

DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE PCR QUANTITATIVA PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE DA INTERLEUCINA 22

Beatriz Montagna Santana da Silva (PIBIC/FA/UEM), Julyane Schavaren, Mariana de Souza Terron, Larissa Danielle Bahls Pinto (Orientador). E-mail: ldbpinto@uem.br.

[1] Comentário: Ao menos adicionar nome da Aleia e Guilherme.

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

Imunologia/Imunogenética

Palavras-chave: Análise de expressão gênica; Inflamação; PCR em Tempo Real

RESUMO

A interleucina 22 (IL-22) é uma citocina envolvida na manutenção da integridade das barreiras epiteliais, no reparo tecidual e na defesa contra infecções, estando associada à resposta imune em doenças inflamatórias e infecciosas. Considerando a relevância de sua expressão gênica, o presente projeto teve como objetivo desenvolver e otimizar um protocolo de PCR em tempo real quantitativa (qPCR) para análise da expressão de IL-22. Trata-se de uma pesquisa experimental de caráter metodológico, iniciada com levantamento bibliográfico e planejamento laboratorial. As amostras foram obtidas a partir de Buffy Coat e PBMC, previamente armazenados em TRIzol. O RNA total foi extraído segundo protocolo do fabricante, tratado com DNase para remoção de DNA genômico e submetido à avaliação de concentração e pureza no espectrofotômetro NanoDrop, além de verificação da integridade em gel de agarose a 1%. As razões 260/280 indicaram boa qualidade para a maioria das amostras de Buffy Coat (1,81 a 1,86), embora uma amostra tenha apresentado menor rendimento, enquanto as de PBMC não puderam ser analisadas por erro de pipetagem. Em seguida, foi realizada a síntese de cDNA a partir do RNA tratado, obtendo-se material adequado para as etapas subsequentes de padronização da qPCR. Dessa forma, os resultados obtidos até o momento confirmam a viabilidade do protocolo de extração e conversão do RNA, estabelecendo as bases para a análise da expressão do gene IL-22 em futuros ensaios, contribuindo para a compreensão de seu papel na resposta imune.

INTRODUÇÃO

A interleucina 22 (IL-22) é uma citocina produzida principalmente por células linfóides inatas do tipo 3 (ILC3) e linfócitos T auxiliares ativados, especialmente Th17 (SHABGAH et al., 2017). Essa molécula exerce papel fundamental na manutenção da homeostase de barreiras epiteliais, participando da ativação de células epiteliais, indução de genes relacionados à defesa antimicrobiana, reparo tecidual e regulação de processos inflamatórios, particularmente em infecções virais (XUAN et al., 2021).

Evidências apontam que alterações na expressão do gene IL22 estão associadas à suscetibilidade e ao prognóstico de diferentes doenças, incluindo a espondilite anquilosante, na qual níveis elevados de IL-22 foram descritos tanto no plasma quanto em tecidos de pacientes, sugerindo sua participação na inflamação crônica e destacando seu potencial como biomarcador diagnóstico e prognóstico (ZHANG et al., 2012). Considerando a relevância desse marcador imunológico, o presente projeto tem como objetivo desenvolver e otimizar uma reação de PCR em tempo real quantitativa (qPCR) para avaliação da expressão gênica de IL22, configurando-se como uma pesquisa experimental de caráter metodológico com potencial aplicação em estudos de resposta imune, doenças infecciosas e autoimunes.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Desenho de primers para o gene da IL-22.

Foi realizada uma busca da sequência FASTA do gene *RUNX1*, no *GeneBank* para desenho de *primers* específicos que flanqueiam as regiões mutadas de interesse. As melhores sequências foram avaliadas usando os *softwares* *Primer-BLAST*, *Multiple Primer Analyzer* e *OligoAnalyzer*. O uso dessas ferramentas possibilitou a determinação da temperatura de *melting*, proporção de citosina/guanina, formação de fragmentos de DNA inespecíficos, *self-dimer*, *hetero-dimer* e *hairpin*.

[2] Comentário: ?????

