

## DIVERSIDADE ALÉLICA DO RECEPTOR Fc $\gamma$ RIIA – H/R131 EM INDIVÍDUOS COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

**OLIVEIRA**, Cristina Rodrigues<sup>1</sup>, **NUNES**, Marcus Vinícius Oliveira<sup>2</sup>, **LOPES**, Fabiana de Freitas<sup>3</sup>, **CRESPO**, Adriana Moraes Costa<sup>4</sup>, **SILVEIRA**, Lucimeire Antonelli<sup>5</sup>.

Palavras – chave: Receptor Fc; polimorfismo; *Leishmania* sp; Fc $\gamma$ RIIA

### 1. INTRODUÇÃO (justificativa e objetivos)

Os receptores para a porção Fc de IgG (Fc $\gamma$ Rs) são expressos em diversas células do sistema imune. Ao se ligarem a patógenos opsonizados por imunoglobulinas, respostas biológicas como fagocitose, citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), liberação de mediadores inflamatórios e aumento da apresentação de antígenos, são desencadeadas (VAN DE WINKEL *et. al.* 1993). Dessa forma, os Fc $\gamma$ Rs fazem uma ligação entre a imunidade celular e humoral. O Fc $\gamma$ RIIA, expresso por macrófagos neutrófilos, plaquetas (ABBAS *et. al.* 2003) e células dendríticas (PLEASS & WOOF 2001), liga-se às subclasses de anticorpos IgG com afinidade variável, podendo ser influenciado por um polimorfismo alélico no gene que codifica este receptor. A diferença em um único nucleotídeo na base 494 (A ou G) resulta na troca do aminoácido arginina (R) para histidina (H) na posição 131 e determina três padrões alélicos: os homocigotos H/H e R/R e o heterocigoto H/R (MOENS *et. al.* 2006), conferindo ao Fc $\gamma$ RIIA H/H maior afinidade para as subclasses IgG2 e IgG3 (CLARK *et. al.* 1991). Esta mutação pode resultar em diferentes respostas desencadeadas por patógenos diversos. Estudos têm demonstrado a importância desses receptores na infecção de macrófagos por formas amastigotas de *Leishmania* sp, em adição aos receptores para complemento (CR3) e para manose (MR) (PETERS *et. al.* 1995). A *Leishmania* interage diretamente com receptores dos macrófagos, ou após opsonização por componentes do sistema complemento e anticorpos IgG. Vários fatores relacionados ao hospedeiro e ao parasito estão envolvidos na resposta imune à leishmaniose, dentre eles os Fc $\gamma$ s. Estudos realizados em camundongos infectados com diferentes espécies de *Leishmania* têm demonstrado o papel dos Fc $\gamma$ Rs à exacerbação da leishmaniose (KIMA *et. al.* 2000; MILES *et. al.* 2005; BUXBAUM & SCOTT 2005; PADIGEL & FARREL 2005), entretanto WOELBING *et. al.* (2006) demonstrou que receptores Fc $\gamma$  em células dendríticas, estão envolvidos no desenvolvimento da imunidade protetora, em camundongos infectados por *L. major*. Dessa forma, comparamos a distribuição das diferentes formas alotípicas do Fc $\gamma$ RIIA em indivíduos com Leishmaniose Tegumentar Americana.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1 – Amostras**

Foram analisadas amostras sanguíneas de 88 pacientes com LTA, a maioria do estado de Goiás e 98 amostras de indivíduos saudáveis (grupo controle), além de biópsia da lesão. De acordo com os dados clínicos e imunopatológicos os pacientes foram divididos em quatro grupos: forma cutânea, cutâneo-mucosa, mucosa e cutânea-difusa.

### **2.2 – Diagnóstico da LTA**

O diagnóstico foi realizado por pesquisa do parasita (exame direto e histopatológico), sorologia por imunofluorescência indireta e teste intradérmico de Montenegro

### **2.3 – Determinação do genótipo Fc $\gamma$ RIIA**

O DNA genômico das amostras de sangue foi extraído com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), precipitado com 1.4 M de acetato de amônio e etanol 100% e ressuscitado em água milli-Q (MILLIPORE®). Após a extração, o fragmento do gene Fc $\gamma$ RIIA foi amplificado por PCR usando primers alelo-específicos, contendo: aproximadamente 200 ng de cada primer, 200  $\mu$ M de dNTP, 75 nM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de Tris HCl pH 8,5; 50 mM de KCl; 0,8 U de Taq DNA polimerase. Assim, obtivemos um produto de 366 pb. O polimorfismo Fc $\gamma$ RIIA - H/R 131 foi analisado digerindo-se o produto da amplificação com a enzima de restrição alelo-específicas Bsh 1236I (FnuDII), utilizando 1U a 0,5 U da enzima. Os produtos de digestão enzimática foram analisados por eletroforese em gel de agarose 3% corado com brometo de etídio.

