

DESEMPENHO DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL NA QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À RESPOSTA IMUNE INDUZIDA POR ANTÍGENOS DE *Leptospira interrogans*

HARTWIG, Daiane Drawanz¹; OLIVEIRA, Thaís Larré¹; SEIXAS, Fabiana Kömmling²; FORSTER, Karine Maciel¹; DELLAGOSTIN, Odir Antônio¹

¹Laboratório de Biologia Molecular – Centro de Biotecnologia – CDTec – UFPel

²Laboratório de Genômica funcional – Centro de Biotecnologia – CDTec – UFPel
Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900.

daiane_dh@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose causada por espécies de *Leptospira* patogênicas que infectam mamíferos (VINETZ, J.M., 2001). Humanos são geralmente infectados por contato direto ou indireto com a urina de animais, principalmente roedores, que albergam leptospirosas patogênicas em seus rins (LEVETT, P.N., 2001).

O maior foco no desenvolvimento de vacinas de nova geração contra a leptospirose são as proteínas de membrana externa (OMPs) (BETHLEM, E.P.; CARVALHO, C.R., 2000). Dentre elas, nosso grupo tem trabalhado com vários alvos, os quais podem ser apresentados sob diferentes formas ao sistema imune, como: vacina de subunidade, vacina de DNA e vacinas vetorizadas, das quais destacamos a utilização de *Mycobacterium bovis* BCG como vetor vacinal.

Para leptospirose o que se busca é uma vacina que confira tanto uma resposta imune humoral quanto celular. Com base na técnica de PCR em tempo real, o perfil de resposta imune tem sido avaliado para uma série de antígenos de *Leptospira* (FAISAL, S.M. et al., 2008; FAISAL, S.M. et al., 2009a; FAISAL, S.M. et al., 2009b; FAISAL, S.M. et al., 2009c; YAN, W. et al., 2009; YAN, W. et al., 2010).

Nosso objetivo neste estudo foi avaliar o desempenho da reação de PCR em tempo real, também conhecida como qPCR (PCR quantitativa), em termos de eficiência, intervalo de precisão linear e sensibilidade. Neste primeiro ensaio buscamos padronizar o ensaio para quatro genes (TNF- α , IFN- γ , TGF- β e β -actina), que serão posteriormente utilizados na quantificação da expressão de citocinas em hamsters, para determinar o perfil de resposta imune induzido por diferentes construções vacinais contra leptospirose.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Imunizações, cultivo de esplenócitos e PBMCs

Golden Syrian Hamsters fêmeas de seis semanas de idade (Biotério Central, UFPel) foram divididos em três grupos. Um grupo foi imunizado via intramuscular com duas doses de 80 μ g de proteína recombinante cada, acrescidas do adjuvante hidróxido de alumínio 15%, com intervalo de 21 dias entre cada dose. Um grupo (controle negativo) foi inoculado com 100 μ L de PBS-hidróxido de alumínio 15%, e outro grupo (controle positivo) foi inoculado com 10⁹ células inativadas de *L. interrogans* sorovar Copenhageni Fiocruz L1-130, via intraperitoneal. Dois animais de cada grupo foram sacrificados nos dias 1, 7, 14, 21, 28 e 42 após a segunda dose, para coletas de sangue, esplenócitos e células mononucleadas do sangue periférico (PBMCs). Os esplenócitos e PBMCs foram processados para cultivo de acordo com

Bastos et al. (2002). As células foram estimuladas com MEM (controle negativo), 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Concanavalina A (Sigma), 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de proteína recombinante, 100 μL de PBS ou 10^4 células de *L. interrogans* inativadas, durante 72 horas, sendo então coletadas com TRI Reagent (Ambion) e armazenadas a $-70\text{ }^\circ\text{C}$.

Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total do sangue foi isolado utilizando RiboPureTM-Blood kit (Ambion) e a extração de RNA dos esplenócitos e das PBMCs foi realizada com TRI Reagent (Ambion), ambos de acordo com as instruções do fabricante. O RNA extraído foi tratado com 8 U/ μL de DNase I (Applied Biosystems) a $37\text{ }^\circ\text{C}$ por 10 min e quantificado utilizando QubitTM Fluorometer (Invitrogen). A síntese de cDNA foi realizada utilizando High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems), segundo instruções do fabricante. A síntese de cDNA foi feita em reações de 20 μL (1 μg de RNA total, MultiScribeTM Reverse Transcriptase 50 U/ μL^{-1} , tampão RT $10 \times 2\text{ } \mu\text{L}$, dNTPs 100 mM, RT Random Primers $10 \times 2\text{ } \mu\text{L}$) com ciclos de incubação de $25\text{ }^\circ\text{C}$ por 10 min, $37\text{ }^\circ\text{C}$ por 120 min e $85\text{ }^\circ\text{C}$ por 5 min.

PCR quantitativo em tempo real

As amplificações por PCR em tempo real e as análises foram realizadas no equipamento Mx3005P (Stratagene). Todas as reações foram realizadas utilizando SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) com reações de 12,5 μL (cDNA 0,5 μL , Master Mix 10 μL , 10 pmol de cada *primer*). As condições de amplificação consistiram de uma pré-incubação a $95\text{ }^\circ\text{C}$ por 10 min, seguida pela amplificação do DNA alvo em 45 ciclos ($95\text{ }^\circ\text{C}$ por 10 min, $60\text{ }^\circ\text{C}$ por 30 seg e um período de extensão variável a $72\text{ }^\circ\text{C}$). A curva de *melting* foi realizada imediatamente após a amplificação com uma taxa de transição de temperatura linear de $0,1\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$ de 55 à $95\text{ }^\circ\text{C}$ com determinação contínua da aquisição da fluorescência.

Eficiência de amplificação

Com o intuito de avaliar a eficiência da reação de amplificação de cada gene-alvo (β -actina, TNF α , IFN γ e TGF β), foram realizadas diluições seriadas de cDNA, para amplificação nas mesmas condições acima citadas. O gráfico gerado pela concentração de cDNA e os respectivos valores de CT foram empregados para o cálculo da equação de regressão e a correlação entre as variáveis pelo R-quadrado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar o desempenho da reação de qPCR em termos de eficiência, intervalo de precisão linear de quantificação e sensibilidade, dados gerados a partir de uma diluição seriada de amostras com concentrações conhecidas (curva padrão) são um excelente meio de determinação do desempenho global de um ensaio de qPCR. A série de diluições deve abranger uma ampla gama de concentrações (no mínimo 4 pontos) para garantir que a reação seja executada em igual eficiência para diferentes concentrações. O ideal é que as concentrações testadas tenham os mesmos níveis que os das amostras alvo. Para obter resultados reprodutíveis e com exatidão, a eficiência da reação deve ser próxima a 100%, ou seja, a quantidade de DNA deve duplicar após cada ciclo da fase exponencial.

Para testar a eficiência de amplificação de cada um dos genes-alvo, diluições seriadas de cDNA foram testadas e os resultados da reação foram tabeladas para o cálculo da equação de regressão do R-quadrado (R^2). A curva padrão foi construída e o valor da inclinação da reta, que indica a sensibilidade do teste, permitiu o cálculo da eficiência da reação. A curva padrão demonstra o log da quantidade de amostra inicial contra o número de ciclos da qPCR, e é gerada pelo software MxPro. Uma

correlação linear, com um fator de inclinação da curva entre -3,1 e -3,6, que equivale a um cálculo de eficiência de reação de 90-110%, são valores aceitáveis para a maioria das aplicações que requerem quantificação exata. As equações de regressão obtidas no presente estudo estão listadas na Tabela 1 e mostram boas condições de amplificação (valores de inclinação de -3,5) e correlação positiva entre as variáveis (R^2 entre 0,95 e 0,99) observadas em pelo menos quatro diluições sucessivas, gerando uma eficiência de amplificação entre 90,2 e 92,5%. Além disso, no final dos ciclos da qPCR foi gerada a curva de dissociação que verifica a pureza do produto formado, ou seja, se existia mais de um fragmento de DNA amplificado na reação. A curva de dissociação avalia a dissociação da dupla fita de DNA com o aumento da temperatura, e o produto presente na reação é considerado puro quando apenas uma única temperatura de dissociação é encontrada.

