

“Análise da expressão de genes modulados por FABP4 em lesões murinas induzidas por *Leishmania amazonensis*”

Palavras-Chave: FABP4; infecção; *Leishmania*.

Autores(as):

Ayra Mahalla de Souza, IB – Unicamp

Mariana Borges Costa Brioschi, IB – Unicamp

Prof. Dr. Danilo Ciccone Miguel, IB – Unicamp

INTRODUÇÃO:

As leishmanioses fazem parte das Doenças Tropicais Negligenciadas e podem ser causadas por mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. A ocorrência está associada principalmente às condições precárias de saneamento básico ou a falta de afetando, ocupação de áreas de bordas de mata, pobreza e, deste modo, majoritariamente os países subdesenvolvidos (WHO, 2023).

Os parasitos do gênero *Leishmania* infectam principalmente macrófagos em hospedeiros vertebrados, onde sobrevivem em vacúolos parasitóforos na forma amastigota, modulando o ambiente para garantir sua sobrevivência.

O tratamento para essas infecções é complexo devido à toxicidade dos fármacos disponíveis, que em sua maioria necessitam de administração parenteral. Sabe-se até o presente momento que a proteína FABP4 interfere no sucesso da infecção em certas células hospedeiras que abrigam *Leishmania amazonensis*, facilitando o transporte de ácidos graxos e regulando a expressão de genes relacionados ao armazenamento e síntese desses ácidos; essas atividades se explicam, pois, a FABP4 faz interação com ácidos graxos e mediadores lipídicos na célula, diminuindo a disponibilidade dessas moléculas e sucessivamente de seus alvos, como o PPAR γ . Quando a FABP4 está presente, a disponibilidade de ácidos graxos livres aumenta, resultando no bloqueio da resposta inflamatória e aumentando a atividade do PPAR γ , promovendo o tráfego acelerado de colesterol (MAKOWSKI et al., 2005).

Nesse sentido, o estudo da proteína FABP4 se torna interessante para compreender a infecção e ajudar nas descobertas de novos tratamentos.

METODOLOGIA:

- Genotipagem

A genotipagem dos animais foi afirmada por PCR convencional a partir do DNA extraído de uma pequena porção da cauda do camundongo, logo após as amplificações, para visualizar a corrida, foi utilizado gel de agarose 1,5%. Os primers utilizados para amplificação foram: aP2-1 (CAGCACTCACCCACTTCTTTCAT), aP2 402F (ACATACAGGGTCTGGTCATG) e neo-2 (ATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCCT), conforme protocolo de rotina para genotipagem dos animais, já estabelecido pelo grupo de laboratório de acordo com o grupo do Dr. G. Hotamisligil (Harvard University).

- **Animais e Procedimento experimental**

Foram utilizados 18 camundongos, que posteriormente a genotipagem foram divididos em dois grupos, sendo um grupo de selvagens (WT) e/ou heterozigotos (HE) e um deletado para a proteína FABP4 (KO) (Protocolo CEUA nº 6385-1).

- **Diluição Limitante**

Os animais infectados dos dois grupos foram eutanasiados para a remoção dos tecidos das lesões da pata direita e dos linfonodos caudais. Os tecidos e o baço do animal WT2 foram isolados, pesados e macerados com 1 mL de PBS 1x utilizando um pistilo autoclavado. O conteúdo foi armazenado em eppendorfs de 1,5 mL, mantidos no gelo para posterior centrifugação e sucessivas lavagens. Após a última lavagem, o pellet foi distribuído em placas de 96 poços para diluições sucessivas. As placas foram incubadas por 7 dias a 26°C para verificar o crescimento das culturas e quantificar os parasitas viáveis em meio 199, com o objetivo de estabelecer os valores aproximados do número de parasitas viáveis por grama de lesão (COSTA FILHO, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

- **Genotipagem**

A genotipagem por PCR convencional dos camundongos C57Bl/6 WT e fabp4-/- foi a primeira etapa realizada. Através da eletroforese e revelação do gel, confirmou-se a composição dos grupos de trabalho para correta separação.

