

PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL PARA A DETECÇÃO DE MEDIADORES DA RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Maria Carolina Mota dos Santos (PIBIC/FA), Camila Alves Mota (Coorientadora), Thaís Gomes Verzignassi Silveira (Orientadora), e-mail: tgvsilveira@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde / Maringá, PR.

Área: Farmácia, Subárea: Análise Toxicológica.

Palavras-chave: Doenças negligenciadas, leishmaniose cutânea, PCR em tempo real.

Resumo:

As leishmanioses são zoonoses negligenciadas que se apresentam na forma clínica tegumentar ou visceral, têm diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* como agentes etiológicos e insetos do gênero *Lutzomyia* como vetores. O curso da doença depende da interação entre o parasito e a resposta imune do hospedeiro, regulada por vários mediadores. Nesse estudo, padronizou-se a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) para avaliação da expressão gênica dos alvos HIF-1 α , iNOS, arginase, e citocinas INF- γ , IL-10, IL-12 e IL-17 em hamsters infectados por cepas de *Leishmania (Viannia)*. A escolha da concentração otimizada dos iniciadores *forward* e *reverse*, sendo de 400 nM para ambos, se deu pela combinação desses que gerou menor *threshold cycle* (Ct) e maior *slope* (ΔRn). Na construção da curva-padrão do HIF-1 α , arginase, IFN- γ , IL-12 e IL-17 a diluição seriada 1:5 da amostra de cDNA foi feita em seis pontos, partindo-se da concentração de 200 ng para o HIF-1 α e 100 ng para os outros alvos. No caso da iNOS e IL-10, partindo-se de 200 ng e 100 ng, respectivamente, a diluição foi 1:4, também em seis pontos. As reações foram realizadas em duplicata. A eficiência da qPCR variou de 94,8% a 104,9%. As curvas-padrão são necessárias para as análises de amostras por qPCR em estudos sobre o envolvimento dos mediadores propostos na resposta desencadeada por diferentes espécies de leishmania, algo fundamental à pesquisa de novos alvos terapêuticos e profiláticos para a leishmaniose tegumentar.

Introdução

As leishmanioses são zoonoses negligenciadas, do grupo de doenças infecciosas, não contagiosas e apresentam-se na forma clínica tegumentar ou visceral. Diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*

podem ser agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar (LT) e insetos hematófagos do gênero *Lutzomyia* são seus vetores. No Brasil, encontram-se dois principais subgêneros envolvidos nos casos humanos, *Leishmania Viannia* (L.V.) e *Leishmania Leishmania* (L.L.).

O curso da LT depende da interação entre parasito e resposta imune do hospedeiro, regulada por várias citocinas e enzimas. Como uma resposta eficiente ao controle da infecção, aponta-se a ação controlada das células T *helper* 1, que produzem a interferon-gama (IFN- γ), ativando os macrófagos e estimulando a produção de óxido nítrico (NO) pela enzima NO sintase induzida (iNOS) (Scott et al, 2016). O fator induzido por hipóxia 1 (HIF-1) está envolvido na resposta celular à hipóxia, condição comum em doenças infecciosas. Estudos apontam que há respostas diferentes à hipóxia e ao HIF-1 α conforme a espécie de leishmania envolvida e as condições do microambiente tecidual (Knight; Stanley, 2019; Santos et al, 2017).

Apesar de existirem vários estudos, ainda é preciso melhor compreensão da regulação da resposta imune desencadeada pela leishmania, além de que, dado a capacidade dos parasitos de evasão à resposta adaptativa, a LT possui caráter crônico. A reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) permite analisar a expressão de genes, essencial ao estudo de respostas imunes. Inicialmente, este estudo objetivou padronizar a qPCR a fim de analisar a expressão de determinados mediadores imunológicos a partir de amostras de lesão de pacientes diagnosticados com LT. No entanto, devido as dificuldades em conseguir material genético suficiente à construção das curvas-padrão para tal avaliação na LT humana, preliminarmente padronizamos a qPCR utilizando o RNA obtido de hamsters infectados por cepas de *Leishmania* (*Viannia*). Dessa forma, padronizou-se a qPCR para avaliar a expressão gênica dos alvos HIF-1 α , iNOS, arginase, e citocinas INF- γ , IL-10, IL-12 e IL-17.

