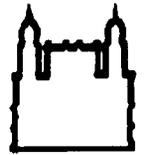




**UFBA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES  
FcGAMA EM LEUCÓCITOS DE PACIENTES COM  
LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA**

**GEORGE MARIANE SOARES SANTANA**

**Salvador - Bahia - Brasil  
2002**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós Graduação em Patologia**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES  
FcGAMA EM LEUCÓCITOS DE PACIENTES COM  
LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA**

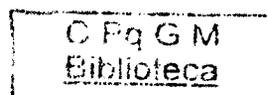
**George Mariane Soares Santana**

**Orientador: Johan Van Weyenbergh**

Dissertação apresentada para  
Obtenção de grau de Mestre em  
Patologia, área de concentração  
em Patologia Experimental

Salvador-Bahia

2002



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do CPqGM /FIOCRUZ  
Salvador - Bahia.

Santana, George Mariane Soares  
S231a Avaliação da expressão dos receptores FcGama em leucócitos de  
pacientes com Leishmaniose cutânea localizada / George Mariane Soares  
Santana. \_ Salvador: Universidade Federal da Bahia / Centro de  
Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ, 2002.  
70 p.:ils.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental)- Universidade  
Federal da Bahia, 2002.

1. Leishmaniose Cutânea. 2. Receptores FcGama. I. Título.

CDU 616.993:577.27

PUC  
11/11/02  
11/11/02

11/11/02  
11/11/02

**Avaliação da expressão dos receptores Fcγ3 em leucócitos de pacientes com leishmaniose cutânea localizada**

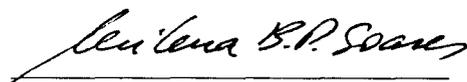
**GEORGE MARIANE SOARES SANTANA**

FOLHA DE APROVAÇÃO

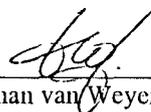
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Maria Ilma Andrade Santos Araújo  
Médica  
IIUPES - UFBA



Dra. Milena Botelho Pereira Soares  
Pesquisadora Assistente  
CPqGM - FIOCRUZ



Dr. Johan van Weyenbergh  
Pesquisador Visitante  
CPqGM - FIOCRUZ

*Dedico este trabalho a minha esposa Ivone Silva de Jesus, familiares e amigos, pela solidariedade e incentivo constante.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Johan Van Weyenbergh

Pela sua orientação, disponibilidade e incentivo

Ao Dr. Manoel Barral Netto, por ter me concedido à oportunidade de iniciar minha trajetória na pesquisa, junto aos pesquisadores do LIM1

Ao Dr. Jan van de Winkel, por sua colaboração e fornecimento dos anticorpos

Ao Dr. Theo Thepen, pelo apoio e colaboração com a utilização da Imunotoxina e dos anticorpos

Aos estimados amigos da Fundação Monte Tabor (HSR), pelo companheirismo e cooperação

Aos amigos especiais do laboratório (LIM1 e LIP), pelo incentivo constante e solidariedade

Aos colegas do mestrado, pelos momentos agradáveis de aprendizado e amizade

À Silvia Cardoso, José Roberto, Jorge Tolentino e Jorge Clarêncio, pela colaboração no desenvolvimento do trabalho e convivência agradável

A Rosália Meire e Rosecarla, pelo carinho e atenção constante

Ao curso de Pós-graduação e aos professores, pela dedicação

As Bibliotecárias Ana Maria Fiscina e Vânia, pela ajuda na obtenção e organização das referências bibliográficas

Aos setores de comunicação visual e informática, pelo apoio na elaboração dos recursos visuais necessários para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Centro de pesquisa Gonçalo Moniz, pela disponibilidade do espaço físico, pessoal e recursos que possibilitaram a realização deste trabalho

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	X
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1.2 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE MURINA.....	2
1.3 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE HUMANA.....	3
1.4 TRATAMENTO.....	4
1.5 OS RECEPTORES Fc HUMANOS.....	8
1.5.1 Internalização e apresentação de antígeno.....	12
1.5.2 ADCC.....	12
1.5.3 Liberação de mediadores.....	13
1.5.4 Polimorfismos.....	14
1.5.5 Papel dos FcγR nas patologias.....	15
1.5.6 Receptores Fc na imunoterapia.....	18
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3 JUSTIFICATIVAS.....	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1 POPULAÇÃO ESTUDADA.....	22
4.2 CONTROLES.....	22

4.3	OBTENÇÃO DAS CÉLULAS.....	23
4.4	PROTOCOLO DE MARCAÇÃO.....	23
4.5	CITOMETRIA DE FLUXO.....	24
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
4.7	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	25
5	RESULTADOS.....	28
5.1	DEFINIÇÃO DE POPULAÇÕES CELULARES.....	28
5.1.1	Morfologia.....	28
5.1.2	Marcação específica.....	28
5.2	QUANTIFICAÇÃO DE POPULAÇÕES CELULARES.....	29
5.3	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS Fc $\gamma$ R.....	30
5.3.1	Avaliação da expressão % Fc $\gamma$ r.....	30
5.3.2	Avaliação da expressão dos Fc $\gamma$ r em MFI.....	31
5.4	CORRELAÇÃO DE PORCENTAGEM DE Fc $\gamma$ R.....	31
5.5	CORRELAÇÃO DE MFI DE Fc $\gamma$ R.....	32
5.6	CORRELAÇÃO ENTRE DADOS CLÍNICOS E EXPRESSÃO DE Fc $\gamma$ R.....	33
6	DISCUSSÃO.....	50
7	CONCLUSÕES.....	55
8	PERSPECTIVAS.....	56
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
9	ANEXOS.....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpo
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA)
BCG	Bacilo Calmette-Guérain
CD	Código de diferenciação
DTH	teste de intradermorreação de Montenegro
Fc $\gamma$ R	Receptor para fração Fc das imunoglobulinas G
FITC	Isoftiocianato de fluoresceína
G-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HR	alto respondedor
IFN- $\gamma$	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
ITAM	Sequência conservada de ativação de imunoreceptor contendo tirosina
ITIM	Sequência conservada de inibição do imunoreceptor contendo tirosina
Ka	Constante de associação
KDa	quilo Dalton
LCD	leishmaniose cutânea difusa
LCL	leishmaniose cutânea localizada
LCM	leishmaniose cutânea mucosa
LR	Baixo respondedor
LV	leishmaniose visceral
MDX44	Imunotoxina
MFI	Intensidade média de fluorescência
MMII	Membros inferiores
MMSS	Membros superiores
NA	Antígeno de neutrófilo
NK	Natural Killer
PE	Ficoeritrina
PMN	Polimorfonucleares
PMNN	Polimorfonuclear Neutrófilo
PMNE	Polimorfonuclear Eosinófilo
RIFI	Reação de Imunofluorescência indireta
TGF	Fator de crescimento e transformação
Th	Célula T helper
TNF	Fator de necrose tumoral

**RESUMO**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES FcGAMA EM LEUCÓCITOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA. George Mariane Soares Santana.** O curso da infecção por *Leishmania* apresenta características clínicas variadas, dependente da virulência e do tropismo do parasita, além da resposta imune do hospedeiro. Recentemente foi demonstrado que a infecção por *Leishmania mexicana* não se estabelece na ausência de anticorpos circulantes ou dos receptores Fc. Sabendo que os receptores Fc constituem uma interface entre a resposta imune humoral e celular, e que estes dois tipos de resposta aparentemente se antagonizam na leishmaniose, avaliamos a expressão dos receptores para IgG (CD16, CD32 e CD64) na superfície de leucócitos do sangue periférico de pacientes com leishmaniose cutânea localizada, comparando com controles sadios e correlacionamos a expressão dos receptores para IgG com dados clínicos. Nossos dados mostram um aumento significativo da porcentagem de monócitos expressando CD16, de linfócitos expressando CD32, e de neutrófilos expressando CD32 e CD64. A expressão de CD32 em linfócitos mostrou correlação significativa com a porcentagem de célula B em pacientes, mas não em controles, o que sugere uma possível participação deste receptor na resposta humoral na leishmaniose cutânea localizada. Em contraste aos controles, a porcentagem de CD16 em monócitos de pacientes não se correlacionou com CD64 em neutrófilos e com nenhum marcador de linhagem mieloide ou linfoide. Porém, observamos correlação significativa entre a porcentagem de CD16 em monócitos e o tamanho da lesão nos pacientes, sugerindo que este receptor representa um possível marcador de severidade e/ou evolução clínica de doença, como já foi demonstrado na AIDS.

**Palavras-chaves:** 1. Leishmaniose Cutânea. 2. Receptores Fcgama

**ABSTRACT**

**STUDY OF FcGAMMA RECEPTOR EXPRESSION IN LEUKOCYTES OF PATIENTS WITH LOCALIZED CUTÂNEOUS LEISHMANIASIS. George Mariane Soares Santana.** The course of *Leishmania* infection presents several clinical features, depending on parasite virulence and tissue tropism, beside host immune response. Recently have previously shown that *Leishmania mexicana* infection does not establish in the absence of circulating antibody and Fc receptors. Considering that Fc receptors compose an interface between humoral and cellular immune response, which apparently antagonize each other in leishmaniasis, we evaluated IgG receptor (CD16, CD32 and CD64) surface expression in peripheral blood cells from patients with localized cutaneous leishmaniasis, as compared to normal healthy controls and correlated Fc receptor expression to clinical data. Our data show a significant increase in the percentage of monocytes expressing CD16, of lymphocytes expressing CD32 and of neutrophils expressing CD32 and CD64. Lymphocyte CD32 expression was significantly correlated to the percentage of B cells in patients, but not in controls, suggesting possible participation of this receptor in humoral immune response in localized cutaneous leishmaniasis. In contrast to controls, the percentage of CD16 in monocytes from patients did not correlate to CD64 in neutrophils, nor with any myeloid or lymphoid lineage marker. However, we observed a significant correlation between CD16 expression in monocytes and lesion size in patients, suggesting this receptor might represent a marker of disease severity and/or evolution, as has been previously shown in AIDS.

**Key –words:** 1. Cutaneous Leishmaniasis. 2. Fcgamma receptors

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A leishmaniose é uma zoonose que resulta do parasitismo dos hospedeiros vertebrados por protozoários do gênero *Leishmania* (família *Trypanosomatidae*, ordem *Kinetoplastida*). O parasito pode ocorrer sob duas formas evolutivas: promastigota, que é uma forma flagelada extracelular encontrada dentro do trato digestivo dos vetores e a forma amastigota que é encontrada nos tecidos, predominantemente parasitando células do sistema fagocítico mononuclear de mamíferos (NEVES et al., 1997).

Essa doença é causada por 21 espécies de leishmanias e são transmitidas por cerca de 30 espécies de flebotomíneos. Os humanos são considerados hospedeiros acidentais e outros mamíferos, como roedores e cães são classificados como reservatórios (HERWALDT et al., 1999).

Várias formas clínicas se destacam: cutânea, visceral e mucosa. No Brasil, a distribuição geográfica da leishmaniose cutânea é ampla. Com exceção do Rio Grande do Sul, a doença tem sido registrada em todo território nacional. A incidência chega a exceder 35.000 casos/ano no país. Em 1998 foram notificados 12.069 casos novos, sendo aproximadamente 40% deles situados na região nordeste, acometendo principalmente os estados do Maranhão, Ceará e Bahia (MS-FNS, 1998). A forma visceral encontra-se distribuída em 17 estados do Brasil e em outras áreas do continente americano, sendo uma endemia em franca expansão geográfica. Tem-se registrado cerca de 2.000 casos, por ano, no país, com letalidade em torno de 10% (MENDES et al., 2000). Aproximadamente 3% dos pacientes com infecção por *L. braziliensis* evoluem para a forma cutâneo mucosa (BARRAL et al.,

1997). Atualmente, a crescente manifestação da leishmaniose em pacientes portadores do HIV despertou interesse em analisar a patogênese dessa doença fora dos países endêmicos.

## 1.2 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE MURINA

Uma importante contribuição para melhorar o entendimento dos mecanismos imunológicos da leishmaniose humana foi realizado a partir do modelo experimental utilizando camundongos resistentes (C57BL/6, CBA) e susceptíveis (BALB/c) à infecção por *L. major*, sendo decisivo para o desenvolvimento do conceito de dois tipos de resposta imune, tipo 1 e tipo 2, que promoveram a cura ou a progressão da doença, respectivamente (MOSMANN & COFFMAN, 1986). O curso da infecção depende da ação preferencial de sub-populações de linfócitos T, baseada no perfil de citocinas produzidas pelas células T helper (CD4+) antígeno-específicas. A depender do estímulo antigênico ou da linhagem dos camundongos utilizados, dois perfis distintos de resposta das células T CD4+ foram identificados. O perfil da resposta tipo 1, nos quais os clones celulares secretam citocinas como IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\beta$  (LT), associa-se ao fenótipo de resistência, ativando macrófagos que inibe a multiplicação dos parasitos, levando ao controle da lesão. O perfil de resposta tipo 2 é caracterizado por clones celulares que secretam as citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 associando-se ao fenótipo de susceptibilidade, que inativa os mecanismos de controle da multiplicação dos parasitos. Por outro lado esta resposta promove uma grande produção de anticorpos e inativação de macrófagos e sabe-se que somente os macrófagos ativados são capazes de destruir a *Leishmania* (CHERWINSKY et al., 1988 & HEINZELC et al., 1989 & COFFMAN et al., 1988).

A contribuição dos modelos experimentais na leishmaniose foi de fundamental importância para o entendimento da imunopatogênese da doença, onde esta resposta imune polarizada determinou o atual paradigma de resposta Tipo 1 e Tipo 2. No homem, esta polarização não é regra, podendo ocorrer perfis distintos e mais complexos de resposta imune.

### 1.3 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE HUMANA

As diferentes espécies de *Leishmania* se associam com diversas manifestações clínicas onde destacam-se duas formas clínicas básicas da doença: a forma tegumentar e a forma visceral, sendo que a forma tegumentar apresenta um espectro amplo de manifestações clínicas-imunopatológicas (BRYCESSON, 1969). As formas de leishmaniose cutânea localizada (LCL) e de leishmaniose cutânea mucosa (LCM), representam um pólo responsivo por fortes reações de hipersensibilidade do tipo tardia aos antígenos da *Leishmania* na pele, devido a uma potente imunidade mediada por célula. Por outro lado, a imunidade humoral específica na LCM e LCL é menos exacerbada, com baixas produções de anticorpos (CARVALHO et al., 1994). No outro espectro da doença tegumentar, encontram-se a leishmaniose cutânea difusa (LCD) que é caracterizada pelo pólo não responsivo ou anérgico, em que os pacientes apresentam imunidade humoral exacerbada na ausência de resposta imune mediada por células (CONVIT et al., 1972). A leishmaniose visceral (LV) está representada pelas formas agudas, sub-agudas e crônicas, no entanto a maioria dos pacientes permanecem assintomáticos (BADARÓ et al., 1986). Nos indivíduos sintomáticos, observa-se uma resposta humoral marcante, enquanto a resposta imune celular com produção de IFN- $\gamma$  está suprimida (CARVALHO et al., 1985 & CARVALHO et al., 1994). Além da produção de anticorpos anti-*Leishmania*, são observados níveis

elevados de imunoglobulinas G, M e complexos imunes circulantes, sugerindo uma ativação policlonal de células B (GALVÃO CASTRO et al., 1984).

Os perfis de citocinas, produzidos pelos pacientes que desenvolvem a forma cutânea da leishmaniose são variados, sugerindo que existe um amplo espectro de resposta imune. Em um pólo estariam os indivíduos que controlam a infecção espontaneamente (KEMP et al., 1999 & CARVALHO et al., 1995 & AJDARY et al., 2000) ou após o tratamento (COUTINHO et al., 1996), assim como os pacientes com doença ativa, que apresentam resposta do tipo 1. No outro pólo estariam os pacientes com a forma cutânea difusa, que respondem com a produção de citocinas do tipo 2 (BOMFIM et al., 1996 & CASTES & TAPIA, 1998). No meio deste espectro, estariam os pacientes que apresentam uma resposta mista tipo 1/ tipo2, com predomínio de tipo1, passando por um equilíbrio entre estas respostas (ROCHA, 1999). A resposta mista tem sido observada em pacientes que apresentam a forma cutânea localizada da leishmaniose, com longo período de evolução clínica ou com lesões múltiplas, também naqueles que apresentam a forma cutânea difusa, pós tratamento (CASTES & TAPIA, 1998, GAAFAR et al., 1995 & BOMFIM et al., 1996).

#### 1.4 TRATAMENTO

O antimônio pentavalente é o quimioterápico de primeira escolha utilizado há 40 anos para LCL e LCM e tem resultados satisfatórios. Porém, o tratamento (via parenteral, 20 mg/kg/dia por 20 dias) é longo e pode requerer repetidas doses, podendo ter efeitos refratários com uma certa freqüência. Algumas complicações podem ser apresentadas, como: cardiotoxicidade, elevação das enzimas hepatocelulares e comprometimento músculoesqueléticos, necessitando de drogas alternativas (BARRAL et al., 1995).

A anfotericina B e a pentamidina geralmente são utilizadas quando os pacientes não respondem ao tratamento com antimônio pentavalente. Além dos efeitos colaterais, a grande limitação destas drogas é o custo, não sendo disponível sua utilização corriqueiramente (comunicação pessoal, Barral A.). A anfotericina B é nefrotóxica, podendo causar hipocalcemia e, durante a sua administração, pode ocorrer febre e flebite. Recentemente foram demonstrados efeitos terapêuticos positivos da anfotericina B em dose única (7-5 mg/kg/peso via parenteral), levando à cura de 90% de 203 pacientes da Índia acometidos com a forma visceral da leishmaniose. Com este esquema terapêutico a toxicidade foi minimizada (PIRISI, 2000). Por outro lado, a pentamidina pode ocasionar efeitos colaterais como hipotensão, hipoglicemia, cefaléia e mialgias (BARRAL et al., 1995).

Há um grande número de novas drogas sendo utilizadas experimentalmente para o tratamento da leishmaniose humana como: nifurtimox, rifampicina, dapsona, metronidazol, sulfametoxazol-trimetropim, paramomicina, ketoconazol, itraconazol, allopurinol dentre outras, muitas com administração oral e com resultados variáveis de cura, mais voltado para formas cutâneas da doença e uma certa especificidade para tipos variados de cepas de *Leishmania sp* (BARRAL et al., 1995).

O zinco apresenta papel importante no metabolismo dos macrófagos, célula hospedeira preferencial da *Leishmania*, sendo um fator essencial na imunidade inata, e tem sido demonstrado ter papel crucial na imunidade mediada por célula (PRASAD et al., 1995). Em um ensaio clínico randomizado incluindo 102 pacientes Iraquianos acometidos com LCL causada por *L. major* e *L. tropica*, tratados com sulfato de zinco por via oral, observou-se cura da doença e as reações colaterais foram leves, indicando o zinco como uma boa opção

terapêutica para o controle das manifestações cutâneas da leishmaniose (SHARQUIE et al., 2001).

Uma outra droga a miltefosine que é um fosfolípido alcalino para uso oral (100 à 150 mg/dia por quatro semanas), para pacientes acometidos com a forma visceral da leishmaniose. O miltefosine se mostrou uma excelente alternativa para cura dos pacientes não responsivos ao tratamento com antimonial (SUDAR et al., 1998).

O uso de vacinas com o parasito morto, associado com adjuvantes a exemplo do BCG associado a promastigotas mortas de *L. mexicana* pode ser eficiente em lesões cutâneas múltiplas e lesões mucocutâneas, mais estudos comparativos demonstram que a imunoterapia é menos eficiente e mais longa do que o tratamento convencional com o antimônio e a associação pode ser contra-indicado (BARRAL et al., 1995).

Algumas citocinas (IFN- $\gamma$ , GM-CSF) são capazes de estimular a ação leishmanicida de macrófagos in vitro (MURRAY et al.,1983 & HOOVER et al.,1985.), o que inspirou seu uso clínico para o tratamento da leishmaniose (BARRAL et al., 1995). O IFN- $\gamma$  no tratamento de lesões por *L. guianensis* tem aumentado a resposta imune mediada por célula, promovendo a cura das lesões (HARMS et al., 1989), e foi extremamente benéfico em conjunto com antimônio pentavalente na LV (BADARÓ, 1990). O GM-CSF (fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos) mostrou ação promissora na LCL (ALMEIDA et al., 1999). As maiores limitações do uso de citocinas in vivo são: o custo elevado e o desconhecimento dos efeitos tardios, já que estas aplicações são recentes.

