ANÁLISE IN SILICO DAS SEQUÊNCIAS GÊNICAS DE LEISHMANIA CHAGASI, UM AUXÍLIO AO DIAGNÓSTICO MOLECULAR

RESUMO

O estudo in silico é um método aplicado por meio de análise de dados em uma determinada espécie ou gênero, um auxílio ao diagnóstico, pois auxilia o conhecimento através de análise molecular. Aplicado na resolução dos dados, para avaliar o grau de compatibilidade entre diferentes genes e, assim, melhorar os métodos e técnicas em diversas áreas das ciências biológicas. *Leishmania chagasi*, um parasita protozoário pertencente à família Trypanosomatidae Doflein, apresenta uma longa história de publicações científicas a respeito de sua manifestação clínica e da imunopatologia da doença. Diante de sua enorme variedade clínica e patológica, essa espécie pode se encontrar com aproximações genéticas em vários outros genes e espécies, nesse caso o estudo in silico auxilia essas informações em relação às suas sequências gênicas. Objetivamos no presente trabalho a aplicação do estudo in silico por meio da bioinformática auxiliando um diagnóstico molecular da espécie *Leishmania chagasi*. Para aplicação metodológica incluíram o uso de ferramentas disponíveis online, tais como: NCBI, CAP3, ORF, BLAST. Os resultados comprovaram as aproximações das sequências com *Leishmania chagasi* com *L. major*, *L. donavanni* e *L. infantum*. Comprovamos que o trabalho in silico mostrou-se útil como uma ferramenta rápida, prática e objetiva para a identificação de genes e definição das relações para comprovação das aproximações genéticas entre as espécies.

PALAVRAS-CHAVE: *Leishmania Chagasi*; Bioinformática; In Silico; Biologia Molecular.

ANALYSIS IN SILICO GENE SEQUENCES OF LEISHMANIA CHAGASI, AID TO MOLECULAR DIAGNOSIS

ABSTRACT

The in silico study is a method applied by means of data analysis in a particular species or genus, an aid to the diagnosis, because it helps knowledge through molecular analysis. Applied to the resolution of the data, to assess the degree of compatibility between different genes and thus improve the methods and techniques in various areas of the biological sciences. *Leishmania chagasi*, a protozoan parasite belonging to the family Trypanosomatidae Doflein, has a long history of scientific publications about their clinical manifestations and immunopathology of the disease. Given its enormous variety clinical and pathological, this species can be found with genetic approaches in several other genes and species, then the in silico study aids such information regarding their genomic sequences. We aim in this work is the application of in silico study by bioinformatics helping a molecular diagnosis of the species *Leishmania chagasi*. For methodological application include the use of online tools available, such as NCBI, CAP3, ORF and BLAST. The results confirmed the approaches of the sequences with *Leishmania chagasi* with *L. major*, *L. donavanni* and *L. infantum*. We found that the work in silico was useful as a quick tool, practical and objective to identify genes and defining relations proof of genetic similarities between species.

KEYWORDS: *Leishmania Chagasi*; Bioinformatics; In Silico; Molecular Biology

Natural Resources, Aquidabã, v.5, n.1, Set, Out, Nov, Dez 2014, Jan, Fev, Mar, Abr, Mai, Jun, Jul, Ago 2015.

ISSN 2237-9290

SECTION: Articles

TOPIC: Notas Científicas

DOI: 10.6008/SPC2237-9290.2015.001.0004

Maria Flávia Karoline dos S. Garcia

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/7407581720553826>

flaviaksq@hotmail.com

Priscila Soares da Silva

Fundação de Ensino Superior de Olinda, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/1984176241754160>

psoares867@gmail.com

Meiriana Xavier Vila Nova

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/2326764894889194>

meirianan@bol.com.br

Received: 05/04/2015

Approved: 30/09/2015

Reviewed anonymously in the process of blind peer.

