

MENDONÇA, Y. A.; COSTA, M.; MARTINS, W. S.; MEIRELLES, G. V.; BAILÃO, A. M.; BORGES, C. L.; FIÚZA, R. B.; MADLUN, E. E. W. I. M.; PEREIRA, M.; SOARES, C. M. A. Obtenção e caracterização de seqüências de cDNAs oriundas de *Paracoccidioides brasiliensis* isolado de animais infectados. In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG - CONPEEX, 3., 2006, Goiânia. *Anais eletrônicos do XIV Seminário de Iniciação Científica* [CD-ROM], Goiânia: UFG, 2006. n.p.

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE cDNAs ORIUNDAS DE *Paracoccidioides brasiliensis* ISOLADO DE ANIMAIS INFECTADOS.

MENDONÇA, Yuri Abreu¹, COSTA, Milce², MARTINS, Wellington Santos³, MEIRELLES, Gabriela Vaz², BAILÃO, Alexandre Melo², BORGES, Clayton Luiz², FIÚZA, Rogério Bento³, MADLUN, Eugênia Emília Walquíria Inês Mollinari⁴, PEREIRA, Maristela² e SOARES, Célia Maria Almeida⁵

Palavras-chave: ESTs, infecção, *Paracoccidioides brasiliensis*.

1. INTRODUÇÃO (justificativa e objetivos)

O fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), uma micose que afeta principalmente a população rural da América Latina, sendo no Brasil registrados 85% dos casos. O conhecimento das interações complexas entre um organismo patogênico e seu hospedeiro deve incluir a identificação de padrões de expressão gênica durante a infecção. O advento de métodos de alta velocidade para análise de expressão de genes, tais como o seqüenciamento automático de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) permite a rápida descoberta de novos genes, o exame dos padrões de expressão gênica e a identificação de genes diferencialmente expressos. A obtenção de seqüências de ESTs e a comparação com seqüências de cDNA disponíveis em bancos de dados, permitem a análise da expressão de genes em células em diferentes condições de crescimento e desenvolvimento (Hoekstra *et al*, 2000). O esforço para o seqüenciamento de ESTs de *P. brasiliensis*, forma leveduriforme, oriundas de granulomas de animais experimentais, permitirá a comparação com o banco de ESTs oriundas de células leveduriformes. Esses estudos comparativos deverão prover informações relevantes para a patogênese, virulência e mecanismos envolvidos durante a interação patógeno hospedeiro. 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 - Seqüenciamento dos cDNAs:

Os cDNAs foram quantificados em géis de agarose. Os insertos dos plasmídeos foram seqüenciados utilizando-se o sistema de reação de seqüenciamento "DYEnamic ET, Dye Terminator Cycle Sequencing" (Amersham Biosciences®) e o seqüenciador automático MegaBACE 1000 Automatic Sequencer (Amersham Biosciences, USA).

2.2- Edição das ESTs e Anotação:

Nesta etapa, as seqüências foram submetidas a programas computacionais, com o

intuito de selecioná-las e editá-las para sua posterior anotação. As ESTs foram então depositadas em um banco de dados oriundo do programa PHOREST (Ahren *et al.*, 2004), juntamente com os bancos de levedura e micélio obtidos através do Projeto Genoma Centro-Oeste (www.biomol.unb.br/Pb), onde também foram agrupadas e anotadas. O processo de anotação consistiu na identificação das sequências de *P. brasiliensis* obtidas durante o processo infeccioso, através de comparação dos clusters com outras sequências similares já depositadas nos bancos de dados nr (GenBank), GO e Kegg.

2.5 - RT-PCR semi-quantitativo do gene patatin-like serina hidrolase:

Os cDNAs de levedura e infecção foram sintetizados por transcrição reversa utilizando o Superscript II RNase H –reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies). Estes foram usados em reações de PCR de 25µ de volume final, numa mistura contendo primers específicos, sense e antisense, respectivamente. Os Amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1,5%).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Seqüenciamento e Análise dos cDNAs:

O seqüenciamento dos cDNAs resultaram, após o agrupamento através do programa CAP, formando clusters (singletons e contigs), em 3760 contigs e 4315 singletons, totalizando 24946. O Projeto de infecção do fungo *P. brasiliensis* abrangeu 5242 ESTs.

