo de pacientes sem e com lesão oral foi calculada utilizando teste Mann Whitney (confiabilidade 95%) (R CORE TEAM, 2012).

5 RESULTADOS

Neste capítulo são apresentados os resultados deste trabalho.

5.1 ANÁLISE DO PERFIL DIFERENCIAL DE METILAÇÃO PELA TÉCNICA DE AMPLIFICAÇÃO ARBITRÁRIA SENSÍVEL A METILAÇÃO

A Figura 10 mostra o perfil de bandas da amplificação do DNA de pacientes com e sem lesão de boca após tratamento com as enzimas HpaII e MspI. Podem ser observadas bandas diferencialmente expressas nas canaletas referentes aos pacientes 4, 5, 6 sem lesão oral (metiladas), bandas estas não visualizadas nas canaletas referentes aos pacientes com lesão de boca 1, 2, 3 (não metiladas).

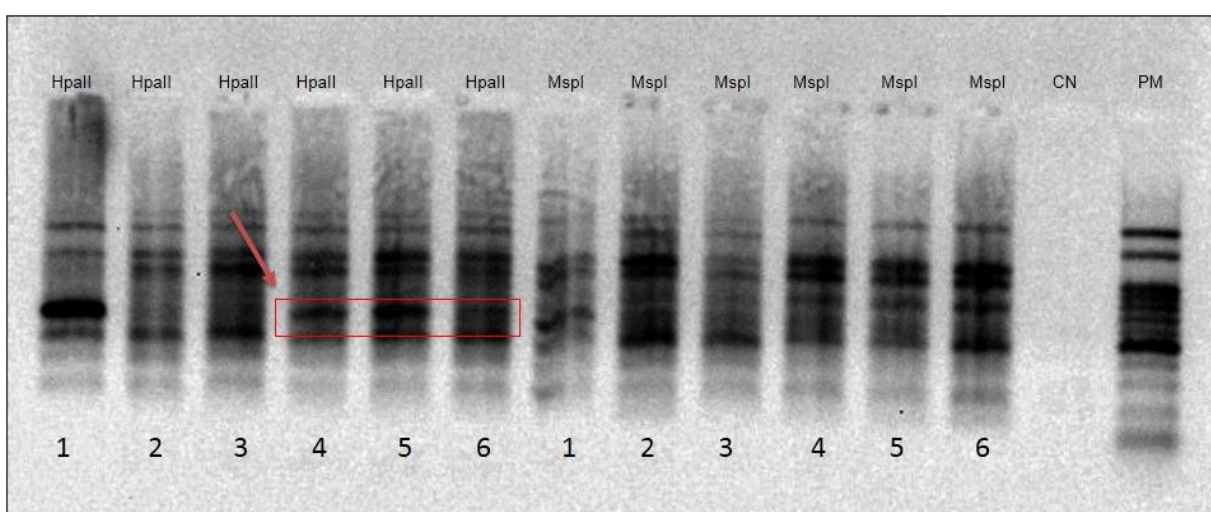


Figura 10 - Perfil diferencial de metilação do DNA pela técnica de MS-AP-PCR em gel de agarose.

Nota: Pacientes com lesão oral identificados pelos números 1, 2, 3 para as enzimas de restrição HpaII e MspI. Pacientes sem lesão oral identificados com os números 4, 5 e 6 para as enzimas HpaII e MspI. CN: controle negativo. PM: peso molecular.

Fonte: do autor.

5.2 RECUPERAÇÃO DE BANDAS DIFERENCIALMENTE METILADAS A PARTIR DE GÉIS DE AGAROSE

As bandas diferencialmente metiladas foram cortadas e posteriormente purificadas. O fragmento de DNA recuperado foi amplificado por PCR. A seguir, os fragmentos amplificados foram clonados em plasmídeos e utilizados para transformar células competentes. Após o crescimento das colônias bacterianas foram selecionadas 10 amostras que se apresentavam únicas e isoladas na placa de Petri e realizou-se novo PCR. As amostras foram avaliadas em gel de agarose para confirmar se houve clonagem de 1 ou mais fragmentos de DNA. Obtivemos o resultado mostrado na figura 10 que apresenta 3 diferentes clones de interesse, identificados por observação visual e que foram purificados e encaminhados para sequenciamento conforme mostrado na Figura 11.

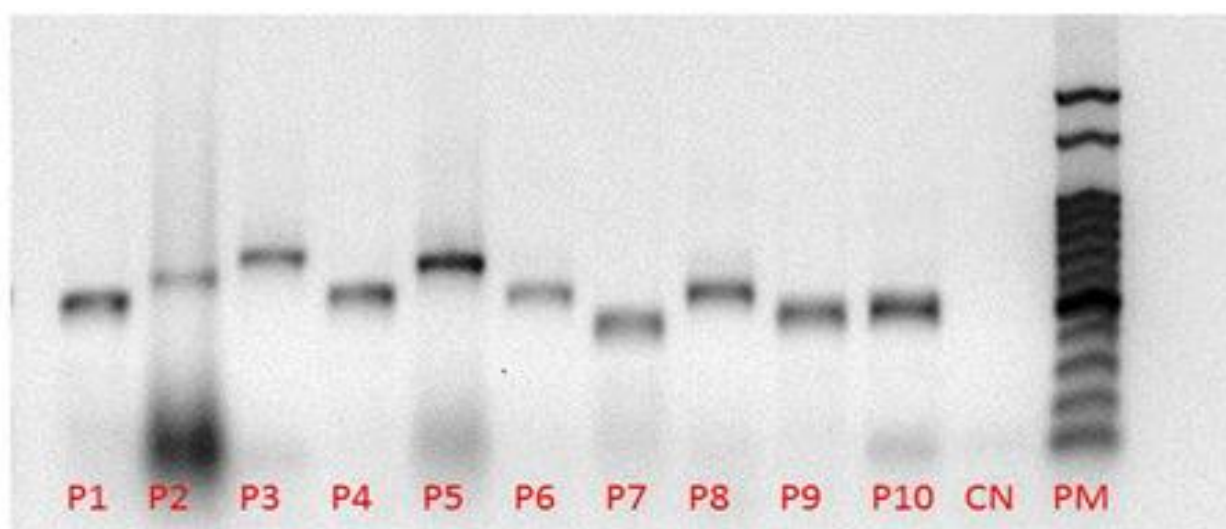


Figura 11 - PCR para seleção de clones recombinantes.

Nota: Os clones foram identificados com a letra P na sequência de P1 a P10. CN: negativo.
PM: peso molecular.

Fonte: do autor

5.3 EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL EM PEQUENA ESCALA (MINIPREP)

Para a seleção do DNA plasmidial em pequena escala dos clones de interesse foram escolhidas as bandas de posição P5, P6 e P7 que apresentavam diferentes pesos moleculares, em seguida obtidos os plasmídeos recombinantes utilizando o Kit Wizard Plus Miniprep DNA Purification System e confirmação do procedimento através gel de agarose após purificação (FIGURA 12).

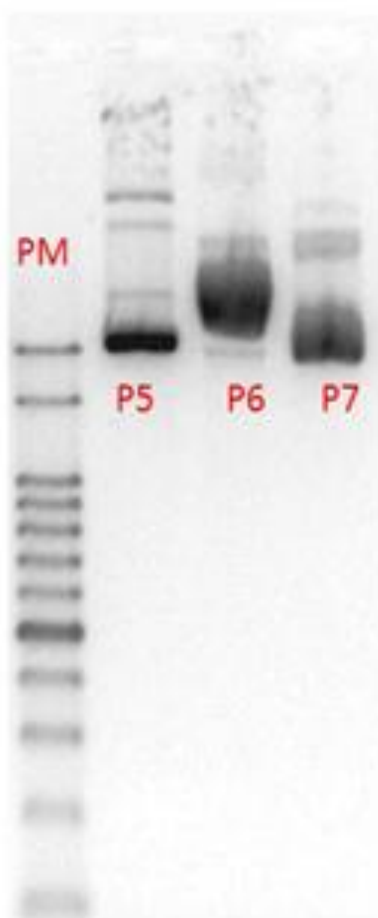


Figura 12 - Gel de eletroforese com os clones selecionados.

