

ANÁLISE *IN SILICO* DO GENOMA MITOCONDRIAL DE FUNGOS DO GÊNERO *CANDIDA spp* PARA IDENTIFICAÇÃO DE POSSÍVEIS REGIÕES POLIMÓRFICAS

Adolfo José da Mota, Francisco G. da Nóbrega

Laboratório de Genética Molecular e Genomas. Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D, Universidade do Vale do Paraíba. Av. Shishima Hifumi, 2911 – Urbanova – 12244-000 – São José dos Campos - SP. e-mail: adolfo.mota @directnet.com.br

Resumo - Neste trabalho fizemos uma análise detalhada do genoma mitocondrial dos fungos *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Kluyveromyces thermotolerans*. Nosso objetivo foi encontrar prováveis regiões conservadas que pudessem ser usadas para construção de *primers* capazes de identificar, por PCR, possíveis regiões polimórficas, o que forneceria uma importante ferramenta, não apenas para a diferenciação entre espécies do gênero *Candida spp*, como também para verificar se há polimorfismo entre isolados de uma mesma espécie. Verificamos que estas regiões conservadas existem e entre elas, algumas possuem características importantes e necessárias para a construção dos *primers*.

Palavras-chave: Genoma mitocondrial; regiões polimórficas; *Candida albicans*, *Candida glabrata*.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas

Introdução

Nos últimos anos, estudos epidemiológicos têm apontado a contribuição relevante que fungos do gênero *Candida spp*, especialmente *Candida albicans*, vêm dando às infecções hospitalares e comunitárias, seguidas de altas taxas de morbidade e mortalidade, principalmente de lactentes e pacientes imunocomprometidos (COLOMBO, 2003).

Esse panorama preocupante vem chamando a atenção de pesquisadores que buscam formas rápidas de identificação e diferenciação bem como a compreensão sobre virulência e patogenicidade dos fungos do gênero *Candida spp*, sendo *Candida albicans* a mais estudada. Alguns testes fenotípicos já consolidados na literatura como o da fosfolipase (PRICE et al, 1982) e proteinase (RÜCHEL et al, 1982), são largamente utilizados, servindo como referencial para virulência e patogenicidade. Testes de placa baseados na assimilação de carboidratos e coloração da colônia, como o CHROMagar, constituem hoje uma das principais ferramentas para identificação e diferenciação dos fungos desse gênero, contudo, para a diferenciação entre algumas espécies, como *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*, os testes fenotípicos são ineficientes porque as colorações e formas assumidas pelas colônias são muito parecidas, o que tem levado a identificações erradas entre fungos dessas espécies. Segundo Odds et al. (1998), aproximadamente 2% das espécies de uma coleção de 2500 isolados identificados inicialmente como *Candida albicans* eram, na verdade, *Candida dubliniensis*.

Na tentativa de resolver essa problemática, testes utilizando métodos moleculares vêm sendo implementados (MÄHNB et al., 2005), contudo, esses estudos, baseados no DNA genômico, não permitem, até o presente momento, a diferenciação entre isolados de uma mesma espécie (DONNELLY et al., 1999), e revelam um baixo polimorfismo entre as espécies do gênero (VALÉRIO et al., 2006) a menos que se utilize técnicas de genotipagem caras e de difícil acesso (Fundyga et al., 2002).

Neste estudo, buscamos identificar, *in silico*, no genoma mitocondrial dos fungos *Candida albicans* (Anderson et al., 2001), *Candida glabrata* (KOSZUL et al., 2003) e *Kluyveromyces thermotolerans* (TALLA et al., 2005), genes conservados entre essas espécies que possam seqüências consenso que possam ser usadas como *primers*, capazes de gerar, por PCR, um padrão distinto de bandas, característico para cada espécie e também, que possam ser usados para verificar se há diferenças entre isolados de uma espécie.

Materiais e Métodos

Com base nos dados do GenBank do NCBI, foi criado, em CoreIDRAW®10, um mapa para cada fungo, contendo todos os genes: *C. albicans* – acesso AF285261 (Figura 1a), *C. glabrata* - acesso CGL511533 - (Figura 1b) e *K. thermotolerans* - acesso AJ634268 (Figura 1c).

A análise dos mapas permitiu a escolha de genes que estavam próximos um do outro, na mesma seqüência e mesma orientação: ATP8, ATP6, ATP9 e COX3 (Fig. 1 a, b e c). Os genes foram alinhados pelo programa CLUSTAL X

versão 1.83 e para analisar as seqüências consenso, foram utilizados os programas GENE RUNNER versão 5.03, opção *analysis oligo*, e PrimerSelect™ 5.00 do DNASTAR, para verificar qual apresentava a melhor característica para ser usada como *primer*.