- **Infecção *in vivo***

Para as infecções *in vivo* com *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) em camundongos C57Bl/6 WT e fabp4-/-, o parasito foi mantido em cultura em meio 199 (Sigma-Aldrich) pH 4,8 até que os promastigotas atingissem a fase estacionária e se diferenciassem em amastigotas axênicos, momento adequado para a inoculação dos parasitos nos camundongos. A inoculação foi realizada com 1×10^6 amastigotas axênicos. Durante certo período, os animais infectados com *L. amazonensis* foram monitorados, e a medição das patas direita e esquerda foi realizada duas vezes por semana com um paquímetro digital, para avaliar a progressão da infecção no coxim plantar traseiro direito. A eutanásia ocorreu equiparada a análise da curva conforme a infecção progredia indicando sinais de inversão

ou não. Os animais foram pesados em balança analítica, e ambas as patas foram retiradas. Com um bisturi, a lesão da pata direita foi exposta para a realização de um *imprint* nas lâminas e, em seguida, as patas foram processadas para a realização da diluição limitante.

INFECÇÃO I

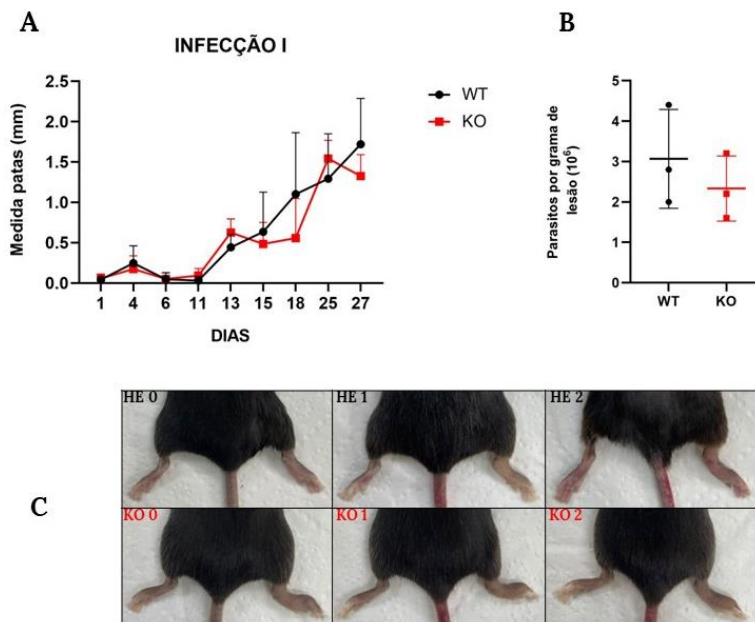


Figura 1: A) Medida das patas em mm; B) Parasitos por grama de lesão ($\times 10^6$); C) Imagens das patas dos camundongos WT (superior) e KO (inferior), após 27 dias corridos de infecção, onde os animais foram eutanasiados e organizados em posição dorso-caudal para obtenção das imagens.