Materiais e métodos

Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total dos macerados de pata e linfonodo dos hamsters foi extraído com Trizol® Reagent (Thermo Fisher Scientific) de acordo com protocolo do fabricante. A concentração do RNA foi medida em fluorímetro Qubit 2.0, com Qubit™ RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). A reação de transcriptase reversa para síntese de cDNA teve volume final de 20 μ L de acordo com High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), em que são usados 2,0 μ L de RT Buffer; 0,8 μ L de dNTP Mix; 2,0 μ L de RT Random Primers; 1,0 μ L de MultiScribe™ Reverse Transcriptase; 1,0 μ L de RNase Inhibitor e 3,2 μ L de H₂O livre de nucleases, sendo completados com 10 μ L de RNA a 200 ng/ μ L. A reação de síntese foi realizada em termociclador Veriti® (Applied Biosystems) a 50 °C por 45 min, seguidos de 70 °C por 15 min.

Padronização dos ensaios de qPCR

Foram usados iniciadores específicos para a quantificação relativa do mRNA dos alvos. Primeiramente, concentrações diferentes de cada iniciador foram testadas e otimizadas. A qPCR teve volume final de 10 μ L, contendo 5 μ L de SYBR Green Select Master Mix (Thermo Fischer Scientific), 1 μ L do iniciador *forward* e 1 μ L do iniciador *reverse*, 2 μ L de água ultrapura e 1 μ L de cDNA. A reação foi feita no StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) nas condições de ciclagem padrão do software. No final da amplificação, avaliou-se a especificidade e eficiência da reação.

Aspectos éticos

Este projeto fez parte de um projeto de doutorado aprovado (Parecer 2.392.327) pelo Comitê de Conduta Ética no uso de Animais em experimentação (CEUA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM) sob o número de 3062060916.

Resultados e Discussão

A otimização dos iniciadores *forward* e *reverse* se deu com testes de diferentes combinações de concentrações, a fim de se escolher aquela que gerasse menor *threshold cycle* (Ct) dentro de uma faixa de confiança e maior *slope* (ΔRn). Para todos os iniciadores, foi escolhida a combinação em que a concentração foi de 400 nM tanto para o *forward* quanto para o *reverse*.

Na construção da curva-padrão do HIF-1 α , arginase, IFN- γ , IL-12 e IL-17 a diluição seriada 1:5 da amostra de cDNA foi feita em seis pontos, partindo-se da concentração de 200 ng para o HIF-1 α e 100 ng para os outros alvos. Já para o iNOS e IL-10, partindo-se de 200 ng e 100 ng, respectivamente, a diluição foi 1:4, também feita em seis pontos. A reação foi realizada duas vezes e em dias diferentes, a fim de atestar a padronização obtendo-se uma semelhança entre as repetições. As informações sobre os iniciadores utilizados e os parâmetros de eficiência da qPCR encontram-se na Tabela 1 e as curvas de padronização obtidas estão na Figura 1.

Tabela 1 – Descrição de iniciadores usados nesse estudo e parâmetros de eficiência da qPCR na construção das curvas-padrão de detecção de mediadores imunológicos em hamsters infectados por cepas de *Leishmania* (*Viannia*).

