

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

LETICIA SUMIE SATO

**“PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE PCR EM TEMPO REAL PARA
AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DA PROTEÍNA DASH DE *Histoplasma*
capsulatum”**

ORIENTADORA: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida
CO-ORIENTADORA: Nayla de Souza Pitangui

ARARAQUARA

2016

LETICIA SUMIE SATO

**“PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE PCR EM TEMPO REAL PARA
AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DA PROTEÍNA DASH DE *Histoplasma*
capsulatum”**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica. Orientadora: Profª. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida. Co-orientadora: Nayla de Souza Pitangui.

ARARAQUARA

2016

DEDICATÓRIA E AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família por todo o apoio e carinho. Meus pais Yasuo e Daisy, meu irmão Felipe e meus avós Mario e Júlia que com todo o amor do mundo me ensinam dia a dia o significado de união, companheirismo e família.

À minha orientadora e professora de sala de aula, Ana Marisa Fusco Almeida, que me ensinou tanto, me apoiou e acreditou no meu trabalho. À Nayla de Souza Pitangui, co-orientadora deste projeto que me recebeu e me acolheu de uma maneira que só tenho a agradecer, me guiando e me ensinando coisas novas todos os dias. Agradeço a paciência e compreensão e o auxílio do primeiro ao último dia dentro do laboratório, vocês foram incríveis mentoras durante todo o processo.

Ao laboratório de Micologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP Araraquara, todos me auxiliaram em cada etapa do projeto. Em especial agradeço Janaina Sardi, Jaqueline Derissi, Claudia Tavares, Haroldo Oliveira e Suélem Rossi por me auxiliarem em etapas específicas do projeto. Todos sempre solícitos, amigos e companheiros. Meu muito obrigada.

À professora Clarice Queico Fujimura Leite, minha orientadora no laboratório de micobactérias e professora em sala de aula que me abraçou e me recebeu desde meu primeiro dia de faculdade e me ensinou coisas que levo para a vida. Ao professor Fernando Pavan, meu mentor no laboratório de micobactérias, que me ensinou muito sobre microbiologia e me apoiou em todas as etapas da minha faculdade. Ao querido amigo Leonardo Marino, que além de nos guiar durante o curso, como veterano, me auxiliou muito em todo este projeto.

Ao laboratório de micobactérias Prof. Dr. Hugo David que foi minha casa durante meus primeiros anos, obrigada por cuidarem de mim e me ensinarem a ser uma pessoa melhor e mais forte. Adolfo Barreto, Marcelo Miyata e Nathália Mendes muito obrigada mesmo pelos quase três anos juntos, amigos companheiros que levarei para a vida.

Às minhas grandes e queridas amigas Akemi, Ligia, Maisa, Patrícia, Simone que sempre me apoiaram e me aconselharam em cada novo projeto, cada novo desafio, com todo o amor, carinho e delicadeza.

Ao Bruno, meu namorado e melhor amigo, meu companheiro de problemas e de comemorações. Muito obrigada por toda a ajuda, todo o carinho e todo o amor.

SUMÁRIO

RESUMO	5
LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS	9
1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Histoplasmose	10
1.2. Epidemiologia	12
1.3. Terapêutica	13
1.4. <i>Histoplasma capsulatum</i>	13
1.5. Fatores de Virulência	14
1.6. Biofilmes	16
1.7. Proteína <i>DASH complex subunit</i>	18
1.8. PCR em tempo real	19
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo Geral	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Microorganismo	21
3.1. Ensaio de formação dos biofilmes e culturas planctônicas	21
3.2. Extração e quantificação de RNA	22
3.3. Síntese e quantificação de cDNA	24
3.4. PCR em tempo real	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1. Ensaio de Biofilme	26
4.2. Extrações de RNA realizadas com Trizol e kit da Qiagen <i>RNeasy Plant Mini Kit®</i>	27
4.3. Quantificação de cDNA	31
4.4. Padronização das reações de PCR em tempo real	32
5. CONCLUSÕES	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

RESUMO

A histoplasmose é uma micose sistêmica, com características de doença granulomatosa com predileção pelo pulmão e órgãos do sistema imunológico e é causada pelo fungo *Histoplasma capsulatum*. Uma extensa diversidade de fungos patogênicos tem demonstrado a habilidade em colonizar superfícies e formar biofilmes, sendo a maior causa para resistência de infecções humanas. Existem diferentes perfis de expressão de proteínas por *H. capsulatum* quando comparado seu crescimento em culturas planctônicas e biofilmes. Desta forma, dando continuidade aos trabalhos realizados, nosso grupo propõe realizar a análise quantitativa da expressão do gene codificante da proteína DASH diferencialmente expressa por *H. capsulatum* durante a formação de biofilmes, a fim de selecionar alvos e/ou biomarcadores da interação fungo-células hospedeiras. Para a realização do estudo foi selecionada a cepa EH-315 de *H. capsulatum*. Após a formação dos biofilmes, as amostras de RNA foram obtidas por meio de extração com o reagente Trizol e com o kit da Qiagen *RNeasy Plant Mini Kit*®. Após a síntese e quantificação de cDNA, foi realizada a PCR em Tempo Real, sendo selecionado o gene codificante da proteína DASH para ter sua expressão avaliada nas diferentes condições de crescimento de *H. capsulatum*, em biofilmes e culturas planctônicas. Os resultados obtidos após quantificação do RNA extraído de cultura planctônica e biofilme da cepa EH-315 de *H. capsulatum* mostram que não foi obtida uma grande quantidade de produto e que sua pureza, se mostra comprometida. Apesar dos resultados do nosso estudo não permitirem a continuidade do processo de análise de expressão gênica, ele ainda assim teve relevância ao pontuar possíveis falhas no processo de extração de RNA.

Palavras-chave: *H. Capsulatum*, biofilme, PCR em Tempo Real

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa indicando a distribuição de histoplasmoses na América Latina. Fonte: Colombo, A. L. et al, 2011.....	12
Figura 2. Biofilme em placa de 24 poços da cepa EH-315 de <i>H. capsulatum</i> após 7 horas de pré-adesão e 72 horas de incubação à 37° C em meio de cultura BHI suplementado com 0,1% de cisteína e 1% de glicose.....	27
Figura 3. Eletroferograma da amostra de RNA extraído com método Trizol de cultura planctônica (P3T) da cepa EH-315 de <i>Histoplasma capsulatum</i>	29
Figura 4. Eletroferograma da amostra de RNA extraído com método Trizol de biofilme da cepa EH-315 de <i>Histoplasma capsulatum</i>	29
Figura 5. Eletroferograma da amostra de RNA extraído com Qiagen <i>RNeasy Plant Mini Kit</i> ® de cultura planctônica da cepa EH-315 de <i>Histoplasma capsulatum</i>	30
Figura 6. Eletroferograma da amostra de RNA extraído com Qiagen <i>RNeasy Plant Mini Kit</i> ® de biofilme da cepa EH-315 de <i>Histoplasma capsulatum</i>	31
Figura 7. Curva de amplificação dos genes rRNA, GAPDH e DASH em amostras de cultura planctônica e biofilme da cepa EH-315 de <i>H. capsulatum</i> , com finalidade de padronizar a reação de PCR em tempo real, partindo de concentrações de 0,5µM, 0,7µM, 0,8µM e 1,0µM de primers dos respectivos genes.....	33

Figura 8. Curva de dissociação dos genes rRNA, GAPDH e DASH em amostras de cultura planctônica e biofilme da cepa EH-315 de *H. capsulatum*, com finalidade de padronizar a reação de PCR em tempo real, partindo de concentrações de 0,5µM, 0,7µM, 0,8µM e 1,0µM de *primers* dos respectivos genes.....34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers para análise de expressão do gene codificante da proteína DASH e genes endógenos para <i>H. capsulatum</i>	25
Tabela 2. Reagentes utilizados na padronização de PCR em Tempo Real.....	26
Tabela 3. Resultados da quantificação em espectrofotômetro NanoVue® (GE Healthcare) de RNA extraído pela metodologia com Trizol.....	28
Tabela 4. Resultados da quantificação em espectrofotômetro NanoVue® (GE Healthcare) de RNA extraído pela metodologia com Qiagen <i>RNeasy Plant Mini Kit</i> ®.....	30
Tabela 5. Valores de Ct para amostras em cultura planctônica e biofilme da cepa EH-315 de <i>Histoplasma capsulatum</i> frente às diferentes concentrações do primer rRNA.....	32
Tabela 6. Valores de Ct para amostras em cultura planctônica e biofilme da cepa EH-315 de <i>Histoplasma capsulatum</i> frente às diferentes concentrações do primer GAPDH.....	32
Tabela 7. Valores de Ct para amostras em cultura planctônica e biofilme da cepa EH-315 de <i>Histoplasma capsulatum</i> frente às diferentes concentrações do primer DASH.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