Em conclusão, a diversidade de formas clínicas, as falhas terapêuticas e os diversos efeitos colaterais dos esquemas terapêuticos, indicam uma grande necessidade de novas alternativas para o tratamento da leishmaniose humana. A resposta terapêutica nas diversas

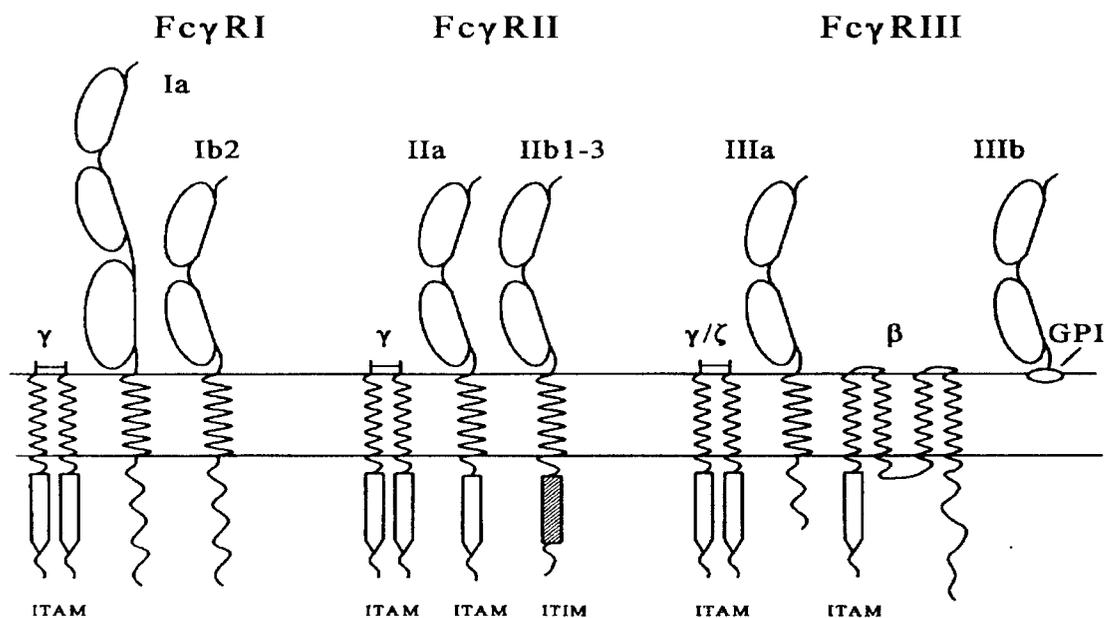
formas da leishmaniose depende da gravidade e da cronicidade da doença, Entretanto a identificação de marcadores biológicos capazes de determinar a evolução clínica dos pacientes teria papel fundamental para o sucesso terapêutico (BACELLAR & CARVALHO et al., 1991).

## 1.5 OS RECEPTORES Fc HUMANOS

Em 1966, Berken e Benacerraf foram os primeiros a reconhecer a existência de ligantes para as imunoglobulinas G em células do sistema imune. A caracterização estrutural destas moléculas, hoje em dia conhecidas como receptores Fc (FcR), foi possível com o desenvolvimento das técnicas de bioquímica e de biologia molecular.

Dois grupos gerais de FcR podem ser distinguidos: FcR expressos em leucócitos, capazes de disparar funções efectoras destas células, e o segundo grupo de FcR, que vão mediar o transporte das imunoglobulinas pela superfície epitelial (FcRn). Dentro do repertório de FcR dos leucócitos humanos, distinguimos os FcR para IgA (Fc $\alpha$ R), IgE (Fc $\epsilon$ R), IgM (Fc $\mu$ R), IgD (Fc $\delta$ R) e IgG (Fc $\gamma$ R) (VAN DE WINKEL et al., 1998).

O receptor IgA (Fc $\alpha$ R) é uma glicoproteína, membro da superfamília das imunoglobulinas “Ig-like”. O Fc $\alpha$ R (CD89) é expresso em monócitos, macrófagos, células mesangiais, neutrófilos e eosinófilos (MORTON et al., 1998). O receptor IgE (Fc $\epsilon$ R) é caracterizado por duas isoformas: o Fc $\epsilon$ RI, membro da superfamília das imunoglobulinas e o Fc $\epsilon$ RII (CD23), membro da família das lectinas (CONRAD et al., 1998), expressos em mastócitos, basófilos, células de langerhans, eosinófilos, plaquetas, monócitos e células dendríticas. O receptor IgM (Fc $\mu$ R) é expresso em subpopulações de células B, T e NK (OHNO et al., 1990). O receptor IgD (Fc $\delta$ R) está documentado em 10-15% das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (COICO et al, 1990). Sendo as IgG os isótipos de maior abundância, os receptores para IgG (Fc $\gamma$ Rs) são os receptores Fc mais numerosos, os mais complexos e os mais descritos na literatura. Existem três classes descritas de receptores Fc $\gamma$ R em humanos: Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32) e Fc $\gamma$ RIII (CD16), esquematizados na figura 1.



**Figura 1: Representação esquemática da estrutura dos receptores  $Fc\gamma$ .** Abreviações: GPI (Glicofosfatidilinositol), ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif), ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif). Fonte: HEIJNEN, 1997.

Destacam-se três genes para os receptores classe I da IgG,  $Fc\gamma$ RI (IA, IB e IC). Esses receptores têm peso molecular de 72 kDa, todos mapeados no cromossoma 1. Esta molécula é caracterizada por possuir uma região extracelular com t - “Ig-like”, um domínio transmembranar e uma cauda citoplasmática. constitutivamente em monócitos e macrófagos, e em neutrófil) IFN- $\gamma$  e G-CSF, citocinas que também aumentam sua macrófagos. Podemos encontrar expressão do  $Fc\gamma$ RI t

células dendríticas. A sua expressão é regulada negativamente na presença de IL-4 ou IL-13. O Fc $\gamma$ RI é capaz de ligar-se a monômeros de IgG com alta afinidade ( $K_a=10^8-10^9 M^{-1}$ ) e este receptor mostra-se específico para as subclasses IgG3>IgG1>IgG4>>>IgG2 em humanos, por diminuição de afinidade respectivamente (VAN DE WINKEL, 1997 & WALLACE et al., 1994).

Existem três isoformas que identificam os Fc $\gamma$ RII ( IIa, IIb, IIc) todos com peso molecular de 40 kDa, cujos genes se localizam no cromossoma 1. Essa molécula tem suas regiões transmembranares e extracelulares bastante conservadas, mas não seus domínios citoplasmáticos. O Fc $\gamma$ RIIa é o único que contém uma sequência conservada de ativação de imunoreceptor contendo tirosina diretamente na região citoplasmática ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif). Entretanto, este receptor pode transmitir um sinal de fagocitose na ausência de outras subunidades e a ligação deste receptor resulta na fosforilação da tirosina da cadeia  $\alpha$ . O Fc $\gamma$ RIIa pode associar-se à cadeia  $\gamma$  de monócitos e macrófagos, e ambos têm atividade sinalizadora, envolvendo uma variedade de receptores de kinases, e também moléculas como CD45, CD148 e CD11b/CD18. O Fc $\gamma$ RIIb é a única isoforma que contém uma sequência conservada de inibição de imunoreceptor contendo tirosina ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) (ERNST et al., 1993 & CAMBIET et al., 1995 & VAN DEN HERIK-OUDIJK et al., 1995) na sua cauda citoplasmática que, inibe a ativação celular envolvendo a ativação de fosfatases e moléculas como CD19 em células B. Os Fc $\gamma$ RII são expressos em monócitos, macrófagos, polimorfonucleares (PMNs), células de Langerhans, células B, plaquetas e células endoteliais. O Fc $\gamma$ RIIa está expresso preferencialmente em monócitos, macrófagos e neutrófilos, enquanto o Fc $\gamma$ RIIb está expresso em basófilos, mastócitos e células B.

O Fc $\gamma$ RII é capaz de ligar monômeros de IgG com baixa afinidade ( $K_a < 10^7 \text{ M}^{-1}$ ), e este receptor mostra-se específico para as subclasses IgG3 > Ig1 = IgG2 >>> IgG4 em humanos, por diminuição de afinidade respectivamente (CAMBIET et al., 1995 & VAN DE WINKEL, 1997 & WALLACE et al., 1994).

Existem duas isoformas para Fc $\gamma$ RIII (IIIa e IIIb), com ambos os genes localizados no cromossoma 1. Este receptor é uma molécula glicosilada de 50-80 kDa, e possui parte transmembranar com dois domínios extracelulares e uma cauda citoplasmática com 25 aminoácidos. O Fc $\gamma$ RIIIa está expresso em macrófagos, células NK, sub-populações de células T e monócitos quando induzido por TGF- $\beta$ , enquanto que o Fc $\gamma$ RIIIb está expresso em neutrófilos e em eosinófilos quando induzidos por IFN- $\gamma$ . A expressão e função deste receptor é dependente da associação com a cadeia  $\gamma$  em monócitos e macrófagos e com a cadeia  $\gamma$  e  $\zeta$  em células NK. Este receptor é diferencialmente glicosilado entre células mielóides e linfóides e sua expressão é regulada positivamente por TGF- $\beta$  e negativamente por IL-4. O Fc $\gamma$ RIIIa é capaz de ligar-se a monômeros de IgG com média afinidade ( $K_a = 3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ) e este receptor mostra-se específico para as subclasses Ig1 = IgG3 >>> IgG2 e IgG4 em humanos por diminuição de afinidade. O Fc $\gamma$ RIIIb é capaz de ligar-se a monômeros de IgG com baixa afinidade ( $K_a < 10^7 \text{ M}^{-1}$ ).

Todos os Fc $\gamma$ Rs existem num complexo hetero-oligomérico composto de uma cadeia  $\alpha$  e uma segunda subunidade de forma promiscua ( $\zeta$ ,  $\gamma$  ou  $\beta$ ). Sua função biológica está baseada na ação da sequência conservada na região citoplasmática: ITAM ou ITIM. As funções de cada FcR são determinadas pelas moléculas de sinalização que podem ser recrutadas de maneira diferenciada nos diversos tipos celulares. Estudos in vitro e in vivo demonstraram a habilidade de disparar uma grande variedade de respostas biológicas.

### 1.5.1 Internalização e apresentação de antígenos

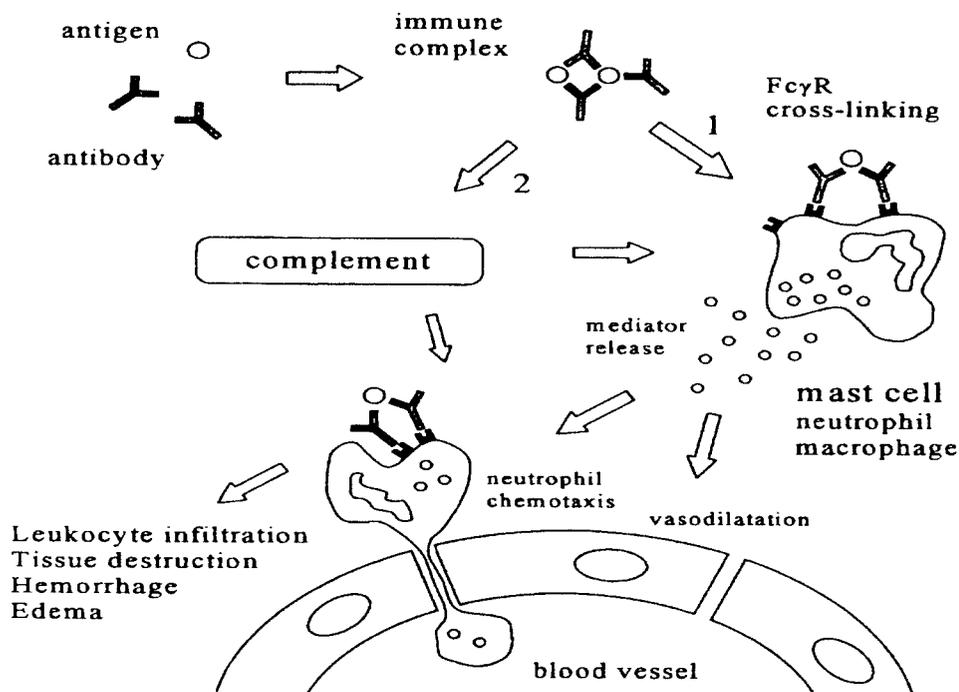
A endocitose de imuno complexos e a fagocitose de partículas opsonizadas decore da ligação dos FcR (SILVERSTEIN et al., 1989). Os mecanismos moleculares destes dois processos são diferentes. A fagocitose requer um ITAM funcionalmente intacto (INDIK et al., 1995), enquanto que a endocitose de pequenos complexos é iniciada geralmente por FcγRIa e FcγRIIa, independente da fosforilação de tirosina do ITAM (DAVIS et al., 1995). FcγR medeiam a endocitose e a fagocitose de antígenos pelos monócitos, macrófagos e células dendríticas, otimizando a resposta imune. Foi demonstrado que FcγR aumentam indiretamente a apresentação de antígenos e a estimulação das células T via facilitação da internalização do antígeno (MANCA et al., 1991 & HEIJNEN et al., 1996).

### 1.5.2 ADCC

Muitos tipos celulares que expressam FcγR têm habilidade de lisar células alvo na presença de anticorpos. A célula NK medeia citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) via FcγRIIIa (WEINER et al., 1993). O FcγRIIa é considerado um indutor de citotoxicidade de neutrófilos (STOCKMEYER et al., 1997). Apenas os neutrófilos ativados por citocinas expressam FcγRI, também capazes de induzir atividade citolítica em células tumorais (VALERIUS et al., 1993). O FcγRIIIb expresso em neutrófilos medeia citotoxicidade para eritrócitos, mas não para células tumorais (ELSÁSSER et al., 1996).

### 1.5.3 Liberação de Mediadores

A ligação de complexos imunes aos FcRs nas diversas células da resposta imune resulta em ativação celular e liberação de citocinas inflamatórias (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6), prostaglandinas, enzimas lisossomais e radicais intermediários do oxigênio (HUIZINGA et al., 1989 & VAN DE WINKEL, 1997). Estes mediadores estimulam uma variedade de respostas celulares como ADCC, destruição de micróbios, recrutamento e ativação de células efetoras e são responsáveis também pelo dano tecidual local (WALLACE et al., 1994 & HEIJNEN, 1997: figura 2).



**Figura 2: Papel dos Fc $\gamma$ R na resposta inflamatória local.** Fonte: HEIJNEN, 1997

#### 1.5.4 Polimorfismos

Vários polimorfismos dos Fc $\gamma$ Rs já foram identificados e associados a diversas patologias, uma vez que estes polimorfismos ditam diferenças em reconhecimento e fagocitose de imuno complexos ou morte de células alvo recobertas por anticorpos. Há duas formas alotípicas para o Fc $\gamma$ RIIa, com indivíduos que são baixo respondedores (LR), “low responders” e outros que são alto respondedores (HR), “high responders”. O polimorfismo do Fc $\gamma$ RIIa é atribuído a uma substituição de um aminoácido: histidina ou arginina presente na posição 131 da região extracelular (VAN DE WINKEL et al., 1993).

Outro polimorfismo bialélico está demonstrado para o Fc $\gamma$ RIIIa, numa porção da membrana proximal deste receptor contendo uma fenilalanina ou uma valina na posição 158, determinando afinidade de ligação para IgG1 e IgG3 (VAN DE WINKEL et al., 1993).

O polimorfismo do Fc $\gamma$ RIIIb é atribuído à variação de alguns aminoácidos entre os dois alótipos, designados de IIIb-NA1 e IIIb-NA2 (VAN DE WINKEL et al., 1993), resultando em quatro ou seis glicosilações na região extracelular deste receptor. Os alótipos do Fc $\gamma$ RIIIb foram identificados inicialmente por reações à transfusão de sangue: PMNs (polimorfonucleares) de indivíduos homozigotos NA2 exibiam uma maior eficiência em fagocitose de hemáceas do que os indivíduos homozigotos NA1 (SALMON et al., 1990).

Embora se desconheça polimorfismos para Fc $\gamma$ RI, existe uma família na Bélgica que contém quatro indivíduos que não expressam este receptor, nem após cultura estimulada com IFN- $\gamma$ , contudo estes indivíduos são saudáveis (VAN DE WINKEL et al., 1993).

### 1.5.5 Papel dos FcγR nas patologias

Os FcγR constituem uma significativa arma de defesa do hospedeiro contra agentes infecciosos extracelulares, através da interação direta com IgG. A opsonização do patógeno por IgG e/ou complemento permite o reconhecimento de uma variedade de organismos usando um limitado número de receptores. Esta interação facilita a morte de alvos extracelulares por ADCC e lise dependente de complemento. O receptor específico usado pelo patógeno intracelular para entrar na célula hospedeira pode, então, definir sua sobrevivência. O *Mycobacterium tuberculosis* (ARMSTRONG et al., 1971) e as *Chlamydias* não opsonizados não disparam a fusão do fagossomo com o lisossomo. Porém, quando esses patógenos são opsonizados por IgG, existe fusão do fagossomo ao lisossomo e consequente exposição às enzimas de degradação. Em contraste, outros patógenos, em particular os vírus, usam a opsonização e ligação com FcγR para facilitar a infecção (TAKEDA et al., 1988 & KRILOV et al., 1989).

A relação entre isotipos específicos de IgG com o polimorfismo dos FcγR pode permitir que o patógeno escape da ADCC e da fagocitose. O alótipo LR do FcγRIIIa tem uma afinidade maior para anticorpos IgG2 do que os HR (VAN DE WINKEL et al., 1991), acelerando a fagocitose de partículas opsonizadas por anticorpos IgG2 em indivíduos LR. As bactérias ricas em polissacarídeos são preferencialmente opsonizadas por IgG2 e os indivíduos HR possuem uma menor habilidade na fagocitose do que os indivíduos LR (SIBER et al., 1980). Esse achado foi confirmado com a observação de que crianças homozigotas LR têm menos recorrência de infecções bacterianas do que crianças homozigotas HR (VAN DE WINKEL et al., 1993). Recentemente foi demonstrado um papel sinérgico do FcγRIIIa e FcγRIIIb presentes em PMN humanos em aumentar a

eficiência da fagocitose mediando a transferência de *Bordetella pertussis* para compartimentos lisossomais, diminuindo a viabilidade destas bactérias (RODRIGUEZ et al., 2001). Em estudo realizado com camundongos FcγR<sup>-/-</sup>, mostrou-se inabilidade de controlar infecções por vírus influenza, comparado com camundongos FcγR<sup>+/+</sup> (HUBER et al., 2001). Finalmente, na leishmaniose, KIMA et al. (2000) demonstraram que o estabelecimento da infecção por membros do complexo de *Leishmania mexicana* em camundongos não se estabelece na ausência de anticorpos circulantes ou de receptores FcγRI, FcεRI e FcγRIII.

Além de mediar o reconhecimento de patógenos recobertos com IgG, por células efetoras do sistema imune, os FcRs também contribuem significativamente nos efeitos patogênicos provocados pela citotoxicidade dos auto-anticorpos e dos subprodutos da resposta inflamatória (HEIJNEN, 1997). O poder com que estes receptores medeiam a resposta imune deletéria pode ser exemplificado na demonstração experimental da morbidade associada à anemia hemolítica autoimune e trombocitopenia mediada por FcγR (CLYNES et al., 1995). Também foi demonstrado anafilaxia aguda sistêmica em modelo murino dependente de IgG1, onde a mortalidade é diretamente associada a presença da cadeia γ do FcγRIII (MIYAJIMA et al., 1997).

Outro exemplo de patologia oriunda da resposta inflamatória iniciada por FcγR é o lúpus eritematoso sistêmico (SLE), uma doença auto-imune idiopática, provocada pela reatividade de auto-anticorpos, causando uma deposição de complexos imunes em vasos sanguíneos, vasculite e destruição de tecidos (ROTHFIELD et al., 1982). Em um estudo genotípico realizado no Japão, não foi encontrada associação entre polimorfismos de FcγRIIa, FcγRIIIa e FcγRIIIb e AR (artrite reumatóide), mas demonstrou-se uma

associação significativa entre SLE e FcγRIIIb NA2/NA2 (HATTA et al., 1999). Morgan et al (2000) mostrou associação entre o alelo 158V de FcγRIIIa e susceptibilidade e severidade para artrite reumatóide. Em um estudo comparando periodontite crônica com periodontite moderada, foi correlacionado a forma grave com o genótipo para o receptor FcγRIIIa e FcγRIIIb (KOBAYASHI et al., 2001).

