MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

CRISTINA RODRIGUES DE OLIVEIRA

Polimorfismo Alélico do receptor FcγRIIA na Leishmaniose Tegumentar Americana

Orientadora:
Profa. Dra. Lucimeire Antonelli da Silveira

Dissertação de Mestrado

Goiânia - Goiás, 2007

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

CRISTINA RODRIGUES DE OLIVEIRA

Polimorfismo Alélico do receptor FcγRIIA na Leishmaniose Tegumentar Americana

Orientadora:
Profa. Dra. Lucimeire Antonelli da Silveira

Dissertação de Mestrado

Goiânia - Goiás, 2006

Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TEDE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás–UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **[X] Dissertação** **[ ] Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor(a):	**CRISTINA RODRIGUES DE OLIVEIRA**				
CPF:	**-**	E-mail:	**oliveira.criss@gmail.com**		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? [X]Sim [ ] Não					
Vínculo Empregatício do autor	**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**				
Agência de fomento:	**-**			Sigla:	**-**
País:	**BRASIL**	UF:	**GOIÁS**	CNPJ:	-
Título:	**POLIMORFISMO ALÉLICO DO RECEPTOR FcγRIIA NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**				
Palavras-chave:	**RECEPTORES Fcγ, POLIMORFISMO ALÉLICO, FcγRIIA, *LEISHMANIA sp,* LEISHMANIOSE.**				
Título em outra língua:	**ALLELIC POLYMORPHISM OF HUMAN FcγRIIA RECEPTOR IN AMERICAN TEGUMENTARY LEISHMANIASIS**				
Palavras-chave em outra língua:	**Fcγ RECEPTORS, ALLELIC POLYMORPHISM, FcγRIIA, *LEISHMANIA sp,* LEISHMANIASIS.**				
Área de concentração:	**IMUNOLOGIA**				
Data defesa: **(**dd/mm/aaaa)	**13/02/2007**				
Programa de Pós-Graduação:	**MEDICINA TROPICAL**				
Orientador(a):	**PROFª. DRª. LUCIMEIRE ANTONELLI DA SILVEIRA**				
CPF:	**-**	E-mail:	**lucimeireantonelli@yahoo.com.br**		
Co-orientador(a):	**-**				
CPF:	**-**	E-mail:	**-**		

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?[1] [X] total [ ] parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

[ ] Capítulos. Especifique: _____

[ ] Outras restrições: _____

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

CRISTINA RODRIGUES DE OLIVEIRA Data: 21 / 09 / 2010

Assinatura do(a) autor(a)

[1] Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

CRISTINA RODRIGUES DE OLIVEIRA

Polimorfismo Alélico do receptor FcγRIIA na Leishmaniose Tegumentar Americana

Orientadora:
Profa. Dra. Lucimeire Antonelli da Silveira

Dissertação de Mestrado submetida ao PPGMT/IPTSP/UFG como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Tropical, na área de concentração de Imunologia.

Goiânia - Goiás, 2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG

O482p

Oliveira, Cristina Rodrigues de.
Polimorfismo Alélico do receptor FcγRIIA na Leishmaniose Tegumentar Americana [manuscrito] / Cristina Rodrigues de Oliveira. - 2007.
93 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Profª. Drª. Lucimeire Antonelli da Silveira.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2007.
Bibliografia.
Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.
Anexos.

1. Polimorfismo genético 2. Receptores Fc 3. Leishmaniose Tegumentar Americana I. Título.

CDU: 616.993.161

Aos meus pais Irene e Manoel, e ao meu irmão Fábio, pelo amor incondicional, pessoas essenciais em minha vida.

À Lucimeire, orientadora e amiga, fundamental para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus amigos, tão importantes nessa fase da minha existência.

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por me dar a oportunidade, força, persistência e vontade de realizar esse mestrado.

À minha orientadora profa. Dra. Lucimeire Antonelli da Silveira, não só orientadora, mas amiga, conselheira, pela competência profissional, por ter contribuído tanto para o meu crescimento científico e pessoal, pelo incentivo, pelos conselhos, pela disposição em ensinar, pelos obstáculos que me ajudou a superar, o meu sincero e eterno agradecimento.

À profa. Dra. Maria de Fátima Costa Alves, pela contribuição com reagentes, material de consumo e aparelhos, essenciais para a execução dessa dissertação, pelo seu papel como coordenadora da pós-graduação, pelas importantes contribuições como membro da banca de qualificação e pela disponibilidade em participar da banca de defesa desta dissertação. À Anamaria pelo auxílio nas análises dos dados.

Às médicas Dra. Ledice e Dra. Ana Joaquina, infectologistas do HDT, pelo atendimento aos pacientes, e em especial à Dra Ledice, pela presteza e disponibilidade sempre em me receber no hospital para coleta dos dados. À profa Mirian Dorta, pela colaboração quanto ao diagnóstico laboratorial das amostras coletadas.

Aos pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana atendidos no HDT, sem os quais não seria possível a execução desse trabalho.

Ao meu amigo, colega de faculdade e colega de laboratório José Paulo, por ter mediado a minha entrada no laboratório de Biologia Molecular e Imunologia Aplicadas às Doenças Infecciosas, sem o qual eu talvez não tivesse chegado até aqui.

Às bolsistas e estagiárias Kelly, Mayra, Fabiana, Camila, Marcus e em especial à Laryssa, que tanto contribuíram para a execução deste projeto.

Às companheiras do laboratório de Biologia Molecular e Imunologia Aplicadas às Doenças Infecciosas, profa. Ms. Adriana Crespo, Yanna e Ana Cláudia, pelo companheirismo e incentivo.

Ao meu amigo que ingressou comigo no mestrado, Alexsander Augusto, por compartilhar muitos desafios desta caminhada, pela amizade, pelo companheirismo, apoio e por me encorajar sempre. Aos demais companheiros da Imunologia, Cristina Cardoso, Ludimila, Hélio, Rosidete, Adriano, Lucas, Ângela, Arioldo, Michele, Hermínio, João Alves, Rafael, Ediane, Eduardo.

Aos companheiros e amigos do CEPRACO, Profa. Ms. Adriana Crespo, profa. Dra. Mara Carvalhaes, Erika, Camila, Marcus, Fernanda, Tariana, Daniel, pela amizade, carinho e paciência principalmente nas fases finais do mestrado.

Aos membros da coordenação do programa de pós-graduação em Medicina Tropical, à ex-coordenadora Regina Bringel, à atual coordenadora Maria de Fátima Costa Alves, ao secretário José Clementino e à Kariny Vieira, por estarem sempre prontos a nos atender.

À banca de qualificação: prof. Dr. Luiz Artur Mendes Bataus, profa. Dra. Ana Maria de Castro e profa. Dra. Maria de Fátima Costa Alves, pelas importantes contribuições, e aos suplentes profa. Rita Goretti Amaral, Mara Sílvia Carvalhaes e Flávia Aparecida de Oliveira.

À banca de defesa, profa. Dra. Irmtraut Araci Hoffman Pfrimer e profa. Dra. Maria de Fátima Costa Alves, por se disponibilizarem a contribuir com a conclusão desse mestrado, e pelos suplentes prof. Dr. Luiz Artur Mendes Bataus e profa. Dra. Flávia Aparecida de Oliveira.

À minha família, meus pais Manoel e Irene pelo apoio em todas as fases da minha vida, por sempre incentivarem meus estudos, pela luta que passaram para que eu chegasse até aqui, sem eles isto não seria possível. Ao meu irmão Fábio, pela confiança que sempre depositou em mim, pela atenção, preocupação e apoio, tão importantes nessa fase da minha vida. Agradeço-os por estarem ao meu lado sempre, mesmo privados da minha atenção devido ao tempo dedicado ao mestrado.

Aos meus amigos, àqueles que torceram por mim, que me deram força, que compreenderam a minha ausência durante o mestrado, que muitas vezes agüentaram o meu mau humor, meu estresse, mas mesmo assim demonstraram carinho e amizade. Em especial à Ariana (in memoriam), muito presente na fase inicial, e à Erika, mais presente nas fases finais dessa caminhada, e à Edilene, mesmo um pouco distante sempre me incentivando. Ao meu querido Henrique, pelos auxílios prestados, por sua presença acolhedora, pela atenção e carinho nessas etapas finais do mestrado.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho, o meu sincero agradecimento.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADCC – Citotoxicidade celular dependente de anticorpos

ADCI – "Antibody-dependent cellular inhibition"

ADE – "Antibody-dependent immune enhancement"

APC – "Antigen presenting cell" (Célula apresentadora de antígeno)

B7-1 – Ligante para CD28; molécula co-estimulatória para ativação de linfócito T

B7-2 – Ligante para CD28; molécula co-estimulatória para ativação de linfócito T

C – Cutânea

C3 – Terceiro componente do sistema complemento

C5 – Quinto componente do sistema complemento

C5b – Fragmento b do quinto componente do sistema complemento

C9 – Nono componente do sistema complemento

CD – "Cluster of differentiation" (Grupo de diferenciação)

CD40L – Ligante de CD40

Célula NK – Célula "natural killer"

CM – Cutâneo-mucosa

CR1 – Receptor para o sistema complemento tipo 1

CR3 – Receptor para o sistema complemento tipo 3

CR4 – Receptor para o sistema complemento tipo 4

CTLA-4 – Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

gp63 – Glicoproteína de superfície de 63 kDa

H – Histidina

HDT – Hospital de Doenças Tropicais

IFI – Imunofluorescência indireta

IFN-γ – Interferon γ

IgG – Imunoglobulina G

IL-10 – Interleucina 10

IL-10R – Receptor para Interleucina 10

IL-12 – Interleucina 12

IL-12R – Receptor para interleucina 12

IL-13 – Interleucina 13

IL-2 – Interleucina 2

IL-4 – Interleucina 4

IL-5 – Interleucina 5

ITAM – “Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs” (Motivos de ativação baseados em tirosina)

ITIM – “Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs” (Motivos inibidores baseados em tirosina)

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

M – Mucosa

MAC – Complexo de ataque à membrana

MSP2 – “Major Surface Protein 2”

NO – Óxido nítrico

PAS – Ácido periódico reativo de Schiff

PBS – “Phosphate buffer saline” (Salina tamponada com fosfatos)

PCR – Reação de polimerização em cadeia

PGE-2 – Prostaglandina E2

R – Arginina

RESA – “Ring-infected Erythrocyte Surface Antigen”

TGF-β – Fator de crescimento e tranformação β

Th1 – Linfócito T auxiliar tipo 1 (T “helper” 1)

Th2 – Linfócito T auxiliar tipo 2 (T “helper” 2)

TNF-α – Fator de necrose tumoral α

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo Biológico *da Leishmania sp*..... 4
Figura 2. Estrutura esquemática dos receptores Fcγ humanos..... 13
Figura 3. Diagrama esquemático da digestão enzimática alelo-específica para determinação do genótipo FcγRIIA – H/R131..... 29
Figura 4. Eletroforese em gel de agarose a 3%, demonstrando os padrões alélicos do receptor FcγRIIA – H/R131 de 13 indivíduos com LTA..... 31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Seqüências de primers que codificam um segmento gênico do receptor FcγRIIA, utilizados nas reações de PCR..... 28

ARTIGO:

Tabela 1. Características demográficas e clínicas dos pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana (n = 88), e dados demográficos dos indivíduos saudáveis do grupo controle (n = 98)..... 40
Tabela 2. Distribuição genotípica e freqüência alélica do FcγRIIA – H/R131 nos pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana e nos indivíduos saudáveis do grupo controle..... 42
Tabela 3. Distribuição genotípica e freqüência alélica do FcγRIIA – H/R131 de acordo com o tempo de resolução da doença..... 43

SUMÁRIO

RESUMO
ABSTRACT
1 INTRODUÇÃO..... 1
1.1 – *Leishmania*: Classificação e Ciclo Biológico..... 1
1.2 – Resposta Imune nas Diferentes Formas Clínicas da LTA..... 5
1.3 – Fatores que Podem Influenciar a Resposta Imune na Leishmaniose. 8
1.4 – Receptores Fcγ Humanos..... 10
1.5 – Participação dos Receptores Fcγ na Infecção Experimental por Leishmania..... 14
1.6 – O FcγRIIA: Diversidade Alélica e Participação nas Doenças Infecciosas..... 19

2 OBJETIVOS..... 24

3 MATERIAIS E MÉTODOS..... 25
3.1 – Indivíduos..... 25
3.2 – Aspectos Clínicos e Progressão da Doença..... 25
3.3 – Diagnóstico da LTA..... 26
3.4 – Determinação dos Padrões Alotípicos do FcγRIIA – H/R131..... 27
3.4.1 Extração do DNA genômico..... 27
3.4.2 Reação de polimerização em cadeia (PCR)..... 27
3.4.3 Digestão enzimática alelo-específica..... 28
3.4.4 Eletroforese em gel de agarose a 1% e 3%..... 29
3.4.5 Análises estatísticas dos dados..... 30

4 ARTIGO: Polimorfismo alélico do receptor FcγRIIA – H/R131na Leishmaniose Tegumentar Americana..... 33

5 CONCLUSÕES..... 53

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 54

7 ANEXOS..... 65

RESUMO

O FcγRIIA, receptor para região Fc de IgG, expresso por macrófagos, neutrófilos, plaquetas e células dendríticas, liga-se às subclasses de anticorpos IgG com afinidade variável, que pode ser influenciada pelo polimorfismo alélico no gene que codifica este receptor. A troca do aminoácido arginina (R) para histidina (H) na posição 131 determina três padrões alélicos: os homozigotos H/H e R/R e o heterozigoto H/R, conferindo ao FcγRIIA – H/H131 maior afinidade para as subclasses IgG2 e IgG3. Isto pode resultar em diferentes respostas frente a patógenos diversos. Alguns estudos demonstram a importância dos receptores Fcγ na infecção de macrófagos por formas amastigotas de *Leishmania sp*, em adição aos receptores para complemento (CR3) e para manose (MR). Além disso, vários fatores genéticos do indivíduo estão envolvidos na resposta imune à leishmaniose, dentre esses os FcγRs. Até o presente momento, não encontramos estudos relacionando o receptor FcγRIIA com a leishmaniose em humanos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo analisar o polimorfismo alélico no gene que codifica o receptor FcγRIIA em indivíduos com Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), avaliar se este polimorfismo seria um fator genético de susceptibilidade ou resistência para esta doença, se estaria influenciando no desenvolvimento das diferentes formas clínicas da LTA, bem como no tempo de cura das lesões. O polimorfismo do FcγRIIA – H/R131 foi analisado em 88 amostras sangüíneas de indivíduos com LTA e em 98 amostras de indivíduos saudáveis (grupo controle), através da PCR, amplificando um segmento do gene que codifica o FcγRIIA, seguida de digestão enzimática alelo-específica e eletroforese em gel de agarose 3%. Nossos resultados demonstraram que a distribuição genotípica e alélica do FcγRIIA - H/R131 foi similar nos pacientes com leishmaniose e no grupo controle, bem como nos pacientes com as diferentes formas clínicas da LTA. Em relação ao tempo de resolução da doença, nos pacientes que tiveram suas lesões curadas com até um mês de tratamento ou após esse período, houve um predomínio do alelo R e do H, respectivamente, entretanto essas diferenças não foram significativas. Assim, nosso estudo sugere que o polimorfismo alélico do FcγRIIA – H/R131 possivelmente não é um fator genético do hospedeiro que esteja associado com proteção ou patogênese na Leishmaniose Tegumentar Americana.

ABSTRACT

The FcγRIIA, receptor for the Fc portion of IgG, expressed by macrophages, neutrophils, platelets and dendritic cells, bind to the subclasses of IgG with variable affinity, that can be influenced by the polymorphism in the gene that encodes this receptor. The substitution of the amino acid arginine (R) for histidine (H), in the 131 position, defines three allelic patterns, the homozygote H/H, R/R and the heterozygote H/R, conferring to the FcγRIIA – H/H131 a greater affinity to the IgG2 and IgG3 subclasses. This can result in different responses to diverse pathogens. Studies show the importance of Fcγ receptors on the macrophage infection by amastigote forms of *Leishmania sp,* in addition to those for the complement (CR3) and for mannose (MR). Besides that, genetic factors related to the hosts are involved in the immune response to the leishmaniasis, among them, the FcγRs. Until this time, we haven't found studies relating the receptor FcγRIIA to the leishmaniasis in humans. This way, this work consists in analyzing the allelic polymorphism in the gene that encodes the FcγRIIA in individuals with American Tegumentary Leishmaniasis (ATL), evaluate if this polymorphism would be a genetic fact of susceptibility or resistance for this disease, if this would be influencing in the development of the different clinical forms of the ATL, as well in the healing process of the lesions. The FcγRIIA – H/R131 polymorphism was analyzed in 88 blood samples of individuals with leishmaniasis and in 98 samples of healthy individuals (control group), using PCR, amplifying a segment of the gene that encodes the FcγRIIA, followed by allele-specific enzymatic digestion and agarose gel eletrophoresis 3%. These results showed that the genotypic and allelic distribution of the FcγRIIA – H/R131 were similar in the patients with leishmaniasis and in the control group, as well in patients with different clinical forms of the ATL. Concerning the resolution time of the disease, among the patients that had their lesions healed within one month of treatment or after this period, there was a predominance of the alleles R and H, respectively, however these differences were not significant. This way, our study suggests that the allelic polymorphism of the FcγRIIA – H/R131 possibly is not a genetic factor of host that is associated to the protection or pathogenesis in the American Tegumentary Leishmaniasis.

1. INTRODUÇÃO

1.1 – *Leishmania:* Classificação e Ciclo Biológico

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes ao filo Sarcomastigophora, ordem Kinetoplastida e à família Trypanossomatidae. Esses parasitas são digenéticos, possuindo hospedeiros invertebrados representados por fêmeas de insetos hematófagos conhecidos como flebotomíneos (ordem Díptera, família Psycodidae, subfamília Phlebotominae, gênero *Lutzomia*), e hospedeiros vertebrados que incluem uma grande variedade de mamíferos, dentre eles o homem. Dessa forma, a LTA é tida como uma zoonose (Neves 2000).

A *Leishmania* possui duas formas principais: a promastigota, forma alongada com flagelo na porção anterior, encontrada no trato digestivo do inseto vetor; e a forma amastigota, arredondada ou oval, apresentando um flagelo curto que não se exterioriza. È um parasita intracelular obrigatório de células do sistema fagocítico mononuclear no hospedeiro vertebrado (Neves 2000). Além dessas, existem outras formas intermediárias da *Leishmania* presentes no vetor.

O ciclo biológico da *Leishmania sp* está esquematizado na **Figura 1**. O inseto vetor, ao picar o hospedeiro vertebrado ingere, juntamente com o sangue, amastigotas presentes no interior de macrófagos. Estes se rompem no trato digestivo do inseto, liberando as amastigotas, que se transformam em promastigotas e se dividem rapidamente por divisão binária. Estas formas podem estar livres ou fixadas às células do epitélio intestinal por hemidesmossomos. Em um estágio mais avançado as promastigotas se tornam paramastigotas, voltando posteriormente a promastigotas. Em seguida, elas migram para a região anterior do tubo digestivo, se diferenciando em promastigotas metacíclicas, estágio infectante do parasita.

Os flebotomíneos não sugam o sangue diretamente do vaso sangüíneo, mas fazem múltiplas picadas na pele, formando uma poça de sangue da qual eles se alimentam. No momento do repasto sangüíneo formas promastigotas metacíclicas

infectantes são regurgitadas no local (Handman & Bullen 2002). Imediatamente após a transmissão, antes da entrada nas células do hospedeiro, as promastigotas são expostas a componentes do soro incluindo proteínas do sistema complemento. Uma parte dos parasitas é lisada pelo complemento (Sacks & Perkins 1984), entretanto um número suficiente sobrevive, uma vez que apresentam uma resistência relativa à lise mediada pelo complemento. Isto possivelmente ocorre pela perda espontânea do complexo de ataque à membrana (MAC) C5b – C9 da superfície do parasita (Puentes et al. 1990). Além disso, formas infectantes da *Leishmania* também expressam uma serina/treonina proteína quinase (LPK-1) que inativa C3, C5 e C9 por fosforilação (Hermoso et al. 1991), evitando a lise. Os parasitas que escapam da lise no ambiente extracelular aderem rapidamente às células da linhagem monocítica residentes ou recrutadas da corrente sangüínea, incluindo células dendríticas (Blank et al. 1993; Moll et al. 1995). A ativação do complemento também leva ao acúmulo de neutrófilos e macrófagos no local da infecção (Marsella & Gopegui 1998).

