

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *Paracoccidioides brasiliensis* ATRAVÉS DE qPCR EM TEMPO REAL

Marina Ribeiro da Silva¹; Marcus Vinícius de Oliveira², Regina Costa de Oliveira³

Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: marina_rs_87@yahoo.com.br¹

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: moliveira@umc.br²

Professora da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: reginaco@umc.br³

Área do conhecimento: Genética Molecular e de Microrganismos

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*; qPCR em tempo real; Expressão gênica

INTRODUÇÃO

Paracoccidioides brasiliensis, agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), é um fungo dimórfico, ou seja, depende da temperatura para sua expressão morfológica e patogenicidade. À temperatura ambiente (23-28° C), o fungo cresce vagarosamente em sua fase micelial; enquanto que a 35-37°C, sofre transição e cresce em seu estágio leveduriforme e patogênico. A patogenicidade do *P. brasiliensis* parece estar intimamente ligada à transição dimórfica deste fungo, pois cepas incapazes de sofrer esta transição morfológica não são virulentas. A PCM é adquirida através da inalação de propágulos produzidos pelo fungo durante a fase micelial. Estes alcançam os alvéolos pulmonares, se transformam em leveduras e crescem no parênquima pulmonar, podendo disseminar-se para outros órgãos (BRUMMER *et al.*, 1993). O desenvolvimento de processos infecciosos são geralmente resultantes de uma interação entre os fatores de virulência do parasita e fatores de resistência do hospedeiro. Assim, estudos sobre os genes do hospedeiro infectado com expressão alterada após a infecção por *Pb* podem levar a uma melhor compreensão da PCM. Em nossos estudos foram realizados inicialmente inúmeros experimentos utilizando a técnica de hibridação competitiva em microarranjos de cDNA de camundongo, em nossas condições experimentais. No entanto, as imagens obtidas resultaram em sinal de hibridação muito fraco, impossibilitando a análise dos dados. Vários testes foram aplicados, os quais comprovaram que o insucesso dos experimentos não era da qualidade do material obtido nas extrações de RNA e sim da ineficácia dos biochips de oligonucleotídeos sintéticos de genes de camundongos utilizados. A alternativa encontrada foi aplicar a técnica de qPCR em tempo real que consiste em detectar o acúmulo dos produtos de amplificação por PCR a partir de um RNA alvo, através da emissão de fluorescência, permitindo uma quantificação bastante precisa e reprodutível do número de cópias do gene estudado (HEID *et al.*, 1996).

OBJETIVOS

Este trabalho se propôs a analisar genes relacionados à resposta imunológica de camundongos das linhagens suscetível e resistente a paracoccidioidomicose com expressão alterada após diferentes períodos de infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*, através da técnica de qPCR em tempo real.

METODOLOGIA

Camundongos das linhagens B10.A (susceptível) e A/J (resistente) divididos em 4 grupos (um grupo controle e um infectado de cada linhagem) foram infectados com 50 μ l de uma suspensão do fungo *P. brasiliensis* (isolado 18) na fase exponencial por via intratraqueal. Após períodos de 30, 60 e 90 dias da infecção, foram sacrificados com uma dose letal do anestésico, para retirada dos pulmões. A extração do RNA dos pulmões foi realizada com Trizol[®] e o material obtido foi purificado utilizando-se RNeasy Mini Kit (50) (Quiagen), segundo especificações do fabricante, permitindo a obtenção de material com grau de pureza satisfatório. As amostras de RNAs obtidos dos pulmões foram submetidas a experimentos de qPCR em tempo real. Realizou-se a síntese de cDNA partindo-se de 3 μ l de RNA total, no qual foi adicionado 4 μ l de oligo dT 100 pmol para seleção do mRNA e água em quantidade suficiente para completar o volume da reação para 19 μ l. A amostra foi submetida a desnaturação a 70°C por 5 minutos, seguida de anelamento em temperatura ambiente durante 10 minutos. Adicionaram-se 6 μ l de tampão de primeira fita 5X (Invitrogen), 3 μ l DTT (0,1M), 0,6 μ l de dNTP's (25mM de cada dNTP), 1 μ l de Superscript II RT (200 U/ μ l – Invitrogen). A reação ficou incubada a 42°C por 2 horas, e foi finalizada com uma incubação a 70°C por 10 minutos para inativar a enzima. A partir de dados obtidos na literatura, foram selecionados alguns genes para avaliação da expressão diferencial por RT-qPCR em tempo real. Para cada gene quantificado foram utilizado 50 ng de cDNA de cada condição (B10.A não infectado, B10.A infectado por 30, 60 e 90 dias, e A/J não infectado, A/J infectado por 30, 60 e 90 dias), 50 nM de cada iniciador (“Forward” e “Reverse”) e 10 μ l de SYBR Green PCR Master Mix 2X em reação com volume final de 20 μ l. As reações de amplificação foram feitas em triplicata, acompanhadas de controles negativos, realizadas no aparelho *ABI Prism® 7500 Real time PCR System* (Applied Biosystems) nas condições especificadas pelo fabricante. Para corrigir quantidades iniciais de cDNA, das diferentes amostras, foi usado um gene normalizador que tem expressão constitutiva em todas as reações, no caso, o da beta-actina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dois animais de cada grupo tiveram seus pulmões isolados a cada 30, 60 e 90 dias da infecção para a extração de RNA. As amostras de RNA de pulmões de camundongos extraídas com Trizol[®], foram analisadas em gel de agarose e quantificadas através de um NanoDrop (Spectrophotometer ND-1000). Somente foram utilizados RNAs que não apresentaram degradação visível no gel (Figura 1) e cuja densidade óptica apresentasse uma razão A_{260}/A_{280} entre 1,9 e 2,0.