BHI – *Brain Heart Infusion* (em português: infusão de cérebro e coração)

cDNA – DNA complementar

C_t - *cycle threshold* (em português: limiar de ciclo)

DNase – Desoxirribunuclease

GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

N/A – *not applicable* (em português: não aplicável)

PBS - Phosphate Buffered Saline (em português: tampão fosfato salino)

PCR – *Polimerase Chain Reaction* (em português: reação em cadeia da polimerase)

RIN – *RNA integrity number* (em português: número de integridade do RNA)

rRNA – RNA ribossômico

mRNA – RNA mensageiro

Undet. – *Undetermined* (em português: indeterminado)

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histoplasmose

A histoplasmose é uma micose sistêmica, com características de doença granulomatosa com predileção pelo pulmão e órgãos do sistema imunológico podendo ser causada pelo fungo *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* no caso da histoplasmose clássica, e por *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* no caso da histoplasmose africana (Aidé, 2009; Gugnani e Okafor, 1997).

Segundo a Organização Mundial da Saúde a maioria dos casos é assintomática, porém algumas infecções podem causar histoplasmose pulmonar aguda, que ocorre na sua maioria em crianças expostas ao microorganismo pela primeira vez, caracterizada por febre alta, dores de cabeça, tosse seca, calafrios, fraqueza, dor pleurítica e fadiga (WHO, 2015; Kauffman, 2007). Pacientes portadores da forma aguda podem apresentar artralgia ou artrite, eritema nodoso ou multiforme e pericardite (Aidé, 2009).

A forma granulomatosa mediastinal é caracterizada pelo alargamento maciço de múltiplos nódulos emaranhados. Esta massa de nódulos pode permanecer em processo de alargamento por meses e até anos. Muitos pacientes são assintomáticos, e os nódulos só são descobertos quando realizada a radiografia de tórax. Porém estes nódulos podem colidir com a veia cava superior, brônquios ou esôfago, com sintomas variáveis de acordo com a estrutura envolvida. Os nódulos também podem escoar-se espontaneamente para tecidos moles adjacentes do pescoço, para as vias aéreas, ou até mesmo para o pericárdio. Inicialmente se pensou que a forma granulomatosa mediastinal progredia para mediastinite fibrosante, mas estudos mais recentes mostram que estas são duas complicações distintas de histoplasmose pulmonar (Kauffman, 2007). A mediastite fibrosante representa uma forma anormal de fibrose em resposta a uma infecção passada. Pode obstruir ou comprimir qualquer estrutura no mediastino,

formando uma massa fibrótica que sob a forma de nódulo pulmonar solitário é denominada histoplasmosa e se caracteriza por uma lesão de centro necrótico e/ou calcificado, circundado por uma cápsula fibrótica. O rompimento desta estrutura para um brônquio pode ocasionar broncolitíase (Aidé, 2009).

Outra forma de manifestação é a histoplasmosa pulmonar crônica cavitária, que aparentemente tem uma predileção por pacientes de maior idade, este fato pode estar relacionado a pré-existência de doenças pulmonares que ajudam no desenvolvimento desta forma de histoplasmosa (Kauffman, 2007; Goodwin, 1976).

Histoplasma capsulatum é um importante patógeno oportunista do homem. Pacientes com linfomas, transplantados renais, cardíacos e hepáticos, em uso de altas doses de corticoesteróides, e particularmente com AIDS podem desenvolver quadros graves de histoplasmosa disseminada, que independente da presença de sintomatologia, pode evoluir com disseminação do fungo para todo o organismo, particularmente para os órgãos ricos em macrófagos, tais como fígado, baço, linfonodo e medula óssea (Ferreira e Borges, 2009).

A histoplasmosa foi pela primeira vez descrita por Samuel Darling, no Panamá, que entre 1905 e 1906 necropsiou três casos disseminados da doença. Inicialmente Darling considerou a doença como sendo causada por um protozoário encapsulado. Posteriormente em 1912, no Instituto de Medicina Tropical em Hamburgo, Rocha Lima mostrou que *Histoplasma capsulatum*, o agente etiológico da histoplasmosa, era na verdade um fungo e não um protozoário. E somente em 1934, o microorganismo foi corretamente identificado como um fungo (Ferreira e Borges, 2009; Benchimol e Sá, 2004).

manipulação de galinheiros e empresas de limpeza. As medidas de desinfecção de secreção e fômites devem ser as de uso hospitalar rotineiro (Brasil, 2010).

1.3. Terapêutica

Segundo o Ministério da Saúde para forma pulmonar aguda, leve a moderada em pacientes que mantêm sintomatologia por mais de 1 mês é iniciada a terapia com Itraconazol, na dose de 200 a 400mg/dia, durante 6 a 12 semanas. Nas formas pulmonares agudas graves, está indicado o uso da Anfotericina B, na dose de 0,5 a 1mg/kg/dia, não ultrapassando 50mg/dia, durante 1 a 2 semanas, seguida de Itraconazol, na dose de ataque de 200mg, 3 vezes ao dia, durante 3 dias, e manutenção de 200mg, 2 vezes ao dia, durante 12 semanas. Nas formas cavitárias pulmonares crônicas, a recomendação é o uso do Itraconazol, 200mg, 3 vezes ao dia, durante 3 dias, seguido de 200 a 400mg por dia, por pelo menos 12 meses, devendo, no entanto, chegar a 18 ou 24 meses (Brasil, 2010).

1.4. *Histoplasma capsulatum*

Histoplasma capsulatum var. *capsulatum* é um fungo termodimórfico. O solo é seu habitat natural, principalmente solos ricos em dejetos de pássaros e morcegos. O dimorfismo é uma característica do fungo que depende da alteração de temperatura e/ou fatores nutricionais, associados à resposta imunológica do hospedeiro. Em saprofitismo e nos cultivos a 23°C, o fungo adota a forma filamentosa, com hifas produtoras de microconídios (elementos infectantes) e macroconídios tuberculados. Em parasitismo e em cultivos a 37°C, apresenta-se leveduriforme, arredondado e unibrotante com 2-4 µm de diâmetro (Aidé, 2009; Kurokawa et al., 1998).

1.5. Fatores de Virulência

A transição morfológica é considerada o fator de virulência necessário para a patogenia do fungo *H. capsulatum*. Esta conversão resulta não apenas na mudança de formato da célula, como também na composição da parede celular, presença de moléculas antigênicas e expressão de genes de virulência (Klein e Tebbets, 2007).

Na sua forma leveduriforme, em resposta a altas temperaturas e outras condições adversas do hospedeiro, o fungo *H. capsulatum* expressa vários genes específicos como *YPS-3* e *CBPI* que o auxiliam a sobreviver no hospedeiro. Estudos mostram que a transição morfológica bem como a expressão de genes de virulência são controladas por dois reguladores transcricionais: os genes histidina quinase (*DRK1*) e *RYPI* (Holbrook and Rappleye, 2008; Klein e Tebbets, 2007).

Como visto em estudo realizado por Medoff et al. (1986), existe uma relação entre a termotolerância e a virulência do fungo *H. capsulatum*, já que cepas menos virulentas necessitam de mais tempo para realizar a transição morfológica, enquanto que as cepas mais virulentas, que suportam melhor a transição para a temperatura de 37°C, realizam a conversão com maior velocidade.

