

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

PRISCILA RIBEIRO ANDRADE

**AVALIAÇÃO DOS MARCADORES FENOTÍPICOS E
FUNCIONAIS DA REAÇÃO REVERSA NA HANSENÍASE**

Rio de Janeiro

2014

AVALIAÇÃO DOS MARCADORES FENOTÍPICOS E FUNCIONAIS DA REAÇÃO REVERSA NA HANSENÍASE

PRISCILA RIBEIRO ANDRADE

Tese apresentada ao Curso de Biologia Parasitária
do Instituto Oswaldo Cruz para obtenção do grau de
Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Euzenir Nunes Sarno.

Rio de Janeiro

2014

PRISCILA RIBEIRO ANDRADE

AVALIAÇÃO DOS MARCADORES FENOTÍPICOS E FUNCIONAIS DA REAÇÃO REVERSA NA HANSENÍASE

Tese apresentada ao Curso de Biologia Parasitária
do Instituto Oswaldo Cruz para obtenção do grau de
Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Euzenir Nunes Sarno

Aprovada em 28/07/2014

BANCA EXAMINADORA:

Membros Efetivos:

1. Dra. Claude Pirmez – Membro interno - (Fundação Oswaldo Cruz -RJ) - **Presidente**
2. Dra. Verônica Schmitz - Membro interno - **Revisora** (Fundação Oswaldo Cruz - RJ)
3. Dra. Eliane Pedra Dias – Membro externo (Universidade Federal Fluminense - RJ)

Membros Suplentes:

1. Dra. Christina Maeda Takiya - Membro externo (Universidade Federal do Rio de Janeiro - RJ)
2. Dra. Adriana Vallochi - Membro interno (Fundação Oswaldo Cruz - RJ)

Ao meu querido e amado pai Ayrton, que nos deixou cedo demais e que estará sempre em nossos pensamentos e no nosso coração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, meu refúgio e conforto nos momentos difíceis e minha fonte de esperança de dias melhores;

À minha mãe que sempre me apoiou e acreditou em mim;

Ao meu pai que me incentivou durante toda essa jornada;

À minha irmã, Luisa e ao meu irmão André Luiz por enriquecerem minha vida;

Aos meus avós que sempre nos ajudaram nos momentos de necessidade;

Ao Pacco, Tainná, Maria, Luna, Cristal e Thor por colocarem um sorriso no meu rosto todos os dias;

Aos meus amigos Eustáquio, Cosme e Maria, por me ajudarem sempre.

Amo muito todos vocês!

À Dra Euzenir Nunes Sarno pela grande oportunidade e pela confiança que depositou em mim. Muito obrigada pelo seu apoio e pelo aprendizado que me proporcionou;

À Dra Thais Porto Amadeu pelo prazer da sua convivência e pelo auxílio imprescindível durante o desenvolvimento desse trabalho;

À Dra Roberta Olmo Pinheiro pelo prazer da convivência e pela solicitude com que sempre me ajuda;

Ao Rafael Petito, Bruno Andrade, Mayara Barbosa, Mayara Mendes, Luciana Nahar e Rhana Prata pela amizade e companheirismo durante esses quatro anos;

Aos companheiros de laboratório de Hanseníase: Ariane, Andressa, Daniel Serra, Eliane, Pedro, Bernardo, Jéssica Duarte, Jéssica Paixão, Mariana, Tamiris, Michele, Marcele, Jhulli, Eduardo, Christiane, Alice, Helen, Patrícia, Vânia, Daniel Chaves, Dr Sérgio, Dr. José Augusto e Dra Danuza.

Aos funcionários do laboratório de Hanseníase: Augusto, Daniel, Andrea, Cristiane, Paulo, Jean e Solange.

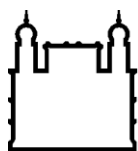
A secretaria e coordenação da pós-graduação de Biologia Parasitária;

Enfim, gostaria de dedicar esse trabalho a todas essas pessoas que fizeram parte desta importante etapa da minha vida. Aos que me ajudaram não só nos aspectos práticos dessa jornada, mas também àqueles que contribuíram para o meu crescimento pessoal. Se a cada dia de nossas vidas aprendemos alguma lição, por menor que seja, aproveito essa oportunidade para agradecer aos meus diversos professores.

“Eu não falhei.

Apenas encontrei dez mil maneiras que não funcionam”

Thomas Edison



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

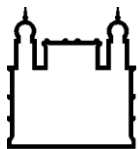
Andrade, PR. **Avaliação dos marcadores fenotípicos e funcionais da reação reversa na hanseníase**. Rio de Janeiro, 2014. Tese em Biologia Parasitária – Instituto Oswaldo Cruz (IOC)

RESUMO

Avaliação dos marcadores fenotípicos e funcionais da reação reversa na hanseníase.

Na hanseníase, a reação reversa (RR) é considerada um fenômeno de reativação imune, no qual uma resposta inflamatória abrupta se inicia, comprometendo a pele e os nervos periféricos. A RR ocorre ao longo do espectro da hanseníase, sendo descrita, inclusive, nas formas anérgicas lepromatosas (LL) subpolares. É sugerido que nas formas reacionais, células imunes da pele como macrófagos e células dendríticas, se tornam ativadas espontaneamente e iniciam uma resposta imune contra componentes do *Mycobacterium leprae* (ML), o que levaria a quebra da imunossupressão pré-existente. O objetivo desse estudo é caracterizar as populações celulares que constituem as lesões de pele L-lep (BL e LL) antes e no início da RR, assim como, determinar a programação genética envolvida na quebra da anergia tecidual nesse grupo durante esse episódio. O início da RR altera drasticamente a organização e morfologia da lesão L-lep, levando ao aparecimento de novas estruturas e tipos celulares, como células epitelioides, granulomas e uma grande diversidade fenotípica de macrófagos e células dendríticas. O marcador de células dendríticas plasmocitoides, CD123, foi mais expresso em lesões de pele RR do que no tecido não reacional, com a população CD123⁺ exibindo tanto marcadores fenotípicos de macrófagos quanto de células dendríticas. Por sua vez, o ML pôde induzir a expressão dessa molécula *in vitro*. A análise de expressão gênica mostrou um aumento dos níveis de RNA mensageiro da interleucina-3 (*IL-3*), fator estimulador de colônias de macrófagos (*M-CSF*), fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (*GM-CSF*), fator de necrose tumoral- α (*TNF α*), interferon- γ (*IFN- γ*), indoleamina-2,3-dioxigenase (*IDO*), interleucina-15 (*IL-15*), receptor de vitamina D (*VDR*), quimiocina *CXCL10* e receptor *Toll-like 2* (*TLR2*) nas lesões RR quando em comparação com o grupo L-lep. Em síntese, nosso estudo demonstrou que o microambiente da lesão RR favorece a diferenciação e plasticidade celular, além de exibir uma variedade de populações mielomonocíticas, destacando o papel das células CD123⁺ e de um eixo de ativação dependente de IL-3 durante a RR.

Palavras-chaves: Reação Reversa; hanseníase, CD123; IL-3; macrófago; células dendríticas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Andrade, PR. **Evaluation of phenotypic and functional markers in leprosy's type 1 reaction.** Rio de Janeiro, 2014. Thesis in Parasite Biology – Oswaldo Cruz Institute.

ABSTRACT

Evaluation of phenotypic and functional markers in leprosy's type 1 reaction.

In leprosy, type 1 reaction (T1R) is considered a Th1 immune reactivation in which a sudden inflammatory response takes place that compromises the skin and peripheral nerves. T1R occurs across the leprosy clinical spectrum and has even been described in the anergic subpolar lepromatous (LL) forms. It is hypothesized that in the T1R forms, skin immune cells such as macrophages and dendritic cells (DCs) become activated, which in turn could initiate a local innate immune response against the existing *Mycobacterium leprae* (ML) components, overwhelming the predominant immunosuppressive state. The aim of the present study is to characterize the skin cellular populations that constitute the BL and LL (L-lep) skin lesion before and during the T1R episode, as well as to determine the gene programming involved in the disruption of the tissue immunosuppression brought about by this phenomenon. The outset of T1R drastically alters the morphological landscape of the LL skin lesion, leading to the appearance of new structures and cell types such as epithelioid granulomas and a wide variety of macrophagic and DC phenotypes. The plasmacytoid DC marker, CD123, was more intensely expressed in T1R skin lesions than in non-reactional tissue, with CD123⁺ cells exhibiting both macrophagic and DC phenotypic markers. In turn, ML, but not TNF- α , was able to increase CD123 expression while gene expression analyses demonstrated *IL-3*, *M-CSF*, *GM-CSF*, *TNF α* , *IFN- γ* , *IDO*, *IL-15*, *VDR*, *CXCL10*, and *TLR2* upregulation in the T1R lesions in comparison to the non-reactional group. In summary, our study showed that the T1R lesion environment favors cell differentiation and plasticity in addition to displaying a high diversity of myelomonocytic populations and highlighting the role of CD123⁺ cells and the IL-3 axis during the progression of T1R.

Key words: Type 1 reaction; leprosy, CD123; IL-3; macrophages; dendritic cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Prevalência da hanseníase no mundo em 2011.....	3
Figura 2: Morfologia do <i>Mycobacterium leprae</i>	3
Figura 3: Modelo esquemático do envelope celular do <i>Mycobacterium leprae</i>	4
Figura 4: Espectro de formas clínicas da hanseníase segundo Ridley & Jopling	8
Figura 5: Imunopatogênese dos polos TT e LL na hanseníase	18
Figura 6: Imunopatogênese da reação reversa	23
Figura 7: Renovação das populações teciduais de macrófagos na homeostase e na resposta imune	25
Figura 8: Proliferação <i>in situ</i> de macrófagos dependente de IL-4.....	26
Figura 9: Diversidade e plasticidade das populações de macrófagos	28
Figura 10: Moléculas que promovem a ativação clássica e alternativa de macrófagos....	29
Figura 11: Características gerais dos fenótipos de macrófagos M1 e M2.	31
Figura 12: Ontogenia de células dendríticas	33
Figura 13: Subpopulações de células dendríticas e seu papel na imunidade	35
Figura 14: Células dendríticas estimuladoras e tolerogênicas em condições homeostáticas e patogênicas	38
Figura 15: Histopatologia das lesões cutâneas L-lep antes e no momento da RR.....	52
Figura 16: Diversidade morfológica de populações de células epitelioides em lesões cutâneas reacionais.....	53
Figura 17: Populações de macrófagos e células dendríticas em lesões cutâneas de pacientes L-lep com RR	56
Figura 18: Expressão de IL-3 e seu receptor, CD123, em lesões cutâneas L-lep sem e no momento da RR	58
Figura 19: Caracterização das células CD123 ⁺ em lesões cutâneas L-lep e RR L-lep.	60
Figura 20: Caracterização das populações CD123 ⁺ no granuloma de lesões de pele reacionais	64
Figura 21: Perfil de expressão gênica em lesões cutâneas L-lep e RR L-lep.....	68
Figura 22: A RR induz um aumento de citocinas Th1 no início do episódio em pacientes L-lep.....	69
Figura 23: A razão entre citocinas pró-inflamatórias e IL-10 nas lesões cutâneas de pacientes L-lep com e sem RR.....	70
Figura 24: O perfil de expressão gênica no sangue de pacientes L-lep com e sem RR....	71
Figura 25: Alterações induzidas pela RR na lesão cutânea L-lep.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados clínicos dos grupos L-lep e RR L-lep	45
---	-----------

LISTAS DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.

a.C: antes de Cristo	DAPI: 4',6-diamidino-2-phenilindol
Ac: Anticorpo	DDC-IDC: Células dendríticas intersticiais ou dérmicas
AG: Arabinogalactanos	DP: Durante o PQT
Ag: Antígeno	ENL: Eritema Nodoso Leproso
AP: Antes da PQT	Foxp3: <i>Forkhead Box P3</i>
APCs: Células Apresentadoras	GM-CSF: Fator estimulador de colônias de Granulócitos e Macrófagos
BAAR: Bacilo Ácido Álccol-resistente	GMP: Precursor de Macrófagos e Granulócitos
BB: Borderline- Borderline	HAART: Terapia Antirreoviral de Alta Atividade
BL: Borderline-Lepromatoso	HO-I: Heme-Oxigenase I
BT: Borderline-Tuberculoide	HSC: Células-Tronco Hematopoiéticas
CARD: Domínios de Ativação e Recrutamento de Caspases	IB: Índice Baciloscópico
CDP: Progenitor de Células Dendríticas	ILB: Índice Logarítmico Baciloscópico
CLP: Progenitor Comum Linfoide	IDO: Indoleamina-2,3 oxigenase
CMP: Progenitor Comum Mieloide	Ig: Imunoglobulina
COX-2: Ciclooxygenase 2	IFN: Interferon
CTLA-4: Antígeno de Linfócito T Citotóxico 4	IL: Interleucina

IRIS: Síndrome Inflamatória de Resconstituição Imune

MMP: Metaloproteinases

LAM: Lipoarabinomanan

moDC: Células Dendríticas derivadas de monócitos

LC: Células de Langerhans

MPP: Progenitor Multipotente

LL: Lepromatoso-Lepromatoso

NK: Células *Natural-Killer*

L-Lep: Pacientes LL e BL

NLRs: Receptores NOD-like

LM: Lipomanan

OMS: Organização Mundial de Saúde

LPS: Lipopolissacarídeo

PAMPs: Padrões Moleculares Associados a Patógenos

M. tuberculosis: Mycobacterium tuberculosis

PBMCs: Células Mononucleares do Sangue Periférico

M-CSF: Fator estimulador de colônias de Macrófagos

PDIMs: Ácidos Micocerosóicos Dimicocerosatos de Fitiocerol

MDP: Muramil dipeptídeo

PGE₂: Prostaglandina E₂

MPD: Progenitor de Macrófagos e Células Dendríticas

PGLs: Glicolipídios Fenólicos

MEP: Precursor de Megacariócito e Eritrócitos

PP: Pós-PQT

ML: *Mycobacterium leprae*

PQT: Polioquimioterapia

PRRs: Receptores de Reconhecimento de Padrões

TMM: Monocilatos de Trealose

RNAm: Ácido Ribonucleico Mensageiro

TLRs: Receptores Toll-Like

RORC: Receptor Nuclear ROR

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa

RR L-lep: pacientes LL e BL com RR

TT: Tuberculoide-Tuberculoide

RR: Reação Reversa

WHO: World Health Organization

SD: Sem Dados

SRA-I: Receptor scavenger A

TACO: Proteína de Revestimento que Contém
Aspartato Triptofano

TGF- β : Fator de Crescimento Beta

Th1: T *helper* 1

Th17: T *helper* 17

Th2: T *helper* 2

TIMP: Inibidores Teciduais de Metaloproteinases

SUMÁRIO

I.	INTRODUÇÃO	1
1.	HANSENÍASE.....	1
1.1	Características Gerais.....	1
1.2	Epidemiologia	1
1.3	Agente etiológico	3
1.4	Aspectos clínicos e Classificação	6
1.5	Tratamento.....	9
1.6	Imunopatogênese	10
1.6.1	Imunidade Inata	11
1.6.2	Imunidade Adaptativa Celular	15
2.	REAÇÃO REVERSA.....	19
2.1	Imunopatogênese	21
3.	POPULAÇÕES CELULARES PRESENTES NA LESÃO CUTÂNEA DA REAÇÃO REVERSA.....	24
3.1	Macrófagos	24
3.1.1	Características Gerais.....	24
3.1.2	Polarização de Macrófagos.....	28
3.2	Células Dendríticas.....	32
3.2.1	Características Gerais.....	32
3.2.2	Células Dendríticas X Tolerância	36
3.3	Células Epitelioides X Granuloma.....	39
II.	JUSTIFICATIVA.....	41
III.	OBJETIVOS	43
IV.	MATERIAL & MÉTODOS.....	44
	Pacientes e dados clínicos.....	44
	Imuno-Histoquímica	46
	Coloração com Oil Red O	47
	Imunofluorescência	47
	Quantificação de marcadores fenotípicos de células CD123 ⁺ através da imunofluorescência	48

Extração de RNA e PCR em tempo real	48
Cultura de células e estímulos	49
Isolamento de células de lesões cutâneas.....	49
Citometria de fluxo	49
Análise Estatística.....	50
V. RESULTADOS.....	51
Lesões de pele L-lep adquirem características tuberculoides durante o episódio reacional	51
Populações heterogêneas de macrófagos e células dendríticas estão presentes na lesão de pele reacional.....	53
CD123 pode estar envolvido na reemergência da imunidade inata tecidual em lesões de pele L-lep no início da RR.....	57
Células CD123 ⁺ em lesões de pele RR L-lep exibem uma combinação de fenótipos de macrófagos e células dendríticas.....	59
Células CD123 ⁺ se concentram em áreas de células epitelioides em lesões de pele RR L-lep	64
Mediadores pró-inflamatórios da RR prevalecem sobre o estado imunossupressor nas lesões de pele L-lep	66
O padrão de expressão gênica dos mediadores inflamatórios no sangue de pacientes L-lep com ou sem RR contrasta com perfil observado nas lesões de pele	70
VI. DISCUSSÃO	72
VII. CONCLUSÃO	80
VIII. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	82
IX. BIBLIOGRAFIA	83

I. INTRODUÇÃO

1. HANSENÍASE

1.1 Características Gerais

A hanseníase, também conhecida como lepra, é uma doença infecciosa crônica caracterizada por lesões cutâneas e pelo acometimento dos nervos periféricos, podendo resultar em problemas motores e sensoriais graves, e levar, assim, ao desenvolvimento de deformidades e deficiências permanentes (Hussain, 2007; Britton & Lockwood, 2004). Seu agente etiológico é o bacilo *Mycobacterium leprae* (ML), um parasita intracelular obrigatório, que tem como nicho preferencial os macrófagos e células de Schwann (Stoner, 1979; Shimoji et al., 1999)

A doença apresenta um período de incubação longo, em média de 3 a 10 anos (Britton & Lockwood, 2004). O contágio conhecido ocorre de pessoa a pessoa através do convívio de doentes não tratados que apresentam alta carga bacilar (multibacilares) e pessoas suscetíveis. O mecanismo preciso de transmissão da hanseníase ainda não foi completamente elucidado, mas admite-se que o contato com o ML ocorra através das vias aéreas superiores, seguida da dispersão sanguínea para a pele e nervos. Entretanto, a possibilidade de transmissão por contato direto com lesões cutâneas de doentes não tratados, não deve ser descartada (Gallo et al., 2005; WHO, 2012; Spierings et al., 2000; Eichelmann et al., 2013).

Evidências históricas apontam para o leste da África e Oriente, em particular a Índia, como local de origem da hanseníase, que parece ter sido disseminada para o resto do mundo através das sucessivas migrações humanas que ocorreram a partir do século IV a.C (Monot et al., 2005; Robbins et al., 2009).

1.2 Epidemiologia

Apesar de a hanseníase ter sido uma doença distribuída pelos continentes da Europa e Ásia, atualmente concentra-se em países em desenvolvimento situados em regiões tropicais e temperadas, como Índia, Brasil, República Democrática do Congo, República Unida da Tanzânia, Nepal, Moçambique, Madagascar, Timor Leste e República Central Africana (Walker et al., 2007; Britton & Lockwood, 2004) (Figura 1).

Recentemente a Organização Mundial de Saúde (OMS) adotou uma estratégia baseada no diagnóstico precoce e no tratamento com a poliquimioterapia para reduzir a prevalência da hanseníase, com compromisso de manter as iniciativas de controle entre o período de 2011 e 2015, priorizando a cobertura de populações carentes em áreas de difícil acesso. A prevalência

global observada no início de 2012 foi de 181.941 casos, sendo detectados 224.365 novos casos (WHO, 2012). Já em 2013, a prevalência global registrada no primeiro bimestre foi de 189.018 casos da doença, sendo detectados 232.857 novos casos nos 115 dos países investigados, com a grande maioria concentrada no sudoeste da Ásia (WHO, 2013).

Em 2011, o Brasil detectou 33.955 casos novos de hanseníase, dos quais, 2.420 eram menores de 15 anos e, apresentou um coeficiente de detecção desse grupo etário de 5,2 por 100 mil habitantes (WHO, 2012). O Ministério da Saúde considera o coeficiente de detecção em menores de 15 anos como principal indicador para o monitoramento de endemia, sendo hiperendêmica a região Norte do país. Apesar da importante redução do coeficiente de prevalência da doença, de 4,71 em 2000 para 1,54 para cada 10 mil habitantes em 2011, algumas regiões demandam intensificação das ações para eliminação da doença. Dados recentes do Ministério da Saúde mostram que a taxa de prevalência de hanseníase no Brasil caiu 65% nos últimos 10 anos, passando de 4,33 por 10 mil habitantes, em 2002, para 1,51 em 2012 (Secretaria de Saúde do Rio de Janeiro, 2013).

Segundo dados de 2012, o estado do Rio de Janeiro apresentou 1.522 casos novos, sendo 79 deles detectados em menores de 15 anos. No mesmo período, foram diagnosticadas 135 pessoas já com incapacidades físicas mais severas, muitas vezes necessitando de procedimentos fisioterápicos de maior complexidade ou intervenção cirúrgica (Secretaria de Saúde do Rio de Janeiro, 2013).

Taxas de Prevalência de Hanseníase, dados notificados á OMS até janeiro de 2011

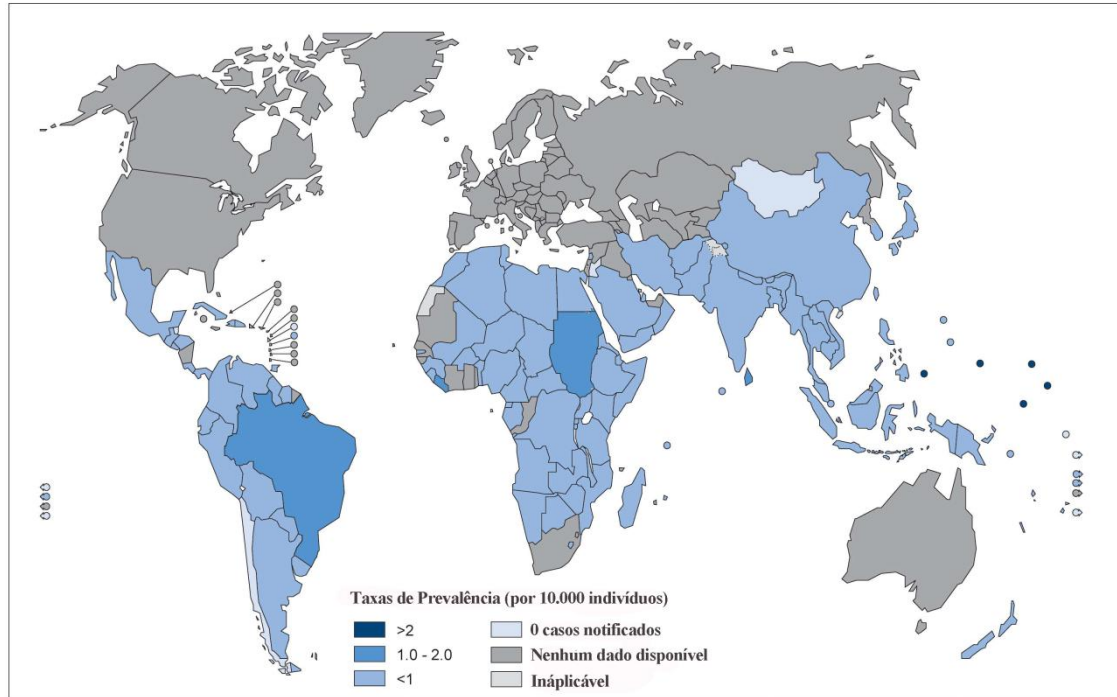


Figura 1: Prevalência da hanseníase no mundo em 2011. Fonte: Adaptado de Organização Mundial de Saúde, 2012.

1.3 Agente etiológico

Descoberto em 1873, por Armauer Hansen em fragmentos de pele, o ML foi o primeiro agente etiológico de uma doença humana a ser identificado. É um bacilo imóvel, não formador de esporos e que se multiplica por divisão binária (Scollard et al., 2006). Apresenta-se sob a forma de um bastonete ligeiramente curvado (Figura 2), podendo ser encontrado também em grupos denominados “globias”, onde vários bacilos interagem entre si através de uma substância chamada de “gléia” (Hussain, 2007).



Figura 2: Morfologia do *Mycobacterium leprae*. (A) ML corado em vermelho pelo método de Fite-Faraco. (B) Suspensão de ML derivada de pata de camundongo *nude* visualizada por microscopia

eletrônica de varredura. (C) Características internas do ML são observadas na seção ultrafina do bacilo por microscopia eletrônica de transmissão (Fonte: adaptado de Scollard et al., 2006).

Sua parede celular consiste de uma camada de peptídeoglicanos composta de cadeias de N-acetilglicosaminas e N-glicosilmurâmico dispostas alternadamente, e que por meio de moléculas de arabinogalactano, se liga a uma camada de galactano. A essa camada ancoram-se moléculas de arabinano, formando assim um arranjo que concede a essa porção da parede celular uma propriedade elétron-densa. Acopladas ao arabinano, estão moléculas de ácidos micólicos, que juntamente com glicolípídios fenólicos (PGLs) constituem a zona elétron-transparente da parede da micobactéria (Figura 3) (Scollard et al., 2006; Brennan & Nikaido, 1995).

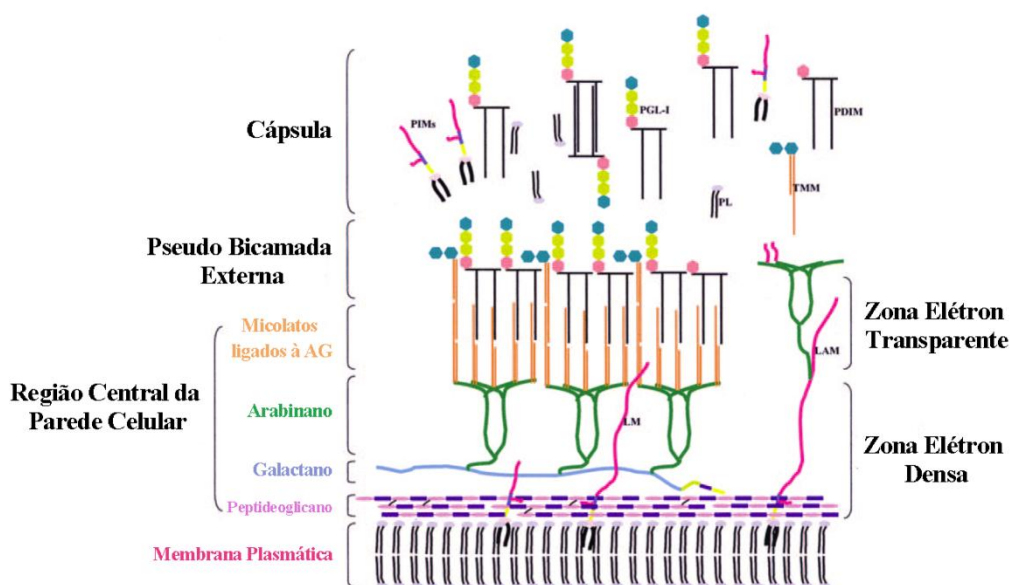


Figura 3: Modelo esquemático do envelope celular do *Mycobacterium leprae*. A membrana plasmática é envolvida pela parede celular formada de peptídeoglicanos ligados covalentemente a galactanos por uma ponte de arabinogalactanos (AG). Ligados à camada de galactano estão moléculas de arabinano, aos quais ácidos micólicos estão acoplados, formando a porção interna de uma bicamada pseudolipídica. A porção externa dessa bicama é constituída por monomicilatos de trealose (TMM), ácidos micocerosóicos de dimicocerosatos de fitiocerol (PDIMs) e glicolípídios fenólicos (PGLs). A cápsula provavelmente composta de PGLs e PDIMs envolve a bactéria. Lipomano (LM) e lipoarabinomano (LAM) são observados tanto ancorados à membrana plasmática quanto na constituição da cápsula (Fonte: adaptado de Scollard et al., 2006).

A abundância de moléculas lipídicas como ácidos micólicos e os PGLs faz com que o ML seja considerado um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), pois resiste à descoloração por solventes orgânicos acidificados quando submetido à coloração por corantes básicos (Rees,

1985; Brennan & Nikaido, 1995). Essa micobactéria é também considerada Gram-positiva, apesar de não ser bem corada por esse método (Rees, 1985).

O ML apresenta um genoma de aproximadamente 3,3 Mb, onde apenas 49,5% correspondem a genes funcionais, ou seja, cerca de 1.604 seqüências codificantes de proteínas e 1.116 pseudogenes (Cole et al., 2001). Ao comparar seu genoma com o de outras micobactérias, como *M. tuberculosis*, pode-se observar que o ML sofreu ao longo do tempo um processo de evolução redutiva, que envolveu a perda de certas funções e de seus respectivos genes, resultando no encolhimento do genoma. São sugeridas diversas causas para a ocorrência desse fenômeno, inclusive as alterações de nichos sofridas por esses organismos como, por exemplo: (1) a mudança de uma vida livre para uma vida intracelular ou estritamente associada a um hospedeiro, (2) mudança de variados hospedeiros para um hospedeiro específico, ou até mesmo, (3) de variados tecidos para um tecido específico do seu hospedeiro (Gómez-Valero et al., 2007).

O ML apresenta um tempo de geração de aproximadamente 14 dias, tendo sido frustradas todas as tentativas de cultivá-lo *in vitro* até o momento. É provável que os efeitos combinados da deleção gênica e de mutações ocorridas em regiões do genoma envolvidas no metabolismo, regulação, reparo de DNA, entre outras, seriam as causas do insucesso do cultivo *in vitro* desse bacilo (Vissa & Brennan, 2001). Além dos aspectos genéticos, o crescimento do ML também é determinado pela temperatura do ambiente onde se encontra, já que o mesmo tem dificuldade de se multiplicar na temperatura corporal de 37°C. Sua taxa ótima de crescimento ocorre na faixa de 27°C a 30°C, o que explica o seu tropismo por áreas mais frias do corpo humano, como a pele, nervos e trato respiratório (Shepard, 1965; Hastings et al., 1968; Desikan, 1977).

Portanto, o cultivo do ML é feito *in vivo* e está restrito a alguns modelos animais, incluindo o tatu e camundongos (Truman, 2005), o que dificulta seu estudo e limita a quantidade de informações disponíveis sobre esse bacilo, quando comparado às outras micobactérias. Com exceção dos animais já citados e alguns primatas, os seres humanos são os únicos reservatórios de infecção do ML (Spierings et al., 2000). Acredita-se que mais de 90% da população seja resistente à infecção pelo ML e não apresente sintomas clinicamente detectáveis (Godal et al. 1972). Uma minoria desses indivíduos infectados, cerca de 5%, desenvolve as diferentes formas clínicas da doença de acordo com o tipo de resposta imunológica aos antígenos do patógeno e de características genéticas do indivíduo. Essas diferenças na resposta imunológica ao ML

justificam o amplo espectro clínico de apresentação da doença (Souza, 1997; Margoles et al., 2011).

1.4 Aspectos clínicos e Classificação

Em 500 a.C. o Sushruta Samhita, um livro médico indiano, reconhecia duas formas fundamentais da hanseníase: uma caracterizada por fenômenos neurológicos e outra onde predominavam deformidades e ulcerações cutâneas. Com uma maior compreensão da doença, essa classificação tornou-se cada vez mais complexa, sendo ainda hoje motivo de discussão entre os profissionais da área. Entre os meados do século XIX até fim do século XX foram feitos avanços consideráveis nesse campo e atualmente existem três sistemas principais de classificação da hanseníase adotados pelos profissionais de saúde: o sistema de Madri, o de Ridley & Jopling e o da OMS.

Em 1953 foi realizado o IV Congresso Internacional de Hanseníase, no qual profissionais da área dividiram a hanseníase em: forma indeterminada, tuberculoide, dimorfa e virchoviana. As formas indeterminada e tuberculoide são identificadas através da baciloscopia negativa no esfregaço cutâneo. As manifestações mais frequentes da forma indeterminada são a presença de áreas de hipo ou anestesia, parestesias, manchas hipocrômicas e/ou eritemo-hipocrômicas, com ou sem diminuição da sudorese e rarefação de pelos. Já a forma tuberculoide apresenta placas eritematosas, eritemato-hipocrômicas, com até 5 lesões de pele bem delimitadas, hipo ou anestésicas, podendo ocorrer comprometimento de nervos (Basombrio et al., 1953).

Os quadros dimorfa e virchoviano, por sua vez, são detectados pela presença de BAAR nos esfregaços de linfa cutânea. A forma dimorfa engloba lesões pré-foveolares (eritematosas planas com o centro claro) ou lesões foveolares (eritematopigmentares de tonalidade ferruginosa ou pardacenta), apresentando alterações de sensibilidade. Já os pacientes virchovianos exibem eritema e infiltração difusos, placas eritematosas de pele infiltradas e de bordas mal definidas, além de tubérculos e nódulos, madarose e lesões das mucosas com alteração de sensibilidade (Basombrio et al., 1953).

O sistema de Ridley & Jopling concebido em 1966, considera características histopatológicas e clínicas, assim como a carga bacteriana e variações na resposta imunológica dos pacientes, para definir o espectro clínico observado na hanseníase. Segundo essa classificação, podemos distinguir os polos tuberculoide-tuberculoide (TT) e lepromatoso-lepromatoso (LL), além das formas intermediárias denominadas borderline-tuberculoide (BT), borderline-borderline (BB) e borderline-lepromatosa (BL). Os indivíduos que não se encaixam

nesses perfis, ou seja, que apresentam uma resposta insuficientemente diferenciada para permitir sua classificação são denominados de indeterminados, e podem ao longo da doença evoluir para qualquer uma das formas mencionadas anteriormente ou até atingir a cura espontânea (Ridley & Jopling, 1966; Goulart et al., 2002) (Figura 4).

O teste de Mitsuda é uma reação de hipersensibilidade do tipo IV usada como medida padrão da imunidade mediada por células ao ML. Esse teste é realizado pela aplicação de uma injeção intradérmica contendo uma suspensão de bacilos mortos por calor que leva a uma reação cutânea, medida após 21–28 dias. Segundo as deliberações feitas no IV Congresso Internacional de Hanseníase, o teste de Mitsuda é considerado negativo quando há ausência de resposta clínica, e positivo quando surge uma infiltração, pápula ou nódulo com mais de 3 mm de diâmetro (Congresso Internacional de Leprologia, 1953).

O teste de Mitsuda é positivo em pacientes TT, pois estes desenvolvem uma vigorosa resposta celular, apresentando poucos bacilos e lesões limitadas. O teste é negativo nos pacientes LL, já que os mesmos apresentam extrema suscetibilidade ao ML, cuja proliferação disseminada resulta em lesões de pele difusamente distribuídas (Scollard et al., 2006).

As formas intermediárias ou borderline são extremamente instáveis, ocorrendo uma progressiva redução da resposta imune celular entre o grupo de maior resistência, o borderline-tuberculoide (BT), e o de menor resistência, o borderline-lepromatoso (BL). Os valores do teste de Mitsuda nesse grupo variam de acordo com o nível de resposta imune do paciente (Britton & Lockwood, 2004; Goulart et al., 2002) (Figura 4).

Pacientes hansênicos podem, além dos sintomas clássicos, desenvolver estados reacionais, ou seja, manifestações clínicas resultantes de alterações no balanço imunológico frente ao ML. Esses episódios podem ocorrer durante o curso natural da doença, durante o tratamento, ou até mesmo quando o indivíduo é considerado curado. Essas reações são classificadas de acordo com Ridley & Jopling, em reação do tipo 1 ou reação reversa (RR) e reação do tipo 2 ou eritema nodoso hansênico ou leproso (ENH ou ENL), e são a principal causa de morbidade e de danos permanentes ao nervo periférico (Ridley & Jopling, 1966) (Figura 4).

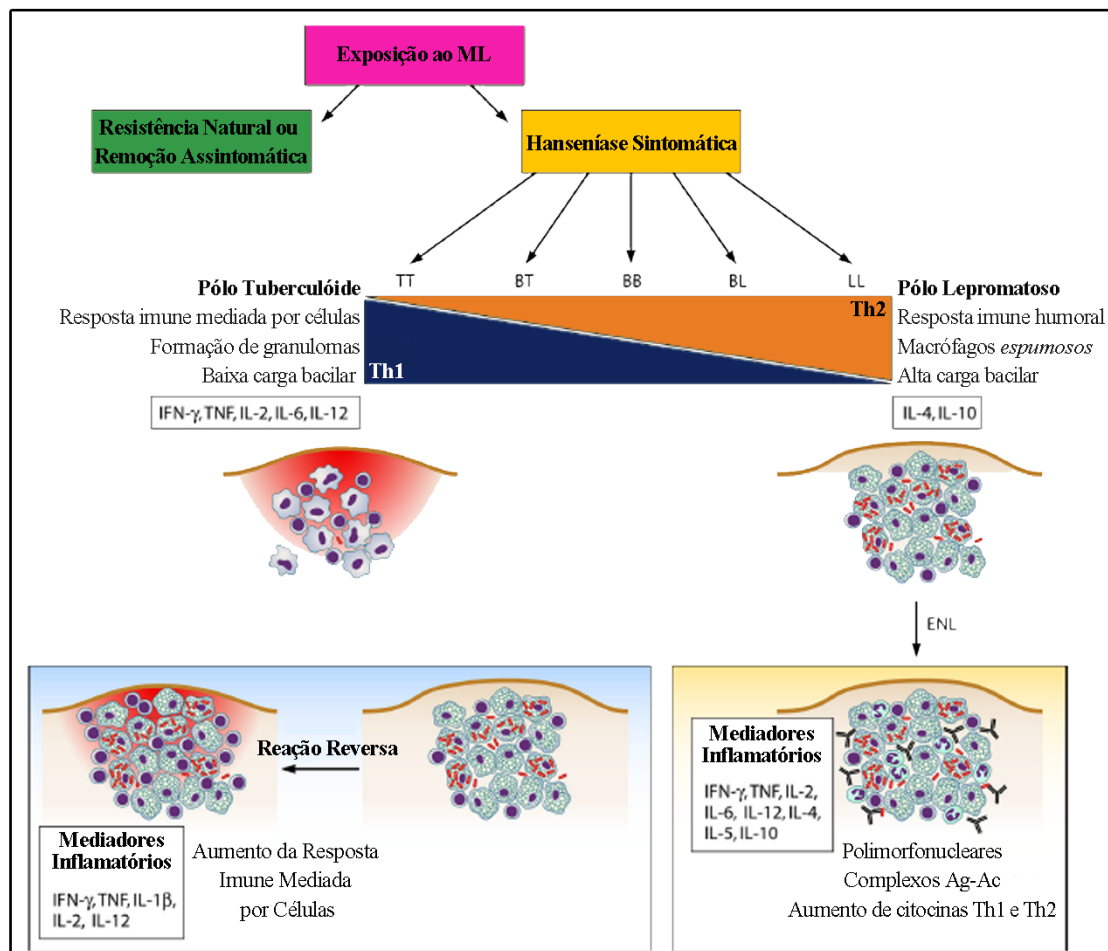


Figura 4: Espectro de formas clínicas da hanseníase segundo Ridley & Jopling. A classificação de Ridley & Jopling divide a hanseníase em um amplo espectro clínico que abrange dois polos opostos e suas formas intermediárias. O polo TT engloba indivíduos capazes de controlar a proliferação e disseminação do bacilo, através de uma eficiente resposta mediada por células. Já os indivíduos do polo LL, por exibir uma resposta essencialmente humoral, com um perfil Th2, não conseguem eliminar nem controlar o bacilo. As formas *borderline* são distribuídas ao longo do espectro de acordo com as semelhanças aos dois polos, entretanto a instabilidade imunológica característica desses pacientes pode levar a evolução para outras formas do espectro. Os quadros reacionais descritos por esse sistema são a reação reversa e o eritema nodoso leproso, que são resultantes de alterações abruptas da resposta imune frente ao ML (Fonte: Adaptado de Misch et al., 2010).