A utilização dos receptores Fcs como marcadores biológicos já esta descrita em algumas patologias. O CD64 é um bom marcador fenotípico de células tumorais metastáticas e a partir dele, contribuiu como estratégia de tratamento (NELSON et al., 2001). Em estudos com pacientes com doenças ateroscleróticas, definiu-se a diminuição do FcγRII (CD 32) em monócitos do sangue periférico como indicador de risco relativo ao desenvolvimento de formas severas de aterosclerose (PFEIFFER et al., 2001). Foi observado em pacientes HIV+ e AIDS a presença aumentada de monócitos ativados CD14+/16+ (LOCHER et al., 1994). Esta subpopulação está mais aumentada em AIDS associada à demência (PULLIAM, 1997). Estudos abordando fenômenos vaso-oclusivos em pacientes com anemia falciforme, mostrou aumento importante de CD64 em PMN com alta aderência endotelial (FADLON et al., 1998). Em pacientes com choque séptico, foi encontrado aumento de expressão de CD64 em monócitos e neutrófilos logo no primeiro dia do choque com diminuição em monócitos e manutenção em neutrófilos, concomitante com níveis elevados de IFN-γ e G-CSF (BARTH et al., 2001).

### 1.5.6 Receptores Fc na imunoterapia

A imunoterapia com FcR aponta para uma possibilidade de redirecionar a capacidade destrutiva induzida pelo Fc $\gamma$ R para eliminar células tumorais ou patógenos. Desde décadas passadas, os anticorpos, por serem ligantes naturais para Fc $\gamma$ R, são utilizados como tratamento para doenças infecciosas, cancer, rejeição de enxerto, doenças auto imunes, desordens circulatórias e doenças articulares. Especialmente desde Kohler e Milstein (1975), que descreveram a produção de anticorpos monoclonais por hibridomas. Das três classes de Fc $\gamma$ R existentes, o de alta afinidade representa uma molécula atrativa para intervenção na resposta imune, pois este receptor está distribuído em células restritas e dispara avidamente processos citolíticos e de fagocitose. Além disso, a expressão do Fc $\gamma$ RI aumenta significativamente a capacidade de apresentar antígenos mediante ligação com IgG (HEIJNEN, 1997). Por outro lado, é importante notar que a ação das citocinas regula a expressão dos Fc $\gamma$ RI. O G-CSF é uma citocina que aumenta o numero de granulócitos e assim diminui o risco de infecções em pacientes submetidos à quimioterapia, mas também induz o aumento de expressão de Fc $\gamma$ RI em PMN in vivo, aumentando a ADCC para células tumorais. Semelhante aumento de expressão de Fc $\gamma$ RI ocorre com o tratamento com IFN- $\gamma$  (VALERIUS et al., 1993 & WEINER et al., 1988).

Finalmente, o Fc $\gamma$ RI mostrou-se um alvo terapêutico promissor em modelo experimental de inflamação cutânea em camundongos transgênicos para o receptor humano. Uma significativa diminuição dos parâmetros clínicos de inflamação foi obtida após eliminação de macrófagos-CD64<sup>+</sup> usando a imunotoxina MDX-44 (TEPEN et al, 2000), composta de um anticorpo monoclonal humanizado dirigido contra o Fc $\gamma$ RI e conjugado com a toxina ricina A (desenvolvido e patenteada por Medarex Ltd.).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar o papel dos Fc $\gamma$ R na leishmaniose cutânea localizada

### **2.2 Objetivos Específicos**

2.2.1 Avaliar a expressão dos receptores para IgG (CD16, CD32 e CD64) na superfície de células do sangue periférico de pacientes com leishmaniose cutânea localizada, comparando com as de controles sadios.

2.2.2 Correlacionar a expressão dos receptores para IgG com dados clínicos de pacientes com LCL (tempo de cura, tempo de doença, DTH, tamanho da lesão)

## **3 Justificativa**

A leishmaniose, segundo a Organização Mundial de Saúde, está entre as seis doenças infecto-contagiosas de maior importância no mundo. Apesar das medidas adotadas nos programas de controle, nos últimos 10 anos, a doença vem se tornando endêmica e aumentando sua incidência num maior número de regiões do mundo (WHO, on line, 2000) Para planejar estratégias eficazes para o controle da leishmaniose, é necessário dominar amplamente a cadeia de transmissão e a patogênese da doença. Apesar dos avanços nos conhecimentos nessa área, ainda assim existem lacunas importantes que impossibilitam a

adoção de medidas eficazes para o seu controle. Muito se avançou na compreensão da patogênese da leishmaniose no modelo murino e na doença humana. No entanto entender os primeiros momentos da interação da *Leishmania* com as células do sistema imune do hospedeiro, ainda é uma incognita. Suspeita-se que exista importante(s) fator(es) genético(s) determinando a evolução do paciente para as formas de maior morbidade (LCM e LCD), freqüentemente associadas à falha terapêutica do tratamento clássico com antimoniais. É preciso, então, identificar marcadores biológicos que determinem a evolução clínica do paciente, além de tratamentos alternativos. Os Fc $\gamma$ Rs constituem uma interface entre a resposta imune humoral e celular. A ligação desses receptores a IgG dispara uma diversidade de funções tais como a ativação da fagocitose de patógenos opsonizados, a secreção de radicais livres derivados de oxigênio e citocinas pro-inflamatórias, a citotoxicidade celular dependente de anticorpos e a apresentação de antígenos (RAVETCH & KINET, 1994). O uso dos Fc $\gamma$ Rs como marcadores biológicos, seja de doença ativa, de cura ou de susceptibilidade, já foi estabelecido em várias doenças infecciosas e auto-imunes (revisto em VAN DE WINKEL & HOGARTH, 1998). Recentemente, KIMA et al (2000) demonstraram que o estabelecimento da infecção por membros do complexo de *Leishmania mexicana* é inibido na ausência de anticorpos circulantes e nos camundongos deficientes em receptores Fc. Dados recentes mostram a relevância da vasculite induzida por complexos imunes, que parece ter papel importante na primeira etapa da patogênese da leishmaniose cutânea (BARRAL A & FREITAS dados não publicados). Dentro dos Fc $\gamma$ Rs, o CD64 mostrou-se como uma alternativa terapêutica para resolução da inflamação cutânea em um modelo experimental, após eliminação de macrófagos, de maneira seletiva, usando uma imunotoxina MDX-44 (THEPEN et al., 2000), composta de um anticorpo monoclonal

humanizado dirigido contra o CD64 e conjugado com a toxina ricina A (desenvolvido e patenteado por Medarex Ltd.).

O estudo da expressão dos Fc $\gamma$ Rs nas diferentes formas da leishmaniose cutânea poderá ampliar os conhecimentos sobre estas moléculas, que constituem uma interface entre a resposta imune humoral e celular e possivelmente entre susceptibilidade e resistência.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 População estudada**

Neste estudo foram incluídos 16 indivíduos portadores de leishmaniose cutânea localizada (M/F=12/4, idade=1,5-71) oriundos da área endêmica de Jequié (Bahia, Brasil). Esses indivíduos apresentavam ulcerações cutâneas únicas localizadas geralmente em MMII (membros inferiores), freqüentemente associado com linfadenopatia com presença do parasito. A confirmação diagnóstica foi realizada pela positividade de teste de hipersensibilidade tardia (Reação de Montenegro-DTH), biópsia da lesão e pela imunofluorescência indireta (RIFI), como resumido na Tabela I. Todos os indivíduos foram submetidos a uma avaliação clínica e encaminhado para tratamento, orientação e retorno ao ambulatório.

### **4.2 Controles**

Voluntários aparentemente sadios (n= 15, M/F=5/10, idade=21-45) da área urbana de Salvador-BA que não tivessem história de contato com área endêmica para leishmaniose serviram como grupo controle.

### **4.3 Obtenção das células**

O sangue periférico da população estudada e dos controles foi coletado por punção venosa de vaso basilíco do antebraço, utilizando sistema de coleta (Vacutainer Franklin Lakes-NJ-EUA).

### **4.4 Protocolo de Marcação**

Amostras de 50  $\mu$ l de sangue total diluídas com 50  $\mu$ l de tampão (PBS+1%BSA+0.1%AZIDA SÓDICA) foram acrescidas de anticorpos fluorescentes (Tabela II), seguido de homogeneização e incubação por 30 minutos a 4° C na ausência de luz. Após este período, foi realizada a lise das hemácias utilizando 1 ml de solução comercial de lise (Lysing solution, BDIS-San Jose-CA-EUA) por tubo de amostra, homogeneizando com vórtex e deixado a temperatura ambiente por 10 minutos, protegido da luz. Após este período, foram realizados duas lavagens com 1 ml de tampão, utilizando 1000 rpm por 5 minutos à 4° C. Ao final deste procedimento, as células foram ressuspensas em 200  $\mu$ l de solução de formalina à 1% e mantidas à 4 ° C , protegidas da luz, para posterior aquisição e análise no citômetro de fluxo.

#### 4.5 Citometria de fluxo

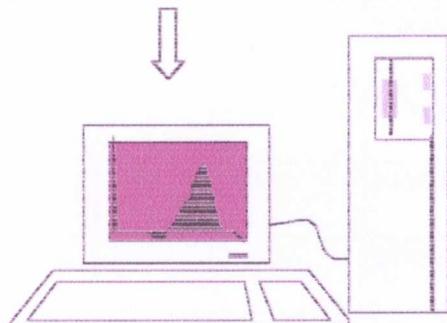
A aquisição e análise das amostras foram realizadas em citômetro de fluxo FACSort (Becton-Dickinson), usando o programa CellQuest. A fluorescência específica de cada amostra foi corrigida pela interferência dos dois fluorocromos (compensação), pela autofluorescência e pela ligação inespecífica de anticorpos, usando isotipos controles. Dez mil eventos celulares foram adquiridos por amostra.

#### 4.7 Considerações Éticas

Sangue

Ex vivo

- 1-Dupla marcação com anticorpos fluorescentes, CD16-CD32-CD64 , CD3-CD19-CD49d-CD56 e isotipos.
- 2- Fixação e lise das hemáceas



CITOMETRIA DE FLUXO

#### **4.6 Análise estatística**

A análise dos dados foi realizado utilizando-se o programa GraphPad=Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA–USA).

Nas comparações das populações celulares e da expressão dos receptores Fc $\gamma$ , de controles sadios com pacientes com leishmaniose cutânea localizada, foi utilizado teste não pareado, t de Student. As correlações realizadas foram obtidas a partir da análise de Pearson.

#### **4.7 Considerações Éticas**

Este projeto foi desenvolvido com aprovação previa do comitê de ética do Hospital Professor Edgar Santos da Universidade Federal da Bahia.

**Tabela I:** População estudada de pacientes com LCL (Jequié-BA)

Paciente	Idade	♂ ♀	Linfade nopia	Tempo doença	Tamanho lesão	Local lesão	DTH	RIFI	Tempo Cura	Diagnóstico Histológico
1	8	M	Sim	45d	4cm	MMII	+	-	60 d	ND
2	19	F	Não	30d	ND	MMII	-	-	60 d	ND
3	71	M	Sim	20d	ND	MMII	+	+	ND	ND
4	62	M	Sim	40d	ND	MMSS	-	-	45 d	ND
5	58	F	Sim	60d	2,0cm	MMSS	+	+	ND	+
6	66	M	Não	90d	6,0cm	MMSS	+	-	60 d	ND
7	5	M	Não	150d	1,5cm	FACE	+	-	150 d	ND
8	9	F	Sim	30d	1,0cm	MMII	+	+	60 d	-
9	31	M	Sim	60d	1,0cm	MMII	+	+	Ativo	-
10	1,5	F	Não	60d	1,5cm	MMSS	+	+	120 d	ND
11	48	M	Não	45d	5,0cm	MMII	+	-	Ativo	-
12	15	M	Sim	21d	2,5cm	MMII	+	+	180 d	+
13	21	M	Não	90d	2,0cm	MMII	+	-	150 d	+
14	38	M	Sim	90d	1,0cm	MMII	+	+	30 d	ND
15	5	M	Não	30d	3,0cm	MMII	+	+	75 d	-
16	ND	M	ND	ND	ND	ND	ND	ND	120 d	+

MMII= Membros inferiores; MMSS= Membros superiores; ND= Não disponível; DTH= Intradermoreação de Montenegro; RIFI= Reação de imunofluorescência indireta.

**Tabela II:** Anticorpos utilizados

Anticorpo	Conjugado	Clone	Isótipo	Companhia
IgG1	FITC	679.1Mc7		Immunotech, Marseille, França
IgG2a	PE	679.1Mc7		Immunotech, Marseille, França
$\alpha$ -CD3/ molécula associada ao TCR	FITC	HIT3a	IgG2a	BDIS-PH-San Jose, CA, EUA
$\alpha$ -CD56/ N-CAM	PE	N901	IgG1	Immunotech, Marseille, França
$\alpha$ -CD19/ molécula associada ao BCR	FITC	467	IgG1	BDIS-San Jose, CA, EUA
$\alpha$ -CD80/ B7.1	PE	104	IgG1	Immunotech, Marseille, França
$\alpha$ -CD64/ Fc $\gamma$ RI	FITC	22	IgG1	Immunotech, Marseille, França
$\alpha$ -CD14/ receptor LPS	PE			BDIS-San Jose, CA, EUA
$\alpha$ -CD16/ Fc $\gamma$ RIIIA	FITC	3G8	IgG1	Immunotech, Marseille, França
$\alpha$ -CD32/ Fc $\gamma$ RII	PE	2E1	IgG2a	Immunotech, Marseille, França
$\alpha$ -CD49d/ VLA4	PE	L25/Sp2	IgG2b	BDIS-San Jose, CA, EUA
$\alpha$ -CD64 / Fc $\gamma$ RI	FITC	10.1	IgG1	BDIS-PH-San Jose, CA, EUA

FITC=Isothiocianato de fluoresceína PE= Ficoeritrina IgG= Imunoglobulina G

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 DEFINIÇÃO DE POPULAÇÕES CELULARES**

#### **5.1.1 Morfologia**

As populações celulares foram definidas por fluorescência inespecífica, com o “forward scatter” (FSC) e o “side scatter” (SSC) como parâmetros de tamanho e granulosidade celular, respectivamente. Então procedeu-se à seleção das populações de linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos por “gates” ou janelas nestas respectivas populações, como demonstra a figura 3. Essas janelas foram confirmados com as marcações específicas para cada população.

#### **5.1.2 Marcação específica**

A população linfocitária foi definida por marcação negativa para CD64 e CD14 e marcação positiva para as diversas subpopulações. As subpopulações linfocitárias foram definidas por marcações específicas que distinguiram linfócitos T, marcados com CD3, células NK, marcadas com CD56, células NKT, marcadas duplamente com CD3 e CD56 e linfócitos B marcados com CD19, como demonstrado nas figuras 3.2 e 3.4. A população monocitária foi definida com marcação positiva para CD64 (Fig. 3.7) e CD14 (dados não mostrados) e marcação negativa com CD3 e C56. A população de neutrófilos foi distinguida dos demais granulócitos por marcação positiva para CD16 e negativa para CD49d (Fig. 3.11). A população de eosinófilos foi determinada por marcação positiva com CD49d e negativa para CD16 e CD49d (Fig. 3.11). O CD32, por estar presente em todas as

populações celulares (Fig. 3.3, 3.7, 3.10), não é um marcador específico de linhagem celular

## 5.2 QUANTIFICAÇÃO DE POPULAÇÕES CELULARES

Inicialmente, foram quantificadas as diversas populações leucocitárias de pacientes e controles em sangue total, para comparar a distribuição destas populações nos dois grupos. A figura 4 mostra a distribuição das populações celulares em linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos, como determinado acima. Foi observado uma redução significativa da % população de neutrófilos no grupo de pacientes (35,7 % SE $\pm$ 3,1) quando comparado com o grupo de controles (47,5 % SE $\pm$ 3,05) ( $p=0,012$ )

Na população de eosinófilos, observou-se aumento significativo nos pacientes (6,66 SE  $\pm$  1,7) em relação a controles (0,67% SE $\pm$ 0,67) ( $p=0,0063$ ). Não houve diferença significativa entre o número de linfócitos totais em pacientes (49,8 % SE  $\pm$ 3,5) quando comparando com controles (42,7% SE $\pm$ 3,0 %). Posteriormente, foram realizadas análises das sub populações de linfócitos (T, B, NK, NKT), como descrito acima. A figura 5, mostra que houve uma diminuição de linfócitos T, de 62,8.  $\pm$  2,8 % em doadores, para 44,7  $\pm$  3,2 % em pacientes ( $p=0,0002$ ). As populações de células B, NK e NKT não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos. Para investigar se estas flutuações nas populações celulares representam eventos independentes ou interligados, passamos a calcular a correlação estatística entre elas. Como demonstrado na figura 6A e B, encontramos correlação negativa entre neutrófilos e linfócitos, tanto em pacientes ( $r= -0,73$  e  $p= 0,0005$ ) como em controles ( $r= -0,96$   $p<0,0001$ ). Porém em 6A

visualizamos também uma correlação negativa entre neutrófilos e monócitos ( $r = -0,58$  e  $p = 0,023$ ), apenas em doadores. Finalmente, na figura 6C observa-se correlação positiva entre eosinófilos e monócitos ( $p = 0,0060$   $r = 0,62$ ), apenas em pacientes.

### **5.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS Fc $\gamma$ R**

#### **5.3.1 Avaliação da Expressão % Fc $\gamma$ R**

Posteriormente, foi realizada avaliação de receptores Fc $\gamma$ RI, RII, RIII (CD64, CD32 e CD16, respectivamente) em linfócitos, monócitos e neutrófilos do sangue periférico de controles e pacientes. Os resultados referentes a porcentagem de expressão estão resumidos na Tabela III. Observa-se nos controles quantificação de receptores Fcs de acordo com a literatura, em que o CD 16 está baixo ou ausente em monócitos, e com alta expressão em neutrófilos (VAN DEN HERIK-OUDIJK et al., 1996). Não foi possível detectar CD16 na população linfocitária, porém, quando essa marcação era realizada utilizando a técnica de obtenção das células por gradiente de ficol hypaque essa marcação era definida nas células NK, como esperado (dados não mostrados). O CD32 nos controles estava expresso constitutivamente em linfócitos, monócitos e neutrófilos como esperado, enquanto que CD64 era ausente em linfócitos, baixo ou ausente em neutrófilos, e contitutivo em monócitos (VAN DEN HERIK-OUDIJK et al., 1996).

Dentre os receptores Fc abordados em todas as populações celulares citadas, observa-se expressão aumentada de CD16 em MC de pacientes com média de 9,5%, comparada com 3,6% para controles ( $p = 0,025$ ). Em linfócitos, detectamos aumento de expressão de CD32

em pacientes com média de 7,1% para 16% ( $p= 0.0021$ ). Finalmente, observamos um aumento de CD64 em neutrófilos de 1,5% para 25,7% ( $p= 0.0074$ ).

### **5.3.2 Avaliação da Expressão FcγR em MFI**

Prosseguindo, foi realizada avaliação da intensidade média de fluorescência (MFI), que é uma medida do número de receptores por célula (CD16, CD32 e CD64) em linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos do sangue periférico de controles e pacientes, o que está resumido na tabela IV. Dentre todos os achados estatisticamente significativos, houve permanência dos resultados obtidos na porcentagem de CD16 em monócitos com média de 13.5 para 28.8, como esperado. Com relação ao CD32 em linfócitos, houve aumento de 14.9 para 61.8, comparado controles com pacientes. A MFI de CD64 em neutrófilos estava aumentado de 4.9 para 26.5, como também em monócitos de 20.7 para 48.9, quando comparado controles com pacientes.

Para investigar se o aumento em três receptores diferentes em células distintas são eventos independentes ou interligados, passamos a determinar correlação estatística entre esses três achados.

### **5.4. CORRELAÇÃO DE PORCENTAGEM DE FcγR**

A Figura 7A e B mostra correlação positiva entre CD16 e CD32 em neutrófilos, tanto em controles como em pacientes, sugerindo regulação metabólica previsível. De maneira surpreendente, a porcentagem de CD16 em neutrófilos também correlacionou-se com a porcentagem de CD64 em monócitos de controles, mas não em pacientes, sugerindo

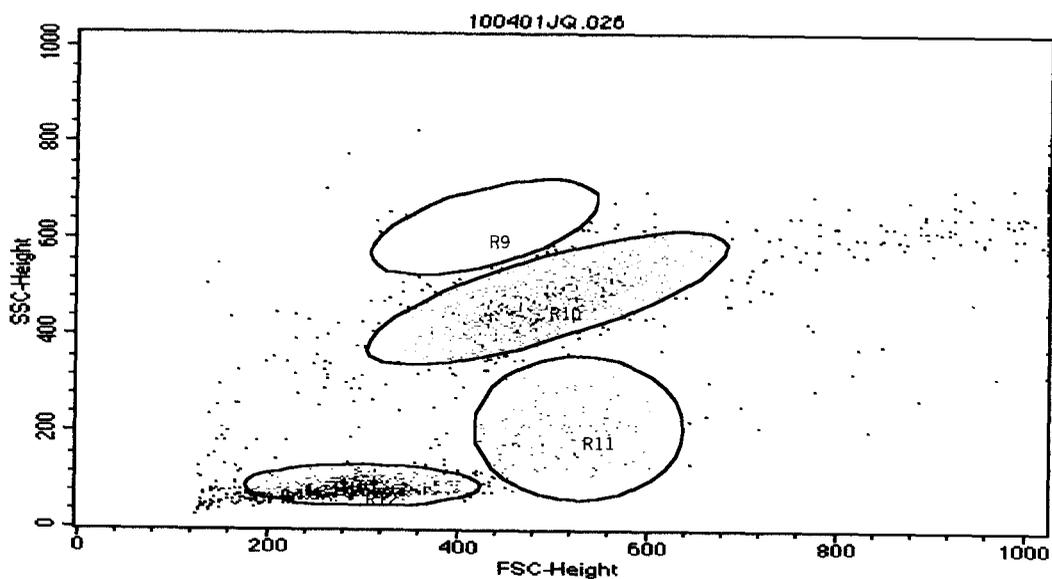
mecanismos celulares ou moleculares distintos (Figura 7C). A figura 7D mostra correlação positiva entre célula B e CD32 em linfócitos o que sugere uma interação da resposta imune humoral e celular ( $p=0,0002$ ,  $r = 0,76$ ).