A aquisição de ferro é um mecanismo essencial para a patogenia de microorganismos. Em torno de 100 enzimas metabólicas utilizam ferro como co-fator de suas atividades catabólicas. *H. capsulatum* tem pelo menos três sistemas de aquisição de ferro identificados. O primeiro mecanismo é a secreção de hidroxamato sideróforo que quela o ferro da proteína transferrina do hospedeiro. O segundo mecanismo é a produção de três diferentes redutores de ferro: uma redutase enzimática dependente de glutathione reduzida, redutores não enzimáticos de baixo peso molecular, e uma atividade redutora na superfície da célula. Estes redutores são utilizados para redução do ferro férrico livre. E por fim, o fungo utiliza um complexo de uma multicobre oxidase (FET3) e uma

permease férrica (FTR1) para uma maior afinidade de transporte do ferro férrico (Hilty et al., 2011).

A parede celular do *H. capsulatum*    composta por galactomananas, glucanos, quitina, proteínas e lipídeos. Na fase de transi  o, influenciada pela temperatura,    modificada a biossíntese de glucanos, sendo que na fase leveduriforme ocorre o aumento da síntese de α -(1-3)-glucano e queda de β -(1,3)-glucano, fato que está diretamente relacionado    virulência do fungo. O polissacarídeo β -(1,3)-glucano, na fase filamentosa, participa do recrutamento de leucócitos e na regula  o de mediadores inflamatórios tais como leucotrienos e citocinas proinflamatórias como TNF- α . O α -(1-3)-glucano mascara a parede celular bloqueando a detec  o de β -(1,3)-glucano pelo sistema imunológico do hospedeiro. Três genes têm sido identificados como necessários para a síntese de α -(1-3)-glucano: α -(1-3)-glucano sintase (AGS1); muta  o no gene AMY1, que codifica uma proteína com homologia para α -(1,4)-amilase; e uma UGP1, que codifica UTP-glicose-1-fosfato uridiltransferase. (Kurokawa et al. 1998, Klein e Tebbets, 2007; Edwards et al., 2011)

Adicionalmente moléculas de adesão que são expressas essencialmente na superfície da célula fúngica, o tornam capaz de inibir a ativa  o dos mecanismos de defesa do macrófago, pois permite a entrada e sobrevivência dentro do fagócito (Holbrook e Rappleye, 2008; Mihu e Nosanchuk, 2011).

Neste contexto, a proteína de choque térmico 60 (HSP60)    uma molécula de superfície que tem como fun  o mediar o reconhecimento do microorganismo, pelo sistema imunológico do hospedeiro, e interfere também no mecanismo de fagocitose dos macrófagos. Ela atua como um ligante do receptor CR3 (CD11/CD18), presente na superfície do macrófago. A intera  o entre o fungo e o macrófago pela HSP60 ligada ao CR3 resulta na rápida ingestão da levedura e uma suave rea  o imunológica, o que

permite que o microorganismo sobreviva e se replique dentro das células do hospedeiro (Mihu e Nosanchuk, 2011; Errante et al., 2011).

O gene *YPS-3*, na fase leveduriforme, codifica uma proteína fase-específica de 20 kDa que é encontrada como um constituinte de parede celular do fungo e também como molécula secretada. Mas a produção de proteína durante a fase leveduriforme é restrita para cepas classe 2 isoladas da América do Norte, que são as cepas mais virulentas e termotolerantes identificadas (Mihu e Nosanchuk, 2011; Bohse e Woods, 2007).

Além disso, a produção de melanina ou pigmentos semelhantes a melanina, pela levedura, está associada à virulência de diversos fungos, pois o processo de melanização diminui a susceptibilidade dos fungos à anfotericina B e caspofungina. Neste sentido, a melanina anula a potência de certos mecanismos de defesa imunológica do hospedeiro, como radicais livres e peptídeos microbicidas (Mihu e Nosanchuk, 2011).

Uma extensa diversidade de fungos patogênicos tem demonstrado a habilidade em colonizar superfícies e formar biofilmes. Estudos mostram que a forma biofilme é a forma natural e preferencial para o desenvolvimento do fungo, e é a maior causa para resistência de infecções humanas. Microorganismos em biofilme crescem em comunidades multicelulares e produzem uma matriz extracelular que promove proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro e resistência às drogas antifúngicas (Sardi et al., 2013).

1.6. Biofilmes

Inicialmente o biofilme foi definido como uma matriz fechada de uma população microbiana, que está aderida entre si, e que se adere a uma superfície ou interface (Costerton et al., 1995). A nova definição de biofilme diz que são células aderidas entre si e à uma superfície ou interface incorporadas à uma matriz de substância polimérica

extracelular que as próprias células produzem, incluindo os componentes abióticos, mas também outros atributos fisiológicos do biofilme, que incluem características como curva de crescimento alterada e o fato de que a forma biofilme transcreve genes que a forma planctônica não transcreve (Donlan e Costerton, 2002).

Durante os primeiros estágios de formação do biofilme, os microorganismos sésseis se encontram em um estado de justaposição de células, podendo ocorrer formações com uma única espécie envolvida, e também microcolônias com diferentes espécies misturadas (Costerton, et al., 1995).

A matriz é primordialmente formada por exopolissacarídeos, e muitos são negativamente carregados devido à presença de carboxyl, sulfato ou grupos fosfato. Adicionalmente, pequenas quantidades de proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos podem estar presentes. Estruturalmente a matriz forma uma espécie de gel tridimensional super hidratado, que separa a água por canais que promovem um mecanismo de circulação de nutrientes dentro do biofilme (Al-Fattani e Douglas, 2006).

A natureza da estrutura do biofilme e seus atributos fisiológicos conferem uma resistência inerente ao agente antimicrobiano. Os mecanismos responsáveis por esta resistência podem ocorrer em decorrência de uma penetração mais lenta do agente antimicrobiano pela matriz, níveis de crescimento alterado do biofilme e outras mudanças fisiológicas de crescimento do biofilme (Donlan e Costerton, 2002).

Pesquisas tem revelado informações sobre as bases moleculares e genéticas do desenvolvimento do biofilme. Existem evidências de que no desenvolvimento do biofilme, durante a fase de fixação em uma superfície e formação de microcolônias, genes específicos são ativados. Como exemplo, genes reportadores mostram que a transcrição de genes, que são requeridos na síntese de matriz extracelular

polissacarídica, é ativada após o processo de fixação do biofilme (Costerton et al., 1999).

Segundo estudos realizados por Sardi et al. (2014) existem diferentes perfis de expressão de proteínas por *H. capsulatum* quando comparado seu crescimento em culturas planctônicas e biofilmes. Utilizando espectrometria de massas, mais de 40 proteínas, pertencentes a diferentes grupos funcionais, são diferencialmente expressas e identificadas comparando a forma biofilme com a planctônica. Os três principais grupos funcionais incluem proteínas envolvidas no metabolismo de aminoácidos, proteínas nucleares e proteínas de transição.

Desta forma, dando continuidade aos estudos realizados, este trabalho propõe realizar a análise de expressão do gene codificante de uma proteína de destaque em estudo realizado por Pitangui em 2012, a DASH, que é diferencialmente expressas quando o fungo se apresenta em biofilmes de *H. capsulatum*.

1.7. Proteína *DASH complex subunit*

Segundo Pitangui (2012), uma proteína que merece destaque é a *DASH complex subunit*, constituinte estrutural do citoesqueleto. Na análise proteômica realizada tal proteína foi cerca de 10 vezes mais expressa pelo fungo na forma biofilme em comparação à forma planctônica. Assim, dando continuidade aos estudos, propusemos neste trabalho realizar a padronização da análise quantitativa da expressão gênica desta proteína.

Os elementos principais do citoesqueleto são microtúbulos e filamentos de actina, também podem apresentar filamentos intermediários. Suas funções englobam citoarquitetura, movimentação das organelas na célula, movimento nuclear, conexão

dos complexos transmembrana e orientação das microfibrilas (Geitmann e Emons, 2000).

1.8. PCR em Tempo Real

A reação em cadeia de polimerase em tempo real é uma técnica que permite quantificar mRNA em amostras biológicas, permitindo quantificar alterações biológicas relevantes de acordo com os níveis de mRNA. Seus benefícios, quando comparada por exemplo à PCR convencional, incluem maior sensibilidade, maior espectro, um potencial elevado durante todo o processo, bem como quantificações precisas. Porém, alguns fatores podem interferir na reação, como extração ineficiente de RNA, que acarreta em uma amostra de qualidade comprometida, presença alta de componentes indesejáveis, co-precipitado, polifenóis de plantas e polissacarídeos (Valasek e Repa, 2005; Deepak et al., 2007).

