

ANÁLISE DO FRAGMENTO GENÔMICO F10 DE *Paracoccidioides brasiliensis*

Carla Sodré Dias*; Marina Pasetto 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 – *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo patogênico, causador da paracoccidioidomicose, que apresenta o fenômeno do termo-dimorfismo, se apresentando na forma micelial a 25°C e na forma leveduriforme a 37°C, sendo esta última a forma infectante. Obteve-se um isolado deste fungo, o clone PbF10, inserido no plasmídeo YEP 351 e submetido à reação de inserção de Transposon, onde através do seqüenciamento será possível o fechamento de tal clone e colaboração na organização genômica completa do fungo. Estes esforços têm sua ênfase centrada na busca de genes potencialmente envolvidos em patogenicidade e virulência.

Palavras – chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, transposon, isolado Pb F10

Área de conhecimento – Genética

Introdução

Os fungos são organismos heterotróficos, eucarióticos, poucos sendo unicelulares [7] e que se distinguem das plantas por apresentarem ausência de quaisquer pigmentos fotossintéticos; ausência de celulose na parede celular (os fungos apresentam quitina) e a presença do polissacarídeo de reserva (glicogênio) localizado no vacúolo [9]. Constituem um reino próprio – o reino *Fungi*. São seres geralmente aeróbicos, necessitando de oxigênio para viver [5].

Um número expressivo de fungos são de interesse médico por causarem doenças. Segundo Mezzari & Cauduro, as micoses são divididas em superficiais (pitíriase versicolor, piedra branca, piedra negra, unha negra), cutâneas (dermatofitias e candidíases), subcutâneas (esporotricose, cormomicose, micetomicoses, rinosporidiose, zigomicoses), sistêmicas ou profundas (paracoccidioidomicose, blastomicose, histoplasmose, coccidioidomicose), sendo que muitas, entre elas a candidíase sistêmica, são oportunistas, ou seja, causadas por fungos que habitualmente vivem na pele ou mucosas internas e que causam doenças quando o hospedeiro humano encontra-se em estado de depauperamento nutricional ou/é imunológico. Os fungos mais associados com as micoses sistêmicas são: *Blastomices dermatitis*, agente da blastomicose; *Histoplasma capsulatum*, agente da histoplasmose; *Coccidioides immitis*, agente da coccidioidomicose e *Paracoccidioides brasiliensis*, causador da paracoccidioidomicose [4]. Esses fungos possuem em comum o fenômeno denominado termo-dimorfismo, que [8], consiste em duas fases morfológicas que são definidas pela temperatura. Nesse projeto nosso objetivo é estudar o *Paracoccidioides brasiliensis* (PB), o agente etiológico da paracoccidioidomicose

(PCM). 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 [1].

Nestes últimos anos estudos globais foram executados, identificando em pouco tempo milhares de genes expressos (ESTs) tanto na forma leveduriforme infectante como na forma miceliana. Um grupo do estado de São Paulo, congregando pesquisadores da UNIFESP (Drs. Rosana Puccia e L.R. Travassos), USP de Ribeirão Preto (Drs. Gustavo H. Goldman e Maria Helena S.Goldman), da Universidade de Mogi das Cruzes (Drs. Regina C. de Oliveira e Luiz Nunes) e o nosso grupo na UNIVAP, identificou cerca de 4.690 genes [3] e o grupo do Brasil central, que reúne laboratórios do Distrito Federal e de Goiás principalmente, sob a coordenação da Dra. Maria Sueli S. Felipe, desenvolve amplo programa de identificação e análise de genes de PB, também com milhares de genes já identificados [2] e dezenas de genes estudados individualmente. Estes esforços têm sua ênfase centrada na busca de genes potencialmente envolvidos em patogenicidade e virulência, tendo por objetivo obter informações sobre a organização genômica de *Paracoccidioides brasiliensis* (PB) via seqüenciamento completo e anotação de clones com insertos grandes e paralelamente ampliando a descoberta de genes neste organismo.

Matérias e métodos

O clone de *Paracoccidioides brasiliensis* utilizado foi o que chamamos de clone Pb-F10 que é originário da construção da biblioteca genômica de Pb efetuada neste laboratório. Na análise por

