

SEQUENCIAMENTO COMPLETO E ANÁLISE DO FRAGMENTO GENÔMICO Pb B08 de *Paracoccidioides brasiliensis*.

Aline C.F. Barbosa*; Marina Passeto Nóbrega

Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, São José dos Campos – SP, Brasil *alinefbarbosa@uol.com.br

Resumo: Agente etiológico da paracoccidioidomicose; doença endêmica da América Latina; o *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) é um fungo termo-dimórfico que apresenta sua forma micelial a 25°C e leveduriforme a 37°C. A partir de uma biblioteca genômica, criada em nosso laboratório obteve-se um fragmento clonado em *Yep351* – o clone Pb B08, o qual foi seqüenciado utilizando a técnica de transposon. O sequenciamento total desse clone poderá contribuir para a organização genômica completa do Pb.

Palavras – chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, paracoccidioidomicose, clone Pb B08

Área de conhecimento – Genética

Introdução

Os fungos são organismos eucarióticos os quais se dividem em dois tipos: leveduras e fungos filamentosos. As leveduras crescem como células únicas que se reproduzem por brotamento assexual, já os fungos filamentosos crescem como filamentos longos, chamados de hifas, e formam um emaranhado como uma esteira que são os micélios [1]. Este microorganismo, muitas vezes, possui duas formas diferentes de se apresentar na natureza (levedura e micélio). Os fungos capazes de se transformar de micélio para levedura são chamados dimórficos e essa transição pode ser causada por diferentes fatores ambientais como a modificação do pH, da temperatura, dos níveis de glicose, dentre outros [2].

Primeiramente descrito por Adolfo Lutz em 1908 [3], o *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) é um fungo termo-dimórfico, o qual se apresenta em forma de hifas quando submetido a temperatura de 25°C e sofre transição para sua forma leveduriforme quando exposto a uma temperatura de 37°C [4]. Este fungo é endêmico dos países latino-americanos, os quais fornecem condições favoráveis ao seu desenvolvimento, tais como temperatura em torno de 18 a 24°C, chuvas abundantes, predomínio de florestas e de árvores nativas e ainda invernos curtos e verões ensolarados [5].

A elucidação do genoma do Pb é de grande interesse médico por este ser o agente etiológico de uma micose sistêmica, a paracoccidioidomicose (PCM).

A infecção humana pelo Pb ocorre principalmente pelas vias aéreas superiores através da inalação de propágulos de sua forma micelial. Ao alcançar os alvéolos pulmonares, o fungo sofre transição de micélio para levedura - sua forma patogênica - devido à elevação da temperatura para 37°C, temperatura média do corpo humano [6]. A PCM possui duas diferentes apresentações clínicas. A

PCM juvenil acomete adultos com idade inferior a 30 anos e crianças de ambos os sexos (representa de 3 a 5% dos casos desta doença), afetando principalmente os órgãos do sistema retículo endotelial, como fígado, baço, linfonodos e medula óssea. Já a PCM adulta (forma mais freqüente em que a doença se apresenta) tem uma progressão lenta e atinge preferencialmente homens a cima de 35 anos, causando lesões pulmonares, e eventualmente mucocutâneas, com ou sem disseminação para outros órgãos [7].

Os estudos da biologia molecular e da genética do Pb visam estabelecer parâmetros para a melhor compreensão da virulência e patogênese deste microorganismo. Este trabalho tem por objetivo elucidar e analisar mais uma região genômica do Pb, contribuindo desta forma para sua organização genômica completa.

Materiais e Métodos

A partir de uma biblioteca genômica de Pb, criada em nosso laboratório através de digestão enzimática utilizando a enzima *Sau3A* e inserção dos fragmentos em vetores *Yep351*, selecionamos um clone (Pb B08) para seu sequenciamento completo. Para estimar a quantidade de pares de bases correspondentes ao Pb B08 realizamos dupla digestão enzimática utilizando *XbaI* e *EcoRI* e análise por eletroforese em gel de agarose 1% (Fig.1).

A partir desta análise esperava-se que o clone escolhido fosse formado por aproximadamente 8.808 pb, então optamos por utilizar a técnica de inserção de transposons com gene de resistência a canamicina (“Epicentre Technologies”), facilitadores do sequenciamento genético. Após a reação de inserção dos transposons realizamos transformação da bactéria *E.coli* DH10B competentes para que estas funcionassem como maquinaria de replicação de nosso DNA

recombinante – fragmento PbB08 ligado ao vetor *Yep351*.