Seguindo o mesmo raciocínio da PCR convencional, a metodologia apresenta a fase de crescimento exponencial, fase de crescimento linear e fase estacionária. No gráfico de amplificação (ΔR_n versus número de ciclos) estas fases podem ser observadas. O ponto onde a reação atinge seu limiar da fase exponencial é chamado de *threshold* e este ponto corresponde ao número de ciclos necessários para que a fluorescência seja detectável chamado de *cycle threshold* (C_t). E assim, uma amostra de concentração desconhecida pode ter sua concentração calculada, a partir da confecção de uma curva padrão, baseada nos valores de C_t de cada amostra (Niclas e Buel, 2003; Kubisca et al., 2006; Heid et al., 1996).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Padronização da metodologia de PCR em tempo real para avaliação da expressão do gene codificante da proteína DASH, que é diferencialmente expressa por *H. capsulatum* durante a formação de biofilmes, a fim de indica-la como um possível alvo e/ou biomarcador da interação fungo-células hospedeiras.

2.2. Objetivos específicos

- Extração dos RNAs de uma cepa de alta virulência de *H. capsulatum*, nas formas biofilmes e planctônicas, utilizando diferentes métodos de extração, entre eles Trizol e Kit comercial, a fim de otimizar a concentração, integridade e pureza do RNA obtido;
- Análise da integridade do RNA extraído por meio do equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer® (*Agilent Technologies*);
- Quantificação e análise da pureza do RNA utilizando espectrofotômetro NanoVue® (*GE Healthcare*);
- Síntese de cDNA;
- Padronização das reações de PCR em tempo real;
- Análise quantitativa diferencial dos genes expressos pelo fungo em culturas planctônicas e em biofilmes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microorganismo

Para a realização do estudo foi selecionada a cepa EH-315 de *H. capsulatum*, isolada de morcego infectado capturado no estado de Guerrero, México. Esta cepa está depositada na Coleção de Cultura de *H. capsulatum* do Laboratório de Imunologia de Fungos do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Faculdade de Medicina da Universidade Nacional Autônoma do México (UNAM) (www.histoplas-mex.unam.mx). Esta coleção está registrada no banco de dados da Federação Mundial para Coleções de Cultura com o número LIH-UNAM WDCM817.

3.1. Ensaio de formação dos biofilmes e culturas planctônicas

A formação dos biofilmes foi realizada segundo descrito por Pitangui et al. (2012). Para armazenamento as leveduras foram suspensas em soro fetal bovino 90% e Dimetilsulfóxido 10% e congeladas até o momento do uso. Para o início da metodologia foram retirados 30µl da suspensão de levedura, previamente descongelada e, ressuspensos em 5 ml de BHI caldo suplementado com 0,1% de cisteína e 1% de glicose sob agitação a 37°C durante 24 horas.

Após 24 horas a suspensão foi centrifugada a 4°C, 3500 rpm durante 15 minutos e lavada com PBS. Depois de lavadas as leveduras foram centrifugadas novamente a 4°C, 3500 rpm durante 10 minutos e depois suspensas em 2 ml de PBS.

Foi feita uma diluição 1:500 para a contagem em câmara de Newbauer. Após contagem de 5 campos foi tirada a média para ajustar a concentração para o inóculo, que foi ajustada para 5×10^6 células/ml.

A fase leveduriforme ou planctônica foi incubada a 37°C em 2 erlenmeyers de 200 ml de BHI caldo suplementado com 0,1% de cisteína e 1% de glicose durante 72 horas sob agitação 100 rpm.

Para a formação dos biofilmes foram utilizadas quatro placas de 24 poços (TPP®, Trasadingen, Switzerland). Para a fase de pré-adesão do biofilme foram adicionados 500µl do inóculo a cada poço da placa que ficaram incubadas sob agitação a 37°C durante 7 horas. Após 7 horas o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 2 ml de BHI caldo suplementado com 0,1% de cisteína e 1% de glicose para a fase de adesão do Biofilme.

Para a fase de adesão o microorganismo foi mantido em meio BHI caldo suplementado com 0,1% de cisteína e 1% de glicose sob agitação a 37°C por 48 horas. Realizou-se uma troca do meio de cultura e após 24 horas foi feito descarte do BHI caldo suplementado com 0,1% de cisteína e 1% de glicose dos poços e 1 ml de PBS foi adicionado em cada poço para a raspagem dos biofilmes formados no fundo dos poços com alça descartável. Os biofilmes foram coletados em tubos de 50 ml, centrifugados e lavados até que o sobrenadante descartado estivesse límpido, no caso foram duas lavagens e centrifugações. Descartado o sobrenadante final a amostra foi armazenada a -80°C para a extração de RNA.

3.2. Extração e quantificação de RNA

As amostras de RNA foram obtidas por meio de duas metodologias diferentes, extração com o reagente Trizol e com o kit da Qiagen *RNeasy Plant Mini Kit*®.

Na extração com o reagente Trizol lavou-se inicialmente as células 3 vezes com PBS, para retirar o meio de cultura excedente. Em um tubo foi adicionada uma quantidade estimada de 1,5 g do pellet de células, 3,5 ml de reagente Trizol e aproximadamente o

mesmo volume em pérolas de vidro. A amostra passou por congelamento em nitrogênio líquido e foi agitada em Vórtex por aproximadamente 15 minutos, em seguida repousou por 10 minutos em temperatura ambiente e foi centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos. Foi transferido o sobrenadante para um novo tubo e adicionou-se 0,2 ml de clorofórmio para cada 0,75 ml de Trizol recuperado, o tubo foi agitado novamente e deixado em repouso por 10 minutos. Após o repouso a amostra foi centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante transferido para um novo tubo. O volume recuperado na etapa anterior foi adicionado à uma mistura de fenol : clorofórmio : álcool isoamílico na proporção 25 : 24 : 1, agitou-se gentilmente, a amostra repousou em temperatura ambiente por 10 minutos e foi realizada centrifugação do tubo a 3000 rpm por 15 minutos. A fase aquosa foi novamente transferida para um novo tubo, e foram acrescentados 0,25 ml de isopropanol, 0,25 ml de solução de citrato de sódio 0,4 M e cloreto de sódio 0,8 M para cada 0,75 ml de trizol recuperado inicialmente, agitou-se gentilmente e a amostra repousou a temperatura ambiente por 10 minutos. A amostra foi centrifugada a 3000 rpm por 30 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 75%. Uma nova centrifugação foi realizada a 3000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi desprezado. O precipitado secou a temperatura ambiente, ressuspenso em água DEPC (dietil pirocarbonato) 0,01% e armazenada a -80°C.

A extração com o kit da Qiagen *RNeasy Plant Mini Kit*® foi realizada conforme manual de utilização fornecido pelo fabricante, mas antes foi feita a lise das células por congelamento em nitrogênio líquido e agitação vigorosa em Vórtex. Foi adicionado tampão RLC para cada 100 mg de tecido celular. Agitou-se vigorosamente. O lisado foi transferido para uma coluna de *spin QIAshredder*, que foi centrifugada por 2 minutos em velocidade máxima a 4°C. O sobrenadante foi descartado para um outro tubo, retirado com cuidado para não perturbar o sedimento celular. Em seguida, foi

adicionado e homogeneizado meio volume de etanol (96-100%) ao lisado limpo. O passo seguinte foi transferir a amostra para uma coluna de *spin Mini*, que foi centrifugada por 15 segundos a 10.000 rpm a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e foi adicionado tampão RW1, centrifugou-se novamente. Após descartado o sobrenadante foi adicionado tampão RPE, centrifugado e descartado o sobrenadante mais duas vezes. Por fim somente a coluna foi centrifugada para secar a membrana e então foi adicionada a água livre de RNase, e foi feita mais uma centrifugação para coletar o RNA.

A amostra de RNA foi quantificada em espectrofotômetro NanoVue® (GE Healthcare). Posteriormente, a integridade do RNA das amostras foi avaliada, utilizando o equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer® (Agilent Technologies) e armazenada a -80°C para a síntese de cDNA.

