

COSTA, Milce<sup>1</sup>, MARTINS, Wellington Santos<sup>3</sup>, MEIRELLES, Gabriela Vaz<sup>1</sup>, MENDONÇA, Yuri Abreu<sup>1</sup>, MOREIRA, Sabrina Fonseca Ingenito<sup>1</sup>, PARENTE, Juliana Alves<sup>1</sup>, BAILÃO, Alexandre Melo<sup>1</sup>, BORGES, Clayton Luiz<sup>1</sup>, FIÚZA, Rogério Bento<sup>3</sup>, FÁRIA Fabrícia Paula<sup>1</sup>, FELIPE, Maria Sueli Soares<sup>4</sup>, MOLLINARI-MADLUN, Eugênia Emília Walquíria Inês<sup>2</sup>, PEREIRA, Maristela<sup>1</sup> AND SOARES, Célia Maria Almeida. Análise do transcrito de *paracoccidioides brasiliensis* durante o processo infeccioso In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG - CONPEEX, 2., 2005, Goiânia. Anais eletrônicos do XIII Seminário de Iniciação Científica [CD-ROM], Goiânia: UFG, 2005. n.p.

## **ANÁLISE DO TRANSCRITO DE *Paracoccidioides brasiliensis* DURANTE O PROCESSO INFECCIOSO**

**COSTA, Milce<sup>1</sup>, MARTINS, Wellington Santos<sup>3</sup>, MEIRELLES, Gabriela Vaz<sup>1</sup>, MENDONÇA, Yuri Abreu<sup>1</sup>, MOREIRA, Sabrina Fonseca Ingenito<sup>1</sup>, PARENTE, Juliana Alves<sup>1</sup>, BAILÃO, Alexandre Melo<sup>1</sup>, BORGES, Clayton Luiz<sup>1</sup>, FIÚZA, Rogério Bento<sup>3</sup>, FÁRIA Fabrícia Paula<sup>1</sup>, FELIPE, Maria Sueli Soares<sup>4</sup>, MOLLINARI-MADLUN, Eugênia Emília Walquíria Inês<sup>2</sup>, PEREIRA, Maristela<sup>1</sup> e SOARES, Célia Maria Almeida<sup>1</sup>**

Palavras-chave: Transcritoma, *Paracoccidioides brasiliensis*, Infecção

### **1. INTRODUÇÃO** (justificativa e objetivos)

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da Paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica restrita a países da América Latina com aproximadamente 80% dos casos relatados no Brasil. (Franco, 1987; Restrepo *et al*, 2001). Como um fungo termodimórfico, transita entre as formas miceliana, saprófita, a qual presume-se ocorra na natureza em temperaturas inferiores a 28°C, e leveduriforme, que ocorre nos tecidos infectados à temperatura de 35°C a 37°C (San-Blas, 1993). 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 e para a fase inicial da interação do fungo com o hospedeiro (Franco, 1987). O esforço para o sequenciamento de ESTS de forma leveduriforme, oriundas de granulomas de animais experimentais, permitirá comparação com o banco de ESTs oriundas de células leveduriformes (Projeto Genoma Centro Oeste; Felipe *et al*, 2003). Esses estudos comparativos deverão prover informações relevantes para a patogênese, virulência e mecanismos envolvidos durante a interação patógeno hospedeiro. Este estudo tem o objetivo de analisar os genes expressos por *P. brasiliensis* durante o processo de infecção no modelo experimental, camundongos B10.A, como já padronizado em nosso laboratório.

### **2. METODOLOGIA**

#### **2.1 – Infecção dos camundongos**

Camundongos da linhagem B10A com 8 a 12 semanas foram infectados intraperitonealmente com  $1.0 \times 10^6$  cell/mL de Pb01 (ATCC MYA-826) e tiveram o

fígado extraído 90 dias após a inoculação. O fígado infectado foi cultivado então por 7 dias.

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

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<sup>®</sup> 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.

### 2.3 – Extração de DNA plasmidial.

Antes do sequenciamento o DNA plasmidial foi extraído por lise alcalina (Mini – prep).

### 2.5 – Sequenciamento dos clones provenientes da biblioteca de cDNA de *P. brasiliensis*.

Os DNAs visualizados em gel de agarose foram seqüenciados no seqüenciador automático MEGABACE<sup>™</sup> 1000 Automatic Sequencer (Amersham Biosciences<sup>®</sup>), utilizando-se o sistema de reação de seqüenciamento: “DYEnamic ET, Dye Terminator Cycle Sequencing” (Amersham Biosciences<sup>®</sup>).

### 2.6 – Bioinformática.

As seqüências de cDNAs com índice PHRED (Ewing et al, 1998) 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, inicialmente, comparadas com seqüências depositadas em bancos de dados para análises de similaridade. Foram utilizadas, inicialmente, as bases de dados do Projeto Genoma Centro-Oeste ([www.biomol.unb.br/Pb](http://www.biomol.unb.br/Pb)) e GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). As seqüências resultantes dessas análises serão anotadas por meio de um pipeline, o qual inclui um processamento automático que utiliza o algoritmo BLASTX (Altschul et al, 1990) e o programa InterPro Scan. As seqüências não redundantes, com valores de similaridade de  $E < 10^{-5}$  serão consideradas significativas e os genes com maior número de identidades entre os nucleotídeos serão utilizados para agrupar os transcritos com função similar.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Neste estudo descrevemos os resultados da análise parcial do transcrito de *P. brasiliensis*, compreendendo um total de 5.243 seqüências, com 1.672 clusters, sendo 1.029 contigs e 643 singlets. Em análises preliminares foram identificadas seqüências que codificam HSPs, aspartyl proteinase, serine proteinase, malate dehydrogenase, formamidase entre outras. Os contigs e singlets resultantes serão anotados usando um pipeline que inclui processamento automático através de Blast e InterPro Scan. A anotação será feita usando um sistema que essencialmente compara estes clusters com

seqüências disponíveis em bancos de dados.

#### 4. CONCLUSÃO

A análise e a categorização funcional dos transcritos de *P. brasiliensis* durante o processo infectivo deverão contribuir para o conhecimento de genes potencialmente expressos envolvidos no processo infectivo bem como para o entendimento da patogenicidade deste 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.

Ewing B., Hillier L., Wendl M.C., Green P. 1998a. Base-calling of automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assesment. Genome Res. 8, 175-185.

Felipe, M. S. S. et al, 2003. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. Yeast 20: 1-9.

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.

McEwen J. G., Garcia A. M., Ortiz B. L., Botero S., Restepo A. 1995. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. Arch Med Res 26:305-306.

Restrepo, A, McEwen, J. G. & Castaneda, E. (2001). The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? Med. Mycol.39, 233-241.

San-Blas, G. 1993. Paracoccidioidomycosis and etiological agent *Paracoccidioides brasiliensis*. J. Med. Vet. Mycol. Rev 31;99-113.

**FONTE DE FINANCIAMENTO** – CNPq / MCT; Capes.

---

1 Laboratório de Biologia Molecular ICB II, Universidade Federal de Goiás – Goiânia – GO – Brasil.

2 Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás – Goiânia – GO – Brasil.

3 Laboratório de Bioinformática, Universidade Católica de Goiás – Goiânia – GO – Brasil.

4 Laboratório de Biologia Molecular Universidade de Brasília – Brasília – DF – Brasil.