## 5.5 CORRELAÇÃO DE MFI DE $Fc\gamma R$

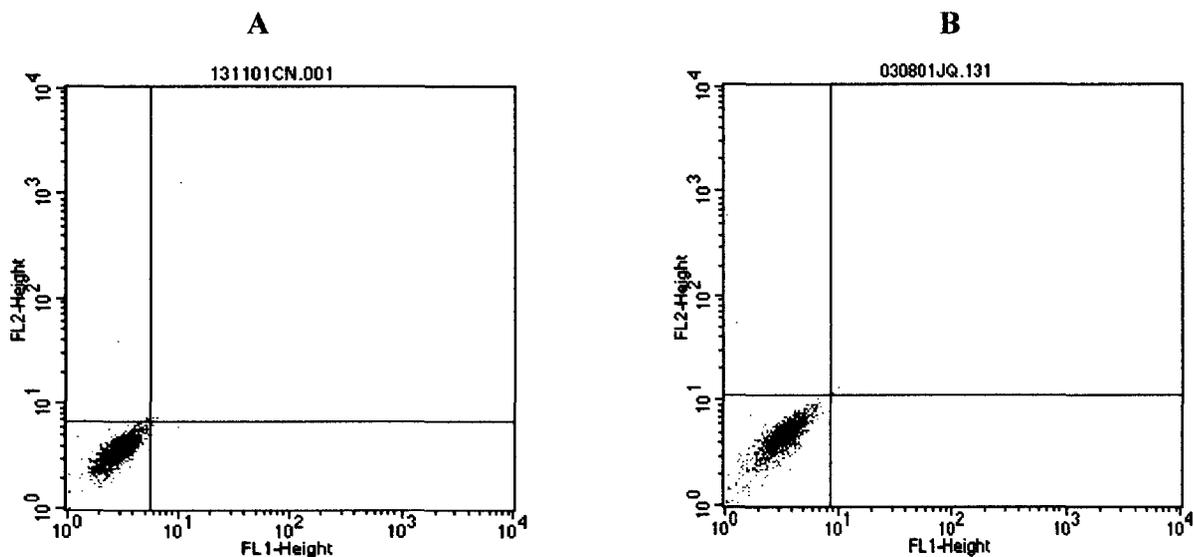
A figura 8A e B mostra correlação extremamente significativa ( $p < 0,0001$  e  $r = 0,85$  a  $0,98$ ) entre a MFI de CD32 em neutrófilos, linfócitos e monócitos nos dois grupos, sugerindo uma regulação estreita supracelular do número de receptores por célula. Por outro lado, a Figura 8D mostra correlação entre MFI de CD64 em neutrófilos e monócitos em pacientes ( $p = 0,0002$   $r = 0,80$ ) e não em controles (8C  $p= 0,90$ ), sugerindo evento relacionado ao processo patológico. A figura 9A mostra correlação positiva de MFI entre CD64 e CD32 em monócitos tanto em controles como em pacientes, sugerindo regulação intracelular. A figura 9A mostra correlação positiva entre MFI de CD64 em monócitos e CD16 em neutrófilos, em controles; e CD16 em monócitos de pacientes Fig. 9B. A figura 9C mostra correlação positiva, entre dois receptores significativamente aumentados ( $p=0,0019$   $r=0,55$ ) em pacientes, MFI CD32 em linfócito com CD64 em neutrófilo, evento interligado e sugestivo por está relacionado com o processo patológico, o que parece ser refletido também em monócitos de pacientes. Além nos linfócitos, o CD32 em monócitos e neutrófilos também se correlaciona com o CD64 em neutrófilos, como mostrado na figura 9D. Desta mesma forma, detectamos correlação positiva de MFI entre CD64 e CD32 em neutrófilos ( $p=0,0026$ ,  $r =0,70$ ).

## 5.6. CORRELAÇÃO ENTRE DADOS CLÍNICOS E EXPRESSÃO DE FcγR

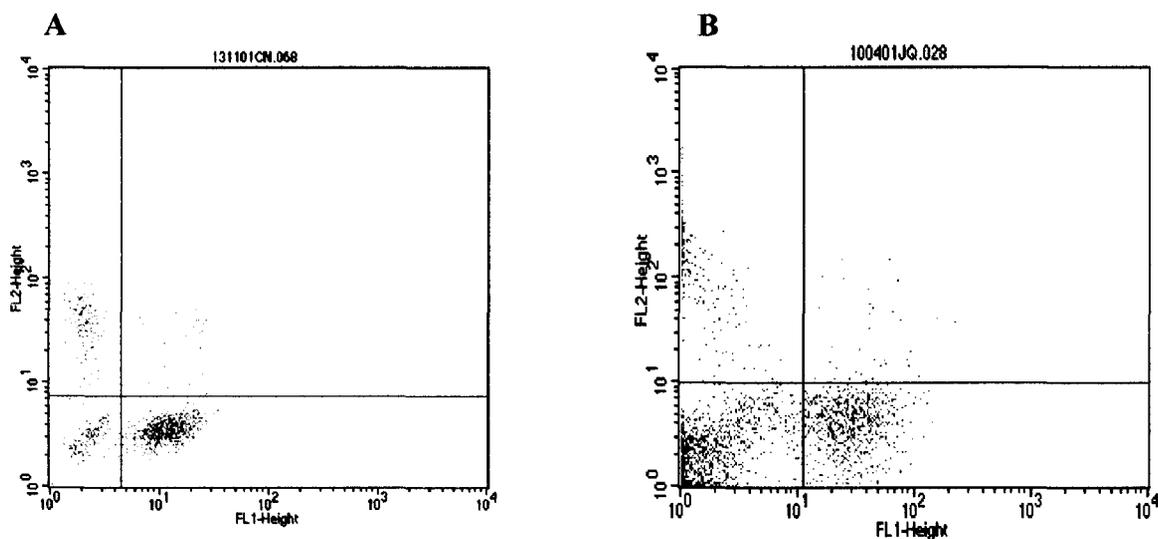
A Figura 10 mostra correlação estatisticamente significativa entre a porcentagem de CD16 em monócitos e os tamanhos das lesões em pacientes com LCL ( $p=0,0031$ ,  $r=0,80$ ), sugerindo um fator deletério para a evolução clínica dos pacientes. Não foi detectado correlação significativa entre os demais receptores Fc e os outros parâmetros clínicos (tempo de doença, tempo de cura, local da lesão, DTH e RIFI).



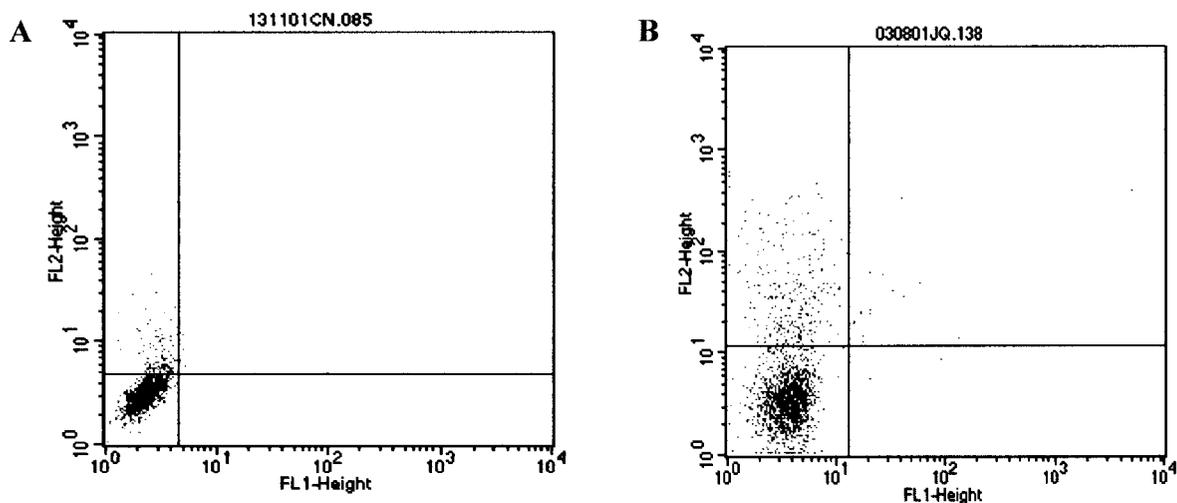
**Figura 3: Imagem densitometrica de fluorescência não específica por tamanho (FSC) e granulidade (SSC) celular, identificando as populações de linfócitos (azul), monócitos (vermelho), neutrófilos (verde) e eosinófilos (laranja)**



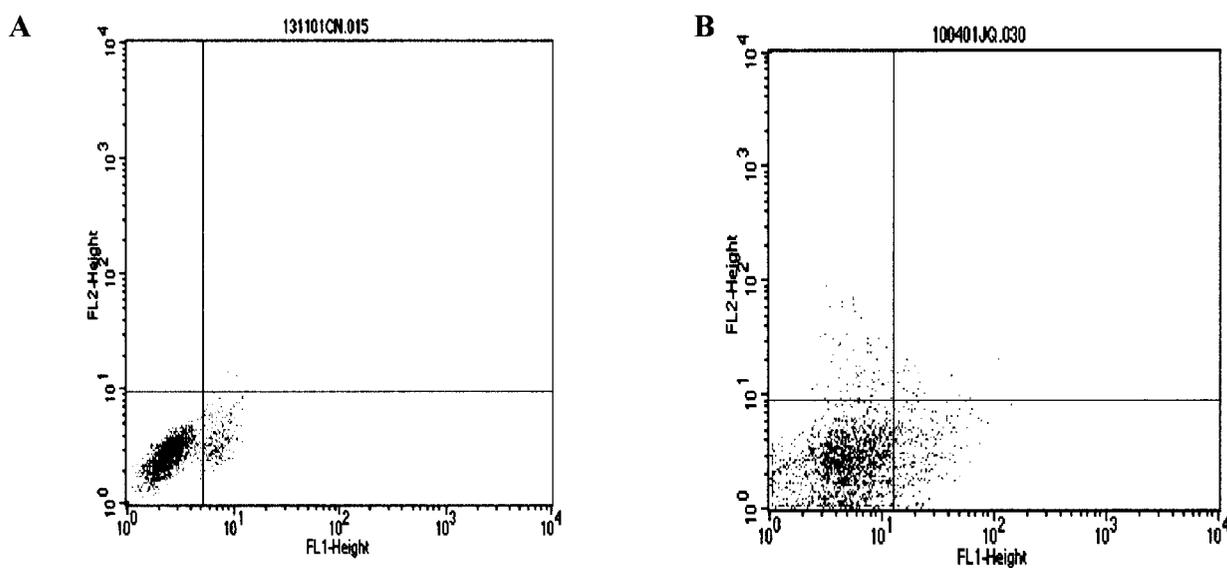
**Fig. 3.1:** Imagem densitométrica de fluorescência específica de células de sangue periférico, selecionadas na janela de linfócitos, após marcação com isótipos IgG1(FL1) e IgG2a (FL2) A =controles B= pacientes



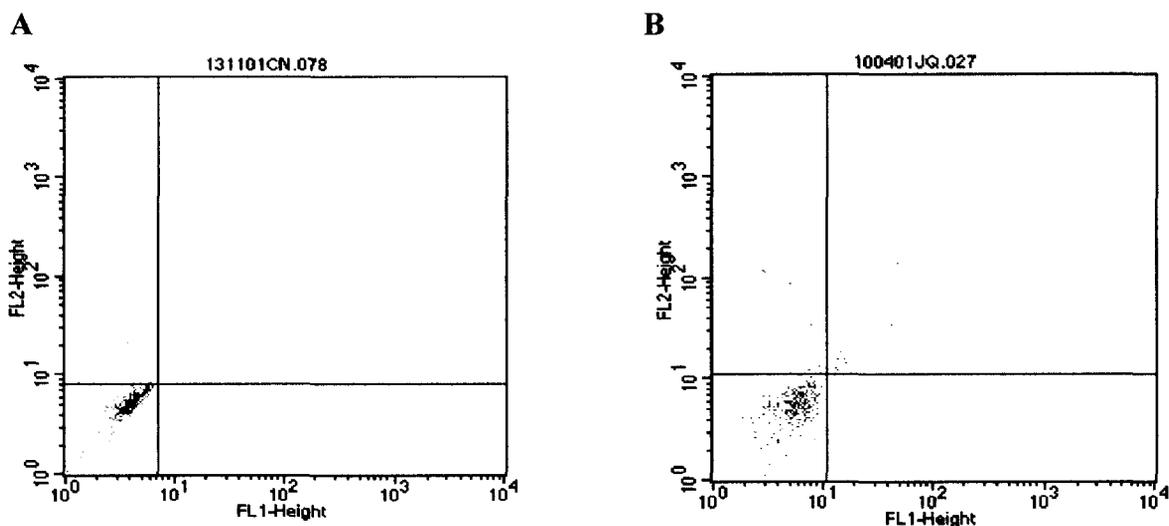
**Fig. 3.2:** Imagem densitométrica de fluorescência específica de células de sangue periférico, selecionadas na janela de linfócitos, após marcação com anti-CD 3 (FL1) e anti-CD 56 (FL2) A =controles B= pacientes



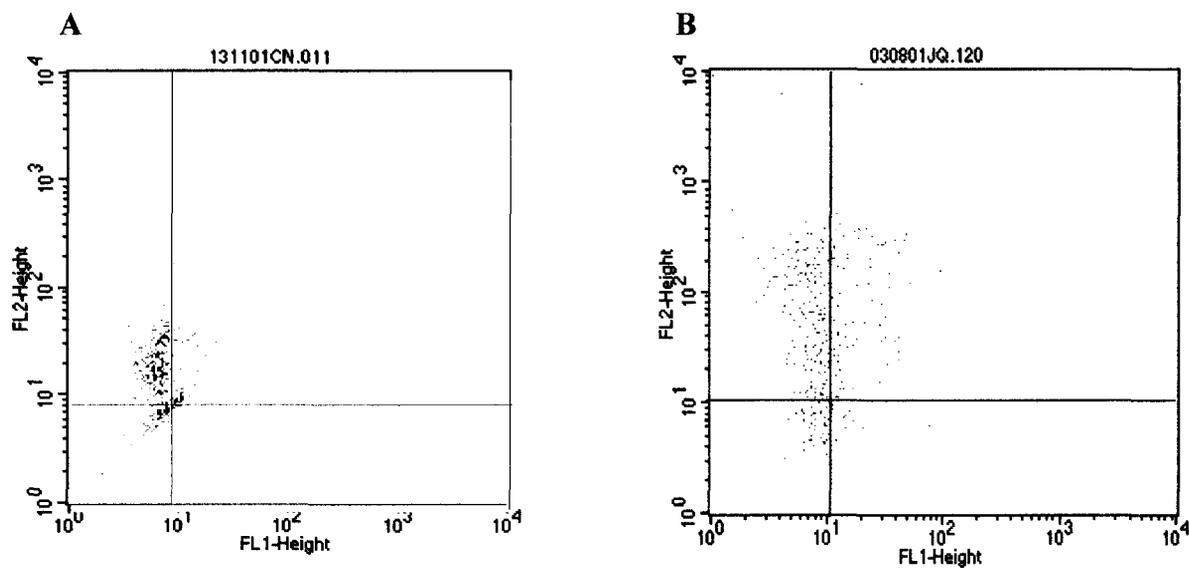
**Fig. 3.3: Imagem densitométrica de fluorescência específica de células de sangue periférico, selecionadas na janela de linfócitos, após marcação com anti-CD64 (FL1) e anti-CD32 (FL2) A =controles B= pacientes**



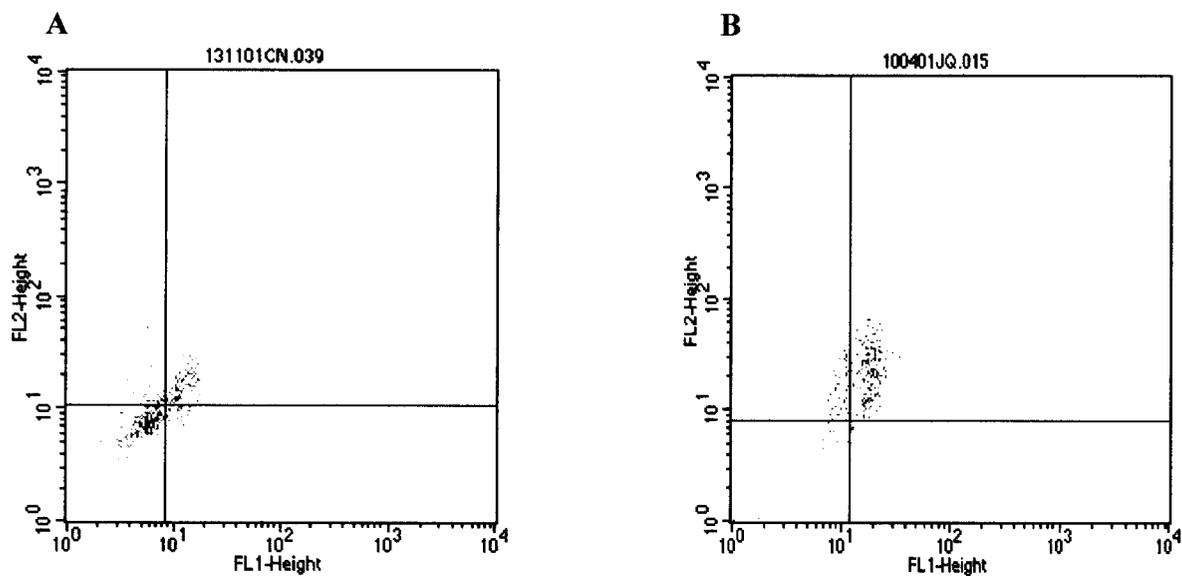
**Fig. 3.4: Imagem densitométrica de fluorescência específica de células de sangue periférico, selecionadas na janela de linfócitos, após marcação com anti-CD19 (FL1) e anti-CD80 (FL2) A =controles B= pacientes**



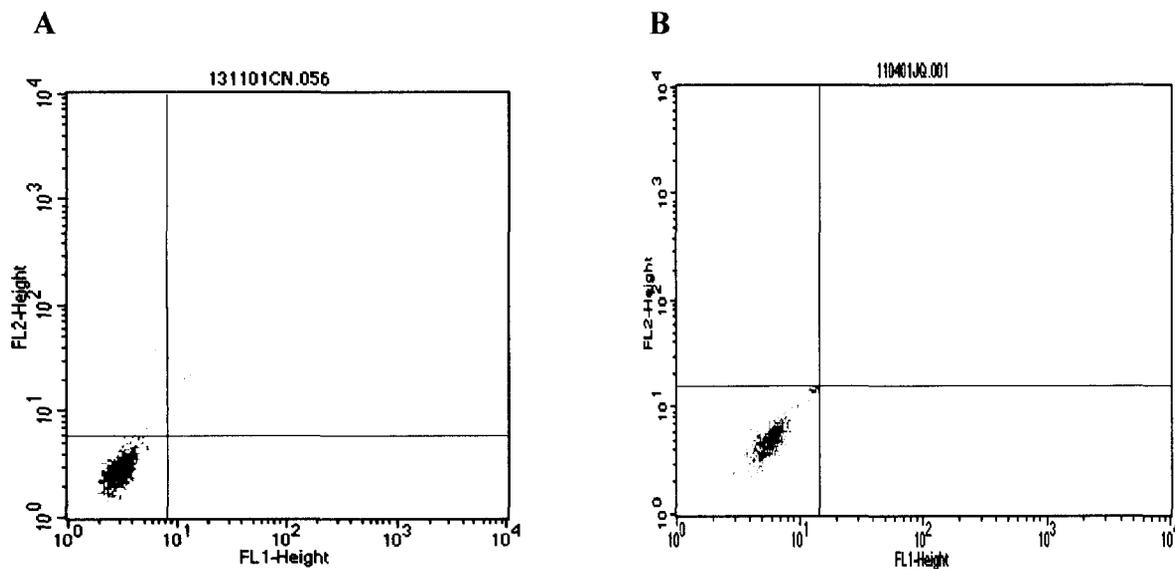
**Fig 3.5: Imagem densitométrica de fluorescência específica de células de sangue periférico, selecionadas na janela de monócitos, após marcação com isotipos IgG1 (FL1) e IgG2a (FL2) A =controles B = pacientes.**