O sistema de classificação da OMS é mais simples e útil em locais onde não há recursos para obtenção das informações adotadas pela classificação de Ridley & Jopling. Nesse caso, as formas TT e BT são consideradas paucibacilares e as BB, BL e LL são classificadas como multibacilares por apresentarem uma alta carga parasitária. Apesar de pacientes com uma única lesão cutânea serem classificados como paucibacilares, esse grupo é definido oficialmente pela presença de ≤ 5 lesões, enquanto que o grupo multibacilar é caracterizado pela presença de ≥ 6 lesões (WHO, 2012; Hussain, 2007).

Apesar desse sistema de classificação ser útil e prático em situações onde há carência de outras ferramentas de diagnóstico, ele é passível de erros que podem resultar na escolha incorreta de tratamento dos pacientes. Uma comparação feita entre essa classificação e a de Ridley & Jopling na Índia demonstrou que aproximadamente 60% dos pacientes classificados como BT foram inseridos no grupo de multibacilares, e foram, portanto, tratados inadequadamente, recebendo uma quantidade maior de medicação, por um período maior que o necessário (Van Brakel et al., 2005).

Portanto, é aconselhável que centros de referência utilizem ambos os sistemas de classificação, a fim de se obter um diagnóstico confiável. A classificação da OMS é extremamente útil para uma avaliação inicial e direcionamento do atendimento. Entretanto, no contexto da pesquisa clínica, é indicada a adoção do sistema de Ridley & Jopling, pois este fornece uma compreensão melhor da patologia da doença, do prognóstico e fatores de riscos para possíveis complicações (Lockwood et al., 2007).

1.5 Tratamento

Na década de 40 do século XX, observou-se que o antibiótico dapsona, potente inibidor da enzima dihidropteroato sintase envolvida no metabolismo do ácido fólico, interrompia o progresso dos sintomas da hanseníase (Hussain et al., 2007). Entretanto, na década de 60 se iniciou um fenômeno generalizado de resistência a essa droga, reduzindo sua eficácia no tratamento da doença. Posteriormente, a administração de dapsona foi acoplada aos antibióticos rifampicina e clofazimina, estabelecendo, então, a chamada polioquimioterapia (PQT) que constitui, atualmente, a estratégia mais eficaz de combate à infecção pelo ML (Britton & Lockwood, 2004; WHO, 2012).

Desde 1995, a OMS disponibiliza o tratamento gratuitamente para todos os pacientes com hanseníase nos países endêmicos, inicialmente através do fundo para drogas da Fundação Nippon e, desde o ano 2000, através da doação da Novartis e da Fundação Novartis para o Desenvolvimento Sustentável (WHO, 2012).

A polioquimioterapia é um tratamento simples e altamente efetivo, que pode ser empregado na cura de todas as formas clínicas da hanseníase. A rifampicina é a droga mais importante no tratamento da hanseníase, e por isso é incluída na terapia de todas as formas clínicas. É adotado um regime de 12 doses de uma combinação de rifampicina, clofazimina e dapsona para os pacientes multibacilares que deve ser administrada ao longo de um período de no máximo 18 meses. Os pacientes paucibacilares devem seguir um tratamento de 6 doses de

rifampicina e dapsona que devem ser administradas ao longo de um período de no máximo 9 meses. A alta dos pacientes está condicionada ao cumprimento do tratamento de acordo com as diretrizes da OMS no espaço de tempo determinado para cada grupo (Ministério da Saúde, 2009; WHO, 2012).

1.6 Imunopatogênese

A interação entre o ML e o sistema imune do hospedeiro determina não só o curso da infecção, como também a forma de manifestação da hanseníase. Ao longo do espectro de formas clínicas da doença podemos observar claramente o paradigma imunológico Th1 x Th2, e correlacioná-lo diretamente com os sintomas desenvolvidos pelo paciente. Atualmente, é amplamente aceito que fatores genéticos ligados à resposta imune determinam não só se os indivíduos expostos ao ML desenvolverão hanseníase, mas também se os mesmos serão acometidos pelas formas clínicas mais resistentes ou suscetíveis ao bacilo (Misch et al., 2010; Pinheiro et al., 2011).

Apesar das imunidades celular e humoral estarem simultaneamente ativadas na hanseníase, o componente celular assume uma maior participação na eliminação do bacilo, já que o ML é um patógeno intracelular (Sehgal, 1989). As formas clínicas do polo TT (TT e BT) são consideradas mais resistentes, pois agrupam indivíduos capazes de organizar uma resposta mediada por células eficiente que culmina no controle da carga bacilar (Britton & Lockwood, 2004). Esses pacientes exibem lesões cutâneas com infiltrado granulomatoso formado por células epitelioides circundadas por um halo linfocitário. Devido ao controle imune eficaz, a existência de BAAR nas lesões é rara. Nessas formas, a presença de filetes nervosos na derme é escassa, já que a destruição dessas estruturas é um fenômeno frequente nesses pacientes (Gallo et al., 2005) (Figura 5).

As formas LL apresentam uma imunidade celular inoperante, exibindo uma anergia celular específica contra o ML (Ottenhoff, 1994). Deste modo, esses indivíduos são permissivos à sobrevivência e multiplicação do bacilo, exibindo lesões cutâneas repletas de macrófagos parasitados com aspecto vacuolado, devido ao intenso armazenamento de lipídios (Gallo et al., 2005; Goulart et al., 2002). Uma grande quantidade de bacilos é observada nessas lesões, e pelo fato, do dano nervoso ocorrer mais lentamente nessas formas, é possível visualizar um maior número de filetes nervosos dérmicos do que no polo TT (Gallo et al., 2005) (Figura 5).

1.6.1 Imunidade inata

A natureza da resposta imune adaptativa, e, portanto, as consequências de uma infecção, são determinadas pelo caráter da resposta imune inata. As células da imunidade inata são equipadas com um amplo repertório de receptores de reconhecimento de padrões (em inglês PRRs) que, por sua vez, reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (em inglês PAMPs), sendo estes compartilhados por diversas classes de microrganismos (Modlin, 2010).

Uma importante classe de PRRs responsável pelo reconhecimento de lipoproteínas micobacterianas são os receptores do tipo Toll (em inglês TLR), que se encontram na superfície de células apresentadoras de antígeno (em inglês APC), como monócitos e macrófagos (Brightbill et al., 1999). O reconhecimento do ML parece ocorrer, principalmente, através do heterodímero TLR2/1, que após a ativação, leva à diferenciação de monócitos em macrófagos e células dendríticas, desencadeando também a produção de TNF- α e IL-12, ambas importantes para indução de uma resposta Th1. Além disso, a ativação de TLR2/1 induz a expressão de GM-CSF e seu receptor, causando a expansão de populações de células dendríticas, além de IL-15 e seu receptor, o que provoca a diferenciação de macrófagos (Krutzik et al., 2003; 2005; Montoya & Modlin, 2010). Análises imuno-histoquímicas revelaram que TLR1 e 2 são mais expressos em macrófagos presentes nas lesões de pacientes TT, quando comparados as lesões de pacientes LL, indicando um dos possíveis mecanismos que contribui para a anergia observada neste polo (Krutzik et al., 2003) (Figura 5).

A proteína de revestimento que contém aspartato triptofano (em inglês, TACO ou coronina-1) inibe a maturação de fagossomas, favorecendo assim o parasitismo intracelular. Macrófagos parasitados por ML na lesão de pele de pacientes LL apresentam alta expressão dessa molécula, que pode diminuir a sinalização via TLR2 (Suzuki et al., 2006). A ativação desse receptor, por sua vez, suprime a expressão de coronina-1 em macrófagos humanos (Tanigawa et al., 2009; Montoya & Modlin, 2010) (Figura 5).

Outro grupo importante de PRRs é a família de receptores do tipo NOD, que não só compartilham homologia com os TLRs, mas podem apresentar um domínio CARD, envolvido na ativação de caspases (Correa et al., 2012). O NOD2 é um integrante dessa família que medeia a resposta a peptídeoglicanos localizados na parede de micobactérias, reconhecendo especificamente a porção de muramil dipeptídeo (MDP) (Yang et al., 2007; Girardin et al., 2003). A ativação de NOD2 pelo MDP leva a diferenciação de monócitos em células dendríticas, juntamente com a produção de IL-32. As lesões de pele TT apresentam maior expressão de IL-

32 e NOD2 do que lesões LL. Além disso, monócitos de pacientes LL são naturalmente resistentes à ativação de NOD2, e, portanto, não se diferenciam em populações de células dendríticas produtoras de IL-32, como é observado nos monócitos de indivíduos TT (Montoya & Modlin, 2010; Schenk et al., 2012). Deste modo, NOD2 parece ser importante para resposta imune contra o ML, já que polimorfismos identificados no gene *NOD2* estão associados com a susceptibilidade a hanseníase (Berrington et al., 2010) (Figura 5).

Lesões LL são caracterizadas por um marcante *déficit* de células dendríticas, tanto na derme quanto na epiderme, o que pode ser um dos mecanismos que justifique a imunidade celular inoperante desse polo (Sieling et al., 1999; Simoes et al., 2009; Miranda et al., 2007; Lee et al., 2007). A diferenciação de precursores mieloides em células dendríticas pode ser inibida por lipídios derivados do hospedeiro e pelo próprio ML, ambos encontrados em abundância nas lesões LL (Lee et al., 2007; Cruz et al., 2008; Murray et al., 2007). A galectina 3 é uma proteína que promove a diferenciação de monócitos em macrófagos, sendo expressa predominantemente nesses tipos celulares. Ao contrário das lesões TT, as lesões cutâneas LL expressam altos níveis de galectina 3, o que pode justificar a baixa frequência de células dendríticas nesse polo, já que a população de monócitos pode estar sendo direcionada a se diferenciar em macrófagos em vez de células dendríticas (Chung et al., 2013) (Figura 5).

De um ponto de vista histológico, as populações de macrófagos exibem alta diversidade morfológica entre as formas clínicas da hanseníase. As lesões de pele TT exibem macrófagos com aspecto ativado, chamados também de células epitelioides, que se organizam em granulomas. Já nas lesões LL residem macrófagos repletos de bacilos e lipídios, denominados de células de Virchow (Virchow, 1863; Modlin, 2010). Portanto, pode-se sugerir que essas diferenças refletem funcionalidades distintas dessas populações nos dois polos da doença. Os macrófagos das lesões TT exibem um perfil funcional microbicida dependente da via de vitamina D, induzido pela citocina IL-15, que é altamente expressa nesses pacientes. Já a população de macrófagos LL, sob o efeito dos elevados níveis de IL-10 dessas lesões, apresentam alta capacidade fagocítica, captando elevada quantidade de bacilos e lipoproteínas oxidadas de baixa densidade. Isso indica que as populações de macrófagos nos dois polos da doença estão seguindo programas funcionais distintos, determinados pelo perfil de citocinas expresso nesses grupos, o que reflete na capacidade do hospedeiro em conter a disseminação do bacilo (Montoya et al., 2009) (Figura 5).

Provavelmente, devido a grande capacidade fagocítica dos macrófagos LL, ocorre um amplo acúmulo de fosfolipídios oxidados derivados do hospedeiro em lesões desses pacientes,

que exibem também uma alta expressão de genes relacionados ao metabolismo de lipídios, cenário não observado nas lesões TT (Cruz et al., 2008). Recentemente foi demonstrado que o ML é capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos por um mecanismo dependente de TLR6 e TLR2 (Mattos et al., 2011). Esses corpúsculos lipídicos, por sua vez, constituem sítios para a síntese de eicosanoides e podem ser reguladores críticos na subversão da resposta imune na hanseníase (Figura 5).

Uma evidência que reforça a existência desse mecanismo, é o fato das lesões de pacientes LL apresentarem maior expressão de ciclooxigenase 2 (COX-2) quando comparado às lesões de pacientes TT (Kiszewski et al., 2003). Isso explica a liberação de prostaglandina E₂ (PGE₂) por monócitos de pacientes LL, mas não de pacientes TT (Misra et al., 1995). A PGE₂ inibe a produção de IL-2 e também de IFN- γ , citocinas em geral fracamente expressas nas lesões LL, mas importantes para geração de uma resposta imune específica (Misra et al., 1995; Kiszewski et al., 2003) (Figura 5).

Apesar das diferenças funcionais observadas nas populações de macrófagos, o receptor CD209 que medeia a fagocitose de diversos patógenos, inclusive o ML, é expresso em níveis similares nas lesões cutâneas dos polos da hanseníase (Krutzik et al., 2005). Entretanto, esse receptor tem um papel importante na função de células dendríticas do polo LL, já que é mais expresso no sangue de pacientes BL e LL do que indivíduos BT. Nesses pacientes, o ML interage com CD209 e ativa a via de NF- κ B, levando a produção de IL-10, contribuindo assim para o quadro imunossupressor dessas formas (Kumar et al., 2013a).

Outro mecanismo imunossupressor descrito na hanseníase está relacionado à presença de microRNAs, que são sequências curtas de RNAs não codificantes envolvidos na regulação da expressão gênica de células eucariotas. O microRNA-21 é capaz de inibir a expressão de genes da via antimicrobiana de vitamina D, diminuindo a expressão de moléculas induzidas pela ativação de TLRs. As lesões cutâneas de LL apresentam maior expressão do microRNA-21 que as lesões de pacientes TT, o que parece ser mais um mecanismo, além da IL-10, que impossibilita a progressão de uma resposta microbicida nesses pacientes (Liu et al., 2012) (Figura 5).

Na hanseníase, a apoptose é mais frequente em células de pacientes paucibacilares que multibacilares, sugerindo que esse fenômeno seja um mecanismo empregado na contenção da multiplicação bacilar (Hernandez et al., 2003; Walsh et al., 2004; Fulco et al., 2007). Dados do nosso grupo indicam que o ML pode levar a apoptose de macrófagos humanos por um mecanismo relacionado à expressão de TNF- α . Sabe-se, também que sinais liberados por

células apoptóticas podem direcionar a polarização de macrófagos para um fenótipo alternativo M2 (Ferracini et al., 2013). Nosso grupo também demonstrou recentemente que, na presença do ML, a fagocitose de células apoptóticas (eferocitose) induz a alteração do fenótipo de macrófagos M1, para um fenótipo M2, com aumento da expressão de receptores *scavenger*, como o CD163 e o SRA-I, das citocinas imunorregulatórias IL-10 e TGF- β e a redução de IL-15 e IL-6. Já os macrófagos M2 não apresentam alteração de fenótipo e função frente a células apoptóticas (de Oliveira Fulco et al., 2014). Isso indica que a eferocitose em pacientes hansênicos é independente da forma clínica e pode levar a um aumento da população de macrófagos M2, auxiliando a persistência bacteriana nos indivíduos LL e contribuindo para conter a inflamação no grupo TT.

Outro mecanismo empregado pelo ML que induz a anergia observada no polo LL é o aumento da expressão da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) em APCs. A IDO é uma enzima catalisadora do aminoácido essencial triptofano, altamente expressa em lesões de pele LL em relação a pacientes TT. Dados do nosso grupo sugerem que induzindo a expressão gênica e atividade enzimática de IDO, o bacilo desencadeie a anergia antígeno-específica na população de células T, observada no polo LL. Além disso, essa enzima também atua inibindo o estresse oxidativo, o mecanismo bactericida mais eficiente na eliminação do ML, inibindo a via do óxido nítrico através da ativação da heme oxigenase-1 (HO-1) (Sierra-Filardi et al., 2010; de Souza Sales, et al., 2011) (Figura 5).

O CD163 foi inicialmente caracterizado como um receptor *scavenger* para hemoglobina, mas estudos recentes têm demonstrado sua funcionalidade como receptor para bactérias, inclusive para o ML, assim como seu importante papel na imunidade inata (Kristiansen et al., 2001; Fabrick et al., 2009). Nosso grupo mostrou recentemente o aumento da expressão de CD163 nas lesões de pele LL quando comparados ao grupo TT (Moura et al., 2012). Além disso, nosso grupo observou que a população de macrófagos de lesões de pele LL expressam mais IDO, receptores *scavenger* CD163 e SRA-I, arginase-I e CD86, quando comparados aos macrófagos das lesões TT. O CD163 contribui não apenas para a internalização do ML, como também para sua sobrevivência, ao aumentar os estoques de ferro intracelular (de Souza Sales et al., 2011; Moura et al., 2012; de Oliveira Fulco et al., 2014) (Figura 5).

Os interferons do tipo I ou IFN α/β , são essenciais para imunidade contra infecções virais, mas parecem não ter um papel importante no contexto de patógenos bacterianos, como no caso de *Mycobacterium tuberculosis* (Berry et al., 2010). Genes relacionados ao IFN- γ são mais expressos nas lesões de pele TT que no grupo LL, enquanto que IFN- β e moléculas associadas

a esta via são expressos em altos níveis nos pacientes LL (Teles et al., 2013). A via antimicrobiana de vitamina D é induzida por IFN- γ e pode ser inibida por IL-10 e IFN- β , indicando que há uma relação inversa entre os interferons tipo I e II que reflete na resposta observada nas lesões TT e LL (Teles et al., 2013) (Figura 5).

1.6.2 Imunidade adaptativa celular

Uma correlação inversa entre a imunidade celular e a resposta imune humoral é observada nas formas clínicas da hanseníase. Verifica-se uma maior frequência de células T CD8⁺ nas lesões de pele LL, enquanto que células T CD4⁺ predominam em lesões TT. No polo TT, a lesão exibe uma razão populacional CD4/CD8 de 1,9/1 concentrada em sua maioria nos granulomas, enquanto que as lesões LL apresentam uma relação de 0,6/1 dessas populações dispersadas entre os macrófagos espumosos. No entanto, não são observadas diferenças no sangue desses grupos, pois ambos apresentam uma taxa CD4:CD8 de 2:1 (Modlin et al., 1983; Modlin et al., 1986) (Figura 5).

Além disso, pacientes TT exibem uma taxa de células T de memória:T *naive* de 1:1 no sangue e 14:1 nas lesões de peles, o que indica que a maioria da população de linfócitos CD4⁺ nessas lesões expressam fenótipo T de memória (CD45R0⁺). Em contrapartida, nas lesões LL a metade das células T CD4⁺ são células T *naive*. A maioria das células CD8⁺ que infiltram as lesões LL é CD28⁻, indicando que apresentam um fenótipo supressor, enquanto que as células de fenótipo T citotóxico (CD28⁺) predominam nas lesões TT (Modlin et al., 1988).

Outras classes adicionais de células T recrutadas para o sítio de infecção do ML foram identificadas, incluindo células T expressando receptores $\gamma\delta$ e um tipo de célula T $\alpha\beta$ duplo negativo (CD4⁻ e CD8⁻) (Beckman et al., 1994; García et al. 1997; Porcelli & Modlin 1999). Estas células reconhecem antígenos não proteicos, incluindo o LAM e ácido micólico micobacterianos, os quais são apresentados por moléculas CD1 expressas por APCs, independentemente de MHC de classe I e II (Porcelli & Modlin 1999; Sieling et al., 2005; Torrelles et al., 2011). As proteínas CD1 são expressas em altos níveis nas células dendríticas nos granulomas dérmicos de pacientes TT, ao contrário de lesões LL, o que sugere que as células T restritas ao CD1 contribuem para o controle do patógeno (Sieling et al., 1995; 1999) (Figura 5).

O padrão de resposta imune Th1 x Th2 na hanseníase foi determinado através da detecção da expressão de RNAm de citocinas na lesão de pacientes TT e LL. Os pacientes LL apresentam um perfil predominante de citocinas do tipo Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10), havendo

também produção dessas citocinas por células T do sangue periférico (Salgame et al., 1991; Yamamura et al., 1991; Sieling & Modlin 1994). A IL-4 induz células B a produzirem altos títulos de anticorpos específicos para o ML, incluindo anticorpos da classe Imunoglobulina E (IgE) e anticorpos IgM anti-PGL-1, associados com a inibição da resposta imune celular (Modlin, 1994). A IL-10, por sua vez, tem sido detectada em altos níveis nesses pacientes, mostrando correlação positiva com o alto índice bacilosκόpio (Moubasher et al. 1998) (Figura 5).

Genes relacionados com respostas de células B apresentam expressão aumentada em lesões de pele LL quando em comparação a lesões TT, indicando a existência de uma rede dependente de IL-5 e IgM. Além disso, o ML é capaz, juntamente com a IL-5, de induzir a produção de IgM em células sanguíneas (Ochoa et al., 2010) (Figura 5).

A IL-13 também tem sido incluída no mecanismo de supressão de células T na hanseníase por seus efeitos sobre células B e macrófagos similares aos da IL-4. Tem sido demonstrado que apenas clones de células Th2 de lesões lepromatosas produzem IL-13 (Salgame et al., 1991; Modlin, 1994; Sieling & Modlin, 1994; Foss, 1997; Sampaio & Sarno, 1998; Montoya et al., 2009; Montoya & Modlin, 2010).

As lesões de pacientes TT expressam altas quantidades de citocinas do tipo Th1 (IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IFN- γ e TNF- α) em comparação com as lesões de pacientes LL (Arnoldi et al., 1990; Salgame et al., 1991; Yamamura et al., 1991; Sieling et al., 1994; García et al., 1999). A IL-2 estimula a proliferação de linfócitos, responsáveis pela manutenção da produção de citocinas, e, paralelamente, estimula as células *natural killer* (NK), potencializando a produção de IFN- γ . Já o IFN- γ , age nos macrófagos, estimulando a fagocitose, a produção de radicais reativos de nitrogênio e oxigênio e mecanismos de ativação celular que, por sua vez, aumentam a produção de TNF- α , intensificando a ativação de macrófagos, estabelecendo assim, um mecanismo sinérgico cíclico (Foss, 1997). Adicionalmente, a IL-12 estimula as células NK, induzindo a produção de IFN- γ , potencializando ainda mais ativação de macrófagos. Não é observada uma grande imunidade humoral neste polo da doença, sendo encontradas baixas concentrações de imunoglobulinas específicas (Foss, 1997; Sampaio et al., 2003; Moura et al., 2008) (Figura 5).

O fator de crescimento transformador beta (TGF- β 1), um dos mais potentes fatores endógenos imunossupressores, apresenta um amplo espectro de ações, estando envolvido tanto em respostas imunes inatas quanto adaptativas (Wahl et al., 2004; Wahl, 2007). Altos níveis desse fator foram observados em lesões cutâneas de pacientes LL quando comparados com as lesões TT. O TGF- β 1 tem ação supressora sobre macrófagos contrapondo os efeitos do IFN- γ na atividade antimicrobiana mediada pelo óxido nítrico e inibindo a produção de TNF- α , podendo

contribuir para a perpetuação da infecção (Bermudez et al., 1993; Goulart et al., 1996). Além disso, essa molécula pode impedir a geração de linfócitos Th1 e Th2, inibindo a transcrição dos fatores *T-bet* e *Gata-3*; está envolvida na diferenciação de células Th17, além de ser secretada em altos níveis por células T reguladoras (Treg) e Th3 (Gorelik et al., 2000; Gorelik et al., 2002; Komagata & Weiner, 2000) (Figura 5).

Células T reguladoras constituem uma população importante do sistema imune adaptativo, pois promovem respostas supressoras e tolerogênicas. O papel dessas células na resposta imune da hanseníase é controverso. Palermo e colaboradores (2012) mostraram que pacientes LL apresentam altos níveis de Tregs no sangue e nas lesões cutâneas, quando comparados com pacientes do polo TT. Já Kumar e colaboradores (2013) observaram uma maior frequência de Treg produtoras de TGF- β no sangue de pacientes BL e LL quando comparados ao grupo TT. Entretanto, Attia e colaboradores (2010) identificaram níveis maiores de Treg circulantes em pacientes TT do que em indivíduos LL (Palermo et al., 2012; Attia et al., 2010; Kumar et al., 2013b) (Figura 5).

Recentemente a resposta Th17 tem sido investigada no contexto da hanseníase. As citocinas da família IL-17 que são produzidas por esses linfócitos têm sido associadas com diversas patologias como artrite reumatoide, psoríase e esclerose múltipla (Polycarpou et al., 2013). A expressão gênica de IL-17A está reduzida em lesões LL quando comparados à pele de indivíduos saudáveis e níveis circulantes dessa citocina não são detectáveis no sangue de ambos os grupos (da Motta-Passos et al., 2012). Além disso, lesões de pele TT exibem maiores níveis de expressão gênica das citocinas IL-17A, IL-21 e do fator de transcrição RORC do que o grupo LL (Saini et al., 2013) (Figura 5).

Em síntese, a hanseníase tem servido como modelo para estudo de mecanismos de proteção, patologia e supressão imune por apresentar um amplo espectro de formas clínicas abrangendo desde a exacerbação até a ausência da resposta imune contra o bacilo. O estudo da dinâmica da imunidade ao ML tem permitido avanços consideráveis no campo da imunologia, inclusive desvendando mecanismos alternativos ao padrão clássico Th1 x Th2 (Gallo et al., 2005).

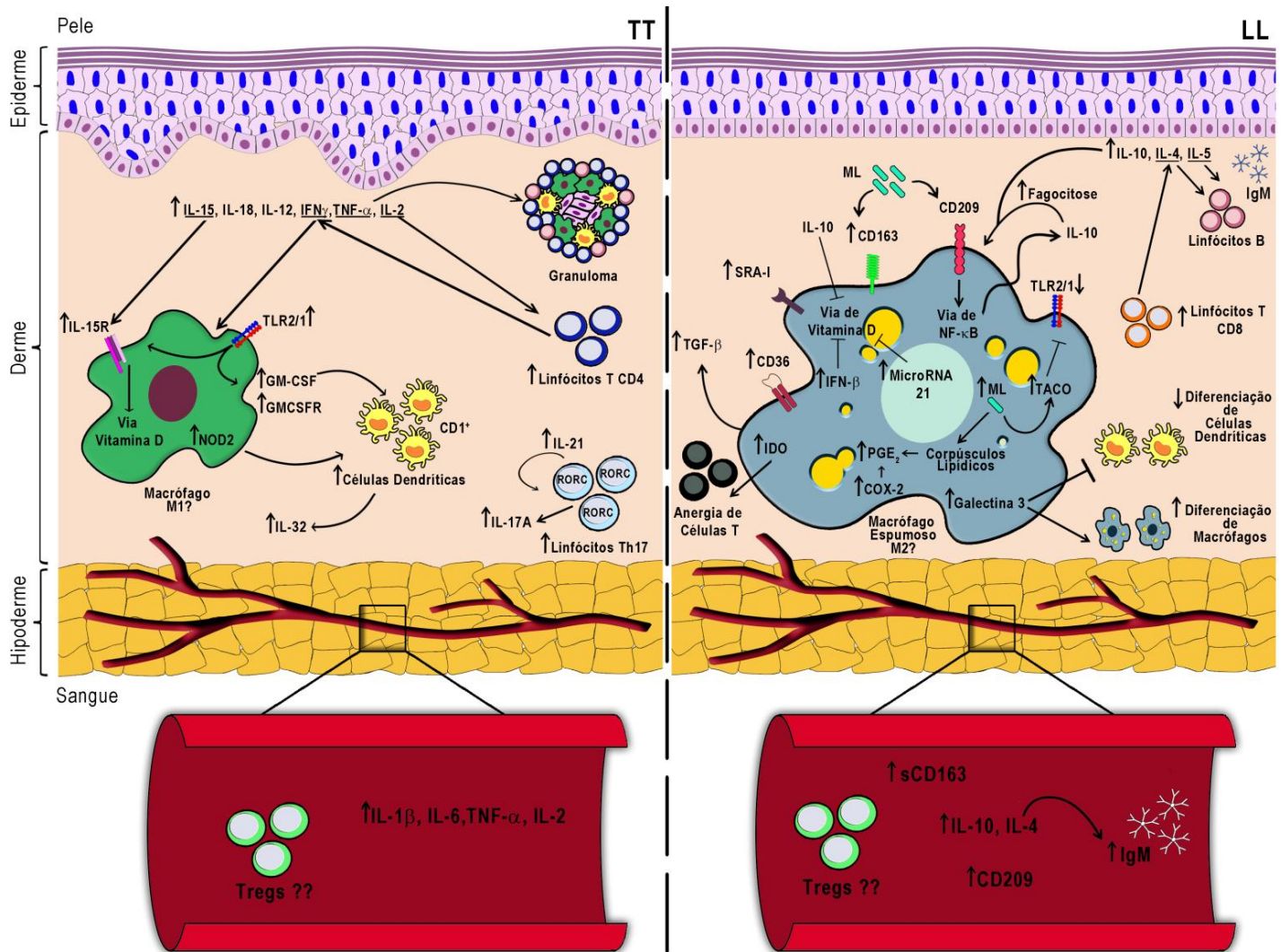


Figura 5: Imunopatogênese dos polos TT e LL na hanseníase. A existência dos polos da hanseníase reflete os diferentes contextos imunológicos desenvolvidos por indivíduos acometidos por essa doença. A imunidade do polo TT se baseia em uma eficiente resposta celular que se estrutura, entre outras coisas, sobre a ativação de PRRs, como o heterodímero TLR2/1 e NOD2. A ativação desses receptores leva, principalmente, à diferenciação de células dendríticas, um tipo celular crucial na contenção de infecções micobacterianas. Outro efeito da ativação de TLR2/1 é a secreção de TNF-α, um potente ativador de macrófagos que atua também na organização dos granulomas. O potencial microbicida das APCs é favorecido pela via de vitamina D. As células T também participam avidamente da resposta TT, sendo responsáveis pelos altos níveis de IFN-γ e IL-2, promovendo uma resposta Th1. A resposta Th17 também parece estar envolvida na imunidade TT, pois altos níveis de linfócitos RORC⁺, assim como citocinas desse eixo (IL-17 e IL-21) foram identificados nessas lesões. Em conjunto, todos esses mecanismos contribuem para o controle e eliminação do bacilo nesse polo da hanseníase. Os indivíduos LL, por sua vez, não conseguem estruturar a mesma resposta, apresentando limitações que possibilitam ao bacilo interferir com vias importantes da resposta imune do hospedeiro. As populações de macrófagos exibem alta expressão de receptores *scavenger*, como SRA-I, CD163 e CD36. A capacidade microbicida dessas células é comprometida pela presença de IFN-β, IL-10 e micro RNA 21 nas lesões. A ativação do TLR2/1 é prejudicada pela alta expressão de TACO induzida pelo ML. A alta expressão de IDO pode ser parcialmente responsável pela anergia nesse grupo e a grande frequência de linfócitos B nas lesões e no sangue justificam os altos títulos de anticorpos observados nesse grupo. Todos esses aspectos contribuem para sobrevivência e disseminação do bacilo (Fonte: elaborado por Andrade, PR, 2014).

2. REAÇÃO REVERSA

As reações da hanseníase são complicações que ocorrem ao longo da evolução da doença, resultantes de mudanças na resposta imune do hospedeiro contra o ML. Apesar de atingir, principalmente, as formas clínicas borderline, a RR pode ocorrer em uma pequena porcentagem de indivíduos com as formas LL subpolar da doença (Nery et al., 2013; Wade, 1955; Kar & Job, 2005). As características clínicas da RR se resumem ao aparecimento de lesões de pele e injúria nervosa periférica, e devido ao desenvolvimento de neurite na maioria dos pacientes, esse episódio é a principal causa do surgimento de deformidades e deficiências na hanseníase (Lockwood et al., 2008; Lockwood et al., 2011).

Os sintomas da RR relacionados com a ocorrência de injúria no sistema nervoso periférico podem incluir hiperestesia cutânea difusa e alodínia sensorial ou motora associada ou não com dor neural. Os mecanismos envolvidos com esses sinais ainda não foram elucidados e, portanto, a sua identificação precoce é essencial para a intervenção terapêutica apropriada nos estágios iniciais do episódio reacional.

Há diversos fármacos disponíveis para o tratamento da RR, mas o padrão é a utilização de corticoides orais, geralmente prednisona, que age na supressão da inflamação cutânea (edema e eritema). A dose indicada pela OMS é a administração de 1 — 1,5 mg/Kg diariamente e excepcionalmente 1,5 — 2 mg/Kg, até a melhora clínica, ou seja, a redução da dor à palpação e da dor espontânea dos nervos envolvidos, assim como, diminuição do edema, eritema e infiltração das lesões cutâneas acompanhado pela melhora na sensibilidade (Ministério da Saúde, 2009).

A retirada do esquema terapêutico é feita pela diminuição gradual das doses de prednisona. São reduzidos 10 mg a cada 15 dias, até se atingir a dose diária de 20 mg, podendo-se, então, reduzir a dose em 5 mg a cada 15 dias. Ao alcançar a dosagem de 5 mg, deve-se mantê-la por 15 dias e posteriormente o paciente deve tomá-la em dias alternados por mais 15 dias. O tempo médio de uso da prednisona em casos de RR é de 6 a 9 meses para cada episódio reacional (Ministério da Saúde, 2009).

Na terapêutica da RR, duas questões são de grande importância: o tratamento de episódios reacionais recorrentes e o diagnóstico tardio da RR. Episódios recorrentes são definidos como o reaparecimento de sintomas reacionais entre 6 a 12 semanas após o término do tratamento com prednisona. Por outro lado, a RR tardia é definida como a ocorrência do episódio reacional em qualquer momento após a conclusão da PQT. A maioria dos casos de RR

ocorrem entre os 6 e 12 meses do regime de PQT, mas podem ocorrer também de 6 meses até 7 anos após a conclusão do tratamento para hanseníase (Kumar et al. 2004). A detecção precoce seguida da terapia adequada com doses e duração apropriadas é a solução ideal para se minimizar a recorrência dos episódios e reduzir a frequência de deformidades e deficiências resultantes do acometimento funcional dos nervos (Pai et al., 2012).

Apesar da campanha de eliminação global de hanseníase ter reduzido drasticamente a prevalência da doença, um grande obstáculo continua sendo o diagnóstico precoce e tratamento da RR (Raffe et al. 2013). Portanto, há a necessidade de marcadores que auxiliem o reconhecimento e a prevenção de RR recorrentes, além de permitirem a distinção de episódios de RR de casos de recidiva da hanseníase.

A frequência de RR varia de 3,5% a 47,5% de acordo com o início e definições de casos (Becx-Bleumink & Berhe, 1992; Lienhardt & Fine 1994). A incidência de RR é maior durante a PQT, reduzindo gradualmente após o tratamento (Nery, 2013; Kumar et al. 2004). Kumar e colaboradores (2004) apontaram como fatores de risco para o desenvolvimento de RR o sexo feminino, formas clínicas multibacilares e doença generalizada. Outros fatores associados com o início da RR incluem variações hormonais decorrentes de gravidez, terapia antiretroviral altamente ativa (HAART), coinfeções e presença de antígenos micobacterianos nas lesões cutâneas dos pacientes.

A ocorrência de infecções crônicas orais também está associada com o desenvolvimento de episódios reacionais através da modulação da produção das citocinas IL-6 e IL-10 (Motta et al., 2010; Motta et al., 2012). Além disso, uma alta proporção de pacientes HIV positivos apresentaram RR no momento de diagnóstico da hanseníase (Sarno et al., 2008). Nesse caso, o início da HAART também se mostrou associado com o desenvolvimento de RR (Batista et al., 2008; Menezes et al., 2009). Apesar do episódio reacional também afetar pacientes que não estão recebendo tratamento para AIDS, o uso da HAART, parece ter um papel importante no desenvolvimento de RR nesse grupo, já que desde que esse regime terapêutico tornou-se disponível em países endêmicos para hanseníase, mais de 40 casos de RR associados com a síndrome de reconstituição imune (IRIS) foram descritos (Pavie et al., 2010; Talhari et al., 2010).

2.1 Imunopatogênese

Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da RR ainda são desconhecidos, mas sabe-se que os pacientes acometidos pelo episódio exibem uma mudança no seu *status* imunológico, alterando seu perfil de resposta Th2 em direção a Th1 ou intensificando uma resposta Th1 já estabelecida, com ambos os quadros resultando no aparecimento de novas lesões cutâneas e reativação das lesões antigas, juntamente com o acometimento dos nervos periféricos (Yamamura et al., 1991).

Vários trabalhos têm mostrado que esse fenômeno inflamatório leva a alterações não só na pele e nervos dos pacientes, mas também no sangue desses indivíduos. Os níveis de IL-1 β , TNF- α e receptor de IL-2 mostraram-se elevados no soro de pacientes reacionais, declinando após o tratamento com prednisona, evidenciando a forte resposta inflamatória em curso durante o episódio (Sarno et al., 1991; Tung et al., 1987, Parida et al., 1992; Sehgal et al., 1991). Altas concentrações de CXCL10 e IL-6 foram encontradas no plasma de pacientes com RR em comparação com um grupo não reacional de pacientes BT (Stefani et al., 2009). Foram observados altos níveis de IL-17F no soro de pacientes reacionais das formas clínicas borderline (BT e BL) da hanseníase em comparação com o grupo sem RR (Chaitanya et al., 2012). Dados do nosso grupo observaram uma menor atividade da enzima IDO nos pacientes em RR quando comparados às formas LL (de Souza Sales et al., 2012) (Figura 6).