3.3. Síntese e quantificação de cDNA

Para a reação de síntese de primeira fita de cDNA foi realizada uma reação com 1 µg de RNA total com 10 pmol/µL de primer CDS. A mistura foi aquecida a 72°C por 2 minutos. Em seguida foi adicionada a mistura 10 pmol/µL de primer cDNA, 4µl de Tampão de Primeira Fita, 10mM de dNTPs, 40U/ml de RNaseout (Ribolock), 100mM de DTT e 50mM de Cloreto de magnésio.

A reação foi incubada a 42°C por 1 hora e trinta minutos. Após este período foram adicionados 80µl de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM de EDTA pH 8,0) e a solução foi aquecida durante 7 minutos a 72°C.

As amostras de cDNA foram armazenadas a -20°C para a reação de PCR em tempo real.

3.4. PCR em Tempo Real

Foi selecionado o gene codificante da proteína DASH (Código de acesso do banco de proteína DAD2_KLULA) para ter sua expressão avaliada nas diferentes condições de crescimento de *H. capsulatum*, em biofilmes e culturas planctônicas. Os primers do gene de interesse (DASH *Forward* e *Reverse*) e os primers dos genes endógenos (rRNA *Hc Forward* e *Reverse* e GAPDH *Forward* e *Reverse*) foram desenhados no laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, sendo sintetizados primers específicos conforme sequências demonstradas na tabela 1.

Foram utilizados dois diferentes genes endógenos para garantir a confiabilidade do resultado obtido.

Tabela 1. Primers para análise de expressão do gene codificante da proteína DASH e genes endógenos para *H. capsulatum* (rRNA e GAPDH).

Gene	Primers
DASH	Forward 5'TCAGGCAGCTCCGTGATGT3'
	Reverse 5'TCCCAGTTCCTCCATTTGTGA3'
rRNA	Forward 5'CAGCGAAATGCGATGAGTAATG3'
	Reverse 5'CGACCGCCCAACACACA
GAPDH	Forward 5' AAATGCTGTTGAGCACGATG3'
	Reverse 5' CTGTGCTGGATATCGCCTTT3'

Foi realizada padronização da concentração dos primers de acordo como o gradiente de concentração a seguir: 0,5 μ M; 0,7 μ M; 0,8 μ M e 1,0 μ M. O volume dos reagentes respectivos para cada concentração do primer é demonstrada na tabela 2.

Tabela 2. Reagentes utilizados na padronização de PCR em Tempo Real

Concentração do Primer	0,5 μ M	0,7 μ M	0,8 μ M	1,0 μ M
SYBR Green®	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
<i>Primer Forward (10 μM)</i>	5,0 μ l	7,0 μ l	8,0 μ l	10,0 μ l
<i>Primer Reverse (10 μM)</i>	5,0 μ l	7,0 μ l	8,0 μ l	10,0 μ l
H ₂ O Milli-Q	35 μ l	31 μ l	29 μ l	25 μ l
Total	95 μ l	95 μ l	95 μ l	95 μ l

Os testes para a reação de PCR foram realizados utilizando-se 1 μ l de cDNA, 50 μ l de Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Fermentas), e 0,5 μ M de cada primer (concentração que mostrou melhor desempenho ao longo dos testes realizados), sendo adicionado água à reação até atingir o volume de 95 μ l, neste caso 35 μ l de água. As reações foram realizadas com temperatura inicial de 50°C por 2 minutos, seguido por 10 minutos a 95°C. Depois, 40 ciclos de 95°C a 15 segundos, seguidos de anelamento e síntese a 60°C por um minuto. Em seguida a PCR, a análise da curva de *melting* foi realizada para confirmar a emissão de sinal correspondente a um único produto. As reações foram realizadas com o aparelho Applied Biosystems 7500 cycler. Foram utilizados os genes rRNA e GAPDH como referência. Como controle negativo foi empregada uma reação que contém todos os reagentes exceto a amostra de cDNA.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ensaio de Biofilme

Foi possível observar que após 72 horas de incubação na temperatura de 37° C em meio de cultura BHI suplementado com 0,1% de cisteína e 1% de glicose, o microorganismo foi capaz de formar o conjunto de células aderidas entre si e à uma

superfície característico de biofilme, como descrito por Pitangui et al. (2012). A formação de um biofilme maduro pode ser observada na figura 3.



Figura 2. Biofilme em placa de 24 poços da cepa EH-315 de *H. capsulatum* após 7 horas de pré-adesão e 72 horas de incubação à 37° C em meio de cultura BHI suplementado com 0,1% de cisteína e 1% de glicose.

4.2 Extrações de RNA realizadas com Trizol e kit da Qiagen RNeasy Plant Mini Kit®

Após extração do RNA das amostras de *H. capsulatum* em culturas planctônicas e biofilmes da cepa EH-315 de *Histoplasma capsulatum*, realizadas com Trizol e Qiagen *RNeasy Plant Mini Kit®*, foi realizada quantificação do material extraído em NanoVue® (GE Healthcare), bem como foi avaliada a integridade deste material por meio do equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer® (Agilent Technologies) na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias FCAV – UNESP – Jaboticabal -SP.

A tabela 3 mostra os resultados obtidos após quantificação do RNA extraído de cultura planctônica e biofilme da cepa EH-315 de *H. capsulatum* utilizando o método Trizol. Os dados mostram que não foi obtida uma grande quantidade de produto e que sua pureza, obtida pela razão A260nm/A280nm, se mostra comprometida já que é recomendado que o valor de referência desta razão esteja entre 1,8 e 2,0.

Tabela 3. Resultados da quantificação em espectrofotômetro NanoVue® (GE Healthcare) de RNA extraído pela metodologia com Trizol.

Amostra	Quantificação (ng/μl)	A260nm/A280nm
Planctônica	17,2	1,706
Biofilme	9	1,596

Posteriormente, foi avaliada a integridade do RNA extraído das amostras de culturas planctônicas e biofilme da cepa EH-315 de *H. capsulatum* e conforme o manual de uso do equipamento, o Agilent 2100 Bioanalyzer® (Agilent Technologies) utiliza eletroforese automatizada por capilaridade para analisar a integridade do RNA. O resultado é exibido na forma de eletroferograma, no qual o equipamento realiza a detecção e calcula os picos referentes às subunidades 18S e 28S do fragmento. Desta forma, para analisar a integridade da amostra, a razão 28S/18S e o RIN (número de integridade do RNA) são os parâmetros analisados.

A figura 4 mostra o eletroferograma referente a uma amostra com RNA extraído de uma cultura planctônica da cepa EH-315 com Trizol. O resultado da razão 28S/18S foi 0,0 e o RIN igual a 2,70. O que representa uma amostra com sua integridade comprometida, já que valores menores que 2,0 para a razão 28S/18S e RIN menor que 7,0 não representam bons resultados.

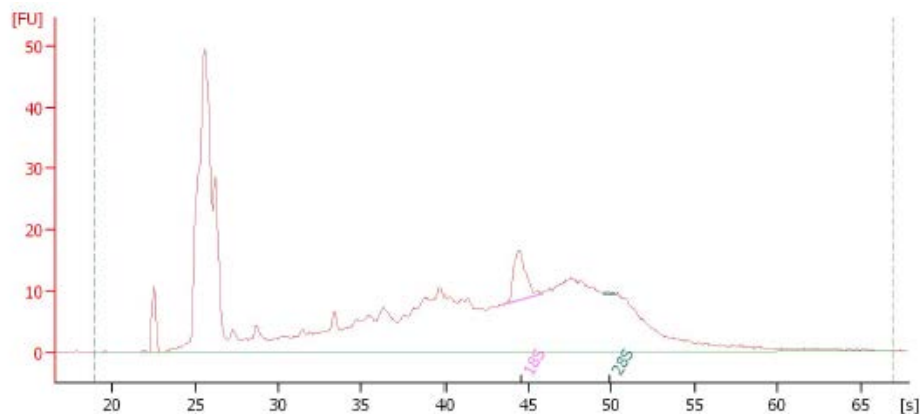


Figura 3. Eletroferograma da amostra de RNA extraído com método Trizol de cultura planctônica (P3T) da cepa EH-315 de *Histoplasma capsulatum*.

