

CARACTERIZAÇÃO DE TRANSCRITOS DE *Paracoccidioides brasiliensis* ISOLADO DE ANIMAIS INFECTADOS

MEIRELLES, Gabriela Vaz¹; SOARES, Célia Maria de Almeida²

Palavras-chave: transcritos, infecção, patogênese, *P. brasiliensis*.

1. INTRODUÇÃO (justificativa e objetivos)

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da Paracoccidioidomicose (PCM), a micose sistêmica de maior prevalência no Brasil. *P. brasiliensis* transita entre as formas miceliana, a qual presume-se ocorra na natureza, e leveduriforme, que ocorre nos tecidos infectados. A transição entre as morfologias micélio e levedura é parte do ciclo biológico do fungo e se constituiu em etapa essencial para o estabelecimento da infecção (Franco, 1987). Uma estratégia para a identificação de genes potencialmente associados à resposta do fungo ao hospedeiro, tais como genes de virulência, por exemplo, é a sua análise durante a infecção. Em especial os genes que não são expressos *in vitro* mas, especificamente ativados *in vivo*, são possivelmente importantes para a patogênese. Muitos dos trabalhos com *P. brasiliensis* têm focalizado a identificação e caracterização de genes e moléculas expressas durante o cultivo do fungo *in vitro*. Relativamente, existem poucos estudos acerca do conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos durante a interação parasita-hospedeiro e a patogênese. A virulência de isolados pode ser atenuada ou perdida após subseqüentes ciclos de subcultivos durante longos períodos (Brummer et al, 1990) ou restabelecida após inoculações em modelos experimentais. Em função dessas considerações, é evidente a necessidade de estratégias que utilizem sistemas para identificação de genes que são especificamente induzidos durante a infecção, em comparação ao crescimento *in vitro*, em meio de laboratório.

2. METODOLOGIA

2.1 – Extração do RNA total, purificação do mRNA e construção da biblioteca de cDNA de *P. brasiliensis*.

Foram obtidos RNAs totais de fungos, forma leveduriforme, cultivados *in vitro*, por 7 dias, após isolamento de fígado dos animais. A extração do RNA foi feita utilizando-se Trizol (Gibco BRL). O RNA poliadenilado foi isolado por cromatografia em colunas, utilizando-se o kit Oligotex[®] mRNA Kit (Qiagen, Germany). A biblioteca de cDNA foi construída utilizando-se o kit Superscript Plasmid System (Invitrogen, Corporation). Os cDNAs foram ligados ao plasmídeo pCMV-SPORT6 e, a seguir, utilizados para a transformação de *Escherichia coli* DH10B.

2.2 – Plaqueamento, crescimento celular e extração de DNA plasmidial dos clones

recombinantes de *P. brasiliensis*.

Utilizou-se 1 µl da biblioteca amplificada de cDNA (3×10^{11} ufc/mL), para cada placa, diluído a uma razão de 1/1000000. Foram plaqueados 100 µL (50 µL de meio LB 2X + 50 µL da biblioteca), obtendo-se, aproximadamente, 950 colônias por placa. Às microplacas tipo Deep Well, de 96 poços, foram adicionados 1 mL de meio Circle Grow® (Q-BIO gene) contendo 100 µg/mL de ampicilina. As colônias foram inoculadas individualmente. As placas foram incubadas a 37°C, 320 rpm, durante 22 h. Em seguida, os DNAs plasmidiais foram extraídos, em sistemas de placas, por lise alcalina.

2.3 – Quantificação de amostras de DNA.

A concentração das amostras de DNA foi estimada em gel de agarose 0,8% com brometo de etídeo a 5 µg/mL, através de comparação visual com amostras de concentração previamente conhecida.

2.4 – Sequenciamento dos clones recombinantes provenientes da biblioteca de cDNA de *P. brasiliensis*.