INFECÇÃO II

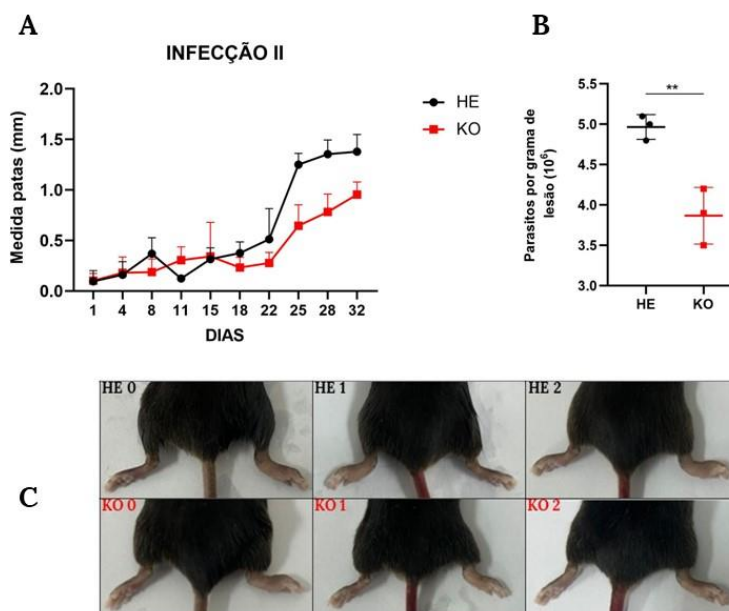


Figura 2: A) Medida das patas em mm; B) Parasitos por grama de lesão ($\times 10^6$); C) Imagens das patas dos camundongos HE (superior) e KO (inferior), após 32 dias corridos de infecção, onde os animais foram eutanasiados e organizados em posição dorso-caudal para obtenção das imagens.

INFECÇÃO III

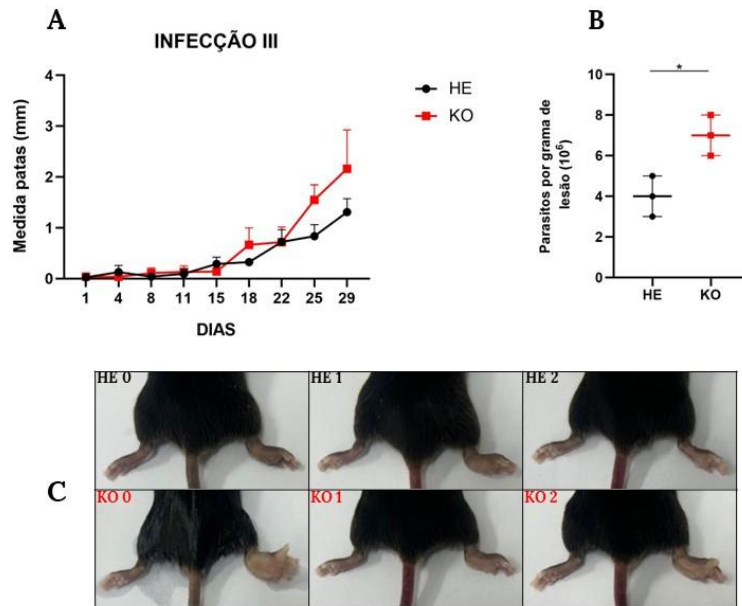


Figura 3: A) Medida das patas em mm; B) Parasitos por grama de lesão ($\times 10^6$); C) Imagens das patas dos camundongos HE (superior) e KO (inferior), após 29 dias corridos de dias corridos de infecção, onde os animais foram eutanasiados e organizados em posição dorso-caudal para obtenção das imagens.

As replicatas biológicas (figuras 1,2 e 3) foram submetidas à avaliação dos aspectos de lesão, e as inversões de curva entre WT/HE e KO (figuras 1-A e 3-A). Essa inversão é esperada como já observado pelo grupo de pesquisa, no início da infecção os animais do grupo WT/HE tendem a ter uma infecção mais acelerada, porém, depois de um curto período a curva com o KO se inverte. Nos testes realizados na **INFECÇÃO II** (figura 2-A; B e C), o experimento foi ajustado para que a eutanásia ocorresse antes da inversão da curva com objetivo de estabelecer um limiar comparativo entre as cargas parasitárias e a expressão gênica de alguns genes essenciais envolvidos na infecção. Referente a carga parasitária, nota-se (figura 1-B; 2-B e 3-B) que a quantidade de parasitos por grama de lesão entre os indivíduos do grupo KO em relação ao WT/HE se relaciona com a progressão da infecção por *L. amazonensis*, refletindo também na carga de parasitos por macrófago infectado (figura 4) e propondo que a proteína FABP4 interfere e exerce controle na infecção.

