

AVALIAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS EXPRESSANDO CD14 E CD16 EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Ledice I A PEREIRA, Hélio GALDINO Jr, Ildelfonso Alves DA SILVA Jr, Valéria Bernadete Leite QUIXABEIRA, Miriam Leandro DORTA, Milton Adriano Pelli de OLIVEIRA, Fátima RIBEIRO-DIAS

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia

Introdução

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença causada, no Brasil, por três principais espécies de parasitos do gênero *Leishmania* que pertencem a dois subgêneros: (1) *Viannia*, representado, principalmente, pelas espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*, associadas com lesões cutâneas localizadas e ulceradas, disseminadas ou mucosas (oral, nasofaríngea) e (2) *Leishmania*, representado pela espécie *L. (L.) amazonensis*, associada com o desenvolvimento de lesões cutâneas localizadas ou com a forma difusa da LTA (Gontijo & Carvalho, 2003; Brasil, 2007). Em seres humanos, as características do parasito e da resposta imune do hospedeiro definem a ampla diversidade de formas clínicas da infecção causada por *Leishmania*, porém, independente de qual seja a espécie envolvida, a cura clínica é obtida após indução de eficiente resposta imune celular (perfil de linfócitos Th1). A predominância de citocinas Th1 (interferon gama, IFN γ , fator de necrose tumoral, TNF) parece ser o perfil mais comumente encontrado na leishmaniose cutânea localizada (LCL) (Cáceres-Dittmar et al., 1993; Pirmez et al., 1993; Convit et al., 1993) e o aumento do IFN γ e a diminuição do TNF parecem ser necessários para a obtenção da cura (D'Oliveira Jr et al., 2002). A modulação da resposta imune celular é feita por citocinas, tais como a interleucina 10 (IL-10), que é considerada anti-inflamatória e imunossupressora. Em resposta a antígenos de *Leishmania*, os linfócitos de pacientes com LM produzem altas quantidades de IFN γ e TNF e baixa quantidade de IL-10. Além disto, os linfócitos dos pacientes parecem resistentes à ação inibitória da IL-10 (Bacellar et al., 2002). Enquanto em pacientes com LCL há uma correlação positiva entre o número de monócitos produzindo TNF e IL-10, naqueles com leishmaniose mucosa (LM), não há esta correlação,

sugerindo que haja um desequilíbrio na produção de TNF e IL-10, o que pode favorecer uma reação inflamatória exacerbada (Gaze et al., 2006).

No sangue periférico, distintas subpopulações de monócitos podem ser observadas de acordo com a expressão das moléculas CD14 e CD16. O CD14 é um co-receptor do TLR4 (*Toll-like receptor 4*), que é o receptor do lipopolissacarídeo (LPS) de certas bactérias Gram negativas e o CD16 é o receptor de baixa afinidade para a imunoglobulina G (FcγRIII). As subpopulações de monócitos podem produzir diferentes citocinas, mostrando um perfil mais ou menos inflamatório (Ziegler-Heitbrock, 1996; Skrzeczynska-Moncznik et al., 2008). Porque durante os processos inflamatórios pode haver alteração nas subpopulações dos monócitos, foi proposto recentemente que as subpopulações de monócitos sejam nominadas apenas de acordo com os marcadores de membrana e não pelas suas atividades pró ou antiinflamatórias. Sendo assim, em condições fisiológicas podem ser detectadas três subpopulações de monócitos no sangue periférico humano: os clássicos (CD14^{hi}CD16⁻), os intermediários (CD14^{hi}CD16⁺) e os não clássicos (CD14^{lo}CD16⁺) (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Na LTA, foi demonstrado que os pacientes com LCL apresentam um elevado número de monócitos CD14⁺CD16⁺ e uma maior intensidade de expressão do CD16 nestes monócitos, quando comparados com controles sadios (Soares et al., 2006). Neste estudo, foi demonstrada uma associação entre o número dos monócitos CD16⁺ e a gravidade da doença. Apesar dos vários estudos sobre a imunologia da LTA, uma compreensão dos mecanismos que levam ao controle ou à persistência dos parasitos ainda é pobre. Um desequilíbrio entre as subpopulações de monócitos circulantes poderia estar envolvido na imunopatogenia da LTA. Portanto, neste trabalho o **objetivo** foi avaliar a frequência das subpopulações de monócitos do sangue periférico de pacientes com LTA e a expressão de TNF e IL-10 nos monócitos CD14⁺.