digestões enzimáticas dupla dos pDNAs extraídos dos diversos clones escolhidos oriundos da biblioteca o F10, pertencia ao grupo dos que apresentavam maior inserto retido de DNA cromossomal. Decidimos utilizar o método de inserção de transposons para o seqüenciamento deste clone. Realizamos in vitro a inserção de transposons ("Epicentre Technologies") com o gene de resistência à kanamicina. Após esta reação, transformamos a bactéria (*E coli* DH10B) competentes, fazemos o selecionamento dos clones com a inserção dos transposons em placas com adição de kanamicina e selecionamos os clones resistentes. Os clones assim selecionados são processados para recuperação de seus DNAs plasmidiais (pDNAs). Os pDNAs purificados são seqüenciados e analisados. Sabemos que o transposon possui 1221 pb e os "primers" (19pb) usados no seqüenciamento, localizam-se nas extremidades do fragmento e estão voltados para o exterior do transposon. Os clones da placa de transformação foram coletados e colocados em LA (meio completo com adição de ampicilina) juntamente com 200 µl de água destilada e deionizada e 120 µl do antibiótico kanamicina, colocados para crescer na estufa à 37°C overnight. Então foi feito um inóculo dos clones em Cicle Grow com kanamicina e incubados no shaker à 37°C, a 220 rpm overnight. O isolamento do DNA (Boilling) foi realizado após o crescimento das células. Com os pDNAs isolados e purificados estes foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%. Após uma prévia análise destes pDNAs, estes foram submetidos ao PCR (Reação da cadeia da Polimerase) de seqüenciamento, utilizando sempre 2 µl de água, 2µl de primer (492 F ou 493 R), 2µl do mix Amershan e 6µl do pDNA. O processo de amplificação é realizado tanto no termociclador PCR System 2400 da Perkin Elmer como no termociclador PCR PTC-100™ Programmable Thermal Controler sendo programado da seguinte maneira: 30 segundos a 96°C para a desnaturação inicial e em seguida inicia-se 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 "primer" com a fita molde e 4 minutos a 60°C para elongação da cadeia. Finalizando-se os quarenta ciclos a amostra é resfriada a 4°C. Após a reação de amplificação faz-se a precipitação do DNA amplificado, adicionando-se 5µl (1mg Glicogênio dissolvidos em 1ml 5M NH₄OAc), 50µl de 100% etanol e deixando-se a -80°C por aproximadamente 30 minutos ou "over-night". Centrifuga-se por 30 minutos, 4000rpm, 4°C e despreza-se o sobrenadante. O DNA amplificado é lavado duas vezes com 110µl de 80% etanol, centrifuga-se 15 minutos, a 4000 rpm cada. Após a lavagem o DNA

e secado a vácuo e redissolvido em 2µl de Formamida para o seqüenciamento.

Seqüenciamento

O seqüenciador utilizado é o ABI-377 fornecido pela Perkin-Elmer, interfaceado em um Macintosh G3 com o programa ABI Prism™ Collection 377 com capacidade para seqüenciamento de 96 amostras simultaneamente.

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 e diluição em formamida carrega-se as amostras no gel de seqüenciamento. No eletroferograma tem a fluorescência verde como indicativa da base nitrogenada Adenina, a vermelha para a Citosina, azul para Guanina e preta para a Timina.

Análise dos Cromatogramas de Seqüenciamento

Os cromatogramas obtidos por seqüenciamento foram analisados através do software phred com o parâmetro de qualidade >=20. Os arquivos fastas gerados foram validados através de um "script" (programa computacional) que separa as seqüências fastas de melhor qualidade e tamanho de pares de base (pb). Para alinhar os FASTA utilizou-se o software CAP3. Alternativamente também utilizamos a ferramenta SeqManII do programa DNASTAR, Inc.

Resultados

Após o seqüenciamento, os cromatogramas foram analisados por um programa computacional, onde alinhamos as várias seqüências geradas de melhor qualidade no formato Fasta. Por alinhamento analisamos as regiões que superpõem umas as outras e formamos os diferentes *contigs*. Estes *contigs* também são realinhados, até que se forme um único *contig* que corresponde ao tamanho do inserto de DNA do recombinante (pDNA do clone) em estudo. Definimos assim que este clone Pb F10 tem um pDNA de 7061 bp. A seqüência completa do DNA foi analisada pelo programa *Blastx* no site do NCBI (Nacional Center for Biological Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e observamos a presença de dois genes não divididos nesta região. Uma hipotética proteína da família das peptidases e uma exoribonuclease [Fig 1]. Submetemos esta seqüência a uma outra

análise, a de busca de ORFs utilizando a ferramenta ORFFinder do NCBI. Identificamos uma ORF de 673aa apresentando um “domain” conservado com peptídeo de sinalização de peptidases, ou seja, da mesma família das peptidases encontrada na primeira análise. Observamos também outra ORF de 438aa correspondente a proteína da família da exoribonuclease [Fig 2].

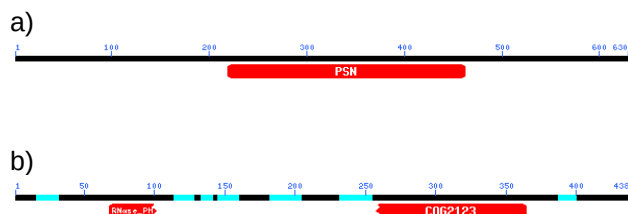


Fig 1: Genes presentes não divididos na sequência completa: a) Hipotética proteína da família das peptidases; b) Exoribonuclease.