Esse perfil de expressão pró-inflamatório também se estende às populações celulares sanguíneas, já que células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes em RR exibiram alta expressão gênica de IL-1 β , perforina, IL-12p55 e IFN- γ quando comparados com os indivíduos não reacionais (Moraes et al., 1999). Tanto populações celulares sanguíneas quanto cutâneas de pacientes em RR também exibiram alta expressão da molécula coestimuladora B7-1 (CD80) em comparação com indivíduos BL e LL sem reação, evidenciando o aumento da capacidade apresentadora de antígenos nesse episódio (Santos et al., 2007) (Figura 6).

Apesar de muitas mudanças imunológicas ocorrerem no sangue de pacientes reacionais, sintomas sistêmicos raramente são observados durante a RR. Os sintomas do episódio se restringem ao microambiente cutâneo e neural. Em lesões cutâneas, a expressão gênica das citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-2 e IFN- γ encontrou-se elevada durante o episódio reacional, com a concomitante redução de IL-4, IL-5 e IL-10 (Yamamura et al., 1991). A expressão de TNF- α concentra-se principalmente em macrófagos e nervos dessas lesões (Khanolkar-Young et al, 1995). Foi observada, também a redução da expressão gênica de IFN- β em lesões de pele reacionais quando comparadas com lesões LL (Teles et al., 2013) (Figura 6).

Lesões cutâneas reacionais apresentam elevada infiltração de linfócitos CD4⁺, além de uma maior reatividade imune celular contra antígenos do ML que podem levar ao desenvolvimento de dano nervoso (Cooper et al., 1989). Apesar de não serem observadas diferenças entre os níveis circulantes de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ no sangue de indivíduos com RR (Laal et al., 1987), um aumento nessas populações é observado nas lesões de pele, durante o episódio reacional em comparação com as formas clínicas LL sem reação, restritas principalmente ao granuloma epitelióide (Modlin et al., 1983; Cooper et al., 1989). Além dessas células, linfócitos $\gamma\delta$ também foram encontrados em níveis elevados na pele de pacientes em RR (Uyemura et al., 1992; Sieling & Modlin, 1994). Pacientes reacionais exibiram também uma menor expressão de Foxp3 do que indivíduos das formas BT e BB não acometidos por esse episódio (Massone et al., 2010) (Figura 6).

Os macrófagos de lesões reacionais se assemelham morfológicamente àqueles observados nas lesões cutâneas do polo TT. No caso de pacientes do polo LL que desenvolvem a RR, o papel funcional dessa população sofre uma mudança na programação gênica, abandonando o caráter fagocítico e adquirindo um perfil microbicida (Montoya et al., 2009). Altos níveis de expressão de dois peptídeos microbicidas humanos, as β -defensinas 2 e 3, foram encontrados em lesões de pacientes RR em comparação ao grupo não reacional, apontando para o papel da resposta imune inata nesse episódio (Cogen et al., 2012). Além disso, lesões reacionais exibem alta frequência de células de Langerhans e células dendríticas CD1⁺ (Sieling et al., 1999; Modlin et al., 1984) (Figura 6).

As metaloproteinases (MMP) são enzimas proteolíticas capazes de degradar componentes da matriz extracelular, sendo, portanto, responsáveis pela remodelagem desse ambiente (Han et al., 2001; McCawley & Matrisian, 2001). Essas moléculas são secretadas por diversos tipos celulares, como macrófagos e linfócitos, sob um regime rigoroso de regulação, já que a secreção excessiva de MMPs pode levar ao extenso dano tecidual (Okamoto et al., 2004). Um mecanismo de controle dessas moléculas envolve a família de inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP), que interagem com as MMPs, impedindo sua ação (Gomez et al., 1997). Em lesões de pacientes em RR foi observado um aumento dos níveis de RNAm de MMP-2, MMP-9 e TIMP-1, o que juntamente com a elevada atividade dessas MMPs e uma alta razão de MMP/TIMP-1, indicam um ambiente favorável à promoção de dano tecidual (Teles et al., 2010) (Figura 6).

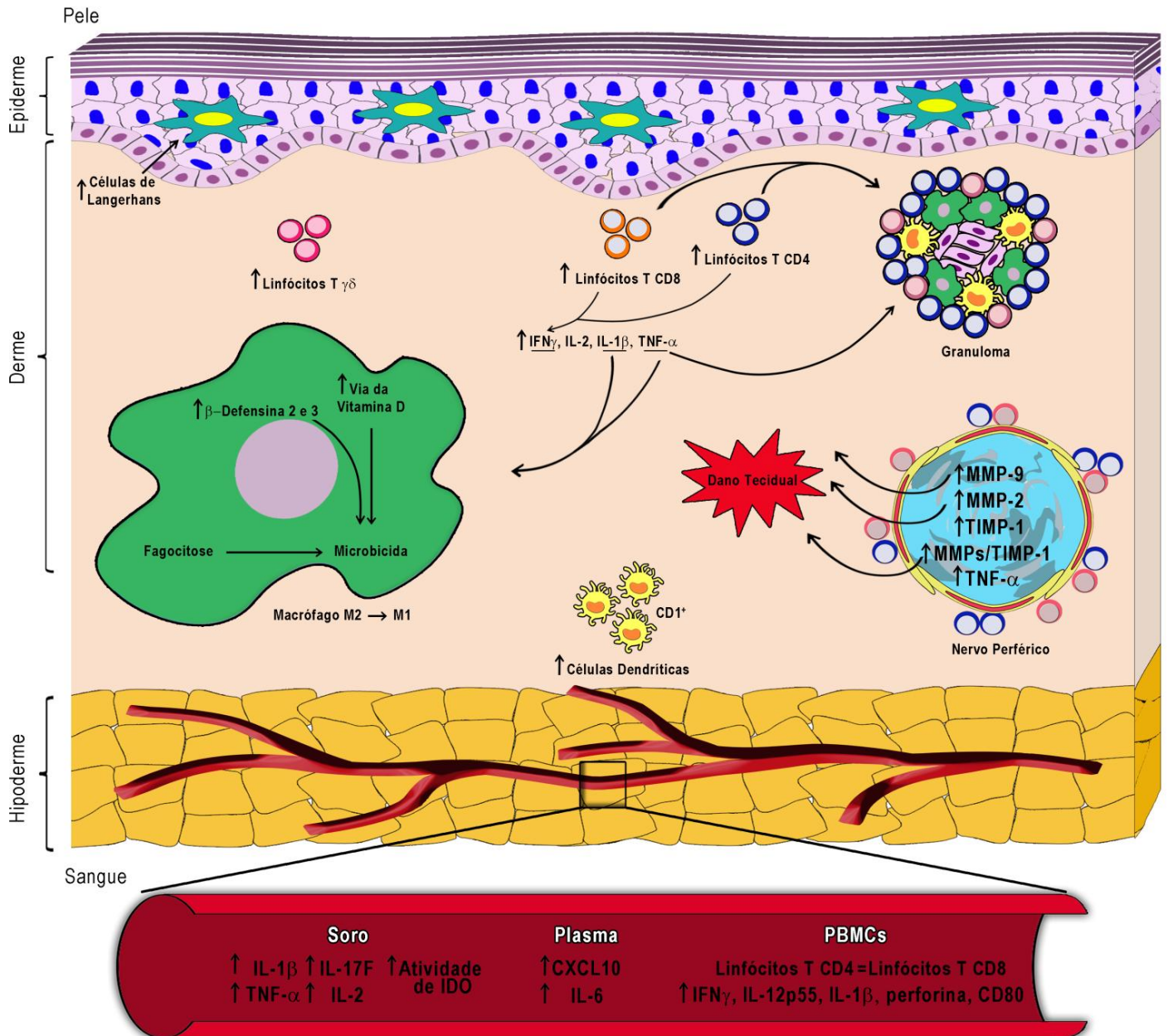


Figura 6: Imunopatogênese da reação reversa. Com o desenvolvimento da RR, há uma mudança no status imunológico do paciente dependente da forma clínica, levando a um direcionamento da resposta para o perfil Th1 ou a exacerbação da resposta pró-inflamatória já estabelecida. Em geral, é observado um aumento das populações de células dendríticas, assim como a elevação dos níveis de TNF- α , IFN- γ , IL-2 e IL-1 β . Populações de linfócitos T como CD4⁺, CD8⁺ e $\gamma\delta$ também estão aumentadas nas lesões reacionais, contribuindo para resposta Th1. A população de macrófagos sofre uma reprogramação gênica que favorece o perfil funcional microbicida, através do recrutamento da via de vitamina D e o auxílio das β -defensinas. O nervo também é afetado, expressando altos níveis de MMPs, colaborando para o dano tecidual, já em curso devido à intensa resposta inflamatória (Fonte: elaborado por Andrade, PR, 2014).

3. POPULAÇÕES CELULARES PRESENTES NA LESÃO CUTÂNEA DA REAÇÃO REVERSA

O microambiente cutâneo abriga um amplo complexo de tipos celulares responsáveis pela vigilância imunológica e manutenção da homeostase (Heath & Carbone, 2013). Essas populações migram constantemente da corrente sanguínea ou colonizam o tecido durante as fases de desenvolvimento, mantendo sua densidade através da replicação *in situ* (Davies et al., 2013; Jenkins et al., 2011). Entre as células da pele que são relevantes para resposta imune, podemos destacar as populações da imunidade inata, como os macrófagos residentes e subpopulações de células dendríticas (Dupasquier et al., 2004).

Controvérsias existem em relação à ontogenia e o fenótipo de macrófagos e células dendríticas, o que não só reflete a heterogeneidade populacional dessas células, mas também a carência de marcadores fenotípicos adequados para identificação de subtipos celulares únicos (Geissmann et al., 2010; Davies et al., 2013). Essa dificuldade é ainda mais pronunciada durante a inflamação, já que nesse contexto, as células teciduais residentes exibem considerável plasticidade fenotípica e as novas populações vindas do sangue encontram-se em variados estágios de diferenciação (Galli et al., 2011).

Como mencionado anteriormente, os sintomas clínicos da RR são restritos, principalmente, à pele e aos nervos periféricos, o que sugere que os componentes celulares da imunidade tecidual tem uma participação importante no desenvolvimento desse fenômeno.

3.1 Macrófagos

3.1.1 Características gerais

Os precursores de macrófagos são liberados na circulação como monócitos e colonizam os tecidos do corpo, incluindo o baço, que funciona como um reservatório de monócitos imaturos. Quando essas células migram do sangue e extravasam pelo endotélio para os tecidos, elas podem se diferenciar em macrófagos e células dendríticas. Portanto, a função principal dos monócitos é manter a renovação populacional de macrófagos tissulares e células dendríticas na homeostase e em resposta a inflamação (Gordon & Taylor, 2005).

Em humanos, os monócitos são divididos em grupos baseados na expressão das moléculas CD16 e CD14 (Ziegler-Heitbrock, 2007). Os monócitos CD14⁺⁺CD16⁻ são os chamados de monócitos clássicos e correspondem à população mais prevalente do sangue, expressando também CCR2. Já a população CD16⁺ engloba 2 subtipos: os monócitos

intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺) e os não clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺) (Ziegler-Heitbrock, 2010; Ziegler-Heitbrock & Hofer, 2013).

Durante o desenvolvimento dos monócitos, as células progenitoras mieloides originam sequencialmente monoblastos, promonócitos, e finalmente monócitos, que são liberados pela medula óssea na corrente sanguínea. Os monócitos, por sua vez migram do sangue para os tecidos, renovando a população de macrófagos teciduais residentes do osso (osteoclastos), alvéolos, sistema nervoso central (microglia), tecido conjuntivo (histiócitos), trato gastrointestinal, fígado (células de Kupfer), baço e peritônio (Gordon & Taylor, 2005) (Figura 7).

Em adição ao seu papel na manutenção das populações de macrófagos tissulares e células dendríticas no estado homeostático, os monócitos são recrutados para tecidos infectados, onde participam da resposta imune (Serbina et al., 2008). Durante as infecções, os monócitos, assim como as células que originam, podem migrar para os linfonodos e promover respostas imunes, se diferenciando ou apresentando antígenos para células dendríticas (Erslund et al., 2010) (Figura 7).

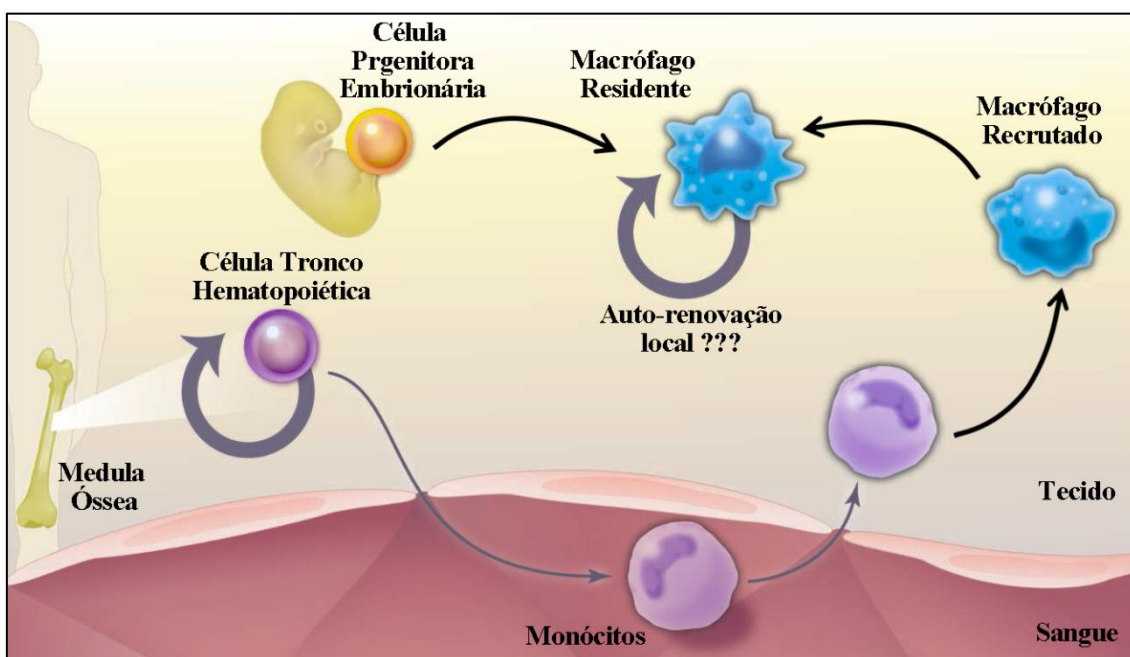


Figura 7: Renovação das populações teciduais de macrófagos na homeostase e na resposta imune. No modelo clássico, os macrófagos se originam de monócitos sanguíneos, que por sua vez se desenvolvem a partir de células tronco hematopoiéticas da medula óssea. A migração de monócitos sanguíneos para o tecido frente a um desafio antigênico, por exemplo, garante o rápido aumento populacional dos macrófagos teciduais durante a resposta imune. Entretanto, há a possibilidade de que populações de macrófagos residentes originadas de progenitores embrionários possam se renovar independentemente das células tronco hematopoiéticas. A proliferação local contribuiria para homeostase tecidual e para o aumento da densidade populacional dessas células no caso de uma resposta imune (Fonte: adaptado de Sieweke & Allen, 2013).

A visão estabelecida da diferenciação de monócitos recrutados em macrófagos foi recentemente desafiada por Jenkins e colaboradores (2011), que demonstraram que em um meio inflamatório Th2, os macrófagos teciduais sofrem um intenso processo de proliferação mediado pela citocina IL-4. O conceito de que a população de macrófagos teciduais tem capacidade de autorrenovação, permitiria o estabelecimento de um meio anti-inflamatório que levaria ao reparo do sítio danificado, sem a dependência do influxo de monócitos do sangue (Murray e Wynn, 2011; Jenkins et al., 2011; Sieweke & Allen, 2013) (Figura 7 e 8).

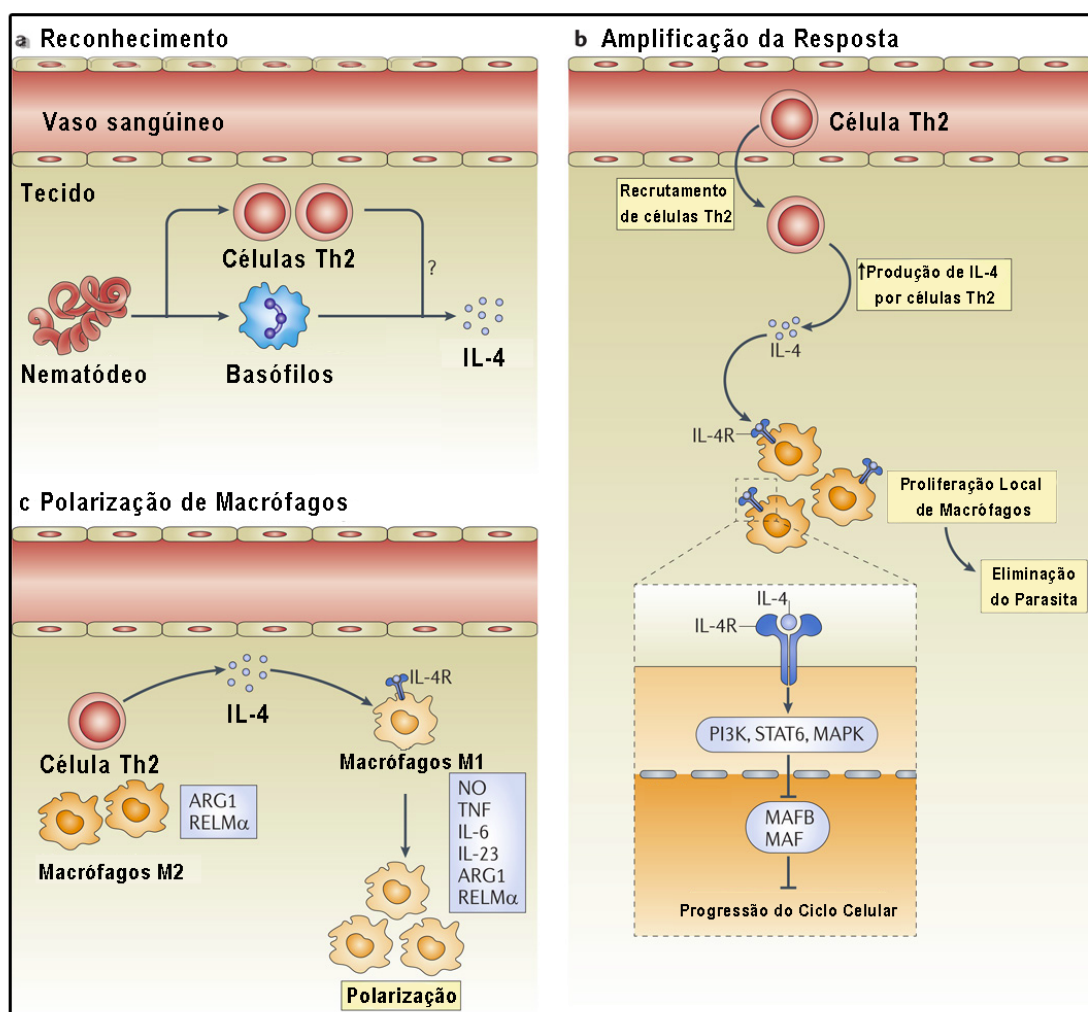


Figura 8: Proliferação *in situ* de macrófagos dependente de IL-4. No modelo de infecção por nematódeos ocorre uma intensa secreção local de IL-4 por basófilos e células Th2 antígenos-específicas (a). O aumento de IL-4 pode levar a expansão de populações residentes de macrófagos M1, assim como sinalizar para essa população assumir um perfil misto M1 e M2, já que começam a expressar moléculas características de ambos os fenótipos, como por exemplo, arginase e TNF- α . Esse processo culmina na eliminação do parasita independentemente do recrutamento de monócitos sanguíneos (b e c) (Fonte: adaptado de Murray & Wynn, 2011).

Os macrófagos diferem morfológicamente e fenotipicamente dependendo da sua localização no organismo. Essas células expressam uma variedade de receptores, reconhecendo produtos derivados ou não do hospedeiro. Através de processos como endocitose e fagocitose, assim como da secreção de citocinas, fatores de crescimento e metabólitos, essas células realizam suas funções tróficas e tóxicas, atuando como um fagócito profissional durante o desenvolvimento e a vida adulta do hospedeiro. Deste modo, os macrófagos contribuem para respostas imunes inatas e adaptativas, assim como, para a remodelação tecidual e diversos processos patológicos (Gordon & Martinez, 2010).

Os macrófagos são APCs e participam do recrutamento dos componentes celulares da resposta imune adaptativa (Gordon & Taylor, 2005). Os macrófagos maduros estão localizados estrategicamente ao longo do corpo e realizam a importante função de vigilância imune, onde rastreiam sinais de danos teciduais ou organismos invasores, a fim de estimular linfócitos e outros tipos celulares a responderem (Murray & Wynn, 2011). Mediante injúria e infecção, eles migram para os sítios em questão, contribuindo para inflamação aguda e crônica, localmente e sistemicamente. Eles expressam receptores TLRs, NLRs, receptores *scavenger*, receptores Fc para imunoglobulinas, entre outros. Seu repertório secretor inclui enzimas antibacterianas e proteolíticas, quimiocinas e citocinas pró- e anti-inflamatórias. Eles geram também espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, além de metabólitos de araquidônicos (Gordon & Martinez, 2010; Williams et al., 2014).

Os macrófagos teciduais residentes estão presentes constitutivamente nos órgãos na ausência de inflamação e realizam papéis tróficos e homeostáticos, atuando na remoção de *debris* e servindo de sentinelas de injúrias e infecções. Os macrófagos tissulares podem proliferar localmente, mas são terminalmente diferenciados, fazendo *turnover* em taxas distintas, dependendo do estímulo e do microambiente tecidual (Gordon & Martinez, 2010). Essas células também podem suprimir respostas inflamatórias, e, por conseguinte, assegurar que a homeostase tecidual seja restaurada após a infecção e injúria (Murray & Wynn, 2011).

A sua função homeostática de “limpeza” é mediada por receptores encontrados na superfície dos macrófagos, como os receptores *scavenger*, de fosfatidilserina, integrinas, do sistema complemento, de trombospondina, entre outros (Erwig et al., 2007). Em aspectos gerais, esses receptores mediadores de fagocitose não transduzem sinais indutores da transcrição de citocinas ou induzem sinais inibitórios, o que garante que o processo fagocítico ocorra independentemente de células imunes. Portanto, o papel principal dos macrófagos residentes

não é de células efetoras imunes e sim de limpeza do microambiente intersticial (Mosser & Edwards, 2008).

Os macrófagos tissulares, assim como os monócitos recém-recrutados, estão sujeitos a uma hierarquia de estágios de ativação que assegura a homeostase tecidual e impede a sustentação prolongada do processo inflamatório, cenário que pode levar ao desenvolvimento de diversas doenças crônicas (Murray & Wynn, 2011).

3.1.2 Polarização de macrófagos

Os macrófagos apresentam uma incrível plasticidade que os permite responder eficientemente a sinais microambientais e alterar seu fenótipo, podendo também alterar sua fisiologia durante respostas imunes adaptativas e inatas, como demonstrado por Mackaness na década de 70. A polarização dos macrófagos é a prova mais contundente dessa plasticidade e é vista como um espectro de fenótipos distribuídos entre dois extremos: a ativação clássica e a ativação alternativa (Lopez-Castejón et al., 2011; Mackaness, 1977) (Figura 9).

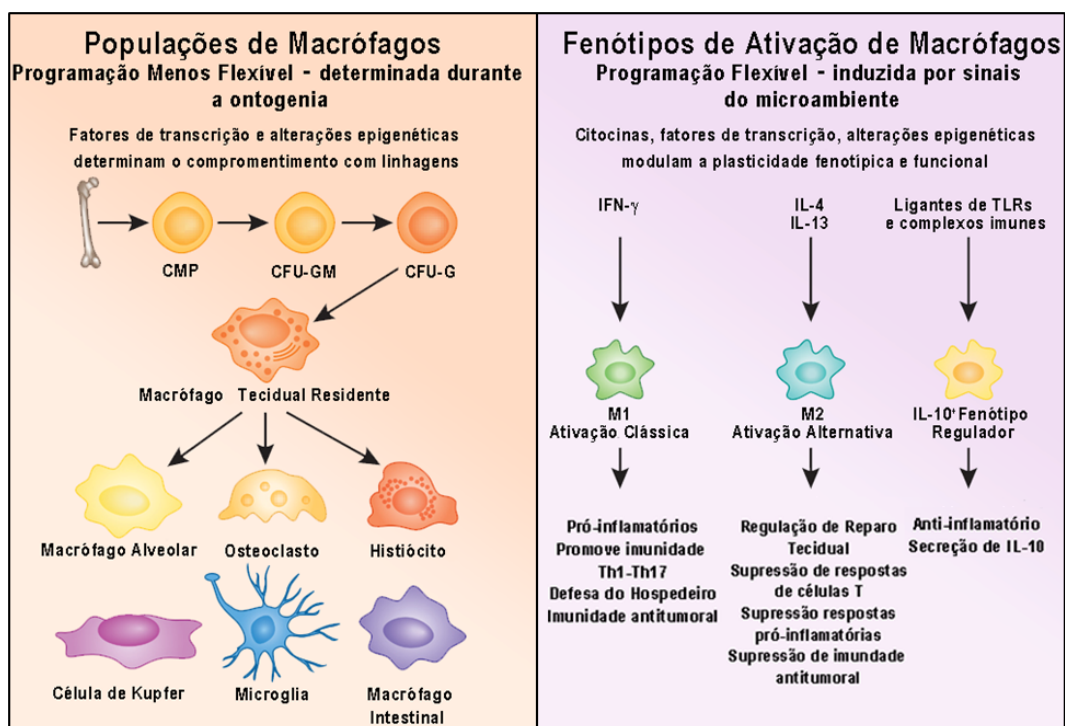


Figura 9: Diversidade e plasticidade das populações de macrófagos. Macrófagos podem ser categorizados em subpopulações tendo como base sua localização anatômica (esquerda) e seu fenótipo funcional (direita). Os macrófagos residentes incluem os alveolares (pulmão), intestinais (intestino), osteoclasto (osso), microglia (cérebro), histiócitos (tecido conjuntivo) e células de Kupfer (fígado). Monócitos podem entrar nesses tecidos e se diferenciar nessas populações residentes, podendo também, após a ativação, assumir diferentes fenótipos funcionais (Fonte: adaptado de Galli et al., 2011).

Os macrófagos apresentam dois perfis funcionais predominantes: ou promovem a defesa do hospedeiro, imunidade antitumoral e respostas inflamatórias; ou suprimem todas essas ações, sendo importantes tanto na indução como na resolução de respostas imunes (Galli et al, 2011). Em resposta a citocinas e produtos microbianos, os fagócitos mononucleares exibem propriedades funcionais e polarizadas. Espelhando a nomenclatura Th1/Th2, os macrófagos polarizados são chamados de M1 e M2 (Galli et al, 2011).

O perfil M1 é promovido quando os macrófagos são ativados classicamente após a exposição a dois sinais: o IFN- γ que prima a célula sem ativá-la propriamente, e o TNF- α ou um indutor dessa citocina, como por exemplo, um ligante de TLR (Nathan, 1991). Portanto, macrófagos são ativados classicamente em resposta ao IFN- γ , juntamente com a exposição aos antígenos microbianos (Hibbs, 2002; MacMicking et al., 1997). O GM-CSF, um fator de crescimento hematopoiético, também leva a polarização de macrófagos M1. Essa citocina é produzida por uma variedade de tipos celulares e leva ao aumento de apresentação antigênica; da fagocitose mediada por complemento e anticorpos; da capacidade microbicida; além de promover quimiotaxia e adesão de leucócitos (Verreck et al., 2004; Martinez & Gordon, 2014). Quando os macrófagos são ativados classicamente eles migram para os sítios de inflamação para eliminação dos antígenos alvo (Ezekowitz & Gordon, 1984; Mosser, 2003) (Figura 10).

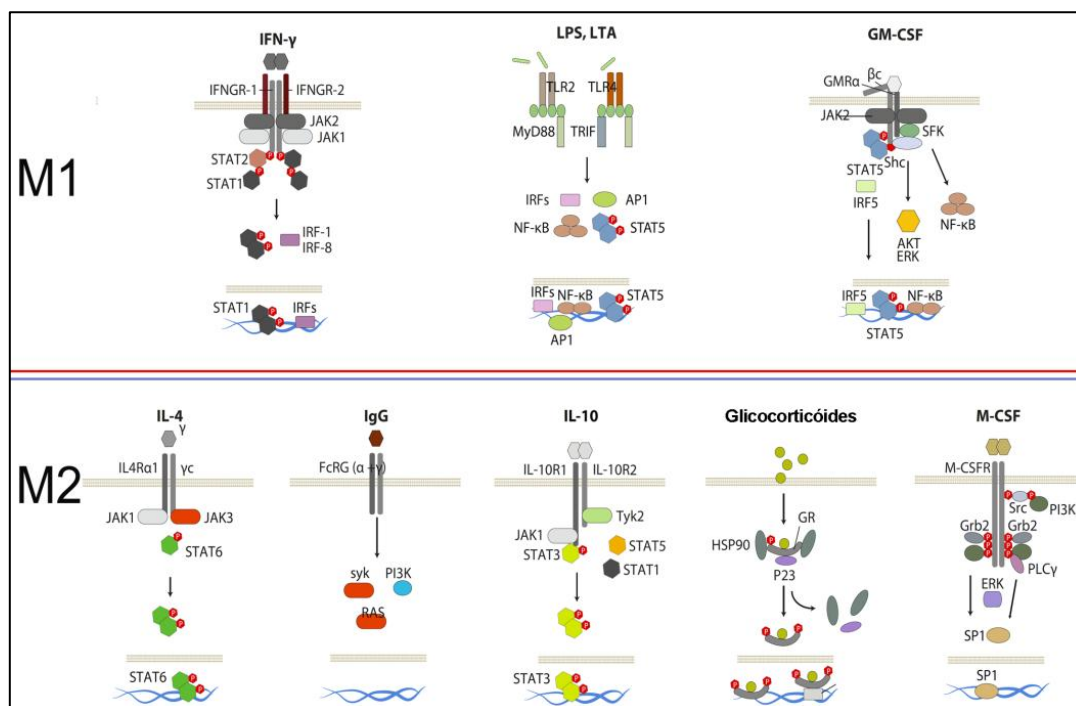


Figura 10: Moléculas que promovem a ativação clássica e alternativa de macrófagos. A ativação clássica de macrófagos leva à geração do fenótipo M1 através da ação de fatores como IFN- γ , ligantes de TLRs como o LPS e o GM-CSF. Já a ativação alternativa promove a polarização para o tipo M2, que engloba subclasses determinadas pelos seus agentes indutores, como por exemplo: IL-4 ou IL-

13 (M2a); IgGs (M2b); IL-10 ou glicocorticóides (M2c) e M-CSF. Essas moléculas exercem seus efeitos biológicos através do recrutamento de vias de sinalização específicas, que por sua vez, irão determinar a programação gênica e o fenótipo adotados pelo macrófago após a ativação (Fonte: adaptado de Martínez & Gordon, 2014).

As células M1 apresentam alta expressão de IL-12, IL-23, IL-1 β , IL-6, TNF- α , espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e baixos níveis de IL-10. Participam de respostas polarizadas Th1 e medeiam a resistência a parasitos intracelulares e tumores (Verreck et al., 2004; Mantovani et al., 2004). Devido ao fato de secretarem grandes quantidades de TNF- α e IL-1 β , e ainda participarem da diferenciação de células Th17, elas são importantes promotoras de inflamação crônica e doenças autoimunes, como por exemplo, artrite reumatoide, arteriosclerose, fibrose pulmonar, e doença de Crohn (Smith et al., 2009; Wilson et al., 2010; Woollard & Greissmann, 2010) (Figura 11)

Os macrófagos M2 antagonizam as ações tóxicas do perfil M1, suprimindo a inflamação, a atividade antitumoral e promovendo a regeneração tecidual e angiogênese (Gordon & Taylor, 2005; London et al., 2011). A IL-4 e IL-13 são mais que simples inibidores da ativação macrófaga, pois induzem o perfil fenotípico M2, que ao contrário do perfil M1, constitui uma classe que engloba outros subtipos de macrófagos induzidos por outros estímulos (Gordon, 2003). Vários tipos celulares podem produzir IL-4 e IL-13, como células T CD4⁺ e CD8⁺, NKT, basófilos, mastócitos e eosinófilos, o que sugere que a ativação alternativa de macrófagos pode ser induzida tanto por respostas imunes inatas quanto adaptativas (Paliard et al., 1988; Seder et al., 1992; Yoshimoto et al., 1995; Seder et al., 1991; Moqbel et al., 1995) (Figura 10).

Os macrófagos M2 são caracterizados pela expressão de marcadores alternativos de ativação e são subdivididos em três subtipos: M2a (induzidos por IL-4 e IL-13), M2b (induzidos por complexos imunes, agonistas de TLRs e IL1R) e M2c (induzidos por IL-10 e hormônios glicocorticóides) (Mantovani et al., 2004). As populações de macrófagos M2 expressam altos níveis de IL-10, de receptores *scavenger*, de receptores de manose e galactose e do receptor antagonista de IL-1 (IL-1RA). O metabolismo de arginina nessas células é geralmente direcionado para produção de ornitina e poliaminas, envolvendo a via da arginase. O M-CSF foi recentemente incluído ao grupo de indutores da ativação alternativa de macrófagos, induzindo um fenótipo secretor de altos níveis de IL-10 e baixa expressão de moléculas coestimuladoras como HLADR, CD86 e CD40 (Verreck et al., 2004; Martínez & Gordon, 2014). Em geral, os macrófagos M2 participam de respostas Th2, são frequentes em tumores, promovem reparo tecidual e remodelamento, além de apresentarem funções imunoreguladoras (Mantovani et al., 2004) (Figura 10 e 11).

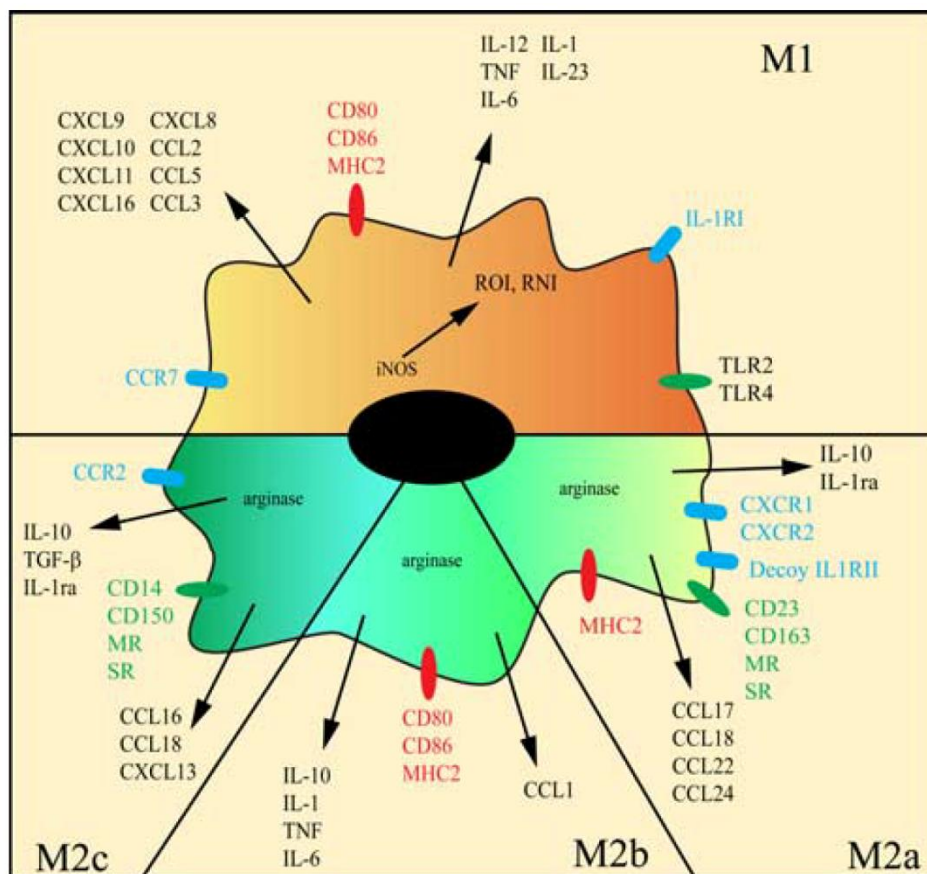


Figura 11: Características gerais dos fenótipos de macrófagos M1 e M2. O repertório inflamatório dos macrófagos M1 inclui a secreção de mediadores pró-inflamatórios e a liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Em contraste a ativação alternativa engloba três classes de fenótipos M2 (a, b e c) que medeiam respostas anti-inflamatórias (Fonte: Benoit et al., 2008).

A polarização M1 sustenta a resistência contra bactérias intracelulares e controlam a fase aguda da infecção. Entretanto, uma programação M1 prolongada é deletéria para o hospedeiro, podendo levar a extensos danos teciduais (O'Reilly et al., 1999). Já a evolução das doenças crônicas está associada à reprogramação em direção ao perfil M2 (Kiszewski et al., 2006).

O paradigma M1 x M2 não pode ser apenas descrito como um estágio de ativação e inativação, mas sim como a expressão de dois programas metabólicos distintos (Mills et al., 2000). Portanto, a ativação de macrófagos pode ser tanto inflamatória quanto anti-inflamatória. Atualmente a ativação de macrófagos é vista como plástica, rápida e completamente reversível, sugerindo que essas células são extremamente dinâmicas e podem, primeiramente, participar da resposta inflamatória e depois da resolução do processo (Porcheray et al., 2005). Consequentemente, os macrófagos exibem mudanças funcionais progressivas resultantes das alterações no microambiente (Stout & Suttles, 2004).

Ao contrário das células T que sofrem extensas modificações epigenéticas durante a diferenciação, os macrófagos retêm sua plasticidade e habilidade de responder a sinais microambientais (Stout et al., 2005). Isso leva a uma grande dificuldade de se isolar um único marcador para identificar populações de macrófagos. Vários estudos *in vivo* sugerem que o fenótipo de uma população de macrófagos pode se alterar ao longo do tempo, não estando claro ainda, se essas alterações são um resultado de um processo de “desdiferenciação” do fenótipo original para um fenótipo de repouso ou da migração de uma nova população de macrófagos para o tecido, substituindo as células originais (Mosser & Edwards, 2008).