Referencing this:

GARCIA, M. F. K. S.; SILVA, P. S.; NOVA, M. X. V.. Análise in silico das sequências gênicas de *leishmania chagasi*, um auxílio ao diagnóstico molecular. *Natural Resources*, Aquidabã, v.5, n.1, p.45-49, 2015. DOI:

<http://dx.doi.org/10.6008/SPC2237-9290.2015.001.0004>

INTRODUÇÃO

A *Leishmania* é um gênero de protozoários da família Trypanosomatidae, que inclui os parasitas causadores das leishmanioses. A leishmaniose visceral (LV) é transmitida ao homem por insetos vetores ou transmissores, conhecidos como flebotomíneos. A transmissão acontece apenas quando uma fêmea infectada popularmente conhecida por mosquito-palha (*Lutzomyia longipalpis*) passa o protozoário a uma vítima sem a infecção, enquanto se alimenta de seu sangue. É causada por espécies do gênero *Leishmania*, pertencentes ao complexo *donovani*. São reconhecidas três espécies como agentes etiológicos da doença destacando-se a *Leishmania chagasi* (SILVA et al., 2011). *Leishmania chagasi* destaca-se como uma doença endêmica que sempre são encontrados muitos casos de notificações no Brasil. Fazendo uma análise, a maior parte dos casos ocorre no nordeste do país. Nos últimos anos as regiões sudeste e norte também vêm assumindo uma proporção significativa de casos (VASCONCELOS, 2010). É uma zoonose largamente disseminada, que representa um problema sério de saúde pública com várias manifestações clínicas que dependem da espécie. Além disso, a leishmaniose destaca-se como a segunda causa de mortalidade dentre doenças negligenciadas.

O diagnóstico clínico pode ser feito através da visualização de: alterações cutâneas, linfadenomegalia, perda de peso, aumento de tamanho do baço e do fígado, onicogribose e apatia. Já o diagnóstico laboratorial conta com vários métodos, dentre eles diagnóstico: parasitológico, imuno- histoquímica, molecular e sorológico (FARIA & ANDRADE, 2012). A bioinformática une conhecimentos nas mais diversas áreas a fim de descobrir o código genético que está nas biomoléculas através da formação de modelos lógico-matemáticos e estatísticos. Tais estratégias têm garantido a interpretação e elucidação de eventos biológicos ocorridos a partir do sequenciamento de genes e proteínas (ARAUJO et al., 2008). Estudos 'in silico' são realizados, e assim avaliam o grau de compatibilidade entre diferentes genes e, podendo por tanto, melhorar os métodos e técnicas nas diversas áreas das ciências biológicas. O presente trabalho tem por objetivo aplicação de estudo 'in silico' por meio da bioinformática auxiliando um diagnóstico molecular da espécie *Leishmania chagasi*, como também analisar aproximação 'in silico' da *Leishmania chagasi* com os demais gêneros e espécies possíveis.

METODOLOGIA

Para a execução deste trabalho foram utilizadas diferentes ferramentas de bioinformática disponíveis *online*. Inicialmente, realizou-se uma busca no banco de dados localizado no Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI, Genbank, database) para identificar sequências de genes disponíveis para os parasitas do gênero *Leishmania chagasi*. Em seguida, selecionaram sequências codificadoras (CDS) pertencentes a estas famílias de genes, de forma aleatória. Nesta fase, foi possível analisar comparativamente a quantidade de dados disponíveis

no banco de dados NCBI pelo número de famílias de genes e descrever o número de sequências codificadoras disponíveis para cada espécie ou gênero. As sequências obtidas foram agrupadas usando o Programa da Assembléia Sequence - CAP3 (HUANG & MADAN, 1999), o que fez a identificação do quadro de leitura aberta (ORF), com o programa localizador ORF identificando as regiões 5'-UTR e 3'-UTR de cada sequência. O ORF foi submetido ao Blastn (que consiste em um programa que compara a sequência de nucleotídeos de entrada contra um banco de dados de nucleotídeos) (AMARAL et al., 2007) para a identificação e seleção das respectivas sequências relacionadas aos genes. Este programa é muitas vezes aplicado a fim de encontrar semelhanças entre nucleotídeos e proteínas em bancos de dados com grande número de sequências de vários organismos (PROSDOCIMI et al., 2003). Nesta etapa, ORFs foram comparados com outras já depositadas no banco de dados NCBI.