A figura 5 mostra um eletroferograma referente a uma amostra com RNA extraído de biofilme da cepa EH-315 com Trizol. O resultado da razão 28S/18S foi de 0,4 e o RIN igual a 7,6. Apesar da razão entre os picos das subunidades estar baixo, o número de integridade do RNA está dentro do valor aceito.

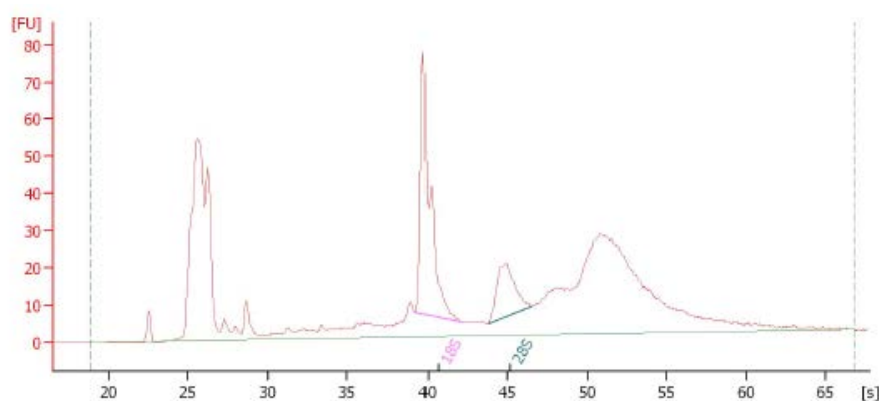


Figura 4. Eletroferograma da amostra de RNA extraído com método Trizol de biofilme da cepa EH-315 de *Histoplasma capsulatum*.

Em comparação aos resultados anteriores a tabela 4 mostra os resultados obtidos na reação de extração de RNA de cultura planctônica e biofilme da cepa EH-315 com

Qiagen *RNeasy Plant Mini Kit*®. Os dados mostram que foi obtida uma quantidade maior que a obtida na extração com Trizol e apresenta maior pureza das amostras, haja visto a razão A260nm/A280nm que apresenta valores de aproximadamente 2,0.

Tabela 4. Resultados da quantificação em espectrofotômetro NanoVue® (*GE Healthcare*) de RNA extraído pela metodologia com Qiagen *RNeasy Plant Mini Kit*®.

Amostra	Quantificação (ng/μl)	A260nm/A280nm
Planctônica	35,2	2,047
Biofilme	62,4	2,026

Ainda em comparação com os resultados anteriores referentes as extrações realizadas com Trizol, a figura 6 mostra o eletroferograma de uma amostra com RNA extraído de uma cultura planctônica da cepa EH-315 com Qiagen *RNeasy Plant Mini Kit*®. O resultado da razão 28S/18S foi 0,9 e o RIN igual a 6,80. O que ainda assim representa uma amostra com integridade comprometida, mas em comparação ao resultado anterior apresenta resultados relativamente melhores.

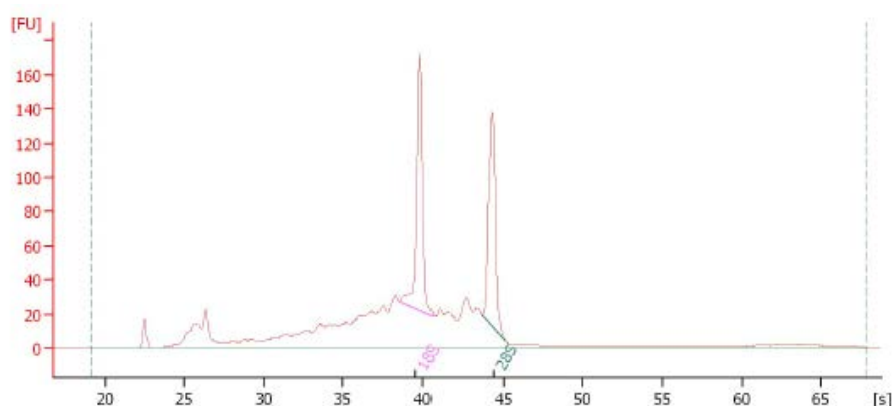


Figura 5. Eletroferograma da amostra de RNA extraído com Qiagen *RNeasy Plant Mini Kit*® de cultura planctônica da cepa EH-315 de *Histoplasma capsulatum*.

A figura 7 mostra um eletroferograma referente a uma amostra com RNA extraído de biofilme da cepa EH-315 com Qiagen *RNeasy Plant Mini Kit*®. O resultado da razão 28S/18S é igual a 0,0 e o RIN foi classificado como N/A. Este é um resultado inesperado para esta amostra, pois acompanhando a lógica dos resultados apresentados esperava-se que a amostra com RNA extraído de biofilme da cepa EH-315 com Qiagen *RNeasy Plant Mini Kit*® apresentaria um valor para a razão 28S/18S melhor que o anterior e um RIN ótimo para uso, ou seja, maior que 7,0 ou 8,0.

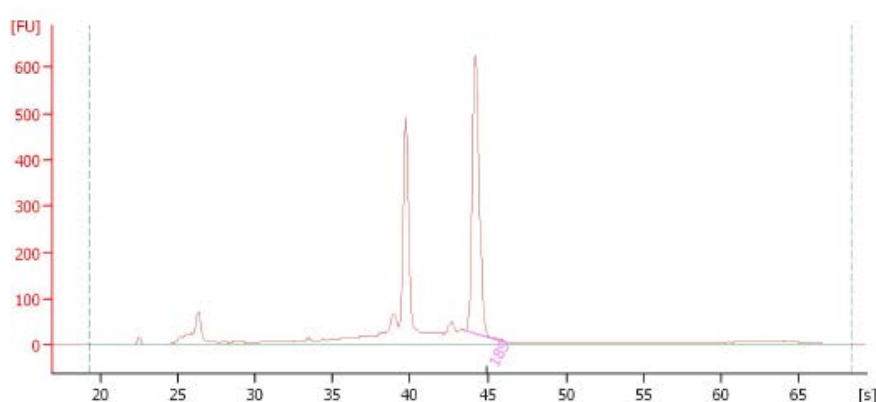


Figura 6. Eletroferograma da amostra de RNA extraído com Qiagen *RNeasy Plant Mini Kit*® de biofilme da cepa EH-315 de *Histoplasma capsulatum*.

Os resultados obtidos neste estudo, acima apresentados, indicam falha em alguma etapa do processo, a hipótese do grupo para a possível falha indica os processos de extração de RNA. As análises, dos resultados de quantificação e avaliação de integridade, realizadas acima tem como base para discussão o estudo comparativo, de amostras de RNA tratadas e não tratadas com DNase, realizado por Norhazlin et al. (2015).

4.3. Quantificação de cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir destas amostras e quantificado também em NanoVue® (*GE Healthcare*) e foram obtidas as seguintes concentrações: 2,136 ng/μl

para cDNA sintetizado a partir de amostra com RNA extraído de culturas planctônicas da cepa EH-315 de *H. capsulatum* com Qiagen *RNeasy Plant Mini Kit*®; e 1,842 ng/μl para cDNA sintetizado a partir de amostra com RNA extraído de biofilmes da cepa EH-315 de *H. capsulatum* com Qiagen *RNeasy Plant Mini Kit*®.

4.4. Padronização das reações de PCR em tempo real

O intuito foi padronizar a reação de PCR em Tempo Real para posterior análise do gene expresso pela proteína DASH no processo de desenvolvimento do biofilme.

Para a padronização realizamos corridas de PCR em tempo real com diferentes concentrações dos primers propostos e obtivemos o resultados presentes das tabelas 5, 6 e 7.

Tabela 5. Valores de Ct para amostras em cultura planctônica e biofilme da cepa EH-315 de *Histoplasma capsulatum* frente às diferentes concentrações do primer rRNA.

rRNA							
0,5 μM		0,7 μM		0,8 μM		1,0 μM	
Amostra	Ct	Amostra	Ct	Amostra	Ct	Amostra	Ct
Planctônica	37,0448	Planctônica	Undet.	Planctônica	Undet.	Planctônica	Undet.
Biofilme	38,9934	Biofilme	Undet.	Biofilme	Undet.	Biofilme	Undet.