As promastigotas podem ligar-se especificamente a receptores na membrana dos macrófagos sendo fagocitadas. Moléculas de superfície da *Leishmania* e vários receptores do macrófago estão envolvidos nesta interação. Acredita-se que as duas principais famílias de moléculas presentes na superfície das formas promastigotas, a glicoproteína 63 (gp63) e os fosfoglicanos sejam os principais ligantes para os macrófagos (Alexander & Russell 1992). A gp63 é uma zinco-metaloprotease distribuída abundantemente na superfície das promastigotas, porém não nas amastigotas (Handman & Bullen 2002). A família dos fosfoglicanos presentes na *Leishmania* compreende os glicolipídios, representados pelo lipofosfoglicano (LPG), e proteínas fosfoglicosiladas, como uma fosfatase ácida secretada e proteofosfoglicanos (PPG) (Handman & Bullen 2002), sendo o LPG o principal componente desta família. A ligação do parasita na superfície da célula pode ocorrer através de numerosos receptores. Os receptores para o complemento (CR1 e CR3) são considerados os mais importantes na interação com as formas promastigotas do parasita, sendo que os para manose (MR), e para fibronectina, o CR4 (receptor para o complemento) também estão envolvidos nesse tipo de interação (Alexander & Russell 1992).

A interação da *Leishmania* com os receptores celulares é seguida de internalização. Poucos minutos após a fagocitose, os parasitas são localizados no fagossoma, que é constituído pela própria membrana celular. O fagossoma então funde-se com lisossomas, dando origem ao fagolisossoma ou vacúolo parasitóforo (VP) (Solbach & Laskay 2000). Esse vacúolo é um compartimento ácido rico em peptídeos microbicidas e enzimas hidrolíticas (Antoine et. al. 1998). Dentro do VP, as promastigotas se transformam rapidamente em amastigotas, formas resistentes às substâncias líticas presentes no local, que se multiplicam, chegando a ocupar todo o citoplasma do macrófago, podendo promover o deslocamento do núcleo do centro para dar lugar ao vacúolo com as formas amastigotas (Neves 2000). A membrana do macrófago se rompe devido à quantidade de amastigotas em seu interior, lançando-as nas proximidades. Uma outra forma de liberação foi sugerida, em que as amastigotas podem recrutar a maquinaria exocítica da célula infectada, acumulando os vacúolos parasitóforos na periferia celular e liberando os parasitas por um processo semelhante à exocitose (Rittig & Bogdan 2000; Solbach & Laskay 2000). As amastigotas são então novamente internalizadas pelas células vizinhas.

O LPG está envolvido na internalização das promastigotas e das amastigotas, entretanto é muito menos expresso nesta última forma, sendo ausente em amastigotas de algumas espécies como a *Leishmania donovanni* (Ilgoutz & McConville 2001). Nas espécies deficientes de LPG, os PPGs podem ser importantes na internalização das formas amastigotas (Handman & Bullen 2002). Em relação ao hospedeiro, os receptores Fc para imunoglobulina G (FcγR), o CR3 e o MR, desempenham um papel importante na infecção dos macrófagos por formas amastigotas (Peters et al. 1995).

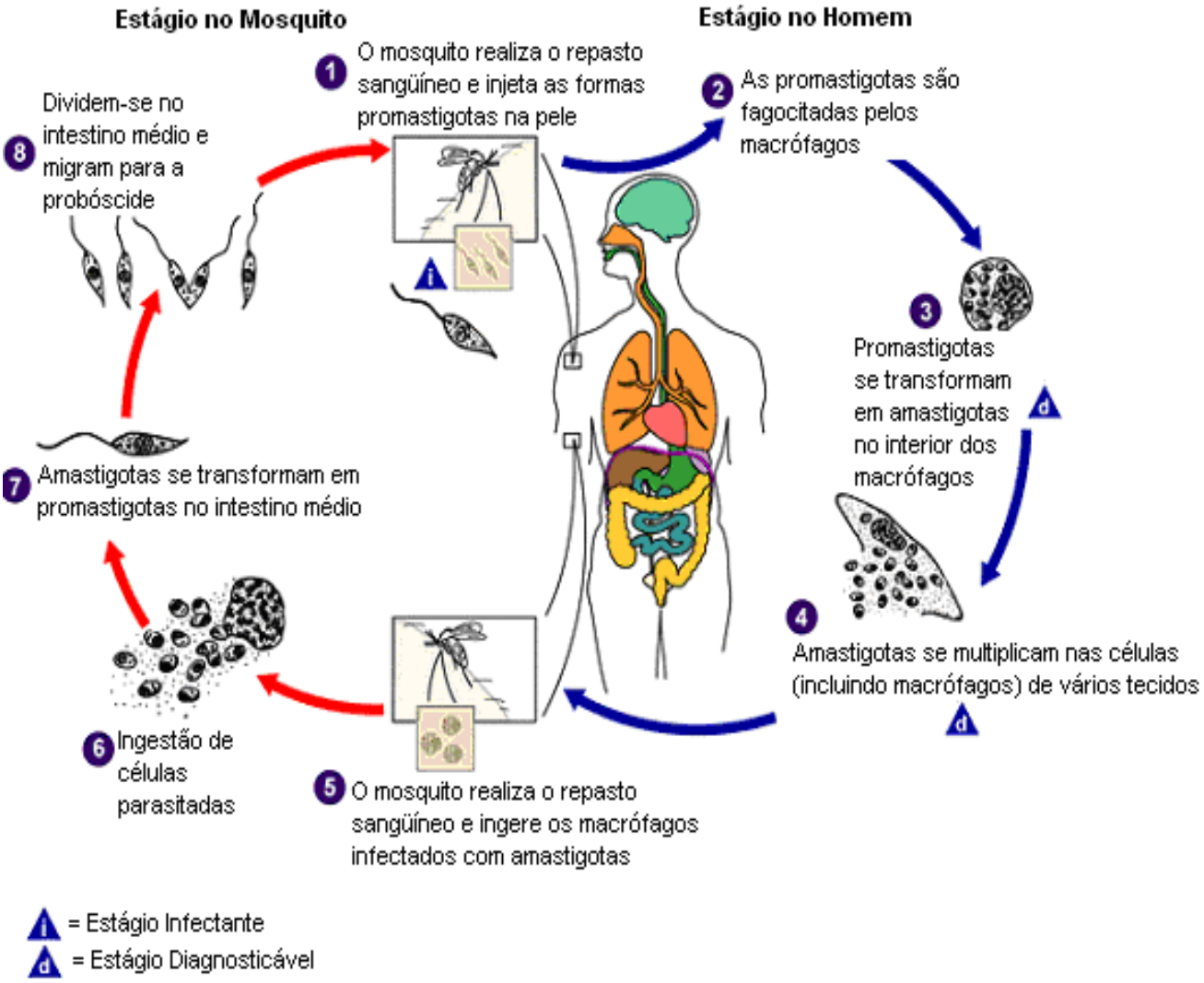


Figura 1. Ciclo biológico da *Leishmania sp*.

(Fonte: http://it.wikipedia.org/wiki/Immagine:Leishmania_LifeCycle.gif)

Acesso em 09/10/2006.

1.2 – Resposta Imune nas Diferentes Formas Clínicas da LTA

As formas clínicas da LTA podem ser classificadas em cutânea, mucosa ou cutâneo-mucosa e difusa, podendo variar desde uma lesão cutânea única que se resolve naturalmente até lesões destrutivas e desfigurantes. A forma cutânea representa aproximadamente 90% dos casos de leishmaniose. Esta é considerada a forma mais branda, e caracteriza-se normalmente por lesões ulceradas em sua maioria, ou mais raramente verrucosas, que se desenvolvem dentro de semanas ou meses após a picada do inseto vetor. Geralmente as lesões são únicas (forma cutânea localizada), mas podem apresentar-se com múltiplas lesões, que são resultantes da disseminação linfática ou hematogênica (forma cutânea disseminada). Geralmente os sintomas sistêmicos são ausentes, e se não tratadas as lesões podem persistir por meses ou anos, podendo então cicatrizar-se espontaneamente (von Stebut & Udey 2004).

A forma cutâneo-mucosa (ou mucosa) é caracterizada por lesões mucosas agressivas que aparecem normalmente meses ou anos após a lesão inicial cutânea, por extensão direta da lesão primária ou por disseminação hematogênica (Neves 2000). Essas lesões podem atingir mucosas e cartilagens, do nariz, boca, faringe, laringe e traquéia (Amato et al. 2003). Iniciam-se com eritema e coriza constante e posteriormente apresentam processo ulcerativo, podendo levar a grave destruição do trato respiratório superior atingindo os lábios e se propagando pela face (Neves 2000).

Na forma cutânea difusa lesões papulares ou nodulares contendo grande quantidade de parasitas se encontram espalhadas por toda a pele. Esta forma clínica é causada predominantemente por *L. amazonensis* (Pinheiro et al. 2004). A infecção é iniciada por lesão ulcerada única, e posteriormente múltiplas lesões se desenvolvem devido a migração de macrófagos infectados ou disseminação do parasita através de vasos linfáticos. O desenvolvimento desta forma clínica está intimamente relacionado a deficiência na imunidade celular, podendo persistir por toda a vida do indivíduo (Convit et al. 1972; Castes & Tapia 1998).

Muitos fatores estão envolvidos na diversidade das formas clínicas e na gravidade da leishmaniose, tais como: o grande número de espécies de *Leishmania* e de variações intra-espécies, o estado de saúde geral e a constituição genética do hospedeiro, bem como sua resposta imune (Rogers et al. 2002; Rivas et al. 2004). Assim, podemos observar que uma complexa resposta imune está envolvida nas diferentes formas clínicas dessa doença.

Na leishmaniose cutânea as citocinas produzidas por linfócitos T auxiliares tipo 1 (Th1), interleucina-2 (IL-2), interferon-γ (IFN-γ), fator de necrose tumoral-α (TNF-α) predominam em relação ao padrão de citocinas produzidas por linfócitos T auxiliares tipo 2 (Th2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-13 (IL-13) (Caceres-Dittmar et al.1993; Pirmez et al. 1993; Tapia et al. 1993; Louzir et al. 1998). A grande quantidade dessas citocinas provavelmente contribui para a eficiente eliminação dos parasitas (Pirmez et al. 1993). O IFN-γ aumenta a produção de óxido nítrico (NO), cuja importância para a destruição da *Leishmania sp* já foi comprovada em modelos de leishmaniose murina (Liew et al. 1990), mas não está claro na leishmaniose humana (Vieira et al. 2002). Diferentemente Bourreau et al. (2003) demonstraram que a presença de IL-13 e IL-4 no sítio e durante o início de desenvolvimento da lesão determinou o desenvolvimento de lesões de tamanho menor quando comparadas às de pacientes que apresentavam citocinas do padrão Th1, o que sugere um papel imunorregulatório das citocinas Th2 nas fases iniciais da doença, evitando o desenvolvimento de uma resposta inflamatória exacerbada. Resultados semelhantes foram encontrados por Rocha et al. (1999), com maior produção de interleucina-10 (IL-10) em relação ao IFN-γ nos estágios iniciais da doença, e uma troca do perfil de citocinas com predomínio das pró-inflamatórias ao longo da evolução da doença. Assim, o desenvolvimento da resposta Th1 nas fases seguintes com produção de IFN-γ e TNF-α, poderia levar à ativação eficiente de macrófagos, a destruição dos parasitas e uma tendência para a resolução da lesão (Coutinho et al. 1996).

A forma clínica mucosa é caracterizada por uma resposta imune celular exacerbada (Bacellar et al. 2002). Análises microscópicas das lesões demonstram uma reação inflamatória intensa, com predomínio de linfócitos e macrófagos com pouco ou nenhum parasita encontrado (Bittencourt & Barral 1991). Enquanto alguns

estudos sugerem que a forma mucosa pode representar uma reação de hipersensibilidade a infecção por *Leishmania* (Azulay & Azulay Jr 1995), outros revelam um padrão misto de citocinas do tipo Th1 e Th2 no sítio da lesão, com expressão aumentada de RNA mensageiro (RNAm) para IFN-γ, TNF-α e IL-4 e em menor quantidade RNAm para IL-10 e IL-5 (Pirmez et al. 1993). Ao contrário, Bacellar et al. (2002) demonstraram um aumento da produção de IFN-γ e TNF-α, e reduzida produção de IL-10, o que poderia contribuir para a gravidade desta forma clínica. Entretanto, este trabalho não avaliou a produção de IL-4, que foi a citocina Th2 encontrada em maior quantidade no estudo realizado por Pirmez et al. (1993). Esses autores avaliaram a expressão do RNA mensageiro das citocinas no local das lesões, diferentemente de Bacellar et al. (2002), que dosaram as citocinas produzidas por linfócitos de sangue periférico de pacientes com a forma mucosa sob estímulo *in vitro* com antígenos de *Leishmania*. Em conjunto esses resultados sugerem que a produção elevada das citocinas pró-inflamatórias, IFN-γ e TNF-α, não leva necessariamente à completa eliminação dos parasitas, persistindo um pequeno número de formas amastigotas mesmo após a cura das lesões. Sendo que, ao contrário, a produção elevada dessas citocinas pode ser prejudicial ao organismo, uma vez que na forma mucosa, forma mais grave da doença, há uma forte resposta Th1 impropriamente modulada. A IL-4 produzida no local da lesão parece ser insuficiente para bloquear a produção das citocinas Th1 ou mesmo para modular esta resposta, entretanto, poderia suprimir parcialmente os efeitos do IFN-γ, o que explicaria a permanência dos parasitas, contribuindo para a cronicidade e injúria tecidual, que são características desta forma clínica (Pirmez et al. 1993).

Algumas hipóteses poderiam explicar a produção e a resposta reduzida a IL-10 na leishmaniose mucosa. Uma delas é que em altas concentrações de IFN-γ , há uma regulação negativa na expressão do receptor para interleucina-10 (IL-10R) em linfócitos, prejudicando os efeitos moduladores da IL-10 (Liu et al. 1994). Outra é que a secreção aumentada de outras citocinas pró-inflamatórias pode também regular negativamente a produção do IL-10R (Bacellar et al. 2002). Assim, embora a resposta do tipo Th1 seja geralmente protetora na leishmaniose, uma modulação inadequada desta resposta poderia levar a uma reação exacerbada, constituindo um mecanismo importante na patogênese da leishmaniose do tipo mucosa.

A leishmaniose cutânea difusa apresenta muitas similaridades com a doença grave desenvolvida em linhagens de camundongos susceptíveis a leishmania, como no BALB/c. Em ambos os casos a resposta imune celular é deficiente, com ausência de resposta de hipersensibilidade tardia, sendo caracterizada pela produção de citocinas do tipo Th2 e níveis reduzidos de citocinas do padrão Th1, com conseqüente inibição da ativação de macrófagos, levando a uma acentuada proliferação de formas amastigotas em seu interior (Castes et al. 1984; Carvalho et al. 1985). Caceres-Dittmar et al. (1993), em um estudo avaliando a expressão do RNAm de citocinas no local das lesões observaram que na leishmaniose difusa a maioria das células T presentes secreta uma mistura de citocinas do padrão Th1 e Th2, com predomínio das citocinas do tipo 2 (IL-4, IL-5 e IL-10).

1.3 – Fatores que Podem Influenciar a Resposta Imune na Leishmaniose

Um dos melhores modelos para estudar a resposta imune na leishmaniose experimental é a infecção de camundongos com *Leishmania major*. A maioria das linhagens de camundongos, como o C57BL/6, C3H e CBA, quando infectadas com *L. major* desenvolvem doença cutânea localizada, sendo a resolução da infecção mediada por células Th1 (Rogers et al. 2002). Estas células produzem IFN-γ, citocina que induz a produção de NO por fagócitos, principalmente macrófagos, levando a destruição dos parasitas (Rogers et al. 2002). Outras linhagens, como o BALB/c, desenvolvem uma resposta Th2, produzindo IL-4 que regula negativamente a expressão da subunidade β2 do receptor para IL-12 (IL-12R) em células T, citocina fundamental para o desenvolvimento da resposta Th1. Assim, as células não respondem a IL-12, inibindo a produção de IFN-γ e NO, prejudicando a eliminação dos parasitas pelos macrófagos (Rogers et al. 2002). Entretanto, mesmo camundongos BALB/c deficientes em IL-4 continuam suscetíveis à infecção (Noben-Trauth et al. 1996), demonstrando que a suscetibilidade à leishmaniose é determinada por múltiplos fatores.

Além do IFN-γ, e IL-4, outras citocinas são importantes no desenvolvimento da resposta imune à leishmaniose, podendo determinar a polarização da resposta de células Th, com algumas induzindo uma resposta Th1, protetora na leishmaniose,

e outras participando do desenvolvimento e fase efetora da resposta Th2. A IL-12, produzida por células apresentadoras de antígenos, principalmente células dendríticas, induz a produção de IFN-γ por células T e NK ("natural killer"), sendo fundamental para a indução da resposta Th1. O TNF-α também desempenha um papel importante na leishmaniose, participando da ativação de macrófagos, aumentando a produção de NO e contribuindo para a eliminação do parasita (Rogers et al. 2002). Tem sido demonstrado que o TNF-α é crítico para a resolução da infecção por *L. major*, uma vez que a ausência desta citocina em camundongos nocautes infectados é fatal (Wilhelm et al. 2001). O fator de crescimento e transformação-β (TGF-β) e IL-10 podem inibir a produção de IFN-γ, conseqüentemente prejudicando a ativação de macrófagos, tornando-os mais permissivos a infecção por *Leishmania* (Barral-Netto et al. 1992). Entretanto, alguns estudos sugerem que a IL-10 é importante para controlar a produção excessiva de IFN-γ e os danos teciduais que podem ocorrer em uma resposta Th1 exacerbada (Soares et al. 1997). Na leishmaniose humana, a cura tem sido relacionada com a produção de IFN-γ (Rogers et al. 2002), e a IL-10 com o prolongamento do curso da doença (Coutinho et al. 1996; Kemp 1997; Louzir et al. 1998)

Em um estudo realizado com biópsias de pacientes infectados com *Leishmania guyanensis* apresentando a forma cutânea da doença, foi observado um transitório predomínio da resposta Th2, com produção de IL-4 e interleucina-13 (IL-13) no sítio da lesão durante a fase inicial da infecção, seguido pelo desenvolvimento da resposta Th1 nas fases tardias de desenvolvimento da lesão, com predomínio de IFN-γ nestes sítios. Nesse estudo foi demonstrado que o tempo de desenvolvimento da lesão foi menor em biópsias com predomínio de citocinas Th2 no início da infecção, do que naquelas com predomínio de citocinas Th1, sendo que naquelas com tempo de desenvolvimento de lesão intermediário houve expressão equivalente de citocinas Th1 e Th2 (Bourreau et al. 2003). Isto pode ser importante, uma vez que citocinas Th2, que apresentam propriedades antiinflamatórias, podem limitar o desenvolvimento da lesão, permitindo eliminação dos parasitas quando a resposta Th1 se desenvolver (Paul & Seder 1994; Abbas et al. 1996). Coutinho et al. (1996) em um estudo realizado com linfócitos de sangue periférico de pacientes com leishmaniose cutânea, observaram a produção de IFN-γ, IL-2 e IL-4, um padrão misto de citocinas Th1 e Th2, durante a fase ativa da doença. Nas fases de cura da lesão níveis aumentados de IFN-γ e baixos de IL-4 foram

observados. Assim, o papel das citocinas Th2 no desenvolvimento da leishmaniose precisa ser melhor elucidado.

Tem-se demonstrado o papel das moléculas co-estimulatórias na resposta imune à leishmaniose. Camundongos deficientes em CD40 e CD40L são altamente suscetíveis à infecção por *L. major* (Campbel et al. 1996; Kamanaka et al. 1996). O papel das moléculas B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) na imunidade à *L. major* também tem sido demonstrado. Enquanto a ação dessas duas moléculas estimula a produção de IFN-γ, B7-2 sozinha estimula a produção de IL-4 (Mbow et al. 2001). Em células mononucleares procedentes do sangue periférico de indivíduos saudáveis, expostos a *Leishmania major* in vitro, o bloqueio das moléculas CD80 e/ou CD86 interferiu na produção de IFN-γ por células T e IL-12 por macrófagos infectados (Brodskyn et al. 2001). A interação entre B7 (CD86 e CD80) e CD28 parece não influenciar muito o resultado da infecção por *L. major* em camundongos (Rogers et al. 2002), entretanto as interações entre as moléculas B7 e CTLA-4 parecem ser importantes, com estudos em murinos, sugerindo papéis diversos do CTLA-4 na infecção, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida, dos fatores genéticos do hospedeiro e do estado de ativação da célula T (Gomes & DosReis 2001). Alguns trabalhos também têm mostrado a importância da molécula co-estimulatória OX40 no desenvolvimento de células Th2 (Akiba et al. 2000), e B7-DC, molécula expressa exclusivamente por células dendríticas, como importante para a produção de IFN-γ na leishmaniose (von Stebut et al. 2000).