RESULTADOS

A partir do programa NCBI as sequências em formato FASTA foram utilizadas. Então, empregou-se o programa CAP3 software, utilizado para o agrupamento de sequências similares e montagem de genômica contíguos, que foram identificados por partes iguais de sequências, recebendo o gene 'contig'. Aplicando a técnica '*in silico*' obtemos a aproximação genética entre *Leishmania infantum* com similaridades com 100%, *Leishmania donovani* strain 97%; *Leishmania donovani* strain com 94%, *Leishmania major* strain Friedlin 78% e *L. major hydrophilic* com 98% de similaridade. O resultado da análise pelo BLASTx utilizando-se o banco não redundante de sequência indicou que a sequência em análise apresentou homologia com sequência das *Leishmania infantum* com a analisada inicialmente.

Na tabela 1 podemos analisar a similaridade entre as análises que foram feitas. *Leishmania chagasi* JPCM5 quando comparada com a *Leishmania infantum* há uma similaridade de 100%. Logo após foi evidenciado semelhança entre *Leishmania infantum* strain (99%), *Leishmania donovani* (97%), *Leishmania major* strain (78%). Aplicando as ferramentas computacionais podemos analisar as sequências de *Leishmania chagasi* com *L. major*, *L. donovani* e *L. infantum* na tabela 2, foi então a comprovação que o trabalho *in silico* mostrou-se útil e viável como uma ferramenta rápida, prática. Segundo Santos 2004, a principal ferramenta da pesquisa em bioinformática é o próprio computador e o seu resultante disponibilizado faz com que a utilização dos dados possa ser aproveitada de forma rápida e fácil (SANTOS, 2004). No gráfico 2 também podemos observar os sítios de inserção usados em bioinformática para detectar similaridades entre as sequências encontradas no NCBI e aplicada o Cap3 como ferramenta da biologia computacional.

Tabela 1: Similaridade entre as amostras estudadas e gêneros depositados no banco de dados Genbank.

Descrição	Similaridade	Referência
Leishmania infantum JPCM5 hydrophilic acylated surface protein b (HASPB) mRNA, complete cds		ref XM_001465758.2
Leishmania infantum JPCM5 genome chromosome 23	100%	emb FR796455.1
Leishmania infantum strain MHOM/FR/1978/LEM75 K26 protein (K26) gene, partial cds	99%	gb EF504255.1
Leishmania donovani strain MHOM/IN/1983/AG83 cell surface protein B1 mRNA, partial cds	97%	gb AY702004.1
Leishmania donovani strain MHOM/IL/1998/BenAmi (LRC-L529) K26 protein gene, partial cds	94%	gb HQ170543.1
Leishmania major strain Friedlin complete genome, chromosome 23	78%	emb FR796419.1
L.major hydrophilic surface protein 2	98%	emb Z83206.1

Gráfico 1: Sítios de inserção usados em bioinformática para detectar similaridades entre as sequencia encontradas no NCBI