Material e Métodos

Foram incluídos no trabalho pacientes (n = 34) virgens de tratamento e indivíduos sadios (n = 32), dos gêneros masculino e feminino, com idade variando de 18 a 60 anos. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética (CoEP/UFG). O sangue venoso heparinizado foi submetido a tratamento com anticorpos anti-CD14-APC, anti-CD16-PECy5, anti-TNF-FITC e anti-IL-10-PE para citometria de fluxo. O sangue foi diluído

(v/v) em meio RPMI 1640 e incubado na ausência ou presença de lipopolissacarídeo (LPS, 100 ng/mL) por 6 h, a 37°C, sob agitação. Após a hemocultura, novamente o sangue foi tratado com os anticorpos para citometria de fluxo. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur, BD, sendo obtidos 50.000 eventos totais e 10.000 eventos na janela dos monócitos CD14⁺. Os dados foram analisados pelo programa FCS Express v4. Os resultados foram expressos em valores individuais (%), medianas % [valor mínimo - máximo], sendo comparados por testes não pareado Mann Whitney e pareado de Wilcoxon, utilizando o programa GraphPad PRISM V.3 (San Diego, CA, EUA).

Resultados/Discussão

A população de monócitos CD14^{hi}CD16⁺ está aumentada em pacientes com LTA: As subpopulações de monócitos (Fig. 1A) foram avaliadas de acordo com a expressão das moléculas CD14 e CD16 (Fig. 1B) no sangue recém-colhido de pacientes com LTA e indivíduos saudáveis. As análises mostraram que a porcentagem da subpopulação de monócitos CD14^{hi}CD16⁺ está significativamente aumentada no sangue dos pacientes (4,5% [de 0,9 a 33%] x 2,6% [0,04 a 15,5%], n = 25 x 22; p < 0,05; Fig. 1C). Esta é a primeira vez que subpopulações de monócitos são avaliadas na LTA. Soares et al. (2006) demonstraram que os monócitos CD14⁺CD16⁺ estavam aumentados nos pacientes com LTA, porém não avaliaram as subpopulações destes monócitos.

Monócitos CD14⁺ produzem TNF e IL-10 em hemoculturas ativadas com LPS: A expressão de citocinas foi avaliada nos monócitos CD14⁺ (Fig. 1D), no sangue cultivado com meio (Fig. 1E e 1F, à esquerda) ou com LPS (Fig. 1E e 1F, à direita), sendo avaliadas a expressão de TNF (Fig. 1E e 1F, acima) e IL-10 (Fig. 1E e 1F, abaixo). Os dados mostraram que o TNF e a IL-10 foram significativamente induzidos nas hemoculturas de pacientes (TNF: 1,7% x 18,2%; IL-10: 1,6% x 4,2%; n = 29; p < 0,001) e controles (TNF: 1,7% x 8,6%; IL-10: 1,7% x 2,3%; n = 27; p < 0,001; Fig.1G). Porém, não foram atestadas diferenças significantes entre a porcentagem de células positivas (Fig.1G) e a intensidade de expressão (dados não mostrados) das citocinas quando comparados pacientes e controles, nas culturas não ativadas ou ativadas com LPS. Para o nosso conhecimento, ainda não foi avaliada a expressão de TNF e de IL-10 em hemoculturas de pacientes com LTA, sendo que os nossos dados sugerem que não há alteração na capacidade de resposta destas células após ativação com LPS. Uma das vantagens da

hemocultura é a menor manipulação possível dos monócitos do sangue, permitindo uma avaliação dos monócitos com o mínimo de alteração de suas funções. Mais experimentos são necessários para determinar possíveis correlações entre as frequências de cada subpopulação de monócitos e a produção de citocinas.