1.4 – Receptores Fcγ Humanos

Os FcγRs são receptores de superfície celular que se ligam à porção Fc de anticorpos IgG, expressos na maioria das células do sistema imune (Cohen-Solal et al. 2004). Esses receptores pertencem em sua maioria à superfamília das imunoglobulinas, e consistem em um grupo de proteínas integrantes de membrana, constituídos de um domínio extracelular de ligação a IgG, uma região transmembrana e uma cauda citoplasmática. Além disso, podem se apresentar como moléculas solúveis com região transmembrana ausente (van de Winkel &

Capel 1993). Há três tipos de FcγRs: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) e FcγRIII (CD16), cada um destes apresentando diferentes isoformas, e o FcγRIV, recentemente descrito no modelo murino (Nimmerjahn et al. 2005). Em geral esses receptores são heterodiméricos, constituídos por uma cadeia α, que apresenta extensa porção extracelular e reduzida cauda citoplasmática, sendo esta cadeia responsável pela ligação à região Fc das imunoglobulinas. A cadeia γ, que se associa não covalentemente à cadeia α, é necessária para a transdução de sinais, sendo comum em diferentes receptores, como FcγRI, FcγRIII e FcεRI (van de Winkel & Capel 1993). A exceção são os receptores FcγRII (A, B e C), monoméricos, com cadeia única, responsável pela bifuncionalidade do receptor, o reconhecimento da porção Fc de IgG e pela transdução de sinais (Gerber & Mosser 2001). As estruturas dos diferentes FcγRs humanos estão esquematicamente representadas na **Figura 2.**

Os receptores FcγRII e FcγRIII ligam a IgG monomérica de forma ineficiente, mas ligam-se a imunocomplexos com alta afinidade. Diferentemente o FcγRI liga-se com alta afinidade a IgG monomérica, mas nenhum sinal é gerado, a menos que haja uma ligação desses anticorpos com antígenos poliméricos (Amigorena 2002). Após interação com a IgG, os FcγRs podem gerar sinais ativadores ou inibidores nas células que os expressam. Dentre os receptores ativadores incluem- se os FcγRI, FcγRII (A e C) e FcγRIII, os quais são caracterizados pela presença de motivos de ativação baseados em tirosina (ITAMs – "immunoreceptor tyrosine-based activation motifs"), que são domínios localizados na cauda intracitoplasmática do receptor, e responsáveis pela transdução de sinais para o interior da célula. Já os receptores FcγRIIB, possuem nessa região citoplasmática os motivos inibidores baseados em tirosina (ITIMs – "immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif"), que desencadeiam sinais intracelulares capazes de inibir a ativação celular (Gerber & Mosser 2001). Alguns FcγRs apresentam polimorfismo alélico, gerando isoformas que diferem quanto ao peso molecular, a distribuição celular e a afinidade de ligação às subclasses de IgG, podendo este polimorfismo estar envolvido em diferentes respostas frente a diversos patógenos.

Os receptores Fcγ atuam promovendo uma ligação entre a imunidade celular e humoral (Van de Winkel & Capel 1993). A principal função dos FcγRs é a ativação

de células acessórias, o que os tornam essenciais na defesa do organismo contra infecções (Omi et al. 2002). A ligação dos receptores Fc a patógenos opsonizados por imunoglobulinas pode ativar os fagócitos, resultando na ativação de várias enzimas, as tirosinas-quinases, desencadeando uma variedade de respostas biológicas, tais como: fagocitose, endocitose, citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), liberação de mediadores inflamatórios, aumento da apresentação de antígenos (van de Winkel & Capel 1993), transcrição de genes de citocinas (Ravetch & Bolland 2001), aumento da explosão respiratória (Daëron 1997), dentre outras.

As respostas biológicas desencadeadas pelos receptores Fc ativadores parecem depender mais do tipo celular que os expressam do que do tipo de receptor. Diferentes receptores Fc com propriedades ativadoras desencadeiam as mesmas respostas quando expressos no mesmo tipo celular. Contudo, quando expresso em diferentes tipos de células, o mesmo receptor desencadeia diferentes respostas, caracterizando respostas celulares tipo-específicas. Conseqüentemente, as respostas biológicas são principalmente determinadas pela especificidade tecidual dos receptores Fc (Daëron 1997).

Alguns FcγR humanos apresentam homólogos em camundongos. Assim, os FcγR humanos: FcγRIA, FcγRIIB e FcγRIIIA apresentam isoformas similares em camundongos. Os receptores FcγRIIA, FcγRIIC e FcγRIIIB humanos, entretanto, não possuem formas homólogas em camundongos (Pleass & Woof 2001).

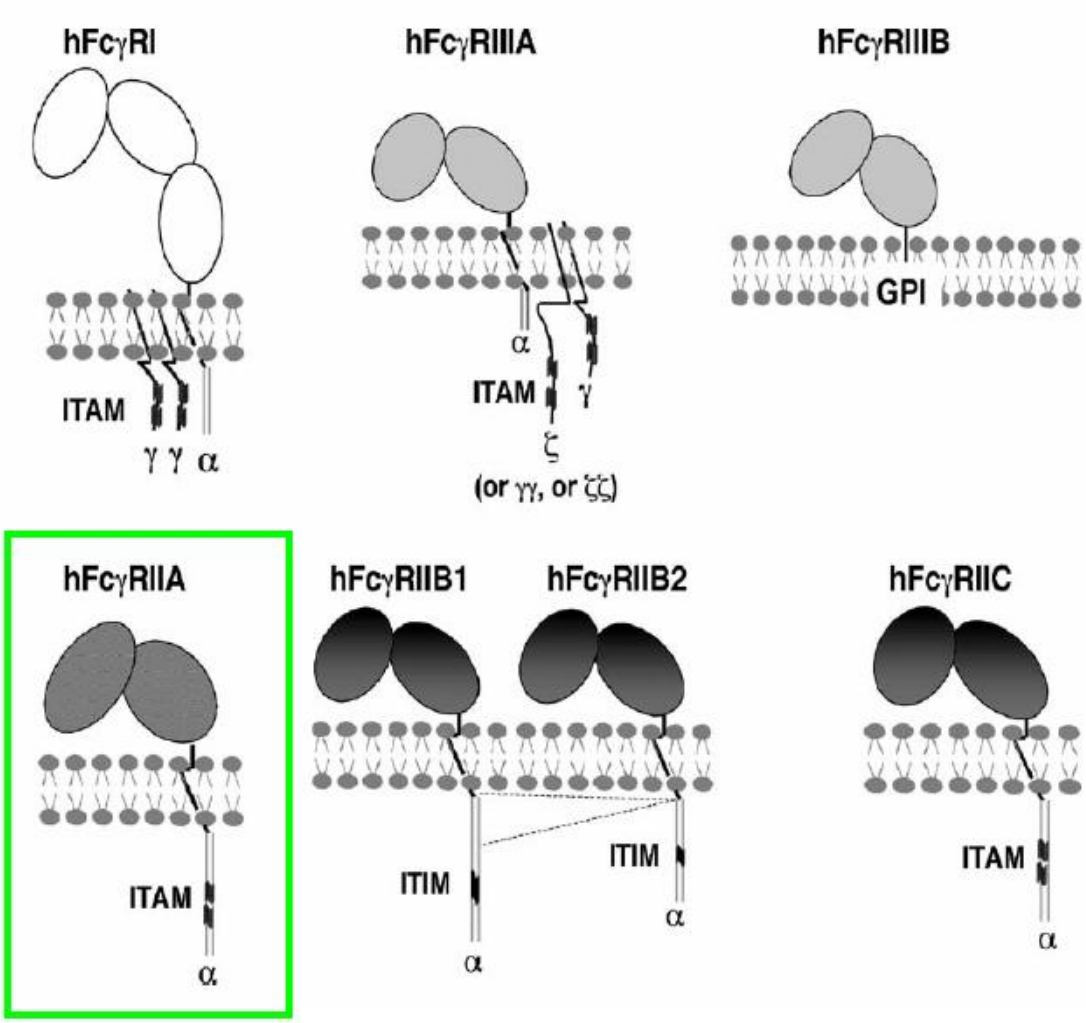


Figura 2. Estrutura esquemática dos receptores Fcγ humanos. Em destaque temos o receptor FcγRIIA. (Extraído de Sibéril et al. 2006).

1.5 – Participação dos Receptores Fcγ na Infecção Experimental por *Leishmania*

Vários receptores de superfície celular podem estar envolvidos na fagocitose da leishmania. Esta se liga ao macrófago diretamente ou por mecanismos de opsonização específica (Peters et al. 1995). O reconhecimento direto da leishmania consiste em uma forma de escape, pois nesse caso o mecanismo microbicida de explosão respiratória dos macrófagos não é ativado (Neves 2000). O mecanismo de opsonização específica envolve proteínas do sistema complemento e FcγRs. A internalização de formas promastigotas por macrófagos pode ser mediada por receptores para o sistema complemento CR1, CR3 (Handman & Bullen 2002) e CR4, bem como por receptores para manose e fibronectina (Alexander & Russel 1992). Os receptores envolvidos na ligação das formas amastigotas com os macrófagos não estão tão bem definidos, mas os principais receptores envolvidos são os FcγR, CR3 e MR (Peters et al. 1995). Um estudo realizado por Woelbing et al. (2006) com *L. major*, sugere que células dendríticas e macrófagos usam diferentes receptores para o reconhecimento e a ingestão da *Leishmania*. De acordo com esses autores a internalização da *Leishmania* por células dendríticas necessita da opsonização com anticorpos IgG envolvendo receptores Fcγ, e sugerem que os receptores CR3 e CR4 parecem ser dispensáveis, embora Blank et al. (1993) sugerem que o CR3 medeie a internalização de amastigotas de *L. major* por células de Langerhans.

As formas promastigotas ficam por curto período de tempo no hospedeiro mamífero após serem transmitidas pelo inseto vetor, sendo rapidamente internalizadas por fagócitos, se transformando em amastigotas. Estas são as únicas formas que permanecem no hospedeiro mamífero (Kane & Mosser 2001).

Diversos estudos têm demonstrado o papel dos receptores Fcγ na internalização de formas amastigotas, a maioria deles relacionando esta função com a exacerbação da doença. Kima et al. (2000) demonstraram que camundongos BALB/c nocautes para a cadeia γ, e camundongos alterados geneticamente sem anticorpos circulantes, quando infectados com *L. amazonensis* ou *L. pifanoi* desenvolveram lesões menores do que os camundongos normais. A transferência

de soro de camundongos imunes contendo anticorpos anti-*Leishmania* para os camundongos deficientes de anticorpos, mas com expressão normal de FcγR, reproduziu lesões maiores, como aquelas desenvolvidas pelos camundongos normais. Esse estudo sugere a participação dos anticorpos IgG e dos FcγR na patogênese da doença, contribuindo para a susceptibilidade de camundongos da linhagem BALB/c às espécies *L. pifanoi* e *L. amazonensis.* (Kima et al. 2000)

Similarmente, Miles et al. (2005) observaram o desenvolvimento de lesões menores nos camundongos BALB/c infectados com *L. major* e deficientes em anticorpos, a presença reduzida de parasitas nessas lesões comparada ao tamanho e número de parasitas presentes nas lesões apresentadas pelos camundongos do tipo selvagem. Esses autores demonstraram ainda que o mecanismo de exacerbação da doença com desenvolvimento de lesões maiores favorecidas pelos anticorpos circulantes ocorre pela produção aumentada de IL-10 comparada a IL-12, por macrófagos ativados. Os ensaios "in vitro" mostraram que células T cultivadas com macrófagos derivados da medula óssea e infectados com formas amastigotas procedentes das lesões, produziram predominantemente IL-4 com reduzidos níveis de IFN-γ, diferentemente dos macrófagos estimulados com ovalbumina, que produziram primariamente IFN-γ.

Kane & Mosser (2001) também observaram produção aumentada de IL-10 por macrófagos infectados com amastigotas opsonizadas com IgG. Como conseqüência a IL-10 inibe a produção de IL-12 e TNF-α por esses macrófagos e impede que eles sejam ativados pelo IFN-γ, não conseguindo restringir o crescimento dos parasitos em seu interior. Os mesmos efeitos não foram observados com macrófagos de camundongos nocautes para a cadeia γ dos receptores Fcγ. Assim, a presença de citocinas antiinflamatórias no meio pode inibir o desenvolvimento da resposta imune Th1 (Kane & Mosser 2001), que é protetora na leishmaniose. Dessa forma, anticorpos IgG em conjunto com os FcγR, poderiam estar contribuindo para a progressão da doença.

Em estudos realizados por Buxbaum & Scott (2005) utilizando camundongos C57BL/6 infectados com *L. mexicana,* foi demonstrado que amastigotas

opsonizadas com anticorpos induziram a produção de IL-10 por macrófagos in vitro, sugerindo que a interação entre o patógeno opsonizado e os receptores Fcγ desencadeia a produção de IL-10. Além disso, células dos linfonodos de camundongos nocautes para a cadeia γ dos FcRs produziram maior quantidade de IFN-γ e menor de IL-10 comparadas às células de linfonodos de camundongos C57BL/6 normais, e aqueles camundongos foram capazes de resolver a lesão. Esse estudo em camundongos C57BL/6, cujos níveis de anticorpos são bem menores comparados aos produzidos por camundongos BALB/c em resposta a infecção por *Leishmania*, demonstra que os FcγRs e os anticorpos IgG também contribuíram para a susceptibilidade à leishmaniose. Em conjunto estes estudos demonstram que o fenômeno de patogênese associado aos anticorpos IgG e FcγRs são independentes da linhagem de camundongos e das espécies de *Leishmania.*

Padigel & Farrel (2005) também demonstraram que camundongos BALB/c FcγR$^{-/-}$ controlam a infecção por *L. major*. Segundo este trabalho células de linfonodos de camundongos BALB/c normais, comparados aos FcγR$^{-/-}$ produziram maior quantidade de IL-10 e níveis semelhantes de IFN-γ, apresentaram um número maior de células secretando IL-4 e número comparável de células secretoras de IL-12 em ambos os grupos, sugerindo que na ausência de envolvimento dos receptores Fcγ há diminuição da produção de citocinas Th2 sem o aumento concomitante de citocinas Th1. Além disso, no sítio da lesão, observou-se maior produção de IL-10 e TGF-β em camundongos que possuíam os FcγRs normais, sugerindo que a sinalização através da cadeia γ pode exercer um papel importante na produção dessas citocinas no local da infecção, podendo explicar o fato desses camundongos FcγR$^{-/-}$ resolverem a infecção mesmo sem o aumento das citocinas do padrão Th1. No soro desses camundongos nocautes, foi observado também níveis reduzidos de IgG1 e maiores de IgG2a, isótipo cuja produção é dependente de IFN-γ, sugerindo dominância da resposta Th1 nesses camundongos durante a infecção, talvez mais por inibição da resposta Th2 do que por estimulação direta de Th1.

Com base nos estudos citados podemos observar que a exacerbação da leishmaniose associada à participação dos receptores Fcγ está relacionada à produção aumentada de IL-10, entretanto este não é o único mecanismo envolvido.

Buxbaum & Scott (2005) demonstraram que camundongos C57BL/6 FcγR$^{-/-}$ e IL-10$^{-/-}$ infectados por *L. mexicana* são capazes de resolver as lesões e controlar o número de parasitas na lesão, entretanto os camundongos FcγR$^{-/-}$ apresentaram um número menor de parasitas e suas células responderam melhor ao IFN-γ. Esses resultados sugerem que mecanismos dependentes e independentes de IL-10 podem resultar da sinalização através dos FcγRs, resultando na capacidade reduzida do hospedeiro em controlar a infecção. Os mecanismos independentes de IL-10 podem ser mediados por TGF-β ou PGE2, ambos envolvidos no aumento da susceptibilidade a *Leishmania* (Farrel & Kirkpatrick 1987; Barral-Netto et al. 1992; Li et al. 1999; Gorelik et al 2002) e produzidos por monócitos após ligação de imunocomplexos aos FcγRs (Rouzer et al. 1980; Kanto et al. 1998). Entretanto esses mecanismos independentes de IL-10 parecem não ser suficientes para a cura das lesões (Buxbaum & Scott 2005). Outras citocinas como a IL-4 bem como outros fatores poderiam também estar envolvidos.

É interessante notar que macrófagos de camundongos FcγR$^{-/-}$ não apresentam menor capacidade de fagocitar leishmanias, apresentando quantidades de parasitas no interior dos macrófagos comparáveis às encontradas em camundongos do tipo selvagem, sugerindo que a falta desses receptores não prejudica a internalização desses parasitas (Padigel & Farrell 2005; Buxbaum & Scott 2005).

Woelbing et al. (2006) demonstraram em um estudo realizado em camundongos infectados com *L. major*, que células B, anticorpos IgG e os receptores Fcγ presentes nas células dendríticas são importantes para o desenvolvimento da imunidade protetora. De acordo com este trabalho, a internalização de amastigotas ou promastigotas opsonizadas com anticorpos IgG induziu aumento na produção de IL-12 por células dendríticas, o que não ocorreu com macrófagos. Camundongos infectados com parasitas opsonizados após tratamento com soro imune (contendo anticorpos específicos), desenvolveram lesões menores e mostraram uma menor carga parasitária, quando comparados àqueles infectados com parasitas tratados com soro normal (não contendo anticorpos específicos). O desenvolvimento de lesões menores associa-se com o

predomínio de IFN-γ sobre IL-4, sugerindo que a internalização de *L. major* por células dendríticas na presença de anticorpos IgG leva a um aumento da resposta Th1 e ao desenvolvimento de lesões menores. Resultados semelhantes foram obtidos em camundongos μMT, que são deficientes em células B e não produtores de anticorpos, quando infectados com parasitas opsonizados com IgG. As células dendríticas internalizaram maior quantidade de parasitas opsonizados, aumentando a ativação de células T, em comparação aos parasitas não opsonizados. Além disso, camundongos C57BL/6 $Fc\gamma^{-/-}$ desenvolveram lesões maiores e carga parasitária maior quando comparados aos controle do tipo selvagem. Esse estudo também demonstrou que células dendríticas internalizam *L. major* predominantemente através dos receptores FcγR (FcγRI e FcγRIII), sendo a ligação a esses receptores associada com a ativação dessas células e liberação de IL-12, o que está de acordo com outros estudos (Regnault et al. 1999; Sedlik et al. 2003; Amigorena 2002).

Apesar de inúmeros estudos apontarem para o papel dos FcγR na exacerbação da leishmaniose, Woelbing et al. (2006) demonstraram que esses receptores são importantes para o desenvolvimento da imunidade protetora. Entretanto devemos considerar que os estudos foram realizados com diferentes células: macrófagos e células dendríticas. Essas duas APCs participam do reconhecimento e internalização da *Leishmania* através de diferentes receptores, como proposto por esse autor. Enquanto macrófagos utilizam principalmente o CR3, os FcγRs são mais importantes nas células dendríticas, e isto leva a resultados diferentes, com o aumento da produção de IL-12 por células dendríticas, e de IL-10 por macrófagos. O equilíbrio entre esses diferentes receptores e a geração de mecanismos pró e antiinflamatórios envolvendo macrófagos e células dendríticas é crítico para o resultado da doença (Woelbing et al. 2006).

1.6 – O FcγRIIA: Diversidade Alélica e Participação nas Doenças Infecciosas

O FcγRII humano é codificado por três genes que codificam as diferentes subclasses do FcγRII: A, B, C. As variações presentes em cada um deles resultam em seis transcritos diferentes (FcγRIIa1, a2, b1, b2, b3 e c) (Metes et al. 1998). Os receptores FcγRIIA e FcγRIIC, quando estimulados, sob agregação, por partículas ou por células revestidas com anticorpos citofílicos (IgG1 e IgG3), podem induzir um sinal de ativação para os fagócitos. Já o FcγRIIB gera sinais inibidores nas células que os expressam (Gerber & Mosser 2001).

O receptor FcγRIIA, expresso por macrófagos, neutrófilos, plaquetas, monócitos e células dendríticas (Pleass & Woof 2001), tem a capacidade de ligar-se à IgG1 e à IgG3 humanas, não se ligando à IgG2 nem à IgG4. Entretanto, um polimorfismo alélico no gene que codifica este receptor gera diferentes isoformas que podem alterar esta característica. A diferença em um único nucleotídeo na base 494 (A ou G) resulta em duas formas codominantemente expressas do FcγRIIA, que diferem no aminoácido na posição 131 (Moens et al. 2006). O FcγRIIA – R131, com o códon CGT codifica o aminoácido arginina; e FcγRIIA – H131, apresenta o aminoácido histidina que é codificado pelo códon CAT (Norris et al. 1998). A isoforma FcγRIIA – H131 liga-se eficientemente à IgG2 humana, conferindo à IgG2 portanto a propriedade de citofilia, o que não ocorre com a isoforma FcγRIIA – R131. Além disso, foi demonstrado que a isoforma H131 tem afinidade aumentada para a IgG3 humana (Clark et al. 1991; Warmerdam et al. 1991, Parren et. al., 1992; Tate et al., 1992). Enquanto a forma H131 manifesta alta afinidade para IgG2, a R131 liga-se pouco ou nada a esta subclasse de anticorpos (Warmerdam et al. 1991). Assim, a presença da isoforma H131 do receptor pode ser importante em situações em que IgG2 está aumentada.

