

VALIDAÇÃO DOS DADOS DE MICROARRAY DE *Paracoccidioides brasiliensis* EXPOSTO À TELURANA RF-07 POR RT-PCR

David Aciole Barbosa¹; Daniela Leite Jabes²; Luiz Roberto Nunes³

Estudante do Curso de Ciências Biológicas; aciole.d@gmail.com¹

Orientadora do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes; danielajabes@umc.br²

Orientador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes; nunes1212@gmail.com³

Área do Conhecimento: Genética Molecular de Microrganismos

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*; Organotelurana; Microarray; qPCR

INTRODUÇÃO

O *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo termodimórfico (NUNES *et al.*, 2005) e causador da paracoccidioidomicose (PCM). O surgimento de fenótipos de resistência a drogas em fungos impede o sucesso do tratamento farmacológico tradicional e incentiva a investigação da atividade antimicrobiana de diferentes compostos, em especial quando estes compostos agem de maneira distinta dos antifúngicos convencionais (SANGLARD, 2002). Organometálicos são amplamente usados como agentes microbicidas. Os organometálicos a base de Telúrio (IV) foram pouco estudados até o momento CUNHA *et al.*, 2009). A telurana RF-07 (427,5 g/mol) é um composto hipervalente de Telúrio também chamada de organoteluroxetana RF-07. A Telurana RF-07 já foi testada para o tratamento de leishmanioses *in vivo* (PIMENTEL *et al.*, 2012), evidenciando seu potencial como um agente antimicrobiano, mas, até o momento, não há estudos descritos na literatura especializada, destinados a avaliar seu potencial antifúngico. No entanto, estudos, realizados no laboratório de Genômica do Núcleo Integrado de Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes, demonstraram que este composto é capaz de inibir o crescimento de leveduras de *P. brasiliensis* em cultura, bem como promover uma significativa alteração em seu transcriptoma, algo que foi evidenciado por estudos de hibridação em um microarranjos de DNA carregando aproximadamente 5 mil genes deste microorganismo. A técnica de Real-Time RT-PCR (Real-Time Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction) (qPCR) é amplamente usada para confirmar dados obtidos por hibridação em microarranjo de DNA (RAJEEVAN *et al.*, 2001). O presente estudo tem por alvo confirmar, por qPCR, a variação verificada por hibridação em microarray no padrão de expressão de dois genes identificados como modulados em resposta a exposição a organotelurana RF-07 e foi desenvolvido no contexto de uma série de estudos destinados a avaliar o potencial antifúngico desta droga contra leveduras de *P. brasiliensis*.

OBJETIVOS

Avaliar alterações existentes no perfil de expressão gênica do *P. brasiliensis* em resposta a diferentes concentrações da Telurana RF-07. Auxiliar experimentos destinados a estudar as alterações globais no transcriptoma de *P. brasiliensis*, através de experimentos de hibridação em microarranjos de DNA. Confirmar, por qPCR, a

variação verificada no padrão de expressão de dois genes identificados como modulados em resposta a exposição a duas concentrações da organotelurana RF-07.

METODOLOGIA

Foi cultivado o isolado Pb18 de *Paracoccidioides brasiliensis*, na fase leveduriforme, em meio de cultura sólido YPD modificado (0,5% de extrato de levedura, 0,5% de peptona, 1,5% de dextrose e 2% de ágar, pH 6,3) a 37° C, com repiques semanais. Foram realizadas curvas de crescimento baseadas na densidade ótica a 600 nm das culturas leveduriformes de Pb18 em meio YPD modificado com adição de Telurana RF-07 nas concentrações de 2 µM e 5 µM. O RNA do fungo de cada réplica experimental foi submetido a extração e purificação e foi usado para síntese de cDNA marcado com fluoróforos Cy3-dCTP ou Cy5-dCTP. O cDNA marcado foi usado para hibridação e análise dos microarranjos. Experimentos de qPCR foram realizados para validar os resultados das hibridações em microarranjo e para avaliar a variação dos níveis transcricionais de alguns genes de interesse, em resposta à exposição de *P. brasiliensis* a diferentes concentrações de RF-07. Os cDNAs utilizados nestes ensaios foram produzidos a partir de reações de RT-PCR realizadas com amostras de RNA derivadas das diferentes condições experimentais avaliadas neste estudo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A administração da droga Telurana RF-07 causou diminuição no crescimento do *P. brasiliensis* de maneira dose-dependente. A concentração de 5 µM da droga afetou mais acentuadamente o crescimento do fungo e a expressão dos genes do cluster 3 (figura 3). Apesar da variedade de produtos finais, a primeira reação da produção de esfingolipídios realizada pela *Spt* é conservada desde mamíferos até fungos. Por esta razão, considera-se que a *Spt* seja a enzima chave para regulação do conteúdo de esfingolipídeos, tanto em fungos quanto nos eucariotos em geral (HANADA, 2003). *Sur2* é o gene que transcreve a enzima que canaliza a reação de hidroxilação da diidroesfingosina (ou diidroceramida) em fitoesfingosina (ou fitoceramida). Mutações no gene *Sur2* alteraram os padrões de resistência em *Saccharomyces cerevisiae* à ação do antifúngico Siringomicina E (SRE), pois a C4-hidroxilação garante que a membrana da levedura seja íntegra, morfologicamente inalterada e resistente à detergentes (GRILLEY *et al.*, 1998; IDKOWIAK-BALDYS, *et al.*, 2004). Ao analisar os resultados dos microarranjos, comparando-os com os resultados de qPCR, verificou-se que ambas as técnicas obtiveram valores próximos de variação de expressão dos genes estudados após o tratamento com Telurana RF-07 (figura 5). No entanto, os valores de desvio-padrão obtidos pela técnica de hibridação em microarranjo são muito elevados, comprometendo sua interpretação em alguns casos. Esta situação é mostrada durante a análise de variação de expressão do gene *Sur2*, demonstrando uma validação quantitativa dos resultados. Qualitativamente, somente para o gene *Sur2*, o desvio-padrão não permite concluir se o gene é sub- ou super-regulado nestas condições. A análise de qPCR ajuda a dirimir esta questão, mostrando que o gene é, de fato, sub-regulado quando o fungo é exposto a esta concentração da droga. Esta discordância mínima é comum em estudos comparativos destas duas metodologias, e já foi vista inclusive em análises transcricionais de *P. brasiliensis* feitas por Leite (2005) e Oliveira (2009), porém ainda assim estes autores encontraram alta similaridade entre resultados das duas técnicas.