Tabela 6. Valores de Ct para amostras em cultura planctônica e biofilme da cepa EH-315 de *Histoplasma capsulatum* frente às diferentes concentrações do primer GAPDH.

GAPDH							
0,5 μM		0,7 μM		0,8 μM		1,0 μM	
Amostra	Ct	Amostra	Ct	Amostra	Ct	Amostra	Ct
Planctônica	Undet.	Planctônica	Undet.	Planctônica	Undet.	Planctônica	Undet.
Biofilme	39,1604	Biofilme	Undet.	Biofilme	Undet.	Biofilme	39,5364

Tabela 7. Valores de C_t para amostras em cultura planctônica e biofilme da cepa EH-315 de *Histoplasma capsulatum* frente às diferentes concentrações do primer DASH.

DASH							
0,5 μ M		0,7 μ M		0,8 μ M		1,0 μ M	
Amostra	C_t	Amostra	C_t	Amostra	C_t	Amostra	C_t
Planctônica	36,0082	Planctônica	37,3988	Planctônica	36,7732	Planctônica	35,8604
Biofilme	Undet.	Biofilme	Undet.	Biofilme	38,5573	Biofilme	37,6478

Os resultados de C_t , assim como a curva de amplificação, não apresentaram resultados positivos para a padronização. Os valores de C_t considerados adequados para uso nos cálculos de expressão gênica não podem ultrapassar o número de 35 ciclos, pois a amostra perde sua confiabilidade. É possível observar tanto nas tabelas 5, 6 e 7 quanto na figura 8 que os resultados de encontram fora dos valores considerados adequados.

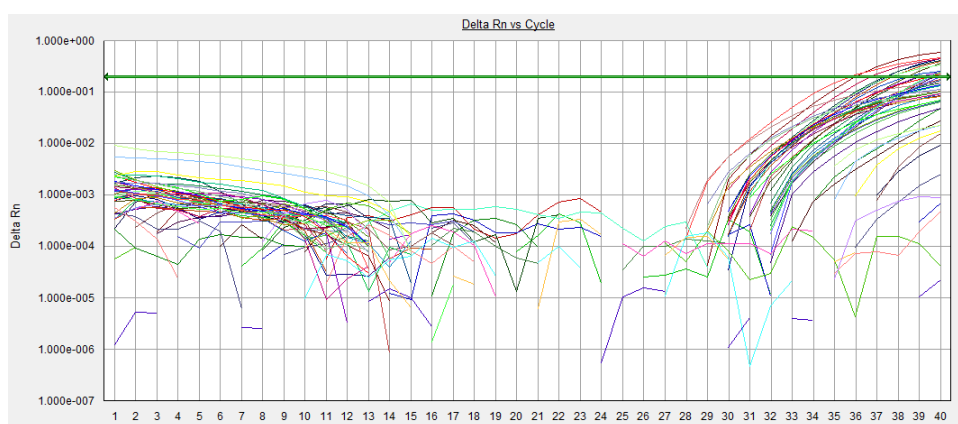


Figura 7. Curva de amplificação dos genes rRNA, GAPDH e DASH em amostras de cultura planctônica e biofilme da cepa EH-315 de *H. capsulatum*, com finalidade de padronizar a reação de PCR em tempo real, partindo de concentrações de 0,5 μ M, 0,7 μ M, 0,8 μ M e 1,0 μ M de *primers* dos respectivos genes.

De acordo com estudo realizado por Ladeira, Isaac e Ferreira (2011) o C_t da amostra é inversamente proporcional à quantidade inicial de amostra disponível para amplificação. Os resultados obtidos no estudo para C_t apresentaram valores acima de 35 ciclos, e muitas vezes acima até do valor máximo mensurado pelo equipamento. Sendo

assim, podemos então concluir que a quantidade de cDNA na reação foi insuficiente partindo do princípio que ele necessitou de um número muito elevado de ciclos para emitir a fluorescência para o equipamento.

Na figura 9 é possível observar o resultado da curva de dissociação das amostras em questão. A curva de dissociação, utilizada para identificar dímeros de primers ou amplificação de produto não específico, também não apresentou um resultado satisfatório. O ideal para uma curva de dissociação é que suas curvas apresentem seu picos na mesma temperatura. Como não foi observada um número de amplificações considerável as curvas apresentadas na figura 9 são possivelmente dímeros de primers.

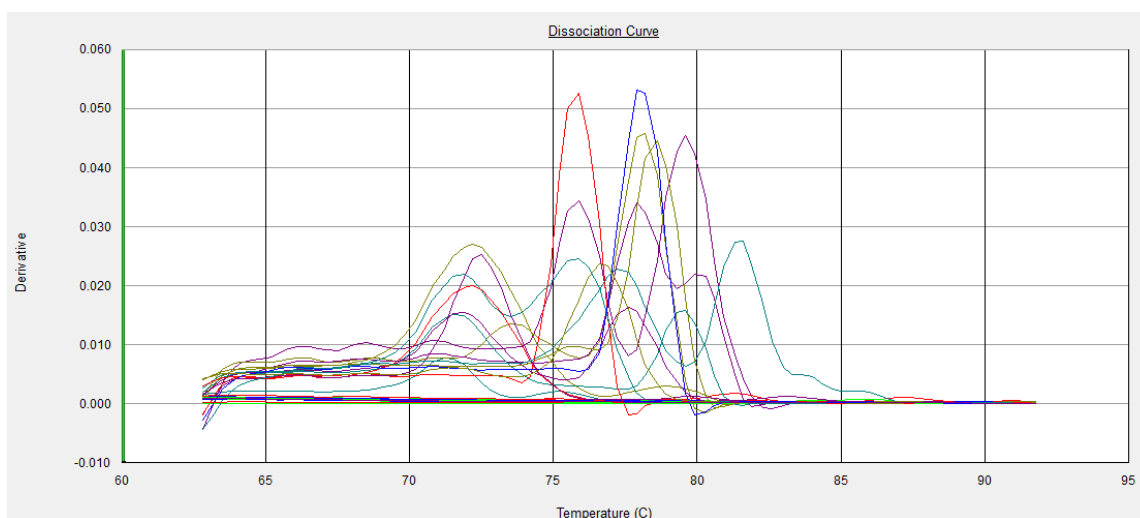


Figura 8. Curva de dissociação dos genes rRNA, GAPDH e DASH em amostras de cultura planctônica e biofilme da cepa EH-315 de *H. capsulatum*, com finalidade de padronizar a reação de PCR, partindo de concentrações de 0,5 μ M, 0,7 μ M, 0,8 μ M e 1,0 μ M de *primers* dos respectivos genes.

Outro ponto levantado pelo grupo foi a falta de um tratamento com DNase (desoxirribonuclease), pois realizando o tratamento podemos garantir que não foi amplificado DNA no lugar da amostra de cDNA. No trabalho em questão não podemos vincular isso ao resultado que obtivemos, já que não a amplificação não ocorreu

conforme desejado. Como demonstrado por Gouveia, G. R. (2011) em estudo comparativo de três protocolos distintos para extração de RNA, a amostra sofre visível influencia nos resultados quando tratada com DNase e apresentou bons resultados em seu estudo. Fato também comprovado por J. Norhazlin et al. (2015) que também realizou estudo comparativo de amostra de RNA tratada e não tratada com DNase.

5. CONCLUSÕES

Podemos concluir que apesar dos resultados do nosso estudo não permitirem a continuidade do processo de análise de expressão gênica, ele ainda sim teve relevância ao pontuar possíveis pontos de falha para o processo que possivelmente auxiliará em estudos futuros utilizando a metodologia de PCR em tempo real para genes referentes ao fungo *H. capsulatum*.

A primeira consideração a ser feita é a comparação entre os dois tipo de extração de RNA, e através da razão A260nm/A280nm e analisando os resultados fornecidos pelo equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer® (Agilent Technologies) foi possível concluir que a extração realizada com Qiagen *RNeasy Plant Mini Kit*® se destaca em rendimento e qualidade de amostra comparada a extração realizada com Trizol. Ainda assim, será necessário um ajuste de quantidade de amostra inicial de massa celular da cultura planctônica e biofilme adicionada à coluna para a realização da extração.