Sequences producing significant alignments:						
Select:	All	None	Selected: 0			
Alignments	Download	GenBank	Graphics	Distance tree of results		
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐ Leishmania infantum JPCM5 hydrophilic acylated surface protein b (HASPB) mRNA, complete cds	1375	9055	100%	0.0	100%	XM_001465758.2
☐ Leishmania infantum JPCM5 genome chromosome 23	1375	9674	100%	0.0	100%	FR796455.1
☐ Leishmania chagasi K26 (K26) gene, complete cds	1375	9055	100%	0.0	100%	AF131228.1
☐ Leishmania infantum K26 antigen (K26) gene, complete cds	1362	9031	99%	0.0	99%	DQ192034.1
☐ Leishmania infantum strain MHOM/ES/99/LM-855 hydrophilic acylated surface protein b gene, partial cds	1068	12803	84%	0.0	99%	KC578808.1
☐ Leishmania infantum strain MHOM/FR/1995/LPH114 K26 protein (K26) gene, partial cds	1046	8726	76%	0.0	100%	EF504255.1
☐ Leishmania infantum strain MHOM/FR/1978/LEM75 K26 protein (K26) gene, partial cds	1040	8709	76%	0.0	99%	EF504255.1
☐ Leishmania donovani HASPB1 gene	989	17347	97%	0.0	96%	AJ011810.1
☐ Leishmania infantum strain MHOM/GR/2001/GH10 K26 protein (K26) gene, partial cds	950	8262	76%	0.0	99%	EF504257.1
☐ Leishmania infantum strain MHOM/GR/2001/GH46 K26 protein (K26) gene, partial cds	950	8262	76%	0.0	99%	EF504258.1
☐ Leishmania donovani strain MHOM/IN/1983/AG83 cell surface protein B1 mRNA, partial cds	717	8056	64%	0.0	97%	AY702004.1
☐ Leishmania donovani strain MHOM/IN/2003/BHU/32 K26 (K26) gene, partial cds	592	3030	80%	2e-165	85%	JX284870.1
☐ Leishmania donovani strain MHOM/IL/1998/BenAmi (LRC-L529) K26 protein gene, partial cds	520	3500	84%	1e-143	94%	HQ170543.1
☐ Leishmania donovani strain MHOM/KE/LRC-L445 K26 (K26) gene, partial cds	514	2133	80%	5e-142	87%	JX284869.1

Figura 1: identificando maior afinidades entre as espécies estudadas

CONCLUSÕES

Através do resultados foi possível ter a confirmação das aproximações das sequências de *Leishmania chagasi* com *L. major*, *L. donavanni* e *L. infantum*. Comprovamos que o trabalho *in silico* mostrou-se útil e viável como uma ferramenta rápida, prática, objetiva e de baixo custo para a identificação de genes e definição das relações para comprovar as aproximações genéticas entre as espécies. Agradecemos a Faculdade Pernambucana de Saúde- FPS/IMIP e a Universidade Federal de Pernambuco-UFPE.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, A. M.; REIS, M. S.; SILVA, F. R.. **Programa BLAST**: guia prático de utilização. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.
- ARAUJO, N. D.; FARIAS, R. P.; PEREIRA, P. B.; FIGUEIRÊDO, F. M.; MORAIS, A. M. B.; SALDANHA, L. C.; GABRIEL, J. E.. A era da bioinformática: seu potencial e suas Implicações para as ciências da saúde. **Estud Biol**. v.30, p.143-8, 2008.
- FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M.. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan- Amaz Saúde**. v.3, n.2, p.47-57, 2012.
- HUANG, X.; MADAN, A.. CAP3: a DNA sequence assembly program. **Genome Research**. v.9, p.868-877, 1999. DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/gr.9.9.868>.
- PROSDOCIMI, F.; CERQUEIRA, G. C.; BINNECK, E; SILVA, A. F.; REIS, A. N.; JUNQUEIRA, A. C. M.; SANTOS, A. C. F.; NHANI-JÚNIOR, A.; WUST, C. I.; CAMARGO-FILHO, F.; KESSEDJIAN, J. L.; PETRETSKI, J. H.; CAMARGO, L. P.; FERREIRA, R. G. M.; LIMA, R. P.; PEREIRA, R. M.; JARDIM, S.; SAMPAIO, V. S.; FOLGUERAS-FLATSCHART, A. V.. Bioinformática: manual do usuário. **Biotecnologia. Ciência & Desenvolvimento**. n.29, p.18-31, 2003.
- SANTOS, E. C.. **Uma introdução à bioinformática através da análise de algumas ferramentas de software livre ou de código aberto utilizado para o estudo de alinhamento de sequências**. Monografia (Especialização) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.
- SILVA, F. F.; CASTRO, R. L.. **Estudo epidemiológico da leishmaniose no município de Pirenópolis – Goiás (BR)**. Monografia (Especialização) - Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2011.
- VASCONCELOS, D. R. M.. **Deteção de Leishmania chagasi em Lutzomyia longipalpis por meio de qpcr em tempo real: Triagem de genes e métodos quantitativos**. Dissertação (Mestrado em Veterinária) – Universidade Estadual do Ceara, Fortaleza, 2010.