2. Extração de ácidos nucleicos e síntese de cDNA

O RNA foi extraído de amostras de Buffy Coat e PBMC de pacientes com Espondilite Anquilosante, participantes de estudos anteriores, utilizando TRIzol, seguindo protocolo do fabricante. Após centrifugação e separação das fases, o RNA foi precipitado com isopropanol, lavado com etanol 80% e armazenado a -80 °C. A integridade e concentração do RNA foram avaliadas por NanoDrop. As amostras foram tratadas com DNase I para remoção de DNA genômico residual e, posteriormente, submetidas à transcrição reversa com *random primers*, gerando cDNA. O êxito da síntese de cDNA foi avaliado por meio de eletroforese em gel de agarose e posteriormente as amostras foram armazenadas a -25°C para análises subsequentes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o desenho, análise e seleção dos *primers*, foram adquiridos os pares de iniciadores presentes na tabela 1.

Nome do <i>primer</i>	Sequência (5' - 3')
Forward primer	GCCCTATATCACCAACCGCA
Reverse primer	CAGATAGCAGCGCTCACTCA

As amostras de RNA de pacientes com Espondilite Anquilosante foram obtidas para validação da técnica de qPCR para a avaliação de expressão gênica da IL-22. A qualidade do RNA obtido avaliada no NanoDrop mostrou razões 260/280 adequadas para as amostras EA07, EA08 e EA09, obtidas do *Buffy Coat* (variando de 1,81 a 1,86), com concentrações entre 118,6 e 154,4 ng/μL. A amostra EA10 apresentou concentração mais baixa (22,3 ng/μL e razão 1,68), e as amostras de PBMC apresentaram erro de pipetagem, e consequente amostra insuficiente. Todas as amostras obtidas por meio do *Buffy Coat* tiveram êxito na extração do RNA, pois foi observado um arraste de RNA e duas bandas evidentes, 18S e 28S, correspondentes ao RNA ribossômico, por meio da eletroforese em gel de agarose (Figura 1.)



Figura 1- Eletroforese do RNA em gel de agarose. As bandas visíveis nas amostras BC EA07, BC EA08 e BC EA09, correspondem as duas bandas 18S e 28S do RNA ribossômico. LD: Padrão de peso molecular; PMBC: amostras obtidas a partir do isolamento de células mononucleares do sangue periférico; BC: amostras obtidas a partir do *Buffy Coat*.

Após a obtenção das amostras e dos *primers*, foram realizadas tentativas de padronização das condições de PCR para a detecção da expressão gênica da IL-22, entretanto, não foi observada positividade das bandas de interesse. Isso pode ter ocorrido por uma falha no desenho do *primer* ou devido a amostra utilizada ser negativa para a expressão do gene. Um novo *par de primer* está sendo desenhado para retomada dos testes afim de obter a padronização da técnica.

Formatado: Fonte: Itálico

Formatado: Fonte: Itálico

CONCLUSÕES

O presente trabalho possibilitou a extração de RNA, avaliação de sua qualidade e pureza, tratamento com DNase e posterior síntese de cDNA a partir das amostras analisadas. Esses resultados demonstram a viabilidade metodológica do protocolo adotado e fornecem a base necessária para as etapas subsequentes de padronização e aplicação da qPCR na avaliação da expressão do gene IL22.

AGRADECIMENTOS





Agradeço à Fundação Araucária pelo apoio financeiro concedido por meio da bolsa de iniciação científica, bem como à orientadora Profa. Dra. Larissa Bahls, à coorientadora Profa. Dra. Mariana Terron e à mestrande Julyane Schavaren pela orientação, acompanhamento e contribuições fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

(SHABGAH, A. G.; NAVASHENAG, J. G.; SHABGAH, O. G.; MOHAMMADI, H.; SAHEBKAR, A. Interleukin-22 in human inflammatory diseases and viral infections. Autoimmunity Reviews, v. 16, p. 1209-1218, 2017.

XUAN, X.; ZHANG, L.; TIAN, C.; WU, T.; YE, H.; CAO, J. et al. Interleukin-22 and connective tissue diseases: emerging role in pathogenesis and therapy. Cell and Bioscience, v. 11, p. 1-13, 2021.

ZHANG, L.; LI, Y. G.; LI, Y. H.; QI, L.; LIU, X. G.; YUAN, C. Z. et al. Increased frequencies of Th22 cells as well as Th17 cells in the peripheral blood of patients with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. PLoS One, v. 7, n. 4, e31000, 2012.