Nota: Clones de interesse referentes as posições P5, P6 e P7 retirados e purificados do PCR de colônia.

Fonte: do autor

5.4 SEQUENCIAMENTO DO DNA E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS

Os plasmídeos P5, P6 e P7 foram sequenciados e após análise dos cromatogramas obtidos pelo software PhredPhrap (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>), as sequências consenso geradas foram utilizadas para análise de homologia pela ferramenta BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para a obtenção de dados de mapeamento e identidade com as sequências presentes no genoma humano. O fragmento clonado no plasmídeo P5 apresentou similaridade com uma sequência de DNA presente no cromossomo 20, próxima ao gene “*YTH domain family, member 1*” (YTHDF1). Por sua vez, os fragmentos clonados nos plasmídeos P6 e P7 apresentaram similaridade com sequências de DNA presentes no cromossomo 15, sendo que o fragmento P6 apresentou similaridade com uma sequência intrônica do gene RNA proteína de ligação com múltiplos “RNA binding protein with multiple splicing 2” (RBPMS2) e o fragmento P7 com uma sequência intrônica do gene “*diphthamine biosynthesis 6*” (DPH6) (TABELA 3).

Tabela 3 - Fragmentos obtidos por MS-AP-PCR e identificação dos mesmos por homologia.

Clone ID	Sequência obtida	Localização (Cromossomo)	Resultado de Homologia obtido pelo programa BLAST
P5	AGCGCTCCCCACCGTACTCCCT GGCGGGGCTGCTTTGTCCTTGA TGAAACTGGCTCCTGCTCTCTTG GTTCCCTCCTGCCTCCCTGTGCCT TGGGAGTGCACTGACATGGAGT GTGCTGACGTGGAGTGTGTGGA GTGCGCTGACGTGGAGTGGCGCT GATGAGTGTGTGGAGTGGGCTG ACGTGGAGTGGGCTGGCGTGGA GTGTGTGGAGTGGGCTGGCGTG GAGTGTGTGGAG	20q13.33	99% de homologia com uma região presente no cromossomo 20 próximo ao gene YTH domain family protein 1.
P6	CCTCTCCCAGCATGCCCCCTC CACCTGCCGCCACGCGCATT CGATTAACTCCCCTCCAACCCG CGCAAGAATGACTCTCAGCCAC GGTGAAGACAAACTTTGTCTCTT AACTTTGACTCTCAGCCATGGT GAAGACAAACCTCACGTGAGCT TTTGCCAAGCCCATTGAGCAGAA TCTCGGGCCGCTTGGGACGCAT CTTCTCCCTTGGGACACGTCTTC CCCTCAGTAGAGGCACCACTAT ACCAGCCTCTGTGCCCGGGGTT GGAGTGGGAGTTAAT	15q22.31	99% de homologia com uma região presente no cromossomo 15 referente ao gene RNA binding protein with multiple splicing 2
P7	CACTCCAACCGCGCGAAAACAA AAGATAAATAAAAGCAAACATCT AAAGGTAATGAGACAGGAAGAA GTA AACATGTAGGTA ACTCGAT TGAGTTACTCAACTTTAACCCGG GGTTGGAGTGGGAGTT	15q14	99% de homologia com uma região presente no cromossomo 15 referente ao gene DPH6

Fonte: do autor

O fragmento P5, correlacionado ao gene YTHDF1 foi o único que mostrou identidade com a região promotora desse gene (FIGURA 13A). Os dois últimos fragmentos (P6 e P7) apresentam homologia com sequências intrônicas do gene RBPMS2 e *DPH6*, respectivamente (FIGURA 13B e 13C).

Muitos algoritmos tem sido utilizados para identificar ilhas CpG baseados em três parâmetros: comprimento, quantidades de CGs, proporção esperada e

observada (ObsCpG/ExpCpG) que foram originalmente proposto por Gardiner-Garden e Frommer, em 1987 e, mais tarde revisto por Takai e Jones (2002 apud HAN; ZHAO, 2009).

Para a determinação da presença de ilhas CpG, foram selecionados 500 pares de base (pb) antes da sequência obtida e mais 500 pb após o fim da sequência obtida neste trabalho. Estas sequências foram então avaliadas segundo parâmetros que definem uma ilha CpG utilizando a ferramenta CpG Plot (http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_cpplot/).

Os resultados indicam que todos os fragmentos apresentam elevado conteúdo de CG, porém somente o fragmento correspondente à região promotora do gene YTHDF1 apresentou uma ilha CpG (FIGURA 14).

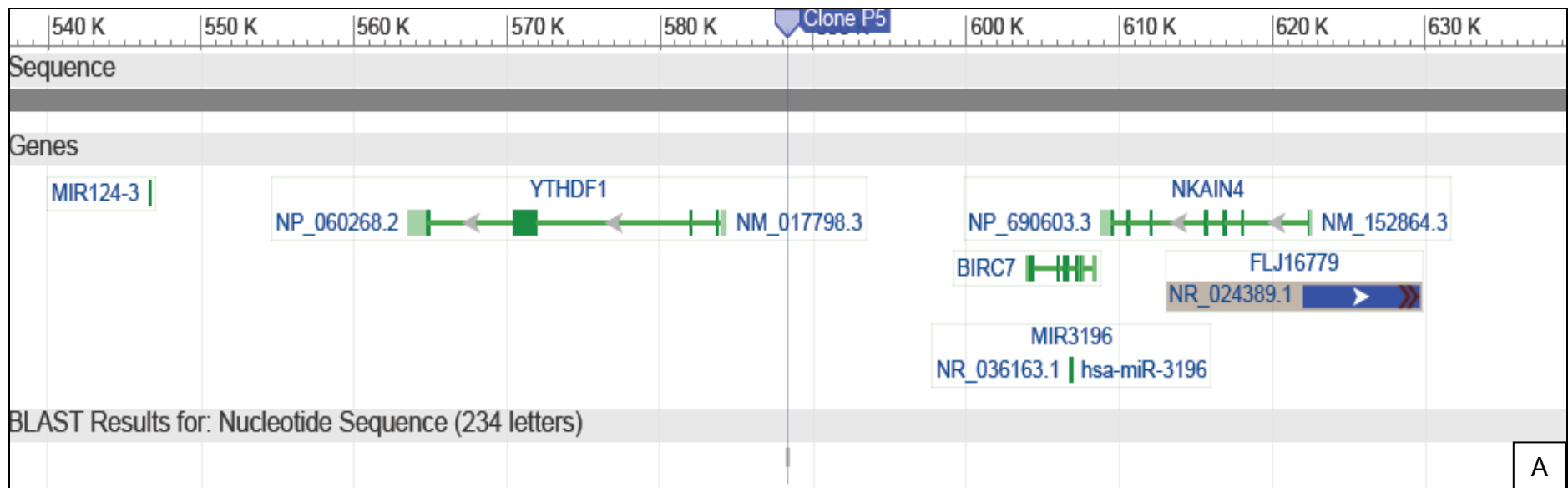


Figura 13 - Localização genômica dos fragmento sequenciado referente ao clone P5.

Nota: A sequência consenso fragmentos P5 (A) obtida pelo *software PhredPhrap* foi alinhada no genoma humano pelo uso da ferramenta BLAST.