Há um segundo polimorfismo no aminoácido da posição 127 no receptor FcγRIIA que também afeta a função deste receptor (Norris et al. 1998). Uma substituição da base nitrogenada citosina (C) para adenina (A) leva a uma mudança no aminoácido glutamina (Q) para lisina (K). Esta mutação no aminoácido 127, produzindo a forma alotípica FcγRIIA – K127, também dá a este receptor a

capacidade de ligar-se eficientemente à IgG2 humana tal qual a molécula H131. Assim, as formas alotípicas H131 e K127 do FcγRIIA fazem com que este seja o único receptor para Fc de IgG capaz de interagir eficientemente com IgG2 humana.

O desenvolvimento de uma determinada doença infecciosa irá depender de uma série de fatores, como a cepa do patógeno em questão, e fatores relacionados ao hospedeiro, como a resposta imune desenvolvida bem como fatores genéticos. Um fator genético que pode estar envolvido na resposta imune do indivíduo é o polimorfismo dos FcγRs. Os receptores FcγRIIA desempenham funções importantes em diversas doenças infecciosas. As diferentes formas alotípicas deste receptor, H/R131 poderia levar a diferentes respostas, dependendo, por exemplo, do patógeno envolvido e do predomínio de diferentes subclasses de IgG .

Tem-se demonstrado a importância da participação do receptor FcγRIIA e dos anticorpos IgG2 nas infecções bacterianas, por bactérias encapsuladas, tais como *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae* (van de Winkel & Capel 1993). Assim, indivíduos que possuem a forma FcγRIIA – H131 deste receptor demonstram ser mais resistentes às infecções bacterianas, enquanto o genótipo FcγRIIA – R131 tem sido associado à susceptibilidade a estas doenças. Yee et al. (2000) avaliaram a associação entre as isoformas R131 e H131 do FcγRIIA e casos de bacteremia em indivíduos com pneumonia pneumocócica. De acordo com este estudo, a população controle de pessoas saudáveis apresentou uma distribuição genotípica de 29% para o genótipo FcγRIIA – R/R131, 46% para FcγRIIA – H/R131 e de 25% para FcγRIIA – H/H131, semelhante à encontrada em outras populações, como em Americanos negros e brancos e na população hispânica (Duits et al. 1995; Yee et al. 1997). Já entre os pacientes com pneumonia pneumocócica, o genótipo FcγRIIA – R/R131 esteve presente em 50% dos casos. Além disso, 10% desses pacientes morreram dentro de uma semana após o início do estudo, todos eles possuindo o genótipo R/R131. Os resultados deste estudo demonstraram que a maior parte dos pacientes com bacteremia na pneumonia pneumocócica são homozigotos para o alelo R131 do FcγRIIA. Especula-se a existência de um fator genético associado ao polimorfismo do FcγRIIA que determine a gravidade da doença nas infecções pneumocócicas. Na pneumonia, as bactérias replicam nos alvéolos e estimulam uma

resposta inflamatória local; na ausência de fagocitose eficiente, há replicação do microrganismo e disseminação para a corrente sanguínea, onde, se não removidos, sofrem novas replicações. A remoção dos pneumococos é eficientemente mediada por anticorpos contra polissacarídeos capsulares, sendo a subclasse IgG2 a que mais contribui para o processo de remoção destes microrganismos. Se os anticorpos que revestem a superfície bacteriana ligam-se fracamente ao FcγRIIA, a remoção pode não ocorrer normalmente (Yee et al. 2000), o que ocorre em indivíduos com a isoforma R131 desse receptor, que não se liga eficientemente à IgG2. Em controvérsia, os estudos realizados por Moens et al. (2006), entretanto, não demonstraram nenhuma associação entre os genótipos do FcγRIIA – H/R131 com a pneumonia pneumocócica invasiva, com distribuição das formas alotípicas deste receptor semelhante no grupo controle e no grupo de indivíduos doentes. Um recente estudo realizado por Wiertsema et al. (2006) indica que em crianças, a eficácia de uma vacina pneumocócica polissacarídica para otite média aguda é influenciada pelo polimorfismo do FcγRIIA – H/R131. Estas vacinas polissacarídicas induzem principalmente a produção de anticorpos da subclasse IgG2. Assim, indivíduos homozigotos R/R131 apresentaram maior risco de desenvolverem novos episódios de otite média aguda quando comparados aos homozigotos H/H131.

Os FcγRs também desempenham funções importantes nas infeções virais, como na dengue. Acredita-se que fatores genéticos do hospedeiro podem estar envolvidos na prediposição de alguns indivíduos para o desenvolvimento de formas mais graves da doença, como a febre hemorrágica da dengue. Dentre esses fatores genéticos, o polimorfismo do receptor FcγRIIA pode estar envolvido. Loke et al. (2002) demonstraram um possível efeito protetor do alótipo homozigótico FcγRIIA – R/R131 para a febre hemorrágica do dengue. Esse estudo que associa o genótipo FcγRIIA – R/R131 com resistência à febre hemorrágica abre perspectivas para futuras investigações.

Um estudo realizado por Brouwer et al. (2004) que avalia a transmissão perinatal do HIV-1 de mães infectadas para seus recém-nascidos, correlaciona o polimorfismo do FcγRIIA – H/R131 com susceptibilidade à infecção perinatal por esse vírus. Esse estudo sugere que crianças com o genótipo H/H131 têm maior probabilidade de serem infectadas perinatalmente pelo HIV-1. A freqüência do

genótipo H/H131 foi significativamente maior em recém-nascidos HIV-positivos comparada com aqueles HIV-negativos (35% e 21%, respectivamente). Além disso, esse estudo relaciona os genótipos R/R131 e H/R131 com menor susceptibilidade à infecção pelo HIV.

Tem-se estudado também a participação dos FcγRs nas doenças causadas por protozoários. Um estudo realizado por Shi et al. (2001) avaliou o papel das isoformas R131 e H131 do receptor FcγRIIA na malária em crianças do Kênia, na África. Acredita-se que a isoforma do receptor FcγRIIA – R/R131, que não se liga à IgG2 humana, pode ser um fator genético de proteção contra a infecção de alta densidade pelo *Plasmodium falciparum*. Resultados obtidos por Shi et al. (2001) mostraram que em crianças do grupo controle, o grupo de baixo risco de infecção, a prevalência do genótipo FcγRIIA – R131 foi significantemente maior (34%) quando comparado à do grupo de alto risco (17%); a prevalência do genótipo FcγRIIA – H/H131 foi similar (25% e 22%) e a presença do genótipo FcγRIIA – H/R131 foi maior no grupo de alto risco (61%) do que no de baixo risco (41%). Esses autores demonstraram que crianças com o genótipo FcγRIIA – R/R131 têm menor probabilidade de ter infecções repetidas de alta densidade por *P. falciparum* nos primeiros anos de vida, sugerindo um efeito protetor deste genótipo. Similarmente, Cooke et al. (2003) em seu estudo, associou o genótipo H/H131 com a susceptibilidade ao desenvolvimento da malária grave (malária cerebral, anemia grave e hipoglicemia), e do alelo R como fator de proteção para esta doença.

Ao contrário, Omi et al. (2002) realizaram um estudo avaliando a associação do polimorfismo dos receptores FcγRIIA e FcγRIIB com a susceptibilidade à malária cerebral em pacientes Tailandeses. Nesse estudo, o polimorfismo do FcγRIIA – H/R131, ou do FcγRIIIB – NA1/NA2 não apresentaram associação significante com a gravidade da malária. Contudo, na presença do alelo FcγRIIIB – NA2, o genótipo FcγRIIA – H/H131 foi associado com susceptibilidade à malária cerebral. Esses resultados sugerem que a combinação dos polimorfismos FcγRIIA – H/R131 e FcγRIIIB – NA1/NA2 têm um efeito interativo. Assim, a presença do alelo FcγRIIIB – NA2 pode levar à falha de fagocitose mediada por Fcγ em pacientes com malária, e estar associado a patogênese da malária cerebral.

Divergentemente, Aucan et al. (2000) demonstraram associação entre altos níveis de IgG2 humana dirigidos contra os epítopos antigênicos das proteínas (RESA e MSP2) de *Plasmodium falciparum*, com baixo nível de infecção em uma população de indivíduos expostos à malária em Burkina Faso na África. Dentre os indivíduos estudados 15, 55 e 30%, apresentavam, os genótipos FcγRIIA – H/HR131, H/R131, e R/R131, respectivamente. Assim, 70% dos indivíduos possuíam o alelo FcγRIIA – H131, cujo produto liga-se eficientemente à IgG2 humana. Nesse estudo observou-se que altos níveis de IgG2 e baixos níveis de IgG4 estavam associados ao baixo risco de infecção. Além disso, altos níveis de IgG3 dirigidos contra o epítopo MSP2 também estavam associados ao baixo risco da doença. Assim, esses resultados sugerem que, além da IgG3, a IgG2 pode estar envolvida na proteção contra o *P. falciparum.*

Ainda não existem estudos envolvendo a participação dos receptores FcγRIIA na leishmaniose humana. Até agora os estudos que avaliam o envolvimento dos FcγRs na resposta imune a *Leishmania* foram realizados no modelo murino, sendo que nestes não há um FcγR que seja homólogo ao FcγRIIA humano. Apesar disso, diversos estudos já mencionados anteriormente no modelo murino, demonstram a participação dos FcγRs na patogênese dessa doença.

Fatores como idade, sexo e genéticos, tais como aqueles relacionados ao polimorfismo no receptor FcγRIIA com as suas diferentes formas alotípicas podem interferir na resposta imune do indivíduo a determinado patógeno, podendo conferir proteção ou mesmo aumentando a susceptibilidade do indivíduo a determinadas doenças, ou ao desenvolvimento de formas mais graves como demonstrado na dengue e na malária. Assim, nesse estudo avaliamos o padrão de polimorfismo alélico do receptor FcγRIIA em pacientes com diferentes formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho consistiu em avaliar a relação dos padrões de diversidade alélica do receptor FcγRIIA com proteção ou patogênese na Leishmaniose Tegumentar Americana.

Os objetivos específicos foram:

1. Comparar o polimorfismo alélico do FcγRIIA – H/R131 em indivíduos com Leishmaniose Tegumentar Americana e em indivíduos saudáveis, a fim de avaliar se este polimorfismo é um fator genético de susceptibilidade ou resistência para a LTA;

2. Avaliar a relação do polimorfismo alélico desse receptor com o desenvolvimento da forma clínica mais branda (cutânea) ou mais graves (mucosa e cutâneo-mucosa) de LTA;

3. Analisar a influência dos diferentes padrões alotípicos do FcγRIIA - H/R131 sobre o tempo necessário para a cura das lesões.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Pacientes e Controles

Participaram do estudo 88 indivíduos com Leishmaniose Tegumentar Americana atendidos no Hospital de Doenças Tropicais, Anuar Auad (HDT) em Goiânia – Goiás, no período de 2000 a 2004, bem como 98 indivíduos saudáveis doadores de sangue (grupo controle) que se apresentaram no Banco de sangue do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, no período de 2004 a 2005. A maioria dos indivíduos com Leishmaniose são do estado de Goiás, sendo alguns do Tocantins e Mato Grosso.

Os indivíduos de ambos os grupos foram devidamente esclarecidos quanto aos objetivos do projeto e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica, Humana e Animal do Hospital das Clínicas/UFG e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (anexos nas páginas 66-68 e 70-72, respectivamente).

Foram colhidas amostras de 5ml de sangue por punção venosa em tubos vacutainer com EDTA dos indivíduos de ambos os grupos, além de biópsia e impressão da lesão dos indivíduos com LTA, para confirmação do diagnóstico.

3.2 – Aspectos Clínicos e Progressão da Doença

De acordo com os dados clínicos e imunopatológicos os pacientes com LTA foram divididos em quatro grupos, que apresentaram as formas clínicas cutânea, cutâneo-mucosa, mucosa e cutânea difusa (Carvalho et al. 1994)

Os pacientes retornaram ao ambulatório após um, três, seis, doze e dezoito meses após o início do tratamento, para avaliar os processos de evolução ou cura da doença. Nem todos os pacientes fizeram todos os retornos, e receberam como tratamento antimonial pentavalente, anfotericina B ou pentamidina, sendo que o primeiro foi administrado à maioria dos pacientes.

3.3 – Diagnóstico da LTA

Para confirmação do diagnóstico nos pacientes com LTA, além do exame clínico foram realizados os seguintes exames laboratoriais:

- **Exame direto** – Realizado por impressão ou biópsia da lesão, fixado em metanol, corado pela técnica de Giemsa e analisado ao microscópio óptico.
- **Diagnóstico Histopatológico** – O material obtido da biópsia foi incluso em parafina cortado em micrótomo, fixado em lâminas que foram coradas com Hematoxilina-Eosina. O diagnóstico diferencial foi realizado usando a coloração de PAS.
- **Imunofluorescência Indireta (IFI)** – O diagnóstico sorológico por IFI foi realizado no Laboratório Margarida Dobler Komma localizado no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) – UFG. Os resultados com títulos de anticorpos acima de 1/40 foram considerados positivos.
- **Teste de Montenegro** – O teste intradérmico de Montenegro também foi realizado no Laboratório Margarida Dobler Komma (IPTSP – UFG) e avalia a reação de hipersensibilidade tardia do paciente. A reação positiva é caracterizada por uma reação inflamatória no local onde o antígeno é inoculado (intradermicamente, na face interna do braço), formando uma pápula que atinge o auge em 48-72 horas. A intradermorreação acima de 5 mm foi considerada positiva.

As etapas do estudo descritas acima em Materiais e Métodos referentes aos pacientes com LTA foram realizadas em associação com o grupo de pesquisa coordenado pela Prof ª. Dr ª. Míriam Cristina Leandro Dorta.

3.4 – Determinação dos Padrões Alotípicos do FcγRIIA – H/R131

3.4.1 – Extração do DNA genômico

As amostras de sangue total, armazenadas a –20°C, foram utilizadas na extração do DNA genômico, cuja técnica foi realizada de acordo o método descrito por Ferreira et al. (1998), com algumas modificações padronizadas no laboratório de Biologia Molecular e Imunologia Aplicadas às Doenças Infecciosas. O sangue foi descongelado em banho-maria a 37°C. Depois de descongelada utilizou-se 500 μL da amostra sangüínea e adicionou-se igual volume de PBS (salina tamponada com fosfatos). Em seguida, a amostra foi centrifugada a 3.500 g por 15 minutos a 4ºC. O "pellet" foi então ressuspendido em 500 μL de tampão de lise (10 mM de Tris-HCl pH 8,0, 10 mM de EDTA pH 8,0 e 0,5% de SDS) incubado a 37°C por uma hora, e após adição de 100 μg/mL de Proteinase K (USB Corporation, Cleveland, OH, USA), as amostras foram mantidas a 56°C de um dia para o outro. Na etapa seguinte adicionou-se 1 volume de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25: 24: 1) (USB Corporation, Cleveland, OH, USA), misturando-se delicadamente por 10 minutos. Após centrifugação a 5.000 g por 15 minutos à temperatura ambiente, recuperou-se a fase aquosa transferindo-a para outro eppendorf. A etapa de extração com fenol foi repetida por três vezes. A seguir, adicionou-se 0,2 volumes de acetato de amônio 5M e 2 volumes de etanol 100%, observando-se a precipitação do DNA imediatamente. O "pellet" foi recuperado por centrifugação a 5.000 g por 5 minutos à temperatura ambiente e lavado com 2 volumes de etanol a 70%. Finalmente, o "pellet" foi secado à temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos, ressuspendido em 50 μL de água mili-Q (MILLIPORE® Billerica, MA, USA) e armazenado a – 20°C.

3.4.2 – Reação de polimerização em cadeia (PCR): amplificação do gene FcγRIIA

A estratégia de tipagem das formas alotípicas do FcγRIIA, descrita por Jiang et al. (1996), consiste na amplificação do gene FcγRIIA, obtendo-se um

produto de 366 pb, que apresenta dois sítios CGCG, um na extremidade 5' e outro na 3', seguida de digestão enzimática obtendo-se dois fragmentos com tamanhos distintos, de 343 pb e 322 pb dos padrões alotípicos H131 e R131 respectivamente (**Figura 3**). A reação em cadeia da polimerase para amplificação de um fragmento do gene que codifica o FcγRIIA, padronizada em nosso laboratório, foi realizada num volume de 25μL contendo: aproximadamente 200 ng de cada primer (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), 200 μM de dNTP (Eppendorf, Barkhausenweg Hamburg, Germany) 75 nM de MgCl2 , 10 mM de Tris HCl pH 8,5 ; 50 mM de KCl ; 0,8 U de Taq DNA polimerase (Biosystems, Curitiba, PR, Brasil), e processada em termociclador (Gene Cycler, BIO-RAD, Japão) nas seguintes condições: 95ºC por 5 min; 40 ciclos de 94º C por 1 min, 55º C por 1 min, 72º C por 1 min; 72º C por 7 mim. As seqüências nucleotídicas dos primers utilizados são apresentadas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Seqüências de primers que codificam um segmento gênico do receptor FcγRIIA, utilizados nas reações de PCR.

GENE	PRIMERS	SEQÜÊNCIA GÊNICA
FcγRIIA	ANTERIOR	GGAAAATCCCAGAAATTCTCGC
	REVERSO	CAACAGCCTGACTACCTATTACGCGGG

3.4.3 – Digestão enzimática alelo-específica

O polimorfismo do FcγRIIA – H/R131 foi analisado digerindo-se o produto amplificado com enzima de restrição alelo-específica. O produto amplificado do alelo H131 contém um sítio BshI 1236I (FnuDII) na região 3' e após digestão enzimática produz um fragmento gênico de 343 pb. O produto do alelo R131 contém dois sítios localizados na região 3' e 5', obtendo-se um fragmento gênico de 322 pb após digestão enzimática (**Figura 3 e Figura 4**). Assim, indivíduos do genótipo H/H131 apresentam um fragmento de 343 pb, enquanto aqueles do genótipo R/R131 apresentam um fragmento de 322 pb e os heterozigotos H/R131 apresentam ambos os fragmentos (**Figura 4**).

Após a verificação do produto amplificado correspondendo ao tamanho da banda do fragmento gênico do receptor FcγRIIA em gel de agarose 1%, 4 a 10 μl do produto amplificado foram digeridos com 0,5 a 1U da enzima BshI 1236I (FnuDII) (MBI Fermentas, Burlington, Ontário, Canadá) em um volume de 10 a 15 μL, em banho-maria a 56°C de um dia para o outro.

Os produtos de digestão enzimática foram, posteriormente, analisados por eletroforese em gel de agarose 3% e corados com brometo de etídio.

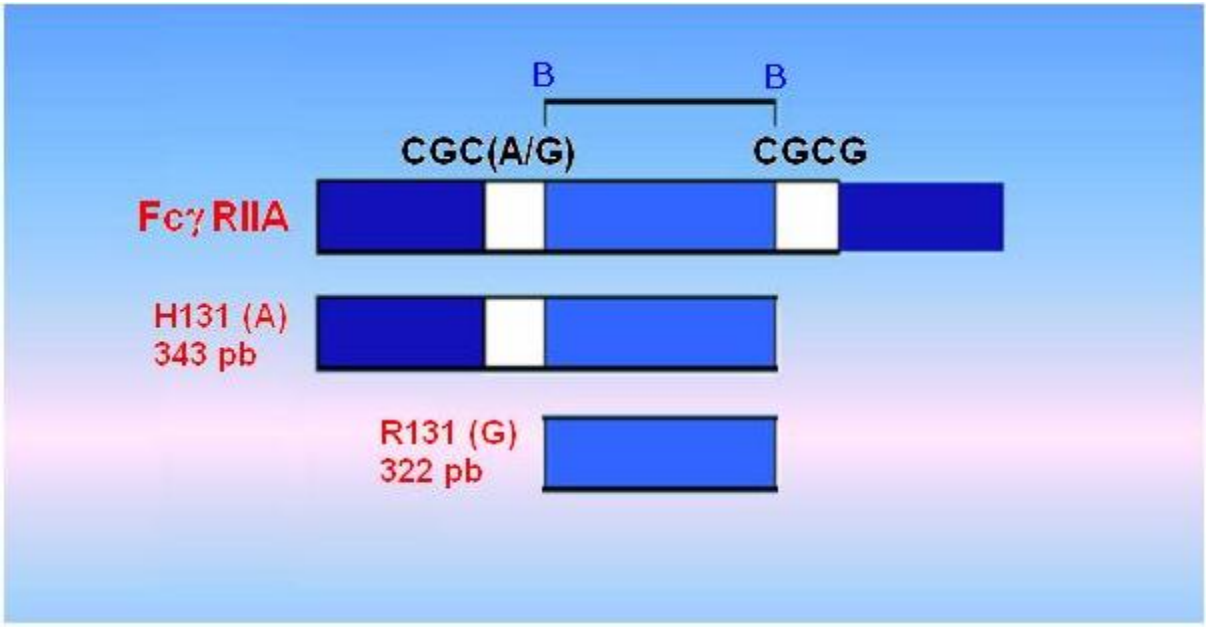


Figura 3. Diagrama esquemático da digestão enzimática alelo-específica para determinação do genótipo FcγRIIA – H/R131. O gene FcγRIIA e os produtos da digestão enzimática estão representados; B indica o local dos sítios BshI – 1236 I FnU DII. Abaixo estão os produtos da PCR digeridos representando as formas alotípicas H131 e R131 com seus respectivos tamanhos.

