

CARACTERIZAÇÃO DO BIOMARCADOR CD163 NA RESPOSTA IMUNE EM HANSENÍASE

Thayse S. Barros¹, Lucas S. Magalhães¹, Márcio B. dos Santos^{1,2}, Priscila L. Almeida^{1,2}; Lays Bonfim¹, Rodrigo A. Cazzaniga¹; Patrícia R. M. Souza^{1,2}, Michael W. Lipscomb³, Tatiana R. de Moura¹, Roque P. Almeida¹; Amélia R. de Jesus¹, Ricardo Luis L. da Silva^{1,2}

1. Laboratório de Biologia Molecular – HU – Universidade Federal de Sergipe
2. Depto de Educação em Saúde de Lagarto – Universidade Federal de Sergipe
3. Departamento de Biologia, Howard University, Washington, DC, EUA.

Resumo:

O CD163 é um receptor expresso em monócitos, macrófagos e neutrófilos. Essa molécula possui como finalidade a internalização de complexos haptoglobina-hemoglobina. Na resposta imunológica, sua expressão está associada à um macrófago M2. E, conseqüentemente, está relacionada à apresentação mais severa da Hanseníase; visto que esse macrófago modula negativamente a resposta imune.

Primeiramente foi confirmada a associação de sCD163 com a Hanseníase Wirchowiana ao se observar altos níveis do marcador no soro desses pacientes. Posteriormente, experimentos *in vitro* indicaram indução da expressão de CD163 na superfície de macrófagos e neutrófilos, em modelo de infecção por *Leishmania amazonensis-GFP*, sugerindo essas células como possíveis fontes para a molécula sérica.

Conclui-se, portanto, que o sCD163 possui um papel importante na modulação da resposta imune que determina a apresentação clínica de infecções por patógenos intracelulares.

Autorização legal: Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do HU/UFS.

Palavras-chave: CD163; Hanseníase; *Leishmania*.

Apoio financeiro: CNPq, CAPES, FAPITEC.

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UFS

Introdução:

A Hanseníase é uma doença infectocontagiosa provocada pelo *Mycobacterium leprae*. A doença é transmitida por via respiratória e acomete principalmente pele e nervos, podendo levar a deformidades graves. Segundo a extensão dos sintomas apresentados, a Hanseníase pode ser identificada em 6 formas clínicas: wirchowiana, tuberculóide, indeterminada e as formas dimorfas (dimorfa tuberculóide, dimorfa dimorfa e dimorfa wirchowiana).

Macrófagos, células fagocíticas e indutoras da resposta imune adaptativa, podem ser fenotipicamente polarizados pelo microambiente para montar programas específicos funcionais. Macrófagos polarizados podem ser categorizados em dois grupos: os classicamente ativados (M1) e os alternativamente ativados (M2). Ao passo que o fenótipo M1 exhibe potentes propriedades microbicidas e promove fortes respostas Th1, o fenótipo M2 conduz processos anti-inflamatórios com uma resposta Th2.

Essa polarização é determinante na resposta imune no curso da hanseníase, determinando a gravidade da doença e seu fenótipo clínico, paucibacilar e multibacilar. Moura e colaboradores (2012) demonstraram uma expressão elevada de CD163 na superfície de macrófagos em lesões de pacientes com a forma paucibacilar quando comparada com lesões das demais formas e, também, a produção de IL-10, TNF e TGF- β por esses macrófagos.

O CD163 é um receptor expresso em monócitos, macrófagos e neutrófilos. Esse, age de forma a internalizar complexos haptoglobina-hemoglobina. A expressão de CD163 é induzida por glicocorticoides, regulada positivamente pela IL-6 e IL-10 e negativamente TNF- α e IFN- γ . Quanto à sua atuação na resposta imunológica, o CD163 tem sido associado ao fenótipo M2; podendo estar expressos em macrófagos adaptados à limpeza tecidual. Vale ressaltar, que a polarização em

M2 está associada à uma modulação negativa da resposta imunológica e está relacionada com uma apresentação mais severa da Hanseníase.

Sob estímulos anti-inflamatórios, a molécula CD163 pode sofrer proteólise e ser liberada para o meio. Dessa forma, sua forma solúvel pode ser detectada e ser utilizada como biomarcador preditor de severidade de doenças inflamatórias, como Hanseníase e Tuberculose.

Dessa forma, o objetivo do trabalho foi verificar a presença e caracterizar a associação do marcador sCD163 com a apresentação clínica da Hanseníase e se a infecção por *Leishmania sp.*, modelo de infecção por patógeno intracelular, é capaz de induzir a expressão do CD163 em fagócitos humanos.

Metodologia:

Seleção dos Pacientes e Dosagem de sCD163. Os pacientes portadores de Hanseníase foram recrutados do ambulatório de Dermatologia do Hospital Universitário da UFS (HU-UFS), do Projeto (DES)MANCHA Sergipe. O critério de inclusão foi o diagnóstico de Hanseníase confirmado pelo aspecto clínico das lesões, baciloscopia positiva e confirmação histopatológica em biopsias de pele. Os de exclusão foram a ausência de condições (gravidez) ou doenças (HIV, HTLV-I, Diabetes mellitus) que possam interferir na resposta imunológica ou apresentação clínica da Hanseníase. O soro dos pacientes foi coletado antes do início do tratamento. Além disso, foram coletadas amostras de sangue de indivíduos saudáveis, contactantes dos pacientes, sem histórico de Hanseníase, de ambos os sexos, para utilização como controles. Ao mesmo tempo, as amostras de soros de pacientes com Hanseníase, e controles foram submetidas a dosagem de sCD163 por kit de ELISA.