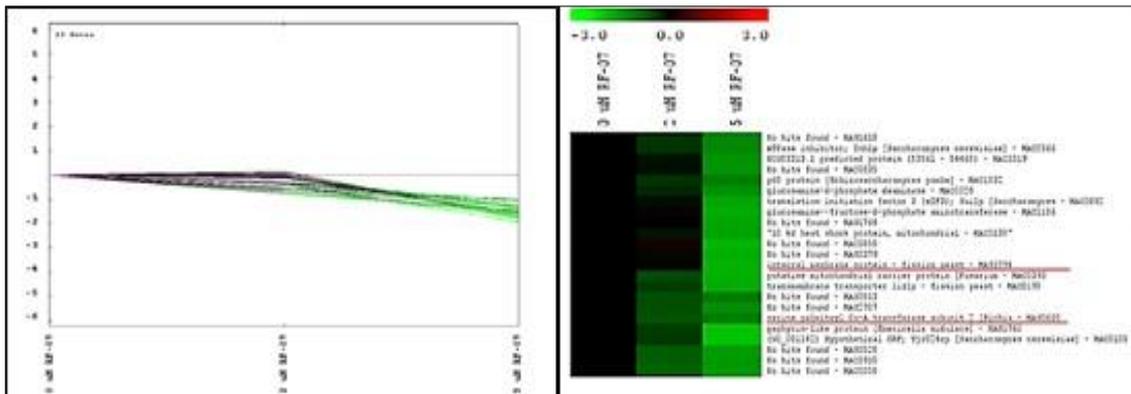


Figura 3 – Cluster 3 e seus genes com expressão diminuída em resposta a Telurana RF-07. O gráfico a esquerda representa o perfil transcricional dos genes, que estão descritos a direita. Os genes MAS1094 e MAS0610, que serão discutidos adiante, estão destacados.

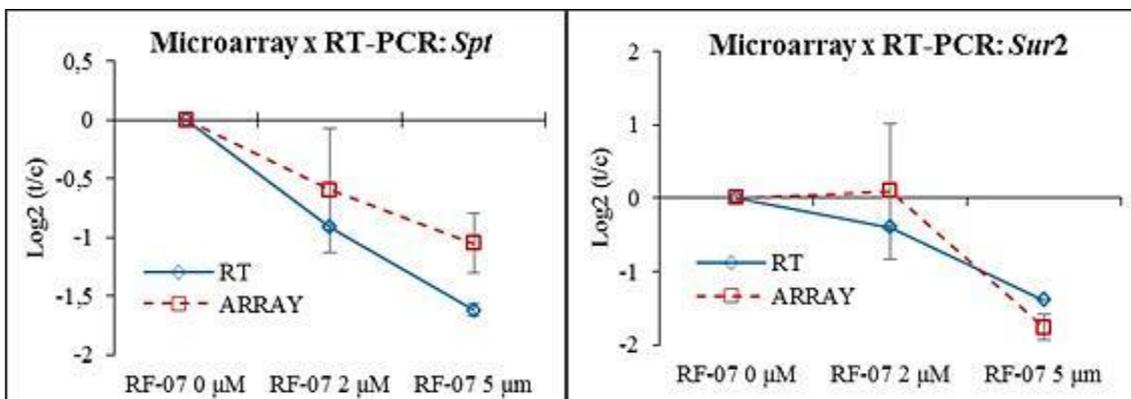


Figura 5 – Comparação da variação do perfil transcricional dos genes *Spt* (esquerda) e *Sur2* (direita) avaliada pela técnica de microarranjos e por qPCR. No eixo x estão colocadas as diferentes concentrações de Telurana RF-07 ao qual o fungo foi exposto; no eixo y está o logaritmo na base 2 da razão entre expressão dos genes na cultura tratada (t) e expressão na cultura controle (c).

