

MEIRELLES, G. V.; COSTA, Milce; MARTINS, Wellington Santos; MENDONÇA, Yuri de Abreu; BAILÃO, Alexandre Melo; BORGES, Clayton Luiz; FIÚZA, Rogério Bento; MOLLINARI-MADLUN, Eugênia Emília Walquíria Inês; PEREIRA, Maristela; SOARES, C. M. A. Identificação e caracterização transcricional do fungo patogênico humano *Paracoccidioides brasiliensis* em camundongos 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.

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO TRANSCRICIONAL DO FUNGO PATOGÊNICO HUMANO *Paracoccidioides brasiliensis* EM CAMUNDONGOS INFECTADOS

MEIRELLES, Gabriela Vaz¹; **COSTA**, Milce²; **MARTINS**, Wellington Santos³;
MENDONÇA, Yuri de Abreu²; **BAILÃO**, Alexandre Melo²; **BORGES**, Clayton Luiz²;
FIÚZA, Rogério Bento³; **MOLLINARI-MADLUN**, Eugênia Emília Walquíria Inês⁴;
PEREIRA, Maristela²; **SOARES**, Célia Maria de Almeida⁵

Palavras-chave: transcritos, infecção, patogênese.

1. INTRODUÇÃO (justificativa e objetivos)

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da Paracoccidioidomicose (PCM), uma importante micose sistêmica e endêmica da América Latina. *P. brasiliensis* transita entre as formas miceliana, a qual presume-se que 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 constitui 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. Muitos dos trabalhos com *P. brasiliensis* têm focalizado a identificação e caracterização de genes e moléculas expressas durante o cultivo do fungo *in vitro*, havendo, relativamente, 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 animais, mostrando-se evidente a necessidade de estratégias que utilizem sistemas eficientes para identificação de genes que são especificamente induzidos durante a infecção, comparado ao crescimento *in vitro*.

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 *P. brasiliensis*, forma leveduriforme, cultivados *in vitro*, por 14 dias, após reisolamento do fígado de camundongos B10.A. 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 vetor pCMV-SPORT6 e, a seguir, utilizados para a transformação de *Escherichia coli* DH10B.

2.2 – Crescimento celular e extração do DNA plasmidial.

As colônias obtidas através de plaqueamento da biblioteca amplificada de cDNA (3 x 10¹¹ ufc/mL) foram inoculadas individualmente em microplacas tipo Deep Well, de 96 poços, em 1 mL de meio Circle Grow[®] (Q-BIO gene) contendo 100 µg/mL de ampicilina. As placas foram incubadas a 37°C, 320 rpm, durante 22 h. Os DNAs plasmidiais foram, então, isolados.

2.3 – Sequenciamento dos clones recombinantes.

Os DNAs anteriormente visualizados em gel de agarose 0,8% 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[®]).

2.4 – Bioinformática.

As seqüências de cDNA geradas a partir de 10 placas (960 clones), com índice PHRED (Ewing et al, 1998) igual ou maior que 20 para 200 nucleotídeos, foram editadas para a remoção de nucleotídeos do vetor, utilizando-se Cross Match (Green, 1996). As ESTs resultantes foram, então, armazenadas em um banco de dados (MySQL) em uma plataforma Linux (Fedora) e processadas utilizando-se uma versão modificada da ferramenta PHOREST (Ahren *et al.*, 2004), juntamente com as ESTs obtidas de outras 90 placas, do mesmo Projeto, e com os bancos de levedura e micélio obtidos através do Projeto Genoma Centro-Oeste (Felipe *et al.*, 2005). As ESTs foram agrupadas através da ferramenta CAP (Huang, 1992), e a ferramenta BLAST (Altschul *et al.*, 1990) foi utilizada, em paralelo, para comparar as ESTs de cada Projeto com o banco GenBank do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), e com os bancos GO (<http://www.geneontology.org>) e Kegg (<http://genome.ad.jp/kegg>). O processo de anotação foi realizado baseando-se em valores de similaridade $E < 10^{-5}$.

2.5 – Análise por RT-PCR semi-quantitativa (sqRT-PCR) do gene ortólogo em *P. brasiliensis*, *ura5*, obtido do processo infectivo.

cDNAs de leveduras de *P. brasiliensis* cultivadas *in vitro* e leveduras isoladas do fígado de camundongos infectados foram sintetizados utilizando-se a transcriptase reversa Superscript II RNase H (Invitrogen). Os cDNAs foram utilizados para PCR na concentração de 15ng/µL, em uma reação de 25µL. O número de ciclos da PCR foi otimizado para cada condição experimental para assegurar uma fase linear de amplificação, sendo padronizado em 22 ciclos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Sequenciamento e análise dos cDNAs.

Após o processamento *in silico* das seqüências de cDNA, foram obtidas, no total, 3760 contigs e 4315 singlets, englobando 24946 ESTs. O Projeto Transcriptoma de *P. brasiliensis* durante o Processo Infectivo abrangeu 5242 ESTs, as quais foram categorizadas funcionalmente durante o processo de anotação.

3.2 – Análise por sqRT-PCR do gene *ura5*.

O gene codificante para a proteína orotato fosforibosiltransferase, *ura5*, foi identificado em *Histoplasma capsulatum*, E-value 3e-57, através da comparação do contig formado por 5 ESTs, oriundo do Projeto Transcriptoma *P. brasiliensis* durante o Processo Infectivo, com o GenBank, utilizando-se a ferramenta BLASTX. *Ura5* é requerido para a via da biossíntese de pirimidina e auxotrofia para uracila em *H. capsulatum* e encontra-se envolvido na interação patógeno-hospedeiro e virulência

deste organismo (Retallack *et al.*, 1999). Esse gene não se encontra descrito no Projeto Genoma Centro-Oeste, e a análise por sqRT-PCR demonstrou que *ura5* apresenta-se mais expresso durante a passagem de *P. brasiliensis* em animais experimentais, quando comparado ao cultivo das células leveduriformes *in vitro*.

4. CONCLUSÃO

Os transcritos de *P. brasiliensis* obtidos durante o processo infectivo foram identificados e classificados quanto à possível função. Análises comparativas permitiram a identificação do ortólogo em *P. brasiliensis*, *ura5*, potencialmente envolvido na interação patógeno-hospedeiro e virulência. Estudos comparativos dessa natureza e a categorização funcional desses transcritos contribuem consideravelmente para o conhecimento de novos genes expressos durante a infecção, sendo relevantes para um melhor entendimento a respeito da patogenicidade de *P. brasiliensis*.

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.
- 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. 1998. Base-calling of automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assesment. *Genome Res.* 8, 175-185.
- Felipe, M. S. *et al.* 2005. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J. Biol. Chem.* 280(26): 24706-14.
- 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. 1992. A contig assembly program based on sensitive detection of fragment overlaps. *Genomics.* 14(1): 18-25.
- Retallack, D. M., Heinecke, E. L.; Gibbons, R.; Deepe, G. S. Jr. & Woods, J. P. 1999. The URA5 gene is necessary for *Histoplasma capsulatum* growth during infection of mouse and human cells. *Infect Immun.* 67(2):624-9.

FONTE DE FINANCIAMENTO – CNPq / MCT; Capes.

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

² Instituto de Ciências Biológicas - ICB - Laboratório de Biologia Molecular - UFG

³ Laboratório de Bioinformática - UCG

⁴ Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - UFG

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