

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM CAMUNDONGOS INFECTADOS PELO FUNGO *PARACOCIDIODES BRASILIENSIS* ATRAVÉS DE HIBRIDAÇÃO EM MICROARRANJOS DE DNA

Marina Ribeiro da Silva¹; Regina Costa de Oliveira² (Curso: Farmácia)

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

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

Área de conhecimento: Genética Molecular

Palavras-chaves: *Paracoccidioides brasiliensis*, microarranjo de DNA, genômica funcional

INTRODUÇÃO

Paracoccidioides brasiliensis, agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), é um fungo termodimórfico, que 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 (ALMEIDA *et al.*, 2007). A patogenicidade do *Paracoccidioides brasiliensis* parece estar intimamente ligada à transição dimórfica deste fungo, pois cepas incapazes de sofrer esta transição morfológica não são virulentas (SAN-BLAS e NINO-VEGA, 2001). A paracoccidioidomicose 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 extra pulmonares (BRUMMER *et al.*, 1993).

O desenvolvimento de processos infecciosos é geralmente resultante de uma interação entre os fatores de virulência do parasita e fatores de resistência do hospedeiro. Assim, estudos sobre os genes do hospedeiro infectado que tenham sua expressão alterada após a infecção por *P. brasiliensis* podem levar a uma melhor compreensão da PCM. Estudos pioneiros realizados por CALICH e colaboradores (1985), utilizando camundongos isogênicos como hospedeiros, evidenciaram duas linhagens de camundongos com respostas opostas em relação à infecção por *P. brasiliensis*, quando infectados por via intraperitoneal. Estudos com modelos de inoculação intratraqueal com leveduras e propágulos nas diferentes linhagens de camundongos revelaram que a resistência à infecção pulmonar por *P. brasiliensis* apresentada pela linhagem A/Sn parece estar associada à resposta imune celular, caracterizada principalmente pela eficiente ativação de macrófagos, com formação de granulomas que contêm a disseminação do fungo (CANO *et al.*, 1998).

O padrão de resposta de diferentes células do hospedeiro parece apresentar variações significativas, dependendo do “background” genético do animal infectado, da via de inoculação e do tipo de tecido estudado. Um melhor entendimento do mecanismo de resposta imunitária à infecção por *P. brasiliensis* poderia ser alcançado através de uma abordagem de análise de expressão gênica em larga escala, como a hibridação em microarranjos de DNA (DNA microarrays) (LI *et al.*, 2002).

OBJETIVOS

Este trabalho se propôs a analisar, através de hibridações competitivas com mRNAs obtidos de camundongos da linhagens B10.A e A/J, saudáveis e experimentalmente infectados pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, genes com expressão alterada após diferentes etapas do processo infeccioso.

METODOLOGIA

Camundongos das linhagens B10.A (susceptível) e A/J (resistente) divididos em 4 grupos de 6 animais (um grupo controle e um infectado de cada linhagem) foram infectados com 50 µl 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 para as marcações com Cy3- ou Cy5-dCTP (Amersham Biosciences). Quando necessário, o material obtido foi amplificado através do método descrito por Wang & Marincola (2002). A marcação com fluoróforos Cy3 ou Cy5 foi realizada a partir de mRNA de células de pulmões de camundongos não infectados, usado como referência contra mRNA derivado de células pulmonares infectadas com *Pb* mantidas por períodos distintos. A síntese da primeira fita de cDNA foi feita partindo-se de 15 µg de RNA total (concentrado em 14 µl), no qual foi adicionado 4 µl de dN6 primer (3 µg/µl) e H₂O MilliQ autoclavada, perfazendo um volume final de 19,5 µl. A amostra foi submetida a desnaturação a 70°C por 10 minutos, seguida de anelamento em temperatura ambiente durante 10 minutos, quando então, adicionou-se 6 µl de tampão de primeira fita 5X (Invitrogen), 3 µl DTT (0,1 M), 0,6 µl dNTPs (25 mM de cada dNTP), 1 µl de Superscript II RT (200 U/ µl – Invitrogen). A reação foi incubada a 42°C por 2 horas. Após este período, foi realizado a degradação do RNA com 1 µl de RNase A (10 mg/ml) mantendo-se a reação a 37° por 30 minutos. A segregação do cDNA dos demais materiais foi feita utilizando-se Microcon YM-30 (Millipore) e o volume ajustado para 21 µl. O cDNA contido nos 21 µl obtidos na síntese da primeira fita foram desnaturados a 95°C durante 5 minutos seguido da adição de 20 µl de solução de iniciadores randômicos 2,5X (Invitrogen), 5 µl de dNTPs mix (dATP 24 mM, dTTP 24 mM, dGTP 24 mM e dCTP 12 mM), 1 µl Klenow 40 U/µl (Invitrogen), 2 µl de fluoróforo Cy3 ou Cy5. A reação foi incubada em banho-maria a 37°C por 2 horas, e sua purificação feita em Microcon YM-30 (Millipore) através de 3 lavagens consecutivas, utilizando-se em cada uma delas 400 µl de H₂O MilliQ autoclavada. A amostra foi concentrada até 14 µl. As duas amostras foram misturadas e a incorporação de ambos fluoróforos medida em espectrofotômetro NanoDrop[®] ND-1000 e o volume final foi seco completamente em centrifuga a vácuo. Ressuspendeu-se o material em 40 µl de solução de hibridação e seguiu-se a hibridação competitiva contra um biochip contendo de oligonucleotídeos sintéticos representativos de genes de camundongos em câmara úmida, por um período de 22 horas a 42°C. Após a hibridação, procedeu-se a lavagem na qual cada etapa foi repetida por duas vezes, utilizando-se as mesmas soluções do protocolo de marcação de 1ª fita.