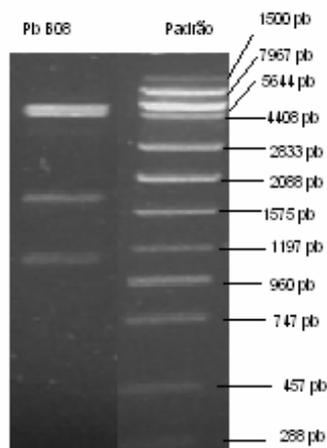


Fig.1 Eletroforese em gel de agarose 1% da digestão enzimática *XbaI* e *EcoRI* do clone Pb B08.

As bactérias foram plaqueadas em meio de cultura contendo 120 μ L de canamicina, como método de seleção dos transformantes, e incubadas a 37°C pela noite. Os transformantes crescidos foram selecionados aleatoriamente e transferidos para novo meio também contendo 120 μ L de canamicina e incubados novamente a 37°C pela noite. Para aquisição de uma quantidade razoável de nosso DNA recombinante durante a extração do mesmo, incubamos os clones em meio líquido – Cicle Grow + canamicina, a 37° em um agitador a 280 rpm, por aproximadamente 18 horas. Aplicamos, então, à estes clones crescidos em Cicle Grow com canamicina a técnica de Boiling para a extração do pDNA (DNA recombinante). O pDNA extraído foi purificado, analisado em gel de agarose 1% por eletroforese e então submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR). Para esta reação utilizamos 2 μ l de água, 2 μ l de iniciadores específicos para transposon (492 F ou 493 R), 2 μ l do mix Amershan (o qual possui dNTPs e ddNTPs) e 7 μ l do pDNA. O termociclador utilizado, PCR PTC-100™ Progamable Thermal Controler, foi programado para os seguintes ciclos: 30 segundos a 96°C, onde ocorre a desnaturação inicial; uma seqüência de mudanças de temperatura que se repete por 40 vezes: 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C para o anelamento do iniciador com a fita molde e 4 minutos a 60°C para alongação da cadeia e por fim diminuição da temperatura para 4°C. As amostras obtidas foram precipitadas com 5 μ L de NG e 50 μ L de etanol 100% por 30 min a -80°C e então lavadas com 80% ETOH-EDTA. Após a lavagem o DNA amplificado foi secado à vácuo e então diluído em

2 μ L de formamida para seqüenciamento. O seqüenciamento foi realizado no seqüenciador ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer, desenvolvido pela Applied Biosystems/HITACHI.

Todas as seqüências obtidas foram analisadas utilizando-se o software phred com o parâmetro de qualidade ≥ 20 e então apenas um “contig” foi gerado. A partir deste “contig” único realizamos análises através do banco de dados NCBI (Nacional Center for Biological Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Resultados e Discussão

As seqüências obtidas foram submetidas a um alinhamento utilizando-se o software phred com parâmetro de qualidade ≥ 20 o que nos resultou em apenas um “contig” que apresentou 6.754 pb ao contrário do estimado através de digestão enzimática realizada com *XbaI* e *EcoRI*, onde a eletroforese em gel de agarose 1% demonstrou que o clone Pb B08 possuiria ~ 8.808 pb.

Utilizando este “contig” único, o qual representa a seqüência completa do clone em questão, realizamos análises utilizando a ferramenta Blastx e ORF finder do banco de dados NCBI (Nacional Center for Biological Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A primeira análise, utilizando Blastx demonstrou três diferentes genes não divididos (Fig.2). Quando submetemos o mesmo “contig” a ferramenta ORF finder encontramos duas ORFs representativas (Fig.3), uma apresentando ~ 308 pb (Fig.4) e outra com ~ 890 pb (fig.5).