Gene	Sequência do primer	Referência	Amplicon	Slope	Y-Inter	R ²	Eff %
HIF-1 α	Fw 5'-CAGAGCCTCCTCGTCTGAG-3' Rv 5'-CTCGCTTGTCAGGGCCAG-3'	Este estudo	82 bp	-3,48	36,44	0,99	93,8
iNOS	Fw 5'-TGAGCCACTGAGTTCTCCTAAGG-3' Rv 5'-TCCTATTTCAACTCCAAGATGTTCTG-3'	Osorio et al, 2012	93 bp	-3,31	43,04	0,98	100,2
Arg	Fw 5'-TGAGCAGCTGGCTGGTGTG-3' Rv 5'-GCCAGAGATGCTTCCAAGTCC-3'	Este estudo	100 bp	-3,46	35,02	0,99	94,2
IFN- γ	Fw 5'-TGTTGCTCTGCCTCACTCAGG-3' Rv 5'-AAGACGAGGTCCCCTCCATTC-3'	Espitia et al, 2010	130 bp	-3,47	37,93	0,99	93,9
IL-10	Fw 5'-GTTGCCAAACCTTATCAGAAATGA-3' Rv 5'-TTCTGGCCCCGTGGTTCTCT-3'	Zivicec et al, 2011	77 bp	-3,25	38,65	0,97	102,8
IL-12	Fw 5'-CTGTGTCTCTGCTGCTGTTGC-3' Rv 5'-GGACATTACAGTTGACCTTCAC-3'	Este estudo	124 bp	-3,45	36,83	0,98	94,8
IL-17	Fw 5'-GCAGTGACATGTGGAGCAGC-3' Rv 5'-CAAGGTCTCCTCGGCAGTC-3'	Este estudo	138 bp	-3,20	36,36	0,99	104,9

Notas: Coeficiente de correlação (R²) reflete a linearidade da curva-padrão, sendo ideal quanto mais próximo de 1. *Slope* e *Eff%* relacionam-se à eficiência da reação, sendo que uma eficiência próxima a 100% equivale a um *slope* de -3,32.

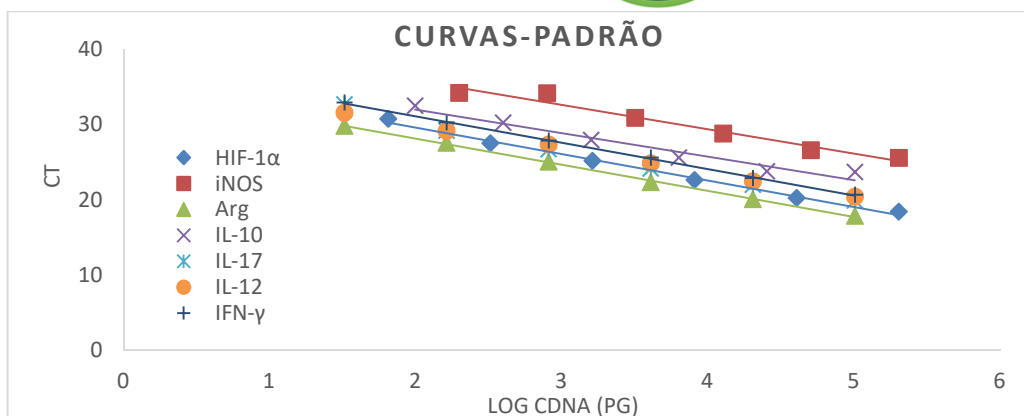


Figura 1 – Curvas de padronização de ensaios qPCR para análise da expressão gênica dos alvos HIF-1 α , iNOS, Arginase, IL-10, IL-17, IL-12 e interferon- γ de hamsters infectados por cepas da *Leishmania (Viannia)*.

Conclusões

As curvas-padrão são necessárias para as análises de amostras por qPCR. Nossos resultados mostraram que a qPCR para a detecção dos alvos propostos está padronizada e pode ser utilizada para a pesquisa de mediadores da resposta imune induzida por cepas da *Leishmania (Viannia)*, possibilitando estudos sobre o envolvimento desses mediadores na resposta desencadeada por diferentes espécies de leishmania. A melhor compreensão do papel do HIF-1 α na resposta frente à LT pode levar a proposta de novos alvos terapêuticos e profiláticos para a LT.

Agradecimentos

À Fundação Araucária, pelo incentivo à pesquisa e pela bolsa de Iniciação Científica concedida. Ao Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá e ao Laboratório de Imunologia Clínica e Leishmanioses por proporcionar o espaço e recursos de pesquisa.

Referências

- KNIGHT, M.; STANLEY, S. HIF-1 α as a central mediator of cellular resistance to intracellular pathogens. **Current opinion in immunology**, v. 60, p. 111-116, 2019.
- SANTOS, S. A. dos; ANDRADE JÚNIOR, D. R. de. HIF-1 α and infectious diseases: a new frontier for the development of new therapies. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, 2017.
- SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581-592, 2016.