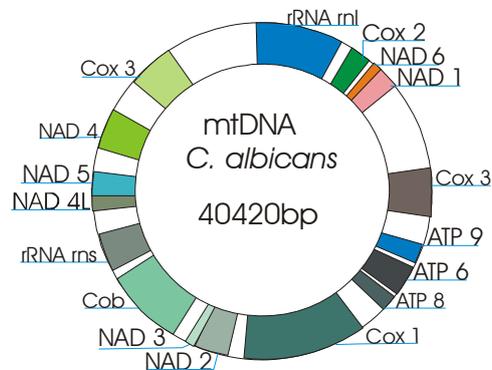


Fig. 1a Mapa mitocondrial da *C. albicans*

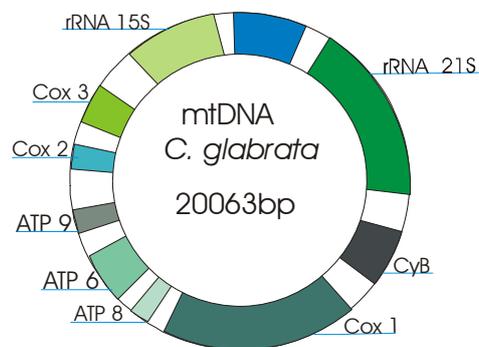


Fig. 1b Mapa mitocondrial da *C. glabrata*

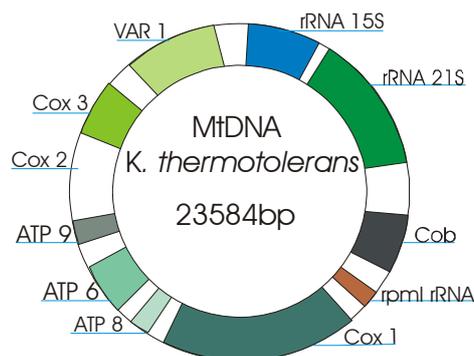


Fig. 1c Mapa mitocondrial do *K. thermotolerans*
 Legenda: rRNA rnl – RNA ribossomal subunidade maior; rRNA rns – RNA ribossomal subunidade menor; COX 1, 2 e 3 – citocromo oxidase subunidades 1, 2 e 3; NAD 1, 2, 3, 4, 5 e 6 – NADH desidrogenase subunidades 1, 2, 3, 4, 5, 6; ATP 6, 8 e 9 – ATPase subunidades 6, 8 e 9; COB – provável apocitocromo b; VAR1 provável proteína ribossomal mitocondrial VAR1.

Os critérios principais usados para selecionar os alinhamentos foram o tamanho (entre 17 e 21

pares de bases), a temperatura da anelamento, quantidades de bases guanina e timina (próximo a 50%), se formavam dímeros, e se a extremidade 3' estava livre e com pelo menos cinco bases consenso entre os três fungos.

Resultados

Após a análise, seis alinhamentos foram escolhidos (Tabela 1) por apresentarem uma temperatura de anelamento média de 50° C, poucas possibilidades de formarem dímeros, ter a extremidade 3' bastante conservada entre os três fungos e o tamanho médio de 20 bp.

No gene COX3 foi possível encontrar três alinhamentos viáveis, identificados na Tabela 1 como Aln1, 2 e 3, respectivamente.

Os *primers* foram desenhados a partir da seqüência consenso (indicada pelo asterisco na Tabela 1) de cada alinhamento, sendo que para os alinhamentos do gene COX3 desenhou-se a seqüência complementar.

Tabela 1- Alinhamentos selecionados

Gene	Alinhamento	Organismo
ATP8	5' TGCCACAATTAGTACCATTTTA	<i>K.thermotolerans</i>
	5' TGCCACAATTAATTCATTTTA	<i>C.glabrata</i>
	5' TGCCACAATTAGTTCCTTTTFA ***** * * * *	<i>C.albicans</i>
ATP6	5' TGCTAATATATTGCTGGACA	<i>K.thermotolerans</i>
	5' TGCTAATATCTTCTCTGGACA	<i>C.glabrata</i>
	5' TGCTAATATATTATCTGGACA ***** * *****	<i>C.albicans</i>
ATP9	5' ATGCAATTAGTATTAGCCGC	<i>K.thermotolerans</i>
	5' ATGCAATTAGCATTAGCCGC	<i>C.glabrata</i>
	5' ATGCAATTAGCTTTAGTGC ***** ***** *	<i>C.albicans</i>
COX3 Aln1	5' CCTTCACCATGACCAAT	<i>K.thermotolerans</i>
	5' CCATCACCATGACCAAT	<i>C.glabrata</i>
	5' CCTTCACCATGACCTAT ** ***** **	<i>C.albicans</i>
COX3 Aln2	5' TAGGTGATCATAACAATTGCAGT	<i>K.thermotolerans</i>
	5' TAGGTGATCATAACAATTGCAGT	<i>C.glabrata</i>
	5' TAGGAGATCATACTTTAGCAGT **** ***** * *****	<i>C.albicans</i>
COX3 Aln3	5' TTTGAGCTTACTTTTCATTTCAGC	<i>K.thermotolerans</i>
	5' TTTGAGCATATTTTCATTTCAGC	<i>C.glabrata</i>
	5' TTTGAGCATATCTACATTTCAGC ***** ** * *****	<i>C.albicans</i>