### **2.4 – Análises Estatísticas**

Para comparar a distribuição genotípica do Fc $\gamma$ RIIA do grupo de pacientes com leishmaniose com o grupo controle foi realizado o teste do chi-quadrado ( $\chi^2$ ).

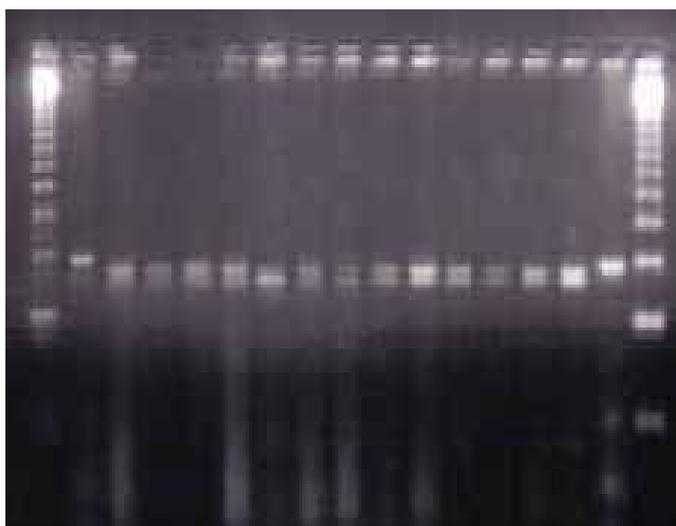
## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O polimorfismo do Fc $\gamma$ RIIA foi analisado por PCR seguida de digestão enzimática alelo-específica com a enzima BshI-1236I FnuDII. O produto amplificado consiste em um fragmento de 366 pb, sendo que o alelo H131 contém um sítio de digestão, produzindo um fragmento de 343 pb, e o produto da PCR referente ao alelo R131 contém dois sítios, dando origem a um fragmento de 322 pb. O genótipo H/R131 possui ambos os fragmentos (**Figura 1**).

Dentre os pacientes estudados a maioria (72,7%) apresentou a forma cutânea, considerada a forma clínica mais branda da doença; 21,6% apresentaram a forma mucosa; 4,5% apresentaram a forma cutâneo-mucosa; e 1,2% apresentaram a forma cutânea difusa.

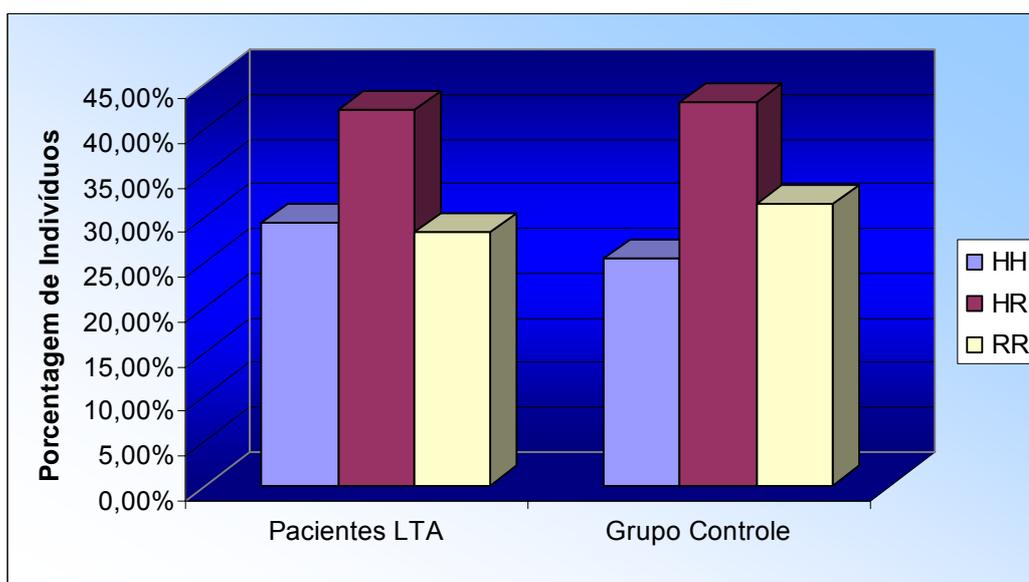
Comparamos a distribuição do genótipo Fc $\gamma$ RIIA – H/R131 nos pacientes estudados com um grupo de indivíduos saudáveis. A diferença quanto a distribuição deste genótipo na população saudável não foi estatisticamente significativa em relação à encontrada nos pacientes com leishmaniose ( $\chi^2$  calculado = 0,442566,  $\chi^2$  crítico = 5,66, alfa = 5%) (**Figura 2**). Também não houve diferenças significativas na frequência referente aos alelos H e R nos dois grupos estudados (dados não mostrados).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17



**Figura 1** - Eletroforese em gel de agarose a 3%, demonstrando os padrões alélicos do receptor  $Fc\gamma RIIA$  de 13 indivíduos com leishmaniose tegumentar americana. 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 o produto amplificado e digerido com esta enzima.

