

ANÁLISE DE miRNA DIFERENTEMENTE EXPRESSOS EM MACRÓFAGOS INFECTADOS COM *Cryptococcus neoformans*.

Ane Wichine Acosta Garcia¹, Charley Christian Staats^{1,2}.

¹ Centro de Biotecnologia e ² Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia - Instituto de Biociências, UFRGS.



INTRODUÇÃO

A levedura *Cryptococcus neoformans* é o principal agente etiológico da criptococose, acometendo principalmente pacientes que são submetidos à terapia imunossupressora devido a transplante de órgãos, quimioterapia ou doença autoimune, assim como a portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida. Esta doença é adquirida através da inalação de esporos ou leveduras dessecadas encontradas no ambiente, em árvores como eucaliptos, solo e excretas de pombos (Perfect, 2010). O quadro clínico é caracterizado por uma infecção pulmonar primária, com a possibilidade de disseminação pelo organismo do hospedeiro, causando mais comumente meningoencefalite (Brown *et al.*, 2012).. A fagocitose exercida pelos macrófagos alveolares é a principal linha de defesa pulmonar do hospedeiro contra criptococose, sendo necessário que ocorra a reprogramação da expressão gênica nessas células para contenção da disseminação do patógeno (Nicola e Casadevall, 2012). Uma maneira de modular a resposta à infecção pode ser através de microRNAs como miR-146 e miR-155, envolvidos na regulação da imunidade inata e de ação pró-inflamatória (Monk, 2010). Sendo assim, o objetivo do trabalho foi analisar a expressão destes microRNAs em macrófagos após infecção com o patógeno *Cryptococcus neoformans*, a fim de avaliar possível modulação da resposta imune das células frente à infecção fúngica pelo mecanismo de RNAi.