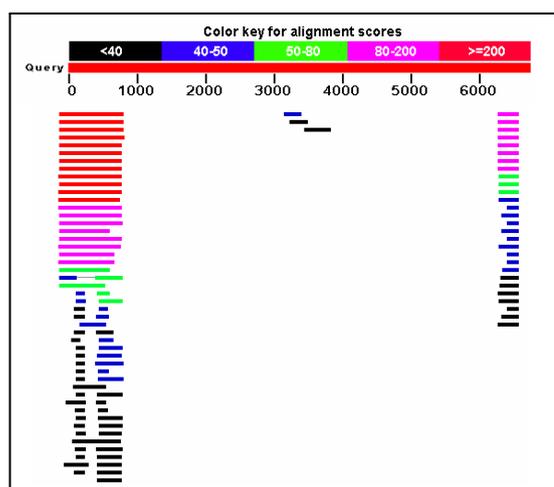


Fig. 2. Representação dos três genes encontrados no clone Pb B08 totalmente seqüenciado obtida através da ferramenta Blastx.

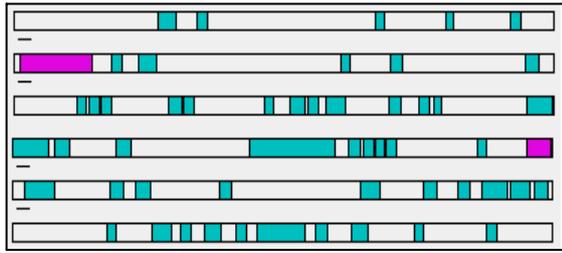


Fig. 3. ORF, obtida através do ORF finder, demonstrando a presença dos dois genes no clone Pb B08.

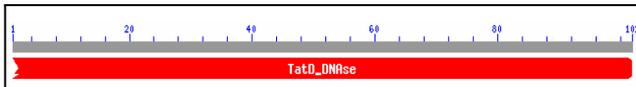


Fig. 4. Representação do gene TatD-related deoxyribonuclease.

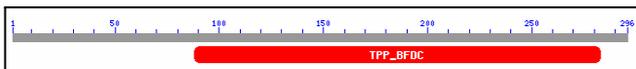


Fig. 5. Representação do gene Thiamine pyrophosphate enzyme

Conclusão

Através das análises realizadas é possível concluir que a região genômica totalmente sequenciada, clone Pb B08, do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* possui ao menos dois genes com similaridade relevante à *Aspergillus fumigatus*, "TatD-related deoxyribonuclease" (Fig.4) e *Synechococcus* sp, "Thiamine Pyrophosphate Enzyme" (Fig.5)

Agradecimentos

Ao Luciano Ângelo Bernardes pelo desenvolvimento da parte de bioinformática ao que se refere neste trabalho. Ao programa de bolsas para alunos de iniciação científica, PIBIC/UNIVAP pela ajuda financeira. À todos do laboratório de Genética Molecular e Genomas que de alguma forma contribuíram para a realização do mesmo.

Referências Bibliográficas

- [1] WARREN, L. & ERNEST, J. – Microbiologia Médica e Imunologia, 4º ed. Editora Artes Médicas Sul LTDA., São Paulo – SP.
- [2] HORNBY, Jacob M.; *et al.* Size Effect in Dimorphic Fungi: Extracellular Control of Yeast-Micelium Dimorphism *Ceratomyces Ulmi*. Applied and Environmental Microbiology, v.70, n.3, p. 1356-1359, março 2004.
- [3] LUTZ, A. Uma micose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das blastomicoses americanas. Brazil Med, v. 22, p. 121-124, 1908.
- [4] LACAZ, C.S., Historical evolution of the knowledge on paracoccidioidomycosis and its ethiologic agent. In Franco, M., Lacaz, C. S., Restrepo-Moreno, A., Del Negro, G. Paracoccidioidomycosis. Eds. CRC Press EUA, p. 1-11, 1994.
- [5] BAGAGLI, E., SANO, A.; COELHO, K. L; *et al.* Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasyurus noveminct*) captured in a endemic área of aracoccidioidomycose. Am.J.Trop-Med. Hug. , v.50, p.505-512, 1998.
- [6] MECEWEN, J.G, BEDOYA, V., PATINO, M.M., SALAZAR, M.E, RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidioidomycose induced by the inalation of conidia. J. Med.Vet. Mycol. 25, p.165-175. 1987.
- [7] MORAIS, F. V. O gene PbGP43 que codifica o antígeno principal do *Paracoccidioides brasiliensis*: polimorfismo e transcrição. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. São Paulo, 2003.