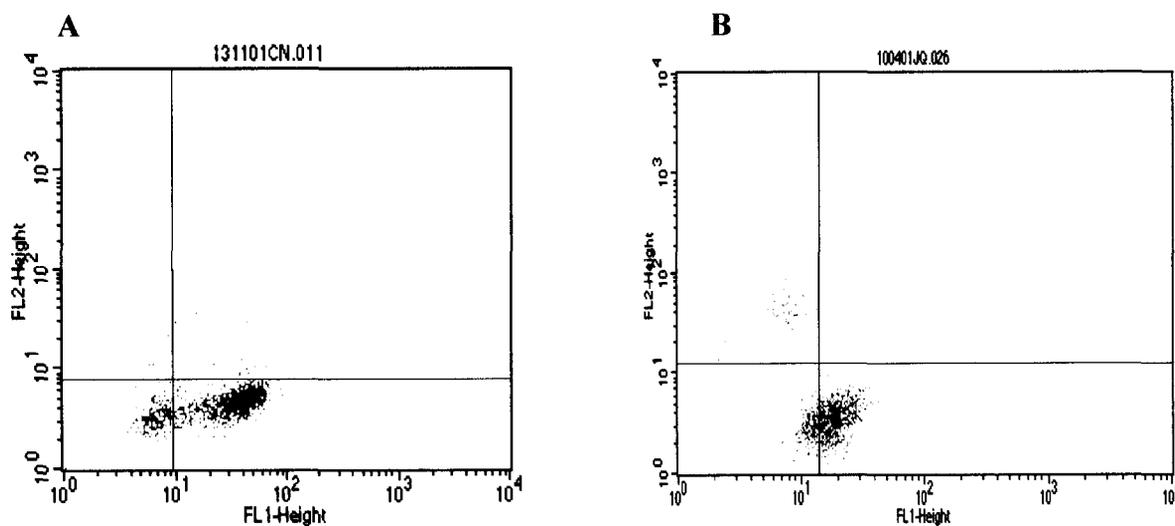
**Fig. 3.6: Imagem densitométrica de fluorescência específica de células de sangue periférico, selecionadas na janela de monócitos, após marcação com anti-CD16 (FL1) e anti-CD49d (FL2) A =controles B = pacientes**



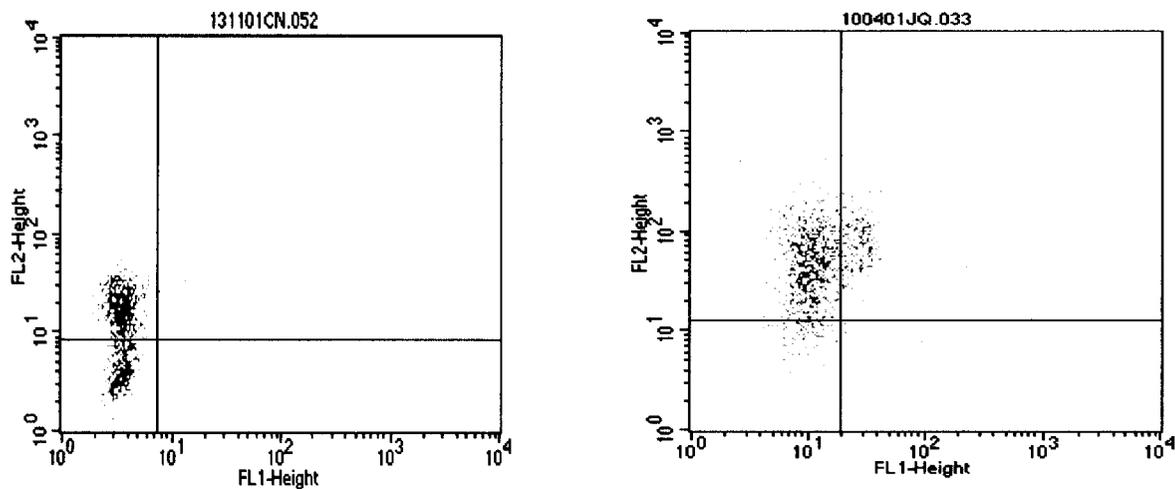
**Fig. 3.7: Imagem densitométrica de fluorescência específica de células de sangue periférico, selecionadas na janela de monócitos, após marcação com anti-CD64 (FL1) e anti-CD32 (FL2) A = controles B = pacientes**



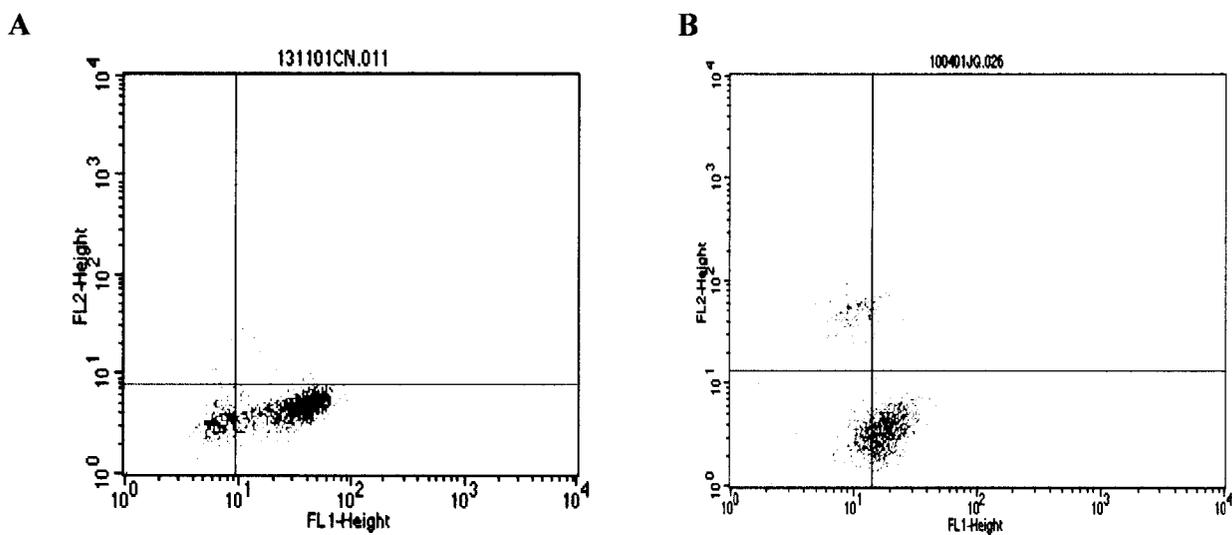
**Fig.3.8: Imagem densitométrica de fluorescência específica de células de sangue periférico, selecionadas na janela de neutrófilos, após marcação com isótipos IgG1(FL1) e IgG2a (FL2) A = controles B = pacientes**



**Fig.3.9: Imagem densitométrica de fluorescência específica de células de sangue periférico, selecionadas na janela de neutrófilos, após marcação com anti-CD16 (FL1) e anti-CD49d (FL2) A = controles B = pacientes**



**Fig.3.10: Imagem densitométrica de fluorescência específica de células de sangue periférico, selecionadas na janela de neutrófilos, após marcação com anti-CD64 (FL1) e anti-CD32 (FL2) A = controles B = pacientes**



**Fig. 3.11: Imagem densitométrica de fluorescência específica de células de sangue periférico, selecionadas na janela de granulócitos, após marcação com anti-CD16 (FL1) e anti-CD49d (FL2) A = controles B = pacientes**

**Tabela III: Expressão de (%) dos receptores FcγR CD16, CD32 e CD64 em linfócitos, neutrófilos e monócitos de controles e pacientes com LCL**

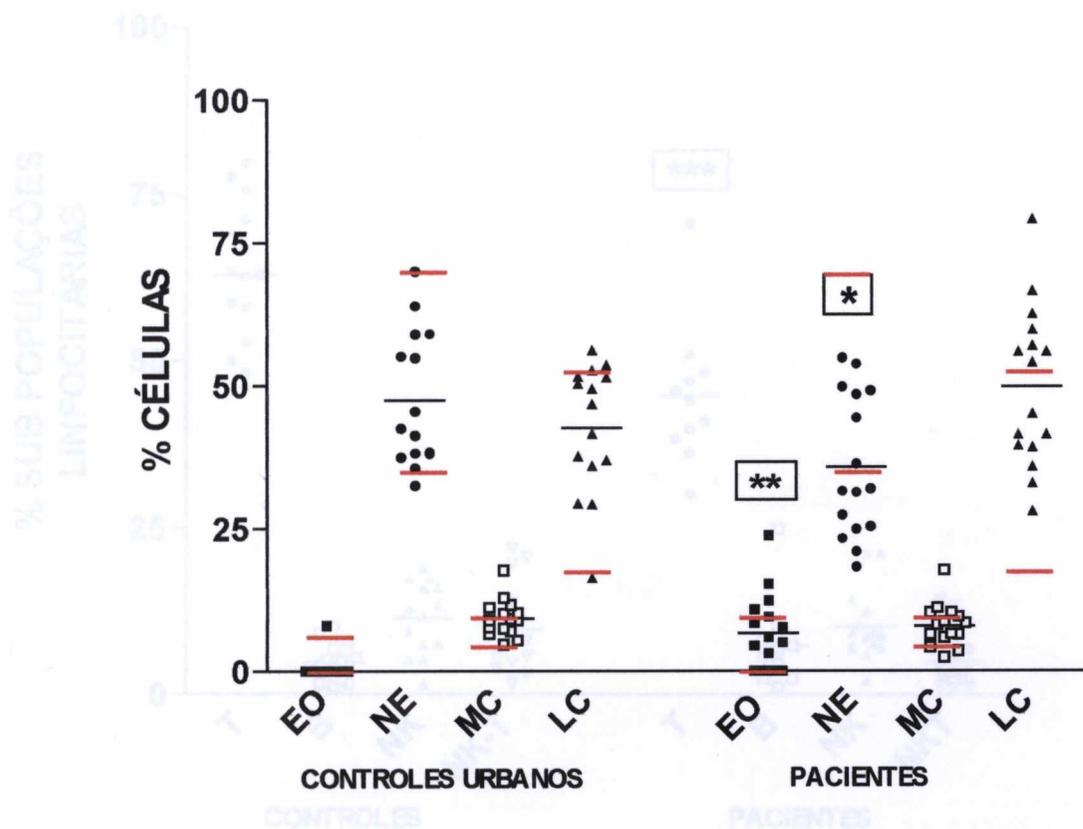
CONTROLES					PACIENTES COM LCL			ANÁLISE ESTATÍSTICA	
	Subpop. de leucócitos	média	SE	n	média	SE	n	p (teste t)	
<b>CD16</b>	LC	1.2	0.7	14	1.7	0.7	14	0.81	
	MC	<b>3.6</b>	<b>1.1</b>	<b>11</b>	<b>9.5</b>	<b>2.0</b>	<b>15</b>	<b>0.0255</b>	*
	NE	83.6	3.9	15	91.1	2.2	16	0.166	
<b>CD32</b>	LC	<b>7.1</b>	<b>0.9</b>	<b>15</b>	<b>16.0</b>	<b>2.1</b>	<b>16</b>	<b>0.0021</b>	**
	MC	70.9	3.5	12	78.1	4.2	16	0.163	
	NE	<b>65.6</b>	<b>5.9</b>	<b>13</b>	<b>77.9</b>	<b>5.6</b>	<b>16</b>	<b>0.0108</b>	*
<b>CD64</b>	LC	-	-	-	-	-	-	-	-
	MC	40.0	6.1	13	53.4	4.3	16	0.297	
	NE	<b>1.5</b>	<b>0.4</b>	<b>10</b>	<b>25.7</b>	<b>6.4</b>	<b>16</b>	<b>0.0074</b>	**

LC= linfócitos, MC= monócitos, NE= neutrófilos, SE= erro padrão

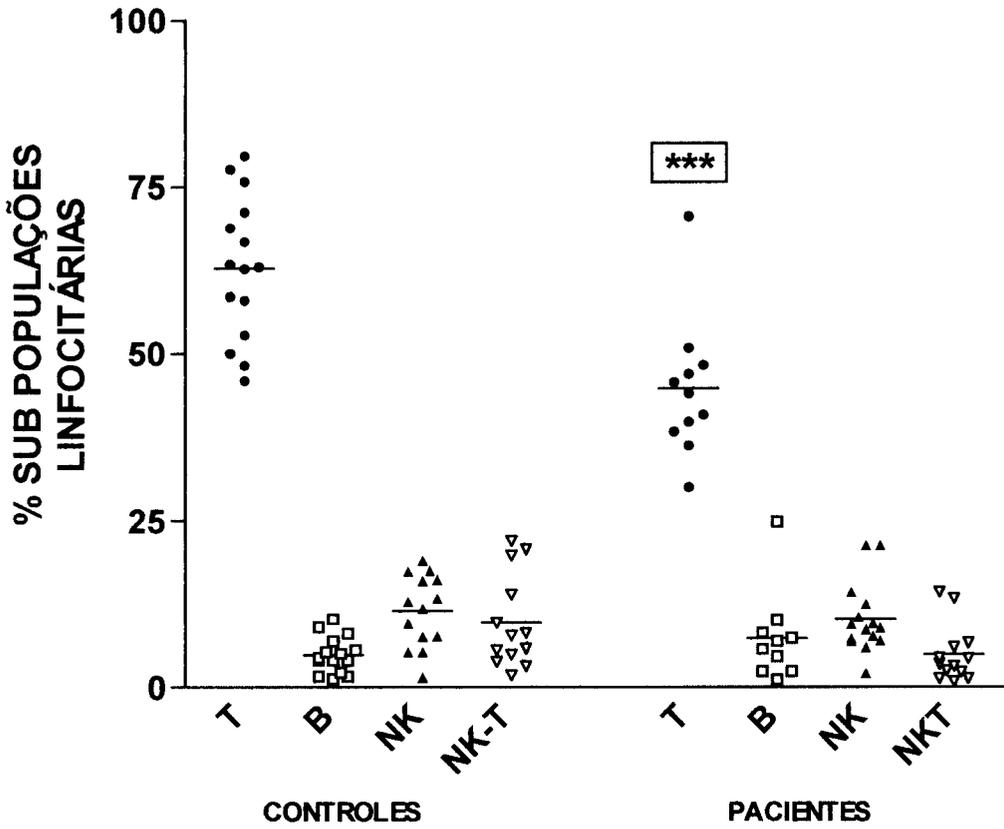
**Tabela IV: MFI dos FcγR CD16, CD32 e CD64 em linfócitos, neutrófilos e monócitos de controles e pacientes com LCL**

		CONTROLES			PACIENTES COM LCL			ANÁLISE ESTATÍSTICA	
	Sub população de linfócitos	média	SE	n	média	SE	n	p (teste t)	
<b>CD16</b>	LC	4.1	2.9	13	4.9	2.6	15	0.498	
	MC	13.5	4.6	13	28.8	3.6	15	0.0168	*
	NE	79.8	26.5	15	327.7	72.0	15	0.0075	**
<b>CD32</b>	LC	14.9	2.0	14	61.8	11.1	16	0.0008	***
	MC	32.5	6.6	14	223.6	48.7	16	0.0014	**
	NE	22.1	2.6	15	162.5	31.7	16	0.0003	***
<b>CD64</b>	LC	-	-	-	-	-	-	-	-
	MC	20.7	5.6	14	48.9	7.7	16	0.0018	**
	NE	4.9	1.9	12	26.5	6.2	16	0.0034	**

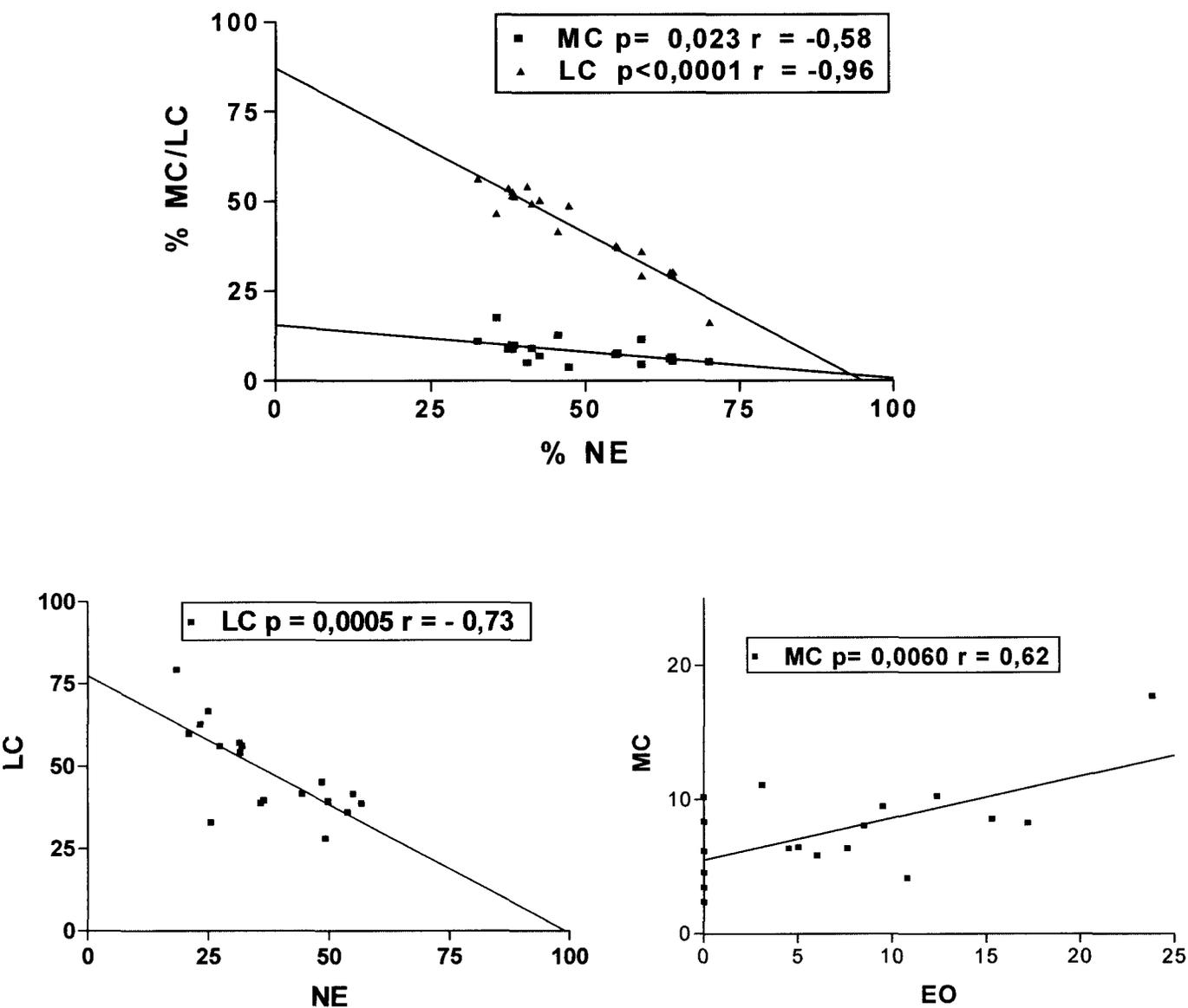
LC= linfócitos, MC= monócitos, NE= neutrófilos, SE= erro padrão



**Fig.4: Distribuição (%) de populações celulares em sangue periférico de controles e pacientes com LCL.** As médias estão representadas por linhas pretas e os limites inferiores e superiores normais estão delimitados por linhas vermelhas (Abbas et al, 1994) EO= eosinófilos, NE= neutrófilos MC= monócitos LC= linfócitos (\*\* $p < 0,001$  \* $p < 0,05$ , teste t não pareado).