3.4.4 – Eletroforese em gel de agarose a 1 % e 3%

A eletroforese em gel de agarose 1% foi utilizada tanto para a visualização do DNA genômico, após extração, quanto para a visualização dos produtos

amplificados, e o gel a 3% para análise dos fragmentos obtidos após digestão enzimática.

As amostras para análise foram preparadas com 8 μl de DNA da reação de amplificação ou 8μL do DNA extraído acrescido de 2 μl de tampão de amostra 5X (TBE 5X, glicerol 30%, Azul de bromofenol 0.1% e Xyleno Cyanol 0.1%). Este sistema foi aplicado em gel de agarose a 1% e a eletroforese processada em tampão TEB 1X com corrente constante (60 mA, 100 V). A eletroforese dos produtos de amplificação digeridos foi realizada em gel de agarose a 3%, com 10 – 15 μl de amostra e 2,5 – 4 μL de tampão 5X. O gel foi corado com brometo de etídeo e observado em transluminador de luz ultravioleta (Hoefer Pharmacia Biotech, USA).

3.4.5- Análise dos dados

A comparação da distribuição genotípica e da freqüência alélica do FcγRIIA – H/R131 nos grupos estudados, foi realizada usando o teste do qui-quadrado (χ^2). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

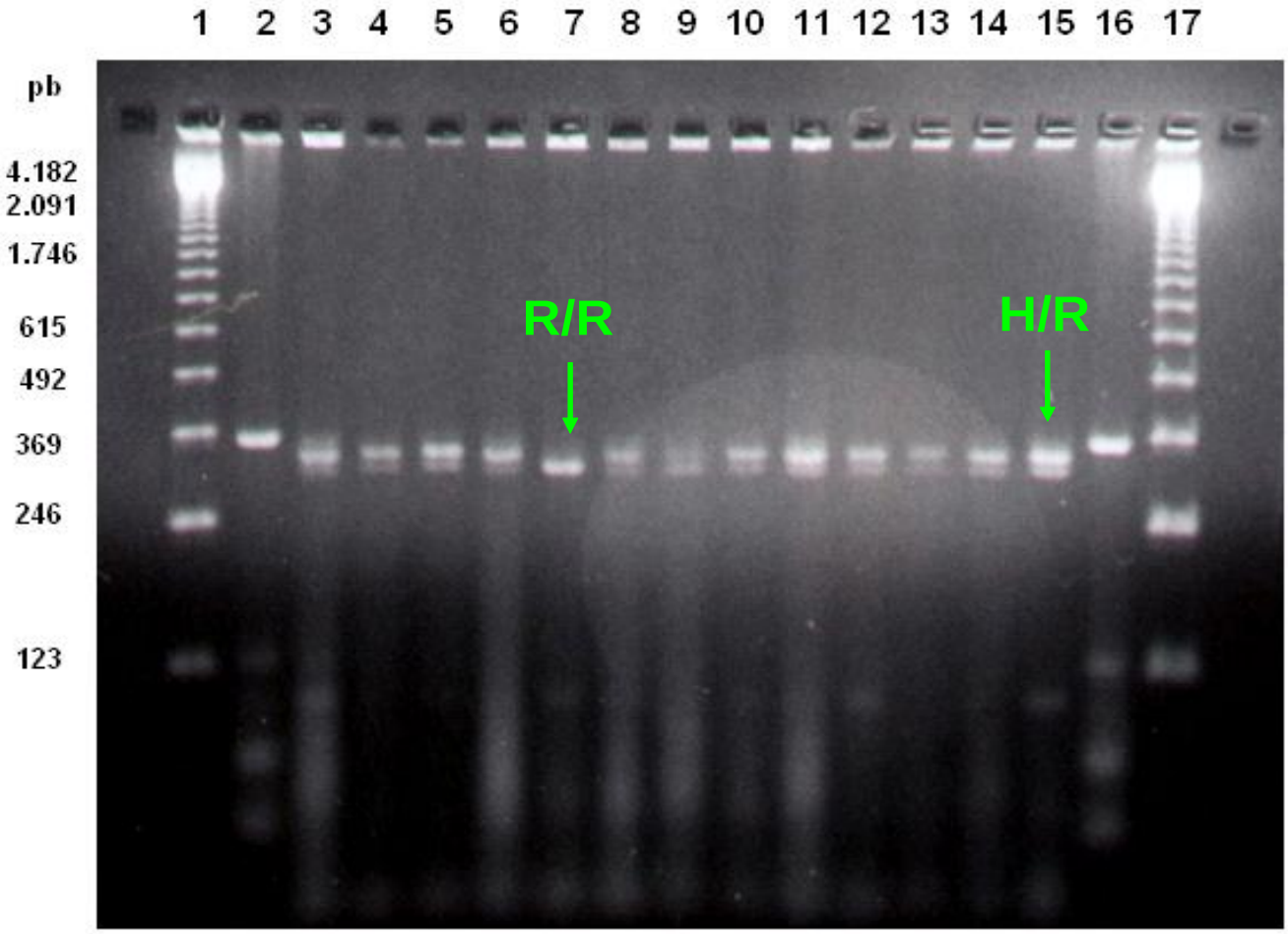
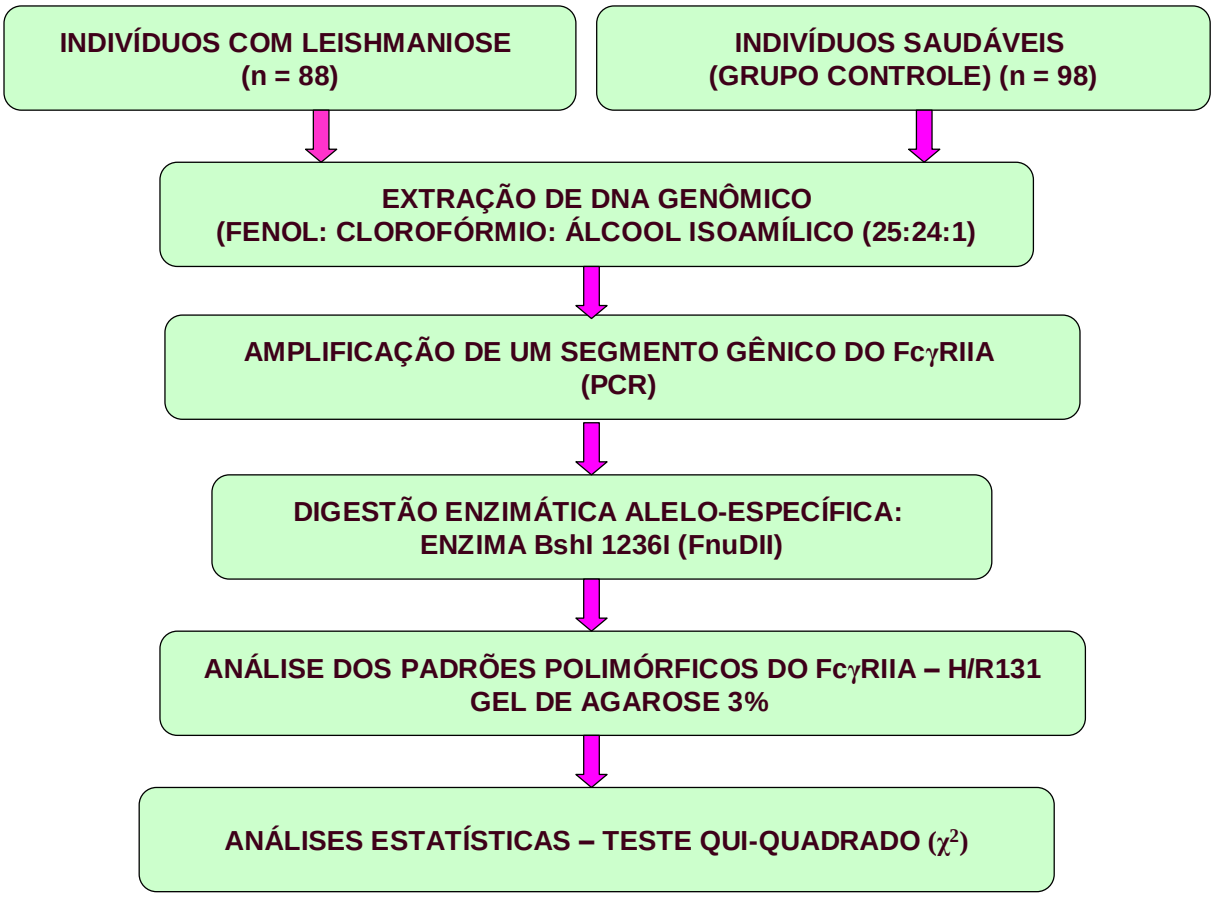


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose a 3%, demonstrando os padrões alélicos do receptor FcγRIIA – H/R131 de 13 indivíduos com LTA. As linhas 1 e 17 mostram o padrão de peso molecular 123 pb DNA Ladder; as linhas 2 e 16 mostram o produto amplificado mas não digerido com a enzima de restrição BsH 1236I. As linhas 3 a 15 mostram produtos amplificados e digeridos com esta enzima: linhas 3-6 e 8-15: genótipo H/R; linha 7: genótipo R/R.

As etapas descritas estão sintetizadas no fluxograma seguinte.



4. ARTIGO:

Polimorfismo alélico do receptor FcγRIIA – H/R131 na Leishmaniose Tegumentar Americana

Este artigo será submetido à revista "Journal of Infectious Diseases**"**

Resumo

Os receptores Fcγ ligam à porção Fc de IgG, promovendo uma interação entre a imunidade celular e humoral. O FcγRIIA, expresso por macrófagos, neutrófilos plaquetas e células dendríticas, ligam a subclasses de IgG com afinidade variável, que é influenciada pelo polimorfismo no gene que codifica este receptor. A substituição do aminoácido arginina (R) por histidina (H) na posição 131, define três padrões alélicos, o homozigoto H/H, R/R e o heterozigoto H/R, conferindo ao FcγRIIA – H/H131 afinidade para IgG2 e aumento na afinidade para IgG3. Alguns estudos demonstram a importância dos FcγRs na infecção de macrófagos por formas amastigotas de *Leishmania sp*, em adição aos receptores para o sistema complemento (CR) e para manose (MR). Fatores relacionados ao hospedeiro e ao parasita estão envolvidos na resposta imune a leishmaniose, dentre eles, os FcγRs. Assim, analisamos a influência dos padrões de diversidade do FcγRIIA na Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). O polimorfismo no FcγRIIA – H/R131 foi analisado em amostras sanguíneas, através da PCR seguida de digestão enzimática alelo-específica. De acordo com nossos resultados, as distribuições genotípica e alélica do FcγRIIA – H/R131 foram similares nos dois grupos estudados, bem como nas formas clínicas mais brandas e mais graves da LTA. Além disso, não houve relação entre o polimorfismo do FcγRIIA – H/R131 com o tempo de cura das lesões. Dessa forma, esse estudo sugere que não há relação entre este polimorfismo alélico com susceptibilidade ou resistência na Leishmaniose Tegumentar Americana, não influenciando o desenvolvimento de diferentes formas clínicas e nem os processos de resolução da doença.

Palavras-chave: Receptores Fcγ, polimorfismo alélico, FcγRIIA, *Leishmania sp,* Leishmaniose Tegumentar Americana

Abstract

The Fcγ receptors bind to the Fc portion of IgG, developing an interaction between cellular and humoral immune response. The FcγRIIA, expressed by macrophages, neutrophils, platelets and dendritic cells, bind to the IgG subclasses with variable affinity, being influenced by the polymorphism in the gene that encodes this receptor. The substitution of arginine (R) for histidine (H) in the 131 position, defines three allelic patterns: the homozygote H/H, R/R and the heterozygote H/R, giving to the FcγRIIA – H/H131 affinity to IgG2 and a greater affinity to IgG3 subclasses. Studies show the importance of FcγRs on the macrophage infection by amastigotes forms of *Leishmania sp,* in addition to the receptors for the complement system (CR) and the manose system (MR). Factors related to the hosts and parasites are involved in the immune response to the leishmaniasis, among them, the FcγRs. This way, we analyzed the influence of the allelic diversity patterns of the receptor FcγRIIA on the American Tegumentary Leishmaniasis (LTA). The FcγRIIA – H/R131 polymorphism was analyzed in blood samples, using PCR followed by allele-specific enzymatic digestion. According to our results, the genotypic and allelic distributions of the FcγRIIA – H/R131 were similar among the studied groups, as well in the clinical forms mild and more severe of ATL. Besides that, there was not relation between the polymorphism of the FcγRIIA – H/R131 and healing time of the lesions. This study suggests that there is no relation between this allelic polymorphism with susceptibility or resistance in the American Tegumentary Leishmaniasis, not influencing the development of different clinical forms neither the processes of the disease resolution.

Key words: Fcγ Receptors, allelic polymorphism, FcγRIIA, *Leishmania sp*, American Tegumentary Leishmaniasis

Introdução

Os FcγRs, receptores que se ligam à porção Fc de IgG, são expressos na maioria das células do sistema imune [1]. Esses receptores fazem parte da superfamília das imunoglobulinas e consistem em proteínas integrantes de membrana, com uma região extracelular que se liga a IgG, uma região transmembrânica, e uma citoplasmática. Os FcγRs se dividem em FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) e FcγRIII (CD16), cada um com diferentes isoformas [2], e o FcγRIV, recentemente descrito no modelo murino [3]. Uma vez ativados esses receptores podem desencadear uma variedade de respostas biológicas, como fagocitose, endocitose, citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), liberação de mediadores inflamatórios e aumento da apresentação de antígenos [4].

O FcγRII apresenta três subclasses, o FcγRIIA e FcγRIIC, que geram sinais de ativação nas células que os expressam, e o FcγRIIB que gera sinais inibidores [2]. O FcγRIIA, expresso por monócitos, macrófagos, neutrófilos, plaquetas e células dendríticas [5], pode desencadear sinais biológicos como, aumento da fagocitose, aumento da explosão respiratória e aumento da produção de mediadores inflamatórios [2]. O FcγRIIA pode ligar-se a IgG1 e IgG3 humanas, anticorpos reconhecidamente citofílicos, não se ligando a IgG2 nem a IgG4. Entretanto, um polimorfismo alélico no gene que codifica este receptor gera diferentes isoformas que podem alterar estas características. A diferença em um nucleotídeo na base 494 (A ou G) resulta na expressão de duas formas codominantes do FcγRIIA, que diferem no aminoácido da posição 131 [6]. O FcγRIIA – R131, com o códon CGT codifica o aminoácido arginina (R); o FcγRIIA – H131 expressa o aminoácido histidina (H), codificado pelo códon CAT [7], ligando-se eficientemente à IgG2 humana, além de se ligar com maior afinidade à IgG3 humana [8-11]. Essas diferentes formas alotípicas desempenham diferentes papéis em diversas doenças infecciosas. Estudos têm demonstrado relação entre os padrões polimórficos desse receptor e a susceptibilidade ou resistência às doenças infecciosas como a malária [12-14], doenças bacterianas [15] e virais [16].

A participação dos FcγRs nos processos de internalização da *Leishmania* e no desenvolvimento da resposta imune têm sido investigados. A *Leishmania* liga-se ao macrófago diretamente ou por mecanismos de opsonização específica [17]. O

reconhecimento direto implica em uma forma de escape, pois nesse caso o mecanismo microbicida de explosão respiratória dos macrófagos não será ativado [18]. O mecanismo de opsonização específica envolve proteínas do sistema complemento e anticorpos IgG. Os FcγRs, os receptores para complemento (CRs) e para manose (MR), são importantes na internalização de formas amastigotas de *Leishmania* [17]. As formas promastigotas podem ser internalizadas através de receptores para o sistema complemento CR1, CR3 [19] e CR4, receptores para manose (MR) e fibronectina [20].

A *Leishmania,* no homem, normalmente causa uma ou mais lesões de pele, que se desenvolvem dentro de semanas ou meses após a transmissão [21]. As formas clínicas podem variar de cutânea localizada, cutânea disseminada, cutâneo-mucosa, e difusa [22]. A existência de um grande número de espécies de *Leishmania* e de variações intra-espécie, o estado de saúde geral e a constituição genética do hospedeiro, bem como sua resposta imune, podem determinar a variedade de formas clínicas e a gravidade da leishmaniose [23, 24]. Dessa forma, há uma complexa resposta imune envolvida nas diferentes formas clínicas da doença. Na forma cutânea as citocinas do padrão Th1 (IL-2, IFN-γ, TNF-α) predominam sobre as citocinas Th2 (IL-4, IL-13) [25-28], embora alguns estudos demonstrem a presença de citocinas Th2 no local da lesão nas fases iniciais da doença [29, 30] e um predomínio de citocinas pró-inflamatórias (Th1) em fases posteriores [29]. O IFN-γ ativa o macrófago, levando à produção de intermediários reativos do oxigênio e óxido nítrico (NO), facilitando a eliminação do parasita [31], bem como aumentando a expressão de FcγRs [32] e induzindo a troca de isótipos de imunoglobulinas para determinadas subclasses citofílicas de IgG, capazes de interagir com os FcγRs. A forma clínica mucosa é caracterizada por uma resposta imune celular exacerbada [33] e impropriamente modulada. Há uma produção elevada de citocinas pró-inflamatórias, embora Pirmez et al. (1993) [26] tenham demonstrado a presença de um padrão misto de citocinas Th1 e Th2. Entretanto, essas citocinas do padrão Th2 parecem ser insuficientes para modular a resposta Th1 [26]. A leishmaniose difusa apresenta resposta imune celular deficiente, com ausência da resposta de hipersensibilidade tardia (DTH) [34], com conseqüente inibição da ativação de macrófagos e proliferação de amastigotas.

Fatores genéticos, tais como aqueles relacionados ao polimorfismo do receptor FcγRIIA podem interferir na resposta imune do indivíduo a diversos patógenos, conferindo proteção ou contribuindo com a patogênese, como observado em doenças bacterianas por pneumococos [15], por protozoários como *Plasmodium falciparum* [12-14], e por vírus como o dengue [16], o que pode depender de fatores tais como: os padrões alotípicos de receptor FcγRIIA expresso pelo indivíduo, idade, sexo, padrões de subclasses de IgG produzidos durante o curso da infecção, dentre outros. Considerando a importância deste receptor já demonstrada em outras doenças infecciosas e mais recentemente em modelos experimentais de leishmaniose, nesse trabalho avaliamos o padrão de polimorfismo alélico do receptor FcγRIIA em pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana, sua possível relação com as diferentes formas clínicas da LTA e com o tempo decorrido para a cura das lesões.

Materiais e Métodos

Pacientes e Controles. Participaram do estudo 88 indivíduos com Leishmaniose Tegumentar Americana atendidos no Hospital de Doenças Tropicais de Goiás, Anuar Auad (HDT) no período de 2000 a 2004, bem como 98 indivíduos saudáveis doadores de sangue (grupo controle) que se apresentaram no Banco de sangue do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, no período de 2004 a 2005. Os indivíduos de ambos os grupos foram devidamente esclarecidos quanto aos objetivos do projeto e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica, Humana e Animal do Hospital das Clínicas/UFG e pelo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás. Foram colhidos aproximadamente 5 mL de sangue por punção venosa em tubos com EDTA de cada indivíduos de ambos os grupos, além de biópsia e impressão da lesão dos indivíduos com LTA, para confirmação do diagnóstico.

Aspectos Clínicos. De acordo com os dados clínicos e imunopatológicos os pacientes foram divididos em quatro grupos, referentes às formas clínicas da doença: cutânea, cutâneo-mucosa, mucosa, e difusa [22]

Diagnóstico da LTA. O diagnóstico clínico dos pacientes foi confirmado laboratorialmente para LTA. Além das características clínicas da lesão, o critério utilizado para confirmação da doença foi a demonstração do parasita pelo exame direto e/ou histopatológico. Nos casos em que esses exames apresentaram resultados inconclusivos ou não foram realizados, o diagnóstico foi confirmado por teste sorológico pesquisando-se anticorpos IgG por imunofluorescência indireta (IFI), e empregando-se a reação intradérmica de Montenegro. Os resultados considerados positivos foram aqueles com título de anticorpos acima de 1/40 e intradermorreação acima de 5 mm.