3.2 Células Dendríticas

3.2.1 Características gerais

Todos os tipos de células dendríticas são originados a partir de células tronco hematopoiéticas residentes da medula óssea, como os progenitores comuns linfóide e mieloide (em inglês CLP e CMP, respectivamente). O CLP e o CMP são os geradores dos diferentes *subsets* de células dendríticas conhecidos atualmente (Takeuchi & Furue, 2007). Estudos demonstraram que o potencial desses precursores de originar os diferentes tipos de células dendríticas se dá pela expressão do receptor Flt3 (Karsunky et al., 2003; D’Amico & Wu, 2003; Onai et al., 2006). O desenvolvimento dessas células a partir do CLP ainda é mal compreendido, havendo dúvidas se essa via de desenvolvimento ocorre em condições homeostáticas ou extraordinárias. Quanto ao desenvolvimento através do CMP, sabe-se que este dá origem ao progenitor de macrófagos e células dendríticas (em inglês MDP) que, por sua vez, se diferencia no progenitor comum de células dendríticas (em inglês CDP), comprometido somente com a geração desse tipo celular (Fogg et al., 2006; Liu et al., 2009; Liu & Nussenweig, 2010) (Figura 11).

Na década de 90, evidências surgiram para corroborar a origem mieloide das células dendríticas, com a observação de que as mesmas podem se derivar de monócitos na presença de GM-CSF e IL-4 (Romani et al., 1994; Sallusto & Lanzavecchia, 1994; Akagawa et al., 1996; Kiertscher & Roth, 1996; Pickl et al., 1996; Zhou & Tedder, 1996; Chapuis et al., 1997). A origem linfóide foi observada, inicialmente, pela presença de marcadores associados a populações linfóides nas células dendríticas (Vremec et al., 1992) (Figura 12).

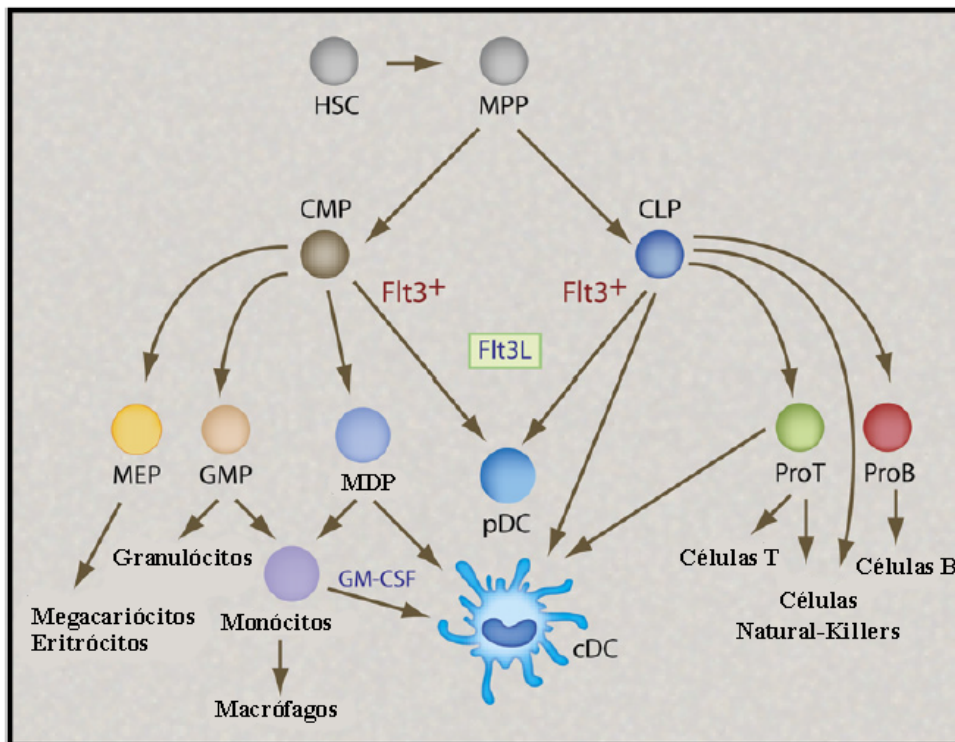


Figura 12: Ontogenia de células dendríticas. Estudos no modelo murino apontam que tanto células dendríticas plasmocitoides (pDCs) quanto as convencionais (cDCs) podem ser originadas a partir progenitores mielóides (CMP) e linfóides (CLP) que expressam Flt3 em condições homeostáticas. Já em condições inflamatórias, monócitos podem se diferenciar em células dendríticas na presença de GM-CSF. Abreviações: HSC (Célula tronco hematopoietica), MPP (Progenitor multipotente), GMP (Precursor de macrófagos e granulócitos), MEP (Precursor de megacariócito e eritrócitos) e MDP (progenitor de macrófagos e células dendríticas) (Fonte: adaptado de Wu & Liu, 2007).

Entre os subtipos de células dendríticas descritos em humanos atualmente, podemos destacar as células dendríticas monocíticas (em inglês moDC), intersticiais ou dérmicas (em inglês DDC-IDC), células de Langerhans (em inglês LC) e plasmocitoides (em inglês pDC) (Rossi & Young, 2005). O fato de tanto CMP quanto CLP serem capazes de originar todos os subtipos de células dendríticas no baço e no timo, não só atesta a ascendência dupla dessas células e a plasticidade do potencial de desenvolvimento de seus progenitores, mas também, que o fenótipo das células dendríticas não é um reflexo de sua origem (Wu & Liu, 2007; Wu & Dakic, 2004).

As células dendríticas têm um papel crucial na promoção e no controle da magnitude e qualidade de respostas imunes adaptativas. No estado homeostático, essas células residem tanto nos tecidos periféricos, quanto nos órgãos linfóides, circulando também no sangue, e monitorando o microambiente contra possíveis invasores. Elas permanecem quiescentes até encontrar um estímulo inflamatório exógeno ou endógeno, que ao deflagrar uma reprogramação transcricional complexa, leva a expressão diferencial de um conjunto de genes e a integração de

diversas vias de sinalização, mudando essas células de seu fenótipo efetor (Zanoni & Granucci, 2011).

Para gerar uma resposta microbicida, as células dendríticas sofrem um processo de maturação, em que passam de células captoras para células apresentadoras de antígenos. Essa metamorfose implica em alterações funcionais e morfológicas como: a perda de estruturas adesivas, reorganização do citoesqueleto, aquisição de maior motilidade celular, perda de receptores endocíticos e fagocíticos; secreção de quimiocinas e citocinas, aumento da expressão de moléculas coestimulatórias e translocação de compartimentos de MHC II para superfície celular (Trombetta & Mellmann 2005; Tang & Cyster, 1999; Yoneyama et al., 2002; Penna et al., 2002; Heufler et al., 1996; Martin-Fontecha et al., 2004; Piqueras et al., 2006; Caux et al., 1994; Pierre et al., 1997; Cella et al., 1997).

Atualmente, com os diversos estudos nessa área, a classificação de células dendríticas tornou-se um tanto complexa. Podem-se dividir essas células em duas grandes categorias: convencionais e não-convencionais. As células dendríticas convencionais apresentam morfologia e funcionalidade típica no estado homeostático, enquanto as não-convencionais assumem esse perfil quando desafiadas por um estímulo inflamatório (Liu et al., 2009; Liu & Nussenzweig, 2010; Shortman & Liu, 2002; Shortman & Naik, 2007) (Figura 13).

As células dendríticas convencionais consistem nas populações derivadas do CDP e das pré-células dendríticas e podem ser divididas nas subcategorias de células dendríticas migratórias e linfoides. As migratórias têm a habilidade de migrar de tecidos periféricos para os órgãos linfoides, onde podem apresentar os antígenos para as células T. Esse grupo engloba as células de Langerhans da epiderme, as intersticiais da derme e as populações pulmonares, hepáticas, renais e intestinais (Kushwah & Hu, 2011) (Figura 13).

As células de Langerhans e as intersticiais dérmicas são distribuídas pelos tecidos do corpo, e, portanto, são as primeiras a entrarem em contato com o antígeno. As células de Langerhans são encontradas nas superfícies epiteliais da pele e da mucosa, enquanto as células dendríticas dérmicas localizam-se na derme da pele e no interstício dos órgãos sólidos. As células de Langerhans expressam CD1a, mas não CD11b, ao contrário das monocíticas e dérmicas (Ratzinger et al., 2004; Katz et al., 1979).

As células dendríticas não-convencionais compreendem as células dendríticas plasmocitoides e as monocíticas. As células dendríticas monocíticas têm como célula precursora direta o monócito sanguíneo, que, quando em contato com M-CSF origina populações de

macrófagos, e quando em contato com GM-CSF e IL-4, gera, após seis dias *in vitro*, células dendríticas (Sallusto & Lanzavecchia, 1994; Bender et al., 1996; Romani et al., 1996). Essas células capturam antígenos solúveis com alta eficiência e respondem a estímulos microbianos e inflamatórios (Figura 12).

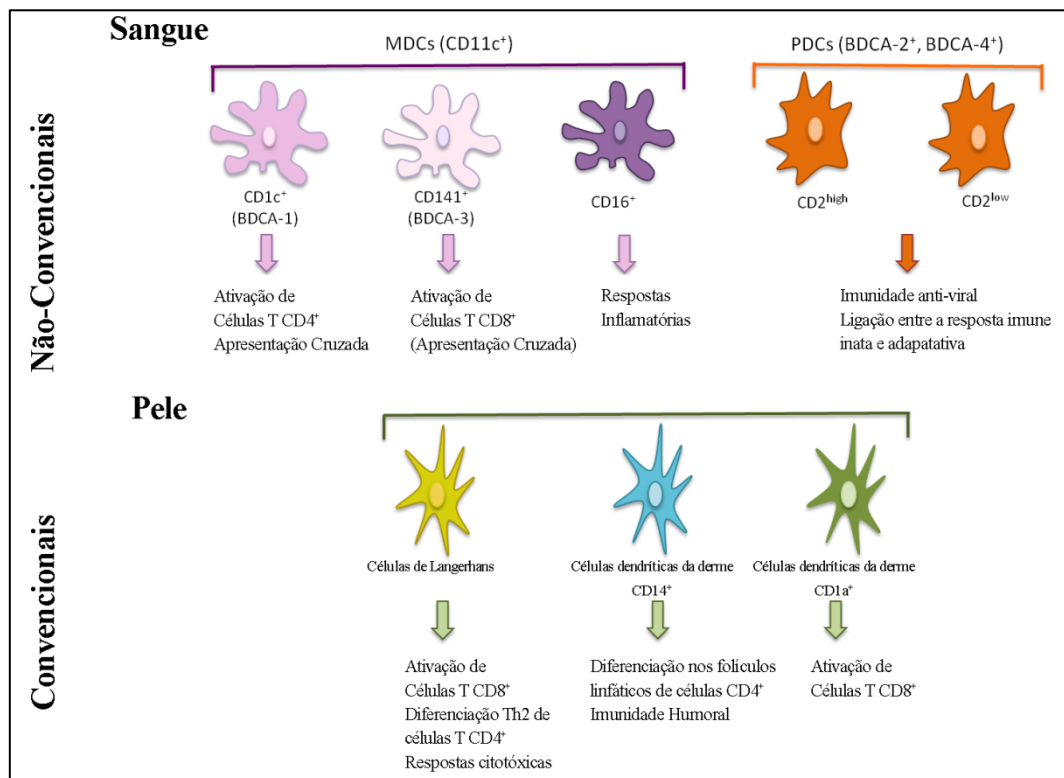


Figura 13: Subpopulações de células dendríticas e seu papel na imunidade. As células dendríticas não-convencionais englobam as monocíticas e plasmocitoides. Recentemente, foram descritos 2 subtipos de pDCs com base na expressão de CD2 (Matsui et al, 2009). As células dendríticas convencionais englobam as populações teciduais (Fonte: adaptado de Salvador et al., 2012).

As células dendríticas plasmocitoides, apesar de derivadas do CDP, são únicas na habilidade para secretar grandes quantidades de IFN α/β em resposta a antígenos virais, e por isso, são classificadas como não convencionais. São encontradas tanto em órgãos linfoides como não linfoides, e por expressarem TLR7 e TLR9, reconhecem DNA e RNA virais (Guiducci et al., 2008). Além de serem fonte de IFN α/β , as células plasmocitoides são essenciais para diferenciação de células B ativadas em células plasmáticas através da secreção de IFN α/β e IL-6 (Jego et al., 2003).

As células dendríticas plasmocitoides humanas são fenotipicamente caracterizadas como CD4⁺CD45RA⁺CD123⁺ILT3⁺ILT1⁺CD11c⁻. Também expressam um receptor Fc γ de baixa afinidade, o CD32, que modula a produção de IFN α/β , e mais dois marcadores restritos a essa

população no sangue e medula óssea: o BDCA-2 e BDCA-4. BDCA-2 é uma glicoproteína de membrana lectina do tipo C que pode internalizar antígenos para posterior apresentação e o BDCA-4 é também chamado de neuropilina-1 (Trinchieri et al., 1978; Perussia et al., 1985; Bave et al., 2003; Dzionek et al., 2001; 2002; 2003).

As ações das células dendríticas impactam e são impactadas tanto pela imunidade inata quanto pela imunidade adaptativa. As células do sistema imune inato e o microambiente tecidual têm um papel importante na ativação de células dendríticas. Os fatores secretados pelas células inatas ativam células dendríticas imaturas, assim como seus precursores, induzindo o seu desenvolvimento em células maduras com fenótipos distintos. Portanto, citocinas como IL-10, IL-15, IFN α/β , TNF- α e IFN- γ , produzem diferentes fenótipos de células dendríticas, que por sua vez, podem induzir tipos diferentes de imunidade de células T (Paquete et al., 1998; Luft et al., 1998; Santini et al., 2000; Blanco et al., 2001; Watanabe et al., 2004; Chomarat et al., 2003; Steinbrink et al., 1997; Sato et al., 2003; Mohamadzadeh et al., 2001; Dubsky et al., 2007; Uhlig et al., 2006).

Após o cumprimento do seu papel funcional, que consiste na apresentação antigênica e ativação de células T, as células dendríticas passam pelo estágio de diferenciação terminal e progridem em direção a morte por apoptose, contribuindo para a atenuação da resposta imunológica e liberação do espaço que passaram a ocupar após a migração (Matsue & Takashima, 1999). Complicações nessa fase podem levar ao acúmulo dessas células ainda ativadas e ao desenvolvimento de doenças autoimunes (Wang et al., 1999).

3.2.2 Células Dendríticas X Tolerância

Uma característica extraordinária do sistema imune de mamífero é a sua capacidade de gerar um repertório de receptores de células B e T capazes de reconhecer virtualmente qualquer antígeno existente. Aleatoriamente, esses receptores podem reconhecer antígenos próprios do organismo, sendo, portanto, necessários vários mecanismos regulatórios para evitar o desenvolvimento de um cenário autoimune, ou "*horror autotoxicus*", como proposto por Paul Herlich no início do século XX. Esse equilíbrio delicado entre imunogenicidade contra antígenos estranhos e tolerância contra antígenos próprios é crítico, pois a corrupção desse quadro pode levar tanto a autoimunidade, resultante de respostas inflamatórias exacerbadas e da falha de mecanismos tolerogênicos, quanto a infecções crônicas e tumores, decorrentes de baixa imunogenicidade e tolerância excessiva (Manicassamy & Pulendran, 2011).

A tolerância imunológica é estabelecida por dois processos chamados de tolerância central e tolerância periférica. A tolerância central opera principalmente no timo e na medula óssea, onde a maioria das células T e B autorreativas são removidas no estágio imaturo do seu desenvolvimento nesses órgãos. Entretanto, clones potencialmente nocivos podem escapar desse processo e entrar em circulação (Nossal, 1994; Miller & Morahan, 1992; Goodnow et al., 2005). A tolerância periférica atua como um mecanismo reserva para promover a tolerância sistêmica a essas células autorreativas, sendo essencial para o estabelecimento de imunossupressão em áreas de imunoprivilégio, como o cérebro, testículos, olho, entre outros (Manicassamy & Pulendran, 2011).

As células dendríticas, como as APCs mais eficientes do sistema imune, não só participam da promoção de respostas inflamatórias como são essenciais para geração de respostas supressoras, mantendo a tolerância através da indução da anergia e/ou surgimento de células T reguladoras (Manicassamy & Pulendran, 2011). A tolerância de células T a antígenos próprios é estabelecida no timo, onde os tímócitos passam por uma seleção negativa mediada por células dendríticas tímicas, levando a eliminação dos clones autorreativos e indução de células T reguladoras (Brockner et al., 1997; McCaughy et al., 2008; Bonasio et al., 2006). As propriedades tolerogênicas das células dendríticas dependem do estágio de maturação, da exposição a agentes imunossupressores e anti-inflamatórios e da natureza do estímulo microbiano e microambiental (Pulendran, 2010; 2004; Pulendran et al., 2008; Steinman & Bancherau, 2007).

As células dendríticas imaturas podem promover respostas de tolerância *in vivo*, eliminando células T autorreativas ou promovendo a expansão de células T reguladoras (Dhodapkar et al., 2001; Jonuleit et al., 2000; Mahnke et al., 2003; Hawiger et al., 2001). A falta de moléculas coestimuladoras nessas células é essencial para indução de anergia (Novak et al., 2003; Forrester et al., 2010). Na maioria dos casos as células dendríticas maduras promovem respostas imunogênicas. Entretanto, certos estímulos, apesar de induzir a ativação e maturação das células dendríticas, também levam ao aparecimento de células T tolerogênicas (Jiang et al., 2007).

A exposição à citocinas anti-inflamatórias e agentes imunossupressores podem condicionar as células dendríticas ao estágio tolerogênico. *In vitro*, células dendríticas sob o efeito de fatores como vitamina A ou D3, PGE₂, IDO, IL-10, TGF-β exibem um fenótipo tolerante (Akbari et al., 2001; Morelli & Thomson, 2007; Penna et al., 2007; Sato et al., 2002; Steinbrink et al., 2002; Geissmann et al., 1999; 2003; Rutella et al., 2006; Gonzalez-Rey et al., 2006). Os

PRRs, tão importantes na imunidade inata, também participam das respostas tolerogênicas, pois reconhecem ainda ligantes endógenos pertencentes ao próprio organismo como, por exemplo, *debris* celulares de tecidos danificados durante a inflamação ou necrose (Bianchi, 2007; Wagner, 2006; Manfredi et al., 2009; Rubartelli & Lotze, 2007; Guiducci et al., 2010; Kawai & Akira, 2010). Em células dendríticas plasmocitoides, a ativação do TLR9 induz a expressão da enzima IDO, que, por sua vez, promove a diferenciação de células T reguladoras (Orabona et al., 2006; Moseman et al., 2004) (Figura 14).

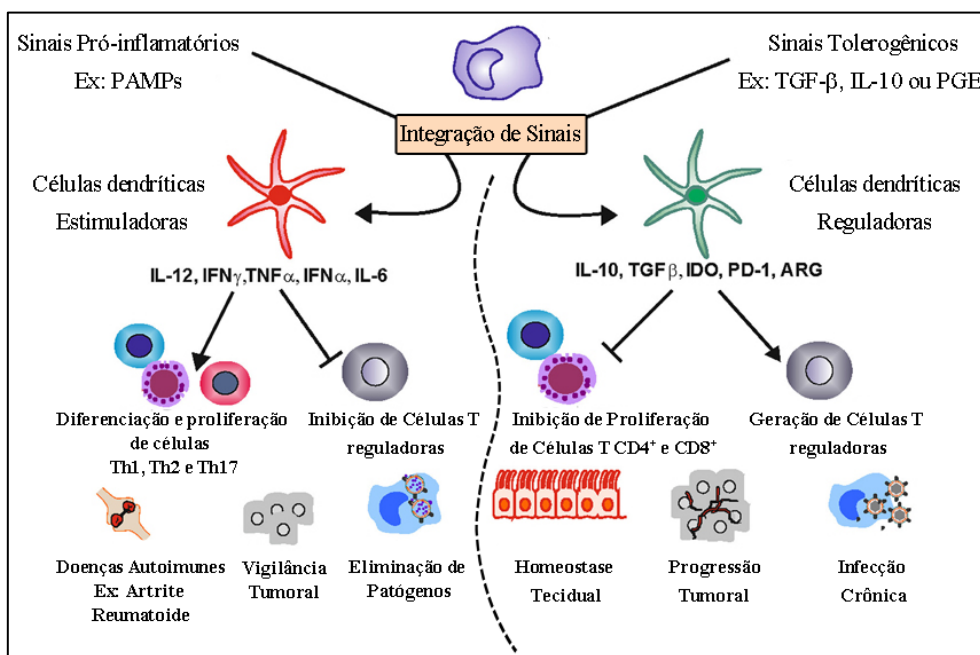


Figura 14: Células dendríticas estimuladoras e tolerogênicas em condições homeostáticas e patogênicas. As células dendríticas compreendem uma linhagem plástica capaz de processar e integrar sinais do microambiente. Em condições pró-inflamatórias essas células estimuladoras promovem uma resposta imune efetiva através da estimulação de células T, direcionando essas respostas para o perfil Th1, Th2 ou Th17. Isso permite que o sistema imune elimine patógenos e controle a proliferação de células transformadas. Entretanto, a ativação descontrolada desse fenótipo pode levar à eliminação da tolerância imunológica e ao desenvolvimento de doenças autoimunes. Em contrapartida, em condições tolerogênicas, as células dendríticas adquirem uma função reguladora, suprimindo a ativação de células T e promovendo a diferenciação e expansão de células T reg. Essa habilidade mantém a tolerância tecidual, mas pode levar a progressão tumoral e a infecções crônicas, devido à persistência de patógenos no organismo (Fonte: Adaptado de Schmidt et al., 2012).

Apesar de ser estabelecido que as células dendríticas induzam a formação de células T reguladoras, evidências recentes apontam para a possibilidade das células T reguladoras programarem as células dendríticas, assim como os macrófagos, a adquirirem um fenótipo tolerante (Cederbom et al., 2000; Houot et al., 2006; Misra et al., 2004; Veldhoen et al., 2006; Oderup et al., 2006). Tanto células dendríticas como macrófagos expressam altos níveis de IDO, cuja indução mostrou-se dependente da interação do CTLA-4 presentes nas células T

reguladoras com as moléculas B7 das superfícies dessas APCs, assim como, da secreção de IL-10 produzida por esses linfócitos (Grohmann et al., 2002; Fallarino, 2003; Munn et al., 2002).

É também provável que células dendríticas tolerogênicas participem da patogênese de doenças inflamatórias crônicas, já que muitos patógenos podem modular a função dessas células como mecanismo de evasão da resposta imune (Lambotin et al., 2010). Em um cenário de equilíbrio, a ativação imune seguida de imunossupressão é sucedida pelo restabelecimento da homeostase imunológica. Entretanto, em um cenário de ativação imune persistente, os mecanismos imunossupressores evocados em resposta podem prevalecer e levar o organismo a um estado de supressão permanente. Um mecanismo de tolerância envolvido nesse sistema regulatório é a expressão sustentada de IDO, observada na ativação imune crônica (Baniyash, 2006).

3.3 Células epitelioides e o granuloma

A fim de se compreender melhor o desenvolvimento e a evolução das lesões de RR é necessária, primeiramente, a caracterização das populações celulares colonizadoras das mesmas. Em 1977, Epstein caracterizou morfológicamente um largo espectro de granulomas cutâneos e postulou que os granulomas imunogênicos como, por exemplo, o encontrado no polo TT e nos casos de RR da hanseníase, são formados por grupos celulares “epitelioides” formadores de nódulos (Epstein, 1977).

Do ponto de vista morfológico, os granulomas são agregados celulares organizados e compactos constituídos de macrófagos maduros, neutrófilos, células dendríticas, células NK, linfócitos T e B, assim como fibroblatos, que secretam componentes de matriz extracelular (Adam, 1976; Spector, 1969; Ramakrishnan, 2012). Além desses tipos celulares, a população de macrófagos também pode sofrer processos de diferenciação e adquirir aspectos morfológicos distintos, originando células gigantes multinucleadas a partir de fusão célula-célula; podendo também assumir uma aspecto vacuolado ou espumoso; ou até mesmo, se transformar em células epitelioides (Adams, 1976; Ramakrishnan, 2012).

No modelo clássico, a formação do granuloma epitelióide em resposta a um desafio antigênico requer a participação de células da imunidade adaptativa (North & Jung, 2004; Andersen, 1997; Saunder & Cooper, 2000). No entanto, estudos no modelo de *zebrafish* (*Danio rerio*) demonstraram que essas estruturas podem se organizar com apenas a participação do sistema imune inato (Davis et al., 2002)

O TNF- α é considerado uma molécula imprescindível para formação e manutenção dos granulomas epitelioides, não só devido ao seu envolvimento na promoção do tráfico de macrófagos e leucócitos durante as respostas inflamatórias, mas também pelo fato de que não ocorre a formação de granulomas organizados em camundongos *knockout* para essa citocina (Algood et al., 2005; Bean et al., 1999; Chakravarty et al., 2008; Flynn et al., 1995). Entretanto, há estudos que desafiam a importância dessa molécula no desenvolvimento dessas estruturas, mostrando que as mesmas podem surgir na ausência do TNF- α (Garcia Vidal et al., 2005; Iliopoulos et al., 2006).

A célula epitelióide, presente no granuloma, é um tipo celular de ontogenia ainda desconhecida sem propriedades fagocíticas e alta capacidade secretora. Alguns estudos sugerem que essa população seria um estágio de diferenciação que macrófagos adotariam na formação do granuloma (Epstein, 1977; Turk & Narayanan, 1982). Entretanto, Fachetti e colaboradores (1989) descreveram um tipo celular nomeado de monócito plasmocitóide e sugeriram, com base em dados de imuno-histoquímica e microscopia eletrônica, que essas células seriam os precursores da célula epitelióide encontrada nos granulomas (De Vos et al., 1990; Fachetti et al., 1989). Essa população foi caracterizada fenotipicamente como células CD3⁻CD11c⁻, CD14⁻, CD20⁻, CD36⁺, CD56⁻, CD68⁺, CD123⁺ e BDCA2⁺, apresentando, portanto, marcadores fenotípicos de macrófagos e células dendríticas (Fachetti & Vermi, 2002). Já que os monócitos plasmocitoides também produzem altos níveis de IFN α/β , essas células também são apontadas como um estágio imaturo das células dendríticas plasmocitoides (Fachetti et al., 1999).

II. JUSTIFICATIVA

Apesar dos casos de RR serem mais frequentes entre as formas instáveis borderline (BT, BB e BL), esse episódio pode também acometer todas as formas clínicas da doença, até mesmo as formas LL (Kar & Job, 2005; Ridley & Jopling, 1966; Wade, 1955). O desenvolvimento de RR em qualquer momento da doença é um desafio para equipe médica e para o programa de controle de hanseníase. A piora súbita das lesões após o início do tratamento gera desconfiança e descrença na cura da doença.

Os fatores que desencadeiam a reativação imune observada na RR ainda não foram esclarecidos, mas o fato desse fenômeno se manifestar até em pacientes com síndromes de imunodeficiência (ex: AIDS), sugere que esse evento é provavelmente específico ao ML, envolvendo possivelmente redes não canônicas da resposta imune (Sampaio et al., 1995; de Oliveira et al., 2013). Por outro lado antígenos do ML foram observados em lesões RR de pacientes TT e LL na ausência de bacilos indetectáveis, levantando a possibilidade de que independentemente da viabilidade bacteriana, componentes do bacilo depositados *in situ* poderiam desencadear a resposta imune que origina esse episódio (Lockwood et al., 2002; Rambukanna et al., 1992). Este fato poderia explicar o desenvolvimento de RR e neurites anos após a cura clínica do paciente.

Os sinais clínicos da RR em geral se limitam a lesões de pele e nervos, raramente afetando o estado sistêmico do indivíduo, o que indica que a imunidade tecidual tem um papel ativo neste episódio. Portanto, no caso de pacientes BL e LL, a RR poderia se desenvolver se os mecanismos imunossupressores locais modificassem o ambiente, levando a ativação das populações celulares residentes responsáveis pela tolerância aos antígenos bacterianos. Outra possibilidade seria o recrutamento de células pré-ativadas do sangue para lesão cutânea decorrente do envolvimento de fatores teciduais ainda não esclarecidos. Nesse contexto, o declínio do estado imunossupressor nas formas BL e LL, assim como, a emergência de uma resposta contra o ML, poderia levar a liberação de citocinas pró-inflamatórias e fatores capazes de mobilizar o influxo de novas populações celulares para lesão, além de ativar a proliferação e diferenciação de células residentes da pele.

Até o momento, as populações celulares que compõem a lesão reacional, assim como suas vias de ativação e diferenciação, não são bem caracterizadas. A lesão de pele RR é um modelo acessível que possibilita o estudo da evolução de um processo imunoinflamatório provocado pela emergência de uma resposta imune em tecido humano previamente anérgico, no

contexto de uma doença infecciosa crônica. O uso de terapias modernas para doenças mediadas imunologicamente poderão contribuir para novas intervenções no tratamento da RR.

III. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Caracterizar o perfil fenotípico das populações de macrófagos e células dendríticas, assim como o perfil funcional através da análise da programação gênica predominante nas lesões cutâneas de pacientes do polo LL da hanseníase (LL e BL) antes e durante a RR.

Objetivos Específicos:

1. Descrever os aspectos morfológicos através da análise por microscopia de campo claro dos componentes celulares de lesões cutâneas de pacientes BL e LL com e sem RR;
2. Caracterizar fenotipicamente as populações de macrófagos, células dendríticas e células epitelioides nas lesões cutâneas de pacientes BL e LL com e sem RR por imunohistoquímica e imunofluorescência;
3. Identificar o perfil de expressão gênica de moléculas relacionadas à resposta imune Th1 e Th2, assim como à polarização de macrófagos em lesões cutâneas de pacientes BL e LL com e sem RR;
4. Realizar uma análise longitudinal, avaliando as modificações na expressão gênica das moléculas analisadas em lesões cutâneas de pacientes BL e LL antes e no momento do episódio RR.

IV. MATERIAL & MÉTODOS

Pacientes e dados clínicos

Nosso estudo foi conduzido no Laboratório de Hanseníase em parceria com o Ambulatório Souza Araújo na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Pacientes diagnosticados com hanseníase e classificados de acordo com o sistema de Ridley & Jopling (1966) foram selecionados. Termos de consentimento foram obtidos de todos os participantes e a aquisição de amostras biológicas foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fiocruz (CEP-Fiocruz) (Protocolo nº. 518/09). Nosso estudo consiste em uma análise longitudinal na qual, pacientes com hanseníase classificados com as formas clínicas LL e BL foram avaliados antes e no desenvolvimento do episódio de RR.

O grupo L-lep é composto de amostras biológicas de indivíduos BL (N=8) e LL (N=6) coletadas previamente ao início do regime de PQT e na ausência de sinais clínicos de RR. O grupo RR L-lep consistiu, em parte, de amostras biológicas coletadas dos pacientes do grupo L-lep (N=14) no momento do diagnóstico reacional clínico e histopatológico, anteriormente ao tratamento com prednisona. Além disso, foram adicionados outros oito indivíduos (5 BL e 3 BB/BL), cujo material foi coletado apenas no momento reacional, e por isso incluídos exclusivamente no grupo RR L-lep. Portanto, nosso estudo analisa o total de 22 pacientes com hanseníase, 14 dos quais foram acompanhados antes e no início da RR, juntamente com outros 8 indivíduos avaliados apenas no momento reacional (Tabela 1).

Os pacientes exibiram uma idade média de 46 anos (20 — 64). O grupo L-lep exibiu um índice logarítmico baciloscópico (ILB) médio de 3,9 (2,25 — 5,9). Todos os casos apresentaram teste de Mitsuda com resultado negativo (0 mm), com exceção de um indivíduo que obteve um resultado de 3 mm. Já o grupo RR L-lep apresentou um ILB médio de 2,4 (0 — 4,9) e, entre esses indivíduos, 11 casos estavam recebendo PQT no momento de manifestação da RR, com uma média de 9,7 meses (2,4 — 35) entre o diagnóstico da hanseníase e desenvolvimento do episódio. Seis pacientes apresentaram RR em média de 14 meses (6 — 31) após a conclusão da PQT, e 5 casos já estavam com RR no momento de diagnóstico de hanseníase (Tabela 1).

O diagnóstico de hanseníase foi baseado em critérios clínicos e histopatológicos, assim como, carga bacilar e teste de Mitsuda. Os casos RR foram identificados através do aparecimento repentino de eritema e edema em lesões de pele novas ou já existentes, além de alterações neurológicas e a presença de granulomas epitelioides na análise histopatológica (Lockwood et al., 2008; Lockwood et al., 2011).

As amostras biológicas obtidas de ambos os grupos consistiram de uma lesão de pele biopsiada com punch de 6 mm de diâmetro e sangue de cada paciente antes e no momento da RR. Após a biópsia, as lesões cutâneas foram armazenadas em nitrogênio líquido ou coletadas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco). Para análise histopatológica de rotina as lesões de pele foram coradas com hematoxilina e eosina (para avaliação geral) e Wade (para identificação de BAAR) (Moura et al., 2012). As amostras de sangue foram coletadas em tubos PAX gene estabilizadores de RNA (PreAnalytiX) e armazenadas a -20°C até a análise de expressão gênica.

Paciente	F.C	Sexo	Idade	IB	ILB diagnóstico	Teste de Mitsuda	Diagnóstico de RR	ILB RR
1	BL	M	54	0,5	2,7	3	DP	1,85
2	BL	M	59	2,25	4,9	0	PP	0
3	BL	M	60	1,5	3,5	0	PP	0
4	LL	M	57	4,25	4,85	0	DP	4,7
5	LL	M	31	4,67	5,85	0	DP	3,8
6	BL	F	41	4	4,85	0	PP	3,7
7	LL	M	43	1,5	4,8	0	PP	3,7
8	LL	M	37	2,16	3,85	0	DP	3,8
9	LL	M	20	2,75	3,5	0	DP	2,5
10	LL	F	24	4,75	5,9	0	DP	4,8
11	BL	F	50	1	3,5	0	DP	0
12	LL	M	31	4,17	4,85	0	DP	3,7
13	BL	M	41	2,5	2,25	0	DP	2,8
14	LL	M	57	5	3,8	0	DP	3,5
15	BL	M	54	0	3,5	0	PP	0
16	LL	F	56	3,75	0,75	0	PP	3,7
17	BL	F	60	0,75	*	0	AP	3,8
18	BL	M	38	2	*	0	AP	1,85
19	BL	F	46	0	*	0	AP	0
20	BB/BL	F	33	1	*	0	AP	2,7
21	BB/BL	M	55	1,25	*	0	AP	0
22	BB/BL	M	64	0,75	SD	0	DP	2,5

TABELA 1: Dados clínicos dos grupos L-lep e RR L-lep. F.C = forma clínica; IB= Índice bacilosκόpio; ILB= Índice Logarítmico Bacilosκόpio; AP= Antes da PQT; PP= Pós-PQT; DP= Durante PQT; SD= Sem dados. Pacientes 1 a 14 são indivíduos cujas amostras biológicas foram obtidas antes (grupo L-Lep) e no momento do episódio reacional (grupo RR L-lep). Pacientes 15 a 22 são casos cujos espécimes biológicos foram coletados apenas no momento de RR e, portanto, pertencem somente ao grupo RR L-lep. (*) Esses pacientes não apresentam ILB de diagnóstico, apenas ILB de RR.

Imuno-histoquímica

Para avaliar o perfil fenotípico do infiltrado inflamatório das biópsias coletadas dos pacientes dos grupos de estudo foi realizada imuno-histoquímica dos marcadores selecionados para macrófagos e células dendríticas. Cortes de 5 µm de espessura foram obtidos no criostato LM3000 (Leica, Wetzlar, Alemanha) a partir de fragmentos de lesões de pele congeladas e foram analisados pela técnica de imunoperoxidase.

Os cortes congelados foram fixados em acetona gelada por 15 minutos, e após a secagem, incubados com reagente de bloqueio de peroxidase (DAKO, CA, USA), a fim de impedir a ação de peroxidase endógena. Ligações inespecíficas foram bloqueadas através da incubação com soro normal de cabra (NGS) por 20 minutos (diluição 1:60) a temperatura ambiente. Para identificar populações de macrófagos M1 e M2, os cortes foram incubados com anticorpos monoclonais produzidos em camundongos anti-IDO (Millipore 10009) (1:50), anti-CD86 (Southern Biotech 979101) (1:50), anti-CD11c (DAKO M0732) (1:25), anti-CD68 (DAKO M0814) (1:100), anti-TLR2 (eBioscience 149922-80) (1:100), anti-CD163 (Santa Cruz sc-20066) (1:100), anti-CD209 (BD Pharmingen 551249) (1:100) ou anti-CD14 (BD Pharmingen 347490) (1:100). As populações de células dendríticas foram avaliadas pela marcação com anticorpos monoclonais anti-CD123 (Biolegend 306002) (1:100), anti-CD1a (DAKO M3571) (1:100), anti-CD1b (BD 55598) (1:100), anti-CD83 (BD Biosciences) (1:100), anti-BDCA-2 (Miltenyi Biotec 130090690) (1:100) ou anti-BDCA-4 (Miltenyi Biotec 130090693) (1:100). Todas as incubações dos anticorpos foram realizadas numa solução de soro albumina bovina (BSA) 0,1% diluída em tampão fosfato de sódio (PBS) na concentração de 1x por 1 hora a temperatura ambiente. Os anticorpos primários foram detectados pelo Kit Substrato de Peroxidase com AEC (3-amino-9-etilcarbazol) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), manuseado de acordo com as instruções do fabricante. O contracoloração foi feita com hematoxilina por 1 min. Controles negativos também foram realizados suprimindo o anticorpo primário ou através do uso de isotipos específicos. A montagem foi realizada com Paramount (DAKO) e os cortes foram avaliados através do microscópio óptico de campo claro Nikon Eclipse E400 (Nikon Instruments Inc., NY, EUA), com auxílio do programa Infinity Capture (Lumenera Corporation, ON, Canadá).

Uma análise semi-quantitativa das células dérmicas positivas para cada marcador foi realizada em ambos os grupos (8 L-lep e 8 RR L-lep). O método de avaliação adotado classificou as amostras em: (0) ausência de células positivas; (+) presença de até 5% de células positivas; (++) presença de células positivas em focos no infiltrado inflamatório, constituindo 20% das células; (+++) cerca de 50% de células positivas; e (++++>) > de 50% de células positivas,

representando a maioria do infiltrado. A análise dos resultados foi realizada 2 vezes sem discordância nos resultados.