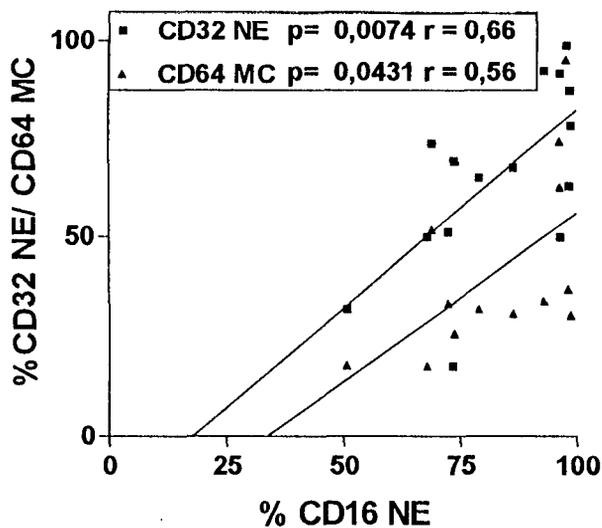


**Fig. 5: Distribuição (%) de sub populações linfocitárias do sangue periférico de controles urbanos e pacientes com LCL. As médias estão representadas por linhas pretas T= linfócito T, B= linfócito B, NK = célula natural killer, NKT (\*\*\*=0,0004, teste t não pareado).**

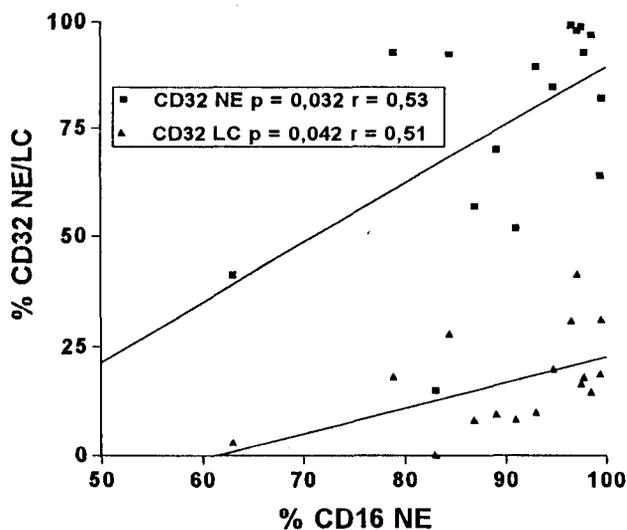


**Fig 6: Correlação negativa entre porcentagem de populações celulares em sangue periférico de controles A) entre NE= neutrófilos e MC = monócitos ( $p = 0,023$   $r = -0,58$ ) e LC= linfócitos ( $p < 0,0001$   $r = -0,96$ ) B) Correlação negativa em porcentagem de populações celulares em sangue periférico de pacientes com LCL entre NE= neutrófilos e LC= linfócitos ( $p = 0,0005$   $r = -0,73$ ) C) Correlação positiva em porcentagem de populações celulares em sangue periférico em pacientes com LCL entre EO= eosinófilos e MC=monócitos ( $p = 0,0060$   $r = 0,62$ ).**

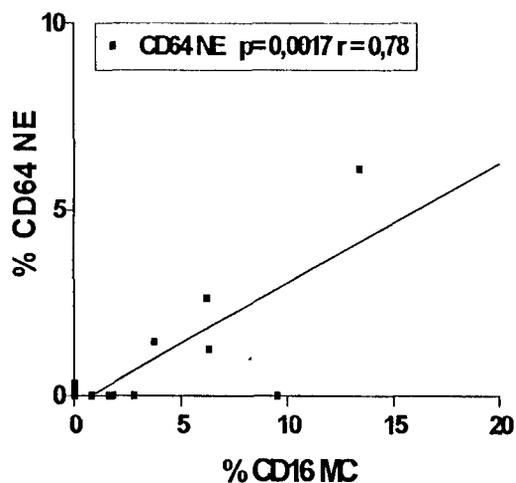
A



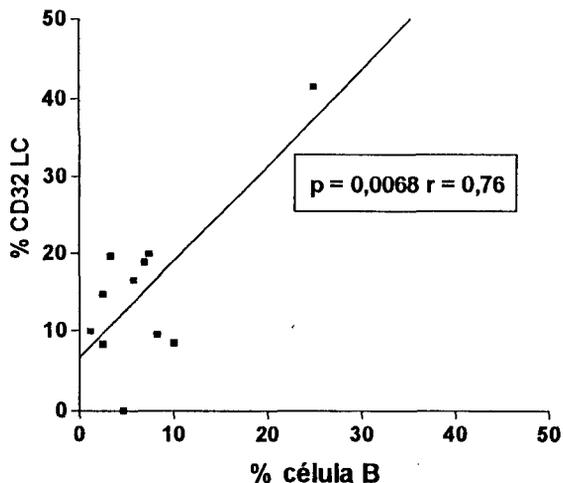
B



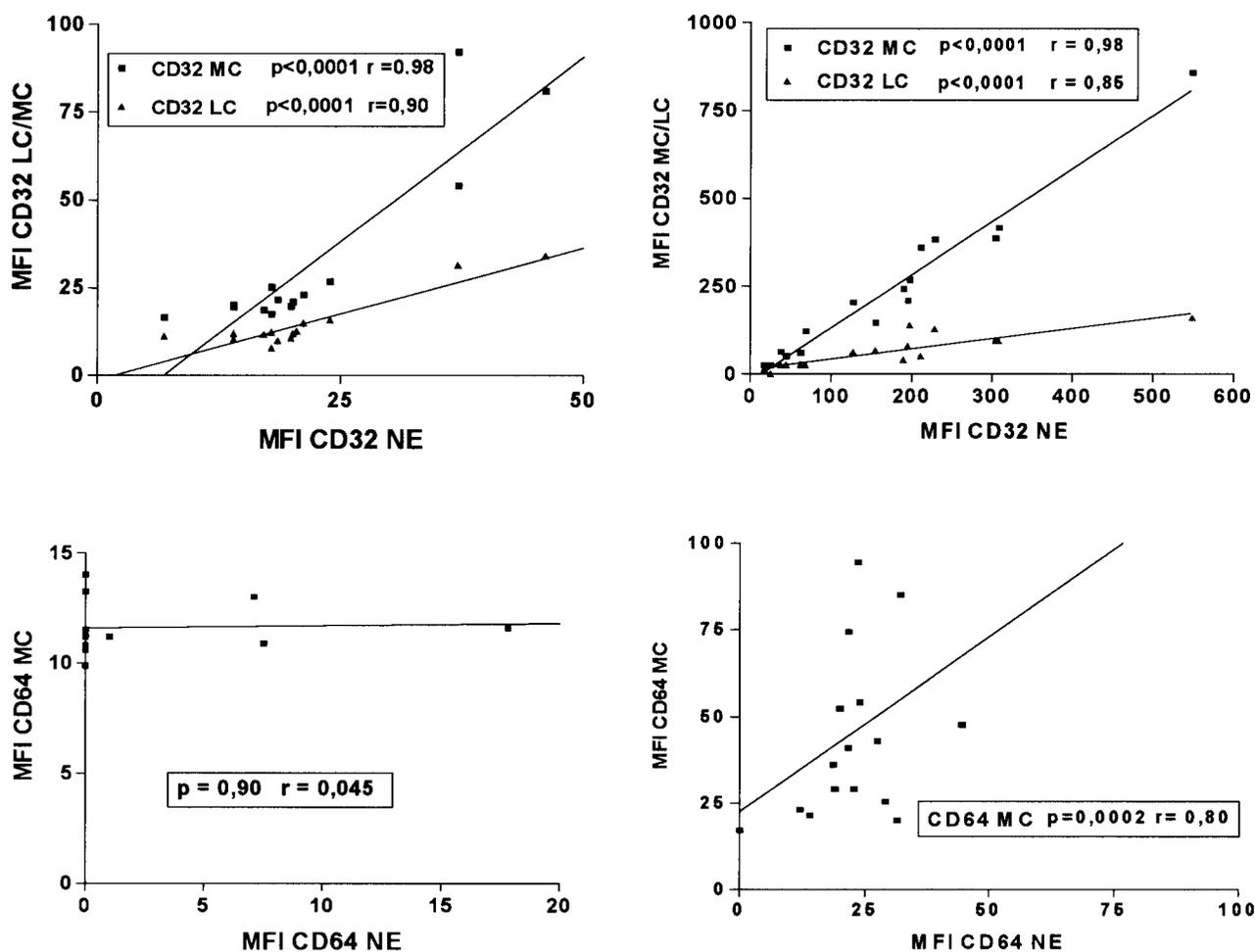
C



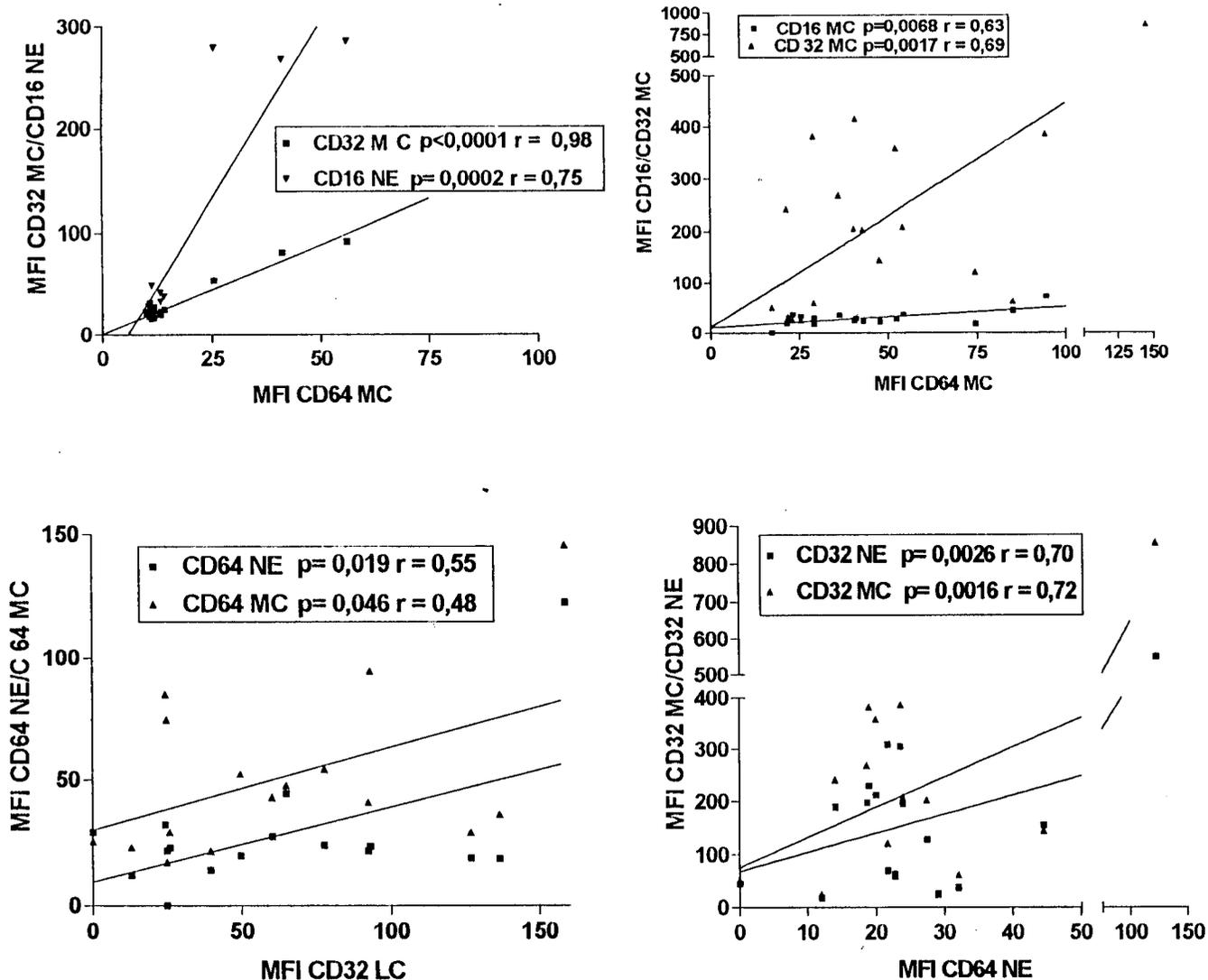
D



**Fig. 7:** Correlação positiva da porcentagem de receptores Fc **A)** entre CD16 e CD32 em neutrófilos ( $p = 0,0074$   $r = 0,66$ ) e CD64 em monócitos ( $p = 0,0431$   $r = 0,56$ ) em controles **B)** entre CD16 em neutrófilos e CD 32 em neutrófilos ( $p = 0,032$   $r = 0,53$ ) e em linfócitos ( $p = 0,042$   $r = 0,51$ ) em pacientes com LCL **C)** entre CD16 em monócitos e CD64 em neutrófilos ( $p = 0,0017$   $r = 0,78$ ) em controles urbanos **D)** entre célula B e CD32 em linfócitos ( $p = 0,0068$   $r = 0,76$ ) em pacientes com LCL.



**Fig. 8:** Correlação positiva entre MFI de **A)** CD32 em neutrófilos e monócitos ( $p < 0,0001$   $r = 0,98$ ) e linfócitos ( $p < 0,0001$   $r = 0,90$ ) em controles **B)** CD32 em neutrófilos e monócitos ( $p < 0,0001$   $r = 0,98$ ) e linfócitos ( $p < 0,0001$   $r = 0,85$ ) em pacientes com LCL **C)** CD64 em neutrófilos e monócitos ( $p = 0,90$   $r = 0,045$ ) em controles urbanos **D)** CD64 em neutrófilos e monócitos ( $p = 0,0002$   $r = 0,88$ ) em pacientes com LCL



**Fig. 9.** Correlação positiva entre MFI de receptores Fc **A)** CD64 monócitos e CD32 monócitos ( $p < 0,0001$   $r = 0,98$ ) e CD16 em neutrófilos ( $p = 0,0002$   $r = 0,75$ ) em controles **B)** entre CD64 monócitos e CD16 ( $p = 0,0068$   $r = 0,63$ ) e CD32 ( $p = 0,0017$   $r = 0,69$ ) monócitos em pacientes com LCL. **C)** entre CD32 linfócitos e CD64 neutrófilos ( $p = 0,019$   $r = 0,55$ ) e monócitos ( $p = 0,046$   $r = 0,48$ ) em pacientes com LCL. **D)** entre CD64 em neutrófilos e CD32 em neutrófilos ( $p = 0,0026$   $r = 0,70$ ) e monócitos ( $p = 0,0016$   $r = 0,72$ ) de pacientes com LCL

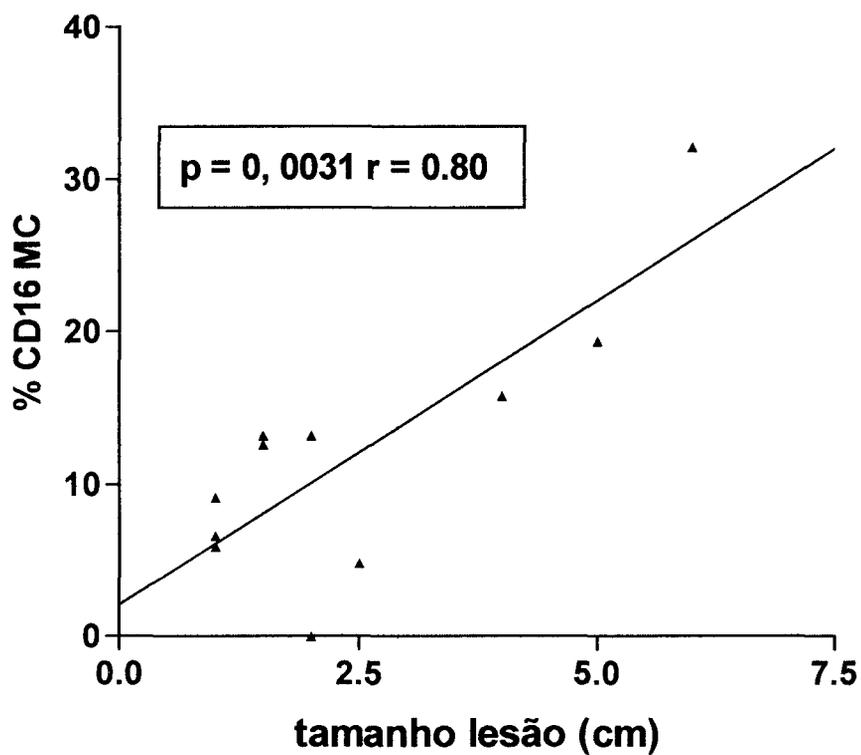


Fig. 10: Correlação positiva entre tamanho da lesão e porcentagem de CD 16 em monócitos ( $p = 0,0031$   $r = 0,80$ ) em pacientes com LCL

## 6 DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliada a expressão *ex vivo* dos receptores Fc para IgG (CD16, CD32 e CD64) em leucócitos do sangue periférico de pacientes com leishmaniose cutânea localizada (LCL), comparado com a de controles. Para iniciar este estudo, avaliamos as populações leucocitárias e nos certificamos que existia uma distribuição normal destas (ABBAS et al., 1994). Porém, encontramos uma diminuição significativa do número de neutrófilos em pacientes, comparados aos controles e um aumento significativo na população de eosinófilos (Figura 4). Esta eosinofilia pode está relacionada com a positividade do exame parasitológico para helmintos em alguns pacientes (5 de 16) (dados não mostrados). Por outro lado, sabendo da presença de eosinófilos tanto em lesões cutâneas de pacientes como em modelos experimentais, avaliamos a expressão de marcadores de superfície desta população. Nossos dados preliminares (anexo I) mostram um estado de ativação celular nos eosinófilos de pacientes, aparentemente IL-5-independente, o que sugere uma possível participação deste tipo celular na resposta imune contra *Leishmania*, fora da via clássica das citocinas tipo 2. Além disso, detectamos uma correlação positiva ( $p=0,0060$ ) entre a porcentagem de eosinófilos e monócitos, o que poderia sugerir uma regulação paralela dessas duas populações na mielopoiese, provavelmente induzida pelo parasito.

O CD16 é marcador de neutrófilo e célula NK. Ao analisar este receptor nas células morfológicamente definidas como neutrófilos, eosinófilos e monócitos, observamos uma forte expressão, ausência e baixa expressão, respectivamente, conforme a literatura. Porém,

nas células morfológicamente definidas como linfócitos, observamos uma discrepância entre a ligação do anti-CD16 (1.7 %) e do anti-CD56 (10.2 %), o mais fiel marcador de célula NK. Entretanto, ao realizarmos análise de fluorescência nas células morfológicamente definidas como linfócitos e obtidas a partir do gradiente de Ficoll, conseguimos detectar um percentual maior de células marcadas com anti-CD16 e anti-CD56, confirmando a qualidade do anticorpo. Sugerimos, então, que ao utilizarmos sangue total que contém uma população de neutrófilos muito superior e repletos de CD16 em comparação às células NK, existiria uma competição pela ligação do anticorpo, ligando-se preferencialmente a neutrófilos em detrimento da célula NK.

Observamos que a expressão de CD16 em monócitos, normalmente presente em percentuais baixos, mostrou-se aumentado de 3,6% para 9,5% em pacientes (Tabela III). Sabe-se que a expressão de CD16 é regulado positivamente pelo mediador solúvel TGF- $\beta$  (WELCH et al., 1990). Em algumas outras patologias, como ocorre nos pacientes com AIDS, a expressão de CD16 está aumentado em monócitos, o que se associa com uma maior produção de TGF- $\beta$  (LOCHER et al., 1994).

O TGF- $\beta$  é um mediador envolvido na diminuição da produção de IFN- $\gamma$  e inibição do receptor de IL-2, levando a mecanismos de desativação macrófágica. BARRAL NETTO et al. (1992), demonstraram que a infecção de camundongos BALB/c por *L. amazonensis*, tanto in vitro como in vivo, induz a produção de TGF- $\beta$  ativo e que anti TGF- $\beta$  protege estes camundongos susceptíveis, sugerindo um mecanismo de escape do parasito. TGF- $\beta$  exógeno induz a reversão, in vivo, de cepa avirulenta em virulenta e reativa doença latente (BARRAL et al., 1993). Em macrófagos humanos infectados com *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*, houve aumento na produção de TGF- $\beta$ , e a sua utilização

exógena favorecia a replicação do parasito em macrófagos infectados com *L. braziliensis*. Adicionalmente, em biópsias de pacientes com leishmaniose cutânea em fase inicial e mucosa ativa foi encontrado a presença de TGF- $\beta$  (BARRAL et al., 1995). Nossos dados mostram correlação positiva entre porcentagem de CD16 em monócitos e tamanho da lesão, (Fig 10) sugerindo um prognóstico negativo para estes pacientes. Gostaríamos de propor, então, este receptor como um possível marcador de evolução clínica, o que poderá ser verificado acompanhando esses pacientes após o tratamento. O receptor de baixa afinidade para IgE (CD23) já foi proposto como possível marcador de evolução clínica em pacientes com leishmaniose cutânea, sendo altamente expresso in situ em pacientes não tratados e refratários ao tratamento (VOULDOUKIS et al, 1994). Foi demonstrado também que esta expressão do CD23 em macrófagos, in situ, relaciona-se com elevada produção de IgE, secreção de TNF- $\alpha$  e NO, o que levaria a morte intracelular de *L. braziliensis*, in vivo, e *L. major*, in vitro (VOULDOUKIS et al., 1994 & 1995).