Determinação do Genótipo FcγRIIA – H/R131. O DNA genômico das amostras de sangue foi extraído com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) (USB Corporation, Cleveland, OH USA), precipitado com 1,4 M de acetato de amônio e etanol 100% e ressuspendido em água milli-Q (MILLIPORE® Billerica, MA, USA), segundo técnica descrita por Ferreira et al. (1998) [35] modificada. O genótipo do FcγRIIA foi determinado por modificação da técnica de Jiang et al. (1996) [36]. O fragmento do gene FcγRIIA foi amplificado por PCR, contendo: 200 ng de cada *primer* (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), 200 μM de dNTP (Eppendorf, Barkhausenweg Hamburg, Germany), 75 nM de MgCl2, 10 mM de Tris HCl pH 8,5, 50 mM de KCl, 0,8 U de Taq DNA polimerase (Biosystems, PR, Brasil). As seqüências de *primers* utilizados foram: primer anterior 5'-GGAAAATCCCAGAAATTCTCGC-3', primer reverso 5'- CAACAGCCTGACTACCTATTACGCGGG - 3'. O polimorfismo do FcγRIIA – H/R131 foi analisado por digestão enzimática alelo-específica do produto amplificado com a enzima de restrição BshI – 1236I (FnUDII) (MBI Fermentas, Burlington, Ontário, Canadá), utilizando 0,5 – 1U da enzima. Essa digere o fragmento de DNA no sítio 5'- CGCG - 3'. O produto da PCR do alelo H131 contém um sítio BshI – 1236I (FnUDII), na região 3', e o produto da PCR referente ao alelo R131 contêm dois sítios, localizados nas regiões 3' e 5', resultando em dois padrões distintos. O

genótipo H/H131 produz um fragmento de 343 pb, enquanto o genótipo R/R131 produz um fragmento de 322 pb e o genótipo H/R131 produz ambos os fragmentos. A análise dos produtos após digestão enzimática foi realizada por eletroforese em gel de agarose 3% corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta em transluminador (Hoefer Pharmacia Biotech, USA).

Análise Estatística. A comparação da distribuição genotípica e alélica do FcγRIIA nos grupos estudados, foi realizada usando o teste do qui-quadrado (χ^2). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

Resultados

Características demográficas dos indivíduos estudados. A média de idade dos pacientes foi de 37,7 anos (variando entre 8 a 68 anos) e dos controles foi de 34,2 anos (variando entre 20 a 58 anos). A maioria dos indivíduos dos dois grupos encontrava-se na faixa etária entre 21 a 40 anos, e eram do sexo masculino (73,9% dos pacientes e 76,5% dos controles).

Características clínicas dos pacientes. A distribuição das diferentes formas clínicas da LTA na população estudada está demonstrada na **Tabela 1.** A forma cutânea foi a predominante (72,7%), seguida pela forma mucosa (21,6%)

Tabela 1. Distribuição das diferentes formas clínicas da LTA nos pacientes estudados (n = 88).

Formas Clínicas da LTA	Pacientes (n = 88) n (%)
Cutânea	64 (72,7)
Mucosa	19 (21,6)
Cutáneo-mucosa	4 (4,5)
Difusa	1 (1,2)

Polimorfismo do FcγRIIA na Leishmaniose Tegumentar Americana. A freqüência genotípica e alélica do FcγRIIA – H/R131 foi analisada em 88 pacientes com LTA e

em 98 indivíduos do grupo controle. Como mostra a **Tabela 2**, os genótipos do FcγRIIA – H/R131 seguiram o mesmo padrão de distribuição nos dois grupos estudados. No grupo de indivíduos com leishmaniose, bem como nos indivíduos saudáveis houve um predomínio do genótipo H/R (42,1% e 42,9%, respectivamente) Apesar do genótipo R/R ser mais freqüente nos indivíduos saudáveis comparado ao grupo de pacientes, não houve diferença significativa na distribuição alélica do receptor FcγRIIA – H/H131 entre esses grupos estudados (*P* = 0,80). Houve um predomínio do alelo H (0,51) nos pacientes com leishmaniose e do alelo R (0,53) no grupo controle, entretanto esses resultados também não apresentaram diferenças significativas. Esses dados sugerem que não há relação de susceptibilidade ou resistência entre o polimorfismo alélico do FcγRIIA e a Leishmaniose.

Distribuição alélica do FcγRIIA – H/R131 nas diferentes formas clínicas da leishmaniose. De acordo com a **Tabela 2**, nos 64 pacientes com a forma cutânea, e nos 23 pacientes com formas mais graves da doença (mucosa e cutâneo-mucosa), a distribuição genotípica do FcγRIIA – H/R131 foi semelhante, e seguiu o mesmo padrão encontrado nos pacientes e controle. Apenas um indivíduo apresentou a forma difusa da doença, e tinha o genótipo heterozigoto H/R do FcγRIIA (paciente não incluído nas análises).

Em relação à freqüência alélica (**Tabela 2**), nossos resultados demonstraram um aparente predomínio do alelo H no grupo de pacientes com a forma cutânea (0,51), considerada a mais branda da doença, embora não haja diferença significativa (*P* = 0,93). A distribuição genotípica e freqüência alélica do FcγRIIA – H/R131 entre os pacientes com as diferentes formas clínicas da LTA e o grupo controle também não apresentaram diferenças significativas. Esses resultados sugerem que não há relação entre os alótipos do FcγRIIA e o desenvolvimento de formas mais brandas ou mais graves de Leishmaniose.

Polimorfismo do FcγRIIA – H/R131 na resolução da doença. Para avaliar se o polimorfismo do FcγRIIA – H/R131 influencia na resolução da doença pelo hospedeiro, comparou-se o tempo decorrido para a cura das lesões nos pacientes apresentando as formas cutânea e mucosa com as diferentes formas alélicas do receptor FcγRIIA. Esses pacientes estudados foram tratados com antimonial

pentavalente e retornaram com 1, 3, 6, 12 e 18 meses após a primeira consulta, quando foram avaliados quanto à cura das lesões. Foram avaliados 17 pacientes com a forma cutânea que curaram as lesões após 1 mês de tratamento. Como mostrado na **Tabela 3,** houve um predomínio do genótipo R/R (41,2%, n = 7) e do alelo R (0,56) nestes pacientes, embora sem diferenças estatísticas (*P* = 0,79 e 0,49, respectivamente). Os indivíduos (n = 3) que curaram as lesões cutâneas após um mês de tratamento apresentaram o genótipo H/R (100%). Os pacientes com a forma mucosa com lesões curadas com um mês de tratamento, a freqüência de ambos alelos foi 0,50, e no grupo que curou as lesões após um mês de tratamento o alelo H foi predominante (0,62). Esses resultados com difrenças não significativas, sugerem que o polimorfismo alélico do FcγRIIA parece não influenciar o tempo de cura das lesões das formas mais brandas e graves da doença.

Tabela 2. Distribuição genotípica e freqüência alélica do FcγRIIA – H/R131 nos pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana segundo as formas clínicas e nos indivíduos saudáveis do grupo controle

	Genótipo FcγRIIA – H/R131 n (%)			*P**	Freqüência alélica FcγRIIA – H/R131		*P**
	H/H	H/R	R/R		H	R	
Pacientes	26 (29,5)	37 (42,1)	25 (28,4)	0,80	0,51	0,49	0,82
Controles	25 (25,5)	42 (42,9)	31 (31,6)	0,80	0,47	0,53	0,82
Formas clínicas da LTA							
Branda (Cutânea)	19 (29,7)	27 (42,2)	18 (28,1)	0,96	0,51	0,49	0,93
Grave (Mucosa e Cutâneo-Mucosa)	7 (30,4)	9 (39,2)	7 (30,4)	0,96	0,50	0,50	0,93

*São considerados significativos valores de *P* < 0,05.

Discussão

No presente estudo, avaliamos a influência do polimorfismo alélico do gene que codifica o receptor FcγRIIA – H/R131 sobre a susceptibilidade ou resistência à Leishmaniose Tegumentar Americana. Para isto comparamos a distribuição dos diferentes genótipos H/H, H/R e R/R e dos alelos H131 e R131 desse receptor em um grupo de pacientes com LTA com um grupo de indivíduos saudáveis. Nossos resultados demonstraram que a distribuição genotípica e alélica do FcγRIIA – H/R131 foi similar nos dois grupos estudados.

Tabela 3. Distribuição genotípica e freqüência alélica do FcγRIIA – H/R131 de acordo com o tempo de resolução da doença.

	Genótipo FcγRIIA – H/R131 n (%)			*P**	Freqüência alélica FcγRIIA – H/R131		*P**
Forma clínica	H/H	H/R	R/R		H	R	
Cutânea							
1 mês	5 (29,4)	5 (29,4)	7 (41,2)	0,79	0,44	0,56	0,49
Após 1 mês	0 (0,0)	3 (100,0)	0 (0,0)	- #	0,50	0,50	- #
Mucosa							
1 mês	2 (25,0)	4 (50,0)	2 (25,0)	- #	0,50	0,50	- #
Após 1 mês	2 (50,0)	1 (25,0)	1 (25,0)	- #	0,62	0,38	- #

Valores de *P* não aplicáveis, pois as freqüências esperadas são menores que 5.

A freqüência relativa do genótipo FcγRIIA – H/R131 varia em diferentes grupos étnicos. Assim, a distribuição genotípica deste receptor nos pacientes com leishmaniose (29,5%, 42,1% e 28,4% para H/H, H/R e R/R respectivamente) e no grupo controle (25,5%, 42,9% e 31,6% para H/H, H/R e R/R respectivamente), foi semelhante à encontrada em um grupo de doadores de sangue no Brasil (22,4%, 44,7% e 32,9% para H/H, H/R e R/R respectivamente) [37], em Caucasianos (23%, 54% e 23% para H/H, H/R e R/R respectivamente) [38], e no grupo controle de

indivíduos saudáveis dos Estados Unidos em um estudo feito por Yee et al. (2000) (25%, 46% e 29% para H/H, H/R e R/R respectivamente) [15], mas se difere daquela encontrada em índios da região amazônica brasileira (1,1%, 15,2% e 83,7% para H/H, H/R e R/R respectivamente) [37] e daquela encontrada em Japoneses (61%, 33% e 6% para H/H, H/R e R/R respectivamente) [38].

Os fatores relacionados ao parasita, tais como o grande número de espécies de *Leishmania* e de variações intra-espécies, bem como os fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro, como o estado de saúde geral e a constituição genética do indivíduo e sua resposta imune, podem influenciar na diversidade de formas clínicas e na severidade da leishmaniose [23, 24]. Em nosso estudo, o polimorfismo do FcγRIIA – H/R131 não influenciou o desenvolvimento das diferentes formas clínicas da LTA, nas suas formas branda (cutânea) ou graves (mucosa e cutâneo-mucosa). Quanto à forma difusa, a forma mais grave da doença, não foi possível avaliar a influência deste polimorfismo, dado ao limitado número de pacientes com essa forma clínica. Nossos resultados também demonstram que a expressão dos diferentes genótipos ou alelos do FcγRIIA – H/R131 parece não influenciar no tempo decorrido para resolução da doença. Entretanto, a ausência de diferenças significativas pode ser conseqüência do número relativamente reduzido de pacientes analisados.

O polimorfismo do FcγRIIA tem sido implicado como um dos fatores capazes de influenciar o desenvolvimento de diversas doenças infecciosas. As diferentes formas alotípicas deste receptor, associado a fatores inerentes ao patógeno envolvido, bem como o perfil de subclasses de IgG, podem contribuir tanto para a patogênese quanto para a resolução da doença. Em infecções por bactérias encapsuladas como *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*, em que há um predomínio de IgG2 em relação às demais subclasses, a presença da forma H131 (H/H ou H/R) do FcγRIIA, capaz de se ligar à IgG2 humana, pode estar associada a maior resistência a essas infecções, sendo o genótipo R/R131 relacionado a maior susceptibilidade [14], embora Moens et al. (2006) [6] não tenham encontrado nenhuma associação entre esses genótipos com a pneumonia pneumocócica invasiva. Na malária, a inibição do crescimento parasitário por ADCI (“antibody-dependent cellular inhibition) foi mediada por anticorpos citofílicos IgG1 e IgG3 e pelo receptor FcγRIIA [13]. Nesse estudo, crianças com o genótipo R/R131 apresentaram menor risco de desenvolver infecção de alta densidade pelo

Plasmodium falciparum, em relação àquelas com os demais genótipos desse receptor. Entretanto, em outro estudo, o polimorfismo no FcγRIIA – H/R131 não mostrou nenhuma associação com a gravidade da malária [14]. Diferentemente, em outras doenças infecciosas, como a dengue, o alelo H131 tem sido associado com a patogênese, considerando-se esse genótipo como um fator prognóstico para o desenvolvimento da forma hemorrágica dessa doença [16].

Apesar de nossos dados sugerirem que não há relação entre o polimorfismo FcγRIIA – H/R131 com a leishmaniose, não podemos descartar um possível envolvimento desse polimorfismo alélico no desenvolvimento desta doença, uma vez que não analisamos a expressão celular dos diferentes alótipos deste receptor, que embora sejam expressos de forma codominante, essa expressão pode ser influenciada por citocinas. Alguns estudos indicam que citocinas do padrão Th1, tais como IFN-γ e TNF-α, aumentam a expressão dos receptores FcγRs ativadores, incluindo o FcγRIIA, e citocinas do padrão Th2 aumentam a expressão do receptor inibidor FcγRIIB [5]. Assim, é possível que na dinâmica da resposta imune, fatores presentes no microambiente podem influenciar a expressão desses receptores, o que não foi objetivo desse estudo.

Outro fator que pode influenciar a atividade funcional do FcγRIIA é o polimorfismo do aminoácido na posição 127 deste receptor. Esse polimorfismo foi observado e demonstrado em indivíduos com o genótipo R/R131 do FcγRIIA, que possuem um aminoácido lisina (K) na posição 127 ao invés de uma glutamina (Q). Essa mutação também permite que o FcγRIIA ligue-se eficientemente a IgG2 humana, semelhante à forma H131 desse receptor [7]. Assim, o FcγRIIA – R/R131 pode ser funcionalmente semelhante àqueles que apresentam o alelo H131, desde que apresentem a forma K127 desse receptor, o que também não foi avaliado neste estudo. Embora não haja diferença no genótipo do FcγRIIA – H/R131 entre as diferentes formas clínicas da LTA, não podemos descartar a possibilidade do polimorfismo Q/K127 estar influenciando o desenvolvimento das formas clínicas brandas ou graves da LTA.

Muitos estudos realizados em camundongos infectados com diferentes espécies de *Leishmania* têm associado os FcγRs e os anticorpos à exacerbação da leishmaniose, contribuindo para o aumento da produção de citocinas antiinflamatórias, como IL-10, IL-4 e TGF-β, resultando em maior carga parasitária, e

conseqüentemente com o desenvolvimento de lesões maiores e mais difíceis de curar [39-42]. Entretanto, Woelbing et al. (2006) [43] demonstraram que anticorpos IgG e receptores Fcγ em células dendríticas, estão envolvidos no desenvolvimento de imunidade protetora, em camundongos infectados por *L. major,* ocorrendo um aumento na produção de IFN-γ e IL-12 por essas células após internalização de leishmanias opsonizadas, com o desenvolvimento de lesões menores com menor carga parasitária, sugerindo a participação da resposta Th1. Em conjunto, esses estudos têm sugerido que diferentes células, tais como macrófagos e células dendríticas, podem estar envolvidas em respostas diferenciadas quando da participação dos FcγRs, podendo o balanço entre diferentes receptores e a geração de mecanismos pró e antiinflamatórios serem críticos para a evolução da doença [43].

Esses estudos em conjunto sugerem um papel dos anticorpos do tipo IgG associados aos receptores FcγRs na patogênese da doença, cujo fenômeno ADE ("antibody-dependent immune enhancement") influencia a produção de citocinas, promovendo a produção de IL-10 e inibindo a resposta do tipo celular, prevenindo desta forma a erradicação de patógenos intracelulares. Em adição, estudos realizados por Padigel & Farrel (2005) [44] demonstraram que camundongos BALB/c $Fc\gamma R^{-/-}$ infectados por *L. major,* são capazes de resolver lesões cutâneas, e nestes camundongos há um número reduzido de células Th2, ou seja, produtoras de IL-4 e IL-10. Além disso, há uma redução dos níveis de IL-10 e TGF-β dentro das lesões, sugerindo que a internalização de leishmanias via FcγRs pode estimular a produção de citocinas antiinflamatórias, as quais são importantes para a susceptibilidade à infecção por *Leishmania*. Entretanto, Woelbing et al. (2006) [43] demonstraram que, ao contrário, esses receptores são importantes para o desenvolvimento da imunidade protetora. Nesse estudo, células B, anticorpos IgG e os receptores Fcγ expressos por células dendríticas são importantes para o desenvolvimento da imunidade protetora em camundongos infectados por *L. major.* Assim, leishmanias opsonizadas por anticorpos IgG induziram produção aumentada de IL-12 por células dendríticas, e os camundongos infectados desenvolveram lesões menores e mostraram uma menor carga parasitária.

Esses resultados contraditórios para o papel dos anticorpos IgG e receptores FcγRs na proteção ou susceptibilidade à leishmaniose podem ser somente

aparentes, o que poderia ser explicado pela dinâmica das interações celulares e moleculares. É possível que nos estágios iniciais da infecção as células dendríticas ativadas e não macrófagos, via IgG-FcγRs sejam essenciais para o desenvolvimento de imunidade protetora para a infecção.

Embora alguns estudos demonstrem em camundongos a importância da participação dos FcγRs na infecção por *Leishmania,* seja na proteção ou na patogênese da doença, não podemos considerar que no homem os mecanismos sejam semelhantes, pois são espécies diferentes, e muitos FcγRs humanos não apresentam homólogos em camundongos, tais como o FcγRIIA, FcγRIIC e FcγRIIIB humanos.

Em conclusão, nossos dados sugerem que não há relação entre o polimorfismo alélico do FcγRIIA – H/R131 com susceptibilidade ou resistência à Leishmaniose Tegumentar Americana, quando comparado a um grupo controle. Além disso, não evidenciamos associação entre o desenvolvimento de formas clínicas mais graves da doença, bem como com o tempo para resolução das lesões, com a expressão de diferentes padrões alotípicos deste receptor. Outros estudos considerando em conjunto diferentes fatores envolvidos na patogênese ou proteção a essa doença poderão auxiliar na elucidação da função desses receptores na LTA.

Referências

1. Cohen-Solal JFG, Cassard L, Fridman W-H, Sautès-Fridman C. Fc γ receptors. Immunol Lett **2004**; 92: 199-205.

2. Gerber JS, Mosser, DM. Stimulatory and inhibitory signals originating from the macrophage Fcγ receptors. Microbes Infect **2001**; 3: 131-139.

3. Nimmerjahn F, Bruhns P, Horiuchi K, Ravetch JV. FcγRIV: A novel FcR with distinct IgG subclass specificity. Immunity **2005**; 23: 41-51.

4. van de Winkel JGJ, Capel PJA. Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. Immunol Today **1993**; 14: 215-221.

5. Pleass RJ, Woof JM. Fc receptors and immunity to parasites. Trends Parasitol **2001**; 17: 545-561.

6. Moens L, Hoeyveld EV, Verhaegen J, De Boeck K, Peetermans WE, Bossuyt X. Fcγ-receptor IIA genotype and invasive pneumococcal infection. Clin Immunol **2006**; 118: 20-23.

7. Norris CF, Pricop L, Millard SS, et al. A naturally occurring mutation in FcγRIIA: a Q to K^{127} change confers unique IgG binding properties to the R^{131} allelic form of the receptor. Blood **1998**; 91: 656-662.

8. Clark MR, Stuart SG, Kimberly RP, Ory PA, Goldstein IM. A single amino acid distinguishes the high-responder from the low-responder form of Fc receptor II on human monocytes. Eur J Immunol **1991**; 21: 1911-1916.

9. Warmerdam PA, Van de Winkel JG, Vlug A, Westerdaal NA, Capel PJ. A single amino acid in the second Ig-like domain of the human Fc gamma receptor II is critical for human IgG2 binding. J Immunol **1991**; 147: 1338-1343.

10. Parren PWHI, Warmerdam PAM, Boeije LCM, et al. On the interaction of IgG subclasses with the low affinity FcγRIIa (CD32) on human monocytes, neutrophils and platelets: analysis of a functional polymorphism to human IgG2. J Clin Invest **1992**; 90: 1537-1546.

11. Tate BJ, Witort E, McKenzie IFC, Hogarth PM. Expression of the high responder / non responder human FcγRII: analysis by PCR and transfection into FcR – COS cells. Immunol Cell Biol **1992**; 70: 79-84.

12. Aucan C, Traoré Y, Tall F, et al. High immunoglobulin G2 (IgG2) and low IgG4 levels are associated with human resistance to *Plasmodium falciparum* malaria. Infec Immun **2000**; 68: 1252-1258.