Coloração com Oil Red O

Para identificação de macrófagos espumosos nas lesões de pele de ambos os grupos, a coloração de Oil Red O foi realizada para detecção de reservas lipídicas. Cortes de 5 µm foram fixados com formolína 10% gelada por 15 minutos. Após uma lavagem com água destilada, os cortes foram incubados com propileno glicol absoluto por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram corados com a solução de Oil Red O 0,5% em propileno glicol por 15 minutos a 60°C. A diferenciação foi realizada através de uma incubação de 5 minutos com propileno glicol 85% a temperatura ambiente, seguida de três lavagens com água destilada. Os núcleos celulares foram corados com hematoxilina. Após a lavagem, os cortes foram montados com Permafluor (DAKO). As imagens foram obtidas no microscópio óptico de campo claro Nikon Eclipse E400 (Nikon Instruments Inc., NY, EUA), com auxílio do programa Infinity Capture (Lumenera Corporation, ON, Canadá).

Imunofluorescência

Para avaliação do fenótipo da população CD123⁺ nas lesões de pele (8 L-lep e 8 RR L-lep) foram realizados ensaios de imunofluorescência com diversos marcadores fenotípicos de macrófagos e células dendríticas. Os cortes de 5 µm foram fixados em acetona gelada por 15 minutos. Após uma lavagem de 5 minutos com PBS 1x os mesmos foram incubados com uma solução de bloqueio e permeabilização contendo BSA 5% NGS 10% Triton X-100 0,25% em PBS 1x por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida foi feita a marcação com anti-CD123 (Biolegend 306002) (1:50) overnight a 4°C. Após a lavagem, os cortes foram incubados com anticorpo secundário Alexa Fluor® 532 produzido em cabra anti-IgG de camundongo (Molecular Probes, OR) a uma diluição de 1:300 por 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente. Na segunda etapa de marcação, os cortes foram incubados separadamente a 4°C overnight com anticorpos monoclonais anti-IDO (Millipore 10009), anti-CD86 (Southern Biothec 979101), anti-CD11c (DAKO M0732), anti-CD68 (DAKO M0814), anti-TLR2 (eBioscience 149922-80), anti-CD163 (Santa Cruz sc-20066), anti-CD209 (BD Pharmigen 551249), anti-CD14 (BD Pharmigen 347490), anti-CD1a (DAKO M3571), anti-CD1b (BD 55598), anti-CD83 (BD Biosciences), anti-BDCA-2 (Miltenyi Biotec 130090690) ou anti-BDCA-4 (Miltenyi Biotec 130090693). A diluição adotada para todos os anticorpos foi 1:50. A última marcação foi realizada com anticorpo secundário Alexa Fluor® 633 produzido em cabra anti-IgG de camundongo (Molecular Probes, OR) a uma diluição de 1:300 por 1 hora 30 minutos em temperatura ambiente. Todos os

anticorpos usados nesse protocolo foram incubados em uma solução de NGS 5% BSA 1% PBS 1x e entre cada marcação foi realizada uma série de 3 lavagens de 5 minutos cada com PBS 1x. O 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) foi usado na diluição de 1:10.000 (PBS 1x) para visualização dos núcleos celulares. Os cortes foram montados com Permafluor (Thermo Scientific, CA, EUA) e selados para visualização. As imagens foram obtidas no Microscópio Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) com software Axiovision 4.7.

Quantificação de marcadores fenotípicos de células CD123⁺ através da imunofluorescência

As lesões de pele de ambos os grupos (8 L-lep e 8 RR L-lep) foram analisadas levando em consideração a presença de tipos celulares na derme. Foi avaliada a colocação de células CD123⁺ com os marcadores fenotípicos de macrófagos e células dendríticas mencionados anteriormente. Imagens de imunofluorescência obtidas no Microscópio Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) com software Axiovision 4.7 foram analisadas quantitativamente através do sistema de teste estereológico composto de 36 pontos (PT), como já descrito previamente (Neves et al., 2006; Madarim-de-Lacerda, 2003). A fórmula utilizada foi $Vv=PP/PT$ (%), onde PP representa os pontos que coincidem com a estrutura marcada e PT representa os pontos totais presentes na grade estereológica. Cinco a dez imagens de campos aleatórios de cada corte foram analisados cegamente.

Extração de RNA e PCR em tempo real

A avaliação do perfil de expressão gênica das lesões cutâneas e sangue dos indivíduos dos grupos L-lep e RR L-lep foi realizada por PCR em tempo real. Primeiramente, o RNA total foi extraído usando reagente Trizol (Invitrogen) em fragmentos de lesões de pele e o Kit PAXgeneTM Blood RNA (PreAnalytiX) foi utilizado para as amostras de sangue, ambos manuseados de acordo com as instruções do fabricante. A pureza e quantificação do RNA foi verificada pelo espectrofotômetro NanoDrop 1000 e a síntese de cDNA foi realizada através do kit de RT-PCR Superscript III first-strand (Invitrogen). Para avaliação da expressão gênica nesse material foi adotado o sistema Taqman de PCR em tempo real, com a utilização do Universal PCR Master Mix (2x) e sondas específicas (Applied Biosystems). Os ensaios foram realizados no sistema de PCR em tempo real StepOne Plus e o GAPDH foi adotado como o controle endógeno das reações. O mRNA das moléculas *IDO*, *CD123*, *CD163*, *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-10*, *IFN- γ* , *CXCL-10*, *IL-15*, *SRA-I*, *PPAR γ* , *TLR2*, *M-CSF* e *GM-CSF* foi quantificado pelo o método 2- Δ Ct (Livak & Schmittgen, 2001).

Cultura de células e estímulos

Células mononucleares do sangue periférico de doadores saudáveis (N=5) foram isoladas por Ficoll-Hypaque (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, EUA). A purificação dos monócitos foi realizada usando kit de separação por seleção magnética positiva CD14 (Milteny Biotec, Auburn, CA, EUA). Os monócitos recuperados foram colocados em meio RPMI 1640 contendo L-glutamina 2 mM, soro fetal bovino (SFB) 10% e antibióticos. A análise por citometria de fluxo atestou pureza de > 90% de monócitos, que foram cultivadas em placas de 24 poços (Costar, Cambridge, MA, EUA) e estimuladas com rhTNF- α (Calbiochem) e ML derivado de tatu sonicado (MOI 10:1) por 24 horas.

Isolamento de células de lesões cutâneas

O isolamento de células de lesão de pele (6 L-lep e 5 RR L-lep) foi baseado no protocolo descrito por Moura e colaboradores (2007). A lesão foi coletada com um "punch" de 6 mm por um profissional treinado no Ambulatório Souza Araújo (FIOCRUZ, Rio de Janeiro) e transferida imediatamente para um tubo contendo meio RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies), sendo mantida no gelo até o momento do processamento. Em um ambiente estéril, a epiderme foi mecanicamente separada da derme com o auxílio de um bisturi e descartada. A derme, por sua vez, foi fragmentada e embebida em uma solução de dispase (0,05 mg/ml) /colagenase (1,26 u/ml) (Gibco, Life Technologies) em meio RPMI 1640 suplementado com SFB 10% overnight a 37°C/5% de CO₂. Após a incubação, foram realizadas três lavagens em meio RPMI 1640 (500 xg por 10 minutos a 4°C). Em seguida as células foram contadas por exclusão em azul de Tripam e avaliadas por citometria de fluxo.

Citometria de fluxo

A expressão de CD123 foi avaliada em células isoladas de lesões de pele (6 L-lep e 5 RR L-lep) e em monócitos obtidos de doadores saudáveis (N=5) por citometria de fluxo. Após a etapa de bloqueio com uma solução de NGS 3% SFB 6% PBS1X por 10 minutos a 4°C, essas células foram marcadas com CD123-PECY7 (Biolegend) em uma diluição de 1:50 por 30 minutos a 4°C. Após 2 lavagens com PBS contendo 1% de BSA (PBS-FACS), as amostras foram lidas e analisadas no citômetro fluxo Accuri C6 (BD) usando o CFlow Software (BD). Em todos os experimentos foram utilizados controles com isotipos específicos e foram analisados 10.000 eventos por amostra.

Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão. As diferenças significativas entre os grupos foram determinadas pelo teste de Mann-Whitney, teste de Wilcoxon ou ANOVA, quando apropriado. A análise quantitativa de marcadores fenotípicos de células CD123⁺ através de ensaios de imunofluorescência foi realizada usando o teste T não pareado com correção de Welch. Para todas as análises estatísticas o valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo. As análises estatísticas foram realizadas através do programa Windows GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

V. RESULTADOS

Lesões de pele L-lep adquirem características tuberculoideas durante o episódio reacional.

Os eventos imunológicos que envolvem o episódio reacional levam não só ao aparecimento de novas lesões cutâneas, mas também podem ocasionar a reativação de lesões pré-existentes (Lockwood et al., 2008). Portanto, o microambiente cutâneo é submetido a um processo de reorganização morfológica que pode ser determinado pelo influxo de novas populações celulares sanguíneas e pelo novo padrão funcional adotado pelas células residentes do tecido. A avaliação histológica mostrou que lesões de pele de pacientes LL apresentam um grande infiltrado de macrófagos na derme, assim como poucos linfócitos, separados de uma epiderme retificada por uma zona clara chamada de faixa de Una (Figura 15A). Os macrófagos LL ou células de Virchow exibiram alta carga bacilar (Figura 15G), exibindo um aspecto vacuolado causado pelo armazenamento de grandes quantidades de lipídios (Figura 15E), como podemos observar pela coloração de Wade e Oil Red O, respectivamente. Na lesão de pele de pacientes BL, por outro lado, observamos um infiltrado intenso de macrófagos distribuídos em bandas pela derme e intercalados com linfócitos (Figura 15C).

No momento do episódio reacional, observamos que o infiltrado presente nas lesões sofre uma drástica alteração, sendo composto, principalmente, por células epitelioides e poucos linfócitos que formam granulomas frouxamente organizados, assemelhando-se a imagem estrutural das lesões reacionais tuberculoideas (Figura 15B e 15D). Em contraste com a epiderme retificada e atrofiada observada na pele L-lep, as lesões reacionais apresentam alta atividade celular e espessamento da epiderme (Figura 15B e 15D). A histologia das lesões cutâneas L-lep no momento da RR não exibiram nenhuma diferença notável entre as formas clínicas LL e BL, obedecendo ao mesmo padrão de organização e exibindo uma alta heterogeneidade na distribuição dos granulomas epitelioides. As populações de células epitelioides no grupo L-lep apresentou uma alta diversidade morfológica (Figura 16), o que possivelmente reflete seus estados funcionais, com as células maduras exibindo uma maior atividade imunológica (Antia & Vanaja, 1997). Ao contrário do que foi observado em lesões L-lep, a reserva lipídica e os bacilos foram restritos a uma população de macrófagos situada na periferia dos granulomas (Figura 15F e 15H). Ambos os componentes não foram detectados nas populações de células epitelioides.

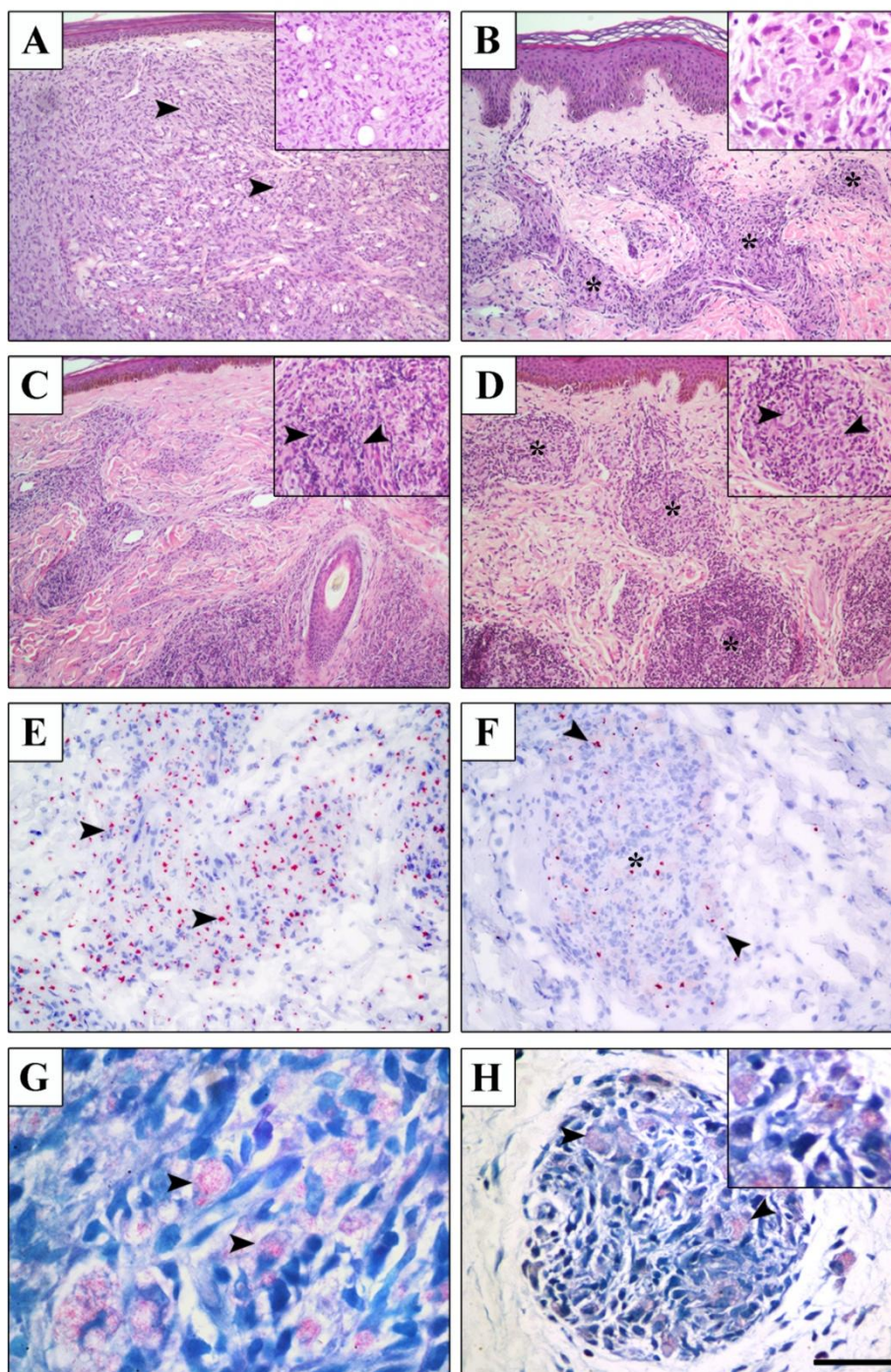


Figura 15: Histopatologia das lesões cutâneas L-lep antes e no momento da RR. Coloração com hematoxilina e eosina realizada nas lesões de pele L-lep e RR L-lep (A-D). Lesão cutânea de um paciente LL antes do episódio de RR, na qual um intenso infiltrado de macrófagos é observado (inserto e setas pretas) (A). Lesão cutânea de um paciente LL no momento do episódio de RR, onde os asteriscos indicam granulomas e o inserto mostra células epitelioides (B). Lesão cutânea de um paciente BL sem RR, na qual as setas pretas no inserto indicam linfócitos (C). Lesão de pele de um paciente BL no momento da RR, onde asteriscos pretos indicam granulomas e o inserto mostra células epitelioides (D). Para visualizar as gotas lipídicas (vermelho) nos macrófagos espumosos (setas pretas), coloração de Oil Red O foi feita em cortes congelados de lesões de pele LL (E) e LL com RR (F), na qual os asteriscos indicam granulomas. O método de coloração de Wade foi realizado para identificar ML (vermelho) nas lesões de pele LL (G) e LL com RR (H), onde as setas pretas apontam para focos de bacilos. Barras: (A-D) = 200 μ m; (E e F) = 100 μ m; (G) = 20 μ m e (H) = 50 μ m. As imagens são representativas da avaliação de

pacientes LL (n=8), BL (n=6), BL com RR (n=10) e LL com RR (n=9). As imagens foram obtidas no microscópio Nikon E400 Eclipse e avaliadas no programa Infinity software.

As alterações morfológicas observadas nas lesões RR L-lep provavelmente refletem um novo estado de reativação imune a nível tecidual. Estudos recentes têm demonstrado que citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , podem interferir com o panorama tissular ao induzir diferenciação de macrófagos e células dendríticas (Bean et al., 1999; Schenk et al., 2014). Nesse contexto, decidimos avaliar as novas populações celulares emergentes e a programação genética em andamento na lesão de pele durante a RR.

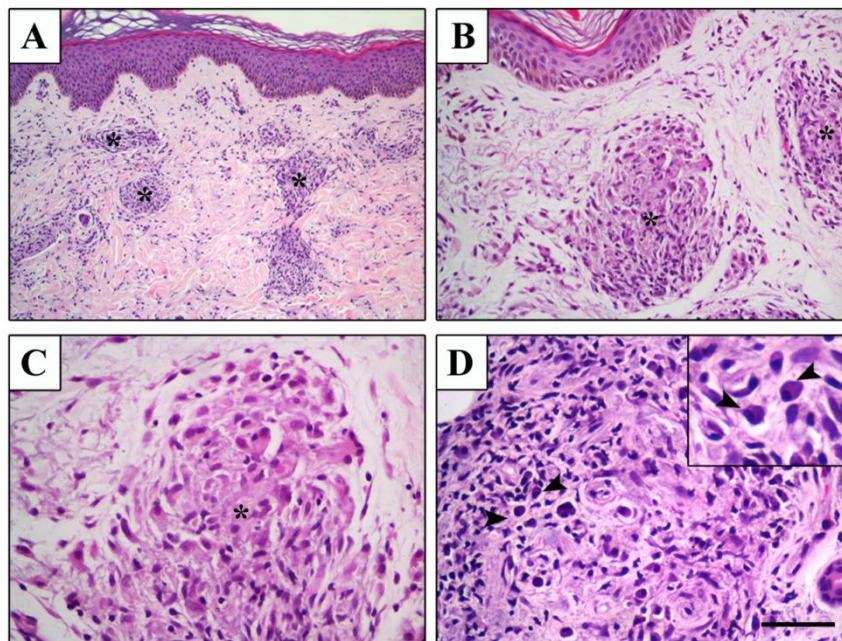


Figura 16: Diversidade morfológica de populações de células epitelioides em lesões cutâneas reacionais. Coloração com hematoxilina e eosina realizada nas lesões de pele RR L-lep (A-D). Lesões cutâneas de um pacientes LL no momento da RR, onde asteriscos indicam granulomas com células epitelioides (A e B). Detalhe das células epitelioides do granuloma mostrado em B (C). Diversidade celular da população de células epitelioides no granuloma reacional (D). Setas pretas apontam para células com aspecto de plasmócitos no meio do infiltrado epiteliode (inserto). Barras: (A) = 200 μ m; (B) = 100 μ m; (C e D) = 50 μ m. As imagens são representativas da avaliação de pacientes BL com RR (n=10) e LL com RR (n=9). As imagens foram obtidas no microscópio Nikon E400 Eclipse e avaliadas no programa Infinity software.

Populações heterogêneas de macrófagos e células dendríticas estão presentes na lesão de pele reacional.

Para avaliar a diversidade populacional exibida pela lesão de pele RR, nós selecionamos marcadores adotados para fenotipagem de macrófagos e células dendríticas em humanos e aferimos sua expressão em lesões de pele de pacientes RR L-lep através de ensaios de imunohistoquímica. Como esperado, um intenso infiltrado de macrófagos foi observado no grupo RR L-

lep, como indicado pela expressão de CD68, um marcador clássico de macrófagos humanos. Células CD68⁺ (>50% de células) foram observadas nos granulomas no grupo reacional (Figura 17A). A fim de estabelecer os fenótipos de polarização dos macrófagos da lesão, a expressão de marcadores de macrófagos M1 e M2 foram avaliadas nos pacientes com RR. O marcador de macrófago M2, CD163, foi expresso em 10 a 50% de células dérmicas, localizando-se principalmente na periferia do granuloma reacional, estando ausente na porção central onde as células epitelioides se concentram (Figura 17B). CD209, também considerado um marcador de macrófagos M2 e presente também em células dendríticas, foi observado em alta frequência (>50% de células) no grupo RR L-lep. Células CD209⁺ se concentraram principalmente no centro do granuloma reacional (Figura 17C).

CD80, por outro lado, foi fracamente expresso na RR. Em pacientes RR L-lep, esse marcador foi encontrado em algumas células epidérmicas, na derme papilar, dentro do infiltrado inflamatório e granulomas (Figura 17D). Além disso, o CD86 também foi detectado em indivíduos reacionais (10 a 50% de células), se concentrando nos granulomas e na derme das lesões cutâneas. O CD11c, que caracteriza células de origem mieloide, foi intensamente expresso (>50% de células), presente nos granulomas reacionais, marcando também células epitelioides nas lesões RR L-lep (dados não mostrados).

A diversidade fenotípica também foi observada nas populações de células dendríticas. O marcador de células de Langerhans, CD1a, apresentou positividade em populações dérmicas e epidérmicas no grupo RR L-lep. Na derme, essas células encontravam-se restritas aos granulomas e infiltrados inflamatórios (Figura 17E). O grupo RR L-lep apresentou uma expressão moderada de CD1b (10 a 50% de células), com marcação restrita aos granulomas (10 a 50% de células) e incluindo também células epitelioides (Figura 17F). O marcador fenotípico de células dendríticas maduras e ativadas, CD83, exibiu uma expressão moderada nas lesões reacionais (10 a 50% de células). Células CD83⁺ foram identificadas no centro do granuloma de RR, com algumas delas exibindo o aspecto morfológico de células dendríticas, sendo observadas também células gigantes positivas para esse marcador na derme de lesões RR L-lep (Figura 17G).

Sabe-se que o TLR2 é uma molécula chave na ativação da resposta imune inata contra micobactérias (Krutzik et al., 2003). Nas lesões de pele RR L-lep, esse receptor foi identificado em células intraepidérmicas e dentro do granuloma (10 a 50% de células), marcando células epitelioides (Figura 17H).

Recentemente, estudos têm descrito a molécula BDCA4 como um marcador fenotípico para algumas subpopulações de células dendríticas (Dzionic et al., 2000; Blomberg et al., 2003).

Nossos dados mostraram que BDCA4 foi expresso por células distribuídas em áreas periféricas e centrais do granuloma reacional (dados não mostrados). Finalmente, o marcador de células dendríticas plasmocitoides, CD123, foi intensamente expresso nas lesões de pele reacionais (>50% de células), com positividade na região central do granuloma, marcando também células epitelioides (Figura 17I e 17J).

Nossos dados propõem a coexistência de diversos fenótipos de macrófagos na lesão de pele de RR L-lep, assim como a expressão de marcadores de células dendríticas em populações morfológicamente distintas, indicando tanto a sua participação na fisiopatologia do episódio quanto sua importância para organização e formação do granuloma. Além disso, também sugerem que a população de células epitelioides exibe um fenótipo misto, expressando marcadores de macrófagos e células dendríticas no contexto imunológico da RR. Uma observação inesperada foi a predominância de células CD123⁺ na lesão de pele reacional, e devido à falta de dados a respeito dessa população no ambiente cutâneo humano, a próxima etapa do nosso estudo foi investigar esse tipo celular em nosso modelo.

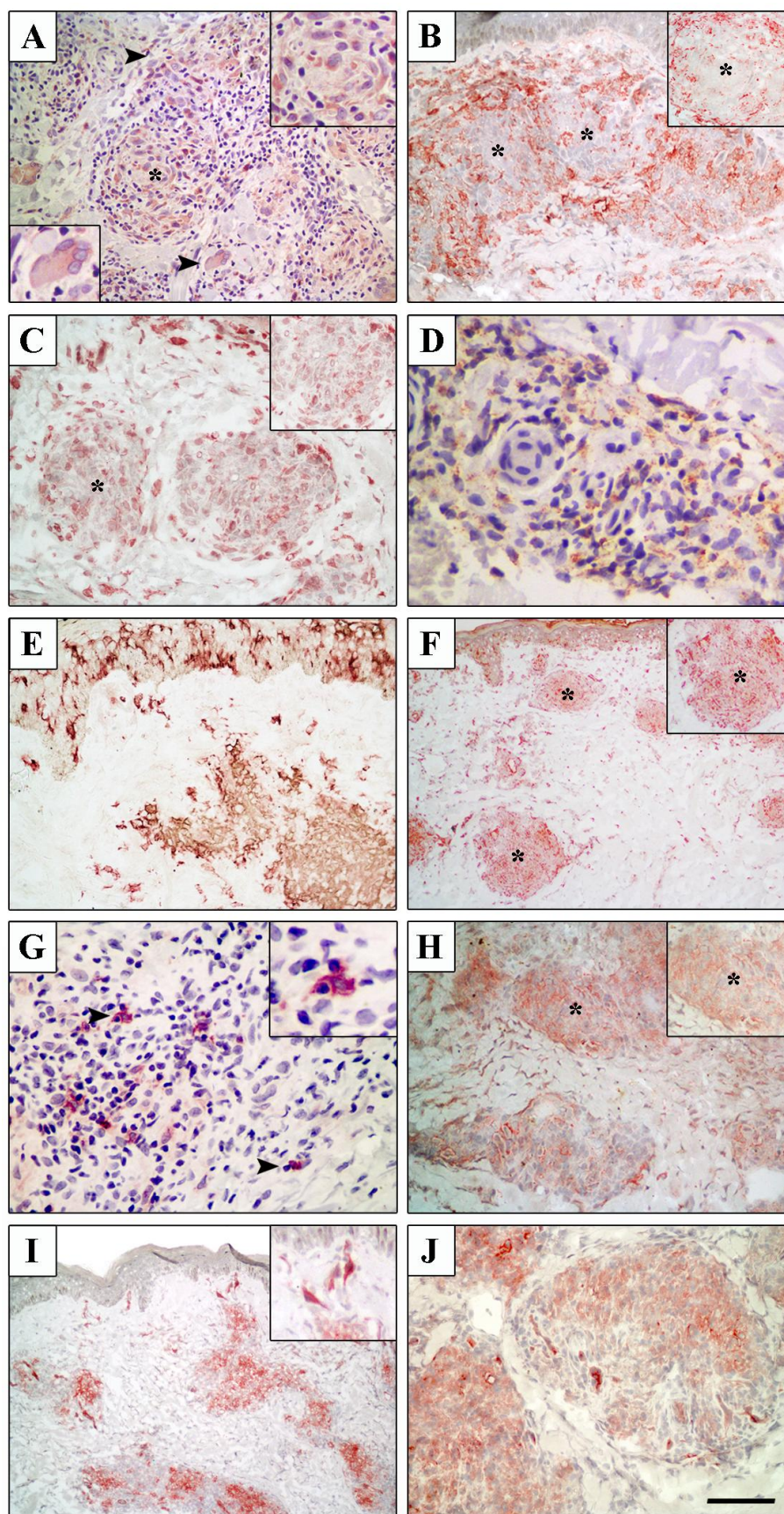


Figura 17: Populações de macrófagos e células dendríticas em lesões cutâneas de pacientes L-lep com RR. A análise imuno-histoquímica mostrou a presença de macrófagos e células dendríticas em lesões de pele RR L-lep. O marcador clássico de macrófago, CD68, foi encontrado

principalmente no granulomas das formas reacionais (inserto e asterisco indicam granuloma e setas pretas apontam para células CD68⁺) (A). CD163, um receptor *scavenger* de macrófagos, estava ausente no centro do granuloma da RR, presente, principalmente na periferia dessa estrutura (B). CD209, outro marcador de macrófago, foi visto na derme, com algumas células CD209⁺ no granuloma reacional (C). CD80 foi observado na derme das lesões RR (D). Em relação às populações de células dendríticas, CD1a, marcador de células de Langerhans, foi observado na epiderme e infiltrado reacional (E). O marcador fenotípico, CD1b foi encontrado em nos granulomas (centro e periferia), com positividade na epiderme (ver inserto e asteriscos) (F). O marcador de células dendríticas maduras, CD83, foi observado na derme e granulomas de lesões RR L-lep (setas pretas) (G). Expressão de TLR2, um receptor da imunidade inata, foi localizada em granulomas e no infiltrado dérmico de pacientes RR (ver inserto e asteriscos) (E). O marcador de célula dendrítica plasmocitoide, CD123, foi expresso em altos níveis em lesões de RR, principalmente no granuloma (ver insertos e asteriscos) (I e J). Essas observações são representativas de pacientes LL com RR (n=2) e BL com RR (n=6) antes do tratamento com prednisona. Barra de escala: (A, C-E, G e J) = 100µm; (B e H) = 50µm. (F e I) = 200µm. As imagens foram obtidas no microscópio Nikon E400 Eclipse e avaliadas no programa Infinity software.

CD123 pode estar envolvido na reemergência da imunidade inata tecidual em lesões de pele L-lep no início da RR.

Como descrito anteriormente, uma alta frequência de células CD123⁺ foi observada em lesões de pele RR L-lep, e considerando que essa população tem sido detectada em muitas doenças e implicada na patogênese das mesmas, nosso próximo passo foi investigar a expressão dessa molécula em lesões de pele de pacientes L-lep com ou sem RR (Nomura et al., 2009; Varughese et al., 2009; Vermi et al., 2009; Farkas et al., 2001; Van Krinks et al., 2004; Wollenberg et al., 2002; Gilliet et al., 2004). A avaliação da expressão gênica através de PCR em tempo real, confirmou os resultados da análise de imuno-histoquímica, mostrando um aumento do mRNA de CD123 nas lesões de pele RR L-lep em comparação com o grupo L-lep ($p=0,0044$) (Figura 18A). A análise da expressão gênica de CD123 de cada paciente antes e no momento da RR mostrou esse fenômeno mais claramente ($p=0,0423$) (Figura 18B).

Ao avaliar as células isoladas de lesões de pele de ambos os grupos por citometria de fluxo, foi encontrada uma alta porcentagem de células CD123⁺ no material dos pacientes reacionais quando comparado com os indivíduos L-lep ($p=0,0353$) (Figura 18C). A investigação da expressão gênica de CD123 nas amostras sanguíneas mostrou uma maior expressão dessa molécula em pacientes L-lep em comparação ao grupo RR L-lep ($p=0,0043$), contrariando o padrão observado nas lesões cutâneas dos grupos (Figura 18D).

Para estabelecer os possíveis indutores da expressão de CD123 nas lesões RR L-lep, ensaios *in vitro* foram realizados com monócitos de indivíduos saudáveis estimulados por 24 horas com rhTNF- α (10 ng/ml) e ML irradiado (MOI 10:1), já que ambos estão presentes na lesão reacional (Figura 15H e 21A). Após a análise por citometria de fluxo, nenhuma diferença foi

observada na expressão de CD123 com a adição de rhTNF- α , mas o ML foi capaz de induzir a expressão dessa molécula ($p=0,0085$) (Figura 18E).

Já que o CD123 é a cadeia α de baixa afinidade do receptor de IL-3, nós avaliamos a expressão dessa citocina nas lesões e no sangue de ambos o grupos. Surpreendentemente, níveis de mRNA de IL-3 não foram detectados em nenhuma das 8 amostras de lesões de pele L-lep analisadas, sendo observada expressão em somente 5 casos RR-L-lep dos 8 examinados (Figura 18F). Já no sangue, não foi observada expressão dessa citocina em nenhum dos grupos (dados não mostrados). Deste modo, nossos dados indicam a existência de mecanismos dependentes de IL-3 em curso na lesão de RR, destacando o possível papel de células CD123⁺ na ativação da resposta imune inata durante esse episódio inflamatório.

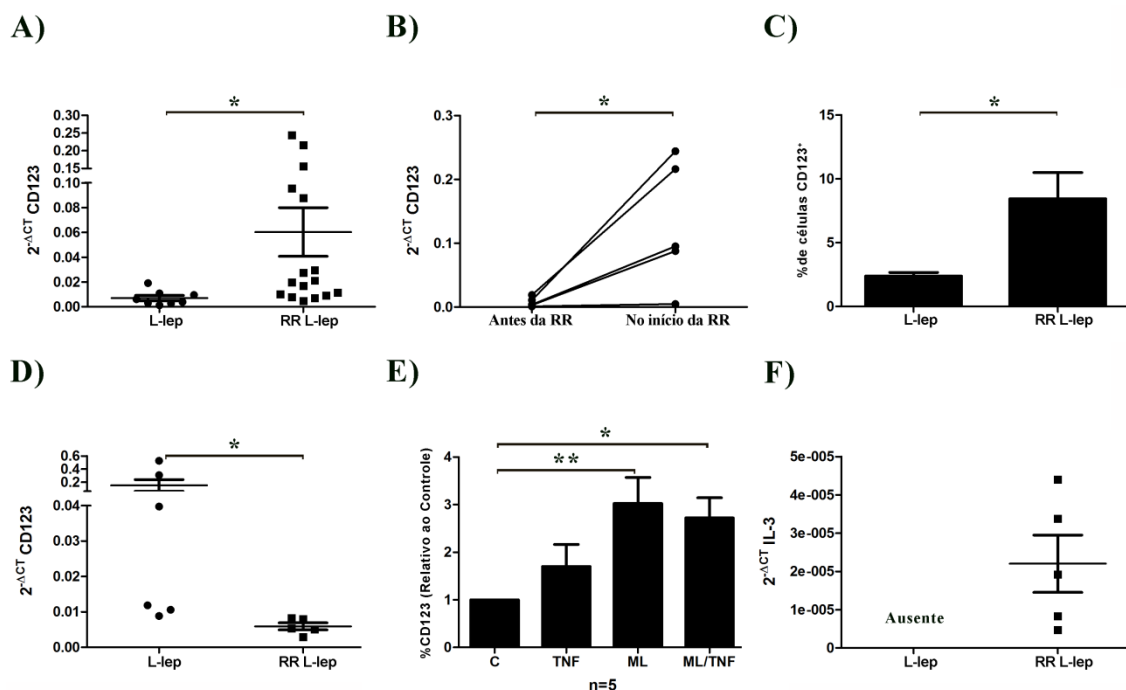


Figura 18: Expressão de IL-3 e seu receptor, CD123, em lesões cutâneas L-lep sem e no momento da RR. A expressão gênica de IL-3 e CD123 avaliada por PCR em tempo real. A expressão gênica de CD123 foi mais alta nos pacientes com RR do que indivíduos L-lep (8 L-lep e 16 RR-lep) (A) e no momento reacional de indivíduos avaliados antes e no início do episódio (n=5) (B). A expressão proteica de CD123 avaliada através de citometria de fluxo em células extraídas de lesões cutâneas de ambos os grupos (6 L-lep e 5 RR L-lep) (C). A expressão gênica do CD123 foi avaliada também no sangue desses pacientes (D). Expressão de CD123 analisada por citometria de fluxo em monócitos de doadores saudáveis estimulados com rhTNF- α (10ng/ml) e ML (MOI 10:1) (n=5) (E). Expressão de IL-3 foi detectada apenas em lesões de pele RR L-lep (8 L-lep e 8 RR L-lep) (F). Teste de Mann-Whitney (A,C e D), teste de Wilcoxon (B) e teste de ANOVA (E) foram usados na análise estatística. * $p<0.05$ e ** $p<0.01$

Células CD123⁺ em lesões de pele RR L-lep exibem uma combinação de fenótipos de macrófagos e células dendríticas.

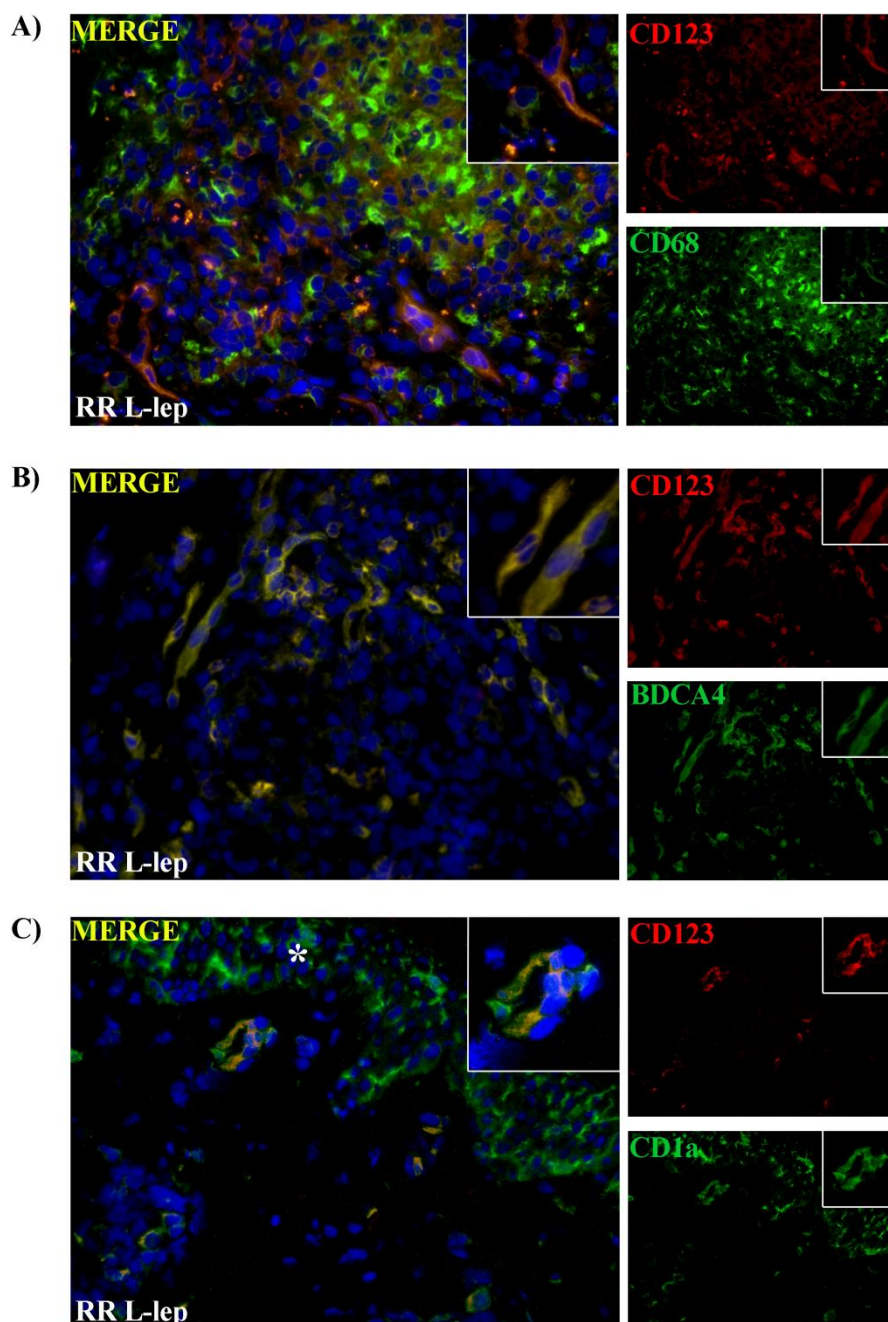
Já que nossos dados anteriores mostraram um aumento de expressão de CD123 nas lesões de pele RR L-lep, nosso próximo objetivo foi avaliar se os macrófagos e células dendríticas expressavam esse receptor. Com esse propósito, ensaios de imunofluorescência foram realizados usando CD123 juntamente com os marcadores fenotípicos já mencionados dessas populações. A colocalização de CD68 e CD123 foi observada em ambos os grupos (Figura 19A), indicando que nessas lesões, os macrófagos expressam o receptor de IL-3. Entretanto, as lesões RR L-lep exibiram uma porcentagem maior de células duplo-positivas quando comparadas ao grupo L-lep ($p=0,0005$) (Figura 19M). Células CD68⁺ também foram detectadas nos dois grupos, indicando que apenas uma fração da população de macrófagos expressam CD123 (Figura 19A).