RESULTADOS

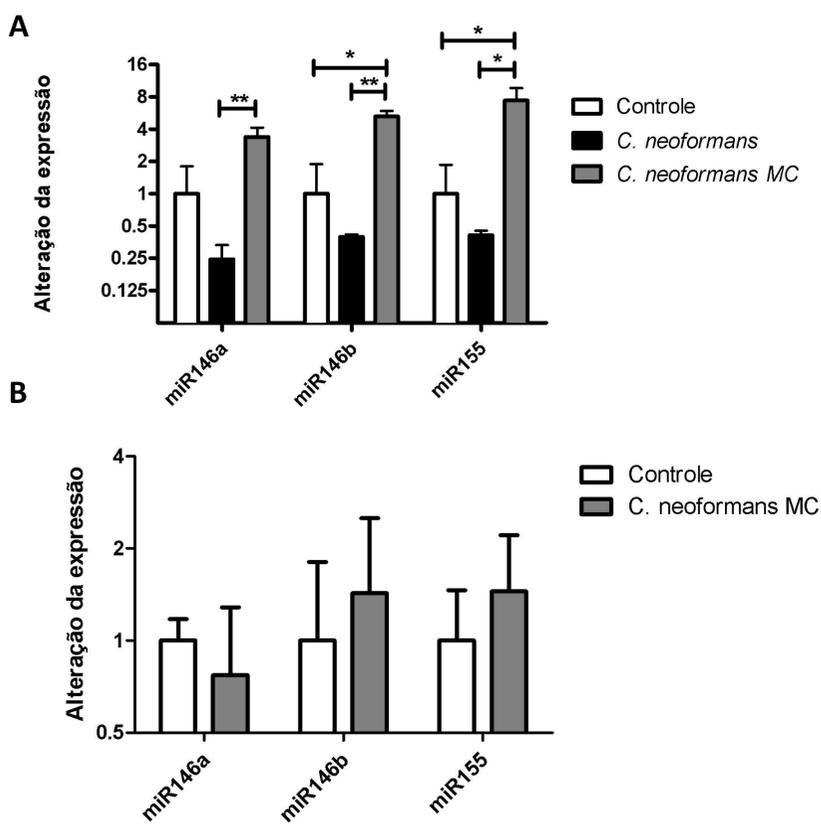


Figura 1: Níveis de miRNAs são modulados em macrófagos murinos infectados por *C. neoformans*. Análise dos níveis relativos de transcritos de miRNAs empregando qRT-PCR após 4 horas e 24 horas de interação entre macrófagos J774.1A e *C. neoformans* H99. (A) No tempo de 4 horas observa-se que houve diferença na expressão dos três microRNAs analisados nas condições avaliadas. Todos apresentaram expressão diferenciada nas condições com a presença de *C. neoformans*, sendo detectados níveis de transcritos mais elevados na condição da infecção com patógeno inativado por calor (*C. neoformans* MC). Os microRNAs miR-146b e miR-155 também apresentaram diferença significativa quando comparadas as condições controle e *C. neoformans* MC, o que sugere que os macrófagos possuem mecanismos de modulação por RNAi diferenciados conforme a condição de infecção fúngica imposta. (B) Os níveis de transcritos não apresentaram diferença estatística significativa entre as condições controle e *C. neoformans* MC, contudo, é possível observar que entre os microRNAs analisados, o miR146b apresentou maior expressão em ambas condições quando comparado aos demais. As barras representam as médias e desvio padrão obtidos a partir de 3 réplicas técnicas de 3 réplicas biológicas. Expressão relativa baseada em 2- Δ Ct a partir de dados do normalizador snRNP U6. A análise estatística foi realizada por Student t test: (*) $p < 0.05$ e (**) $p < 0.001$.

CONCLUSÕES

Os miRNAs miR-146a, miR-146b e miR-155 se apresentaram diferencialmente expressos em macrófagos murinos infectados por *C. neoformans*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Perfect, J. R. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. Clin Infect Dis, v. 50, n. 3, p. 291-322, Feb 2010.
- Brown, G. D. et al. Hidden killers: human fungal infections. Sci Transl Med, v. 4, n. 165, p. 165rv13, Dec 2012.
- Nicola, A. M.; Casadevall, A. In vitro measurement of phagocytosis and killing of *Cryptococcus neoformans* by macrophages. Methods Mol Biol, v. 844, p. 189-97, 2012. ISSN 1940-6029.
- Monk CE, Hutvagner G, Arthur JS, Regulation of miRNA transcription in macrophages in response to *Candida albicans*, PLoS One 5 (2010) e13669.

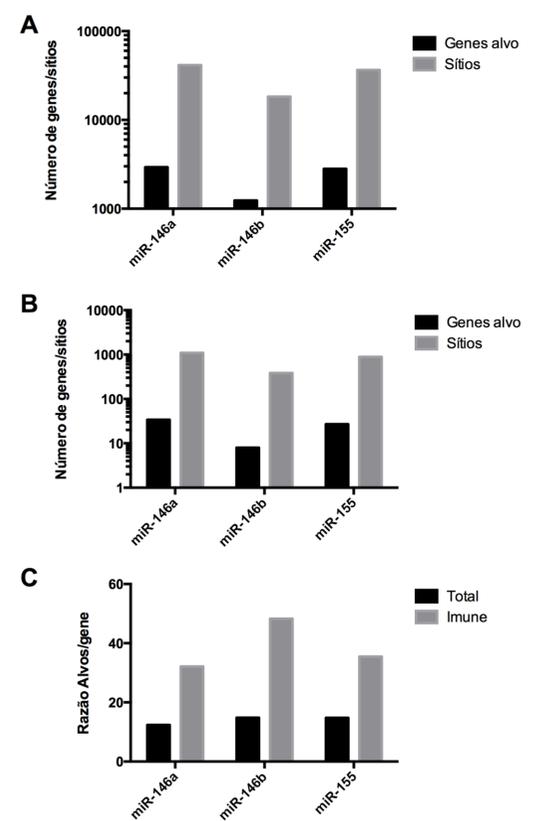


Figura 2: Os microRNAs cuja expressão é modulada em macrófagos murinos infectados por *C. neoformans* apresentam um grande número de alvos. Análise da relação quantitativa entre o número de sítios alvo e genes alvo de cada miRNA de forma geral e relacionados à resposta imune. É possível observar diversas possibilidades de ligação dos miRNAs para regulação dos genes alvo, devido a grande quantidade de sítios alvo presentes. (A) Relação entre o número de sítios alvo e de genes alvo totais para cada miRNA de estudo. (B) Relação entre o número de sítios alvo e de genes alvo relacionados à resposta imune para cada miRNA de estudo, notando-se uma proporção mantida pelas quantidades nos três miRNAs analisados. (C) Razão entre o número de sítios e genes alvo, comparando os dados para quantidades totais e relacionadas à resposta imune. Observa-se que referente aos dados totais, a razão se mantém bastante semelhante, contudo mais baixa do que a razão apresentada pelos dados relacionados à imunidade, no qual destaca-se a razão apresentada pelo miR-146b.

PERSPECTIVAS

- Avaliar o efeito da indução da expressão de microRNAs em macrófagos por estimuladores do sistema imune INF- γ e LPS;
- Avaliar a funcionalidade dos microRNAs com expressão alterada pela quantificação da expressão do gene alvo da ectodisplasia A (Eda).