Tabela 1. Equação de regressão, R-quadrado (R^2) e eficiência das reações de amplificação de cada gene alvo.

| Gene alvo | Equação de regressão | R^2 | Eficiência (%) |
|--------------------------------|------------------------|-------|----------------|
| B-actina | -3,516* LOG(X) + 22,46 | 0,981 | 92,5 |
| IFN-δ | -3,582* LOG(X) + 33,64 | 0,956 | 90,2 |
| TNF-α | -3,566* LOG(X) + 36,09 | 0,955 | 90,7 |
| TGF-β | -3,567* LOG(X) + 35,35 | 0,999 | 90,7 |

4. CONCLUSÕES

Foi possível padronizar a reação de qPCR em termos de eficiência, sensibilidade e precisão linear para os quatro genes avaliados, com dados aceitáveis para quantificação. Com base nos resultados gerados neste estudo serão determinadas as melhores concentrações de amplificação, e estas utilizadas nos ensaios de avaliação dos níveis de expressão de citocinas. Este estudo permitirá determinar o perfil de resposta imune induzido por diferentes vacinas contra a leptospirose.

5. REFERÊNCIAS

BASTOS RG, DELLAGOSTIN OA, BARLETTA RG, DOSTER AR, NELSON E, and OSORIO FA. Construction and immunogenicity of recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing GP5 and M protein of porcine reproductive respiratory syndrome virus. *Vaccine*, 21: 21-29, 2002.

BETHLEM EP and CARVALHO CR. Pulmonary leptospirosis. *Curr.Opin.Pulm.Med.*, 6: 436-441, 2000.

FAISAL SM, YAN W, CHEN CS, PALANIAPPAN RU, MCDONOUGH SP, and CHANG YF. Evaluation of protective immunity of *Leptospira* immunoglobulin like protein A (LigA) DNA vaccine against challenge in hamsters. *Vaccine*, 26: 277-287, 2008.

FAISAL SM, YAN W, MCDONOUGH SP, CHANG CF, PAN MJ, and CHANG YF. Leptosome-entrapped leptospiral antigens conferred significant higher levels of protection than those entrapped with PC-liposomes in a hamster model. *Vaccine*, 27: 6537-6545, 2009a.

FAISAL SM, YAN W, MCDONOUGH SP, and CHANG YF. Leptospira immunoglobulin-like protein A variable region (LigAvar) incorporated in liposomes and PLGA microspheres produces a robust immune response correlating to protective immunity. *Vaccine*, 27: 378-387, 2009b.

FAISAL SM, YAN W, MCDONOUGH SP, MOHAMMED HO, DIVERS TJ, and CHANG YF. Immune response and prophylactic efficacy of smegmosomes in a hamster model of leptospirosis. *Vaccine*, 27: 6129-6136, 2009c.

LEVETT PN. Leptospirosis. *Clin.Microbiol.Rev.*, 14: 296-326, 2001.

VINETZ JM. Leptospirosis. *Curr.Opin.Infect.Dis.*, 14: 527-538, 2001.

YAN W, FAISAL SM, MCDONOUGH SP, CHANG CF, PAN MJ, AKEY B, and CHANG YF. Identification and characterization of OmpA-like proteins as novel vaccine candidates for Leptospirosis. *Vaccine*, 28: 2277-2283, 2010.

YAN W, FAISAL SM, MCDONOUGH SP, DIVERS TJ, BARR SC, CHANG CF, PAN MJ, and CHANG YF. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant Leptospira immunoglobulin-like protein B (rLigB) in a hamster challenge model. *Microbes.Infect.*, 11: 230-237, 2009.