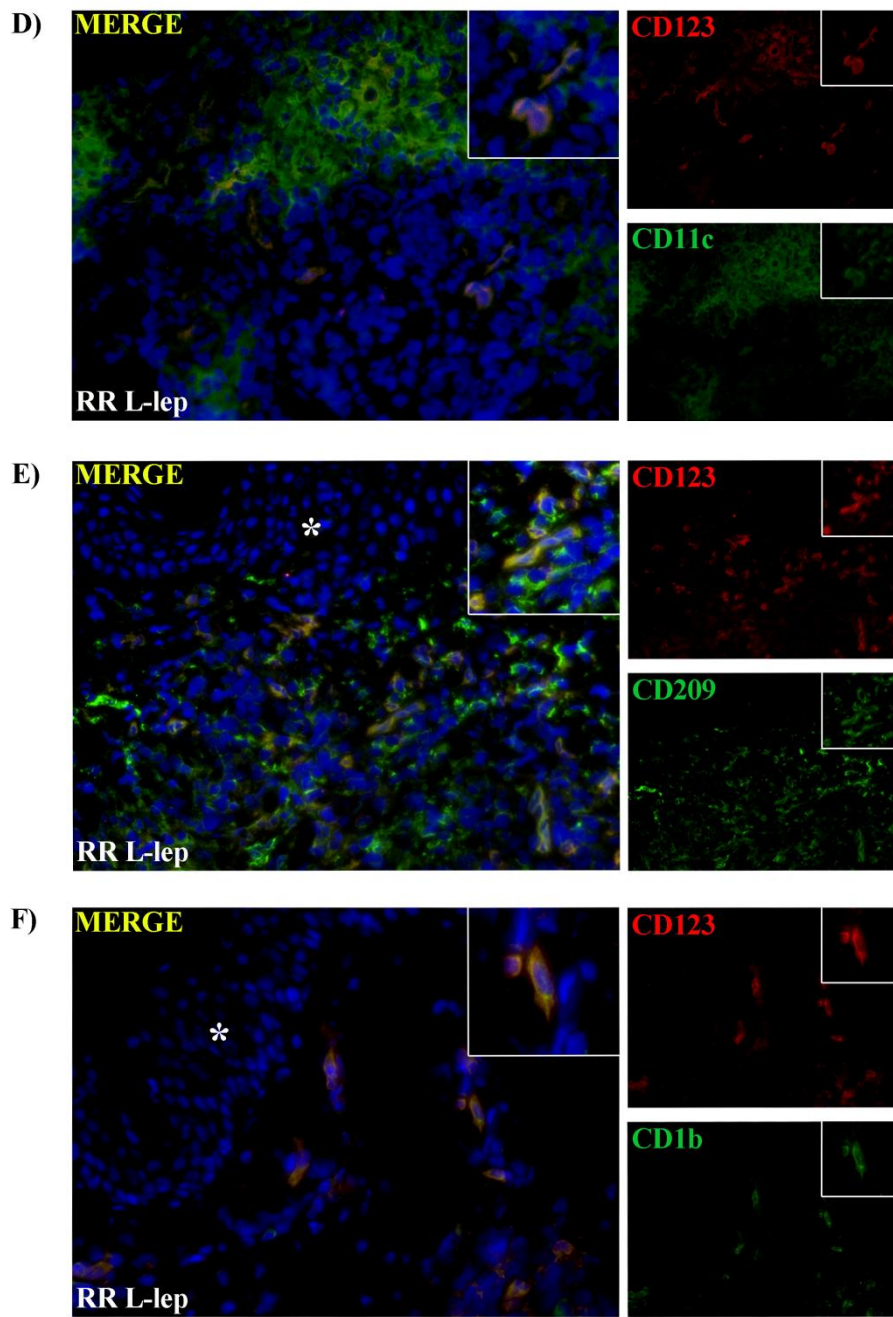
Um padrão diferente foi observado para o marcador BDCA4, o qual colocalizou com todas as células CD123⁺ (Figura 19B). As células duplo-positivas apresentaram uma maior frequência nas lesões de pele reacionais ($p=0,0227$) (Figura 15M), mas células positivas somente para BDCA4 não foram detectadas em nenhum dos grupos, sugerindo que esse marcador é expresso por toda a população CD123⁺. O marcador de células de Langerhans, CD1a, foi expresso em células CD123⁺ localizadas na derme de ambos os grupos de lesões, apesar dessa população ser mais frequente nos indivíduos RR L-lep ($p=0,0055$) (Figura 19C e 19M). A população CD1a⁺CD123⁻ ficou restrita a epiderme em ambos os grupos, com uma expressão maior nas amostras reacionais (Figura 19C).

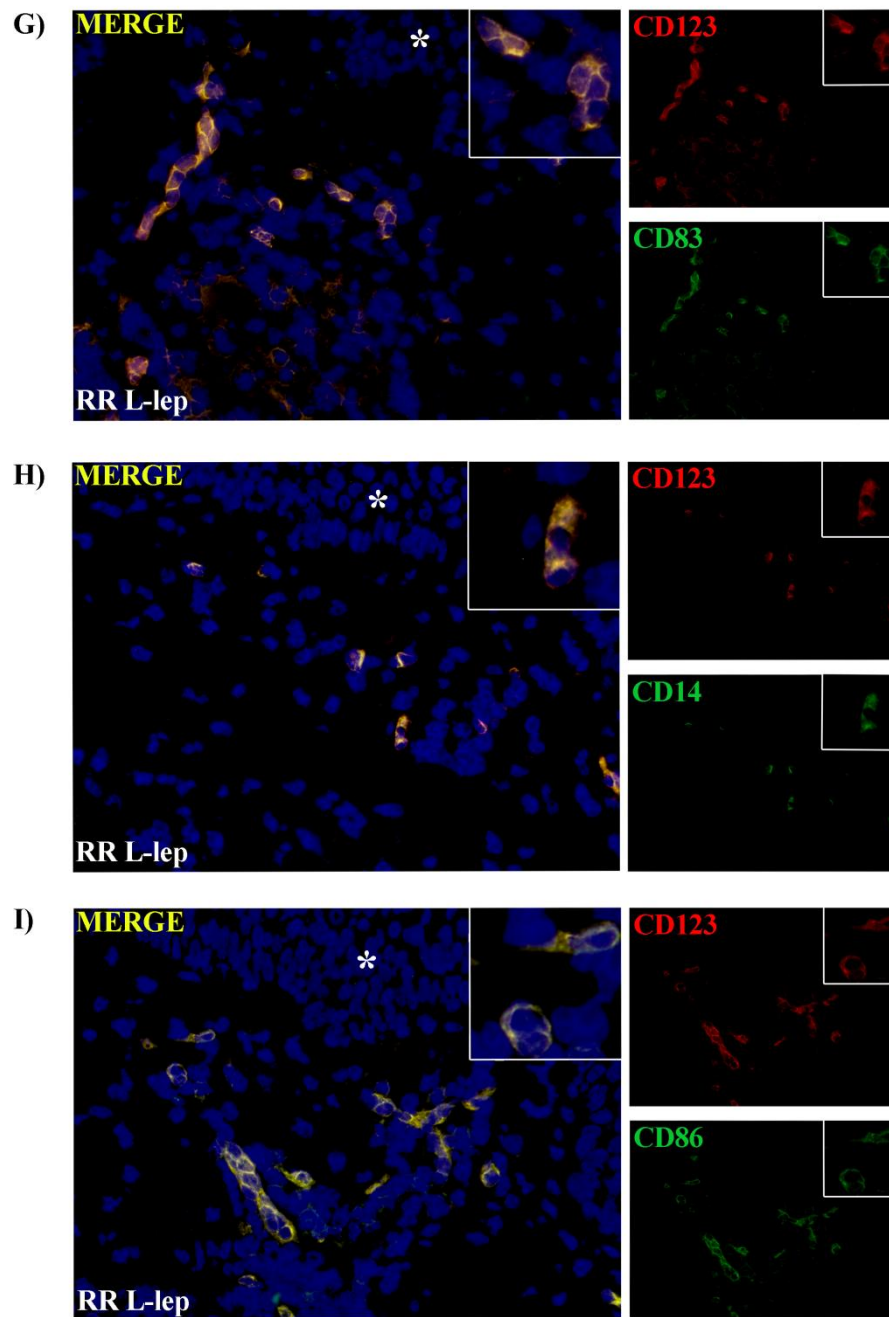
Além disso, os marcadores CD11c, CD209, CD1b, CD83, CD14 e CD86 foram avaliados juntamente com o CD123, e populações duplo-positivas foram observadas para todos eles. Nas lesões cutâneas RR L-lep, a porcentagem de células CD11c⁺/CD123⁺ foi maior quando comparada ao grupo L-lep, apontando para origem mieloide dessa população ($p=0,0142$) (Figura 19D e 19M), com a presença também de células CD11c⁺ nos dois grupos. CD209 colocalizou com CD123 tanto em lesões RR L-lep quanto L-lep, como uma frequência mais alta dessas células nos indivíduos reacionais ($p=0,0378$) (Figura 19E e 19M). A expressão simultânea de CD1b e CD123 foi encontrada em ambos os grupos, sem diferenças observadas em relação a quantidade dessa população (Figura 19F e 19M). Células CD83⁺/CD123⁺ ($p=0,0017$), CD14⁺/CD123⁺ ($p=0,0002$) e CD86⁺/CD123⁺ ($p=0,0187$) também foram encontradas nas lesões de pele dos dois grupos, com uma maior representação dessas populações nos indivíduos com RR (Figura 19G — I e 19M). Os pacientes reacionais também apresentaram uma maior

frequência de células BDCA2⁺/CD123⁺ ($p=0,0053$) e TLR2⁺/CD123⁺ ($p=0,0064$) que indivíduos sem RR (Figura 19J — M).

Nossos dados indicaram que em lesões de RR, as populações de macrófagos e células dendríticas expressam CD123 em uma maior frequência quando comparados aos pacientes não reacionais, possivelmente tornando essas células mais sensíveis à ação de IL-3 e reforçando a ideia de que essa molécula está intimamente relacionada ao processo inflamatório que acompanha o episódio de RR.







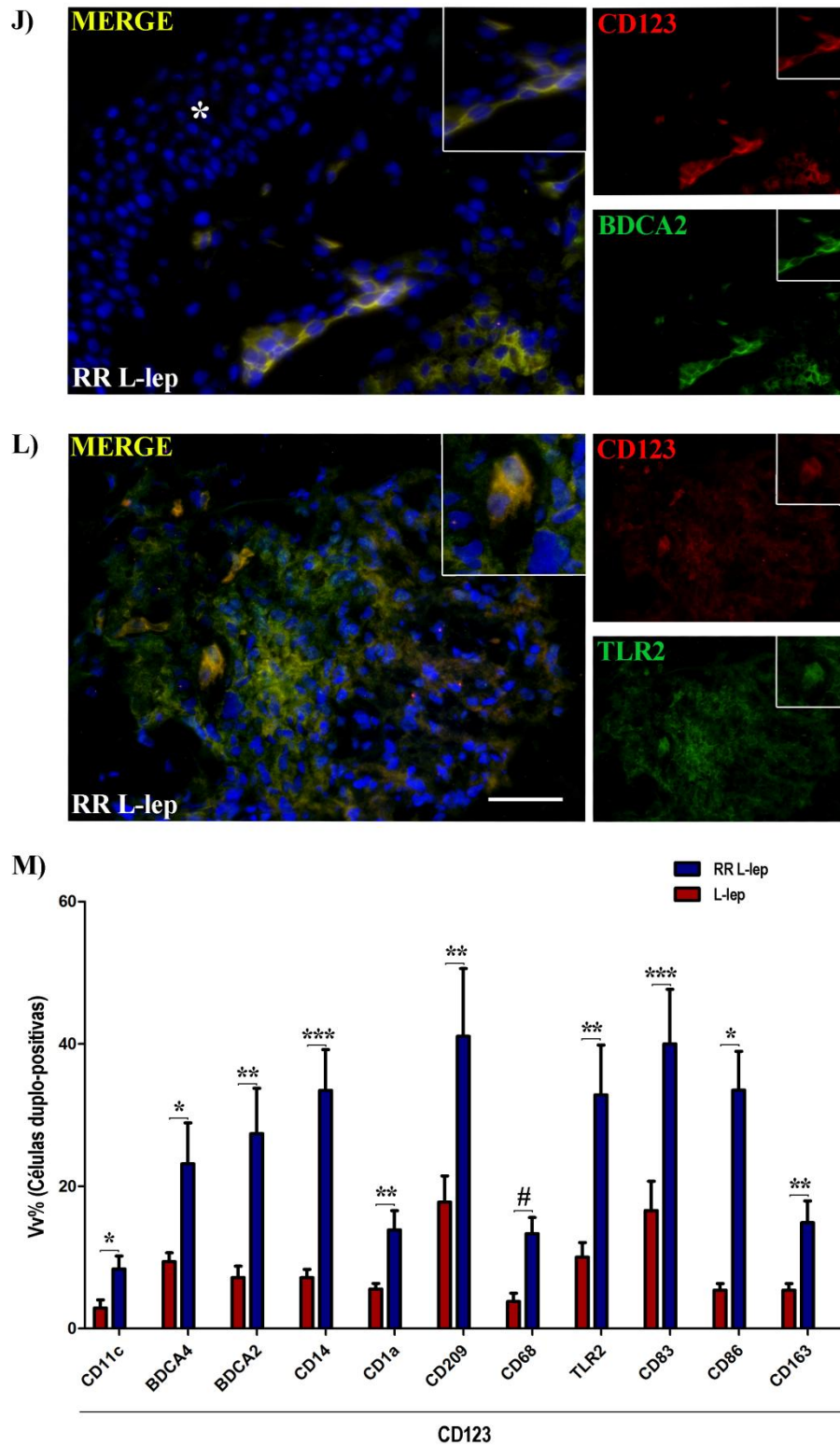
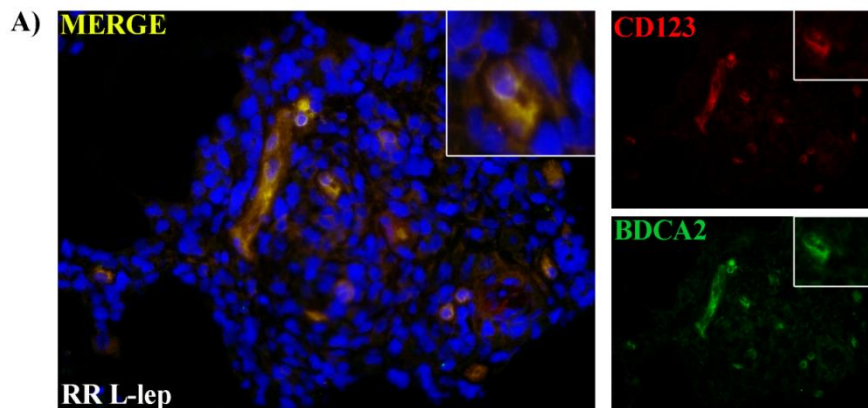


Figura 19: Caracterização das células CD123⁺ em lesões cutâneas L-lep e RR L-lep. A avaliação do conjunto de marcadores expressos por células CD123⁺ nas lesões L-lep e RR L-lep foi realizada por ensaios de imunofluorescência. Foi observada colocalização de células CD123⁺ (vermelho) tanto com marcadores de macrófagos (verde) quanto de células dendríticas (verde) em ambos os grupos. Células CD123⁺/CD68⁺ (A), CD123⁺/BDCA4⁺ (B), CD123⁺/CD1a⁺ (C), CD123⁺/CD11c⁺ (D), CD123⁺/CD209⁺ (E), CD123⁺/CD1b⁺ (F), CD123⁺/CD83⁺ (G), CD123⁺/CD14⁺ (H), CD123⁺/CD86⁺ (I), CD123⁺/BDCA2⁺ (J) e CD123⁺/TLR2⁺ (L) foram encontradas em ambos os grupos, entretanto em maior frequência nas lesões RR L-lep (M). Os asteriscos brancos apontam para epiderme das lesões cutâneas. Os núcleos das células (azul) foram corados com DAPI. Uma análise quantitativa de células duplo-positivas

(densidade de volume - Vv%) foi realizada (M). Os dados são representativos 8 lesões cutâneas de cada grupo. Imagens de imunofluorescência visualizadas e obtidas através do microscópio Colibri da Zeiss. Barra = 50µm. O teste não pareado com correção de Welch foi usado para análise estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ e # $p < 0.001$.

Células CD123⁺ se concentram em áreas de células epitelioides em lesões de pele RR L-lep.

Devido à existência de poucos dados sobre células epitelioides e o fato de monócitos plasmocitoides, cujo marcador fenotípico é o CD123, serem seus potenciais precursores (Crawford et al., 2011), nós caracterizamos as subpopulações de células presentes no granuloma RR L-lep através de ensaios de imunofluorescência, usando CD123 e marcadores de macrófagos e células dendríticas. Células BDCA4⁺/CD123⁺ e BDCA2⁺/CD123⁺ foram encontradas no granuloma RR (Figura 20A e 20B). Confirmando os dados de imunohistoquímica (Figura 17B), nós observamos a ausência de marcação de CD163 nas células CD123⁺ no centro do granuloma, assim como, poucas células CD123⁺ com fraca expressão de CD163 restritas a área periférica (Figura 20C). A colocalização da enzima imunoregulatória IDO com a população CD123⁺ no granuloma, sugere que essas células produzem essa molécula, e, portanto, contribuem para o curso da resposta imune da RR (Figura 20D).



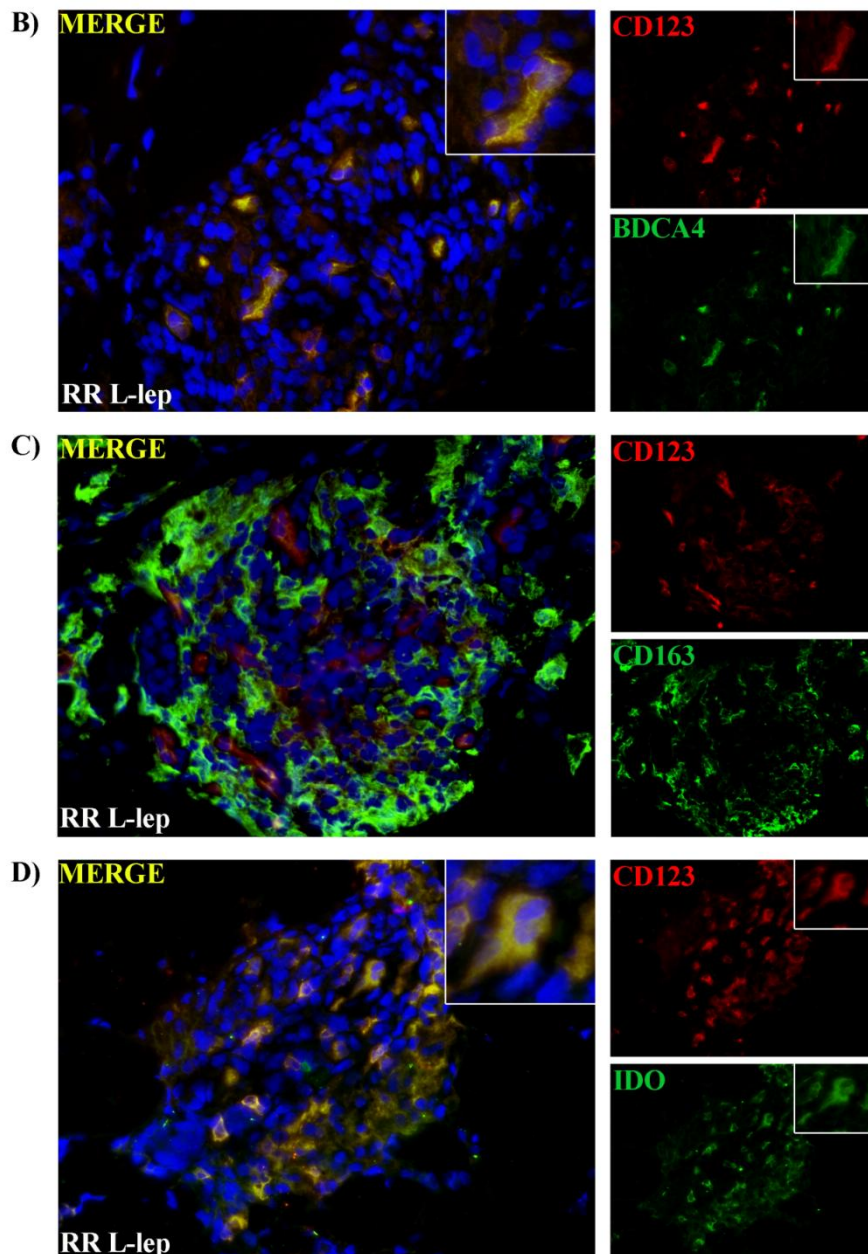


Figura 20: Caracterização das populações CD123⁺ no granuloma de lesões de pele reacionais. Ensaio de imunofluorescência foram realizados para avaliar os marcadores populacionais expressos pelas células CD123⁺ no ambiente do granuloma reacional. A colocalização de CD123 (*vermelho*) com os marcadores BDCA2 e BDCA4 (*verde*), conhecidos como marcadores de células dendríticas, foi observado (A e B). O marcador de macrófago CD163 (*verde*) foi fracamente expresso por células CD123⁺ (*vermelho*) no granuloma, com a positividade para o CD163 restrita a periferia (C). Células CD123⁺ no granuloma também expressam a enzima IDO (*verde*), como mostrado em (D). Os dados mostrados são representativas de 5 amostras dos grupos RR L-lep. Imagens de imunofluorescência visualizadas e obtidas através do microscópio Colibri da Zeiss. Barra =50µm

Em conjunto, esses dados revelaram que a expressão de CD123 se concentra principalmente em células epitelioides na porção central do granuloma de RR, e não na região periférica onde a micobactéria é encontrada (Figura 15H). Já que células epitelioides são consideradas não fagocíticas, é possível que elas contribuam para função do granuloma de uma maneira imunoregulatória, como evidenciada pela expressão de IDO, e, portanto, refletem a nova programação gênica em andamento na RR. Entretanto, nossa análise não é suficiente para chegarmos a essa conclusão, sendo necessária uma investigação mais aprofundada.

Mediadores pró-inflamatórios da RR prevalecem sobre o estado imunossupressor nas lesões de pele L-lep.

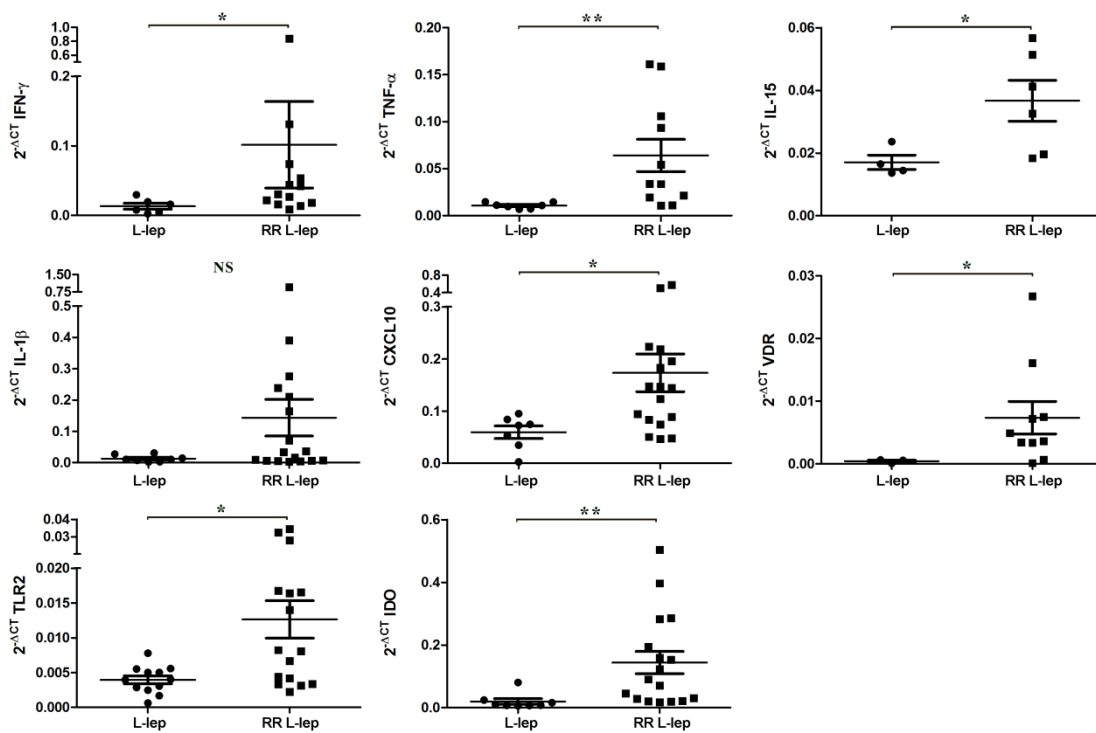
Para desvendar as moléculas envolvidas na ruptura da imunossupressão dos pacientes L-lep no início da RR, a expressão gênica das lesões cutâneas de ambos os grupos foi avaliada por PCR em tempo real. Um aumento na expressão do receptor de vitamina D (VDR) ($p=0,028$), assim como IL-15 ($p=0,0381$) foi verificado em lesões de pele RR L-lep quando comparados com o grupo L-lep (Figura 21A), apontando para a reativação da via de vitamina D nesses pacientes durante o episódio de RR. A citocina Th1, IFN- γ , também estava mais expressa nas lesões RR L-lep ($p=0,0253$) em comparação com as lesões L-lep, juntamente com a quimiocina regulada por IFN- γ , a CXCL10 ($p=0,0188$) (Qi et al., 2009) (Figura 21A).

Além disso, TLR-2, um receptor de imunidade inata que reconhece antígenos micobacterianos (Krutizik et al., 2003), foi expresso em maiores níveis nos pacientes RR L-lep quando comparado com lesões L-lep ($p=0,013$) (Figura 21A). Um aumento de TNF- α foi observado nas lesões reacionais quando comparado aos pacientes que não estavam em RR ($p=0,005$) (Figura 21A). Já a expressão de IL-1 β não apresentou diferença entre os grupos, apesar de alguns pacientes em RR exibirem altos níveis dessa citocina (Figura 21A). Finalmente, os níveis da enzima IDO estavam mais altos no grupo RR L-lep quando comparado com as amostras L-lep ($p=0,0012$) (Figura 21A). A figura 22 mostra a mudança da expressão gênica de cada paciente L-lep antes e no momento da RR, indicando claramente o aumento dos níveis dessas moléculas. Esses dados demonstraram em cada indivíduo o processo de reprogramação gênica no início da RR, indicando o aumento de expressão de moléculas envolvidas em respostas Th1 e mecanismos antimicrobianos, como a IDO ($p=0,0268$), a IL-15 ($p=0,0288$) e o TNF- α ($p=0,0195$).

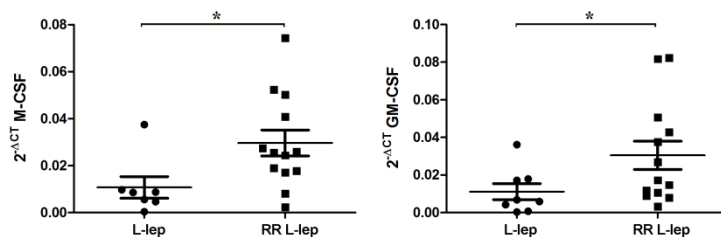
Como observado na Figura 17, a lesão de RR L-lep é caracterizada pela coexistência de populações de macrófagos com perfil funcional M1 e M2. Desse modo, nosso próximo passo foi investigar a expressão de moléculas envolvidas na polarização de macrófagos nos dois grupos

através de PCR em tempo real. Os níveis de GM-CSF ($p=0,0265$) e M-CSF ($p=0,0464$), conhecidos como fatores de diferenciação e indutores de polarização de macrófagos (Lacey et al., 2012) estavam elevados na lesão RR L-lep quando comparados com o grupo L-lep (Figura 21B), justificando a diversidade fenotípica observada na lesão reacional. Por outro lado, a expressão de moléculas consideradas marcadores de macrófagos M2, como o receptor scavenger A (SRA-I) ($p=0,0008$) e PPAR- γ ($p=0,0117$), foi reduzida durante o episódio reacional em comparação com pacientes L-lep, não havendo diferença nos níveis de CD163 (Figura 21C). Esses dados indicaram que mesmo com a presença de macrófagos M1 e M2 na lesão RR L-lep, há uma redução da população M2, sugerindo a reemergência da resposta imune inata contra o ML.

A) Moléculas Pró-inflamatórias



B) Fatores de Polarização de Macrófagos



C) Marcadores Fenotípicos de Macrófagos

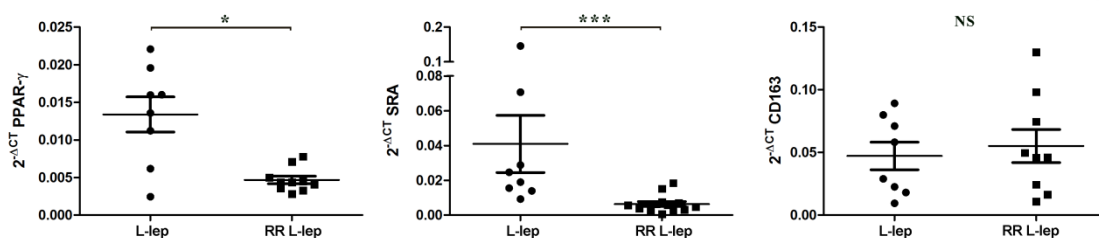


Figura 21: Perfil de expressão gênica em lesões cutâneas L-lep e RR L-lep. Expressão gênica de diversas moléculas inflamatórias avaliada por PCR em tempo real em lesões de pele de pacientes L-lep com e sem RR. Moléculas pró-inflamatórias, como *TNF- α* , *IDO*, *VDR*, *CXCL10*, *TLR2*, *IFN- γ* e *IL-15* foram mais expressas nas lesões de pele reacionais quando comparados ao grupo L-lep (A). Genes envolvidos na polarização de macrófagos M1 e M2 também foram expressos diferencialmente em ambos os grupos. *M-CSF* e *GM-CSF* estavam elevados nas lesões de pele de RR L-lep (B) e os marcadores de macrófagos M2 (*PPAR- γ* e *SRA-I*) foram reduzidos nesses pacientes (C). Nos gráficos, os círculos e os quadrados pretos são representativos de amostras individuais do grupo L-lep e RR L-lep, respectivamente. O teste de Mann-Whitney foi usado para análise estatística. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. NS – não significativo.

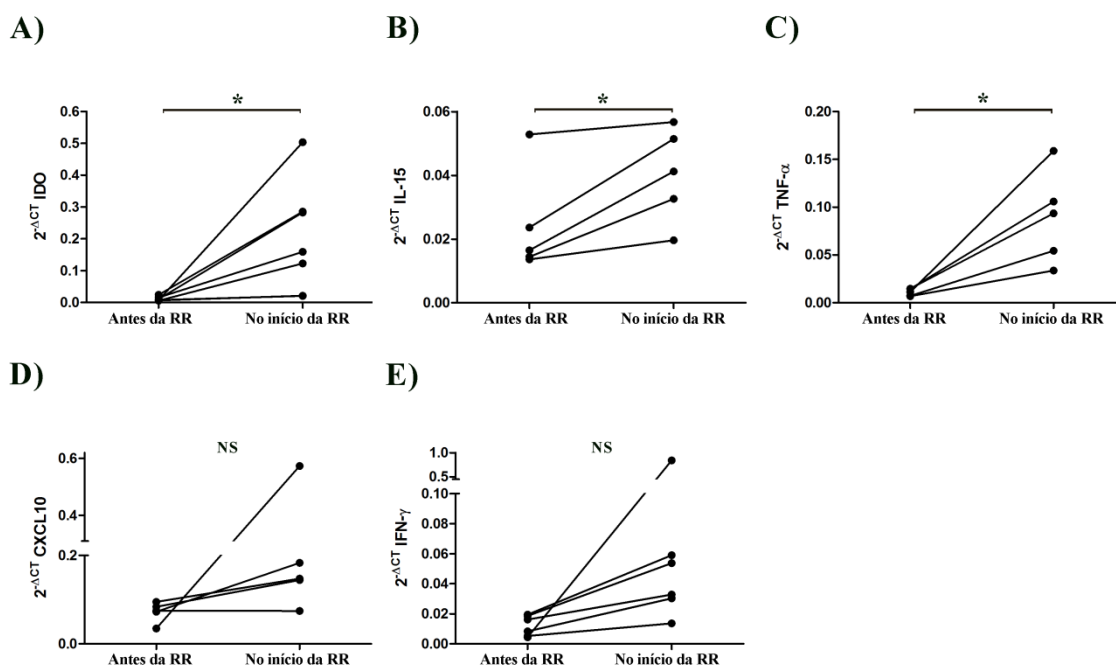


Figura 22: A RR induz um aumento de citocinas Th1 no início do episódio em pacientes L-lep. A expressão gênica de moléculas Th1 em indivíduos L-lep antes e no momento de RR foi avaliada por PCR em tempo real. A expressão gênica de *IDO* (A), *IL15* (B), *TNF- α* (C), *CXCL10* (D) and *IFN- γ* (E) exibiram o mesmo padrão de aumento no início da RR. Os dados são representativos de pelo menos 5 pacientes L-lep que desenvolveram RR. O teste de Wilcoxon foi usado para análise estatística. * $p < 0.05$. NS – não significativo.

O rompimento do estado imunossupressor que ocorre com o início da RR demonstrado pelo perfil descrito acima foi reforçado pela razão dos níveis de expressão de citocinas pró-inflamatórias e IL-10. Apesar de não ter diferença nos níveis de expressão de IL-10 nas lesões de pele entre os dois grupos (Figura 23A), a razão entre a expressão gênica de IL-15 ($p=0,0238$), CXCL10 ($p=0,0013$) e TNF- α ($p=0,0159$) com a IL-10 demonstra que os níveis dessas moléculas excederam os de IL-10 nas lesões reacionais (Figura 23B — D). Isso mostra novamente a reprogramação gênica que ocorre com a emergência da resposta imune. Vale ressaltar que a comparação entre os dados de expressão gênica de pacientes RR L-lep que estavam tomando PQT com aqueles que não estavam ou ainda não tinham sido tratados não apresentou diferença estatística (dados não mostrados), indicando que o tratamento de hanseníase não interferiu com a expressão de moléculas envolvidas na RR.

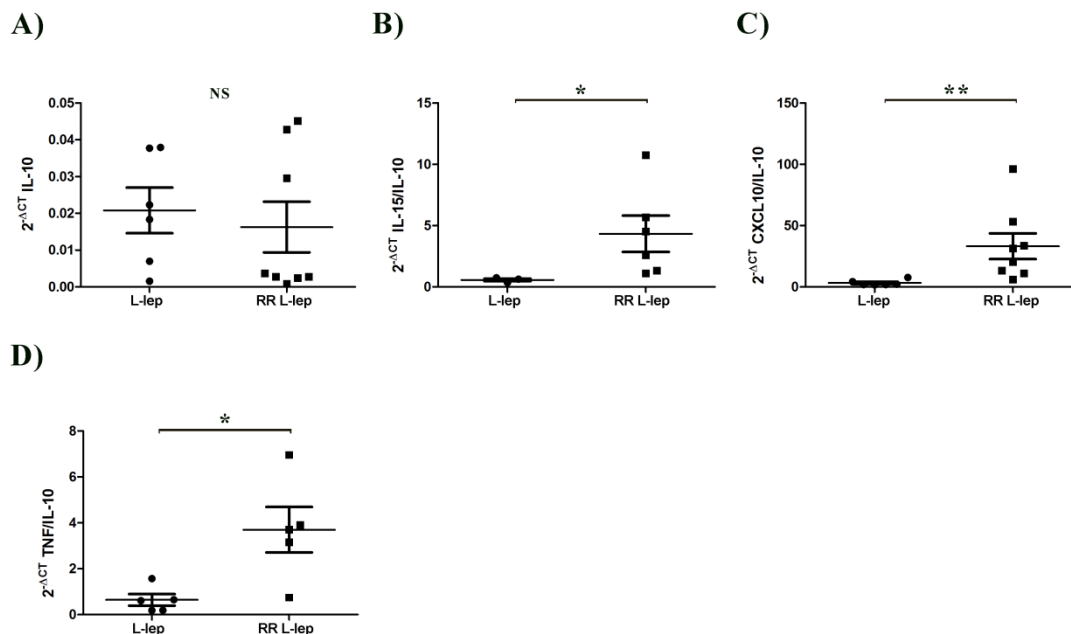


Figura 23: A razão entre citocinas pró-inflamatórias e IL-10 nas lesões cutâneas de pacientes L-lep com e sem RR. A expressão gênica de IL-10 foi avaliada por PCR em tempo real e nenhuma diferença foi observada entre os grupos (A). A razão da expressão gênica de *IL-15/IL-10* (B), *CXCL10/IL-10* (C) and *TNF- α /IL-10* (D) foi maior no grupo RR L-lep quando comparado ao grupo L-lep. Nos gráficos, os círculos e os quadrados pretos são representativos de amostras individuais do grupo L-lep e RR L-lep, respectivamente. O teste de Mann-Whitney foi usado para análise estatística. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$. NS – não significativo.

O padrão de expressão gênica dos mediadores inflamatórios no sangue de pacientes L-lep com ou sem RR contrasta com perfil observado nas lesões de pele.