A leitura dos biochips hibridados foi realizada através de um scanner óptico Affymetrix 418, nos comprimentos de onda 532 nm (Cy3) e 635 nm (Cy5) gerando imagens independentes para cada um dos fluoróforos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para realizar os objetivos propostos, foi necessário estabelecer e testar os procedimentos experimentais até que se obtivessem amostras com qualidade e quantidade satisfatórias para dar continuidade ao projeto.

Células de *P. brasiliensis* foram cultivadas em meio YPD por 5 dias, período em que atinge sua fase exponencial, a 37° C em agitador orbital (Environ Shaker, Lab-Line) a 120 rpm. As células fúngicas apresentaram crescimento bom, compatível com a curva de crescimento já estabelecida no laboratório.

Dois animais sobreviventes de cada grupo A/J foram sacrificados após 60 dias da infecção, a fim de isolar seus pulmões. E a linhagem B10.A, foi infectada com sucesso, então, os pulmões de 2 camundongos de cada grupo foram isolados a cada 30, 60 e 90 dias.

As amostras de RNA da cultura de *P. brasiliensis* em pulmões de camundongos extraídas com Trizol[®], foram analisadas em gel de agarose e quantificadas através de um NanoDrop (Spectrophotometer ND-1000) como exemplificado na Figura 1.

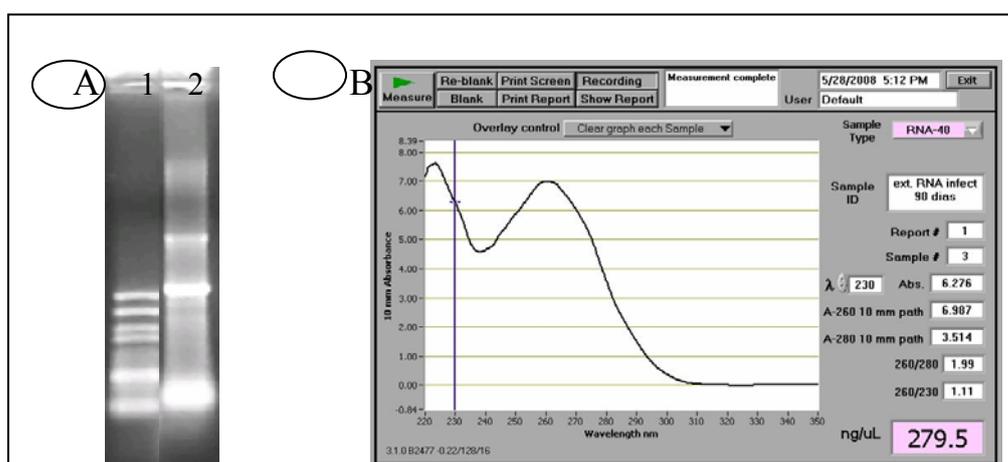


Figura 1 - Gel de eletroforese (agarose 1%) e quantificação por espectrofotometria (Spectrophotometer ND -1000). A - Visualização da integridade das amostras de RNA obtidas a partir de pulmões de camundongos B10.A infectados por *P. brasiliensis* por 90 dias. Canaleta 1 – 2 µg de RNA Ladder 0,1 – 2,0 Kb; Canaleta 2 - 2 µg de RNA extraído de pulmão de camundongo B10.A infectado. B - Leitura feita com 2 µl da amostra de RNA obtida após a extração (diluição 1:10), revelando uma concentração de aproximadamente 0,27 µg./µl e uma razão A_{260}/A_{280} de 1,99.

Somente foram utilizados RNAs que não apresentaram degradação visível no gel e cuja densidade óptica apresentasse uma razão A_{260}/A_{280} entre 1,9 e 2,0. As marcações independentes para cada amostra com inversão dos fluoróforos tiveram um bom resultado. O cDNA foi hibridado contra o biochip de oligonucleotídeos sintéticos de genes de camundongos em câmara úmida, contudo, as imagens obtidas demonstraram sinal de hibridação muito fraco.

CONCLUSÕES

As imagens obtidas após experimentos de hibridação competitiva em microarranjo de DNA estão em processo de análise para identificação de genes diferencialmente

expressos em camundongos acometidos de paracoccidiodomicose, sensíveis ou resistentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, AJ, MATUTE, DR, CARMONA, JA, MARTINS, M, TORRES, I, MCEWEN, JG, RESTREPO, A, LEO, C, LUDOVICO, P, RODRIGUES, F. Genome size and ploidy of *Paracoccidioides brasiliensis* reveals a haploid DNA content: flow cytometry and GP43 sequence analysis. *Fungal Genet Biol.*; 44(1):25-31. 2007

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

CANO, M. I, CISALPINO, P. S.; GALINDO, I.;RAMIREZ, J. L.; MORTARA, R.A.; SILVEIRA, J. F. Electrophoretic karyotypes and genome sizing of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Clinical Microbiology.* v.36. n.3. p.742-747. 1998.

LI, X.; GU, W.; MOHAN, S.; BAYLINK, D.J. DNA microarrays: their use and misuse. *Microcirculation.* 9(1):13-22. 2002.

SAN-BLAS, G.; NINO-VEGA, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: Virulence and host response in R.L. 2001

WANG, E. MARINCOLA FM. Amplification of small quantities of mRNA for expression analysis. In *DNA microarrays – a molecular cloning manual (2002)* D. Bowtell and J. Sambrook (Eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY pp 204-213.