

# ORGANIZAÇÃO DO GENOMA NUCLEAR DE *Paracoccidioides brasiliensis*

**Carla S. Dias\*;** **Simone C. B. Bandeira,** **Luciano Á. S. Bernardes,** **Marina P. Nobrega**

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

**Resumo** – O fungo patogênico *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), causador da micose sistêmica denominada paracoccidioidomicose (PCM), apresenta o fenômeno do termo-dimorfismo, crescendo na forma miceliana a 25°C e na forma de levedura a 37°C. A forma de levedura é a infectante. Recentemente em nosso laboratório foram construídas várias bibliotecas por digestão parcial do DNA nuclear (nDNA) de *P. brasiliensis* inseridos em plasmídeo do tipo YEp 351 originando milhares de clones. Um desses clones, o PbE02, isolado da biblioteca de insertos que variavam de 5 a 10 kb foi totalmente seqüenciado utilizando a técnica de transposon para seqüenciamento. Como resultados temos que este é um clone constituído de um fragmento genômico de 5.661pb. Nesta região encontramos um gene com alta similiaridade com a proteína hipotética encontrada no fungo *Aspergillus nidulans*. Numa outra análise no programa “ORF Finder do NCBI” observamos e confirmamos que estamos com o gene denominado 1 – fosfatidilinositol – 4,5 – bisfosfato fosfodiesterase 1, que é composta de três domínios conservados uma região onde se liga íons de cálcio, um domínio conservado de fosfolipase C e um domínio conservado de quinase C região 2.

**Palavras - chave** - *Paracoccidioides brasiliensis*, clone PbE02, transposon.

**Área de conhecimento** – Biologia Molecular

## Introdução

Os fungos são organismos eucarióticos, heterotróficos, poucos sendo unicelulares (RAVEN, 1996), mas em sua maioria são multicelulares. Estes apresentam quitina na constituição da parede celular (JAWETZ, 2000), contém ergosterol e zimosterol na constituição da membrana e a presença do polissacarídeo de reserva (glicogênio) localizado no vacúolo (SIDRIM, 1999). Os fungos na sua maioria são aeróbios obrigatórios, podendo ser facultativos, mas nunca anaeróbios obrigatórios (JAWETZ, 2000).

A incidência de infecções fúngicas sistêmicas em pacientes saudáveis e imunocomprometidos tem crescido mundialmente nos últimos anos, tornando os fungos patogênicos um importante campo de pesquisa médica (TAVARES, 2005). A maior parte dessas infecções sistêmicas é causada por fungos dimórficos, dentre eles *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* e *Paracoccidioides brasiliensis* (MARESCA, 1989; ROONEY, 2002). O *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), descrito por Adolpho Lutz (LUTZ, 1908), é um fungo termo-dimórfico, que se apresenta sob a forma miceliana à temperatura ambiente (23 a 28°C) e de levedura à temperatura de 35 a 37°C (LACAZ, 1994a) agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM). A doença é restrita a América Central e do Sul, com maior incidência no Brasil, Argentina, Venezuela e Colômbia,

isolada do solo e também de tatus (RESTREPO, 1994). Em humanos, a infecção se inicia por

inalação de propágulos do fungo, os quais aderem no epitélio alveolar pulmonar e se transformam na forma patogênica de levedura (FRANCO,1994). Recentemente vem se aplicando técnicas de biologia molecular para o estudo do *P. brasiliensis*, contribuindo para avanços no diagnóstico, epidemiologia, fatores de virulência, mecanismos de patogenicidade, caracterização de alvos moleculares para a ação de antifúngicos e classificação e relações taxonômicas (CISALPINO, 2000)

O consórcio de *P. brasiliensis* do estado de São Paulo, (UNIFESP, USP/Ribeirão Preto, UMC e UNIVAP) de seqüenciamento já identificou cerca de 4. 690 genes (GOLDMAN et al., 2002). O consórcio de Brasília (Centro Oeste) também identificou milhares de genes (FELIPE et al. 2003) expressos tanto na forma leveduriforme quanto na forma miceliana do *Pb*. Considerando ainda dezenas de genes que foram estudados individualmente. O enfoque principal de todos é encontrar genes que estejam expressando diferencialmente na transição dimórfica (micélios/levedura) deste fungo além de obter informações da organização genômica deste organismo.