Fonte: do autor

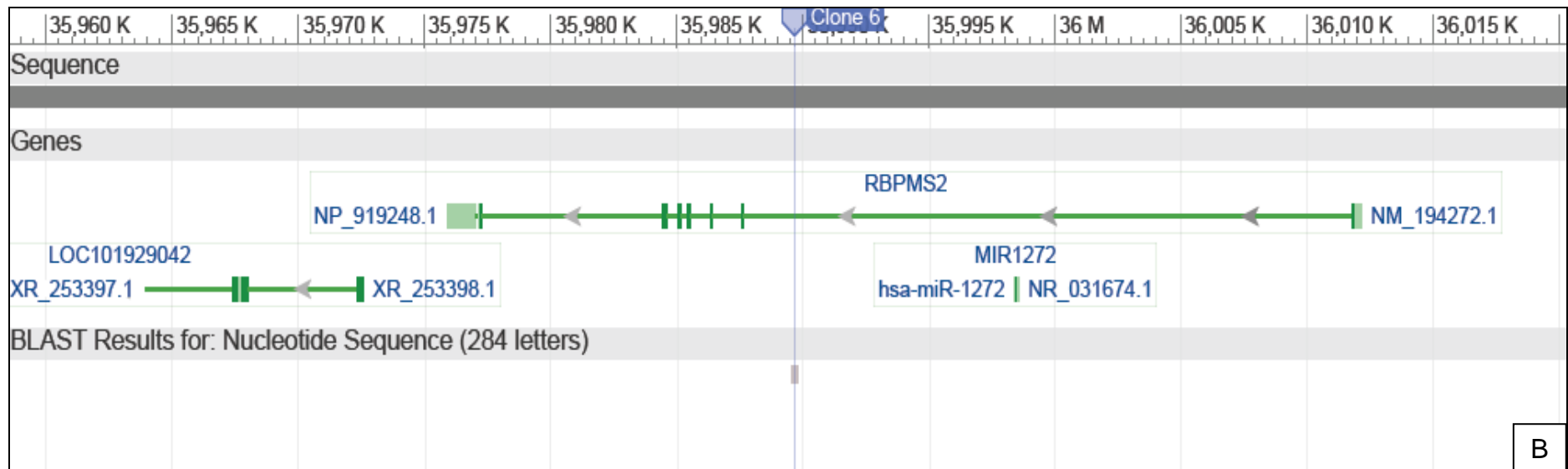


Figura 13 - Localização genômica dos fragmento sequenciado referente ao clone P6.

Nota: A sequência consenso fragmentos P6 (B) obtida pelo *software PhredPhrap* foi alinhada no genoma humano pelo uso da ferramenta BLAST.

Fonte: do autor

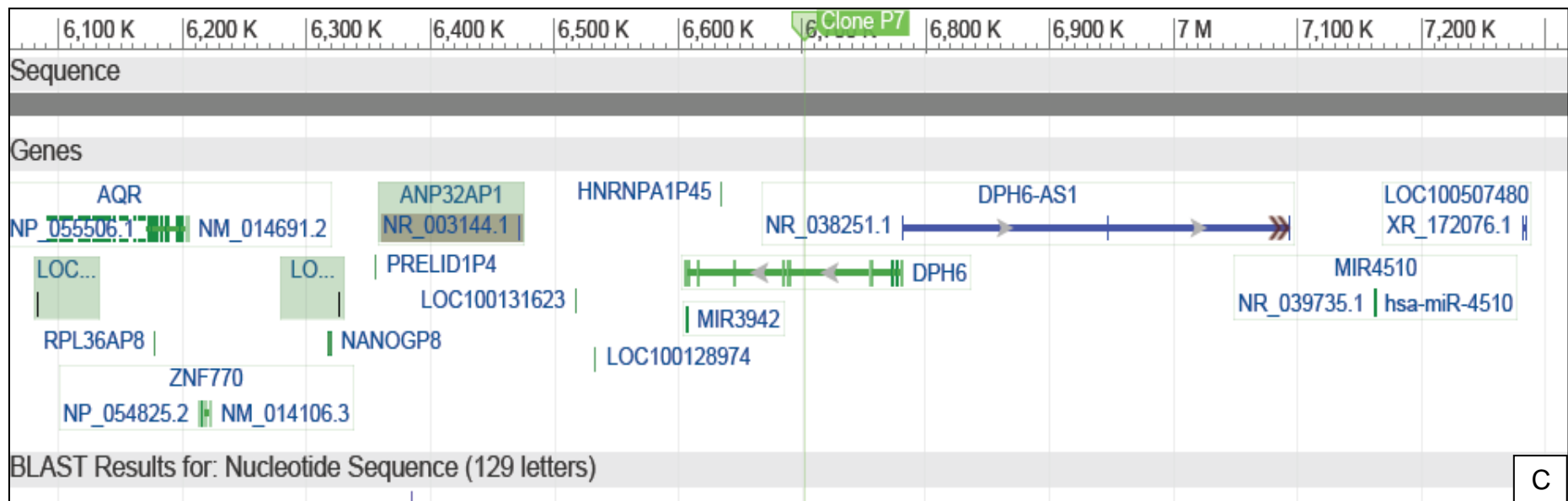


Figura 13 - Localização genômica dos fragmento sequenciado referente ao clone P7.

Nota: A sequência consenso fragmentos P7 (C) obtida pelo *software PhredPhrap* foi alinhada no genoma humano pelo uso da ferramenta BLAST.

Fonte: do autor

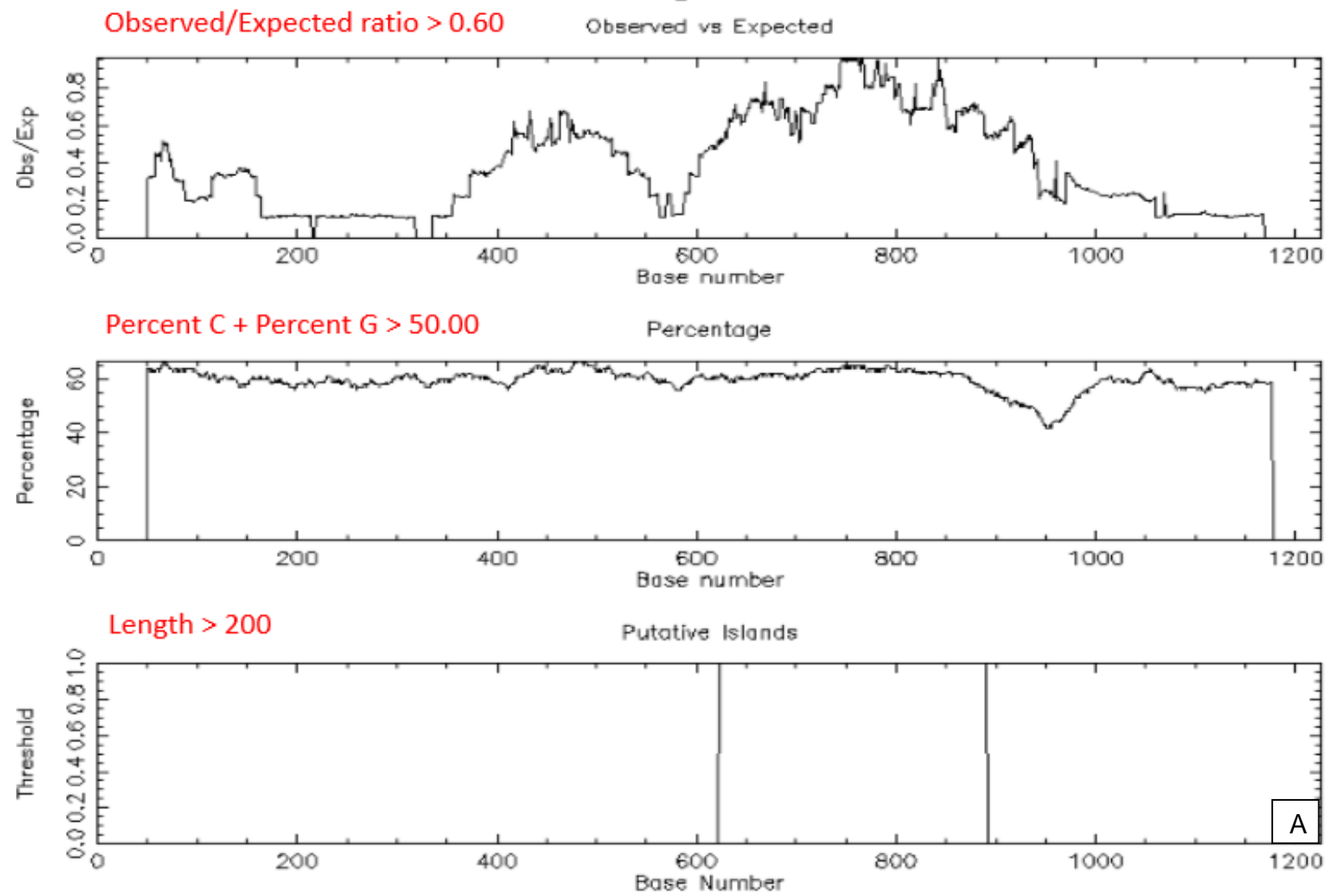


Figura 14 - Conteúdo de CG do fragmento correspondente ao gene YTHDF1 (A) e ao clone P5, de acordo com ferramenta CpG Plot.
 Fonte: do autor