A discordância entre a gravidade e a sintomatologia clínica sistêmica da RR tem sido amplamente discutida, sugerindo que esse processo apresenta uma baixa repercussão nas redes inflamatórias sistêmicas. Entretanto, altos níveis de citocinas inflamatórias no sangue de pacientes reacionais têm sido reportados, e já que elas não levam ao aparecimento de sintomas sistêmicos, pode-se assumir que elas sejam originalmente produzidas nas lesões (Sarno et al., 1991; Tung et al., 1987; Parida et al., 1992; Stefani et al., 2009). Deste modo, nosso próximo passo foi investigar o padrão de expressão gênica de algumas moléculas previamente avaliadas no sangue total de indivíduos L-lep antes e no momento do episódio reacional pela técnica de PCR em tempo real. Surpreendentemente, a expressão de IDO ($p = 0,0317$) e TNF- α ($p = 0,0043$), duas moléculas expressas em altos níveis na lesão de RR (Figura 21A), estavam mais elevadas no sangue de pacientes L-lep do que nos indivíduos reacionais (Figura 24A e 24B). O mesmo padrão pode ser visto para IFN- γ ($p = 0,0571$), apesar de não haver diferença estatística (Figura 24C).

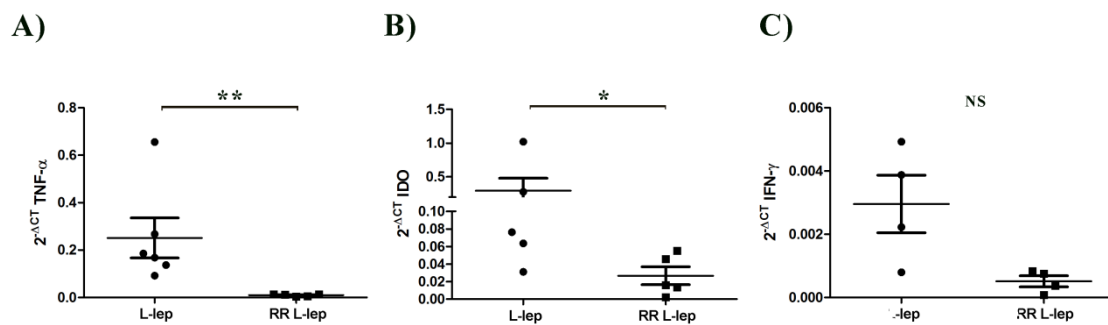


Figura 24: O perfil de expressão gênica no sangue de pacientes L-lep com e sem RR. A expressão gênica de $TNF-\alpha$, IDO e $IFN-\gamma$ foi avaliada por PCR em tempo real em amostras de sangue L-lep e RR L-lep. $TNF-\alpha$ (A) e IDO (B) foram mais expresso no sangue de pacientes L-lep sem RR quando comparados com o grupo reacional. Não foram observadas diferenças estatísticas em relação à expressão de $IFN-\gamma$ (C). Nos gráficos, os círculos e os quadrados pretos são representativos de amostras individuais do grupo L-lep e RR L-lep, respectivamente. O teste de Mann-Whitney foi usado para análise estatística. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$. NS – não significativo.

Esses dados em conjunto com os experimentos anteriores, mostraram que a ativação imune que ocorre no contexto da RR é local e possivelmente mediada por populações celulares que residem ou chegam à lesão cutânea. Ao demonstrar que os padrões de expressão de algumas moléculas encontradas no sangue não correspondem ao encontrado na lesão, nós mostramos que quando se trata da imunologia de hanseníase deve-se ter cuidado ao extrapolar os dados observados em um compartimento para o outro. Entretanto, o significado biológico desse fenômeno e o real impacto no curso da doença requer mais investigação.

VI. DISCUSSÃO

O desenvolvimento da RR em pacientes L-lep é intrigante, não só pela ausência de uma resposta imune direcionada ao ML nas formas BL e LL, mas também pela ocorrência de uma mudança temporária no *status* imunológico desses indivíduos em direção ao polo TT da doença durante esse episódio (Yamamura et al., 1991). Apesar do desenvolvimento de RR nas formas clínicas borderline ser frequente, o aparecimento desse fenômeno nas formas LL subpolares é bastante raro e, provavelmente, afeta uma porção pequena de indivíduos capazes de manter baixos níveis de uma resposta específica contra o ML, os quais são suprimidos durante o curso da infecção (Wade, 1955; Kar & Job, 2005). Portanto, não se pode descartar que em alguns desses pacientes, mesmo apresentando um quadro intenso de anergia imunológica, a imunidade inata pode ser reativada em circunstâncias extraordinárias. No nosso estudo, optamos por incluir somente indivíduos rigorosamente classificados como as formas clínicas BL e LL, com o propósito de excluir qualquer componente tuberculoide da resposta imune desses pacientes.

Recentemente, um amplo espectro de subtipos populacionais de macrófagos e células dendríticas tem sido descrito, atestando a grande variedade fenotípica desses tipos celulares. Entretanto, diversos estudos têm demonstrado a considerável plasticidade dessas células, questionando sua estabilidade, e sugerindo que fatores microambientais ou condições inflamatórias poderiam não somente determinar seus perfis fenotípicos e programação genética, mas também afetar os processos de maturação e diferenciação no tecido (Galli et al., 2011). No episódio reacional ocorre uma liberação repentina de mediadores imunes inflamatórios que prevalecem sobre o estado imunossupressor do paciente, cujas fontes são provavelmente populações celulares residentes da pele, como linfócitos $\gamma\delta$, células NK, macrófagos residentes, subpopulações de células dendríticas e linfócitos T de memória. Todos esses componentes imunes, por sua vez, poderiam ter um papel chave na organização panorâmica da lesão de pele desses pacientes (Galli et al., 2011; Khanolkar-Young et al., 1995; Little et al., 2001; Cooper et al., 1989). Nossos dados revelaram, pela primeira vez, a existência de tipos celulares que expressam CD123 na lesão reacional da hanseníase. Além disso, nós identificamos a presença de diversos fenótipos de macrófagos e células dendríticas na lesão de RR L-lep, sugerindo a ocorrência de um processo de transição no *status* imunológico nos indivíduos desse grupo.

Na avaliação histopatológica, as lesões cutâneas de RR L-lep não exibiram diferenças notáveis entre si, apesar desse grupo ser composto por pacientes com duas formas clínicas distintas (LL e BL). Entretanto, uma mudança drástica foi observada no panorama tecidual na RR em comparação ao padrão observado nas lesões avaliadas no diagnóstico de hanseníase. Uma

intensa infiltração de macrófagos em pacientes BL e LL foi substituída no episódio reacional por granulomas frouxamente estruturados e focos desorganizados de células epitelioides (Figura 15). O aspecto heterogêneo da população de células epitelioides indicam provavelmente níveis diferentes de maturidade e funcionalidade (Figura 16) (Antia & Vanaja, 1997).

Células repletas de lipídios, apesar de frequentes nas lesões L-lep, foram reduzidas a escassos exemplares dispersos pela derme na lesão de pacientes com RR (Figura 15). Esse fato está de acordo com a emergência da resposta imune nesses pacientes, já que as reservas lipídicas têm caráter imunossupressor, sendo foco de produção de eicosanoides, como PGE₂, inibindo a via microbicida da vitamina D e a expressão de moléculas CD1 na diferenciação de células dendríticas (Cruz et al., 2008; Mattos et al., 2010).

As mudanças morfológicas nas lesões cutâneas do grupo RR L-lep foram acompanhadas pela heterogeneidade fenotípica das populações mielomonocíticas. As células epitelioides exibiram tanto marcadores de macrófagos quanto de células dendríticas, aludindo à complexidade desse tipo celular. Essas células encontradas no granuloma exibiram um perfil CD68⁺, CD83⁺, CD209⁺, CD1b⁺, CD11c⁺ e CD123⁺, mas não expressaram CD163 (Figure 17). Dados de imunofluorescência indicaram também que esse tipo celular também expressa BDCA2 e BDCA4, sugerindo que a célula epiteloide exibe características de células dendríticas, já que esses marcadores são adotados para definir células dendríticas plasmocitoides (Figura 20) (Dizionek et al., 2000). Nossos dados demonstraram que células epitelioides da lesão de RR compartilham características fenotípicas com os monócitos plasmocitoides (Fachetti & Vermi, 2002), são provavelmente de origem mielóide como mostrado pela co-expressão de CD11c, mas não expressam o receptor *scavenger* CD163. A ausência de expressão de CD163 pode ser uma das razões pela qual não foram encontrados bacilos nessas células (Figura 15), já que esse receptor auxilia a fagocitose do ML (Moura et al., 2012).

No entanto, o fenótipo dessa população não está bem definido, já que exibiram a expressão de marcadores de dois tipos celulares diferentes. Não se pode descartar a possibilidade de que as células epitelioides sejam um estado de diferenciação alcançado por macrófagos e células dendríticas em um cenário imune específico, contribuindo para formação e função do granuloma. No entanto, mais investigações são necessárias para que possamos estabelecer a real extensão da diversidade da célula epiteloide.

Já está estabelecido que lesões de pele L-lep apresentam um conjunto de moléculas intimamente relacionadas com o estado imunossupressor da doença, como, por exemplo, a grande reserva celular de fosfolipídios, a alta expressão da enzima regulatória IDO e de

receptores *scavenger*, como SRA-I, MARCO, CD36 e CD163 (Cruz et al., 2008; Montoya et al., 2009; de Souza Sales et al., 2011; Moura et al., 2012). Entretanto, quando esses pacientes desenvolvem o episódio reacional, o programa de expressão gênica em curso nessas lesões sofre uma série de alterações em direção ao perfil de resposta Th1, reestabelecendo de maneira limitada a imunidade tecidual. Nossos dados revelam claramente um aumento de expressão de moléculas relacionadas à imunidade inata e adquirida em lesões RR L-lep quando comparadas aos indivíduos L-lep (Figura 21 e 22). A citocina IL-15 e o receptor de vitamina D apresentaram alta expressão nas lesões RR L-lep em comparação com o grupo L-lep, fato que de acordo com Montoya e colaboradores (2009) é essencial para uma resposta microbicida eficiente, podendo ser um dos mecanismos responsáveis pela redução na carga bacilar observada nos indivíduos reacionais (Figura 21). O aumento da expressão de IFN- γ observado em lesões de RR está de acordo com a alta imunidade mediada por células vista nesse episódio, corroborando os dados publicados por Yamamura (1991) (Figura 21). CXCL10, uma quimiocina induzida por IFN- γ , também foi expressa em altos níveis no grupo reacional em comparação com o L-lep, confirmando a associação já descrita dessa molécula com o episódio reacional, tanto no sangue quanto na lesão cutânea (Scollard et al., 2011; Stefani et al., 2009). Tanto a expressão gênica quanto proteica de TLR2 foi encontrada aumentada na RR e, já que esse receptor está envolvido no reconhecimento de ML (Krutzik et al., 2003), essa molécula pode estar envolvida nos eventos iniciais que deflagram a reativação do sistema imune inato nos pacientes L-lep (Figura 17 e 21).

Uma peculiaridade da lesão de RR em pacientes L-lep é a formação do granuloma epitelióide em um ambiente antes tomado completamente por macrófagos espumosos (Figura 15), e no contexto da hanseníase, essa estrutura está associada com as formas clínicas mais resistentes da doença. Portanto, esse estudo reforça a visão do granuloma como uma estrutura protetora (Ramakrishnan et al., 2012). Há fortes evidências que apontam para o TNF- α como uma molécula essencial para formação e manutenção dessa estrutura (Algood et al., 2005; Bean et al., 1999; Chakravarty et al., 2008; Flynn et al., 1995), portanto a maior expressão dessa citocina observada nas lesões reacionais em comparação com o grupo L-lep já era esperada (Figura 21 e 22).

Além disso, os altos níveis de TNF- α e IFN- γ nas lesões de pacientes com RR justifica a elevada expressão gênica de IDO nesse grupo em comparação com as formas L-lep, já que ambas as citocinas podem induzir essa enzima (Robinson et al., 2005). Na hanseníase, muitos mecanismos imunoregulatórios parecem estar associados com o estabelecimento das formas polares da doença, e a via de IDO é apontada como um deles (de Souza Sales et al., 2011). A capacidade da IDO de promover o catabolismo do aminoácido essencial triptofano, pode ser

vista como um mecanismo microbicida que auxilia no controle da carga parasitária nas células hospedeiras (Mackenzie et al., 2007). Entretanto, desde que foi descrito que células dendríticas produtoras deIDO podem induzir anergia em linfócitos T, estudos têm focado no papel imunossupressor dessa enzima (Xu et al., 2008).

Foi sugerido que IDO é umas das principais moléculas indutoras da anergia celular observada no polo LL da hanseníase, já que essas formas exibem uma alta expressão proteica dessa enzima em comparação com lesões de pacientes BT, sendo detectada também uma maior atividade dessa molécula nos soros de indivíduos LL em comparação com pacientes em RR (de Souza Sales et al., 2011). Nossos dados revelaram que uma elevada expressão de IDO, assim como TNF- α , no sangue de indivíduos L-lep quando comparados com o grupo RR L-lep (Figura 24), contrariando o padrão de expressão gênica observado nas lesões de pele, porém justificando os dados anteriores do nosso grupo, que observaram uma maior atividade de IDO e níveis de TNF- α nos soros das formas LL quando comparados com os pacientes reacionais (de Souza Sales et al., 2011).

Até o momento, devido as suas propriedades funcionais opostas, o papel de IDO na resposta imune tem sido controverso, e no contexto de uma doença complexa como a hanseníase, a situação não é diferente (Martiniuk et al., 2012). Talvez, ao se tratar dessa enzima, deve-se levar em consideração o cenário imunológico predominante, e o fato de que essa molécula, quando influenciada por agentes ainda desconhecidos, pode direcionar uma resposta pró-inflamatória ou induzir um estado imunossupressor no ambiente tecidual. Deste modo, nosso estudo sugere que altos níveis de IDO nas formas L-lep, em conjunto com outros mecanismos anti-inflamatórios, levam ao quadro de anergia observado neste polo. Entretanto, a chegada do episódio reacional, por meio de eventos ainda incompreendidos, rompe a barreira imunossupressora e restabelece a resposta imune, e a IDO nesse cenário, funcionaria como um mecanismo microbicida e regulador que agiria na eliminação do bacilo na lesão e no controle da inflamação tecidual.

No nosso estudo, apesar da emergência da resposta imune e aumento de citocinas pró-inflamatórias na lesão de RR, não foi observada diferença na expressão gênica da molécula anti-inflamatória IL-10 entre os grupos avaliados (Figura 23). Em contraste com os nossos dados, outros estudos mostraram um aumento dessa citocina em lesões de pele reacionais em comparação com o grupo controle. Mas, é importante ressaltar que entre os pacientes avaliados nos grupos controle e reacional, havia as formas TT e LL (Andersson et al., 2005; Atkinson et al., 2004).

A razão entre os níveis de citocinas pro-inflamatórias e de IL-10 é considerada um bom indicador da natureza da resposta imune do hospedeiro contra micobactérias (Salina & Morozova, 2004; Jamil et al., 2007; Lima et al., 2000). Nossos dados mostraram que nas lesões de RR a expressão de TNF- α , IL-15 e CXCL10 superam os valores observados para IL-10, indicando a instituição de uma resposta protetora contra o ML, contrapondo a resposta patológica que predominava nos pacientes L-lep, nos quais a expressão de IL-10 foi maior que a dessas outras moléculas (Figura 23).

Macrófagos teciduais, assim como monócitos recém-recrutados, estão sujeitos a uma hierarquia de estados de ativação que garantem a homeostase tissular e previnem constante inflamação juntamente com o desenvolvimento de uma resposta crônica (Murray & Wynn, 2011; Mosser & Edwards, 2008). Dependendo do tipo de condição patológica e o curso da evolução da doença pode-se observar populações de macrófagos M1 e M2, assim como populações que expressam fenótipos mistos ou até únicos (Sica & Mantovani, 2012). Nas lesões RR L-lep, nós identificamos uma grande variedade de fenótipos de macrófagos que apontam para coexistência de populações M1 e M2 no meio do ambiente inflamatório, juntamente com uma ampla diversidade de subpopulações de células dendríticas (Figura 17). Na lesão reacional, observamos um aumento da frequência e variedade de populações de células dendríticas, quando comparamos com as lesões L-lep, o que é um forte indicador da mudança do perfil imune desses pacientes, já que as células dendríticas são extremamente importantes para a resposta mediada por células (Modlin et al., 2010).

Esse panorama heterogêneo observado na lesão de pele reacional pode ser justificado pela elevada expressão de M-CSF e GM-CSF no grupo RR L-lep, quando comparado com as formas L-lep (Figura 21), já que ambos os fatores de crescimento hematopoiéticos podem levar a polarização de macrófagos, e no caso particular do GM-CSF, promover a diferenciação de monócitos em células dendríticas (Schenk et al., 2014; Verreck et al., 2004). Apesar do M-CSF induzir a polarização do fenótipo M2 de macrófagos (Verreck et al., 2004), nossos dados indicam que essa molécula, na lesão de RR, não está envolvida exclusivamente nesse processo, já que nesse grupo a expressão de marcadores fenotípicos da população M2, como SRA-I e PPAR- γ , estava reduzida em comparação aos indivíduos L-lep (Figura 21). Por outro lado, é provável que o GM-CSF esteja envolvido tanto na polarização de macrófagos M1, quanto na diferenciação de subpopulações de células dendríticas na lesão reacional (Sallusto & Lanzavechia, 1994; Verreck et al., 2004).

Um dos dados mais notáveis obtidos nesse estudo foi à observação da expressão exclusiva de IL-3 e da elevada frequência de células CD123⁺ nas lesões cutâneas de RR (Figura 18 e 19). Já que as principais fontes de IL-3 em humanos são linfócitos T ativados e mastócitos, é sugerido que essa citocina age em associação com o processo inflamatório, e, portanto, tem um papel importante no controle das respostas imunes em diversas patologias (Plaut et al., 1989; Niemeyer et al., 1989; Svetic et al., 1993; Hara & Miyajima, 1996). A IL-3 é conhecida como um fator de ativação de macrófagos, aumentando a sua capacidade de reconhecimento e fagocitose (Frendl & Beller, 1990; Frendl et al., 1990; Cardone et al., 2013). Quando em associação com outras citocinas, como IFN- β , a IL-3 pode também promover a diferenciação de monócitos em células dendríticas (Buelens et al., 2002). Além disso, a IL-3 parece estar envolvida em respostas dependentes de linfócitos T, como a hipersensibilidade tardia, já que sua ausência leva à redução do edema e infiltrado inflamatório nas lesões cutâneas avaliadas por Mach e colaboradores (1998).

O papel imunológico de IL-3 também se estende ao endotélio vascular, já que após estimulação com TNF- α , IL-1 β e IFN- γ , essas células aumentam a expressão de subunidades do receptor de IL-3, elevando sua sensibilidade a essa citocina (Korpelainen et al., 1993; 1995). Sobretudo, essa regulação é funcional, já que a IL-3 está envolvida no processo de atração, adesão e transmigração de leucócitos para os sítios inflamatórios (Korpelainen et al., 1993; 1995). Devido ao importante papel do endotélio vascular para inflamação, pode-se dizer que IL-3 favorece a intensificação desse processo, e que uma das consequências da elevada expressão gênica de TNF- α e IFN- γ nas lesões reacionais (Figura 21), seria a ativação de células endoteliais e o aumento de sua sensibilidade a IL-3, intensificando, assim, a resposta inflamatória na pele.

CD123, a subunidade α do complexo do receptor de IL-3, foi mais expresso nas lesões de pele do grupo RR L-lep do que no tecido L-lep, sendo encontrada em populações que expressavam marcadores fenotípicos de macrófagos ou de células dendríticas (Figura 17). Através de ensaios de imunofluorescência, nós mostramos a colocalização de CD123 com CD68, CD83, CD1a, CD14, CD86, TLR2, CD209, CD163, CD11c, BDCA2 e BDCA4 (Figura 19 e 20). O aumento da frequência dessas populações na lesão de pele reacional sugere que as mesmas podem contribuir para as consequências desse episódio. Além disso, nossos dados *in vitro* mostraram que o ML é capaz de induzir a expressão de CD123 em monócitos de sangue humano (Figura 18), o que juntamente com a emergência da resposta imune, pode ser um dos mecanismos responsáveis pela elevada expressão desse receptor nas populações celulares da lesão reacional. Nossas observações foram contraditórias àquelas feitas pelo estudo de

Massone e colaboradores (2010), que mostraram a ausência de células CD123⁺ no grupo de lesões cutâneas de RR. Essa discordância pode ser atribuída não só ao tamanho reduzido da amostra desse estudo, mas também às formas clínicas incluídas no grupo reacional. Além disso, já que aproximadamente 40% dos indivíduos RR L-lep do nosso estudo são da forma LL, uma comparação entre os dois trabalhos não é recomendada.

São necessárias mais investigações para se determinar o papel biológico das células CD123⁺, assim como o da IL-3 nas lesões cutâneas reacionais. E já que a presença de CD131, a subunidade β do complexo do receptor de IL-3, não foi avaliada neste estudo, não podemos afirmar que as células da lesão respondem aos efeitos dessa citocina. No entanto, células CD123⁺ têm sido observadas em muitos modelos de doenças humanas e implicadas na sua patogênese. Macrófagos teciduais que expressam CD123 foram identificados em casos de linfadenite histiocítica necrosante ou doença de Kikuchi-Fujimoto, uma patologia rara que afeta os linfonodos cervicais (Nomura et al., 2009). Essa população de macrófagos também foi encontrada em abundância na lesão de pacientes com hydroa vacciniforme, uma dermatose de fotossensibilidade que acomete crianças (Varughese et al., 2009). Tecidos inflamados de pacientes com lúpus eritematoso, artrite reumatoide e psoríase também exibiram uma alta frequência de células CD123⁺, identificadas nesses casos como células dendríticas plasmocitoides, uma população que vem sendo intimamente relacionada com o desencadeamento dessas doenças (Vermi et al., 2009; Farkas et al., 2001; Van Krinks et al., 2004; Wollenberg et al., 2002; Gilliet et al., 2004). A molécula CD123 também é altamente expressa em casos de leucemia mieloide aguda e leucemia linfoide aguda do tipo B, sendo considerada um marcador para essas neoplasias. Seu papel biológico, no entanto, permanece desconhecido nessas doenças, devido à ausência de CD131 nas populações avaliadas, o que torna a transdução de sinal da IL-3 improvável nessas células (Jordan et al., 2000).

É importante ressaltar que nosso estudo identifica tanto macrófagos quanto células dendríticas como as populações que expressam CD123 na lesão reacional, um grupo extenso que provavelmente inclui várias subpopulações, como a célula dendrítica plasmocitoide, cujo marcador oficial é o CD123, e que após a ativação tem a peculiaridade de produzir grandes quantidades de IFN α/β . Essas citocinas são conhecidas por favorecerem a imunidade mediada por células, incitando a citotoxicidade de células NK e linfócitos T CD8⁺, assim como a secreção de IFN- γ , a diferenciação Th1 e maturação de populações de células dendríticas (Trinchieri et al., 1978; Bandyopadhyay et al., 1986; Agnello et al., 2003; Krug et al., 2004; Dalod et al., 2003; Colonna et al., 2004). No entanto, Teles e colaboradores (2013) descreveram recentemente uma via anti-inflamatória dependente de IFN- β que impugna os efeitos microbicidas do IFN- γ nas

lesões L-lep, contribuindo, portanto, para o quadro de imunossupressão observado neste polo. Além disso, esse estudo observou a redução de expressão gênica de IFN- β em lesões de pele reacionais quando comparadas com lesões LL, o que nos leva a questionar a razão pela qual na lesão de RR há uma alta frequência de células CD123⁺ e baixa produção de IFN- β . Não podemos descartar a existência de um mecanismo de regulação cruzada entre o IFN- β e outras moléculas presentes na lesão, como o TNF- α , já que ambos podem funcionar como vetores opostos em alguns modelos de resposta imune (Ivashkiv, 2003). Já que o TNF- α encontrou-se aumentado na lesão de RR (Figura 21), é possível que tanto a produção, quanto os efeitos supressores do IFN- β estejam sendo oprimidos por essa citocina no tecido durante o episódio inflamatório.

Em síntese, nosso trabalho mostrou pela primeira vez o envolvimento de populações CD123⁺ na lesão de pele de pacientes com hanseníase, ressaltando sua participação no episódio reacional. Além disso, esclarecemos um pouco a complexa diversidade fenotípica das populações celulares da pele durante as condições inflamatórias da RR, apontando um conjunto de moléculas que não só podem participar da resposta imune, mas também influenciar processos de diferenciação e maturação da linhagem mielomonocítica, justificando a alta heterogeneidade observada no microambiente da lesão. Uma investigação mais profunda é necessária para desvendar novas vias de intervenção farmacêutica, que no futuro possam prevenir o desenvolvimento da RR.

VII. CONCLUSÃO

Nossos dados indicam que o microambiente da lesão reacional no grupo L-lep é moldado pela ativação da resposta imune local, que por sua vez, favorece processos de maturação e diferenciação das populações celulares residentes do tecido. A RR altera completamente a organização morfológica da lesão cutânea L-lep, levando ao aparecimento de novas populações celulares com perfis fenotípicos variados. A grande diversidade das células dendríticas e macrófagos encontrados nas lesões reflete a ativação da resposta imune inata local, assim como a reprogramação gênica em curso durante esse episódio (Figura 25).

Em síntese, nosso estudo demonstrou que:

- As mudanças morfológicas na lesão cutânea L-lep no início do episódio reacional são acompanhadas pelo aparecimento de uma variedade fenotípica de populações de células dendríticas e macrófagos organizados ou não em granulomas epitelioides;
- As células epitelioides que surgem nas lesões L-lep durante a RR exibem variados aspectos morfológicos, que refletem seus estágios de desenvolvimento, exibindo também a expressão de marcadores fenotípicos de macrófagos e células dendríticas;
- O episódio reacional aumenta a expressão gênica e proteica de CD123 nas populações de macrófagos e células dendríticas de lesões cutâneas L-lep, o que, juntamente com a presença de IL-3, indica a existência de um mecanismo dependente dessa citocina em curso na RR;
- O episódio reacional leva a uma reprogramação gênica nas lesões L-lep, aumentando a expressão de moléculas envolvidas com uma resposta imune Th1 e com caráter microbicida;
- O perfil de expressão gênica observado no sangue dos pacientes L-lep com ou sem RR não coincide com o padrão encontrado na lesão cutânea, exibindo uma elevada expressão de moléculas Th1, como TNF- α e IDO no sangue de indivíduos L-lep quando comparados com os indivíduos reacionais.

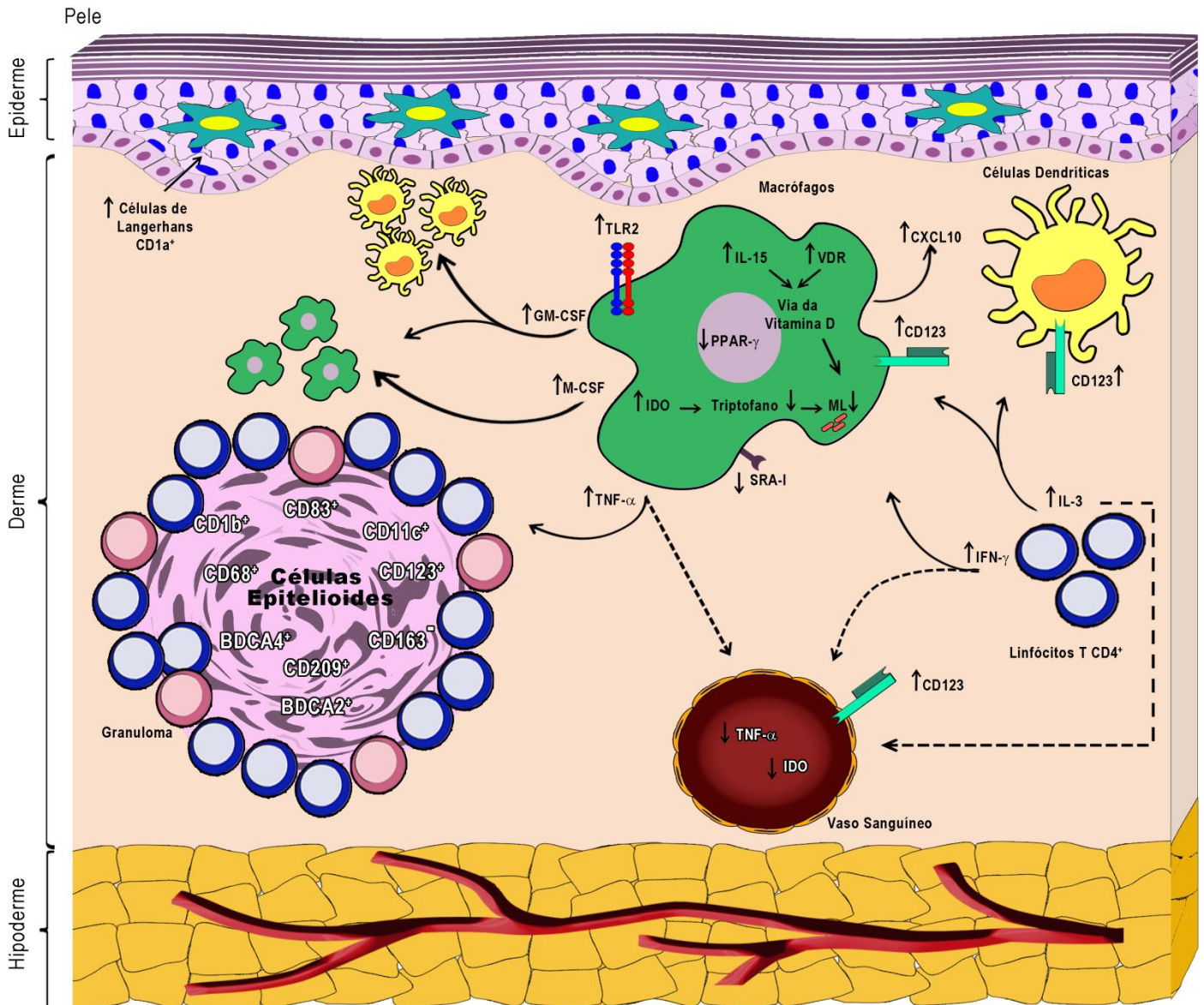


Figura 25: Alterações induzidas pela RR na lesão cutânea L-lep. O episódio reacional leva a inúmeras mudanças no perfil morfológico e gênico nas lesões cutâneas L-lep. Nessas lesões são observadas populações de células epitelioides que expressam marcadores fenotípicos de macrófagos e células dendríticas, e se organizam em granulomas. Além disso, uma grande diversidade de populações de macrófagos e células dendríticas é encontrada, o que possivelmente contribui para o aumento da expressão de moléculas envolvidas na resposta imune inata desse episódio. Os altos níveis de GM-CSF e M-CSF contribuem para essa variedade populacional, já que essas moléculas estão envolvidas com a diferenciação de macrófagos e células dendríticas. O aumento da expressão gênica de IL-15, VDR e IDO contribuem para a capacidade microbicida das APCs e conseqüentemente, para eliminação do ML. O aumento de TNF- α , não só intensifica a ativação de macrófagos, mas também participa da formação e manutenção de granulomas. O IFN- γ , secretado por linfócitos ou células NK, além de aumentar a função efetora das APCs, também leva a produção de CXCL10. A presença de IL-3 nas lesões reacionais, assim como o aumento da expressão de CD123 nas populações de macrófagos e células dendríticas, indica a existência de um mecanismo dependente dessa citocina na RR, com o provável envolvimento do endotélio vascular (setas pontilhadas) (Fonte: elaborado por Andrade, PR, 2014).

VIII. PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente estudo indicou a existência de uma possível via de ativação da resposta imune inflamatória na RR, envolvendo células mielomonocíticas CD123⁺ e o fator de crescimento e diferenciação, IL-3. Entretanto, faz-se necessário uma investigação mais profunda desse mecanismo através de ensaios funcionais *in vitro* com populações celulares sanguíneas e isoladas das lesões cutâneas, submetidas ao estímulo do ML e seus componentes. A ausência de IL-3 no sangue de indivíduos reacionais aponta para possibilidade de que essa citocina é produzida em momento específicos da RR, sendo necessária, portanto, uma avaliação da cinética de expressão dessa molécula durante o curso do episódio.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Adams DO. The granulomatous inflammatory response. A review. *Am J Pathol.* 1976 Jul;84(1):164–92.
2. Agnello D, Lankford CSR, Bream J, Morinobu A, Gadina M, O’Shea JJ, et al. Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J Clin Immunol.* 2003 May;23(3):147–61.
3. Agrawal A, Pandit L, Dalal M, Shetty JP. Neurological manifestations of Hansen’s disease and their management. *Clin Neurol Neurosurg.* 2005 Oct;107(6):445–54.
4. Akagawa KS, Takasuka N, Nozaki Y, Komuro I, Azuma M, Ueda M, et al. Generation of CD1+RelB+ dendritic cells and tartrate-resistant acid phosphatase-positive osteoclast-like multinucleated giant cells from human monocytes. *Blood.* 1996 Nov 15;88(10):4029–39.
5. Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol.* 2001 Aug;2(8):725–31.
6. Algood HMS, Lin PL, Flynn JL. Tumor necrosis factor and chemokine interactions in the formation and maintenance of granulomas in tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 2005 Aug 1;41 Suppl 3:S189–193.
7. Andersen P. Host responses and antigens involved in protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol.* 1997 Feb;45(2):115–31.
8. Andersson AK, Chaduvula M, Atkinson SE, Khanolkar-Young S, Jain S, Suneetha L, et al. Effects of prednisolone treatment on cytokine expression in patients with leprosy type 1 reactions. *Infect Immun.* 2005 Jun;73(6):3725–33.
9. Antia NH, Shetty VP, editors. *The peripheral nerve in leprosy and other neuropathies.* Delhi: Oxford University Press; 1997. 281 p.
10. Arnoldi J, Gerdes J, Flad HD. Immunohistologic assessment of cytokine production of infiltrating cells in various forms of leprosy. *Am J Pathol.* 1990 Oct;137(4):749–53.
11. Atkinson SE, Khanolkar-Young S, Marlowe S, Jain S, Reddy RG, Suneetha S, et al. Detection of IL-13, IL-10, and IL-6 in the leprosy skin lesions of patients during prednisolone treatment for type 1 (T1R) reactions. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2004 Mar;72(1):27–34.
12. Attia EAS, Abdallah M, Saad AA, Afifi A, El Tabbakh A, El-Shennawy D, et al. Circulating CD4+ CD25 high FoxP3+ T cells vary in different clinical forms of leprosy. *Int J Dermatol.* 2010 Oct;49(10):1152–8.
13. Bandyopadhyay S, Perussia B, Trinchieri G, Miller DS, Starr SE. Requirement for HLA-DR+ accessory cells in natural killing of cytomegalovirus-infected fibroblasts. *J Exp Med.* 1986 Jul 1;164(1):180–95.
14. Baniyash M. Chronic inflammation, immunosuppression and cancer: new insights and outlook. *Semin Cancer Biol.* 2006 Feb;16(1):80–8.
15. Basombrio, G.; Prieto, J. G.; Kitamura, K.; Rabello, S. E. A.; Wade, H. W.; Cochraine, R. G.; Khanolkar, V. R.; Latapi, S.; Vegas, M.; Arnold, H. Draft report of classification committee. In: *Congreso Internacional de Leprologia, 6o, Madrid, 1953. Memoria.* Madrid, Gobierno de España. Asociación Internacional de la Lepra, 1953. p. 75-8.
16. Batista MD, Porro AM, Maeda SM, Gomes EE, Yoshioka MCN, Enokihara MMSS, et al. Leprosy reversal reaction as immune reconstitution inflammatory syndrome in patients with AIDS. *Clin Infect Dis.* 2008 Mar 15;46(6):e56–60.