## Matérias e métodos

O clone de *Paracoccidioides brasiliensis* utilizado, PbE02, é originário da construção da biblioteca genômica de Pb efetuada neste laboratório. A análise por digestões enzimáticas

dos pDNAs extraídos dos milhares de clones oriundos das bibliotecas o clone PbE02 pertencia ao grupo dos que apresentavam inserto que variavam de 5,0 a 10 kb retido de DNA cromossomal. Para o seqüenciamento desta região retida neste clone decidimos utilizar a técnica de inserção de transposons para o seqüenciamento. Realizamos *in vitro* a inserção de transposons ("Epicentre Technologies") com o gene de resistência à canamicina. Após esta reação, transformamos a bactéria *Escherichia coli* (DH10B) competentes pelo método químico de CaCl<sub>2</sub>, e selecionamos os novos clones (resistentes) que receberam a inserção dos transposons em placas de LA (com adição de ampicilina e canamicina). Os clones assim selecionados são processados para recuperação de seus DNAs plasmidiais (pDNAs). Os pDNAs purificados (pelo método de Boilling) são analisados por eletroforese em gel de agarose 1% , seqüenciados e analisados. Sabemos que o transposon possui 1221 pb e os "primers" (19pb) usados no seqüenciamento, estão localizados nas extremidades do fragmento e voltados para o exterior do transposon. O seqüenciamento é assim processado: Após uma prévia análise dos pDNAs, estes foram submetidos a Reação da cadeia da Polimerase (PCR) de seqüenciamento. O método de seqüenciamento utilizado é o resultado de um aperfeiçoamento do método Sanger. Consiste em submeter às amostras de pDNA a um processo de PCR ("Polymerase Chain Reaction") linear, onde em cada reação, adiciona-se além dos quatro deoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs), os dideoxi-fluorescentes específicos ("Big Dye Terminators"). Após a reação de PCR, precipitação, diluição das amostras em formamida e carregamos o gel de seqüenciamento. No eletroferograma temos a fluorescência verde (a base adenina), vermelha (citosina), azul (guanina) e preta (timina). O seqüenciador utilizado é o ABI 3100 fornecido pela Applied, interfaceado em um Macintosh G3 com o programa ABI Prism™ Collection com capacidade para seqüenciamento de 96 amostras simultaneamente.

## Análise dos Cromatogramas de Seqüenciamento

Os cromatogramas obtidos por seqüenciamento foram analisados através do software Phred com o parâmetro de qualidade  $\geq 20$ . Os arquivos em formato fastas gerados foram validados através de um "script" (programa computacional) que separa as seqüências de melhor qualidade e tamanho número de pares de base (pb). Para o alinhamento foi utilizado o software CAP3. Alternativamente também utilizamos a ferramenta *SeqManII* do programa DNASTAR, Inc.

## Resultados

Após o seqüenciamento e os cromatogramas analisados pelos programas Phred e CAP3, temos os resultados dos alinhamentos das várias seqüências geradas. Assim, verificamos quais as regiões das seqüências se intercalam com formação do que chamamos de "contigs". Esses "contigs" também são alinhados até que haja a formação de um único consenso, que corresponde ao tamanho do inserto retido no clone em estudo. O PbE02, possui um pDNA de 5651pb. Esta seqüência foi analisada pelo programa *Blastx* no site do NCBI (Nacional Center for Biological Information, disponível na página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), o que nos mostrou a presença de um único gene apresentando três diferentes domínios (Figura 1).

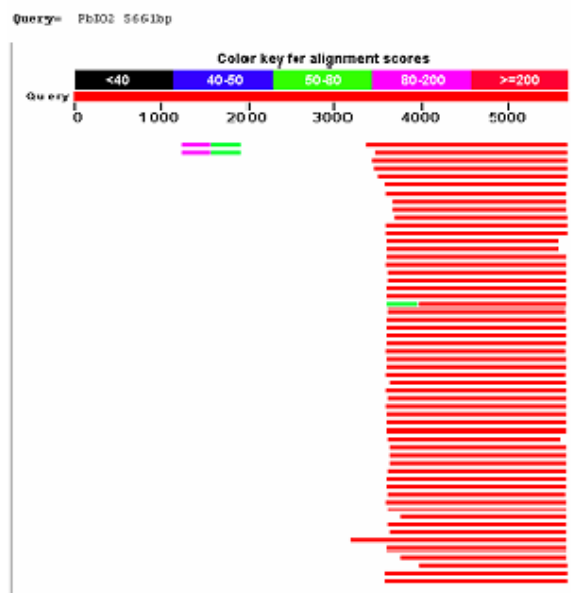


Figura 1: Análise da seqüência do clone PbE02 feita pela ferramenta *Blastx*.

Esse gene é denominado por 1 – fosfatidilinositol – 4,5 – bisfosfato fosfodiesterase 1, apresentando domínio para ligação de cálcio, um domínio de fosfolipase C e um domínio de proteína quinase C região 2, respectivamente (Figura 2).

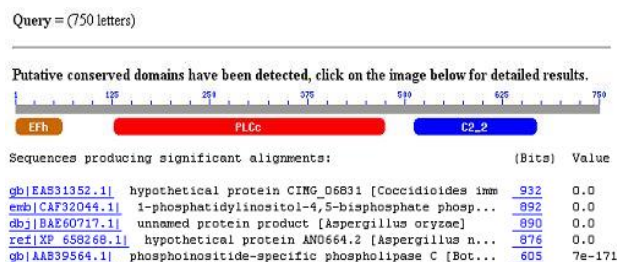


Figura 2: Gene presente e as três regiões de domínios conservados .