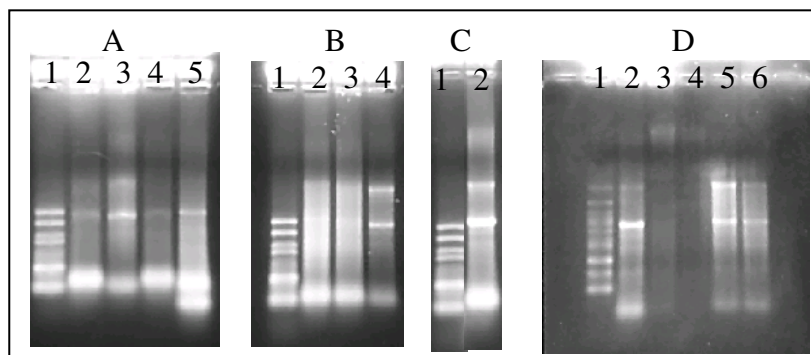


Figura 1 - Gel de eletroforese (agarose 1%). Visualização da integridade das amostras de RNA obtidas a partir de pulmões de camundongos. **A** – Amostras de RNA de camundongo B10.A infectados por 30 dias. 1 – 2 μ g de RNA Ladder 0,1 – 2,0 Kb; 2 e 3 – 2 μ g de RNA extraído de pulmão não infectado ; 4 e 5 – 2 μ g de RNA extraído de pulmão infectado. **B** - Amostras de RNA de camundongos B10.A infectados por 60 dias. 1 – 2 μ g de RNA Ladder 0,1 – 2,0 Kb; 2 e 3 – 2 μ g de RNA extraído de pulmão não

infectado; 4 - 2 µg de RNA extraído de pulmão infectado. C - Amostras de RNA obtidas de camundongos B10.A infectados por 90 dias. 1 - 2 µg de RNA Ladder 0,1 - 2,0 Kb; 2 - 2 µg de RNA extraído de pulmão infectado. D - Amostras de RNA obtidas de camundongos A/J infectados por 30, 60 e 90 dias. 1 - 2 µg de RNA Ladder 0,1 - 2,0 Kb; 2 - 2 µg de RNA extraído de pulmão não infectado; 3 e 4 - 2 µg de RNA extraído de pulmão infectado por 30 dias; 5 - 2 µg de RNA extraído de pulmão infectado por 60 dias; 6 - 2 µg de RNA extraído de pulmão infectado por 90 dias.

