



DETECÇÃO DE POLIMORFISMOS DE IL-18 E IL-10 EM PACIENTES COM PARACOCIDIOIDOMICOSE



Olivatti AL, Mamoni RL, Blotta MHSL

Fomento: FAPESP

Laboratório de Imunologia Celular e Molecular - Departamento de Patologia Clínica
Faculdade de Ciências Médicas, CP 6111
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

Palavras chave: paracoccidiodomicose - polimorfismos de um único nucleotídeo - IL-18 - IL-10

INTRODUÇÃO

A paracoccidiodomicose (PCM) é a micose sistêmica mais prevalente no Brasil. É causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis* e acomete principalmente trabalhadores rurais do sexo masculino. A grande variabilidade da resposta imunológica dos indivíduos à infecção pelo *P. brasiliensis* resulta em diferentes formas clínicas da doença. A resistência está associada à produção de citocinas que ativam macrófagos, como IFN- γ e TNF- α (resposta Th1). Já nas formas mais graves da doença ocorre um predomínio de citocinas do tipo Th2 (IL-4 e IL-5). A IL-18 e a IL-12 atuam em conjunto na estimulação da produção de IFN- γ , a principal citocina ativadora de macrófagos, essencial para a destruição do *P. brasiliensis*. Entretanto, em concentrações muito elevadas estas citocinas podem causar uma resposta inflamatória exacerbada no local da infecção, com conseqüências deletérias para o hospedeiro. A IL-10 é uma citocina supressora da resposta Th1, responsável pela inibição da atividade efetora do IFN- γ , que induz a atividade fungicida dos fagócitos. Entretanto, em certas situações a IL-10 pode ter um papel essencial na modulação da resposta inflamatória excessiva. Os polimorfismos de um nucleotídeo podem predispor indivíduos a doenças e influenciar na resposta a drogas. Em função da importância dos níveis adequados de IL-18 e IL-10 para a resposta eficiente do hospedeiro frente à infecção pelo *P. brasiliensis*, o objetivo do presente trabalho foi verificar se polimorfismos nos genes dessas duas citocinas, associados a maior ou menor produção das mesmas, podem ter influência no desenvolvimento da PCM.

METODOLOGIA

Casuística

Para o estudo do polimorfismo da IL-18 (-607 A/C) foram incluídos 45 controles (indivíduos saudáveis) selecionados na zona endêmica de Campinas e 27 pacientes com PCM atendidos no Hospital das Clínicas da UNICAMP. Para estudo do polimorfismo da IL-10 (-1082 A/G) foram incluídos 84 indivíduos controle e 61 pacientes.

Extração de DNA

Foram coletados de cada indivíduo 5 mL de sangue periférico em tubos com EDTA. Após centrifugação a porção contendo os leucócitos (*buffy-coat*) foi separada e utilizada para a extração do DNA, utilizando-se DTAB/CTAB-clorofórmio.

PCR alelo específico (ARMS - Amplification Refractory Mutation System).

Para verificar a presença dos polimorfismos de IL-18 (-607 A/C) e de IL-10 (-1082 A/G) nas amostras, foi utilizada uma técnica de PCR-ARMS, conforme descrito por Zhang et al. (2005) e Perrey et al. (1999), respectivamente, e esquematizado na figura 1.

Análise estatística

As freqüências genotípicas e alélicas foram comparadas pelo teste 2, sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$.