13. Shi YP, Nahlen BL, Kariuki S, et al. Fcγ receptor IIa (CD32) polymorphism is associated with protection of infants agaist high-density Plasmodium falciparum infection. VII. Asembo bay cohort project. J Infect Dis **2001**; 184: 107-111.

14. Omi K, Ohashi J, Patarapotikul J, et al. Fcγ receptor IIA and IIIB polymorphisms are associated with susceptibility to cerebral malaria. Parasitol Int **2002**; 51: 361-366.

15. Yee AMF, Phan HM, Zuniga R, Salmon JE, Musher DM. Association between FcγRIIa-R131 allotype and bacteremic pneumococcal pneumonia. Clin Infect Dis **2000**; 30: 25-28.

16. Loke H, Bethell D, Phuong CXT, et al. Suscebility to dengue hemorrhagic fever in Vietnam: evidence of an association with variation in the vitamin D receptor and Fcγ receptor IIA genes. Am J Trop Med Hyg **2002**; 67: 102-106.

17. Peters C, Aebischer T, Stierhof YD, Fuchs M, Overath P. The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes. J Cell Sci **1995**; 108: 3715-3724.

18. Neves DP 2000. *Parasitologia Humana*. Atheneu, 10ª ed., São Paulo, xxvi + 428 pp.

19. Handman E, Bullen DVR. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. Trends Parasitol **2002**; 18: 332-334.

20. Alexander J, Russell DG. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. Adv Parasitol **1992**; 31: 175-254.

21. von Stebut E, Udey MC. Requirements for Th1-dependent immunity against infection with *Leishmania major.* Microbes Infect **2004**; 6: 1102-1109.

22. Carvalho EM, Barral-Neto M, Barral A, Broskyn CI, Bacellar O. Immunorregulation in leishmaniasis. Ciência e Cultura (Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science) **1994**; 46: 441-445.

23. Rogers KA, Dekrey GK, Mbow ML, Gillespie RD, Brodskyn CI, Titus RG. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. FEMS Micobiol Lett **2002**; 209: 1-7.

24. Rivas L, Moreno J, Cañavate C, Alvar J. Virulence and disease in leishmaniasis: what is relevant for the patient? TREND Parasitol **2004**; 20: 297-301.

25. Caceres-Dittmar G, Tapia FJ, Sanchez MA, et al. Determination of the cytokine profile in american cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. Clin Exp Immunol **1993**; 91: 500-505.

26. Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Oliveira, MP, Silva FC, Modlin RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. J Clin Invest **1993**; 91: 1390-1395.

27. Tapia FJ, Caceres-Dittmar G, Sanchez MA, Fernandez AE, Convit JA. The cutaneous lesions in American leishmaniasis: leukocyte subsets, cellular interaction and cytokine production. Biol Res **1993**; 26: 239-247.

28. Louzir H, Melby PC, Salah AB, et al. Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major.* J Infect Dis **1998**; 177: 1687-1695.

29. Rocha PN, Almeida RP, Bacellar O, et al. Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. J Infect Dis **1999**; 180: 1731-1734.

30. Bourreau E, Gardon J, Pradinaud R, Pascalis H, Prevót-Linguet G, Pascal L. Th2 response predominate during the early phases of infection in patients with localized cutaneous leishmaniasis and preced the development of Th1 responses. Infect Immun **2003**; 71: 2244-2246.

31. Bogdan C, Röllinghoff M, Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. Immunol Rev **2000**; 173: 17-26.

32. Kurane I, Innis BL, Nisalak A, Hoke C, Nimmannitya S. Human T cell responses to dengue virus antigens. J Clin Invest **1989**; 83: 506-513.

33. Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. Infec Immun **2002**; 70: 6734-6740.

34. Pinheiro RO, Pinto EF, Benedito AB, Lopes UG, Rossi-Bergmann B. The T-cell anergy induced by *Leishmania amazonensis* antigens is related with defective antigen presentation and apoptosis. Annals of the Brazilian Academy of Sciences **2004**; 76: 519-527.

35. Ferreira MV, Liu Q, Kaneko O, et al. Allelic diversity at the merozoite surface protein-1 locus of *Plasmodium falciparum* in clinical isolates from the Southwestern Brazilian Amazon. Am J Trop Med Hyg **1998**; 59: 474-480.

36. Jiang XM, Arepally G, Poncz M, McKenzie SE. Rapid detection of the FcγRIIA-H/R^{131} ligand-binding polymorphism using an allele-specific restriction enzyme digestion (ASRED). J Immunol Methods **1996**; 199: 55-59.

37. Kuwano ST, Bordin JO, Chiba AK, et al. Allelic polymorphisms of human Fcγ receptor IIa and Fcγ receptor IIb among distinct groups in Brazil. Transfusion **2000**; 40: 1988-1392.

38. Osborne JM, Chacko GW, Brandt JT, Anderson CL. Ethinic variation in frequency of allelic polymorphism of human FcγRIIA determined with allele specific oligonucleotide probes. J Immunol Methods **1994**; 173: 207-217.

39. Kima PE, Constant SL, Hannun L, et al. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. J Exp Med **2000**; 191: 1063-1067.

40. Kane MM, Mosser DM. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. J Immunol **2001**; 166: 1141-1147.

41. Miles SA, Conrad SM, Alves RG, Jeronimo SMB, Mosser DM. A role for IgG immune complexes during infection with the intracelular pathogen *Leishmania.* J Exp Med **2005**; 201:747-754.

42. Buxbaum LU, Scott P. Interleukin-10 and Fcγ receptor-deficient mice resolve *Leishmania mexicana* lesions. Infect Immun **2005**; 73: 2101-2108.

43. Woelbing F, Kostka SL, Moelle K, et al. Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. J Exp Med **2006**; 203: 177-188.

44. Padigel UM, Farrell JP. Control of Infection with *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice lacking the common γ-chain for FcR is associated with reduced production of IL-10 and TGF-β by parasitized cells. J Immunol **2005**; 174: 6340-6345.

5. CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que:

1. O polimorfismo alélico do FcγRIIA – H/R131 não está relacionado com proteção ou patogênese na Leishmaniose Tegumentar Americana;

2. As formas alotípicas do FcγRIIA – H/R131 apresentaram o mesmo padrão de distribuição genotípica e alélica no grupo de indivíduos com LTA e no grupo controle.

3. As diferentes formas alotípicas do FcγRIIA – H/R131 não influenciaram o desenvolvimento de formas clínicas mais brandas (cutânea) ou mais graves (mucosa e cutâneo-mucosa) da LTA.

4. O tempo de cura das lesões na forma cutânea da LTA parece não ser influenciado por este polimorfismo alélico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Murphy KM, Sher A 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383: 787-793.

Akiba H, Miyahira Y, Atsuta M, Takeda K, Nohara C, Futagawa T, Matsuda H, Aoki T, Yagita H, Okumura K 2000. Critical contributions of OX40 ligand to T helper cell type 2 differentiation in experimental leishmaniasis. *J Exp Med* 191: 375-380.

Alexander J, Russell DG 1992. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Adv Parasitol* 31: 175-254.

Amato VS, Andrade Jr HF, Neto VA, Duarte MIS 2003. Persistence of tumor necrosis factor-α *in situ* after lesion healing in mucosal leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 68: 527-528.

Amigorena S 2002. Fcγ receptors and cross-presentation in dendritic cells. *J Exp Med* 195: F1-F3.

Antoine JC, Prina E, Lang T, Courret N 1998. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol* 7: 392-401.

Aucan C, Traoré Y, Tall F, Nacro B, Traoré-Leroux T, Fumoux F, Rihet P 2000. High immunoglobulin G2 (IgG2) and low IgG4 levels are associated with human resistance to *Plasmodium falciparum* malaria. *Infec Immun* 68: 1252-1258.

Azulay RD, Azulay Jr DR 1995. Immune-clinical-pathologic spectrum of leishmaniasis. *Int J Dermatol* 34: 303-307.

Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Jesus AM, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM 2002. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infec Immun* 70: 6734-6740.

Barral-Netto M, Barral A, Brownell CE, Skeiky YA, Ellingsworth LR, Twardzik DR, Reed SG 1992. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science* 257: 545-548.

Bittencourt AL, Barral A 1991. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 51-56.

Blank C, Fuchs H, Rappersberger K, Röllinghoff M, Moll H 1993. Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with *Leishmania major*. J Infect Dis 167: 418-425.

Bourreau E, Gardon J, Pradinaud R, Pascalis H, Prevót-Linguet G, Pascal L 2003. Th2 response predominate during the early phases of infection in patients with localized cutaneous leishmaniasis and preced the development of Th1 responses. *Infect Immun* 71: 2244-2246.

Brodskyn CI, DeKrey GK, Titus RG 2001. Influence of costimulatory molecules on immune response to *Leishmania major* by human cells in vitro. *Infect Immun* 69: 665-672.

Brouwer KC, Lal RB, Mirel LB, Yang C, van Eijk AM, Ayisi J, Otieno J, Nahlen BL, Steketee R, Lal AA, Shi YP 2004. Polymorphism of Fc receptor IIa for IgG in infants is associated with susceptibility to perinatal HIV-1 infection. *AIDS* 18: 1187-1194.

Buxbaum LU, Scott P 2005. Interleukin-10 and Fcγ receptor-deficient mice resolve *Leishmania mexicana* lesions. *Infect Immun* 73: 2101-2108.

Caceres-Dittmar G, Tapia FJ, Sanchez MA, Yamamura M, Uyemura K, Modlin RL, Bloom BR, Convit J 1993. Determination of the cytokine profile in american cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin Exp Immunol* 91: 500-505.

Campbell KA, Ovendale PJ, Kennedy MK, Fanslow WC, Reed SG, Maliszewski CR 1996. CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to Leishmania major. Immunity 3: 283-289.

Carvalho EM, Johnson WD, Barreto E, Marsden, PD, Costa JLM, Reed S, Rocha H 1985. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *J Immunol* 135: 4144-4148.

Carvalho EM, Barral-Neto M, Barral A, Broskyn CI, Bacellar O 1994. Immunorregulation in leishmaniasis. *Ciência e Cultura (Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science)* 46: 441-445.

Castes M, AgnelliA, Rondon A 1984. Mechanism associated with immunoregulation in human American cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 57: 279-286.

Castes M, Tapia FJ 1998. Immunopathology of an tegumentary leishmaniasis. *Acta Cient Venez* 49: 42-56.

Clark MR, Stuart SG, Kimberly RP, Ory PA, Goldstein IM 1991. A single amino acid distinguishes the high-responder from the low-responder form of Fc receptor II on human monocytes. *Eur J Immunol* 21: 1911-1916.

Cohen-Solal JFG, Cassard L, Fridman W-H, Sautès-Fridman C 2004. Fc γ receptors. *Immunol Lett* 92: 199-205.

Convit J, Rondon AJ, Pinardi ME 1972. Diffuse cutaneous leishmaniasis – disease due to an immunological defect of host. *Tr Roy Soc Trop Med Hyg* 66: 603-608.

Cooke GS, Aucan C, Walley AJ, Segal S, Greenwood BM, Kwiatkowski DP, Hill AVS 2003. Association of Fcγ receptor IIa (CD32) polymorphism with severe malaria in west Africa. *Am J Trop Med Hyg* 69: 565-568.

Coutinho SG, Oliveira MP, Da-Cruz AM, De Luca, PM, Mendonça SCF, Bertho AL, Soong L, McMahon-Pratt D 1996. T-cell responsiveness of american cutaneous

leishmaniasis patients to purified Leishmania *pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania braziliensis* promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure. *Exp Parasitol* 84: 144-155.

Daëron M 1997. Fc receptor biology. *Annu Rew Immunol* 15: 203-234.

Duits AJ, Bootsma H, Derksen RHWM, Spronk PE, Kater L, Kallenberg C, Capel PJ, Westerdaal NJ, Spoerenburg GT, Gmelig-Meyling FH, van de Winkel JG 1995. Skewed distribuition of IgG Fc receptor Iia (CD32) polymorphism is associated with renal disease in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum* 38: 1832-1836.

Farrel JP, Kirkpatrick 1987. Experimental cutaneous leishmaniasis. A possible role for prostaglandins in exacerbation of disease in *Leishmania major*-infected BALB/c mice. *J Immunol* 138: 902-907.

Ferreira, MV, Liu, Q, Kaneko O, Kimura M, Tanabe K, Kimura EAS, Katzin AM, Isomura S, Kawamoto F 1998. Allelic diversity at the merozoite surface protein-1 locus of *Plasmodium falciparum* in clinical isolates from the Southwestern Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 59: 474-480.

Gerber JS, Mosser, DM 2001. Stimulatory and inhibitory signals originating from the macrophage Fcγ receptors. *Microbes Infect* 3: 131-139.

Gomes NA, DosReis GA 2001. The dual role of CTLA-4 in *Leishmania* infection. *Trends Parasitol* 17: 487-491.

Gorelik L, Constant S, Flavell RA 2002. Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. J Exp Med 195: 1499-1505.

Guy RA, Belosevic M 1993. Comparison of receptors required for entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages. *Infect Immun* 61: 1553-1558.

Handman E, Bullen DVR 2002. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol* 18: 332-334.

Hermoso T, Fishelson Z, Becker SI, Hirschberg K, Jaffe CL 1991. Leishmanial protein kinases phosphorilate components of the complement system. *EMBO J* 10: 4061-4067.

Ilgoutz SC, McConville 2001. Function and assembly of the *Leishmania* surface coat. *Int J Parasitol* 31: 899-908.

Jiang XM, Arepally G, Poncz M, McKenzie SE 1996. Rapid detection of the FcγRIIA-H/R^{131} ligand-binding polymorphism using an allele-specific restriction enzyme digestion (ASRED). *J Immunol Methods* 199: 55-59.

Kamanaka M, Yu P, Yasui T, Yoshida K, Kawabe T, Horii T, KishimotoT, Kikutane H 1996. Protective role of CD40 in *Leishmania major* infection at two distinct phases of cell mediated immunity. *Immunity* 3: 275-281.

Kane MM, Mosser DM 2001. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol* 166: 1141-1147.

Kanto T, Hayashi N, Takehara T, Katayama K, Ito A, Mochizuki K, Kuzushita N, Tatsumi T, Sasaki Y, Kasahara A, Hori M 1998. Cross-linking of Fc (gamma)-receptor on monocytes inhibits hepatitis C virus-specific cytotoxic T-lynfocyte induction in vitro. *Immunology* 94: 461-468.

Kemp M 1997. Regulator and effector functions of T-cell subsets in human *Leishmania* infections. *APMIS Suppl* 68: 1-33.

Kima PE, Constant SL, Hannun L, Colmenares M, Lee KS, Haberman AM, Shlomchik MJ, McMahon-Pratt D 2000. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 191: 1063-1067.

Li J, Hunter CA, Farrel JP 1999. Anti-TGF-beta treatment promotes rapid healing of *Leishmania major* infection in mice by enhancing in vivo nitric oxide production. *J Immunol* 162: 974-979

Liew FY, Li Y, Millott S, 1990. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J Immunol* 145: 4306-4310.

Liu Y, Wei SH, Ho AS, de Waal Malefyt R, Moore KW 1994. Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor. *J Immunol* 152:1821-1829.

Loke H, Bethell D, Phuong CXT, Day N, White N, Farrar J, Hill A 2002. Suscebility to dengue hemorrhagic fever in Vietnam: evidence of an association with variation in the vitamin D receptor and Fcγ receptor IIA genes. *Am J Trop Med Hyg* 67: 102-106.

Pleass RJ, Woof JM 2001. Fc receptors and immunity to parasites. *Trends Parasitol* 17: 545-561.

Louzir H, Melby PC, Salah AB, Marrakchi H, Aoun K, Ismail RB, Dellagi K 1998. Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major. J Infect Dis* 177: 1687-1695.

Marsella R, Gopegui RR 1998. Leishmaniasis: a re-emerging zoonosis. *Int J Dermatol* 37: 801-814.

Mbow ML, Dekrey GK, Titus RG 2001. *Leishmania major* induces differential expression of co-stimulatory molecules on mouse epidermal cells. *Eur J Immunol* 31: 1400-1409.

Metes D, Ernst LK, Chambers WH, Sulica A, Herberman RB, Morel PA 1998. Expression of functional CD32 molecules on human NK cells is determined by an allelic polymorphism of the FcγRIIC gene. *Blood* 91: 2369-2380.

Miles SA, Conrad SM, Alves RG, Jeronimo SMB, Mosser DM 2005. A role for IgG immune complexes during infection with the intracelular pathogen *Leishmania. J Exp Med* 201:747-754.

Moens L, Hoeyveld EV, Verhaegen J, De Boeck K, Peetermans WE, Bossuyt X 2006. Fcγ-receptor IIA genotype and invasive pneumococcal infection. *Clin Immunol* 118: 20-23.

Moll H, Flohé S, Röllinghoff M 1995. Dendritic cells in *Leishmania major*-immune mice harbor persistent parasites and mediate an antigen-specific T cell immune response *Eur J Immunol* 25: 693-699.

Neves DP 2000. *Parasitologia Humana*. Atheneu, 10ª ed., São Paulo, xxvi + 428 pp.

Nimmerjahn F, Bruhns P, Horiuchi K, Ravetch JV 2005. FcγRIV: A novel FcR with distinct IgG subclass specificity. *Immunity* 23: 41-51.

Noben-Trauth N, Kropf P, Müller I 1996. Susceptibility to *Leishmania major* infection in interleukin-4-deficient mice. *Science* 271: 987-990.

Norris CF, Pricop L, Millard SS, Taylor SM, Surrey S, Schwartz E, Salmon JE, Mckenzie SE 1998. A naturally occurring mutation in FcγRIIA: a Q to K^{127} change confers unique IgG binding properties to the R^{131} allelic form of the receptor. *Blood* 91: 656-662.

Omi K, Ohashi J, Patarapotikul J, Hananantachai H, Naka I, Looareesuwan S, Tokunaga K 2002. Fcγ receptor IIA and IIIB polymorphisms are associated with susceptibility to cerebral malaria. *Parasitol Int* 51: 361-366.

Padigel UM, Farrell JP 2005. Control of Infection with *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice lacking the common γ-chain for FcR is associated with reduced production of IL-10 and TGF-β by parasitized cells. *J Immunol* 174: 6340-6345.

Parren PWHI, Warmerdam PAM, Boeije LCM, Arts J, Westerdaal NAC, Vlug A, Capel PJA, Aarden LA, van de Winkel JGJ 1992. On the interaction of IgG subclasses with the low affinity FcγRIIa (CD32) on human monocytes, neutrophils

and platelets: analysis of a functional polymorphism to human IgG2. *J Clin Invest* 90: 1537-1546.

Paul WE, Seder RA 1994. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76: 241-251.

Peters C, Aebischer T, Stierhof YD, Fuchs M, Overath P 1995. The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes. *J Cell Sci* 108: 3715-3724.

Pinheiro RO, Pinto EF, Benedito AB, Lopes UG, Rossi-Bergmann B 2004. The T-cell anergy induced by *Leishmania amazonensis* antigens is related with defective antigen presentation and apoptosis. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 76: 519-527.

Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Oliveira, MP, Silva FC, Modlin RL 1993. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest* 91: 1390-1395.

Pleass RJ, Woof JM 2001. Fc receptors and immunity to parasites. *Trends Parasitol* 17: 545-561.

Puentes SM, Silva RP, Sacks DL, Hammer CH, Joiner KA 1990. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *Immunol* 145: 4311-4316.

Ravetch JV, Bolland S 2001. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 19: 275-290.

Regnault A, Lankar D, Lacabanne V, Rodriguez A, Théry C, Rescigno M, Saito T, Verbeek S, Bonnerot C, Ricciardi-Castagnolli P, Amigorena S 1999. Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med* 189: 371-380.

Rittig MG, Bogdan C 2000. *Leishmania*-host-cell interation: complexities and alternative views. *Parasitol Today* 16: 292-297.

Rivas L, Moreno J, Cañavate C, Alvar J 2004. Virulence and disease in leishmaniasis: what is relevant for the patient? *Trends Parasitol* 20: 297-301.
von Stebut E, Udey MC 2004. Requirements for Th1-dependent immunity against infection with *Leishmania major. Microbes Infect* 6: 1102-1109.

Rocha PN, Almeida RP, Bacellar O, de Jesus AR, Filho CD, Filho AC, Barral A, Coffman RL, Carvalho EM 1999. Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* 180: 1731-1734.

Rogers KA, Dekrey GK, Mbow ML, Gillespie RD, Brodskyn CI, Titus RG 2002. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *FEMS Micobiol Lett* 209: 1-7.

Rouzer CA, Scott WA, Kempe J, Cohn ZA 1980. Prostaglandin synthesis by macrophages requires a specific receptor-ligand interection. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 4279-4282.

Sacks DL, Perkins P 1984. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science* 223: 1417-1419.