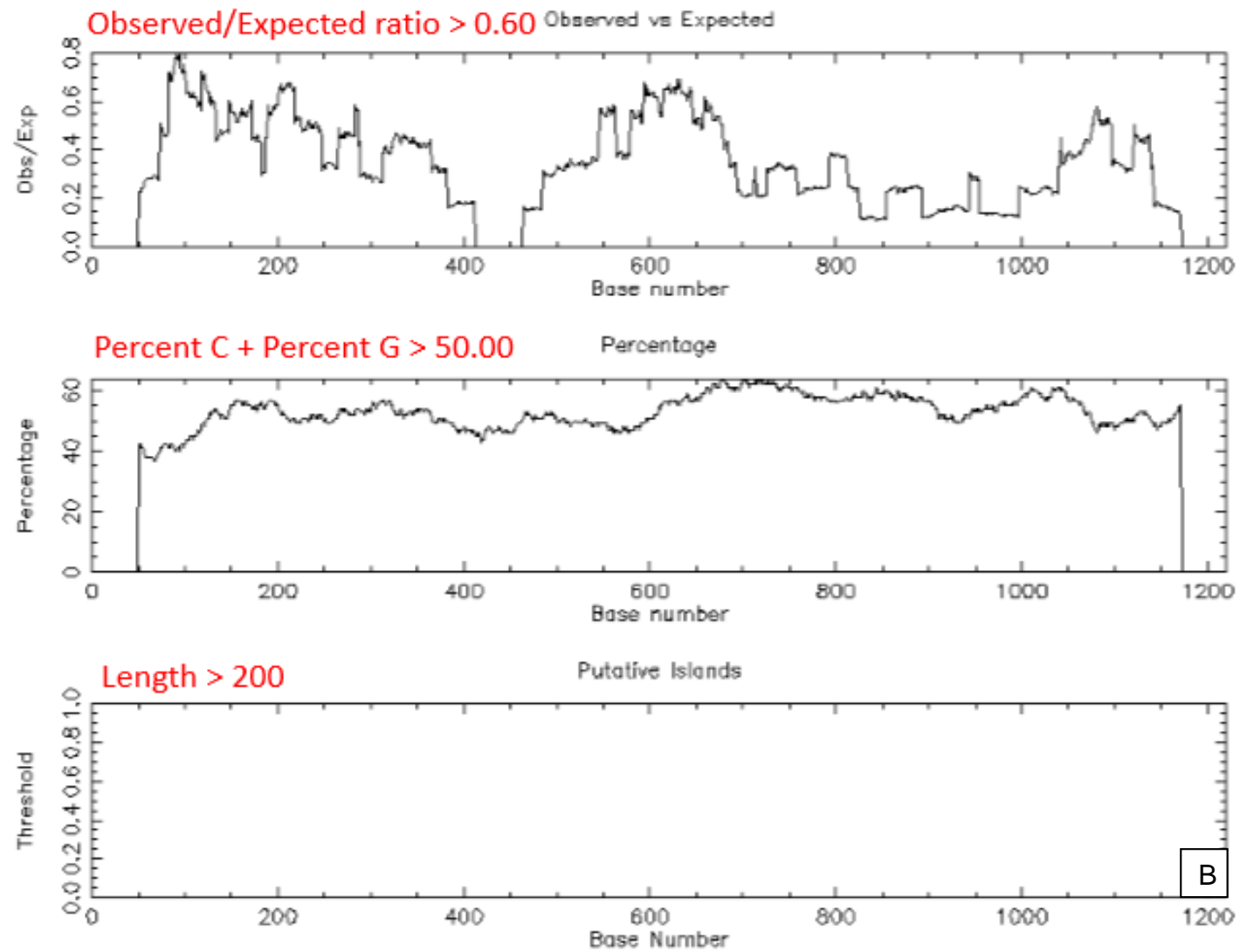


Figura 14 - Conteúdo de CG do fragmento correspondente ao gene RBPMS2 (B) e ao clone P6, de acordo com ferramenta CpG Plot.

Fonte: do autor

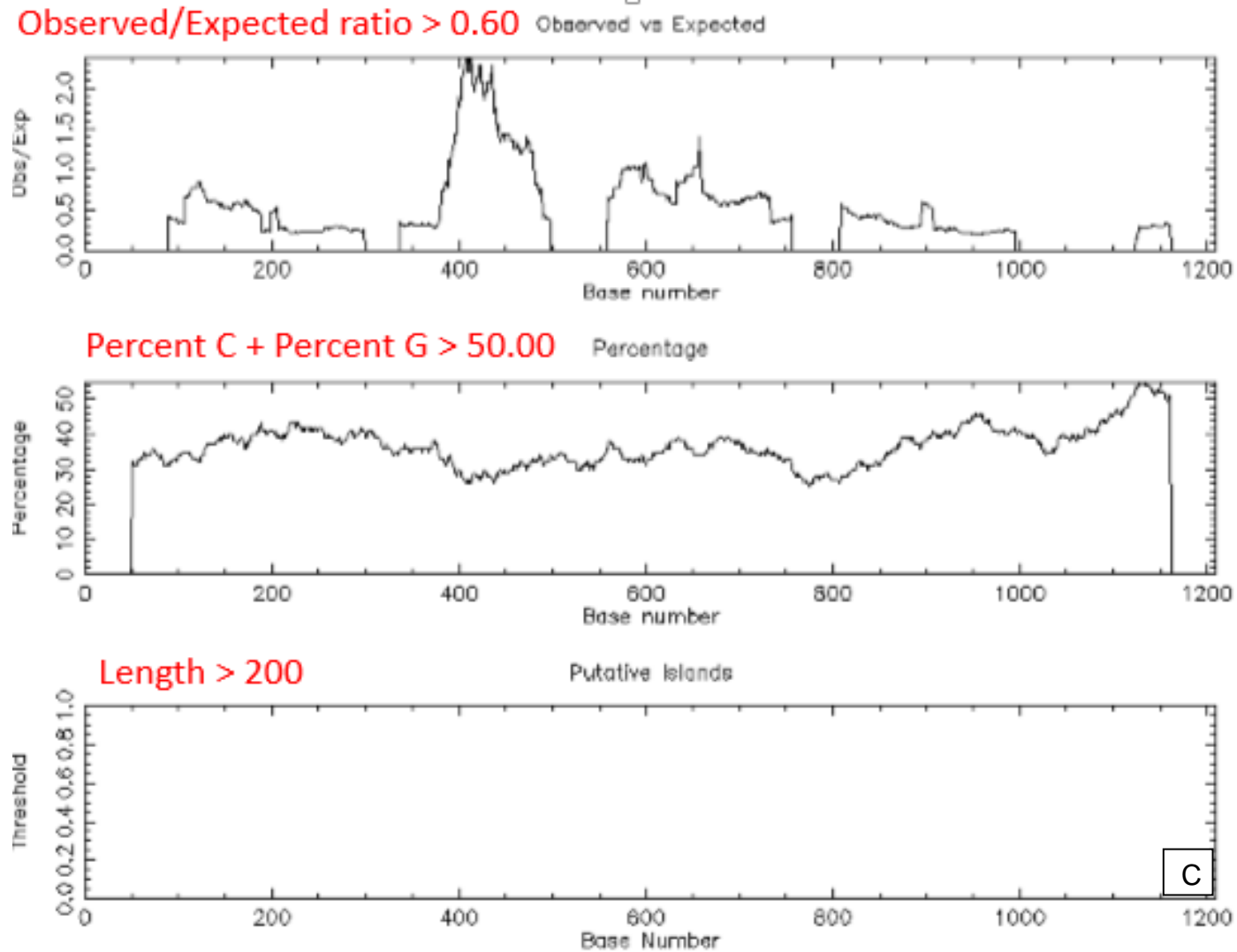


Figura 14 - Conteúdo de CG do fragmento correspondente ao gene *DPH6* (C) e ao clone P7, de acordo com ferramenta CpG Plot.