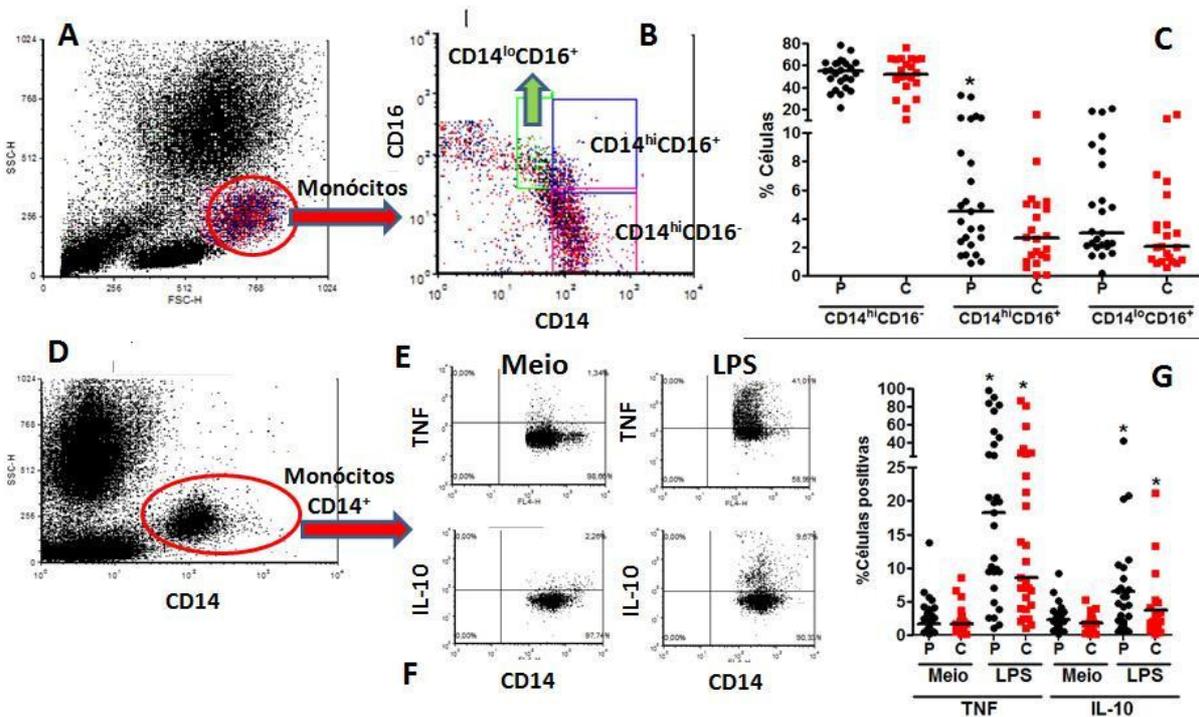


Figura 1. Avaliação das subpopulações de monócitos do sangue periférico e da produção de citocinas TNF e IL-10 em hemoculturas de pacientes com LTA e indivíduos saudáveis. As subpopulações de monócitos (expressão de CD14 e CD16) foram avaliadas por citometria de fluxo (A, B e C) em sangue periférico recém-colhido. A expressão de TNF e IL-10 em monócitos CD14⁺ foi avaliada por citometria de fluxo (D, E, F) após hemocultura com meio (sem ativação) ou LPS (ativação) por 6 h, a 37°C, sob agitação.

Conclusões

- Foi detectada alteração nas frequências das subpopulações de monócitos do sangue periférico de pacientes com LTA, especialmente na população CD14^{hi}CD16⁺ que estava significativamente aumentada.
- Os monócitos CD14⁺ de pacientes e controles produzem citocinas TNF e IL-10 após ativação com LPS, mas não foram atestadas diferenças significantes entre as frequências de monócitos expressando estas duas citocinas quando comparados pacientes e controles.

Apoio financeiro: CAPES, CNPq, FAPEG

Referências

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

Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2ª Edição. 182p. Ed. Ministério da Saúde, 2007. (http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_lta_2ed.pdf).

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.

Convit J, Ulrich M, Fernandez CT, Tapia FJ, Caceres-Dittmar G, Castes M, Rondon AJ, 1993. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87: 444-448.

D'Oliveira A, Jr., Machado P, Bacellar O, Cheng LH, Almeida RP, Carvalho EM, 2002. Evaluation of IFN-gamma and TNF-alpha as immunological markers of clinical outcome in cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 7-10.

Gaze ST, Dutra WO, Lessa M, Lessa H, Guimaraes LH, Jesus AR, Carvalho LP, Machado P, Carvalho EM, Gollob KJ, 2006. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. *Scand J Immunol* 63: 70-78.

Gontijo B, de Carvalho Mde L, 2003. American cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 71-80.

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

Soares G, Barral A, Costa JM, Barral-Neto M, van Weyenbergh J, 2006. CD16⁺ monocytes in human cutaneous leishmaniasis: increased *ex vivo* levels and correlation with clinical data. *J. Leukoc. Biol* 79: 36 -39.

Skrzeczynska-Moncznik J; Bzowska M; Loeseke, S; Grage-Griebnow, E.; Zembala, M; Pryjma J, 2008. Peripheral blood CD14^{high}CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scand. J. Immunol.* 2: 152 – 9.

Ziegler-Heitbrock HW, 1996. Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14⁺ CD16⁺ subpopulation. *Immunol Today* 17: 424-428.

Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJM, Liu Y-J, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB, 2010. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116: e74-e80.