Separação de células e cultura. A separação dos monócitos foi realizada a partir de amostras de sangue venoso heparinizado de doadores saudáveis, utilizando protocolo de separação de células mononucleares de sangue periférico (PBMC). Após a separação as células foram lavadas em PBS e cultivadas por 3h a 37°C/5% CO₂ com meio RPMI suplementado com 20% soro bovino fetal (SBF). As células aderentes foram lavadas e cultivadas por 5 dias à concentração de 5×10^5 células/poço em RPMI 20% SBF para diferenciação em macrófagos. Os neutrófilos foram isolados de amostras de sangue periférico, retirado de doadores saudáveis, utilizando o reagente PolimorphPrep. Após a separação as células foram lavadas e cultivadas em placa de 96 poços na concentração de 10^6 neutrófilos por

poço, em meio RPMI 10% SBF para infecção com *Leishmania*.

Infecção com *Leishmania*-GFP. Foi utilizada para os experimentos uma linhagem de *Leishmania amazonensis* que expressa constitutivamente Proteína Verde Fluorescente GFP (cepa MHOM/BR/73M2269), gentilmente cedida pela Profa Dra Silvia Reni Bortolin Uliana, USP. Os parasitos foram cultivados a 24°C, em meio Schneider's Drosophila, suplementado com 10% SBF. A infecção dos macrófagos foi realizada utilizando 10 promastigostas em fase estacionária para cada macrófago em meio RPMI com 10% SBF, por 24 horas, para marcação com anticorpos específicos e análise por citometria de fluxo. Os parasitos extracelulares foram removidos dos poços por lavagem. Os neutrófilos foram infectados a 5 parasitos por célula, em placa de 96 poços com RPMI 10% SBF, por 3 horas.

Citometria de Fluxo. As células foram incubadas com anticorpos monoclonais específicos, conjugados com fluorocromos, segundo instruções do fabricante, para aquisição em citômetro de fluxo FACS CANTO II e análise no software FlowJo. Foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais: anti-CD209-BV421, anti-CD15-BV421, anti-CD163-PE, anti-CD86-V500 e anti-CD40-APC.

Resultados e Discussão:

Os resultados corroboram com Moura et al (2012) ao descrever o sCD163 associado a Hanseníase Virchowiana. Além disso, demonstramos uma relação entre sensibilidade e especificidade, evidenciada através das curvas ROC, para diferenciação da forma Virchowiana das demais apresentações clínicas.

Através do modelo de infecção por *Leishmania*, evidenciamos que esse patógeno induz polarização da célula para M2, fenótipo permissivo, através do marcador CD163. Macrófagos infectados possuem maior frequência de células CD163+ que, por sua vez, é a população mais infectada. Neutrófilos quando infectados por *Leishmania*, também expressam CD163, atuando como outra fonte da forma sérica da molécula.

Conclusões:

O estudo concluiu que o papel do sCD163 como preditor de severidade da Hanseníase foi reafirmado e a evidência científica ampliada, com base nas curvas ROC. Ademais, que as possíveis origens do sCD163 sérico são macrófagos intensamente parasitados, com polarização para M2, e também neutrófilos intensamente parasitados, possivelmente diferenciados para o perfil N2 ou

TAN.

Referências bibliográficas

1. Alter A, Alcais A, Abel L, Schurr E. Leprosy as a genetic model for susceptibility to common infectious diseases. *Hum Genet.* 2008;123(3):227-35.
2. Scollard DM. The biology of nerve injury in leprosy. *Lepr Rev.* 2008;79(3):242-53.
3. Palermo ML, Pagliari C, Trindade MA, Yamashitafuji TM, Duarte AJ, Cacere CR, et al. Increased expression of regulatory T cells and down-regulatory molecules in lepromatous leprosy. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 2012;86(5):878-83.
4. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity.* 2014;41(1):14-20.
5. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library.* 2008;13:453-61.
6. Krausgruber T, Blazek K, Smallie T, Alzabin S, Lockstone H, Sahgal N, et al. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nature immunology.* 2011;12(3):231-8.
7. Bleharski JR, Li H, Meinken C, Graeber TG, Ochoa MT, Yamamura M, et al. Use of genetic profiling in leprosy to discriminate clinical forms of the disease. *Science.* 2003;301(5639):1527-30.
8. Moura DF, de Mattos KA, Amadeu TP, Andrade PR, Sales JS, Schmitz V, et al. CD163 favors *Mycobacterium leprae* survival and persistence by promoting anti-inflammatory pathways in lepromatous macrophages. *European journal of immunology.* 2012;42(11):2925-36.
9. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature.* 2001;409(6817):198-201.
10. Buehler PW, Abraham B, Vallelian F, Linnemayr C, Pereira CP, Cipollo JF, et al. Haptoglobin preserves the CD163 hemoglobin scavenger pathway by shielding hemoglobin from peroxidative modification. *Blood.* 2009;113(11):2578-86.
11. Nielsen MJ, Moller HJ, Moestrup SK. Hemoglobin and heme scavenger receptors. *Antioxidants & redox signaling.* 2010;12(2):261-73.
12. Stilund M, Gjelstrup MC, Petersen T, Moller HJ, Rasmussen PV, Christensen T. Biomarkers of inflammation and axonal degeneration/damage in patients with newly diagnosed multiple sclerosis: contributions of the soluble CD163 CSF/serum ratio to a biomarker panel. *PloS one.* 2015;10(4):e0119681.
13. Lastrucci C, Benard A, Balboa L, Pingris K, Souriant S, Poincloux R, et al. Tuberculosis is associated with expansion of a motile, permissive and immunomodulatory CD16(+) monocyte population via the IL-10/STAT3 axis. *Cell research.* 2015;25(12):1333-51.
14. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer cell.* 2009;16(3):183-94.