

FERNANDA LOURENÇO ALVES

**Papel dos transposons de DNA da superfamília *Tc1/mariner*
(TREM A-H) no reconhecimento de linhagens de fungos patogênicos
do gênero *Paracoccidioides***

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

**Belo Horizonte
2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

Fernanda Lourenço Alves

Papel dos transposons de DNA da superfamília *Tc1/mariner* (TREM A-H) no reconhecimento de linhagens de fungos patogênicos do gênero *Paracoccidioides*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de mestre em Microbiologia.

**Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Silva Cisalpino
Co-orientadora: Dra. Marjorie Mendes Marini**

**Belo Horizonte
2012**

Agradecimentos

À Deus, por sua infinita bondade: obrigada pela realização de um sonho.

Aos meus pais que, mesmo sem entender muito minha escolha pela pesquisa, sempre me deram apoio e amor incondicional.

À minha querida vó, pelo seu grande amor e cuidado, e é claro, pelas marmitas gostosas de todo dia!

Ao meu amado noivo André, por todo seu carinho, incentivo, apoio e cumplicidade.

À minha orientadora Patrícia. Mesmo sem me conhecer direito, você me aceitou em seu laboratório e me deu a oportunidade de trabalhar com os transposons, algo que eu sempre achei intrigante e queria estudar desde os tempos da graduação. Eu agradeço de todo o coração a sua orientação, dedicação, sabedoria e cuidado.

À minha co-orientadora Marjorie: obrigada por compartilhar os “seus Trem” comigo! Obrigada por todos os seus ensinamentos, pela paciência e atenção. Sem você não seria possível a realização deste trabalho!

Às professoras Fátima e Viviane, por me acolherem em seu laboratório, o meu muito obrigada!

Ao Marco Aurélio que, desde o começo do mestrado, sempre me ajudou. Obrigada pelos conselhos, incentivo e apoio!

À Lud, minha querida companheira: obrigada pelos almoços compartilhados, conversas e ajuda na preparação de materiais e reagentes.

À Aglaupe e Raquel: muito obrigada pela imensa ajuda na extração de DNA.

Aos demais colegas do LabMic: Vanessa, Fábio, Dalila e Izabela. Obrigada pelas conversas divertidas!

À todos os colegas do LIMHO, em especial à Rosana, Paty Campi, Diogo e Frank, que sempre me ajudaram muito. Obrigada por tudo!

À Gil, nossa técnica de laboratório, obrigada por ser tão prestativa e atenciosa.

Aos amigos Luis e Michelle: espero que nossa caminhada, que começou desde a especialização, continue rumo ao doutorado!

À todos os amigos-irmãos da célula: obrigada pelas orações e pela amizade verdadeira.

Aos colegas de mestrado Gi, Gabi, Rafa e Leandro: obrigada pelo companheirismo.

À todos os professores do Programa de Pós-graduação em Microbiologia, obrigada pela oportunidade e pela excelência do ensino.

À todos os funcionários da secretária da Pós-graduação, obrigada pela disponibilidade e ajuda sempre que precisei.

Às doutoras Rosane Hahn e Mariceli Araújo, e aos doutores Zoilo de Camargo e Marcus Teixeira. Muito obrigada pelos isolados cedidos. A contribuição de vocês enriqueceu muito este trabalho.

À CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

Muito obrigada a todos que sempre torceram por mim e que de alguma forma, contribuíram na realização deste trabalho.

