

Produção de Interleucinas RNAm em Camundongos BALB/c Infectados por *Paracoccidioides brasiliensis*, com Análises dos Resultados Através de Processamento de Imagens

Adriana Januário¹; Rosemeire C. L. Rodrigues Pietro¹ (rose@spider.usp.br); Evandro L. L. Rodrigues² (evandro@peterpan.sel.eesc.sc.usp.br); Celso A. de França²; Celio L. Silva¹

¹ Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia FMRP-USP

² Departamento de Engenharia Elétrica EESC-USP

Resumo - A paracoccidioidomicose é uma infecção fúngica progressiva causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, caracterizada por uma reação inflamatória crônica, granulomatosa e por uma depressão da resposta imune mediada por célula. As interações fungo-hospedeiro induzem distúrbios imunoregulatorios que promovem alterações na produção de citocinas. Iniciamos um estudo sobre a produção de RNAm para citocinas em camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis*. No início da infecção, observamos produção equivalente para IL-2 e IL-10 RNAm, com predomínio de RNAm para IL-2 no pulmão. Ao contrário, as células do fígado apresentaram maiores níveis para o RNAm de IL-10. Neste modelo, há uma mudança dinâmica nos níveis de RNAm para IL-2 e IL-10, sugerindo a presença de ambas populações de células T CD4+. Estes resultados e o progresso desta investigação contribuirão para um melhor entendimento da imunopatologia da paracoccidioidomicose.

Abstract - Paracoccidioidomycosis is a progressive fungic infection caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, characterized for a chronic and granulomatous inflammatory reaction and by a depression of the cell mediated immune response. The fungus-host relationships induce immunoregulatory disturbances promoting unbalanced levels of interleukins production. We are studying mRNA cytokines production in BALB/c mice infected with *P. brasiliensis*. In the beginning of the disease, with *P. brasiliensis* stimulated mice showed an analogous production between IL-2 and IL-10 mRNA, however, there is a predominancy in IL-2 mRNA in the lung. In opposition to this in the liver cells IL-10 mRNA was abundant. In this model, there is a dynamic change in the levels of IL-2 and IL-10 mRNA, suggesting the presence of both CD4+ T helper cells. These results and the progress of this investigation will contribute to a better understanding of immunopathology of paracoccidioidomycosis.

Introdução

A Paracoccidioidomicose é uma doença sistêmica crônica causada pelo *Paracoccidioides brasiliensis*. O desenvolvimento de infecção é dependente de vários fatores relacionados ao hospedeiro e ao fungo, podendo levar a morte¹.

A resistência relativa à vários patógenos pode ser estabelecida pelo padrão de citocinas produzido pelas células T helper e pelas moléculas coestimulatórias expressas na superfície celular das células apresentadoras de antígenos², podendo ser um indicador da evolução da paracoccidioidomicose. Com o objetivo de compreender melhor as interações hospedeiro/parasita, analisamos a presença RNAm (RNA mensageiro) para diferentes interleucinas em órgãos como o Baço, a Glândula Adrenal, Fígado, Linfonodo, Pulmão e Timo em camundongos Balb/c infectados com *P. brasiliensis*.

Metodologia

O RNAm extraído dos vários órgãos de camundongos Balb/c infectados com *P. brasiliensis*, foi fixado em membrana de nylon, sendo submetido à reação de hibridação utilizando uma sonda de cDNA (DNA complementar) de interleucina radioativamente marcada com ³²P, que posteriormente é autoradiografada em filme Fuji RTM. Os filmes assim obtidos (figuras A, B, C, D, E e F) foram analisados visando a quantificação dos RNAm para as interleucinas, sendo usado como controle de normalização a concentração de β-actina. A análise das imagens autoradiográficas, teve um encaminhamento bastante criterioso calcado nos conceitos de processamento de imagens^{5,6}. Em todas as etapas para obtenção dos dados a serem analisados, também houve acentuada atenção aos métodos utilizados. A transformação da autoradiografia em imagem, foi realizada em "scanner" de 600 "dpi" no modo de iluminação transmissiva. Duas informações presentes nas imagens são relevantes neste processo: a área autoradiografada para cada órgão e a translucidez,

ou seja, o nível de cinza médio dessa mesma área. A partir da aquisição da imagem, foram aplicados filtros adequados, para que não houvesse perda de informação, e a seguir as imagens foram submetidas à detecção de bordas^{6,7}. Conhecida então a fronteira de interesse, calculou-se a área e a respectiva translucidez, para cada órgão.

Todas as condições experimentais de extração de RNA, fixação na membrana, reação de hibridação e autoradiografia foram pré-estabelecidas e realizadas de acordo com dados da literatura³.



Figura A - β-actina (1ª semana)



Figura B - IL - 2 (1ª semana)



Figura C - IL - 10 (1ª semana)



Figura D - β-actina (4ª semana)



Figura E - IL - 2 (4ª semana)



Figura F - IL - 10 (4ª semana)

Resultados

A análise de nossos resultados demonstraram que os níveis de produção de RNAm para IL-2 e IL-10 foram semelhantes, entretanto podemos ressaltar que na 1ª semana de infecção há um grande aumento nos níveis de produção de RNAm IL-2 no pulmão (32%) e timo (15%), enquanto que os níveis de RNAm IL-10 foram maiores no fígado (22%).

Na quarta semana de infecção os níveis para IL-2 e IL-10, mostraram um aumento acentuado nos níveis de RNAm IL-10 para todos os órgãos (de 20% a 40%). Notamos também que no pulmão, há alternância dos níveis das interleucinas, estando os níveis de IL-2 altos no início da infecção

(32% a mais), enquanto na quarta semana os níveis maiores foram os de IL-10 (29% a mais).

Estes dados sugerem a existência de diferentes padrões de células T helper nesse modelo de infecção e estas populações alternam-se no curso da infecção⁴.

Discussão

As citocinas são moléculas potencialmente imunorreguladoras e podem ser utilizadas como um referencial para o entendimento da evolução da resposta imune do hospedeiro em diversas doenças. Com este propósito investigamos a expressão das interleucinas IL-2 e IL-10 na Paracoccidioidomicose. A descrição do perfil de produção destes mediadores imunológicos permitenos o reconhecimento dos distúrbios desencadeados pela infecção, possibilitando o desenvolvimento de intervenções terapêuticas.

Referências

- ¹ San-Blas, G. - *Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent* - Paracoccidioides Brasiliensis. J. Med. Vet. Mycol., n° 31 - pp. 99-113, 1993.
- ² Durum, S.K. and Oppenheim, J.J. - *Proinflammatory cytokines and immunity* - In W.E.Paul (ed). Fundamental Immunology, 3rd ed Raven Press Ltda., New York, 1993.
- ³ Sambrook, J.; Fritsch, E.F. and Manniatis, T. - *Molecular cloning: A Laboratory manual* - 2nd. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press New York, 1989.
- ⁴ Mosmann, T. and Coffman, R. - *Two Types of Mouse Helper-cell Clone: Implications for Immune Regulations* - Immunology Today, n° 8, pp.223-227, 1987.
- ⁵ Tzay Y. Young and King-Sun Fu, *Handbook of Pattern Recognition and Image Processing*, Academic Press, Inc., 1986.
- ⁶ D. Marr and E. Hildreth, *Theory of edge detection*, Proc. Royal Society London, 1980.
- ⁷ A. Gonzaga e C. A. França, *Um sistema de Processamento de imagens dirigido a microcomputador compatível com PC*, V SIBGRAPI, nov. 1992.