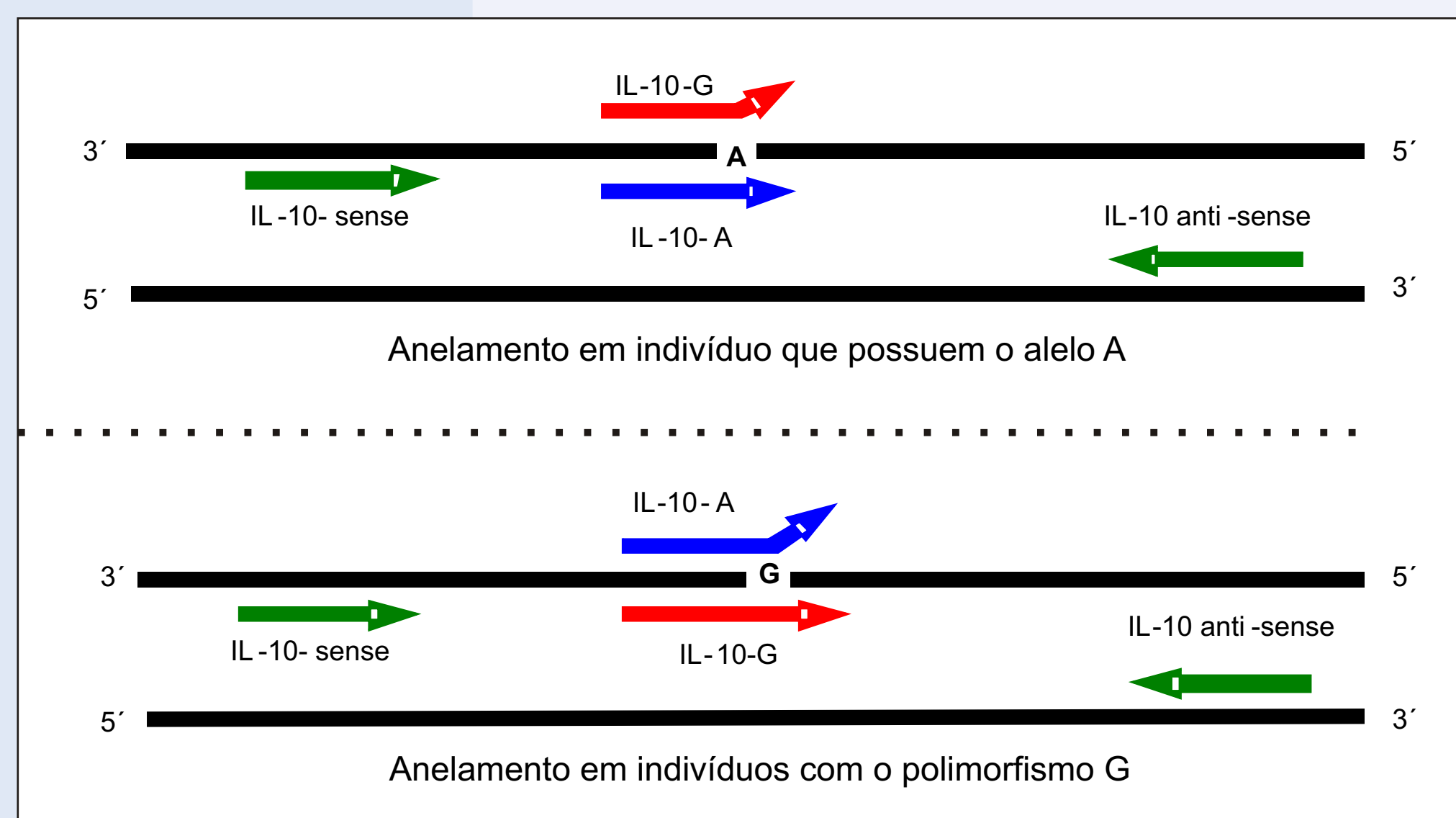


Figura 1. O ARMS é uma adaptação da PCR, onde dois iniciadores senso são desenhados com extremidades 3' complementares ao alelo normal (IL-10-A) ou mutado (IL-10-G, alelo específicos) e um iniciador anti-senso complementar a ambos os alelos (IL-10 anti-sense). A técnica é baseada no princípio de que a Taq DNA polimerase não apresenta atividade 3'-5' exonuclease, de modo que o mal pareamento entre a extremidade 3' do iniciador e o DNA molde resulta na impossibilidade de amplificação. Como controle da reação é utilizado um iniciador IL-10 sense que anela em uma região anterior àquela de anelamento do iniciador alelo específico. Dessa forma para cada amostra são feitos 2 tubos reação, no primeiro coloca-se os iniciadores IL-10-A (alelo selvagem), IL-10 sense e IL-10 anti-sense, e no segundo os iniciadores IL-10-G, IL-10 sense e IL-10 anti-sense. O mesmo foi realizado para detecção dos polimorfismos da IL-18.