Os DNAs anteriormente visualizados em gel de agarose foram seqüenciados no aparelho MEGABACE™ 1000 Automatic Sequencer (Amersham Biosciences®), utilizando-se o sistema de reação de seqüenciamento: “DYEnamic ET, Dye Terminator Cycle Sequencing” (Amersham Biosciences®). As reações foram amplificadas, via PCR, por 35 ciclos. Por último, as amostras contendo o DNA amplificado foram precipitadas com 0,75M de acetato de amônio, etanol 100%, lavadas com etanol 70% e ressuspendidas em 10 µL de tampão contendo formamida.

2.5 – Bioinformática.

As seqüências de cDNAs com índice PHRED (Ewing et al, 1998a,b) igual ou maior que 20 para 100 nucleotídeos foram editadas para a remoção de nucleotídeos do vetor, utilizando-se Cross Match (Green, 1996). As ESTs foram agrupadas utilizando-se o programa CAP3 (Huang & Madan, 1999). As seqüências editadas foram comparadas com seqüências depositadas em bancos de dados – Projeto Genoma Centro-Oeste (www.biomol.unb.br/Pb) e GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) – para análises de similaridade. As seqüências não redundantes, com valores de similaridade de $E < 10^{-5}$, foram consideradas significativas e os genes com maior número de identidades entre os nucleotídeos estão sendo utilizados para agrupar os transcritos com função similar.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Extração de DNA plasmidial.

O DNA plasmidial foi extraído em sistema de placas, segundo metodologia padrão. Estimou-se que as concentrações de todos os DNAs analisados variaram de 150 a 300 ng/µL de amostra em todas as 5 placas.

3.2 – Sequenciamento e análise dos cDNAs.

As seqüências geradas foram submetidas aos programas computacionais PHRED, Cross Match e CAP3, conforme descrito acima, e os clusters resultantes dessas análises foram nomeados de acordo com a placa de origem (PBC-001, por exemplo) e foram comparados com o banco de dados do Projeto Genoma Centro-Oeste e GenBank, através do BLASTX. A tabela abaixo apresenta uma amostra dos resultados obtidos.

Tabela 01 – Resultado do BLASTX da placa PBC-001 contra o GenBank (NCBI).

Poço da Placa	Similaridade com	e-value
A08	hypothetical protein MG03283.4	3e-22
B01	No hits found	
C07	probable adenylate kinase [MIPS]	3e-23
E03	malate dehydrogenase [Paracoccidioides brasiliensis]	2e-18
H07	No hits found	

4. CONCLUSÃO

Os transcritos de *Paracoccidioides brasiliensis* obtidos durante o processo infeccioso estão sendo caracterizados (identificados e classificados quanto à possível função), bem como identificados, por análises comparativas, quanto às diferenças de expressão, entre as leveduras obtidas de fígado de camundongo e as células mantidas *in vitro*. Análises comparativas e a categorização funcional desses transcritos contribuirão para o conhecimento de novos genes expressos, potencialmente envolvidos no processo infeccioso, bem como para o entendimento da patogenicidade desse fungo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215 (3), 403-410.
- Brummer, E.; Restrepo, A.; Hanson, L. H.; Stevens, D. A. 1990. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*: The influence of *in vitro* passage and storage. Mycopathologia 109, 13-18.
- Ewing, B.; Hillier, L.; Wendl, M. C.; Green, P. 1998a. Base-calling of automated Sequencer Traces Using Phred I. Accuracy Assessment. Genome Res. 8, 175-185.
- Ewing, B.; Green, P. 1998b. Base-calling of automated sequencer traces using Phred II. Error probabilities. Genome Res. 8, 186-194.
- Franco, M. 1987. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. J. Med. Vet. Mycol. 25, 5-18.
- Green, P. 1996. PHRAP documentation: University of Washington, Seattle, USA. <http://www.bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html/>.
- Huang, X. & Madan, A. 1999. CAP3: a DNA sequence assembly program. Genome Res. 9, 868-877.

FONTE DE FINANCIAMENTO – CNPq / MCT; Capes.

¹ Bolsista de iniciação científica. Instituto de Ciências Biológicas - ICB - Laboratório de Biologia Molecular, gabrielavm@gmail.com

² Orientadora/ Instituto de Ciências Biológicas/ UFG, celia@icb.ufg.br