3.2 – Análise por RT-PCR semi-quantitativo (sqRT-PCR) do gene patatin-like serine hidrolase:

A seqüência encontrada no projeto, a qual é um contig constituído por duas ESTs, apresentou similaridade com uma patatin-like serine hydrolase de *Aspergillus fumigatus*, com um E-value de 1e-35. O contig foi comparado com as seqüências depositadas no GenBank, utilizando-se a ferramenta BLASTX (Altschul *et al.*, 1990). Apesar de ter sido descrita em *A. fumigatus*, o gene ainda não foi caracterizado em fungos.

Patatinas são um grupo de glicoproteínas de armazenamento de plantas, que apresentam uma atividade acil hidrolase em lipídio. A atividade lipídica de patatinas associadas está relacionada com a defesa contra fitoparasitas. Estudos com *Arabidopsis thaliana* mostraram que a superexpressão de uma patatin-like lipídio acil hidrolase, a PLP2 (patatin-like protein 2), diminui a resistência da planta à invasão de fungos e bactérias patogênicas (Camera *et al.*, 2005). Genes que codificam para PLPs (patatin-like proteins) foram detectados em 55 dos vários genomas completos de bactérias, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como *Bacillus sp.*, *Brucella sp.*, *Rickettsia sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia pestis* e muitas outras (Banerji & Flieger, 2004). A infecção pulmonar aguda causada pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* depende primariamente de uma toxina denominada ExoU, que apresenta um domínio patatin-like fosfolipase em sua seqüência de aminoácidos. Estudos mostraram que a perda da atividade catalítica deste sítio da ExoU em *P. aeruginosa*, devido a uma mutação, causou perda da citotoxicidade, fazendo com que a bactéria não causasse a forma aguda da pneumonia e, conseqüentemente, não causando morte dos camundongos Balb/c infectados (Pankhaniya *et al.*, 2004).

4. CONCLUSÃO

Todas as seqüências obtidas através do sequenciamento de cDNAs oriundas deste trabalho foram identificadas e depositadas num banco de dados. As análises de comparativas possibilitaram a identificação do gene *patatin-like serina hidrolase* no fungo *P. brasiliensis*, podendo estar diretamente relacionado com a patogenicidade do fungo. Estudos sobre a expressão gênica dos transcritos a partir do RT-PCR semi-quantitativo mostraram uma maior expressão do gene *patatin-like serina hidrolase* no processo infectivo, devido a sua possível função patogênica.

O transcriptoma do *P. brasiliensis* durante o processo infectivo facilitará o estudo posterior das proteínas mais expressas durante a infecção, proporcionando melhores chances para a construção de um antígeno, soro, ou vacina mais eficazes, além de avançar bastante o nosso entendimento sobre a biologia molecular do fungo durante a infecção.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahren, D.; Troein, C.; Johansson; T. & Tunlid, A. 2004. PHOREST: a web-based tool for comparative analyses of EST data. *Molecular Ecology Notes*. 4: 311-314.
- 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.
- Banerji, S.; Flieger, A. 2004. Patatin-like proteins: a new family of lipolytic enzymes present in bacteria? *Microbiology* 150:522–525.
- Camera, S. L.; Geoffroy, P.; Samaha, Hala.; Ndiaye, A.; Rahim, G.; Legrand, M.; Heitz, T. 2005. A pathogen-inducible patatin-like lipid acyl hydrolase facilitates fungal and bacterial host colonization in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 44: 810.
- 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.
- Ewing B & Green P.1998b. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* 8, 186-194.
- Hoekstra R., Visser, A., Otsen, M., Tibben J., Lenstra J.A., Roos M.H. 2000. EST sequencing of the parasitic nematode *Haemonchus contortus* suggests a shift in gene expression during transition to the parasitic stages. *Mol. Biochem. Parasitol.* 110, 53-68.
- Pankhaniya, R. R.; Tamura, M.; Allmond, L. R.; Moriyama, K.; Ajayi, T.; Wiener-Kronish, J. P.; Sawa, T. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* causes acute lung injury via the catalytic activity of the patatin-like phospholipase domain of ExoU. *Critical Care Medicine.* 32(11):2293-22.

FONTE DE FINANCIAMENTO – CNPq / MCT; Capes.

¹ Bolsista de iniciação científica. Instituto de Ciências Biológicas - ICB - Laboratório de Biologia Molecular, barone009@yahoo.com.br

² Laboratório de Biologia Molecular ICB II, UFG – Goiânia – GO – Brasil.

³ Laboratório de Bioinformática, UCG – Goiânia – GO – Brasil.

⁴ Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, UFG – Goiânia – GO – Brasil

⁵ Orientadora/ Instituto de Ciências Biológicas/ UFG, celia@icb.ufg.br