RESULTADOS

O PCR-ARMS para o estudo dos polimorfismos de um único nucleotídeo permite verificar a presença de pelo menos uma banda (controle) e a formação de uma segunda banda demonstra a presença do polimorfismo, conforme a figura 2.

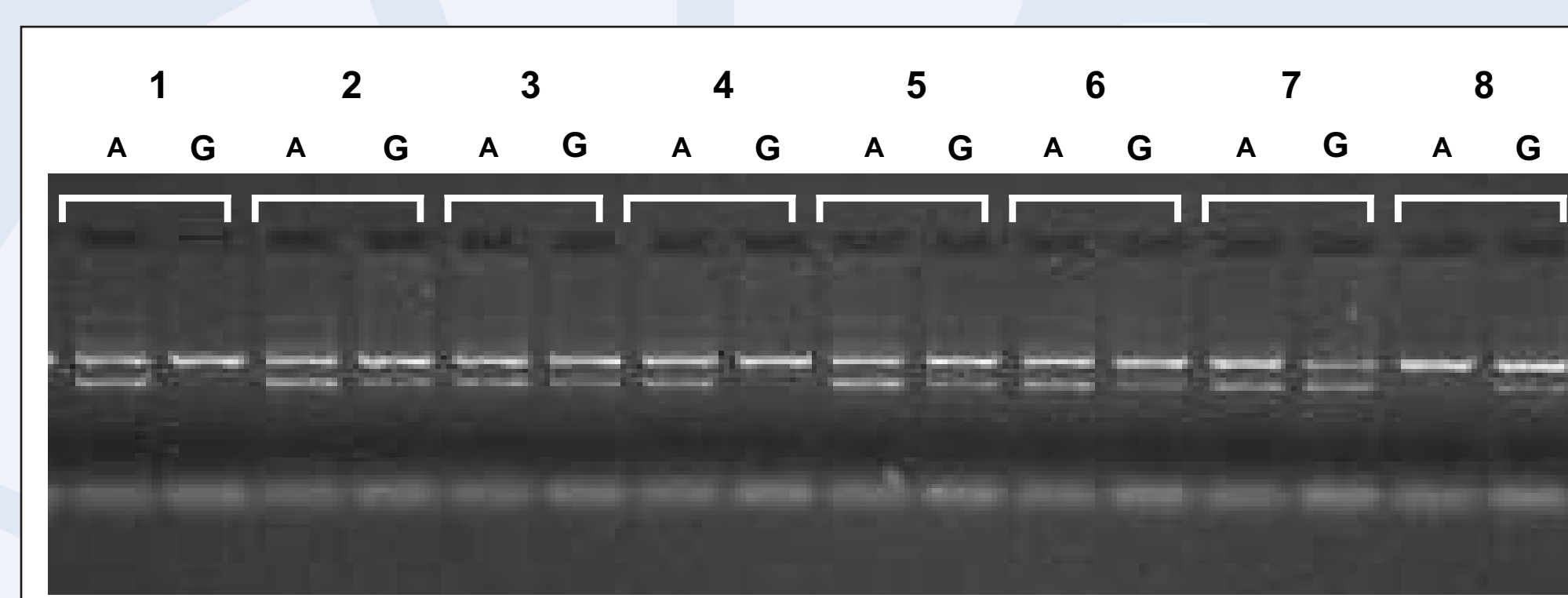


Figura 2. Gel de agarose corado com brometo de etídio, para detecção do polimorfismo -1082 A/G da IL-10 por meio da técnica de PCR-ARMS. Na figura pode-se observar amostras apresentando homozigose para o alelo A (1 e 4) e para o alelo G (8) ou heterozigose (2, 3, 5, 6 e 7).

A análise dos polimorfismos nos grupos estudados não mostrou diferença quanto a freqüência genotípica nas posições -607 A/C e -137 G/C do gene da IL-18, nem tampouco nas posições -1082 A/G e -819 C/T da IL-10 (tabela 1, figura 3).