Discussão

Os seis *primers* desenhados fornecem nove combinações viáveis, com potencialidade de amplificar fragmentos de tamanhos variáveis sendo o menor deles o produto da amplificação do par ATP 9 - COX 3 aln1, com aproximadamente 2032 bp para *C. albicans*; e o maior, o produto da amplificação do par ATP8 - COX3 aln 3, com aproximadamente 4350 bp para *K. thermotolerans*. Em todas as combinações, as bandas geradas são diferentes entre si no tamanho o que sugere fortemente que tais regiões são polimórficas entre as espécies estudadas e que provavelmente esse

polimorfismo se encontre na região intergênica uma vez que o alinhamento dos genes mostrou que estes são bem conservados.

O tamanho dos fragmentos gerados favorece o estudo com enzimas de restrição, potencializando assim, a possibilidade de identificação de regiões polimórficas não apenas entre espécies, mas também entre linhagens de uma mesma espécie.

Conclusão

Com a análise *in silico* do genoma mitocondrial dos três fungos estudados foi possível identificar genes que possuem seqüências bem conservadas e que podem ser usadas para a construção de *primers*, capazes de identificar regiões possivelmente polimórficas nos fungos do gênero *Candida spp* podendo, dessa forma, auxiliar na diferenciação das espécies entre si e investigar se o polimorfismo ocorre também entre isolados de uma mesma espécie.

Referências

- ANDERSON, J. B.; WICKENS, C.; KHAN, M.; COWEN, L. E.; FEDERSPIEL, N.; JONES, T.; KOHN, L. M. Infrequent genetic exchange and recombination in the mitochondrial genome of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 183 (3), p. 865-872, 2001.
- COLOMBO, Arnaldo Lopes; GUIMARÃES, Thais. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida spp*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36 n.5 Uberaba set./out. 2003.
- FUNDYGA, Ruth E.; LOTT, Timothy J.; Arnold, Jonathan. Population structure of *Candida albicans*, a member of the human flora, as determined by microsatellite loci. *Infection, Genetics and Evolution*, v.2, p 57-68, 2002.
- PRICE, Margaret F.; WILKINSON, Ian D.; GENTRY, Layne O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*, n. 20, p 7-14, 1982.
- RÜCHEL, R.; TEGELER R.; TROST, M. A comparison os secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. *Sabouraudia*, n. 20, p. 233-244, 1982.
- MÄHNB, B.; STEHR, F.; SCHÄFER, W.; NEUBER, K. Comparison of standard phenotypic assays with a PCR method to discriminate *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Mycoses*, n. 48, p. 55-61, 2005.
- DONNELLY, Samantha M.; SULLIVAN, Derek J.; SHANLEY, Diarmuid B.; COLEMAN, David C. Phylogenetic analysis and rapid identification of *Candida dubliniensis* basead on analysis of ACT1 intron and exon sequences. *Microbiology*, n. 145, p. 1871-1882, 1999.
- VALÉRIO, Henrique Maia; WEIKERT, Rita de Cássia Botelho; RESENDE, Maria Aparecida. Differentiation of *Candida* species obtained from nosocomial candidemia using RAPD-PCR technique. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39 n.2, p. 174-178, mar./abr., 2006.
- ODDS, F. C.; VAN NUFFEL, L.; DAMS, G. Prevalence of *Candida dubliniensis* isolates in a yast stock collection. *J. Clin. Microbiology*, n.6 p. 2869- 2873.
- KOSZUL, R.; MALPERTUY, A.; FRANGEUL, L.; BOUCHIER, C.; WINCKER, P.; THIERRY, A.; DUTHOY, S.; FERRIS, S.; HENNEQUIN, C.; DUJON, B. The complete mitochondrial genome sequence of the pathogenic yeast *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J. FEBS Lett*, n. 534 (1-3), p. 39-48, 2003.
- TALLA, E.; ANTHOUARD, V.; BOUCHIER, C.; FRANGEUL, L.; DUJON, B. The complete mitochondrial genome of the yeast *Kluyveromyces thermotolerans*. *J. FEBS Lett*, n. 579 (1), p. 30-40, 2005.