Fonte: do autor

5.5 EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE YTHDF1

Após o sequenciamento e identificação da possível relação da região promotora do gene YTHDF1 e a PCM foi feita a análise da expressão gênica utilizando PCR em tempo real. Os dois grupos testados para análise quantitativa da expressão do gene não apresentaram resultados estatisticamente significativos conforme mostrado na Figura 15.

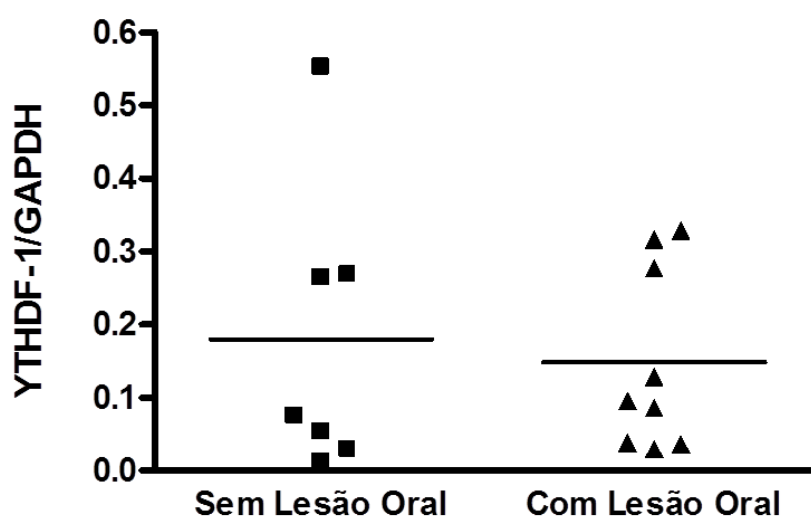


Figura 15 - Valores individuais e média da expressão relativa do gene YTHDF1/GAPDH.

Nota: A expressão do gene YTHDF1 foi feita por PCR em tempo real, o material utilizado foram leucócitos de pacientes com e sem lesão oral na PCM.

Fonte: do autor

6 DISCUSSÃO

A paracoccidiodomicose é uma doença de grande importância na saúde pública e na odontologia pela seriedade das lesões orais e das graves sequelas por elas produzidas. O conhecimento dos sintomas e a conduta diagnóstica são fundamentais para estabelecimento de um tratamento imediato e eficaz. O Brasil é detentor de cerca de 80% de todos os casos da doença na América do Sul e Estados como São Paulo, Minas Gerais e Paraná possuem taxas altas de ocorrência, levando a PCM a ser considerada como grave problema de saúde pública (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

O objetivo geral deste estudo foi avaliar comparativamente o padrão de metilação de DNA de pacientes com e sem lesão oral na etiopatogenia da PCM.

A metodologia empregada neste trabalho foi baseada no artigo de Liang et al. (2002) e é denominada amplificação arbitrária sensível a metilação (MS-AP-PCR). Estes autores demonstraram ser esta técnica rápida e eficiente para identificar padrões alterados de metilação no DNA genômico e isolamento de sequências específicas associadas com o perfil diferencial. Na MS-AP-PCR as amostras de DNA sofrem tratamento prévio com as enzimas de restrição Rsa I para gerar pequenos fragmentos de DNA antes da digestão com as enzimas sensíveis e resistentes à metilação (Hpa II e Msp I). A enzima endonuclease Hpa II reconhece e cliva o sítio de restrição CCGG não metilado, mas não atua sobre este sítio quando a citosina interna encontra-se metilada (CmCGG) e a enzima endonuclease Msp I, reconhece o mesmo sítio de restrição e cliva tanto na presença, quanto na ausência da metilação. A metilação diferencial, portanto, é observada pela amplificação de uma banda específica no DNA digerido com HpaII e ausência de amplificação no DNA digerido com MspI. Emprega-se também uma temperatura inicial de anelamento do iniciador mais baixa, de modo que este possa hibridizar com muitas sequências inespecíficas, e em seguida, a temperatura é aumentada, de modo que apenas os produtos "mais específicos" dos eventos iniciais são amplificados, o que gera um número de bandas que caracteriza a impressão digital do genoma (ESTELLER, 2007).

Na Figura 10 pode ser observado a presença de uma banda metilada no DNA dos pacientes que não apresentam acometimento oral (identificados pelos

números 4, 5 e 6) quando comparado com os pacientes com lesão oral (identificados pelos números 1, 2, 3), sugerindo um padrão diferencial de metilação do DNA. Também pode ser observada uma banda fortemente metilada aparentemente com mesmo peso molecular na canaleta referente ao DNA do paciente número 1 (com lesão oral). Este paciente apresentava doença generalizada, sugerindo condições graves de imunossupressão, além da presença de comorbidades, quadro esse que não foi observado nos outros pacientes com lesão oral (números 2, 3).

Em seguida foi feito isolamento e purificação das bandas de DNA metiladas referente aos pacientes 4 e 5 para a posterior identificação do(s) gene(s) diferencialmente metilados através de clonagem e sequenciamento (FIGURAS 11 e 12). Foram selecionados três clones de interesse (P5, P6, P7) e enviados para sequenciamento. O fragmento do clone identificado como P5 apresentou similaridade com uma sequência de DNA presente no cromossomo 20, na região promotora próxima ao gene “*YTH domain family, member 1*” (YTHDF1). Por sua vez, os fragmentos clonados nos plasmídeos P6 e P7 apresentaram similaridade com sequências de DNA presentes no cromossomo 15, sendo que o fragmento P6 apresentou similaridade com uma sequência intrônica do gene proteína de ligação de RNA com múltiplos splicing 2 (*RNA binding protein with multiple splicing 2*) (RBPM2) e o fragmento P7 com uma sequência intrônica do gene “*diphthamine biosynthesis 6*” (DPH6) (TABELA 3 e FIGURA 13).

A metilação associada a ilhas CpG em regiões promotoras desempenha um papel importante na regulação gênica e outros processos com carcinogênese (HAN; ZHAO, 2009; HERMAN et al., 1996). O principal interesse em encontrar ilhas CpG é que estas podem servir como marcadores de genes. Foi realizada a análise dos fragmentos pela ferramenta CpG plot e somente o fragmento P5, correspondente à região promotora do gene YTHDF1 apresentou uma ilha CpG (FIGURA 14). O estudo do número de ilhas comparado ao número de genes no genoma, a distribuição de ilhas em diferentes regiões genômicas, a distribuição de comprimento, a distância entre duas ilhas vizinhas em regiões promotoras e status de metilação sugerem que o algoritmo de Takai e Jones é em geral mais conveniente para a identificação de ilhas associadas ao promotor de CpGs (HAN; ZHAO, 2009). Vários autores tem proposto definições específicas das ilhas CpG baseadas nas características das sequências, embora deve-se ressaltar que estes

critérios não são perfeitos para definir o status da metilação (GARDINER-GARDEN; FROMMER, 1987 apud BERNSTEIN; MEISSNER; LANDER, 2007).