Tabela 1. Freqüência dos genótipos nos polimorfismos de IL-18 (-607 A/C e -137 G/C) e IL-10 (-1082 A/G e -819 C/T) em controles e pacientes.

Polimorfismos	Alelos	Controles (%)	Pacientes (%)
IL-18 (-607)	AA	24 (53,3)	8 (29,6)
	CC	4 (8,9)	4 (14,8)
	AC	17 (37,8)	15 (55,6)
IL-18 (-137)	CC	6 (10,4)	4 (7,5)
	GG	25 (43,1)	25 (47,1)
IL-10 (-1082)	AA	36 (42,8)	26 (42,6)
	GG	9 (10,7)	12 (19,6)
IL-10 (-819)	AG	39 (46,4)	23 (37,7)
	CC	15 (37,5)	15 (35,7)
	TT	5 (12,5)	8 (19)
	CT	20 (50)	19 (45,2)

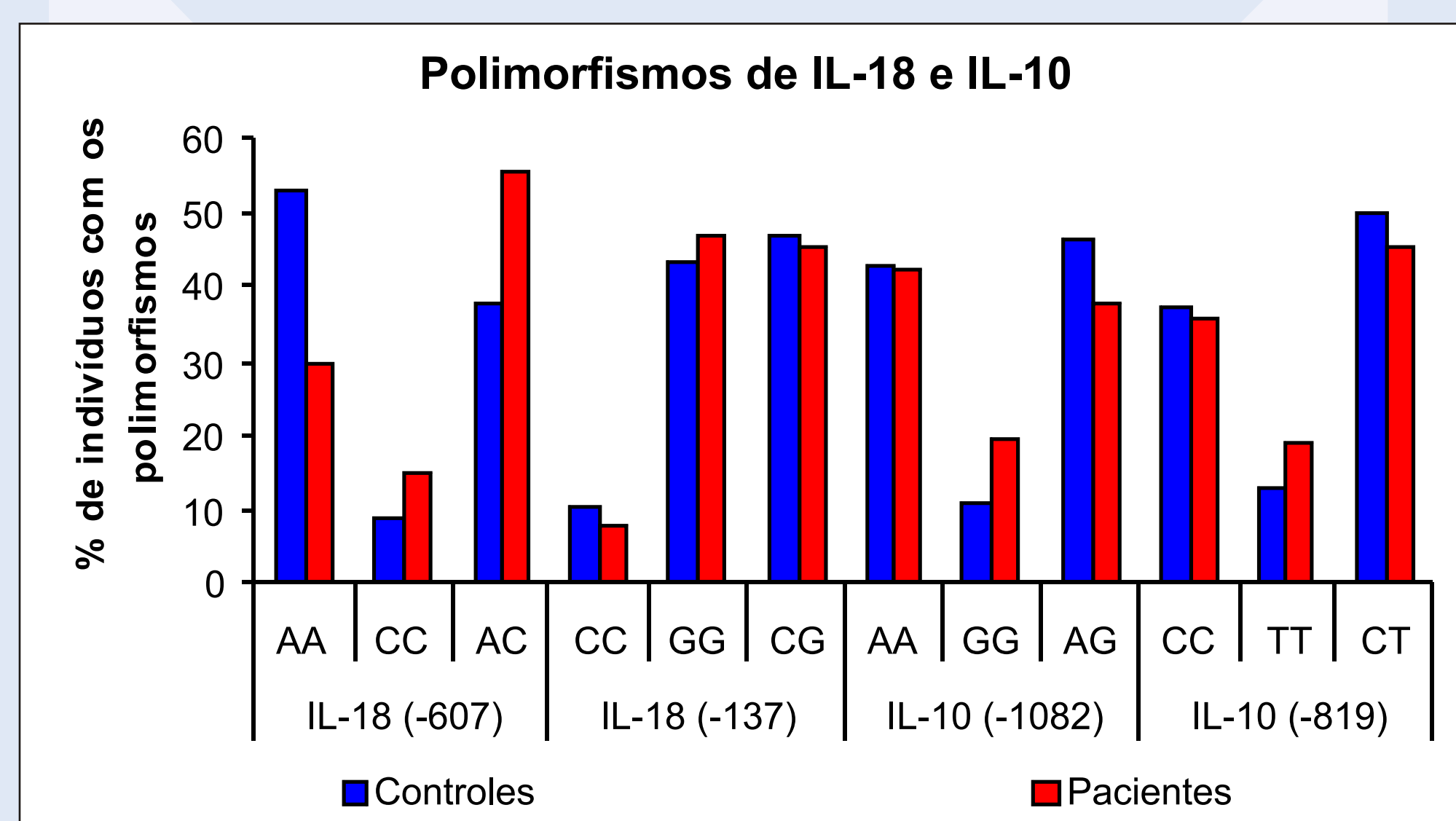


Figura 3. Análise da porcentagem de controles e pacientes (FA e FJ) com os polimorfismos de IL-18 (-607 A/C e -137 G/C) e IL-10 (-1082 A/G e -819 C/T).

Entretanto, a análise da freqüência alélica evidenciou uma freqüência significativamente maior do alelo A do gene da IL-10 nos pacientes e do alelo G nos controles (tabela 2 e figura 4). Em relação a IL-18 verificou-se uma tendência ($p=0,081$) de maior freqüência do alelo C nos pacientes e do alelo A nos controles (tabela 2 e figura 4).

Tabela 2. Freqüência dos alelos nos polimorfismos IL-18 (-607 A/C) e IL-10 (-1082 A/G) em controles e pacientes.

Polimorfismo	Alelo	Controles (%)	Pacientes (%)
IL-18 (-607)	A	65 (73,1)	31 (57,4)
	C	24 (27,9)	23 (42,6)
IL-10 (-1082)	A	75 (40,32)	111 (59,68)
	G	57 (54,8)	47 (45,2)