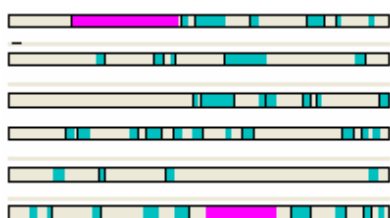


Figura 2: ORF do clone Pb F10 mostrando a existência dos genes

Discussão

O fragmento genômico de *P. brasiliensis* F10 possui dois genes inseridos em sua região genômica. Ao utilizar o programa BLAST/blastx do NCBI identificou a presença destes e para verificar a obtenção destes resultados utilizou – se o programa ORFFinder onde a ORF da proteína hipotética da família das peptidases se encontra localizada na região de 1174 a 3195 bp e a ORF da exoribonuclease se localiza na região de 3679 a 4995 bp.

Conclusão

Com estas análises estamos concluindo que nesta região genômica de *Paracoccidioides brasiliensis* estão inseridos pelo menos dois genes com alta similaridade aos encontrados em outros fungos como *Aspergillus nidulans*, proteína hipotética AN8681.2; *Neurospora crassa* XP 324748; *Gibberella zeae*. FG08778.1; *Magnaporthe* gr. MG02998.4. Genes estes que não são divididos e uma região intergênica de grande interesse para complementação de nossos estudos.

Referências

- [1] CISALPINO, P.S. & TRAVASSOS, L.R. (2000) Aplicações da Biologia molecular à Micologia Médica. In: Lacaz, C.S. (Ed.) Micologia Médica. Ed. Sarvier- EDUSP (“In Press”).
- [2] FELIPE, M. S. S; ANDRADE, R. V; PETROFEZA, S. S; MARANHÃO, A. Q; TORRES, F. A. G; ALBUQUERQUE, P; ARRAES, F. B. M; ARRUDA, M; AZEVEDO, M. O; BAPTISTA, A. J; BATAUS, L. A. M; BORGES, C. L; CAMPOS, E. G; CRUZ, M. R; DAHER, B. S; DANTAS, A; FERREIRA, M. A. S. V; GHIL G. V; JESUINO, R. S. A; KYAW, C. M; LEITÃO, L; MARTINS, C. R; L. MORAES, M. P; NEVES, E. O; NICOLA, A. M; ALVES, E. S; PARENTE, J. A; PEREIRA, M; POÇAS-FONSECA, M. J; RESENDE, R; RIBEIRO, B. M; SALDANHA, R. R; SANTOS, S. C; SILVA-PEREIRA, I; SILVA, M. A. S; SILVEIRA, E; SIMÕES, I. C; SOARES, R. B. A; SOUZA, D. P; DE-SOUZA, M. T; ANDRADE, E. V; XAVIER, M. A. S; VEIGA, H. P; VENANCIO, E. J; CARVALHO, M. J. A; OLIVEIRA, A. G; INOUE, M. K; ALMEIDA, N. F; WALTER, M. E. M. T; SOARES, C. M. A; BRÝGIDO, M. M.. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast*, v.20; p.263–271, 2003
- [3] GOLDMAN, G.H., Everaldo dos Reis Marques, Diógenes Custódio Duarte Ribeiro, Luciano Ângelo de Souza Bernardes, Andréa Carla Quiapin, Patrícia Marostica Vitorelli, Marcela Savoldi Barbosa, Camile Pizeta Semighini, Regina C. de Oliveira, Luiz R. Nunes, Luiz R. Travassos, Rosana Puccia, Wagner L. Batista, Leslie Ecker Ferreira, Júlio C. Moreira, Ana Paula Bogossian, Fredj Tekaia, Marina Pasetto Nobrega, Francisco G. Nobrega and Maria Helena S. Goldman (2002) 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
- [4] KERN, M.E., BLEVINS, K.S. (1997) Medical Mycology: a self instructional text. 2 ed. Philadelphia: F.A. Davis Company, 242p
- [5] LACAZ, C.S., Porto, E., Martins, J.E.C. (1991) Micologia Médica: Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. 8ed. São Paulo, Sarvier, 695p.
- [6] MEZZARI, A., CAUDURO, P. (1996) Micologia no Laboratório. Porto Alegre: Sagra/DC Luzzato, 123p.

[7] RAVEN, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E. (1996) *Biologia vegetal*. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 728p.

[8] SANS BLAS, G., Padrón, R., Murgich, J. (2002) The dimorphic transition in *Paracoccidioides brasiliensis*, a mathematical and physicochemical challenge. In: Annual Review of Biomedical Sciences, Special Issue: VIII International meeting on paracoccidioidimycosis, Botucatu: Fundação Editora da Unesp. p.13.

[9] SIDRIM, J.J.C., Moreira, J.L.B. (1999) *Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 287p.