Encontramos a expressão de CD32 em linfócitos aumentada de 7,1 % em controles sadios para 16 % em pacientes ( $p= 0.0021$ ) (Tabela III). Apesar de termos observado uma correlação significativa com a expressão de CD19, marcador de célula B, este último não mostrou reprodutibilidade em técnica de sangue total e sim em PBMC pelo gradiente de ficol- hypaque (dados não mostrados). A técnica de lise das hemácias utilizada no protocolo expõe todas as populações celulares a um choque hipotônico. As células B, além de se encontrar em concentrações reduzidas no sangue periférico, poderiam ser mais sensíveis a essas variações osmóticas, tendo em vista que elas apresentavam uma maior autofluorescência (dados não mostrados).

Em linhas gerais a célula B desempenha papéis importantes na apresentação de antígeno e na produção de anticorpos. Nas formas tegumentares da leishmaniose, a produção de anticorpos relaciona-se à formação de imuno complexos, que determina a vasculite na fase inicial da patogênese (comunicação pessoal Barral A. & Freitas L.), enquanto que na forma visceral existe uma exacerbação da resposta humoral com ativação policlonal de linfócito B e altas titulações de anticorpos, justificando a gravidade desta forma (GALVÃO-CASTRO et al., 1984). Sabe-se que a célula B expressa preferencialmente o FcγRIIb (JESSUP et al., 2001) que possui regulação de sinalização a partir do motivo ITIM determinando inibição de suas funções. Entretanto, sugere-se duas hipóteses, caso as células B sejam reguladas pela isoforma RIIb, estaria ocorrendo uma inibição da produção de anticorpos como ocorre na leishmaniose cutânea localizada. Para testar esta hipótese, precisaríamos quantificar a IgG total sérica e nas lesões, correlacionando com a expressão do CD32. Caso a isoforma fosse RIIa, possuindo motivo regulatório ITAM, levando à ativação deste receptor, a célula B poderia estar desempenhando papel deletério na produção exacerbada de anticorpos, como nas formas visceral e cutânea difusa da leishmaniose. A figura 8 A e B mostra forte correlação positiva entre o mesmo receptor (CD32) em três populações diferentes, no caso linfócitos, monócitos e neutrófilos., tanto em controles como em pacientes. Este achado sugere uma regulação genética da expressão, em contraste aos outros FcγRs, que são regulados principalmente por citocinas. Pretendemos avaliar esse e outros polimorfismos genéticos dos FcRs para investigar uma possível associação entre esses receptores e susceptibilidade ou severidade das diversas formas clínicas da leishmaniose.

Finalmente, foi detectado um aumento significativo da expressão de CD64 em neutrófilos, de 1,5% para 25,7%, comparando com controles (Tabela III) Normalmente, este receptor está ausente ou em baixas concentrações, podendo ser aumentado por estímulo com GM-CSF, IFN- $\gamma$  ou IL-10 (ERBE et al., 1990 & HUIZINGA et al., 1991). Em outras patologias como a síndrome de respostas inflamatórias sistêmicas, o CD64 está aumentado em neutrófilos de 19% para 65% comparando pacientes com controles (QURESHI et al., 2001). BOVOLENTA et al. (1998) demonstraram que o aumento de CD64 em neutrófilos está sendo mediado por IFN- $\gamma$  e que houve falha na expressão quando tratados com IL-10, em contraste aos monócitos. Baseado nos achados de BOVOLENTA et al. (1998), a correlação entre MFI de CD64 em monócitos e neutrófilos visto na figura 6A sugere que a indução do CD 64 nos pacientes seria mediada por IFN- $\gamma$  ou GM-CSF e provavelmente não por IL-10.

Na figura 7C encontramos correlação de CD16 em monócitos com CD64 em neutrófilos nos controles. Porém, em pacientes esta correlação não aparece, sugerindo mecanismos moleculares e/ou celulares distintos. Sabemos que a expressão destes dois receptores é mediada por citocinas distintas e antagônicas, no caso TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$ , respectivamente. Sugerimos, então, a possível existência de subgrupos de pacientes que estariam sendo regulados por mecanismos imunológicos antagônicos. Baseado nestas suposições, estes marcadores apontam para uma análise preditiva de evolução clínica, sugerindo um mecanismo de monitoramento de falhas terapêuticas baseado em uma análise simples e pouco dispendiosa como a citometria de fluxo

## 7 CONCLUSÕES

1. Foi observado um aumento significativo da população de eosinófilos e diminuição significativa de neutrófilos em pacientes com leishmaniose cutânea localizada comparados com controles.
2. Foi observado um aumento significativo da porcentagem de monócitos expressando CD16, linfócitos expressando CD32 e neutrófilos expressando CD64 em pacientes com leishmaniose cutânea localizada comparados com controles.
3. Observamos uma correlação positiva entre a porcentagem de monócitos expressando CD16 e tamanho da lesão em pacientes com leishmaniose cutânea localizada.

## 8 PERSPECTIVAS

- Primeiramente, gostaríamos de correlacionar os nossos achados da expressão dos Fc $\gamma$ R no sangue periférico com a expressão in situ, tanto nas lesões cutâneas localizadas como nas formas mucosas, difusa e visceral, considerando que a expressão diferenciada de citocinas nestas diversas manifestações clínicas deveria influenciar a expressão dos Fc $\gamma$ R.
- Uma segunda perspectiva constituiria no estudo da possível correlação entre a expressão dos Fc $\gamma$ R e a resposta imune anti-*Leishmania*, tanto celular como humoral. Pretendemos quantificar o teor de IgG anti-*leishmania* no plasma dos pacientes, linfoproliferação e a produção de citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-10, GM-CSF e TGF- $\beta$ ) em cultura de sangue total ex vivo.
- Realizar avaliação genotípica dos diversos polimorfismos dos Fc $\gamma$ R
- Finalmente, dentro dos receptores Fc, o CD64 mostrou-se um promissor alvo terapêutico num modelo experimental de inflamação cutânea, utilizando uma imunotoxina MDX-44 composta de um anticorpo monoclonal humanizado dirigido contra o CD64 e conjugado a uma toxina ricina A (©Medarex Lta) resultando em eliminação por apoptose dos macrófagos inflamatórios e provocando decréscimo dos parâmetros clínicos associados com a inflamação (Thepen et al., 2000). Assim a MDX-44 abre perspectivas para o seu possível uso terapêutico na leishmaniose cutânea localizada (anexo II), com fácil aplicação na lesão. Porém, a MDX-44 poderia ser considerada como terapia alternativa para as formas de maior morbiletalidade como a mucosa, difusa e visceral, possivelmente administrada de forma sistêmica.

## 8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER J.S. **Cellular and Molecular Immunology**. 2.ed. USA: W.B. Saunders Company, p 16, 1994.

AJDARY, S.; ALIMOHAMMADIAN, M.H.; ESLAMI, M.B.; KEMP, K.; KHARAZMI, A. Comparison of the Immune Profile of Nonhealing Cutaneous Leishmaniasis with active lesion and those who have recovered from infection. **Infect. Immun.**, **68**: 2000.

ALMEIDA, R.; D'OLIVEIRA, A.J.R.; MACHADO, P.; BACELLAR, O.; KO, A.I.; DE JESUS, A.R.; MOBASHERY, N.; BRITO SANTOS, J.; CARVALHO, E. M. Randomized, double-blind study of stibogluconate plus human granulocyte macrophage colony-stimulating factor versus stibogluconate alone in the treatment of cutaneous Leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, **180**:1735-1737, 1999.

ARMSTRONG, J.A.; DARCY, H.P. Response of 92 cultures macrophages to Mycobacteteium tuberculosis with observation on fusion of lysosomes with phagosomos. **J. Exp. Med.**, **134**:713, 1971.

BACELLAR O.; BARRAL NETTO M.; BADARO R.; CARVALHO E.M. Gamma interferon production by lymphocytes from children infected with L. chagasi. **Braz J Med Biol Res.**,24(8):791-5,1991.

BADARÓ, R.; DUARTE, M.I.S. Leishmaniose visceral (calazar). In: VERONESI R.; FOCACCIA R. (Eds) **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 1234-1259.

BADARÓ, R.; FALCOFF, E.; BADARÓ, F.S.; CARVALHO, E.M.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; BARRAL, A.; CARVALHO, J.S.; BARRAL-NETTO, M.; BRANDELY, M.; SILVA.. Treatment of visceral leishmaniasis with pentavalent antimony and interferon gamma. **N. Engl. J. Med.**, **322**:16-21, 1990.

BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; ALMEIDA, R.; DE JESUS, A.R.; GRIMALDI JUNIOR, G.; SANTOS, I.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E.M. Lymphadenopathy associated with *Leishmania braziliensis* cutaneous infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **47**:587-592, 1992.

BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; YONG, E.C.; BROWNELL, C.E.; TWARDZIK, D.R.; REED, S.G. Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **1590**:3442-3446, 1993.

BARRAL, A.; TEIXEIRA, M.; REIS, P.; VINHAS, V.; COSTA, J.; LESSA, H.; BITTENCOURT, A.L.; REED, S.; CARVALHO, E.M.; BARRAL-NETTO, M. Transforming growth factor-beta in human cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Pathol.**, **147**:947- 954, 1995.

BARRAL-NETO, M.; MACHADO, P.; BARRAL, A. Human cutaneous Leishmaniasis: recent advances in physiopathology and treatment. **Eur. J. Dermatol.**, **5**:104-113, 1995.

BARTH, E.; FISCHER, G.; SCHNEIDER, E.M.; WOLLMMEYER, J.; GEORGIEFF, M.; WEISS, M. Differences in the expression of CD64 and mCD14 on polymorphonuclear cells and on monocytes in patients with septic shock. **Cytokine**, **14**:299-302, 2001.

BERKEN, A.; BENACERRAF, B. Properties of antibodies cytophilic for macrophages. **J. Exp. Med.**, **123**:119-44, 1966.

BOMFIM, G.; NASCIMENTO, C.; COSTA, J.; CARVALHO, E.M.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. **Exp. Parasitol.**, **84**:188-194, 1996.

BOVOLENTA C.; GASPERINI S.; MCDONALD P.P.; CASSATELLA M.A. High affinity receptor for IgG (Fc gamma RI/CD64) gene and STAT protein binding to the IFN-gamma response region (GRR) are regulated differentially in human neutrophils and monocytes by IL-10 **J Immunol.** **160**; 911-919, 1998.

- BRYCESSON, A.D.M. Diffuse Cutaneous Leishmaniasis in Ethiopia. I Clinical and Histological features of the Disease. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **63**:708-737, 1969.
- CAMBIET, J.C.; DAERON, M.; FRIDMAN, W.H.; GERGELY, J.; KINET, J.P.; KLAUSNER, R.; LYNCH, B.; MALISSEN, B.; PECHT, I.; REINHERZ, E.; RAVETCH, J.; RETH, M.; SAMELSON, L.; SANDOR, M.; SCHREIBER, A.; SEED, B.; TERHORST, C.; VAN DE WINKEL, J.; WEISS, A. New nomenclature for the Reth motif (or ARTH1 /TAM/ ARAM/ YXXL). **Immunol. Today**, **16**:110,1995.
- CARVALHO, E.M.; BARRAL, A.; COSTA, J.M.L.; BITTENCOURT, A.; MARSDEN, P. Clinical and Immunopathological Aspects of Disseminated Cutaneous Leishmaniasis. **Acta Trop.**, **56**:315-325, 1994.
- CARVALHO, E.M.; CORREIA FILHO, D.; BACELLAR, O.; LESSA, H.; ROCHA, H.A. Characterization of the Immune Response in subjects with Self Healing Cutaneous Leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **53**:273-277, 1995.
- CASTES, M.; TAPIA, F..J. Immunopatologia de la Leishmaniasis tegumentaria America. **Acta Cient. Venezol.**, **49**:42-56, 1998.
- CHERWINSKI, H.M.; SCHUMACHER, J.H.; BROWN, K.D.; MOSMANN, T.R. Two types of murine helper T cell clone. Further differences in lymphokine synthesis between th1 and th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. **J. Exp. Med.**, **166**:1229-1244, 1988.
- COFFMAN, R.L.; SEYMOUR, B.W.; LEBMAN, D.A.; HIRAKI, D.D.; CHRISTIANSEN, J.A.; SHRADER, B.; CHERWINSKI, H.M.; SAVELKOUL, H.F.; FINKELMAN, F.D.; BOND, M.W.; The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. **Immunol. Rev.**, **102**:5-28, 1988.

COICO, R.F.; TAMMA, S.L.; BESSLER, M.; WEI, C.F.; THORBECKE, G.J. IgD receptors-positive human T lymphocytes. Modulation of receptors expression by oligomeric IgD and lymphokines. **J. Immunol.**, **145**:3556, 1990.

CONRAD, D.H. **The immunoglobulin receptors and their physiological and pathological roles in immunity**. Great Britain: Kluwer Academic Publishers, 1998.

CONVIT, J.; PINARDI, M.E.; RONDON, A.J. Difuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **66**: 603-610, 1972.

DAVIS, W.; HARRISON, P.T.; HUTCHINSON, M.J.; ALLEN, J.M. Two distinct regions of FC gamma RI initiate separate signalling pathways involved in endocytosis and phagocytosis. **EMBO J.**, **14**:432-441, 1995.

DOMBROWICZ, D.; FLAMAND, V.; MIYAJIMA, I.; RAVETCH, J.V.; GALLI, S.J.; KINET, J.P. Absence of FcεRI alpha chain results in upregulation of FcγRIII-dependent mast cell degranulation and anaphylaxis. Evidence of competition between FcεRI and FcγRIII for limiting amounts of FcR beta and gamma chains. **J. Clin. Invest.**, **99**:915-925, 1997.

ELSASSER, D.; VALERIUS, T.; REPP, R.; WEINER, G.J.; DEO, Y.; KALDEN, J.R.; VAN DE WINKEL, J.G.; STEVENSON, G.T.; GLENNIE, M.J.; GRAMATZKI, M. HLA class II as potential target antigen on malignant B cells for therapy with bispecific antibodies in combination with granulocyte colony-stimulating factor. **Blood**, **87**:3803-3812, 1996.

ERNST, L.K.; DUCHEMIN, A.M.; ANDERSON, C. Association of the high-affinity receptor for IgG (Fc gamma RI) with the gamma subunit of the IgE receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **90**:6023-6027, 1993.

FISCHER-SMITH, T.; CROUL, S.; SVERSTIUK, A.E.; CAPINI, C.; L'HEUREUX, D.; REGULIER, E.G.; RICHARDSON, M.W.; AMINI, S.; MORGELLO, S.; KHALILI, K.; RAPPAPORT, J.; CNS invasion by CD14+/CD16+ peripheral blood-derived monocytes in HIV dementia: perivascular accumulation and reservoir of HIV infection. **J. Neurovirol.**, 7:528-541, 2001.

GAAFAR, A.; KHARAZMI, A.; ISMAIL, A.; KEMP, M.; HEY, A.; CHRISTENSEN, C.B.; DAFALLA, M.; ELKADORA, A.M.; THEANDER, T.G. Dichotomy of the T Cell response to leishmania antigens in patients suffering from cutaneous Leishmaniasis: Absence or Scarcity of th1 activity is associated with severe infections. **Clin. Exp. Immunol.**, 100:239-245, 1995.

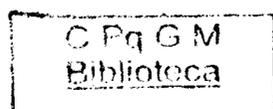
GALVÃO-CASTRO, B.; SÁ FERREIRA, J.A.; MARZOCHI, K.F.; MARZOCHI, M.C.; COUTINHO, S.G.; LAMBERT, P.H. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human american visceral leishmaniasis. **Clin. Exp. Immunol.**, 56:58-66, 1984.

HARMS,G.; ZWINGENBERGER, K.; CHEHADE, A.K.; TALHARI, S. RACZ, P.; MOUAKEH, A.; DOUBA, M.; NAKEL, L.; NAIFF, R.; KREMSNER, P.G.Effects of intradermal gamma-interferon in cutaneous leishmaniasis. **Lancet**, 1:1287-1292, 1989.

HATTA, Y.; TSUCHIYA, N.; OHASHI, J.; MATSUSHITA, M.; FUJIWARA K.; HAGIWARA, K.; JUJI ,T.; TOKUNAGA, K. Association of Fc gamma receptor IIIB, but not of Fc gamma receptor IIA and IIIA polymorphisms with systemic lupus erythematosus in Japanese. **Genes Immun.**, 1:53-60, 1999.

HEIJNEN, I.A.; VAN DE WINKEL, J.G. Human IgG Fc receptors. **Int. Rev. Immunol**,16:29-55, 1997.

HEIJNEN, I.A.F.M. **The hight affinity IgG receptor as a yatget for immunotherapy.** Netherlands: Utrecht Universiteit. Faculteit Geneeskunde Ptoefschrift, 1997.



HEINZEL, C.E.P.; SADICK, M.D.; HOLADAY, B.J.; COFFMAN, R.L.; LOCKSLEY, R.M. Reciprocal Expression of Interferon-gamma or IL-4 During the Resolution or Progression of Murine Leishmaniasis, Evidence for Expansion of Distinct Helper T Cell Subsets. **J. Exp. Med.**, **169**:59-72, 1989.

HERWALDT, B.L.; ARANA, B.A.; NAVIN, T.R. The natural history of Cutaneous Leishmaniasis in Guatemala. **J. Infect. Dis.**, **165**:518-527, 1992.

HOOVER, D.L.; NACY, C.A.; MELTZER, M.S. Human monocyte activation for cytotoxicity against intracellular *Leishmania donovani* amastigotes: induction of microbicidal activity by interferon-gamma. **Cell. Immunol.**, **94**:500-511, 1985.

HUBER, V.C.; LYNCH, J.M.; BUCHER, D.J.; LE, J.; METZGER, D.W. Fc receptor-mediated phagocytosis makes a significant contribution to clearance of influenza virus infections. **J. Immunol.**, **166**:7381-7388, 2001.

INDIK, Z.K.; PARK, J.G.; HUNTER, S.; SCHREIBER, A.D. The molecular dissection of Fc gamma receptor mediated phagocytosis. **Blood.**, **86**:4389-4399, 1995.

JESSUP, C.F.; RIDINGS, J.; HO, A.; NOBBS, S.; ROBERTON, D.M.; MACARDLE, P.; ZOLA, H. The Fc receptor for IgG (Fc gamma RII; CD32) on human neonatal B lymphocytes. **Hum. Immunol.**, **162**:679-685, 2001.

KEMP, K.; THEANDER, T.G.; HVIID, L.; GAAFAR, A.; KHARAZMI, A.; KEMP, M. Interferon- $\gamma$  and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Producing Cells in Humans who are Immune to Cutaneous Leishmaniasis Scand. **J. Immunol.**, **49**:655-659, 1999.

KIMA, P.E.; CONSTANT, S.L.; HANNUM, L.; COLMENARES, M.; LEE, K.S.; HABERMAN, A.M.; SHLOMCHIK, M.J.; MCMAHON-PRATT, D. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. **J. Exp. Med.**, **191**:1063-1068, 2000.

KOBAYASHI, T.; YAMAMOTO, K.; SUGITA, N.; VAN DER POL, W.L.; YASUDA, K.; KANEKO, S.; VAN DE WINKEL, J.G.; YOSHIE, H. The fc gamma receptor genotype as a severity factor for chronic periodontitis in japanese patients. **J. Periodontol.**, **72**:1324-1331, 2001.

KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Biotechnology**, **24**:524-526, 1975.

KRILOV, L.R.; ANDERSON, L.J.; MARCOUX, L.; BONAGURA, V.R.; WEDGWOOD, J.F. Antibody-mediated enhancement of respiratory syncytial virus infection in two monocyte/macrophage cell lines. **J. Infect. Dis.**, **160**:777-782, 1989.

LOCHER, C.; VANHAM, G.; KESTENS, L.; KRUGER, M.; CEUPPENS, J.; VINGERHOETS, J.; GIGASE, P. Expression patterns of Fc gamma receptors, HLA-DR and selected adhesion molecules on monocytes from normal and HIV-infected individuals. **Clin. Exp. Immunol.**, **98**:115-122, 1994.

MANCA, F.; FENOGLIO, D.; LI PIRA, G.; KUNKL, A.; CELADA, F. Effect of antigen/antibody ratio on macrophage uptake, processing, and presentation to T cells of antigen complexed with polyclonal antibodies. **J. Exp. Med.**, **173**:37-48, 1991.

MENDES, A.C.G.; ALBUQUERQUE, P.C.; LESSA, F.D.; MACIEL FILHO, R.; FARIAS, S.F.; MONTENEGRO, T.O. Sistema de informações hospitalares fonte complementar na Vigilância e no Monitoramento das doenças de Transmissão Vetorial. **Inf. Epidemiol. SUS**, **9**:132-136, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Centro Nacional de Epidemiologia. Fundação Nacional de Saúde. Casos de agravos e doenças infecciosas e parasitárias notificadas de janeiro a setembro de 1997 e igual período de 1998, por Unidade Federada do Brasil. **Inf. Epidemiol. SUS**, **7**:90-91, 1998.