RESUMO

O gênero *Paracoccidioides* é agente da paracoccidioidomicose, micose sistêmica de distribuição restrita à América Latina. O polimorfismo genético entre os isolados de *Paracoccidioides* tem sido extensamente demonstrado por diferentes autores, através de diversas técnicas moleculares. Trabalhos recentes revelaram a existência de duas espécies, *P. lutzii* e *P. brasiliensis*, sendo a primeira originalmente caracterizada como uma espécie críptica denominada "Pb01-like" e a última constituída de três espécies crípticas, denominadas S1, PS2 e PS3. Vários tipos de marcadores moleculares vem sendo propostos para a caracterização de espécies crípticas no gênero *Paracoccidioides*. Entretanto, a maioria despende tempo e emprega técnicas bastante laboriosas e/ou caras. Elementos transponíveis tem sido usados no conhecimento da estrutura genética de fungos patogênicos, auxiliando na definição de grupos filogeneticamente relacionados e de importância epidemiológica. Um estudo recente no genoma de *Paracoccidioides* revelou a presença de oito famílias de transposons de DNA, denominadas TremA-H. Os elementos Trem estão distribuídos de forma desigual no genoma de isolados representativos de três espécies crípticas de *Paracoccidioides* (*P. lutzii*; PS2 e S1): TremC e H são encontrados em todas as espécies; TremA, B e F, nas espécies crípticas PS2 e S1; TremD foi detectado apenas em S1 e TremE somente em *P. lutzii*. Este trabalho relata o emprego de reações de amplificação em cadeia da polimerase (PCR) para avaliar a utilidade de três marcadores moleculares na discriminação de espécies crípticas de *Paracoccidioides*: 1) par de iniciadores destinados à região de *indel* do gene *hsp70*; 2) marcadores microssatélites de DNA; 3) Trem A-H. Foram estudados 48 isolados de *Paracoccidioides*, sendo trinta previamente classificados segundo a espécie críptica (10 de *P. lutzii*, 15 de S1, 3 de PS2 e 2 de PS3). 14 isolados puderam ser classificados como *P. lutzii* por meio do uso dos iniciadores dirigidos ao *indel* do gene *hsp70*, sendo os demais 34 isolados classificados como *P. brasiliensis*. Os marcadores microssatélites utilizados não conseguiram discriminar os isolados entre as três espécies crípticas de *P. brasiliensis*. Os resultados obtidos pelo uso da PCR para detecção de elementos TremA-H mostram que TremA, B, F e G são encontrados apenas em *P. brasiliensis* (S1, PS2 e PS3); TremE está presente apenas em *P. lutzii*; TremC e H estão presentes em *P. lutzii* e *P. brasiliensis* (S1, PS2 e PS3). É interessante ressaltar que em *P. brasiliensis*, a amplificação de TremC e TremH mostrou um padrão de duas bandas enquanto que em *P. lutzii*, observou-se apenas uma banda de aproximadamente 2 kb. Em isolados PS3, TremD mostra um padrão de três bandas. Estes resultados confirmam que os padrões de amplificação observados para os oito elementos TremA-H e seu padrão esperado de bandas, podem ser úteis como marcadores moleculares espécie-específicos no gênero *Paracoccidioides*.

ABSTRACT

The genus *Paracoccidioides* is the agent of paracoccidioidomycosis, a systemic mycosis with restricted distribution to Latin America. Genetic polymorphism among isolates of *Paracoccidioides* has been widely demonstrated by different authors using different molecular techniques. Recent studies revealed the existence of two species, *P. lutzii* and *P. brasiliensis*, the first originally characterized as a cryptic species called "Pb01-like" and the last consists of three cryptic species, called S1, PS2 and PS3. Several types of molecular markers have been proposed for the characterization of cryptic species in the genus *Paracoccidioides*. However, most spend time and employs techniques quite laborious and/or expensive. Transposable elements have been used to understand the genetic structure of pathogenic fungi, helping to define groups phylogenetically related and of epidemiological importance. A recent study in the genome of *Paracoccidioides* revealed the presence of eight families of DNA transposon, called TremA-H. The distribution of Trem elements varied between the three cryptic species of *Paracoccidioides* used (*P. lutzii*, PS2 and S1): TremC and H was found in all species, TremA, B and F in the cryptic species S1 and PS2; TremD was only detected in S1 and TremE only in *P. lutzii*. This work reports the use of polymerase chain reaction (PCR) to evaluate the usefulness of three markers to discriminate between the four cryptic species of *Paracoccidioides*: a) a primer for the indel region of *hsp70* gene; 2) DNA microsatellite markers; 3) TremA-H. We studied 48 *Paracoccidioides* isolates and thirty was previously classified according to the cryptic species (10 *P. lutzii*; 15 S1, 3 PS2 and 2 PS3). 14 isolates could be classified as *P. lutzii* through the use of primers design to indel *hsp70* gene. The other 34 isolates were classified as *P. brasiliensis*. The microsatellite markers used could not discriminate between the three cryptic species of *P. brasiliensis*. The results obtained by the use of PCR for TremA-H showed that TremA, B, F and G are only found in *P. brasiliensis* (S1, PS2 and PS3); TremE is present only in *P. lutzii*; TremC and H are present in *P. lutzii* and *P. brasiliensis* (S1, PS2 and PS3). Interestingly, in *P. brasiliensis*, amplification of TremC and TremH showed a pattern of two bands, whereas in *P. lutzii*, was only one band of 2 kb. In PS3 isolates, TremD showed a pattern of three bands. These results confirm the amplification patterns previously observed for the Trem elements and some expected pattern of bands can be useful as molecular markers in the genus *Paracoccidioides*.