Por fim, ao concluirmos que a quantidade de amostra de cDNA foi insuficiente para a reação podemos relacionar o fato levantado com alguma possível intercorrência durante o processo de síntese de cDNA, falha no processo de extração de RNA ou até mesmo um detalhe na concentração adicionada no início do processo de extração do RNA pode ser determinante para a obtenção ou não de resultados ao fim do processo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDÉ, M. A. Chapter 4--histoplasmosis. **J Bras Pneumol**, v. 35, n. 11, p. 1145-51, Nov 2009. ISSN 1806-3756. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20011851> >.

AGILENT TECHNOLOGIES. Agilent 2100 Bioanalyzer. 2100 Expert user's guide. Germany: Agilent Technologies, 2005.

AL-FATTANI, M. A.; DOUGLAS, L. J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, p. 999-1008, April 2006. Disponível em: < <http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.46569-0> >.

BENCHIMOL, JL., and SÁ, MR., eds. and orgs. **Adolpho Lutz: Dermatologia e Micologia = Dermatology and Micology [online]**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2004. 620 p. Adolpho Lutz. Obra Completa, v.1, book 3. ISBN: 85-7541-043-1. Available from SciELO Books <<http://books.scielo.org>>.

BOHSE, M. L.; WOODS, J. P. Expression and interstrain variability of the YPS3 gene of *Histoplasma capsulatum*. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 4, p. 609-15, Apr 2007a. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17337639> >.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias : guia de bolso / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 8. ed. rev. – Brasília : Ministério da Saúde, 2010. 444 p. : Il. – (Série B. Textos Básicos de Saúde).

COLOMBO, A. L. et al. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. **Med Mycol**, v. 49, n. 8, p. 785-98, Nov 2011. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21539506> >.

COSTERTON, J. W. et al. Microbial biofilms. **Annu Rev Microbiol**, v. 49, p. 711-45, 1995. ISSN 0066-4227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8561477> >.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-22, May 1999. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10334980> >.

DEEPAK, S. A. et al. Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. **Current Genomics**, v.8, p. 234-251, Mar 2007. ISSN 1389-2029. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2430684/> >.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin Microbiol Rev**, v. 15, n. 2, p. 167-93, Apr 2002. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11932229> >.

EDWARDS, J. A.; ALORE, E. A.; RAPPLEYE, C. A. The yeast-phase virulence requirement for α -glucan synthase differs among *Histoplasma capsulatum* chemotypes. **Eukaryot Cell**, v. 10, n. 1, p. 87-97, Jan 2011. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21037179> >.

ERRANTE, P. R.; FRAZÃO, J. B.; CONDINO-NETO, A. Deficiência da adesão leucocitária tipo I. **Rev. bras. alerg. Immunopatol**, vol. 34, n. 6, p. 225-233, Dez 2011. ISSN 0103-2259.

FARINA, C. et al. Imported and autochthonous histoplasmosis in Italy: new cases and old problems. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 22, p. 169-171, Sep 2005. ISSN: 1130-1406. Disponível em: < <http://www.reviberoammicol.com/2005-22/169171.pdf> >.

FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S. [Histoplasmosis]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, n. 2, p. 192-8, 2009 Mar-Apr 2009. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19448941> >.

GEITMANN, A.; EMONS, A. M. The cytoskeleton in plant and fungal cell tip growth. **J Microsc**, v. 198, n. Pt 3, p. 218-45, Jun 2000. ISSN 0022-2720. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10849200> >.

GOODWIN, R. A., Jr., F. T. Owens, J. D. Snell, W. W. Hubbard, R. D. Buchanan, R. T. Terry, and R. M. des Prez. 1976. Chronic pulmonary histoplasmosis. **Medicine (Baltimore)** 55:413–452.

GOUVEIA, G. R. et al. Comparação de três protocolos distintos para extração de RNA de amostras fixadas em formalina e embrocadas em parafina. **Bras Patol Med Lab**, v. 47, n.6, p. 649-654, Dez 2011.

GUGNANI, H.C.; MUOTOE-OKAFOR, F. African histoplasmosis: a review. **Rev. Iberoam Micol** 1997, v. 14, p. 155-159.

HEID, C.A., Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Rev*, 1996; 6(10): 986-994.

HILTY, J.; GEORGE SMULIAN, A.; NEWMAN, S. L. *Histoplasma capsulatum* utilizes siderophores for intracellular iron acquisition in macrophages. **Med. Mycol.**, v. 49, n. 6, p. 633-642, Aug 2011. Disponível em: < <http://mmy.oxfordjournals.org/content/49/6/633.full.pdf+html> >.

HOLBROOK, E. D.; RAPPLEYE, C. A. *Histoplasma capsulatum* pathogenesis: making a lifestyle switch. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.11, n.4, p. 318-324, 2008.

NORHAZLIN, J. et al. Effect of DNase treatment on RNA extraction from preimplantation murine embryos. **Genet. Mol. Res.** V.14, n.3, p.11172-10184, Aug 2015.

NOSANCHUCK, J.D.; GACSER, A. *Histoplasma capsulatum* at the host-pathogen interface. *Rev. Microbes Infect.* 2008 July; v. 10(9); p. 973-977.

KAUFFMAN, C. A. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 1, p. 115-32, Jan 2007. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17223625> >.

KLEIN, B.S.; TEBBETS, B. Dimorphism and virulence and fungi. **Curr Opin Microbiol.** August 2007; 10(4): 314–319. doi:10.1016 / j.mib.2007.04.002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3412142/pdf/nihms31336.pdf> >.

KUBISTA M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. The Real-time Polymerase Chain Reaction. *Mol Aspects Med*, 2006, 27:95-125.

KUROKAWA, C.S.; SUGIZAKI, M.F.; PERAÇOLI, M.T.S. **Virulence factors in fungi of systemic mycoses.** *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, vol. 40, n. 3, April 1998. ISSN 1678-9946. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46651998000300001 >.

LADEIRA, P. R. S; Isaac, C.; Ferreira, M. C. Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real. **Rev Med**, v. 90, n.1, p. 47-51, 2011.

MEDOFF, G. et al. Correlation between pathogenicity and temperature sensitivity in different strains of *Histoplasma capsulatum*. **J Clin Invest**, v. 78, n. 6, p. 1638-47, Dec 1986. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3782474> >.

MIHU, M. R.; NOSANCHUK, J. D. *Histoplasma* virulence and host responses. **Int. J. Microbiol.**, v.1, n.1, p. 1-5, Aug 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3189557/pdf/IJMB2012-268123.pdf> >.

NICKLAS J.A., Buel E. Quantification of DNA in forensic samples. *Anal Bioanal Chem*, 2003; 376(8): 1160-1167.

PITANGUI, N. S. et al. Adhesion of *Histoplasma capsulatum* to pneumocytes and biofilm formation on an abiotic surface. **Biofouling**, v. 28, n. 7, p. 711-8, 2012. ISSN 1029-2454. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22784100> >.

PITANGUI, N. S. Análise proteômica diferencial do biofilme de *Histoplasma capsulatum* e implicações na interação fungo-hospedeiro. 2012. 144 f. Tese – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Araraquara, 2012.

NOSANCHUK, J. D.; GACSER, A. Histoplasma capsulatum at the host-pathogen interface. **Microbes Infect**, v. 10, n. 9, p. 973-7, Jul 2008. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18672088> >.

SARDI, J. C. O. et al. Highlights in pathogenic fungal biofilms. **Rev. Iberoam, Micol.** V. 31, n. 1, p. 22-29, 2014. ISSN 1130-1406. Disponível em: < <http://www.elsevier.es/en-revista-revista-iberoamericana-micologia-290-pdf-90268779-S300> >.

Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ*, 2005; 29: 151–159.

World Health Organization. International Travel and Health. Disease Information. Histoplasmosis. Disponível em: <<http://www.who.int/ith/diseases/histoplasmosis/en/>> Acesso em: 13/09/2015.

Araraquara, 07 de janeiro de 2016

Leticia Sumie Sato

Estagiária de Iniciação Científica

De acordo, _____

Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida

Orientadora