MIYAJIMA, I.; DOMBROWICZ, D.; MARTIN, T.R.; RAVETCH, J.V.; KINET, J.P.; GALLI, S.J. Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and Fc $\gamma$ RIII. Assessment of the cardiopulmonary changes, mast cell degranulation, and death associated with active or IgE- or IgG1-dependent passive anaphylaxis. **J. Clin. Invest.**, **99**:901-914, 1997.

MORGAN, A.W.; GRIFFITHS, B.; PONCHEL, F.; MONTAGUE, B.M.; ALI, M.; GARDNER, P.P.; GOOI, H.C.; SITUNAYAKE, R.D.; MARKHAM, A. F.; EMERY, P.; ISAACS, J. Fc gamma receptor type IIIA is associated with rheumatoid arthritis in two distinct ethnic groups. **Arthritis Rheum.**, **43**:2328-2334, 2000.

MORTON, H.C.; VAN EGMOND, M.; VAN DE WINKEL, J.G.J. **Human IgA fc receptors (Fc $\alpha$ R). The immunoglobulin receptors and their physiological and pathological roles in immunity.** Great Britain: Kluwer Academic Publishers, 1998.

MOSMANN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A.; COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, **136**:2348-2357, 1986.

MURRAY, H.W.; CERVA, J.S.; HARIPRASHAD, J.; TAYLOR, A.P.; STOECKLE M,Y.; HOCKMAN, H. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in experimental visceral leishmaniasis. **J. Clin. Invest.**, **95**:1183-1192, 1995.

MURRAY, H.W.; RUBIN, B.Y.; ROTHERMEL, C.D. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine. **J. Clin. Invest.**, **72**:1506-1010, 1983.

NELSON, M.B.; NYHUS, J.K.; ORAVECZ-WILSON, K.I.; BARBERA-GUILLEM, E. Tumor cells express Fc $\gamma$ RI which contributes to tumor cell growth and a metastatic phenotype **Neoplasia**, **3**:115-124, 2001.

NEVES D.P. **Parasitologia Humana**. 9.ed, Atheneu, São Paulo, 35-37, 1997.

OHNO, T.; KUBAGAWA, H.; SANDERS, S.; COOPER, M.D. Biochemical nature of an Fc $\mu$ \_receptors on human B lineage cells. **J. Exp. Med.**, 172:1165-75, 1990.

PFEIFFER, J.R.; HOWES, P.S.; WATERS, M.A.; HYNES, M.L.; SCHNURR, P.; DEMIDENKO, E.; BECH, F.R.; MORGANELLI, P.M.; Levels of expression of Fc $\gamma$ RIIA (CD32) are decreased on peripheral blood monocytes in patients with severe atherosclerosis. **Atherosclerosis**, 155:211-218, 2001.

PIRISI A. Single-dose treatment shows effectiveness for Indian visceral leishmaniasis. **Lancet**, 356:1086, 2000.

PRASAD A.S. Zinc: an overview. **Nutrition**, 11:93-99, 1995. Supplemento 1.

RAVETCH J.V. Fc receptors: rubor redux. **Cell**, 78:553-560, 1994.

RAVETCH J.V.; KINET J.P. Fc receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, 19:457-492, 1991.

ROCHA, P.N.; ALMEIDA, R.P.; BACELLAR, O.; RIBEIRO-DE-JESUS, A.; CORREIA FILHO, D.; CRUZ FILHO, A.; BARRAL, A.; COFFMAN, R.L.; MARCELINO, E.M. Down regulation of th1 type of response in early human American Leishmaniasis. **J. Infect. Disease.**, 180:173-4, 1999.

RODRIGUEZ, M.E.; HELLWIG, S.M.; HOZBOR, D.F.; LEUSEN, J.; VAN DER POL, W.L.; VAN DE WINKEL, J.G. Fc receptor-mediated immunity against Bordetella pertussis. **J. Immunol.**, 167:6545-6551, 2001.

ROTHFIELD, N.F. Systemic lupus erythematosus. **Pediatr. Ann.**, 11:397-402, 1982.

SHARQUIE, K.E.; NAJIM, R.A.; FARJOU, I.B.; AL-TIMIMI, D.J. Oral zinc sulphate in the treatment of acute cutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp. Dermatol.**, 26:21-26, 2001.

- SILVERSTEIN, S.C.; GREENBERG, S.; DI VIRGILIO, F. In: PAUL, W. E. (Ed.) *Fundamental Immunology*. New York: Raven Press, p.703. 1989.
- STOCKMEYER, B.; VALERIUS, T.; REPP, R.; HEIJNEN, I.A.; BUHRING, H.J.; DEO, Y.M.; KALDEN, J.R.; GRAMATZKI, M.; VAN DE WINKEL, J.G. Preclinical studies with Fc(gamma)R bispecific antibodies and granulocyte colony-stimulating factor-primed neutrophils as effector cells against HER-2/neu overexpressing breast cancer. **Cancer**, **57**:696-701, 1997.
- SUNDAR, S.; ROSENKAIMER, F.; MAKHARIA, M.K.; GOYAL, A.K.; MANDAL, A.K.; VOSS, A.; HILGARD, P.; MURRAY, H.W. Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis. **Lancet**, **352**:1821, 1998.
- TAKEDA, A.; TUAZON, C.U.; ENNIS, F.A. Antibody-enhanced infection by HIV-1 via Fc receptor-mediated entry. **Science**, **242**:580-583, 1988.
- TER BEKKE, M.W.; TEMPELMAN, M.J.; CAPEL, P.J.; VAN DE WINKEL, J.G. Functional differences between two Fc receptor ITAM signaling motifs. **Blood**, **86**:3302-3307, 1995.
- THEPEN, T.; VAN VUUREN, A.J.; KIEKENS, R.C.; DAMEN, C.A.; VOOIJS, W.C.; VAN DE WINKEL, J.G. Resolution of cutaneous inflammation after local elimination of macrophages. **Nat. Biotechnol.**, **18**:48-45, 2000.
- VALERIUS, T.; REPP, R.; DE WIT, T.P.; BERTHOLD, S.; PLATZER, E.; KALDEN, J.R.; GRAMATZKI, M.; VAN DE WINKEL, J.G. Involvement of the high-affinity receptor for IgG (Fc gamma RI; CD64) in enhanced tumor cell cytotoxicity of neutrophils during granulocyte colony-stimulating factor therapy. **Blood**, **82**:931-939, 1993.
- VAN DE WINKEL, J.G.; BAST, B.; DE GAST, G.C. Immunotherapeutic potential of bispecific antibodies. **Immunol. Today**, **18**:562-564, 1997.

VAN DE WINKEL, J.G.; CAPEL, P.J. Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. **Immunol. Today**, **14**:215-221, 1993.

VAN DE WINKEL, J.G.; ERNST, L.K.; ANDERSON, C.L.; CHIU, I.M. Gene organization of the human high affinity receptor for IgG, Fc gamma RI (CD64). Characterization and evidence for a second gene. **J. Biol. Chem.**, **266**:13449-13455, 1991.

VAN DE WINKEL, J.G.J.; HOGARTH, P.M. **The immunoglobulin receptors and their physiological and pathological roles in immunity**. Great Britain: Kluwer Academic Publishers, 1998.

VOULDOUKIS I.; ISSALY F.; FOURCADE C.; PAUL-EUGENE N.; AROCK M.; KOLB J.P.; DA SILVA O.A.; MONJOUR L.; POINSOT H.; TSELENTIS Y.; CD23 and IgE expression during the human immune response to cutaneous leishmaniasis: possible role in monocyte activation. **Res Immunol**, **145**(1):17-27, 1994.

VOULDOUKIS I.; RIVEROS MORENO V.; DUGAS B.; OUAAZ F.; BECHEREL P.; DEBRE P.; MONCADA S.; MOSSALAYI MD. The killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the Fc epsilon RII/CD23 surface antigen. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, **15**:92(17):7804-8, 1995.

WALLACE, P.K.; HOWELL, A.L.; FANGER, M.W. Role of Fc gamma receptors in cancer and infectious disease. **J. Leukoc. Biol.**, **55**:816-826, 1994.

WEINER, L.M.; HOLMES, M.; RICHESON, A.; GODWIN, A.; ADAMS, G.P.; HSIEH-MA, S.T.; RING, D.B.; ALPAUGH, R.K. Binding and cytotoxicity characteristics of the bispecific murine monoclonal antibody 2B1. **J. Immunol.**, **151**:2877-2886, 1993.

WILSON, M.E.; YOUNG, B.M.; DAVIDSON, B.L.; MENTE, K.A.; MCGOWAN, S.E. The importance of TGF-beta in murine visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, **161**:6148-6155, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Infectious Disease Leishmaniasis. Disponível em:  
<<http://www.who.int/emc/disease/leish/leisdis1.html>>. Acesso em: 25 nov. 2000.

# EOSINOPHILS IN HUMAN CUTANEOUS LEISHMANIASIS: INCREASED CELL NUMBERS AND EXPRESSION OF ACTIVATION MARKERS

Soares G<sup>1</sup>, Schnitman S<sup>1</sup>, Barral A<sup>2</sup>, Barral-Netto M<sup>1</sup> and Van Weyenbergh J<sup>1</sup>

<sup>1</sup> LIM1, <sup>2</sup> LIP, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ, Salvador-BA, Brazil.

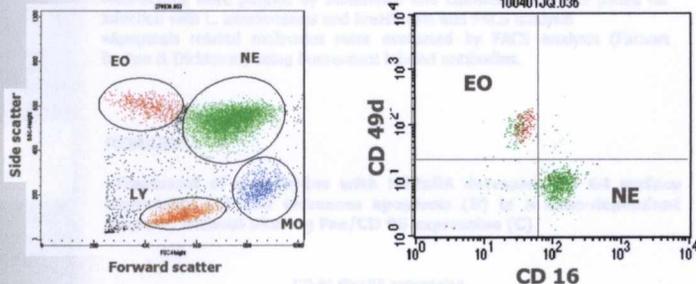
**INTRODUCTION**

The presence of eosinophils has been associated with Th2 immune response and increased IL-5 production, such as observed in asthma and allergic conditions. Eosinophil accumulation has also been demonstrated in variable numbers in cutaneous lesions in human as well as experimental murine leishmaniasis. However, it is unclear if eosinophils play a beneficial or deleterious role in an anti-Leishmania immune response. Therefore, we have quantified eosinophil cell numbers and cellular activation markers by flow cytometry in peripheral blood from patients with localized cutaneous leishmaniasis before and after treatment with pentavalent antimony, and compared to urban controls and controls from an endemic area.

## METHODS

Eosinophil cell numbers and cellular activation markers were quantified by flow cytometry (FACSort, Becton-Dickinson) of whole blood samples (stained with antibodies against CD 16, CD 32, CD 49d, CD 64, CD 80, CD 86 and CD 95 (Fas, APO-1), lysed and fixed using B-D Lysing Solution) from patients with localized cutaneous leishmaniasis (LCL) before and after treatment with pentavalent antimony, and compared to urban controls and controls from an area endemic for LCL.

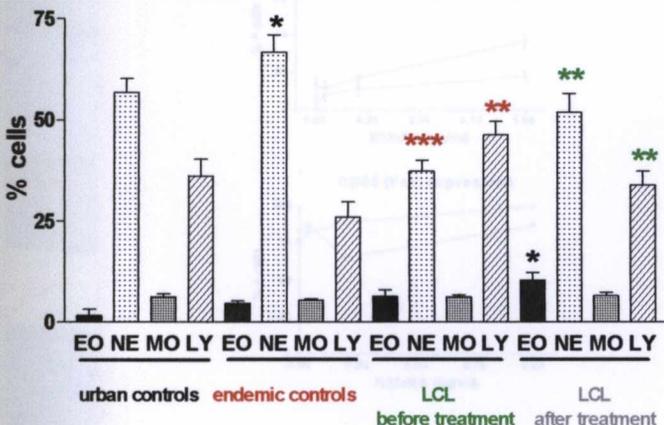
Eosinophils were easily distinguished from neutrophils by characteristic forward and side scatter and by double staining with CD16 and CD49d.



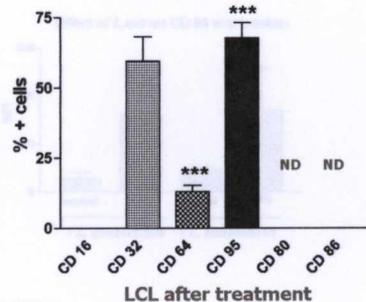
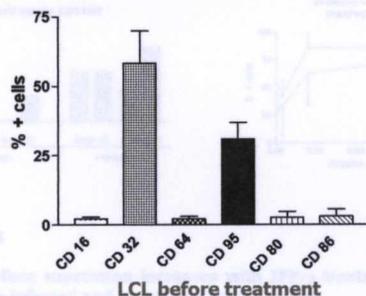
## RESULTS

**Eosinophils are significantly increased in LCL patients after treatment**

### Leukocyte cell type distribution



**CD 64 (high affinity Fc $\gamma$  receptor) and CD 95 (Fas) expression are strongly increased in EO of LCL patients after treatment**



## CONCLUSIONS

We found an increase in EO in untreated patients and controls from an endemic area, as compared to urban controls. Surprisingly, the amount of EO was further increased after successful treatment.

Patient EO expressed CD 64, CD 95, as well as B7.1 (CD80) and B7.2 (CD 86) co-stimulatory molecules, indicating that these cells are activated and might possibly function as antigen-presenting cells.

**CD 64 (high affinity Fc $\gamma$  receptor) and CD 95 (Fas) expression are strongly increased in EO of LCL patients after treatment**

Interestingly, IL-5 was easily detected in plasma from allergic controls with increased EO, but virtually absent in plasma or culture supernatants from our patients, suggesting that increased EO counts are not necessarily related to a Th2 response in human cutaneous leishmaniasis.

## REFERENCES

- Lezama-Dávila et al. Immunomodulation of Chiclero's Ulcer. Role of Eosinophils. T Cells, Tumor Necrosis Factor and Interleukin-2. *Scand. J. Immunol* 1998; 47: 502-508
- Gleich GJ. The eosinophil and bronchial asthma: current understanding. *J. Allergy Clin Immunol* 1990;85:422-436
- Robinson DS, et al. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N. Engl J Med* 1993;326: 298-304
- Durham SB, et al. Cytokine messenger RNA expression for IL-3, IL-4, and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor in the nasal mucosa after local allergen provocation: relationship to tissue eosinophils. *J. Immunol* 1992;148: 2390-2394.
- Lopes AF, Sanderson CJ, Gamble JR, Campbell HD, Young IG, Vadas MA. Recombinant human interleukin 5 is a selective activator of human eosinophil function. *J. Exp. Med.* 1988;167:219-224

# High affinity IgG receptor (CD 64) as a molecular target for possible therapeutic intervention in human Leishmaniasis.

Soares G<sup>1</sup>, Thepen T<sup>2</sup>, vandeWinkel JGJ<sup>2</sup>, Barral-Netto M<sup>1</sup> and Van Weyenbergh J<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>LIMI, - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ, Salvador-BA, Brazil; <sup>2</sup> Medarex Europe, Utrecht, The Netherlands

## INTRODUCTION

Current first-line treatment of cutaneous and visceral leishmaniasis with pentavalent antimony is associated with mild to serious side-effects and relapses. Alternative treatments using recombinant cytokines with known leishmanicidal activity (IFN- $\gamma$  and GM-CSF) have been successful. Both cytokines have also been shown to induce expression of the high affinity IgG receptor (CD 64) on myeloid cells. We are currently exploring the possible therapeutic use of H22xRA (Medarex Inc.), consisting of a humanized anti-CD 64 monoclonal antibody conjugated to ricin A, in human leishmaniasis. Since the CD 64 antigen is preferentially expressed on activated or inflammatory macrophages, H22xRA can be used to eliminate these cells in a highly selective manner, as recently demonstrated in an experimental model of cutaneous inflammation in HuCD 64-transgenic mice (Thepen et al., Nature Biotechnology, 2000).

## OBJECTIVE

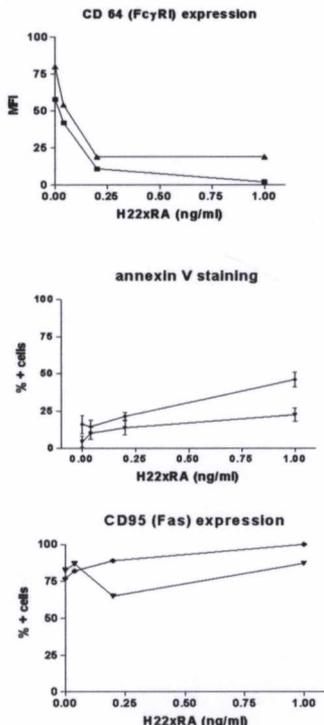
•We are currently testing the biological effects of H22xRA in human monocytes/macrophages infected with different strains of *Leishmania* in vitro

## METHODS

- PBMC were isolated by FICOLL-HYPAQUE centrifugation.
- Monocytes were purified by adherence and cultured in 84 well plates for infection with *L. amazonensis* and *brasilienis* and FACS analysis
- Apoptosis related molecules were evaluated by FACS analysis (Facsort Becton & Dickinson) using fluorescent labeled antibodies.

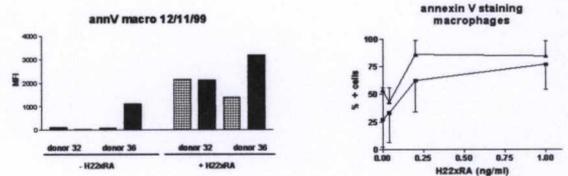
## RESULTS: 1

•Treatment of monocytes with H22xRA decreases CD 64 surface expression (A) and increases apoptosis (B) in a dose-dependent manner, without altering Fas/CD 95 expression (C)



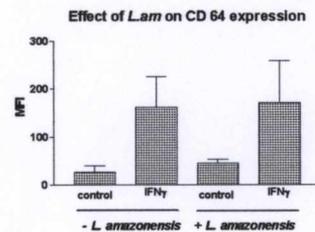
## RESULTS: 2

•Treatment of macrophages with H22xRA increases apoptosis in a dose-dependent manner



## RESULTS: 3

•CD 64 surface expression increases with IFN- $\gamma$  treatment in both *Leishmania*-infected and uninfected macrophages



## CONCLUSION

•We found a time- and dose-dependent induction of apoptosis (determined by annexin V staining) in uninfected as well as *L. amazonensis*-infected cells. Macrophages were more sensitive to the drug than monocytes, reaching up to 90% apoptotic cells at 48 h of treatment. Both CD 64 expression and apoptosis were significantly increased by pretreatment with IFN- $\gamma$ , although strong donor-to-donor variation was observed for CD 64 expression, especially following in vitro infection. Possible therapeutic benefit in vivo will be tested in HuCD 64-transgenic mice, as an experimental model for both cutaneous and visceral leishmaniasis.

## REFERENCES

•THEPEN, T.; VUUREN, A.J.H.; KIEKENS, R.C.M.; DAMEN, C.A.; VOOUS, W.C.; WINKEL, J.G.J. Resolution of cutaneous inflammation after local elimination of macrophages. Nature Biotechnology 2000.,

## ABSTRACT

**Text body:** Current first-line treatment of cutaneous and visceral leishmaniasis with pentavalent antimony is associated with mild to serious side-effects and relapses. Alternative treatments using recombinant cytokines with known leishmanicidal activity (IFN- $\gamma$  and GM-CSF) have been successful. Both cytokines have also been shown to induce expression of the high affinity IgG receptor (CD 64) on myeloid cells. We are currently exploring the possible therapeutic use of H22xRA (Medarex Inc.), consisting of a humanized anti-CD 64 monoclonal antibody conjugated to ricin A, in human leishmaniasis. Since the CD 64 antigen is preferentially expressed on activated or inflammatory macrophages, H22xRA can be used to eliminate these cells in a highly selective manner, as recently demonstrated in an experimental model of cutaneous inflammation in HuCD 64-transgenic mice (Thepen et al., Nature Biotechnology, 2000). We are currently testing the biological effects of H22xRA in human monocytes/macrophages infected with different strains of *Leishmania* in vitro. We found a time- and dose-dependent induction of apoptosis (determined by annexin V staining) in uninfected as well as *L. amazonensis*-infected cells. Macrophages were more sensitive to the drug than monocytes, reaching up to 90% apoptotic cells at 48 h of treatment. Both CD 64 expression and apoptosis were significantly increased by pretreatment with IFN- $\gamma$ , although strong donor-to-donor variation was observed for CD 64 expression, especially following in vitro infection. Possible therapeutic benefit in vivo will be tested in HuCD 64-transgenic mice, as an experimental model for both cutaneous and visceral leishmaniasis.