O gene YTHDF-1 está descrito na literatura relacionado com doenças como câncer de pâncreas, pancreatite e dermatomiosite. De forma interessante encontra-se a dermatomiosite e a pancreatite entre as doenças relacionadas com PCM (GENECARDS, 2014). Este gene foi descrito inicialmente como Dermatomiosite associada ao câncer autoantígeno putativo 1 (“*Dermatomyositis associated with cancer putative autoantigen 1*”). Localizado no cromossomo 20, região 20q13.33, compõem uma família de domínio YTH difundido em eucariotas e que se liga a RNA de cadeia simples (ssRNA) com o domínio conservado YTH (> 60% de identidade) situado no C terminal. Proteínas de ligação a RNAs tem como função regular a estabilidade e a tradução de numerosos mRNAs que codificam resposta a estresse e proteínas proliferativas (ABDELMOHSEN et al., 2009; STOILOV; RAFALSKA; STAMM, 2002; ZHANG et al., 2010).

Para avaliar o nível de expressão de YTHDF1 nos pacientes PCM com e sem lesão oral, procedeu-se testar o nível de expressão gênica deste gene nestes grupos por PCR em tempo real. Para isto uma segunda amostra de sangue de pacientes do estudo foi obtida, para extração de RNA a partir de leucócitos. Utilizou-se o gene de expressão constitutiva GAPDH para normalização dos resultados. Não foram observadas diferenças na expressão do gene YTHDF1 entre o grupo de pacientes com ou sem lesão oral (FIGURA 15). Neste caso os pacientes já estavam utilizando medicação e o status da metilação pode mudar constantemente e ser modulado pelo uso de medicação ou exposição a fatores ambientais, segundo Ulrey et al (2005). Uma possível explicação para a semelhança entre os dois grupos de pacientes pode estar na fonte de células para extração de RNA (leucócitos de sangue periférico). Como a metilação pode ser específica para determinado tecido, os leucócitos podem não retratar ao nível de metilação de DNA a influência exercida pela infecção pelo *P. brasiliensis*.

As diferenças nos padrões de metilação têm sido utilizadas também como marcadores, por exemplo, diferenças entre células tumorais e normais podem ser usadas para detectar a presença de células neoplásicas em amostras de biópsia ou para identificar DNA de amostras de sangue derivadas de tumores (USHIJIMA, 2005).

A epigenética segundo Nakao (2001) pode ser entendida como um sistema complexo que seletivamente utiliza a informação do genoma por meio da ativação ou inativação da função dos genes, permitindo assim a harmonia das funções celulares. A maioria dos genes permanece inativado e somente ocorrem ativações específicas de acordo com a função garantindo assim normalidade do mecanismo celular com menor gasto energético.

Nakao (2001), D' Alessio e Szyf (2006) consideram o fato de que o genoma é idêntico nos diferentes tipos celulares, já o epigenoma é variável de uma célula para outra. O epigenoma envolve o status da cromatina e as proteínas associadas e também as diversas modificações químicas do DNA que ocorrem pela metilação e outros eventos moleculares e que permitem uma perfeita harmonia nos processos celulares e na programação da expressão gênica.

Os padrões de metilação do DNA são alterados em resposta a mudanças na dieta e também exposição ambiental. Os grupamentos metil são provenientes da dieta e doados para o DNA através da via do folato e da metionina, e a ausência do metil pode causar profundas alterações no equilíbrio celular e levar a graves consequências como estabelecimento de patologias (ULREY et al., 2005). Também agentes ambientais como os metais pesados que são encontrados em águas contaminadas, cigarros e pesticidas podem também desestabilizar o genoma ou alterar o metabolismo celular. Todos estes fatores podem sugerir que existe uma correlação entre fatores intrínsecos e extrínsecos podem influenciar ou até mesmo modificar os padrões epigenéticos de cada organismo (RODENHISER; MANN, 2006; SZYF, 2007).

No caso de pacientes de zona rural fatores como má nutrição, tabagismo, exposição ocupacional podem estar associados a uma mudança no perfil de metilação do DNA que poderia facilitar a interação do fungo e estabelecimento da doença e de suas diferentes manifestações clínicas.

Questões como metilação do DNA, acetilação de histonas, cromossomos e cromatina e eventos de transcrição e regulação gênica que nas pesquisas dos últimos anos foram estudados de maneira individual, hoje se mostram intimamente relacionados. É necessária uma visão global dos mecanismos epigenéticos para compreender fenômenos biológicos como desenvolvimento, envelhecimento e suas implicações em doenças humanas (NAKAO, 2001).

Novos estudos são necessários para melhor compreensão dos mecanismos responsáveis pelo estabelecimento das lesões orais na PCM.

7 CONCLUSÕES

As conclusões deste estudo foram divididas em três tópicos abaixo descritos:

- a) Foi observado neste estudo um padrão diferencial na metilação entre o grupo de pacientes com e sem lesão oral na PCM;
- b) A purificação da banda diferencialmente metilada expressa levou a identificação de uma região promotora do gene YTHDF1, com presença de ilha CpG. A associação entre este gene com a PCM ainda não foi relatada na literatura;
- c) Não foi observada expressão diferencial do gene YTHDF1 em amostras de pacientes com e sem lesão oral pela técnica de PCR em tempo real.

REFERÊNCIAS

ABDELMOHSEN, K. et al. Ubiquitin-mediated proteolysis of HuR by heat shock. **EMBO J.**, Germany, v. 9, n. 28, p. 1271-82, 2009.

ALFENAS. Lei nº 4.475 – 27 nov. 2013. Institui o Programa de Manejo da Paracoccidiodomicose – PCM no Município de Alfenas. Disponível em: <<http://www.unifal-mg.edu.br/comunicacao/sancionadaleiprogramamanejo-paracoccidiodomicose>>. Acesso em: 28 dez. 2013.

BAYLIN, S.B.; OHM, J.E. Epigenetic gene silencing in cancer – a mechanism for early oncogenic pathway addiction? **Nat Rev Cancer**, London, v. 2, n. 6, p. 107-16, 2006.

BERGER, S.L. The complex language of chromatin regulation during transcription. **Nature**, London, v. 447, n. 7143, p. 407-12, 2007.

BERNSTEIN, B.E.; MEISSNER, A.; LANDER, E.S. The mammalian epigenome. **Cell**, Cambridge, v.128, n.4, p.669-81, 2007.

BIRD, A. et al. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes Dev**, New York, v.16, n.1, p.6-21, 2002.

BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**, London, v. 447, n. 7143, p. 396-8, 2007.

BISINELLI, J.C. et al. Manifestações estomatológicas da paracoccidiodomicose. **Rev. Bras. Otorrinolaringol**, São Paulo, v.67, n.5, p. 683-7, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 7.ed. Brasília: MS, 2009. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 8.ed. rev. Brasília: MS, 2010. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doencas_infecciosas_parasitaria_guia_bolso.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2014.

CAMARGO, Z. P. Serology of paracoccidiodomycosis. **Mycopathologia**, Berlin, v. 165, n. 4-5, p. 289-302, 2008.

CAMARGO, Z.P.; FRANCO, M.F de. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidiodomycosis. **Rev Iberoam Micol.**, Barcelona, v.2, n.17, p.41-8, 2000.

CAMPOS, M.V.S. **Estudo de pacientes com paracoccidiodomicose e a co-infecção paracoccidiodomicoseHIV/ aids, assistidas no Hospital Universitário**

de Brasília entre 1984 e 2005. 2006. 149f Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas). Faculdade de Medicina. Universidade de Brasília. Brasília, 2006.

CONTI-DIAZ, I. A. On the unknown ecological niche of *Paracoccidioides brasiliensis*: our hypothesis of 1989: present status and perspectives. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, São Paulo, v. 49, n. 2, p. 131-4, 2007.

D'ALESSIO, A.C.; SZYF, M. Epigenetic tete-a-tete: the bilateral relationship between chromatin modifications and DNA methylation. **Biochem. Cell Biol.**, Ottawa, v. 84, n. 4, p.463-76, 2006.