Sedlik C, Orbach D, Veron P, Schweighoffer E, Colucci F, Gamberale R, Ioan-Facsinay A, Verbeek S, Ricciardi-Castagnoli P, Bonnerot R, Tybulewicz VLJ, Di Santo J, Amigorena S 2003. A critical role for syk protein tyrosine kinase in Fc receptor-mediated antigen presentation and induction of dendritic cell maturation. J Immunol 170: 846-852.

Shi YP, Nahlen BL, Kariuki S, Urdahl KB, McElroy PD, Roberts JM, Lal AA 2001. Fcγ receptor IIa (CD32) polymorphism is associated with protection of infants agaist high-density Plasmodium falciparum infection. VII. Asembo bay cohort project. *J Infect Dis* 184: 107-111.

Sibéril S, Dutertre C-A, Boix C, Bonnin E, Ménez R, Stura ES, Jorieux S, Fridman W-H, Teillaud J-L 2006. Molecular aspects of human FcγR interactions with IgG: functional and therapeutic consequences. *Immunol Lett* 106: 111-118.

Soares MBP, David JR, Titus RG 1997. An in vitro model for infection with *Leishmania major* that mimics the immune response in mice. Infect Immun 65: 2837-2845.

Solbach W, Laskay T 2000. The host response to *Leismmania* infection. *Adv Immunol* 74: 275-317.

Tapia FJ, Caceres-Dittmar G, Sanchez MA, Fernandez AE, Convit JA 1993. The cutaneous lesions in American leishmaniasis: leukocyte subsets, cellular interaction and cytokine production. *Biol Res* 26: 239-247.

Tate BJ, Witort E, McKenzie IFC, Hogarth PM 1992. Expression of the high responder / non responder human FcγRII: analysis by PCR and transfection into FcR – COS cells. *Immunol Cell Biol* 70: 79-84.

van de Winkel JGJ, Capel PJA 1993. Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol Today* 14: 215-221.

Vieira MGS, Oliveira F, Arruda S, Bittencourt AL, Barbosa Jr AA, Barral-Netto M, Barral A 2002. B-cell infiltration and frequency of citokine producing cells differ between localized and disseminated human cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 979-983.

von Stebut E, Belkaid Y, Nguyen BV, Cushing M, Sacks DL, Udey MC 2000. *Leishmania major*-infected murine Langerhans cell-like dendritic cells from susceptible mice release IL-12 after infection and vaccinate against experimental cutaneous leishmaniasis. *Eur J Immunol* 30: 3498-3506.

von Stebut E, Udey MC 2004. Requirements for Th1-dependent immunity against infection with *Leishmania major. Microbes Infect* 6: 1102-1109.

Warmerdam PA, van de Winkel JG, Vlug A, Westerdaal NA, Capel PJ 1991. A single amino acid in the second Ig-like domain of the human Fc gamma receptor II is critical for human IgG2 binding. *J Immunol* 147: 1338-1343.

Wiertsema SP, Veenhoven RH, Walraven V, Uiterwaal CSPM, Schilder AGM, Sanders EAM 2006. Pneumococcal vaccine efficacy for mucosal pneumoccocal infections depends on Fcγ receptor Iia polymorphism. *Vaccine* 24: 792-797.

Wilhelm P, Ritter U, Labbow S, Donhauser N, Röllinghoff M, Bogdan C, Korner H 2001. Rapidly fatal leishmaniaisis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF. *J Immunol* 166: 4012-4019.

Woelbing F, Kostka SL, Moelle K, Belkaid Y, Sunderkoetter C, Verbeek S, Waisman A, Nigg AP, Knop J, Udey MC, von Stebut E 2006. Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *J Exp Med* 203: 177-188.

Yee AMF, Ng SC, Sobel RE, Salmon JE 1997. FcγRIIA polymorphism as a risk factor for invasive pneumococcal infections in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 40: 1180-1181.

Yee AMF, Phan HM, Zuniga R, Salmon JE, Musher DM 2000. Association between FcγRIIa-R131 allotype and bacteremic pneumococcal pneumonia. *Clin Infect Dis* 30: 25-28.

7. ANEXOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
HOSPITAL DAS CLÍNICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA MÉDICA HUMANA E ANIMAL

PARECER

I - Identificação:

Título do projeto: *Aprimoramento e Desenvolvimento de Técnicas de Diagnóstico para o Estudo de Leishmanioses no Estado de Goiás.*

Pesquisador responsável: Dr. Marco Túlio A. Garcia-Zapata.

Instituição onde se realizará: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG.

Data de apresentação ao CEP: 03-08-98.

II - Objetivos:

1. Avaliar e comparar as técnicas de diagnóstico tradicionais em termos de eficiência e custo-beneficio.
2. Implantar técnicas modernas de diagnóstico, eficientes e viáveis como ELISA e PCR.
3. Validar a aplicabilidade das técnicas de ELISA e PCR no diagnóstico das Leishmanioses.
4. Organizar, sistematizar e promover a formação de recursos humanos no Estado de Goiás.

III - Sumário do projeto:

Descrição e caracterização da amostra:
Critérios de inclusão e exclusão
Adequação da metodologia
Adequação das condições

Obs.: Todos estes dados estão descritos, com pormenores e satisfatoriamente, nos itens 1.PACIENTES, 2. DIAGNÓSTICO CLÍNICO, 3. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL PARASITOLÓGICO, 3 (SIC). DIAGNÓSTICO LABORATORIAL SORO-IMUNOLÓGICO, 4.DIAGNÓSTICO IMUNO-HISTOPATOLÓGICO e 5. DIAGNÓSTICO MOLECULAR da proposta submetida ao Comitê e sob exame.

IV - Parecer:

O objetivo da pesquisa é o de aprimorar técnicas de diagnóstico da Leishmaniose no Estado de Goiás, utilizando, como objeto de estudos, pacientes atendidos no Hospital de Doenças Tropicais do Estado de Goiás (HDT) e em outros hospitais da rede pública. O parasito será cultivado "in vitro" e inoculado, para infecção experimental, em hamster ou Balb/c. O antígeno será inoculado intradermicamente nos pacientes para posteriores leituras dos resultados dos testes.

O termo de consentimento a ser firmado pelos pacientes é claro e a folha de rosto traz os dados necessários à individuação dos trabalhos e dos responsáveis, da instituição em que será realizada a pesquisa e das participantes.

Proponho aprovação, s.m.j.

Em 08-09-1998 - Joel Pimentel de Ulhôa.

061/98

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA MEDICA HUMANA E ANIMAL
HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
MINISTERIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO

PROTOCOLO N º 00161/98.

AUTOR (ES): Dr. Marco Túlio A. Garcia Zapata

TÍTULO: Aprimoramento e Desenvolvimento de Técnicas de Diagnóstico para o Estudo de Leishmanioses no Estado de Goiás.

Comunicamos-lhe (s) que o seu Protocolo de Pesquisa foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes, tendo sido, portanto, aprovado por este Comitê para sua realização.

Goiânia, 10 de setembro de 1.998

PROF. DR. HEITOR ROSA
Presidente

"Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da UFG"
Presidente

Universidade Federal de Goiás (UFG)
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP)

Goiânia, 07 de Julho de 1998

Ao Ilmo Senhor
Presidente da Comissão de Ética do HDT – SUS/GO
Goiânia – GO

Prezado Senhor,

De acordo com o artigo 7, δ 3°, da R-01/88 do Conselho nacional de Saúde, encaminhamos para o seu conhecimento, apreciação e avaliação pela Comissão de Ética do HDT – SUS/GO, a Proposta do Projeto Integrado de Pesquisa: **"Aprimoramento e desenvolvimento de técnicas de diagnóstico para o estudo de Leishmanioses no estado de Goiás".**

Sem mais, no momento ficamo-lhe a sua inteira disposição para o que considerar conveniente,

Atenciosamente,

Dr. Marco Tulio A García-Zapata
Coordenador do Projeto
Caixa Postal 12911 – Ag. Anhanguera
Fax: (062) 202-3066
E-mail: zapata@iptsp.ufg.br

Dr. Heloísa Chaves de Castro
Médica
HDT
29/07/98

Parecer favorável
à resolução

Aprovado p/
unanimidade de
votos da
Ética do HDT

INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA/UFG
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA
Rua Delenda Rezende de Melo – S/N – Setor Universistário – 74605-050 – Goiânia – Goiás
Tel. (062) 261-6497 – Ramal 218 – Fax: 202 – 3066

HOSPITAL ANUAR AUAD (HDT)/SES
Av. Contorno S/N – Jardim Bela Vista – 74853-400 – Goiânia – Goiás

TERMO DE CONSENTIMENTO

Projeto: **"Aprimoramento e desenvolvimento de técnicas de diagnóstico para o estudo de Leishmanioses no estado de Goiás."**

Pelo presente termo de consentimento, manifesto voluntariamente minha concordância em participar do estudo acima intitulado. Foram-me informados todos os procedimentos relacionados à minha participação neste estudo, os quais consistem em realização de exame clínico, coleta de amostras no local da lesão de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), através de biópsia e aspiração subcutânea no bordo da lesão, aplicação do teste de intradermoreação de Montenegro para diagnóstico imunológico da LTA, coleta de sangue para avaliação da resposta imunológica contra o parasito.

Os exames serão realizados antes do início do tratamento e após 3, 6, 12 e 18 meses.

As implicações relacionadas à minha participação neste estudo foram bem esclarecidas pela equipe responsável.

Tive oportunidade e fui incentivado a pedir qualquer esclarecimento adicional pela que julgasse necessário, sobre qualquer questão relacionada à minha participação no estudo, e cada uma destas questões foi esclarecida pela equipe.

Estou certo que os resultados e conclusões obtidas pelo desenvolvimento deste estudo, poderão contribuir para o melhor conhecimento da LTA e, conseqüentemente, para suportar a adoção de novas medidas para o seu efetivo controle.

Minha privacidade será garantida quando das publicações científicas oriundas deste estudo.

.....
Nome do paciente

.....de.....2000
Local e data

.....
Responsáveis pela pesquisa: Dra. Miriam C. Leandro Dorta
Ms. Ledice Inácia

UFG

PROTOCOLO Nº 028/2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER CONSUBSTANCIADO

I – Identificação:

- Título do projeto: Diversidade alélica do receptor FCγRIIA em crianças com infecções bacterianas do Hospital materno infantil de Goiânia.
- Pesquisador Responsável: Lucimeire Antonella da Silveira
- Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
- Data de apresentação ao COEP:15/03/2004

II – Objetivos:

O trabalho visa analisar o padrão de diversidade alélica dos receptores para IgG em crianças com história de infecções bacterianas, atendidas no Hospital Materno Infantil/ Goânia-GO. Além disto, será feito o isolamento e caracterização do patógeno quando possível e caracterização da resposta imune humoral de acordo com os subtipos de imunoglobulinas presentes no soro/saliva, relacionando sempre com o perfil alelico dos receptores para IgG dos pacientes.

III – Sumário do projeto:

- **Descrição e caracterização da amostra**:
    - Amostras de sangue venoso de doadores homens ou mulheres do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas/UFG serão utilizados como controles.
    - Amostra de saliva de crianças com infecção bacteriana e aquelas comprovadamente sem infecção bacteriana colhidas para rotina no Hospital Materno Infantil, Goiânia,GO com intuito de diagnóstico ou acompanhamento terapêutico serão aproveitadas nesta pesquisa.

- **Critérios de inclusão e exclusão**: Será coletado material de crianças com ou sem infecção bacteriana no período de agosto de 2004 a agosto de 2006.
- **Adequação da metodologia**: A metodologia é considerada adequada e os pesquisadores participantes possuem experiência para condução do projeto.
- **Adequação das condições**: O material coletado será o excedente para exames de rotina no Hospital Materno Infantil ou do banco de sangue do Hospital das Clínicas, os quais têm condições para executar a coleta apropriadamente. A realização das análises será nos Laboratórios do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública que têm as condições necessárias para execução do trabalho proposto.

IV – Comentários do relator frente à Resolução CNS 196/96 e complementares em particular sobre:

- Estrutura do protocolo: O protocolo é adequado e claro, porém incompleto.
- Análise de riscos e benefícios: A metodologia proposta não apresenta riscos significativos para o sujeito da pesquisa.
- Estrutura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Adequado e claro
- Forma de obtenção do Termo de Consentimento: Será aplicado no atendimento inicial ao paciente ou doador.
- Privacidade e confidencialidade: Foi garantido no termo de consentimento livre e esclarecido.

V – Parecer do COEP:

A pesquisa pode fornecer subsídios para uma maior compreensão sobre a diversidade genética do receptor para IgG e predisposição de pacientes a infecções bacterianas. Como a obtenção desta informação não irá acarretar danos significativos aos pacientes/ doadores, sou favorável a aprovação deste projeto desde que seja acrescentado a ele:
Autorização por escrito e assinada do Dr. Vardeli Alves de Morais concordando com a pesquisa no Hospital Materno Infantil.

VI – Data da reunião: 15/04/2004

Assinatura do relator:

Assinatura do Coordenador/COEP:

AUTORIZAÇÃO

Em atendimento a solicitação do relator do Comitê de Ética da Universidade Federal de Goiás (COEP), Eu, Dr Vardeli Alves de Moraes, concordo com a realização do projeto de pesquisa "Diversidade alélica do receptor FcγRIIA em crianças com infecções bacterianas do Hospital Materno Infantil", bem como, com o uso das amostras biológicas, conforme descrito em Materiais e Métodos do referido Projeto.

Sem mais para o momento, Agradeço

Goiânia, 23 de março de 2004.

Dr. Vardeli Alves de Moraes
Diretor do Hospital Materno Infantil

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIAS
LAB. IMUNOLOGIA CELULAR DO INSTITUTO DE PATOLOGIA E SAÚDE PÚBLICA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL, SAÚDE COLETIVA E DERMATOLOGIA
HOSPITAL ANUAR AUAD (HDT)

FICHA DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE

1. DIAGNÓSTICO: ( )

Cutânea (1) **Mucosa (2)** **Cutâneo-Mucosa (3)** **Difusa (4)**

Nº Protocolo:.....

Data:...../...../.....

Nome:.....

.....

Endereço:.....

.....

.....**Telefone contato**:.....

Idade:.....anos **Sexo:** Masculino (1) Feminino (2)

2. Local do provável contágio: ( )

- Goiás interior urbano (1).....
- Goiás interior rural (2).....
- Outro Estado interior rural (3).....
- Outro Estado interior urbano (4).....

Último dia no local:...../...../..... **Características do local**:.....

.....

.....

.....

Profissão atual:.....

Profissão antes do início da doença:.....

3. Tipo de atendimento: ( )

Ambulatório (1) Internação (2) Amb + Internação (3)

4. HDA:.....

.....

.....

.....

Tempo de aparecimento das lesões:.....

Tratamento anterior: Sim (1) Não (2) Qual:.....

Apresenta cicatriz sugestiva de LTA: Sim (1) Não (2)

Há quanto tempo apresentou a lesão?.....

5. EXAME FÍSICO ( )

Lesão: Pele (1) Mucosa (2) Pele+mucosa (3)

Nº de lesões de pele: Única (1) Múltiplas (2) Nº..... Disseminadas (3)

Tipo de lesão: Ulcerada (1) Verrucosa (2) Nodular (3) Outro tipo (4)

Descrição:.....
.....

Tamanho das lesões:.....

Local da lesão: Cabeça (1) Pescoço (2) Tronco (3) Braço (4)
Antebraço (5) Mão (6) Coxa (7) Perna (8) Pé (9)

Adenomegalia satélite: Sim (1) Não (2)

Nº de lesões na mucosa:.....

Locais das lesões Mucosa:

Mucosa nasal (1) Perfuração de septo (2) Gengiva (3) Mucosa oral (4) Palato (5)
Língua (6) Úvula (7) Amígdalas (8) Faringe (9) Laringe (10)

Tipos de lesões mucosas:
Ulcerada (1) Eritêmato-edematosa (2) Outro tipo (3)
Descrever:.....
.....

Aparelho Cardiovascular: Normal (1) Alterado (2)
Descrever:.....
.....

Aparelho respiratório: Normal (1) Alterado (2)
Descrever:.....
.....

Abdome: Normal (1) Alterado (2)
Descrever:.....
.....

Descrever outras alterações:.....
.....
.....

Patologias Associadas: Sim (1) Não (2)

Descrever:.....
.....

6. TRATAMENTO:

Antimonial Pentavalente (1) Anfoterecina B (2) Pentamidina (3) Outros: (4)

Descrever:.....

Esquema (s):.....

7. EXAMES LABORATORIAIS:

Hemograma: Normal (1) Alterado (2)

Descrever:.....

.....

Eletroforese de proteínas: Normal (1) Alterado (2)

Descrever:.....

.....

.....

Dosagem de Imunoglobulinas totais:

IgG:..... IgM:.....

IgA:..... IgE:.....

Exame Direto: Amastigotas presentes (1) Amast. ausentes (2) Não realizado (3)

Biópsia: Fragmento para Histopatológico: Sim (1) Não (2)

Fragmento para Cultura *in vitro* e *in vivo*: Sim (1) Não (2)

Resultado da Cultura:.....

Histopatológico ( )

Processo Inflamatório Crônico granulomatoso com amastigotas (1)

Processo Inflamatório Crônico granulomatoso sem amastigotas (2)

Processo Inflamatório Crônico inespecífico (3)

Macrófagos + *Leishmania* sem granuloma (4)

Descrever: .....

.....

.....

.....

.....

Onde foi realizado:.....

Data...../...../..... N° exame:.....

Testes intradérmicos

IR Montenegro: Positivo.....mm (1)		Neg. (2)	Não realizado (3)
PPD: Positivo.....mm (1)		Neg. (2)	Não realizado (3)
IR Paracoccidioidina:	Positivo.....mm (1)	Neg. (2)	Não realizado (3)
IR Candidina: Positivo.....mm (1)		Neg. (2)	Não realizado (3)

Exames Sorológicos

IFI: Título.....(1) Não realizado (2)

ELISA: IR.....(1) Não realizado (2) **IR >1,0 = Positivo**

8. EVOLUÇÃO

Retorno após 30 dias do início do tratamento: Data...../...../.....

Exame Clínico: Cura clínica (1) Melhor (2) Inalterado (3) Pior (4)

Tomou a medicação corretamente ? Sim (1) Não (2)

Efeito colaterais da medicação; Sim (1) Não (2)

Descrever:.....

.....

Conduta:.....

.....

.....

Avaliação	3m ...../...../.....	6m ...../...../.....	12m ...../...../.....	18m ...../...../.....
Exame clínico	.....	.....	.....	.....
Hemograma	.....	.....	.....	.....
Eletroforese de Proteínas	.....	.....	.....	.....
IR Montenegro	.....	.....	.....	.....
RIFI (Título)	.....	.....	.....	.....
ELISA (IR)	.....	.....	.....	.....
Tratamento	.....	.....	.....	.....
PCR	.....	.....		
Observações	.....	.....	.....	.....

U F G

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E DE SAÚDE PÚBLICA
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás pelo telefone 521-1075 ou 521-1076.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Titulo do Projeto: Diversidade alélica do receptor FcγRIIA em crianças com infecções bacterianas do Hospital materno Infantil de Goiânia.

Pesquisador Responsável : Lucimeire Antonelli da Silveira

Telefone para contato (inclusive ligações a cobrar): 62- 2096119

Pesquisadores participantes: Fabiana Cristina Pimenta, Gabiela Rebouças Araújo, Cristina Rodriguez de Oliveira.

Telefones para contato : 62- 2096119

Pedimos sua autorização para utilizar em nosso projeto de pesquisa a sua amostra de sangue/saliva coletada, com o objetivo de estudarmos se existe ou não uma predisposição genética (alguns genes que foram herdados de seus antepassados) que favoreça a instalação de um quadro clínico mais severo quando infectado por agentes patogênicos presentes em nosso meio ambiente. Não há risco de qualquer tipo de prejuízo para sua pessoa ou de seu filho(a). Este projeto de pesquisa poderá trazer como benefício um maior entendimento sobre como seu organismo interage com os agentes microbianos que o agridem, isto repercutirá, a longo prazo, na forma de lidar com a doença, consequentemente na melhoria das formas de prevenção e tratamento desta. No caso de publicação dos resultados desta pesquisa, garantimos a você o sigilo quanto aos seus dados pessoais e com relação as informações a nós prestadas. Igualmente damos –lhe o direito de negar-se a participar desta pesquisa sem qualquer prejuízo ou danos ao seu tratamento ou acompanhamento terapêutico. De qualquer forma, agradecemos, nos colocando a sua disposição, pessoalmente ou através do telefone acima, para prestar-lhe maiores esclarecimentos.

Lucimeire Antonelli da Silveira/Gabriela Rebouças Araújo

Consentimento de Participação Neste Projeto de Pesquisa

Eu, _____, RG/ CPF/ n.º de prontuário/ n.º de matrícula _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo _____, como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador _____ sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Local e data _____

Nome e Assinatura do sujeito ou responsável: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____ Assinatura: _____

Nome: _____ Assinatura: _____

Observações complementares