CONCLUSÕES

Nossos resultados indicam que a telurana RF-07 é capaz de inibir de maneira significativa o crescimento de *Paracoccidioides brasiliensis*, em concentrações de apenas 2 μM. Estudos de hibridação em microarranjos de DNA mostram que a expressão de mais de 400 genes é afetada quando o fungo é exposto a concentrações de 2 e 5 μM desta droga, o que equivale a uma alteração de aproximadamente 10% do transcriptoma oriundo dos biochips do fungo. Dentre os genes sub-regulados em resposta à RF-07, há pelo menos dois genes (*Spt* e *Sur2*) envolvidos na produção de esfingolipídeos – importantes componentes estruturais da membrana fúngica e cuja produção pode ser um eficiente alvo para abordagens quimioterápicas. Experimentos de qPCR confirmaram a sub-regulação dos genes *Spt* e *Sur2* em resposta à presença de RF-07, sugerindo que um dos mecanismos pelos quais o fungo pode estar afetando o crescimento do *P. brasiliensis* pode estar relacionado à inibição na produção de esfingolipídeos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CUNHA, R. L. O. R.; GOUVEA, I. E.; JULIANO, L. A glimpse on biological activities of tellurium compounds. **An. Acad. Bras. Cien.**, v. 81, n. 3, p. 393-407, 2009.

D'AMBROSIO, C.; GATTA, L.; BONINI, S. The future of the microarray technology: networking the genome search. **Allergy**, v. 60, n. 10, p. 1219-1226, 2005.

GRILLEY, M. M.; STOCK, S. D.; DICKSON, R. C.; LESTER, R. L.; TAKEMOTO, J. Y. Syringomycin action gene SYR2 is essential for sphingolipid 4-hydroxylation in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.** v. 273, n. 18, p. 11062- 11068, 1998.

HANADA K. Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1632, n. 1-3, p. 16-30, 2003.

IDKOWIAK-BALDYS, J.; GRILLEY, M; TAKEMOTO, J. Sphingolipid C4 hydroxylation influences properties of yeast detergent-insoluble glycolipid-enriched membranes **FEBS Lett.**, v. 569, p. 272–276, 2004.

LEITE, D. B.; NUNES, L. R. (Orient.). Análise da transição micélio-levedura do fungo patogênico humano *Paracoccidioides brasiliensis* através de hibridação em microarranjos de DNA. Mogi das Cruzes, 2005 79 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Mogi das Cruzes, 2005.

NUNES, L. R.; COSTA DE OLIVEIRA, R.; LEITE, D. B.; DA SILVA, V. S.; DOS REIS MARQUES, E.; DA SILVA FERREIRA, M. E.; RIBEIRO, D. C.; DE SOUZA BERNARDES, L.A.; GOLDMAN, M.H.; PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L. R.; BATISTA, W. L.; NÓBREGA, M. P.; NOBREGA, F. G.; YANG, D. Y.; DE BRAGANÇA PEREIRA, C. A.; GOLDMAN, G. H. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. **Eukaryot Cell**. v. 4, p. 2115 – 2128, 2005.

OLIVEIRA, M. V. D. Análise do perfil transcricional de *Paracoccidioides brasiliensis* em resposta ao estresse oxidativo. 2009. 171 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, 2009.

PIMENTEL, I. A. S.; PALADI, C. D. S.; KATZ S., JÚDICE W. A. D. S.; CUNHA R. L. O. R.; BARBIÉRI, C. L. (2012) *In Vitro* and *In Vivo* Activity of an Organic Tellurium Compound on *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **PLoS ONE** v. 7, n. 11: e48780. 2012. doi:10.1371/journal.pone.0048780.

RAJEEVAN, M. S.; VERNON, S. D. TAYASAVANG, N. UNGER, E. R. Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR. **J. Mol. Diagn.** v. 3, n. 1, p. 26-31, 2001.

SANGLARD, D. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. **Curr. Opin. Microbiol.** v. 5, p. 379-385, 2002.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelas bolsas de estudo, à FAPESP pelo apoio financeiro no desenvolvimento do projeto, aos amigos, colegas e professores pelo incentivo e pelo aprendizado.