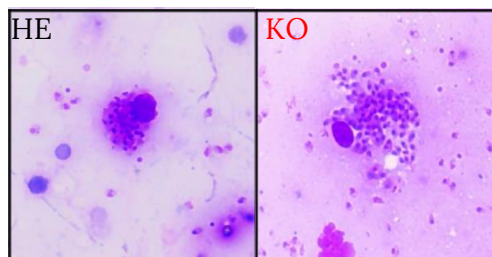


Figura 4: Imprintg de pata infectada demonstrando os macrófagos do grupo isolado de HE e KO infectados com amastigotas de *L. amazonensis*.

O caso do animal WT 2

Percebendo uma visceralização proeminente, os possíveis órgãos que costumam conter parasitos foram investigados, deste modo, o baço foi retirado e encontrou-se amastigotas de *L. amazonensis* (figura 5-B) e notou-se que os macrófagos infectados possuíam uma carga acentuada de amastigotas (figura 5-C). O aumento exacerbado de parasitos no baço e fígado causa a condição de hepatoesplenomegalia, que diz respeito ao aumento excessivo desses órgãos. Infecções por *L. amazonensis*, geralmente, estão associadas a outras formas clínicas de leishmaniose, mas em casos raros pode ocorrer a visceralização. Na (figura 5-B), referente à lâmina do baço, foram localizados amastigotas, confirmando o caso de visceralização da WT2. Pode-se observar que WT2, para além da condição exposta na figura 2, também apresentou perda de pelo na região abdominal

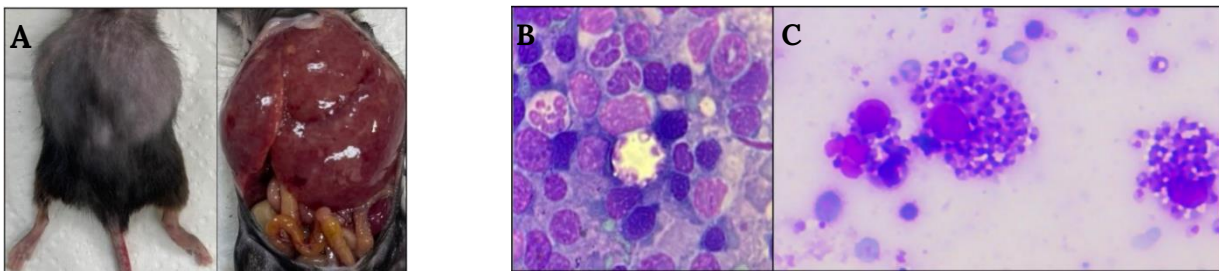


Figura 5: A) Condição de hepatoesplenomegalia; B) Lâmina do baço com amastigotas no centro e C) Lâmina do imprint da pata do WT2 com macrófagos infectados com amastigotas.

CONCLUSÕES:

No período de realização dos experimentos, sugerimos que a proteína FABP4 tem função importante na contenção da infecção por *L. amazonensis* quando comparamos WT/HE e KO para além de uma visão ampla de como a infecção ao longo das semanas se comporta. As análises da expressão gênica dos principais genes modulados por FABP4 por PCR real time ainda está sendo finalizadas.

BIBLIOGRAFIA

FURUHASHI, M; HOTAMISLIGIL, G.S. **Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets.**

WHO. Leishmaniasis. Disponível em: Leishmaniose (who.int) (2023).

COSTA FILHO, Arnaldo Velloso da; LUCAS, Íris Campos; SAMPAIO, Raimunda Nonata Ribeiro. **Estudo comparativo entre miltefosina oral e antimoniato de N-metil glucamina parenteral no tratamento da leishmaniose experimental causada por Leishmania (Leishmania) amazonensis.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, 2008.

BURZA, S., CROFT, S. L., BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, Sep 15;392(10151):951-970, 2018.

LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** Methods. 2001.