ECKHARDT, F. et al. DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 e 22. **Nature Genet.**, New York, v.38, n.12, p.1378-85, 2006.

EHRlich, M.; EHRlich, K. C. Effect of DNA methylation on the binding of vertebrate and plant proteins to DNA. In: JOST, J.P.; SALUZ, H.P. (eds). DNA methylation: molecular biology and biological importance. **Basel: Springer-Verlag**, Cambridge, v. 64, n. [S.l.], p.145-68, 1993.

ESPADA, J.; ESTELLER M. DNA methylation and the functional organization of the nuclear compartment. **Semin Cell Dev Biol**, Philadelphia, v.21, n.2, p.238-46, 2010.

ESTELLER M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. **Nat Rev Genet**, London, v. 8, n. 4, p.286-98, 2007.

FACKLER, M.J. Quantitative Multiplex Methylation – Specific PCR assay for the detection of promoter hypermethylation in multiple genes in breast cancer. **Cancer Res**, Philadelphia, v. 13, n.64, p. 4442-52, 2004.

FELIPE, M. S. et al. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. **J Biol Chem**, Maryland, v. 280, n.26, p.24706-14, 2005.

FORTES M.R.P. Immunology of paracoccidioidomycosis **An. Bras. Dermatol.** Rio de Janeiro, v.86, n.3, p.516-25, 2011.

GARCIA, N.G et al. Extensive cutaneous lesions in paracoccidioidomycosis successfully treated with itraconazole and b-glucan. **Int J Dermatol.**, USA, v.53, n.3, p.168-70, 2014

GARDINER-GARDEN, M.; FROMMER, M. CpG islands in vertebrate genomes. **J Mol Biol**, Philadelphia, v.196, n. 2, p.261-82, 1987.

GENECARDS. Disponível em: <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=YTHDF1&search=d2cd8bd929ca7ce2139c7ee0fddf2a9b>>. Acesso em: 17 jul. 2014.

GONZALGO, M.L.; JONES, P.A. Mutagenic and epigenetic effects of DNA methylation. **Mutat. Res**, Philadelphia, v. 386, n. 2, p.107-18, 1997.

HAN L.; ZHAO Z. CpG islands or CpG clusters: how to identify functional GC-rich regions in a genome? **BMC Bioinformatics**, London, v.10, n. 65, p.65, 2009.

HERMAN J.G. et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proc Natl Acad Sci**, Washington, v.93, n.18, p.9821-26, 1996.

HOLLIDAY, R. The inheritance of epigenetic defects. **Science**, New York, v. 238, n. 4824, p. 163-70, 1987.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nature Genetics**, New York, v. 33, Supp. p. 245-54, 2003.

JONES, P.A, BAYLIN, S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nat Rev Genet.**, London, v.3, n.6, p.415-28, 2002.

LACAZ C.S. Paracoccidioidomicose. In: LACAZ C.S. et al. **Tratado de micologia médica**, 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LIANG G. et al. Identification of DNA methylation differences during tumorigenesis by methylation-sensitive arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Methods**, Philadelphia, v.27, n.2, p.150-5, 2002.

LONDERO, A. T. Epidemiologia. In: DEL NEGRO, G.; LACAZ, C.S.; FIORILLO A. **Paracoccidioidomicose** (Blastomicose sul-americana). 1. ed. São Paulo: Sarvier-Edusp; 1982. p. 85-90.

MAMONI R. L.; BLOTTA M.H. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. **Cytokine**, Philadelphia, v.32, n.1, p.20-29, 2005.

MARQUES, S. A. et al. Paracoccidioidomicose: frequência, morfologia e patogênese de lesões tegumentares. **An Bras Dermatol**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 5, p. 411-7, 2007.

_____, S.A. Paracoccidioidomicose: Centenário do primeiro relato de caso. **An Bras Dermatol**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 3, p. 271-3, 2008.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; DEL NEGRO, G. M. B.; GONCALVES, E. G. Paracoccidioidomicose (Blastomicose sul-americana). In: FOCACCIA, R.; VERONEZI, R. **Tratado de infectologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2010. p.1533-39.

MINAS GERAIS. RESOLUÇÃO SES DE MINAS GERAIS Nº 3244, de 25 de abril de 2012. **Acrescenta agravos estaduais a Lista Nacional de Doenças de Notificação Compulsória e dá outras providências**. Disponível em: <www.ufjf.br/hu/files/2013/04/Resolucao-SES-Nº3244-de-25-de-abrilL-de-2012.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2014.

NAKAO, M. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. **Gene**, New York, v. 278, n. 1-2, p. 25-31, 2001.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. L.; QUEIROZ-TELLES, F. Paracoccidioidomycosis. **Curr Fungal Infect Rep**, Philadelphia, v. 3, n. 1, p. 15-20, 2009.

OLIVEIRA, N. F. P. et al. DNA methylation and cancer. **Rev Bras Cancer**, Brasil, v. 56, n. 4, p.493-9, 2010.

PASZKOWSKI, J.; WHITHAM, S. Gene silencing and methylation processes. **Plant Biology**, Oxford, v.4, n. 2, p.123-29, 2001.

POLO SE; ALMOUZNI G. Histone metabolic pathways and chromatin assembly factors as proliferation markers. **Cancer Lett**, v.220, n. 1, p.1-9, 2005.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2012. Disponível em: <http://www.R-project.org/>. Acesso em: 12 jul. 2014.

RANDO O.J. Chromatin structure in the genomics era. **Trends Genet**, Cambridge, v. 23, n. 2, p. 67-73, 2006.

RESTREPO A. et al. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infect Immun.**, Washington, v. 46, n. 2, p. 346-53, 1984.

_____, A. et al. Paracoccidioidomycose. In: KAUFFMAN, C.A. et al. **Essent clinic mycol**. 2. ed. Springer: New York, 2011. p. 367-85.

_____, A.; GÓMEZ, B. L.; TOBÓN, A. Paracoccidioidomycose: Latin America's Own Fungal Disorder. **Curr Fungal Infect Rep**, Philadelphia, v. 6, n. [S. I.], p. 303-11, 2012.

_____, A.; MCEWEN, J. G.; CASTANEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med Mycol**, Philadelphia, v. 39, n. 3, p. 233-41, 2001.

RODENHISER, D.; MANN, M. Epigenetics and human diseases: translating basic biology into clinical applications. **CMAJ**, Ottawa, v.174, n.3, 341-8, 2006.

RODRIGUEZ, L. E.; CASTRO, C. J. A model of dimorphism in pathogenic fungi: *Paracoccidioides brasiliensis*. **Acta Cient Venez**, Venezuela, v. 38, n. 2, p. 202-11, 1987.

SAN-BLAS, G. et al. A Model of dimorphism in pathogenic fungi: *Paracoccidioides brasiliensis*. **Acta Cient Venez**, Venezuela, v. 38, n. 2, p. 202-11, 1987.

_____, G.; BURGER, E. Experimental medical mycological research in Latin America - a 2000-2009 overview. **Rev Iberoam Micol**, Barcelona, v. 28, n. 1, p. 1-25, 2011.

_____, G.; NINO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med Mycol**, Philadelphia, v. 40, n. 3, p. 225-42, 2002.

SANTOS, R.S. et al. The human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: a medical and molecular approach. **RUVRD**, Três Corações, v. 9, n. 2, p. 281-95, 2011.

SCHAECHTER, M. N. C. et al. **Microbiologia**: mecanismos das doenças infecciosas. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SCULLY, C.; MONTEIL, R.; SPOSTO, M.R. Infectious and tropical diseases affecting the human mouth. **Periodontol 2000**, Hoboken USA, v.18, n. 1, p.47-70, 1998.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Consenso em paracoccidioidomicose. **SBMT**, Uberaba, v. 39, n. 3, p. 297-310, 2006.

SILVA, S.H.M. et al. Monitoring gp43 Antigenemia in Paracoccidioidomycosis Patients during Therapy. **Journal of Clinic Microbiol**, Washington, v. 42, n. 6, p. 2419-24, 2004.