Diversos estudos têm demonstrado que as diferentes formas alélicas expressas do  $Fc\gamma RIIA$  – H/R131 podem influenciar o desenvolvimento de diversas doenças infecciosas, como a malária (AUCAN *et. al.* 2000), infecções por bactérias encapsuladas (YEE *et. al.* 2000), vírus, como o dengue (LOKE *et. al.* 2002), dentre outras. Entretanto, na leishmaniose, este polimorfismo alélico não demonstrou nenhuma influência, em relação aos parâmetros analisados.



**Figura 2** – Distribuição genotípica do gene  $Fc\gamma RIIA$  na população de indivíduos com leishmaniose e no grupo controle.

#### 4. CONCLUSÃO

De acordo com o presente trabalho, não há relação entre as diferentes formas alotípicas do Fc $\gamma$ RIIA – H/R131 com a *Leishmaniose Tegumentar Americana*, não havendo diferenças nos padrões de diversidade alélica deste receptor entre os grupos de indivíduos doentes e saudáveis.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H. & POBER, J.S. *Imunologia Celular e molecular*. 4 ed. Revinter. 2003. 543p.

AUCAN, C., TRAORÉ, Y., TALL, F., NACRO, B., TRAORÉ-LEROUX, T., FUMOUX, F. & RIHET, P. High immunoglobulin G2 (IgG2) and low IgG4 levels associated with human resistance to *Plasmodium falciparum* malaria. *Infection and Immunity*. **68**: 1252. 2000.

BUXBAUM, L.U. & SCOTT, P. Interleukin-10 and Fc $\gamma$  receptor-deficient mice resolve *Leishmania mexicana* lesions. *Infect Immun* **73**: 2101. 2005.

CLARK, M.R., STUART, S.G., KIMBERLY, R.P., ORY, P.A. & GOLDSTEIN, I.M. A single amino acid distinguishes the high-responder from the low responder form of Fc receptor II on human monocytes. *European Journal of Immunology*. **21**: 1911. 1991.

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

LOKE, H., BETHELL, D., PHUONG, C.X.T., DAY, N., WHITE, N., FARRAR, J. & HILL, A. Susceptibility to dengue haemorrhagic fever in Vietnam: evidence of an association with variation in the vitamin D receptor and Fc $\gamma$  receptor IIA genes. *Am J Trop Med Hyg*. **67**: 102. 2002.

MILES, S.A., CONRAD, S.M., ALVES, R.G., JERONIMO, S.M.B. & MOSSER, D.M. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *Journal of Experimental Medicine*. **201**:747. 2005.

MOENS, L., HOEYVELD, E.V., VERHAEGEN, J., DE BOECK, K., PEETERMANS, W.E. & BOSSUYT, X. Fc $\gamma$ -receptor IIA genotype and invasive pneumococcal infection. *Clinical Immunology*. **118**: 20. 2006.

PADIGEL, U.M. & FARRELL, J.P. Control of Infection with *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice lacking the common  $\gamma$ -chain for FcR is associated with reduced production of IL-10 and TGF- $\beta$  by parasitized cells. *Journal of Immunology* **174**: 6340. 2005

PETERS, C., AEBISCHER, T., STIERHOF, Y., FUCHS, M. & OVERATH, P. The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes. *Journal of Cell Science*. **108**: 3715. 1995.

PLEASS, R.J., & WOOF, J.M. Fc receptors and immunity to parasites. *TRENDS in Parasitology* **17**: 545. 2001.

VAN DE WINKEL, J.G.J. & CAPEL, P.J.A. Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunology Today*. **14**: 215.1993.

WOELBING, F., KOSTKA, S.L., MOELLE, K., BELKAID, Y., SUNDERKOETTER, C., VERBEEK, S., WAISMAN, A., NIGG, A.P., KNOP, J., UDEY, M.C. & VON STEBUT, E. Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *Journal of Experimental Medicine*. **203**: 177. 2006.

YEE, A.M.F., PHAN, H.M., ZUNIGA, R., SALMON, J.E. & MUSER, D.M. Association between FcγIIa – R131 allotype and bacteremic pneumococcal pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*. **30**: 25. 2000.

---

<sup>1</sup> - Mestranda em Medicina Tropical /IPTSP/ UFG; <sup>2</sup> - Bolsista PIBIC/IPTSP/UFG; <sup>3</sup> - Estagiária IPTSP/UFG 2005; <sup>4</sup> - Docente IPTSP/ UFG; <sup>5</sup> – Orientadora/IPTSP/UFG

<sup>1</sup> – [cristinagyn@pop.com.br](mailto:cristinagyn@pop.com.br)

<sup>5</sup> – [lucimeireantonelli@yahoo.com](mailto:lucimeireantonelli@yahoo.com)