Três genes foram selecionados para estas análises, com base nas suas possíveis funções que desempenham na ativação do sistema imune do hospedeiro contra um agente invasor, sendo eles: *tlr2*, essencial no reconhecimento de lipopeptídeos microbianos, *MyD88*, relacionado a produção de citocinas inflamatórias induzida pelos Toll-like receptors e *Mpa21*, uma proteína ativadora de macrófagos. Os dois primeiros parecem controlar as taxas fagocíticas, a migração e ativação celular, a secreção de citocinas assim como a expressão de moléculas que afetam células dendríticas e suas competências como células apresentadoras de antígeno para células T. Após as reações de amplificação realizadas no aparelho *ABI Prism® 7500 Real time PCR System* (Applied Biosystems), as amostras foram submetidas às reações de dissociação, em condições determinadas pelo fabricante, no mesmo aparelho para Real Time qPCR, para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos. Contudo, pôde-se detectar que os primers sintetizados para tais genes selecionados não foram específicos, pois a representação gráfica da dissociação apresentou mais de um pico, demonstrando que houve amplificação de mais de uma região do gene, impossibilitando a análise real dos dados. Novas condições de amplificação estão sendo testadas, mas ainda assim outros genes que codificam moléculas conhecidas por modular a resposta imunológica no hospedeiro foram selecionados para análise. Entre eles, selecionamos a quimiocina *CXCL2*, as interleucinas inflamatórias *IL-6* e *IL-10*, o fator de necrose tumoral alfa (*TNF-α*), e molécula de adesão intracelular *CD54*. Estudos realizados por GONZALES *et al.* (2003) sugerem que as citocinas pro-inflamatórias como *TNF-α*, *IL-6* e *IL-1β* podem ser responsáveis pelo recrutamento de leucócitos nos pulmões do hospedeiro durante os primeiros estágios da infecção por *P. brasiliensis*, uma vez que, essas moléculas foram produzidas em níveis elevados nos primeiros quatro dias de infecção em amostras pulmonares de camundongos. De acordo com MOREIRA *et al.* (2006), a molécula de adesão intracelular *CD54* ou *ICAM-1* está envolvida eficazmente na migração celular e na organização da lesão granulomatosa causada por *Pb*, sendo que a ausência de *ICAM-1* em murinos infectados conduziu à susceptibilidade elevada à infecção e atrasou a formação de lesões granulomatosas, além de ter conduzido ao crescimento e à disseminação aumentada do fungo nos pulmões. Em relação a interleucina-10 (*IL-10*), JIMENEZ *et al.* (2006) confirma que os elevados níveis desta interleucina são necessários e suficientes para tornar o hospedeiro murino suscetível a infecção causada por *Coccidioides immitis*, que também pode causar uma micose pulmonar no hospedeiro como o *Pb*. Nossos resultados estão sendo analisados e comparados com o descrito na literatura, indicando diferenças significativas nos níveis de expressão para diferentes períodos de infecção, considerando-se também suas expressões em camundongos resistentes e suscetíveis a paracoccidioomicose

CONCLUSÕES

Uma vez que com a técnica de hibridação em microarranjos de DNA, que era proposta inicial do projeto, não se obteve sucesso, uma alternativa foi aplicar a técnica de qPCR em tempo real, selecionando alguns genes candidatos que possivelmente possuam envolvimento no processo infeccioso. A expressão gênica foi avaliada nos diferentes períodos determinados, 30, 60 e 90 dias, tanto nos camundongos sensíveis como nos

resistentes a paracoccidiodomicose, utilizando sondas específicas. A expressão diferencial nas diversas condições está sendo analisada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidiodomycosis: an update. **Clin Microbiol Rev.**, v. 6, n. 2, p. 89-117, abr 1993.

GONZALES, A.; SAHARA, J.H.; ORTIZ, B.L.; RESTREPO, A.; CANO, L.E. Production of pro-inflammatory cytokines during the early stages of experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Med Mycol**, v.41, n.5, p.391-9, out 2003.

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome Res.**, v.6, n. 10, p. 986-994, out 1996.

JIMENEZ, M.P.; WALLS, L.; FIERER, J. High levels of interleukin-10 impair resistance to pulmonary coccidioidomycosis in mice in part through control of nitric oxide synthase 2 expression. **Infect Immun**.v.71,n.6, p.3387-95, jun 2006.

MOREIRA, A. P.; CAMPANELLI, K. A.; CAVASSANI, J. T.; SOUTO, B. R.; FERREIRA, R.; MARTINEZ, M. A.; ROSSI, J. S.; SILVA. Intercellular adhesion molecule-1 is required for the early formation of granulomas and participates in the resistance of mice to the infection with the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Am J Pathol**, v.169, n.4, p.1270-81, out 2006.