Esta seqüência foi submetida a outra análise, consistindo na busca de ORFs (*Open Reading Frames*), utilizando a ferramenta ORF Finder do NCBI, nos mostrando parte de uma ORF com 750 aminoácidos onde se encontram os domínios conservados. Essa ORF se localiza na fase de leitura - 2, na região de 5992pb até 3341pb (Figura 03).

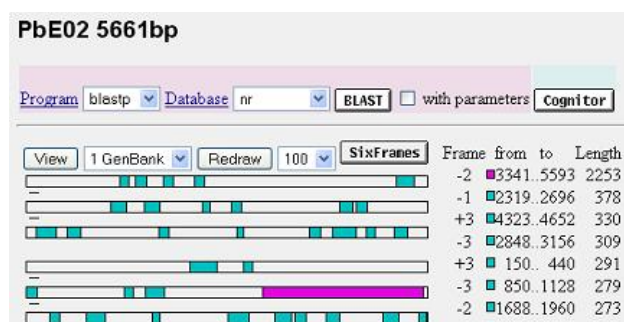


Figura 3: ORF do clone PbE02 sinalizando o gene de 750 aa.

## Discussão

Utilizamos duas ferramentas muito importantes da bioinformática na análise de anotação da região cromossomal retida no clone PbE02 que foram *Blastx* e a "ORF Finder", ambas do NCBI. No clone PbE02, encontramos um gene de *P. brasiliensis* ainda não estudado com três domínios conservados; um de ligação de íons cálcio ( $Ca^{2+}$ ); outro da fosfolipase C e a região 2 de uma quinase C, que codifica para a proteína 1 – fosfatidilinositol – 4,5 – bisfosfato fosfodiesterase 1, com 750 aminoácidos, localizado na extremidade 3' do fragmento de DNA. Observamos que esta apresenta alta similaridade com a proteína hipotética de *Aspergillus nidulans* de 1141 resíduos de aminoácido e que contem os mesmos domínios conservados. Encontramos também alta similaridade deste gene nos fungos de *Coccidioides immitis* esta proteína tem 1151aa, sendo este o que apresentou maior similaridade com o clone em questão, a de *Aspergillus oryzae* com 930aa e a de *Aspergillus fumigatus*, com 1145aa.

## Conclusão

Com estas análises concluímos que nesta região genômica de *P. brasiliensis* está inserido um gene com três domínios possuindo alta similaridade com outros fungos: *Coccidioides immitis* CH476728.1; *Aspergillus fumigatus* Af293; *Aspergillus oryzae* AP007161.1; *Aspergillus nidulans* XM\_653176.1. O gene que codifica esta

proteína em *P. brasiliensis* apresenta-se com a região carboxi-terminal, e não conseguimos detectar a região N-terminal (~300aa) desta proteína. Não apresenta íntrons em quase sua totalidade, se for dividida será próxima da região N-terminal. Uma característica deste organismo observado também nesta análise é uma longa região intergênica.

## Agradecimentos

PIBIC/UNIVAP e FAPESP.

## Referências Bibliográficas

- CISALPINO, P. S.; TRAVASSOS, L.R. Aplicações da Biologia molecular à Micologia Médica. In: Lacaz, C.S. (Ed.) **Micologia Médica**. Ed. Sarvier- EDUSP ("In Press"), 2000.
- FELIPE, M. S. S. et al.. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. **Yeast**, v.20; p.263–271, 2003.
- FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **Journal of medical and veterinary mycology**, v. 25, n. 1, p. 5-18, 1994.
- GOLDMAN, G.H. (...); NOBREGA, M. P.; NOBREGA, F. G.; GOLDMAN M. H. S. EST analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence/pathogenicity genes. **Eukaryotic Cell** 2(1):34-48, 2000.
- JAWETZ, E. *et al.* **Microbiologia médica**. 18. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000, 519p.
- 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, 1994a.
- LUTZ, A. Uma micose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomicoses americanas. **Brazil Med**, v. 22, p. 121-124, 1908.
- MARESCA, Bruno; KOBAYASHI, George S. Dimorphism in *Histoplasma capsulatum*: a model for the study of cell differentiation in pathogenic Fungi. **Microbiological Reviews**, v. 53, n. 2, p. 186-209, Junho 1989.

- RAVEN, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E. **Biologia vegetal**. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, 728p.
- RESTREPO, A. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Paracoccidioidomycosis** (M. Franco, C. S. Lacaz, A. Restrepo, and G. DelNegro, Eds.), p. 121–130. CRC Press, Boca Raton, FL., 1994.
- ROONEY, Peggy J.; KLEIN, Bruce S. Linking fungal morphogenesis with virulence, **Cellular Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 126-137, Março 2002.
- SIDRIM, J.J.C., Moreira, J.L.B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, 287p.
- TAVARES, Aldo Henrique; SILVA, Simoneide Souza; BERNARDES, Vanilce Vilmar; MARANHÃO, Andréa Queiroz; KYAW, Cynthia Maria; POÇAS-FONSECA, Marcio; SILVA-PEREIRA, Ildinete. Virulence insights from the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. **Genetics and Molecular Research**. v. 4, n. 2, p. 372-389, Junho 2005.