SILVA-VERGARA, M. L. et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. **Med Mycol**, Philadelphia, v. 38, n. 3, p.193-9, jun. 2000.

STOILOV P, RAFALSKA I, STAMM S. YTH: a new domain in nuclear proteins. **Trends Biochem. Sci**, Philadelphia, v. 27, n. 10, p. 495-7, 2002.

SZYF, M. The dynamic epigenome and its implications in toxicology. **Toxicol Sci**, Oxford, v. 100, n. 1, p.7-23, nov.2007.

TAKAI, D.; JONES, P.A. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. **Proc Natl Acad Sci**, USA, v. 99, n. 6, p.3740-5, 2002.

THEODORO, R. C. et al. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. **Med Mycol**, Philadelphia, v. 43, n. 8, p. 725-9, 2005.

ULREY C. L. et al. The impact of metabolism on DNA methylation. **Hum Mol Genet**, Oxford, v.14, spec n.1, p. R139-R147, 2005.

USHIJIMA T. Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. **Nat Rev Cancer**, London, n.5, p.223-31, 2005.

ZHANG Z, et al. The YTH domain is a novel RNA binding domain. **J. Biol. Chem**, Rockville, Maryland, v.285, n. 19, p.14701-10, 2010.

APÊNDICE

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: Análise do Perfil de Metilação de DNA em Pacientes com Paracoccidioidomicose
Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias
Telefone de contato: (35) 32991305
Telefone Comitê de Ética: (35) 32991318

INFORMAÇÕES AO PARTICIPANTE OU RESPONSÁVEL:

A Paracoccidioidomicose é uma doença (micose) sistêmica, causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. Ocorre frequentemente em adultos do sexo masculino, habitantes ou trabalhadores da zona rural. Sua principal via de entrada é a respiratória e o controle da infecção depende de resposta imune da pessoa. Suas manifestações clínicas variam de pessoas para pessoa e doença pode acometer diferentes tipos de tecidos e órgãos como os ossos, nervos, fígado, baço, glândulas, pele e a boca. As lesões orais muito característica acometem um grande número de pacientes, mas não todos.

Você está sendo convidado(a) a participar deste estudo porque reside em uma região onde um grande número de pessoas podem estar infectadas com a Paracoccidioidomicose. Só farão parte do trabalho aqueles que concordarem em participar.

PORQUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO FEITO?

O objetivo deste estudo é identificar o perfil de metilação do DNA de pessoas que tiveram a Paracoccidioidomicose. Será estudado como este fator pode interferir na aquisição das doenças e suas consequências para o organismo.

O QUE SERÁ FEITO NESTE ESTUDO?

Caso você concordar em participar deste estudo será colhido 5 mL de sangue para as finalidades descritas abaixo:

Extração do DNA: O material genético da pessoa é conhecido como DNA. Nele estão contidas todas as informações necessárias ao funcionamento do organismo. Apesar de muito parecido, existem pequenas diferenças no DNA de pessoa para pessoa. Neste estudo iremos tentar identificar se estas diferenças estão associadas a uma determinada forma da doença.

QUAIS OS BENEFÍCIOS DESTE ESTUDO PARA A POPULAÇÃO?

Benéficos para os sujeitos da pesquisa: Uma vez que o estudo proposto visa obter novas informações, não existe nenhum benefício direto ao paciente.

Benefícios do projeto: Espera-se que as informações obtidas com os dados deste trabalho possam beneficiar outras populações em risco de adquirir Paracoccidioidomicose no futuro, porque pode auxiliar os pesquisadores e profissionais da área da saúde a desenvolverem no futuro formas de tratamento mais eficazes ou maneiras de prevenir estas doenças.

COMO SERÁ GARANTIDO O ANONIMATO DOS PARTICIPANTES?

Todas as informações obtidas são confidenciais. Cada indivíduo terá um número de identificação. Na divulgação dos dados não serão utilizados nenhuma forma que possa identificar os sujeitos da pesquisa.

Você pode retirar o seu consentimento a qualquer momento sem que isto implique em qualquer penalidade.

QUAIS OS RISCOS PARA O PACIENTE?

Mínimo. O paciente irá contribuir somente com a coleta de sangue. Todo o material para coleta de sangue (agulha e tubo) será fornecido pelo projeto. O sangue será colhido por técnico especializado no Laboratório de Análises Clínicas da UNIFAL. A coleta de sangue pode algumas vezes provocar discreta dor e a formação de pequenos hematomas. Os dados obtidos do prontuário do paciente serão manipulados de forma reserva e em hipótese alguma será mencionado nada que identifique a pessoa. O DNA obtido será utilizado apenas para os fins descritos neste projeto.

QUAIS SÃO MEUS DIREITOS COMO PARTICIPANTE DESTE ESTUDO?

A participação neste estudo é voluntária. Você pode deixar o trabalho a qualquer tempo sem que haja perda dos benefícios a que tem direito.

Se precisar de melhores informações sobre o trabalho que está sendo realizado você deverá entrar em contato com o Prof. Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias, da Universidade Federal de Alfenas/UNIFAL-MG, em Alfenas, no telefone 35 32991305. Caso haja necessidade poderá contar com o Comitê de Ética em Pesquisa pelo telefone 35 32991318.

Este termo será impresso em duas cópias, sendo que uma delas ficará de posse do pesquisador responsável e a outra cópia ficará de posse do sujeito da pesquisa.

PESQUISAS FUTURAS/ NOVAS PESQUISAS

O DNA proveniente do sangue poderá ser guardado para novos testes de laboratório que poderão ser feitos eventualmente. Isto evita que nova amostra de sangue seja coletada e pode aumentar o conhecimento sobre a doença. Caso você concorde com a guarda de DNA para futuros testes assine aqui:

ASSINATURA

Se você concordar em participar do estudo assine seu nome abaixo.

NOME DO PARTICIPANTE:

ID:

DATA NASC:

ASSINATURA DO PARTICIPANTE: _____

ASSINATURA DO PESQUISADOR: _____

DATA: ____/____/____

ANEXO

ANEXO A - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projetos de Pesquisa:

Título da Pesquisa: Número CAAE:

Pesquisador Responsável: Última Modificação: Tipo de Submissão:

Palavra-chave:

Situação da Pesquisa «

Marcar Todas
 Aprovado
 Em Apreciação Ética
 Em Edição
 Em Recepção e Validação Documental

Não Aprovado
 Pendente
 Recurso Não Aprovado na CONEP
 Recurso Não Aprovado no CEP

Recurso Submetido ao CEP
 Recurso Submetido à CONEP
 Retirado

Projeto de Pesquisa:

Tipo	Número CAAE	Título da Pesquisa	Pesquisador Responsável	Versão	Última Modificação	Situação	Gestão da Pesquisa
P	00752212.1.0000.5142	Desenvolvimento de teste de aglutinação para o diagnóstico sorológico da Esporotricose	Luiz Cosme Cotta Malaquias	1	06/09/2012	Aprovado	
P	00800612.3.0000.5142	Inquérito soro-epidemiológico da esporotricose em áreas rurais do município de Alfenas, M(...)	Luiz Cosme Cotta Malaquias	2	14/05/2013	Aprovado	
P	01984412.7.0000.5142	Desenvolvimento de estratégia de melhoria do diagnóstico da Paracoccidiodomicose por imun (...)	Luiz Cosme Cotta Malaquias	2	10/09/2013	Pendente	
P	13074213.8.0000.5142	Estabelecimento da carga fúngica em tecidos parafinados de pacientes portadores de Paracoc(...)	Luiz Cosme Cotta Malaquias	1	13/05/2013	Aprovado	
P	15998613.0.0000.5142	ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DE DNA EM PACIENTES COM PARACOCIDIODOMICOSE	Luiz Cosme Cotta Malaquias	2	04/06/2013	Aprovado	

Este sistema foi desenvolvido para os navegadores Internet Explorer (versão 7 ou superior), ou Mozilla Firefox (versão 9 ou superior).