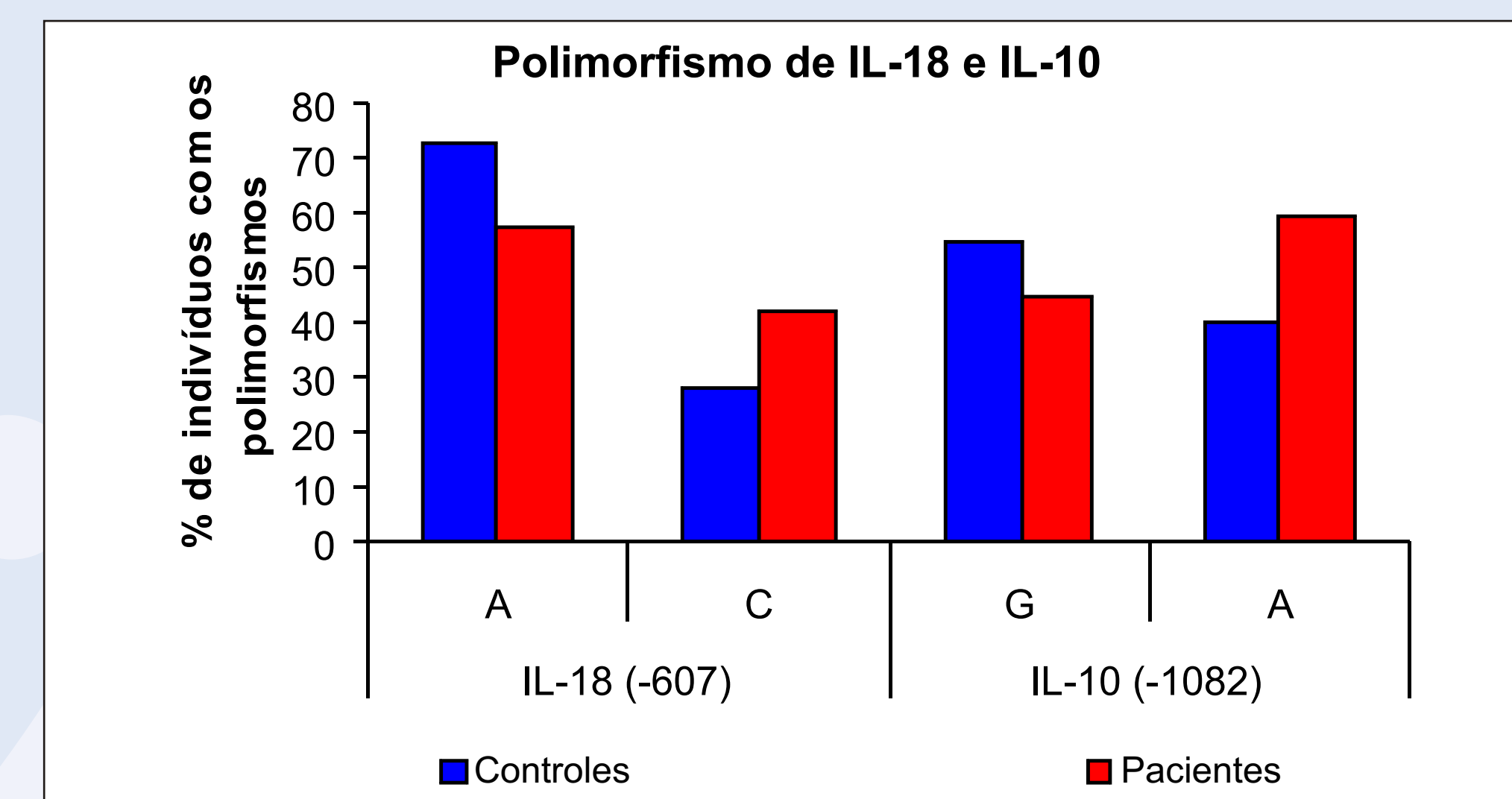


Figura 4. Análise da porcentagem de controles e pacientes (FA e FJ) com os polimorfismos de IL-18 e IL-10.

DISCUSSÃO

A IL-18 é uma citocina associada à inflamação crônica e níveis elevados são detectados no soro de pacientes com PCM, principalmente naqueles com as formas mais graves e ativas da doença (Corvino et al. 2007). Nosso estudo demonstrou uma tendência a maior freqüência do alelo C, relacionado à produção elevada de IL-18 nos indivíduos doentes e do alelo A nos indivíduos saudáveis. A produção de concentrações elevadas de IL-18 pode promover uma exacerbada da resposta inflamatória, com um efeito negativo sobre a resposta imunológica do paciente.

Embora tenha papel supressor da resposta Th1, a IL-10 é capaz de limitar a reação inflamatória no local de infecção e representa um mecanismo regulatório muito importante no controle da resposta a patógenos intracelulares. Nosso estudo demonstrou uma freqüência significativamente maior do alelo A, associado a menor produção de IL-10 nos indivíduos doentes e do alelo G nos indivíduos saudáveis. A maior freqüência do alelo A nos doentes poderia resultar em um controle deficitário da resposta inflamatória ao *P. brasiliensis*, prejudicando a resposta imunológica e favorecendo a doença.

CONCLUSÃO

Embora preliminares, os resultados mostraram uma maior freqüência do alelo C na posição -607, que poderia proporcionar uma maior produção de IL-18, associado a maior freqüência do alelo A na posição -1082, associado a menor produção de IL-10 nos pacientes com PCM em relação aos controles. Em conjunto esses polimorfismos poderiam resultar em maior predisposição a uma resposta inflamatória exacerbada e pior controle da disseminação fúngica pelo hospedeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Zhang PA, Wu JM, Li Y et al. Association of polymorphisms of interleukin-18 gene promoter region with chronic hepatitis B in Chinese Han population. *World J Gastroenterol.* 2005; 11: 1594-8.
- Perrey C, Turner SJ, Pravica V, Howell WM, Hutchinson IV. ARMS-PCR methodologies to determine IL-10, TNF- α , TNF- β and TGF- β 1 gene Polymorphisms. *Transpl. Immunol.* 1999 Jun;7(2):127-8.
- Corvino CL, Mamoni RL, Fagundes GZZ, Blotta MHSL. Serum IL-18 and sTNFR2 are associated with disease severity in patients with paracoccidiodomycosis. *Clin Exp Immunol.* 2007;147(3):483-90.