17. Båve U, Magnusson M, Eloranta M-L, Perers A, Alm GV, Rönnblom L. Fc gamma RIIa is expressed on natural IFN-alpha-producing cells (plasmacytoid dendritic cells) and is required for the IFN-alpha production induced by apoptotic cells combined with lupus IgG. *J Immunol.* 2003 Sep 15;171(6):3296–302.
18. Bean AG, Roach DR, Briscoe H, France MP, Korner H, Sedgwick JD, et al. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *J Immunol.* 1999 Mar 15;162(6):3504–11.
19. Beckman EM, Porcelli SA, Morita CT, Behar SM, Furlong ST, Brenner MB. Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells. *Nature.* 1994 Dec 15;372(6507):691–4.
20. Becx-Bleumink M, Berhe D. Occurrence of reactions, their diagnosis and management in leprosy patients treated with multidrug therapy; experience in the leprosy control program of the All Africa Leprosy and Rehabilitation Training Center (ALERT) in Ethiopia. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1992 Jun;60(2):173–84.
21. Bender A, Sapp M, Schuler G, Steinman RM, Bhardwaj N. Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J Immunol Methods.* 1996 Sep 27;196(2):121–35.
22. Benoit M, Desnues B, Mege J-L. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol.* 2008 Sep 15;181(6):3733–9.
23. Bermudez LE, Covaro G, Remington J. Infection of murine macrophages with *Toxoplasma gondii* is associated with release of transforming growth factor beta and downregulation of expression of tumor necrosis factor receptors. *Infect Immun.* 1993 Oct;61(10):4126–30.
24. Berrington WR, Macdonald M, Khadge S, Sapkota BR, Janer M, Hagge DA, et al. Common polymorphisms in the NOD2 gene region are associated with leprosy and its reactive states. *J Infect Dis.* 2010 May 1;201(9):1422–35.
25. Berry MPR, Graham CM, McNab FW, Xu Z, Bloch SAA, Oni T, et al. An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. *Nature.* 2010 Aug 19;466(7309):973–7.
26. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol.* 2007 Jan;81(1):1–5.
27. Blanco P, Palucka AK, Gill M, Pascual V, Banchereau J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. *Science.* 2001 Nov 16;294(5546):1540–3.
28. Blomberg S, Eloranta M-L, Magnusson M, Alm GV, Rönnblom L. Expression of the markers BDCA-2 and BDCA-4 and production of interferon- α by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism.* 2003;48(9):2524–32.
29. Bonasio R, Scimone ML, Schaerli P, Grabie N, Lichtman AH, von Andrian UH. Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. *Nat Immunol.* 2006 Oct;7(10):1092–100.
30. Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:29–63.
31. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science.* 1999 Jul 30;285(5428):732–6.
32. Britton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. *Lancet.* 2004 Apr 10;363(9416):1209–19.
33. Brouck T, Riedinger M, Karjalainen K. Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med.* 1997 Feb 3;185(3):541–50.
34. Buelens C, Bartholomé EJ, Amraoui Z, Boutriaux M, Salmon I, Thielemans K, et al. Interleukin-3 and interferon beta cooperate to induce differentiation of monocytes into

- dendritic cells with potent helper T-cell stimulatory properties. *Blood*. 2002 Feb 1;99(3):993–8.
35. Cardone M, Ikeda KN, Varano B, Belardelli F, Millefiorini E, Gessani S, et al. Opposite regulatory effects of IFN- and IL-3 on C-type lectin receptors, antigen uptake, and phagocytosis in human macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*. 2013 Sep 9;95(1):161–8.
 36. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, et al. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med*. 1994 Oct 1;180(4):1263–72.
 37. Cederbom L, Hall H, Ivars F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol*. 2000 Jun;30(6):1538–43.
 38. Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature*. 1997 Aug 21;388(6644):782–7.
 39. Chaitanya S, Lavania M, Turankar RP, Karri SR, Sengupta U. Increased serum circulatory levels of interleukin 17F in type 1 reactions of leprosy. *J Clin Immunol*. 2012 Dec;32(6):1415–20.
 40. Chakravarty SD, Zhu G, Tsai MC, Mohan VP, Marino S, Kirschner DE, et al. Tumor necrosis factor blockade in chronic murine tuberculosis enhances granulomatous inflammation and disorganizes granulomas in the lungs. *Infect Immun*. 2008 Mar;76(3):916–26.
 41. Chapuis F, Rosenzweig M, Yagello M, Ekman M, Biberfeld P, Gluckman JC. Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *Eur J Immunol*. 1997 Feb;27(2):431–41.
 42. Chomarat P, Dantin C, Bennett L, Banchereau J, Palucka AK. TNF skews monocyte differentiation from macrophages to dendritic cells. *J Immunol*. 2003 Sep 1;171(5):2262–9.
 43. Chung AW, Sieling PA, Schenk M, Teles RMB, Krutzik SR, Hsu DK, et al. Galectin-3 regulates the innate immune response of human monocytes. *J Infect Dis*. 2013 Mar 15;207(6):947–56.
 44. Cogen AL, Walker SL, Roberts CH, Hagge DA, Neupane KD, Khadge S, et al. Human beta-defensin 3 is up-regulated in cutaneous leprosy type 1 reactions. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(11):e1869.
 45. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*. 2001 Feb 22;409(6823):1007–11.
 46. Colonna M, Trinchieri G, Liu Y-J. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol*. 2004 Dec;5(12):1219–26.
 47. Congreso Internacional de Leprologia, 6, Madrid, 1953. Memoria. Madrid: Asociacion Internacional de La Lepra, 1953
 48. Cooper CL, Mueller C, Sinchaisri TA, Pirmez C, Chan J, Kaplan G, et al. Analysis of naturally occurring delayed-type hypersensitivity reactions in leprosy by in situ hybridization. *J Exp Med*. 1989 May 1;169(5):1565–81.
 49. Correa RG, Milutinovic S, Reed JC. Roles of NOD1 (NLRC1) and NOD2 (NLRC2) in innate immunity and inflammatory diseases. *Biosci Rep*. 2012 Dec;32(6):597–608.
 50. Crawford CL, Hardwicke PMD. Experimental leprosy: a model of epithelioid cell granuloma. *Int J Dermatol*. 2011 Mar;50(3):255–61.
 51. Cruz D, Watson AD, Miller CS, Montoya D, Ochoa M-T, Sieling PA, et al. Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy. *J Clin Invest*. 2008 Aug;118(8):2917–28.

52. D'Amico A, Wu L. The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. *J Exp Med*. 2003 Jul 21;198(2):293–303.
53. Da Motta-Passos I, Malheiro A, Gomes Naveca F, de Souza Passos LF, Ribeiro De Barros Cardoso C, da Graça Souza Cunha M, et al. Decreased RNA expression of interleukin 17A in skin of leprosy. *Eur J Dermatol*. 2012 Aug;22(4):488–94.
54. Dalod M, Hamilton T, Salomon R, Salazar-Mather TP, Henry SC, Hamilton JD, et al. Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta. *J Exp Med*. 2003 Apr 7;197(7):885–98.
55. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol*. 2013 Oct;14(10):986–95.
56. Davis JM, Clay H, Lewis JL, Ghori N, Herbomel P, Ramakrishnan L. Real-time visualization of mycobacterium-macrophage interactions leading to initiation of granuloma formation in zebrafish embryos. *Immunity*. 2002 Dec;17(6):693–702.
57. De Oliveira AL, Amadeu TP, de França Gomes AC, Menezes VM, da Costa Nery JA, Pinheiro RO, et al. Role of CD8(+) T cells in triggering reversal reaction in HIV/leprosy patients. *Immunology*. 2013 Sep;140(1):47–60.
58. De Oliveira Fulco T, Andrade PR, de Mattos Barbosa MG, Pinto TGT, Ferreira PF, Ferreira H, et al. Effect of apoptotic cell recognition on macrophage polarization and mycobacterial persistence. *Infect Immun*. 2014 Sep;82(9):3968–78.
59. De Souza Sales J, Lara FA, Amadeu TP, de Oliveira Fulco T, da Costa Nery JA, Sampaio EP, et al. The role of indoleamine 2, 3-dioxygenase in lepromatous leprosy immunosuppression. *Clin Exp Immunol*. 2011 Aug;165(2):251–63.
60. De Vos R, De Wolf-Peeters C, Facchetti F, Desmet V. Plasmacytoid monocytes in epithelioid cell granulomas: ultrastructural and immunoelectron microscopic study. *Ultrastruct Pathol*. 1990 Aug;14(4):291–302.
61. Desikan KV. Viability of *Mycobacterium leprae* outside the human body. *Lepr Rev*. 1977 Dec;48(4):231–5.
62. Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med*. 2001 Jan 15;193(2):233–8.
63. Dubsky P, Saito H, Leogier M, Dantin C, Connolly JE, Banchereau J, et al. IL-15-induced human DC efficiently prime melanoma-specific naive CD8+ T cells to differentiate into CTL. *Eur J Immunol*. 2007 Jun;37(6):1678–90.
64. Dupasquier M, Stoitzner P, van Oudenaren A, Romani N, Leenen PJM. Macrophages and dendritic cells constitute a major subpopulation of cells in the mouse dermis. *J Invest Dermatol*. 2004 Nov;123(5):876–9.
65. Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol*. 2000 Dec 1;165(11):6037–46.
66. Dzionek A, Inagaki Y, Okawa K, Nagafune J, Röck J, Sohma Y, et al. Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Hum Immunol*. 2002 Dec;63(12):1133–48.
67. Dzionek A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, et al. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med*. 2001 Dec 17;194(12):1823–34.
68. Eichelmann K, González González SE, Salas-Alanis JC, Ocampo-Candiani J. Leprosy. An update: definition, pathogenesis, classification, diagnosis, and treatment. *Actas Dermosifiliogr*. 2013 Sep;104(7):554–63.
69. Epstein WL. Granuloma formation in man. *Pathobiol Annu*. 1977;7:1–30.

70. Ermland K, Wüthrich M, Klein BS. Dynamic interplay among monocyte-derived, dermal, and resident lymph node dendritic cells during the generation of vaccine immunity to fungi. *Cell Host Microbe*. 2010 Jun 25;7(6):474–87.
71. Erwig L-P, Henson PM. Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ*. 2008 Feb;15(2):243–50.
72. Ezekowitz RA, Gordon S. Alterations of surface properties by macrophage activation: expression of receptors for Fc and mannose-terminal glycoproteins and differentiation antigens. *Contemp Top Immunobiol*. 1984;13:33–56.
73. Fabriek BO, van Bruggen R, Deng DM, Ligtenberg AJM, Nazmi K, Schornagel K, et al. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood*. 2009 Jan 22;113(4):887–92.
74. Facchetti F, Candiago E, Vermi W. Plasmacytoid monocytes express IL3-receptor alpha and differentiate into dendritic cells. *Histopathology*. 1999 Jul;35(1):88–9.
75. Facchetti F, De Wolf-Peeters C, De Vos R, van den Oord JJ, Pulford KA, Desmet VJ. Plasmacytoid monocytes (so-called plasmacytoid T cells) in granulomatous lymphadenitis. *Hum Pathol*. 1989 Jun;20(6):588–93.
76. Facchetti F, Vermi W. [Plasmacytoid monocytes and plasmacytoid dendritic cells. Immune system cells linking innate and acquired immunity]. *Pathologica*. 2002 Aug;94(4):163–75.
77. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003 Dec;4(12):1206–12.
78. Farkas L, Beiske K, Lund-Johansen F, Brandtzaeg P, Jahnsen FL. Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon- alpha/beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. *Am J Pathol*. 2001 Jul;159(1):237–43.
79. Ferracini M, Rios FJO, Pecenin M, Jancar S. Clearance of Apoptotic Cells by Macrophages Induces Regulatory Phenotype and Involves Stimulation of CD36 and Platelet-Activating Factor Receptor. *Mediators of Inflammation*. 2013 Nov 20;2013:e950273.
80. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, et al. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity*. 1995 Jun;2(6):561–72.
81. Fogg DK, Sibon C, Miled C, Jung S, Aucouturier P, Littman DR, et al. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science*. 2006 Jan 6;311(5757):83–7.
82. Forrester JV, Xu H, Kuffová L, Dick AD, McMenamin PG. Dendritic cell physiology and function in the eye. *Immunol Rev*. 2010 Mar;234(1):282–304.
83. Foss NT. Aspectos imunológicos da hanseníase. *Medicina (Ribeirão Preto)*. 1997 Sep; 30(3):335–339.
84. Frendl G, Beller DI. Regulation of macrophage activation by IL-3. I. IL-3 functions as a macrophage-activating factor with unique properties, inducing Ia and lymphocyte function-associated antigen-1 but not cytotoxicity. *J Immunol*. 1990 May 1;144(9):3392–9.
85. Frendl G, Fenton MJ, Beller DI. Regulation of macrophage activation by IL-3. II. IL-3 and lipopolysaccharide act synergistically in the regulation of IL-1 expression. *J Immunol*. 1990 May 1;144(9):3400–10.
86. Fulco TO, Lopes UG, Sarno EN, Sampaio EP, Saliba AM. The proteasome function is required for *Mycobacterium leprae*-induced apoptosis and cytokine secretion. *Immunol Lett*. 2007 May 15;110(1):82–5.
87. Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol*. 2011 Nov;12(11):1035–44.
88. Gallo MEN, Sampaio E, Nery JAC, Moraes MO, Antunes SLG, Pessolani MCV et al. Hanseníase: aspectos epidemiológicos, clínicos e imunológicos. In: Coura JR, editor.

- Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Editora; 2005. p.1383-1394.
89. García VE, Sieling PA, Gong J, Barnes PF, Uyemura K, Tanaka Y, et al. Single-cell cytokine analysis of gamma delta T cell responses to nonpeptide mycobacterial antigens. *J Immunol.* 1997 Aug 1;159(3):1328–35.
 90. García VE, Uyemura K, Sieling PA, Ochoa MT, Morita CT, Okamura H, et al. IL-18 promotes type 1 cytokine production from NK cells and T cells in human intracellular infection. *J Immunol.* 1999 May 15;162(10):6114–21.
 91. Garcia Vidal C, Rodríguez Fernández S, Martínez Lacasa J, Salavert M, Vidal R, Rodríguez Carballeira M, et al. Paradoxical response to antituberculous therapy in infliximab-treated patients with disseminated tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 2005 Mar 1;40(5):756–9.
 92. Geissmann F, Gordon S, Hume DA, Mowat AM, Randolph GJ. Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2010 Jun;10(6):453–60.
 93. Geissmann F, Revy P, Brousse N, Lepelletier Y, Folli C, Durandy A, et al. Retinoids regulate survival and antigen presentation by immature dendritic cells. *J Exp Med.* 2003 Aug 18;198(4):623–34.
 94. Geissmann F, Revy P, Regnault A, Lepelletier Y, Dy M, Brousse N, et al. TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J Immunol.* 1999 Apr 15;162(8):4567–75.
 95. Gilliet M, Conrad C, Geiges M, Cozzio A, Thürlimann W, Burg G, et al. Psoriasis triggered by toll-like receptor 7 agonist imiquimod in the presence of dermal plasmacytoid dendritic cell precursors. *Arch Dermatol.* 2004 Dec;140(12):1490–5.
 96. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem.* 2003 Mar 14;278(11):8869–72.
 97. Godal T, Lofgren M, Negassi K. Immune response to *M. leprae* of healthy leprosy contacts. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1972 Sep;40(3):243–50.
 98. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol.* 1997 Oct;74(2):111–22.
 99. Gómez-Valero L, Rocha EPC, Latorre A, Silva FJ. Reconstructing the ancestor of *Mycobacterium leprae*: the dynamics of gene loss and genome reduction. *Genome Res.* 2007 Aug;17(8):1178–85.
 100. Gonzalez-Rey E, Chorny A, Fernandez-Martin A, Ganea D, Delgado M. Vasoactive intestinal peptide generates human tolerogenic dendritic cells that induce CD4 and CD8 regulatory T cells. *Blood.* 2006 May 1;107(9):3632–8.
 101. Goodnow CC, Sprent J, Fazekas de St Groth B, Vinuesa CG. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature.* 2005 Jun 2;435(7042):590–7.
 102. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity.* 2010 May 28;32(5):593–604.
 103. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005 Dec;5(12):953–64.
 104. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003 Jan;3(1):23–35.
 105. Gorelik L, Constant S, Flavell RA. Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J Exp Med.* 2002 Jun 3;195(11):1499–505.
 106. Gorelik L, Fields PE, Flavell RA. Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression. *J Immunol.* 2000 Nov 1;165(9):4773–7.
 107. Goulart IM, Figueiredo F, Coimbra T, Foss NT. Detection of transforming growth factor-beta 1 in dermal lesions of different clinical forms of leprosy. *Am J Pathol.* 1996 Mar;148(3):911–7.

108. Goulart IMB, Penna GO, Cunha G. [Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002 Aug;35(4):365–75.
109. Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Calcinaro F, Falorni A, et al. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol*. 2002 Nov;3(11):1097–101.
110. Guiducci C, Ghirelli C, Marloie-Provost M-A, Matray T, Coffman RL, Liu Y-J, et al. PI3K is critical for the nuclear translocation of IRF-7 and type I IFN production by human plasmacytoid dendritic cells in response to TLR activation. *J Exp Med*. 2008 Feb 18;205(2):315–22.
111. Guiducci C, Gong M, Xu Z, Gill M, Chaussabel D, Meeker T, et al. TLR recognition of self nucleic acids hampers glucocorticoid activity in lupus. *Nature*. 2010 Jun 17;465(7300):937–41.
112. Williams M, Bruhns P, Saeys Y, Hammad H, Lambrecht BN. The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2014 Feb;14(2):94–108.
113. Han YP, Tuan TL, Wu H, Hughes M, Garner WL. TNF-α stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(κ)B mediated induction of MT1-MMP. *J Cell Sci*. 2001 Jan;114(Pt 1):131–9.
114. Hara T, Miyajima A. Function and signal transduction mediated by the interleukin 3 receptor system in hematopoiesis. *Stem Cells*. 1996 Nov;14(6):605–18.
115. Hastings RC, Brand PW, Mansfield RE, Ebner JD. Bacterial density in the skin in lepromatous leprosy as related to temperature. *Lepr Rev*. 1968 Apr;39(2):71–4.
116. Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med*. 2001 Sep 17;194(6):769–79.
117. Heath WR, Carbone FR. The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells. *Nat Immunol*. 2013 Oct;14(10):978–85.
118. Hernandez MO, Neves I, Sales JS, Carvalho DS, Sarno EN, Sampaio EP. Induction of apoptosis in monocytes by *Mycobacterium leprae* in vitro: a possible role for tumour necrosis factor-α. *Immunology*. 2003 May;109(1):156–64.
119. Heufler C, Koch F, Stanzl U, Topar G, Wysocka M, Trinchieri G, et al. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-γ production by T helper 1 cells. *Eur J Immunol*. 1996 Mar;26(3):659–68.
120. Hibbs JB Jr. Infection and nitric oxide. *J Infect Dis*. 2002 Feb 15;185 Suppl 1:S9–17.
121. Houot R, Perrot I, Garcia E, Durand I, Lebecque S. Human CD4+CD25^{high} regulatory T cells modulate myeloid but not plasmacytoid dendritic cells activation. *J Immunol*. 2006 May 1;176(9):5293–8.
122. Hussain T. Leprosy and tuberculosis: an insight-review. *Crit Rev Microbiol*. 2007;33(1):15–66.
123. Iliopoulos A, Psathakis K, Aslanidis S, Skagias L, Sfikakis PP. Tuberculosis and granuloma formation in patients receiving anti-TNF therapy. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2006 May;10(5):588–90.
124. Ivashkiv LB. Type I interferon modulation of cellular responses to cytokines and infectious pathogens: potential role in SLE pathogenesis. *Autoimmunity*. 2003 Dec;36(8):473–9.
125. Jamil B, Shahid F, Hasan Z, Nasir N, Razzaki T, Dawood G, et al. Interferon γ/IL10 ratio defines the disease severity in pulmonary and extra pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2007 Jul;87(4):279–87.
126. Jego G, Palucka AK, Blanck J-P, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity*. 2003 Aug;19(2):225–34.

127. Jenkins SJ, Ruckerl D, Cook PC, Jones LH, Finkelman FD, van Rooijen N, et al. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science*. 2011 Jun 10;332(6035):1284–8.
128. Jiang A, Bloom O, Ono S, Cui W, Unternaehrer J, Jiang S, et al. Disruption of E-cadherin-mediated adhesion induces a functionally distinct pathway of dendritic cell maturation. *Immunity*. 2007 Oct;27(4):610–24.
129. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med*. 2000 Nov 6;192(9):1213–22.
130. Jordan CT, Upchurch D, Szilvassy SJ, Guzman ML, Howard DS, Pettigrew AL, et al. The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia*. 2000 Oct;14(10):1777–84.
131. Kar BR, Job CK. Reversal reaction and Mitsuda conversion in polar lepromatous leprosy: a case report. *Lepr Rev*. 2005 Sep;76(3):258–62.
132. Karsunky H, Merad M, Cozzio A, Weissman IL, Manz MG. Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. *J Exp Med*. 2003 Jul 21;198(2):305–13.
133. Katz SI, Tamaki K, Sachs DH. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature*. 1979 Nov 15;282(5736):324–6.
134. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*. 2010 May;11(5):373–84.
135. Khanolkar-Young S, Rayment N, Brickell PM, Katz DR, Vinayakumar S, Colston MJ, et al. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) synthesis is associated with the skin and peripheral nerve pathology of leprosy reversal reactions. *Clin Exp Immunol*. 1995 Feb;99(2):196–202.
136. Kiertscher SM, Roth MD. Human CD14+ leukocytes acquire the phenotype and function of antigen-presenting dendritic cells when cultured in GM-CSF and IL-4. *J Leukoc Biol*. 1996 Feb;59(2):208–18.
137. Kiszewski AE, Becerril E, Aguilar LD, Kader ITA, Myers W, Portaels F, et al. The local immune response in ulcerative lesions of Buruli disease. *Clin Exp Immunol*. 2006 Mar;143(3):445–51.
138. Kiszewski AEC, Becerril E, Baquera J, Ruiz-Maldonado R, Hernández Pando R. Expression of cyclooxygenase type 2 in lepromatous and tuberculoid leprosy lesions. *Br J Dermatol*. 2003 Apr;148(4):795–8.
139. Komagata Y, Weiner HL. Oral tolerance. *Rev Immunogenet*. 2000;2(1):61–73.
140. Korpelainen EI, Gamble JR, Smith WB, Dottore M, Vadas MA, Lopez AF. Interferon-gamma upregulates interleukin-3 (IL-3) receptor expression in human endothelial cells and synergizes with IL-3 in stimulating major histocompatibility complex class II expression and cytokine production. *Blood*. 1995 Jul 1;86(1):176–82.
141. Korpelainen EI, Gamble JR, Smith WB, Goodall GJ, Qiyu S, Woodcock JM, et al. The receptor for interleukin 3 is selectively induced in human endothelial cells by tumor necrosis factor alpha and potentiates interleukin 8 secretion and neutrophil transmigration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993 Dec 1;90(23):11137–41.
142. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*. 2001 Jan 11;409(6817):198–201.
143. Krug A, French AR, Barchet W, Fischer JAA, Dzionek A, Pingel JT, et al. TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity*. 2004 Jul;21(1):107–19.
144. Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med*. 2003 May;9(5):525–32.

145. Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE, et al. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat Med*. 2005 Jun;11(6):653–60.
146. Kumar B, Dogra S, Kaur I. Epidemiological characteristics of leprosy reactions: 15 years experience from north India. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 2004 Jun;72(2):125–33.
147. Kumar S, Naqvi RA, Ali R, Rani R, Khanna N, Rao DN. CD4+CD25+ T regs with acetylated FoxP3 are associated with immune suppression in human leprosy. *Mol Immunol*. 2013 Dec;56(4):513–20.
148. Kumar S, Naqvi RA, Bhat AA, Rani R, Ali R, Agnihotri A, et al. IL-10 production from dendritic cells is associated with DC SIGN in human leprosy. *Immunobiology*. 2013 Dec;218(12):1488–96.
149. Kushwah R, Hu J. Role of dendritic cells in the induction of regulatory T cells. *Cell Biosci*. 2011;1(1):20.
150. Laal S, Mishra RS, Nath I. Type 1 reactions in leprosy--heterogeneity in T-cell functions related to the background leprosy type. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1987 Sep;55(3):481–93.
151. Lacey DC, Achuthan A, Fleetwood AJ, Dinh H, Roiniotis J, Scholz GM, et al. Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models. *J Immunol*. 2012 Jun 1;188(11):5752–65.
152. Lambotin M, Raghuraman S, Stoll-Keller F, Baumert TF, Barth H. A look behind closed doors: interaction of persistent viruses with dendritic cells. *Nat Rev Micro*. 2010 Apr 7;8(5):350–60.
153. Lee DJ, Sieling PA, Ochoa MT, Krutzik SR, Guo B, Hernandez M, et al. LILRA2 activation inhibits dendritic cell differentiation and antigen presentation to T cells. *J Immunol*. 2007 Dec 15;179(12):8128–36.
154. Lienhardt C, Fine PE. Type 1 reaction, neuritis and disability in leprosy. What is the current epidemiological situation? *Lepr Rev*. 1994 Mar;65(1):9–33.
155. Lima MCBS, Pereira GMB, Rumjanek FD, Gomes HM, Duppre N, Sampaio EP, et al. Immunological Cytokine Correlates of Protective Immunity and Pathogenesis in Leprosy. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2000;51(4):419–28.
156. Little D, Khanolkar-Young S, Coulthart A, Suneetha S, Lockwood DN. Immunohistochemical analysis of cellular infiltrate and gamma interferon, interleukin-12, and inducible nitric oxide synthase expression in leprosy type 1 (reversal) reactions before and during prednisolone treatment. *Infect Immun*. 2001 May;69(5):3413–7.
157. Liu K, Nussenzweig MC. Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev*. 2010 Mar;234(1):45–54.
158. Liu K, Victora GD, Schwickert TA, Guermonprez P, Meredith MM, Yao K, et al. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science*. 2009 Apr 17;324(5925):392–7.
159. Liu PT, Wheelwright M, Teles R, Komisopoulou E, Edfeldt K, Ferguson B, et al. MicroRNA-21 targets the vitamin D-dependent antimicrobial pathway in leprosy. *Nat Med*. 2012 Feb;18(2):267–73.
160. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402–8.
161. Lockwood DNJ, Colston MJ, Khanolkar-Young SR. The detection of *Mycobacterium leprae* protein and carbohydrate antigens in skin and nerve from leprosy patients with type 1 (reversal) reactions. *Am J Trop Med Hyg*. 2002 Apr;66(4):409–15.
162. Lockwood DNJ, Lucas SB, Desikan KV, Ebenezer G, Suneetha S, Nicholls P. The histological diagnosis of leprosy type 1 reactions: identification of key variables and an analysis of the process of histological diagnosis. *J Clin Pathol*. 2008 May;61(5):595–600.
163. Lockwood DNJ, Sarno E, Smith WC. Classifying leprosy patients--searching for the perfect solution? *Lepr Rev*. 2007 Dec;78(4):317–20.

164. Lockwood DNJ, Suneetha L, Sagili KD, Chaduvula MV, Mohammed I, van Brakel W, et al. Cytokine and protein markers of leprosy reactions in skin and nerves: baseline results for the North Indian INFIR cohort. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Dec;5(12):e1327.
165. London A, Itskovich E, Benhar I, Kalchenko V, Mack M, Jung S, et al. Neuroprotection and progenitor cell renewal in the injured adult murine retina requires healing monocyte-derived macrophages. *J Exp Med*. 2011 Jan 17;208(1):23–39.
166. Lopez-Castejón G, Baroja-Mazo A, Pelegrín P. Novel macrophage polarization model: from gene expression to identification of new anti-inflammatory molecules. *Cell Mol Life Sci*. 2011 Sep;68(18):3095–107.
167. Luft T, Pang KC, Thomas E, Hertzog P, Hart DN, Trapani J, et al. Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells. *J Immunol*. 1998 Aug 15;161(4):1947–53.
168. Mach N, Lantz CS, Galli SJ, Reznikoff G, Mihm M, Small C, et al. Involvement of interleukin-3 in delayed-type hypersensitivity. *Blood*. 1998 Feb 1;91(3):778–83.
169. Mackaness GB. Cellular immunity and the parasite. *Adv Exp Med Biol*. 1977;93:65–73.
170. MacKenzie CR, Heseler K, Müller A, Däubener W. Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in antimicrobial defence and immuno-regulation: tryptophan depletion versus production of toxic kynurenines. *Curr Drug Metab*. 2007 Apr;8(3):237–44.
171. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:323–50.
172. Mahnke K, Qian Y, Knop J, Enk AH. Induction of CD4+/CD25+ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. *Blood*. 2003 Jun 15;101(12):4862–9.
173. Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc*. 2003 Dec;75(4):469–86.
174. Manfredi AA, Capobianco A, Bianchi ME, Rovere-Querini P. Regulation of dendritic- and T-cell fate by injury-associated endogenous signals. *Crit Rev Immunol*. 2009;29(1):69–86.
175. Manicassamy S, Pulendran B. Dendritic cell control of tolerogenic responses. *Immunol Rev*. 2011 May;241(1):206–27.
176. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004 Dec;25(12):677–86.
177. Mantovani B, Rabinovitch M, Nussenzweig V. Phagocytosis of immune complexes by macrophages. Different roles of the macrophage receptor sites for complement (C3) and for immunoglobulin (IgG). *J Exp Med*. 1972 Apr 1;135(4):780–92.
178. Margoles L, Río C del, Franco-Paredes C. Leprosy: a modern assessment of an ancient neglected disease. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*. 2011 Apr;68(2):120–126.
179. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*. 2014;6:13.
180. Martín-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A, et al. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol*. 2004 Dec;5(12):1260–5.
181. Martiniuk F, Giovinnazzo J, Tan AU, Shahidullah R, Haslett P, Kaplan G, et al. Lessons of leprosy: the emergence of TH17 cytokines during type II reactions (ENL) is teaching us about T-cell plasticity. *J Drugs Dermatol*. 2012 May;11(5):626–30.
182. Massone C, Nunzi E, Ribeiro-Rodrigues R, Talhari C, Talhari S, Schettini APM, et al. T regulatory cells and plasmacytoid dendritic cells in hansen disease: a new insight into pathogenesis? *Am J Dermatopathol*. 2010 May;32(3):251–6.
183. Matsue H, Takashima A. Apoptosis in dendritic cell biology. *J Dermatol Sci*. 1999 Jul;20(3):159–71.

184. Matsui T, Connolly JE, Michnevitz M, Chaussabel D, Yu C-I, Glaser C, et al. CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions. *J Immunol*. 2009 Jun 1;182(11):6815–23.
185. Mattos KA, D'Avila H, Rodrigues LS, Oliveira VGC, Sarno EN, Atella GC, et al. Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *J Leukoc Biol*. 2010 Mar;87(3):371–84.
186. Mattos KA, Oliveira VGC, D'Avila H, Rodrigues LS, Pinheiro RO, Sarno EN, et al. TLR6-driven lipid droplets in *Mycobacterium leprae*-infected Schwann cells: immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence. *J Immunol*. 2011 Sep 1;187(5):2548–58.
187. McCaughy TM, Baldwin TA, Wilken MS, Hogquist KA. Clonal deletion of thymocytes can occur in the cortex with no involvement of the medulla. *J Exp Med*. 2008 Oct 27;205(11):2575–84.
188. McCawley LJ, Matrisian LM. Tumor progression: defining the soil round the tumor seed. *Curr Biol*. 2001 Jan 9;11(1):R25–27.
189. Menezes VM, Sales AM, Illarramendi X, Miranda A, Gonçalves Morgado M, Gutierrez-Galhardo MC, et al. Leprosy reaction as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome: a case series of a Brazilian cohort. *AIDS*. 2009 Mar 13;23(5):641–3.
190. Miller JF, Morahan G. Peripheral T cell tolerance. *Annu Rev Immunol*. 1992;10:51–69.
191. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*. 2000 Jun 15;164(12):6166–73.
192. Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. 7ª ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2009.
193. Miranda A, Amadeu TP, Schueler G, Alvarenga FBF, Duppré N, Ferreira H, et al. Increased Langerhans cell accumulation after mycobacterial stimuli. *Histopathology*. 2007 Nov;51(5):649–56.
194. Misch EA, Berrington WR, Vary JC Jr, Hawn TR. Leprosy and the human genome. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010 Dec;74(4):589–620.
195. Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol*. 2004 Apr 15;172(8):4676–80.
196. Misra N, Selvakumar M, Singh S, Bharadwaj M, Ramesh V, Misra RS, et al. Monocyte derived IL 10 and PGE2 are associated with the absence of Th 1 cells and in vitro T cell suppression in lepromatous leprosy. *Immunol Lett*. 1995 Dec;48(2):123–8.
197. Modlin RL, Gebhard JF, Taylor CR, Rea TH. In situ characterization of T lymphocyte subsets in the reactional states of leprosy. *Clin Exp Immunol*. 1983 Jul;53(1):17–24.
198. Modlin RL, Gersuk GM, Nelson EE, Pattengale PK, Gunter JR, Chen L, et al. T-lymphocyte clones from leprosy skin lesions. *Lepr Rev*. 1986 Dec;57 Suppl 2:143–7.
199. Modlin RL, Melancon-Kaplan J, Young SM, Pirmez C, Kino H, Convit J, et al. Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988 Feb;85(4):1213–7.
200. Modlin RL, Rowden G, Taylor CR, Rea TH. Comparison of S-100 and OKT6 antisera in human skin. *J Invest Dermatol*. 1984 Sep;83(3):206–9.
201. Modlin RL. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. *J Invest Dermatol*. 1994 Jun;102(6):828–32.
202. Modlin RL. The innate immune response in leprosy. *Curr Opin Immunol*. 2010 Feb;22(1):48–54.
203. Mohamadzadeh M, Berard F, Essert G, Chalouni C, Pulendran B, Davoust J, et al. Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells. *J Exp Med*. 2001 Oct 1;194(7):1013–20.

204. Monot M, Honoré N, Garnier T, Araoz R, Coppée J-Y, Lacroix C, et al. On the origin of leprosy. *Science*. 2005 May 13;308(5724):1040–2.
205. Montoya D, Cruz D, Teles RMB, Lee DJ, Ochoa MT, Krutzik SR, et al. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. *Cell Host Microbe*. 2009 Oct 22;6(4):343–53.
206. Montoya D, Modlin RL. Learning from leprosy: insight into the human innate immune response. *Adv Immunol*. 2010;105:1–24.
207. Moqbel R, Ying S, Barkans J, Newman TM, Kimmitt P, Wakelin M, et al. Identification of messenger RNA for IL-4 in human eosinophils with granule localization and release of the translated product. *J Immunol*. 1995 Nov 15;155(10):4939–47.
208. Moraes MO, Sarno EN, Almeida AS, Saraiva BC, Nery JA, Martins RC, et al. Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon-gamma and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). *Scand J Immunol*. 1999 Nov;50(5):541–9.
209. Morelli AE, Thomson AW. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2007 Aug;7(8):610–21.
210. Moseman EA, Liang X, Dawson AJ, Panoskaltsis-Mortari A, Krieg AM, Liu Y-J, et al. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*. 2004 Oct 1;173(7):4433–42.
211. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008 Dec;8(12):958–69.
212. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol*. 2003 Feb;73(2):209–12.
213. Motta ACF, Furini RB, Simão JCL, Ferreira MAN, Komesu MC, Foss NT. The recurrence of leprosy reactional episodes could be associated with oral chronic infections and expression of serum IL-1, TNF-alpha, IL-6, IFN-gamma and IL-10. *Braz Dent J*. 2010;21(2):158–64.
214. Motta ACF, Pereira KJ, Tarquínio DC, Vieira MB, Miyake K, Foss NT. Leprosy reactions: coinfections as a possible risk factor. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012 Oct;67(10):1145–8.
215. Moubasher AD, Kamel NA, Zedan H, Raheem DD. Cytokines in leprosy, I. Serum cytokine profile in leprosy. *Int J Dermatol*. 1998 Oct;37(10):733–40.
216. 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. *Eur J Immunol*. 2012 Nov;42(11):2925–36.
217. Moura DF, Teles RMB, Ribeiro-Carvalho MM, Teles RB, Santos IMCF, Ferreira H, et al. Long-term culture of multibacillary leprosy macrophages isolated from skin lesions: a new model to study *Mycobacterium leprae*-human cell interaction. *Br J Dermatol*. 2007 Aug;157(2):273–83.
218. Moura RS de, Calado KL, Oliveira MLW, Bühner-Sékula S. Leprosy serology using PGL-I: a systematic review. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41 Suppl 2:11–8.
219. Munn DH, Sharma MD, Lee JR, Jhaveri KG, Johnson TS, Keskin DB, et al. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science*. 2002 Sep 13;297(5588):1867–70.
220. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. 2011 Nov;11(11):723–37.
221. Murray RA, Siddiqui MR, Mendillo M, Krahenbuhl J, Kaplan G. *Mycobacterium leprae* inhibits dendritic cell activation and maturation. *J Immunol*. 2007 Jan 1;178(1):338–44.
222. Nathan C. Mechanisms and modulation of macrophage activation. *Behring Inst Mitt*. 1991 Feb;(88):200–7.
223. Nery JA da C, Bernardes Filho F, Quintanilha J, Machado AM, Oliveira S de SC, Sales AM. Understanding the type 1 reactional state for early diagnosis and treatment: a way to avoid disability in leprosy. *An Bras Dermatol*. 2013 Oct;88(5):787–92.

224. Neves RH, Alencar ACM de B, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Machado-Silva JR, Gomes DC. Hepatic stereology of Schistosomiasis mansoni infected-mice fed a high-fat diet. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006 Sep;101 Suppl 1:253–60.
225. Niemeyer CM, Sieff CA, Mathey-Prevot B, Wimperis JZ, Bierer BE, Clark SC, et al. Expression of human interleukin-3 (multi-CSF) is restricted to human lymphocytes and T-cell tumor lines. *Blood*. 1989 Mar;73(4):945–51.
226. Nomura Y, Takeuchi M, Yoshida S, Sugita Y, Niino D, Kimura Y, et al. Phenotype for activated tissue macrophages in histiocytic necrotizing lymphadenitis. *Pathol Int*. 2009 Sep;59(9):631–5.
227. North RJ, Jung Y-J. Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:599–623.
228. Nossal GJ. Negative selection of lymphocytes. *Cell*. 1994 Jan 28;76(2):229–39.
229. Novak N, Siepmann K, Zierhut M, Bieber T. The good, the bad and the ugly--APCs of the eye. *Trends Immunol*. 2003 Nov;24(11):570–4.
230. O'Reilly M, Newcomb DE, Remick D. Endotoxin, sepsis, and the primrose path. *Shock*. 1999 Dec;12(6):411–20.
231. Ochoa MT, Teles R, Haas BE, Zaghi D, Li H, Sarno EN, et al. A role for interleukin-5 in promoting increased immunoglobulin M at the site of disease in leprosy. *Immunology*. 2010 Nov;131(3):405–14.
232. Oderup C, Cederbom L, Makowska A, Cilio CM, Ivars F. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology*. 2006 Jun;118(2):240–9.
233. Okamoto T, Akuta T, Tamura F, van Der Vliet A, Akaike T. Molecular mechanism for activation and regulation of matrix metalloproteinases during bacterial infections and respiratory inflammation. *Biol Chem*. 2004 Nov;385(11):997–1006.
234. Onai N, Obata-Onai A, Tussiwand R, Lanzavecchia A, Manz MG. Activation of the Flt3 signal transduction cascade rescues and enhances type I interferon-producing and dendritic cell development. *J Exp Med*. 2006 Jan 23;203(1):227–38.
235. Orabona C, Puccetti P, Vacca C, Biccato S, Luchini A, Fallarino F, et al. Toward the identification of a tolerogenic signature in IDO-competent dendritic cells. *Blood*. 2006 Apr 1;107(7):2846–54.
236. Ottenhoff TH. Immunology of Leprosy: lessons from and for leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1994 Mar;62(1):108–21.
237. Pai VV, Tayshetye PU, Ganapati R. A study of standardized regimens of steroid treatment in reactions in leprosy at a referral centre. *Indian J Lepr*. 2012 Mar;84(1):9–15.
238. Palermo ML, Pagliari C, Trindade MAB, Yamashitafuji TM, Duarte AJS, Cacere CR, et al. Increased expression of regulatory T cells and down-regulatory molecules in lepromatous leprosy. *Am J Trop Med Hyg*. 2012 May;86(5):878–83.
239. Paliard X, de Waal Malefijt R, Yssel H, Blanchard D, Chrétien I, Abrams J, et al. Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN-gamma by activated human CD4+ and CD8+ T cell clones. *J Immunol*. 1988 Aug 1;141(3):849–55.
240. Paquette RL, Hsu NC, Kiertscher SM, Park AN, Tran L, Roth MD, et al. Interferon-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor differentiate peripheral blood monocytes into potent antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol*. 1998 Sep;64(3):358–67.
241. Parida SK, Grau GE, Zaheer SA, Mukherjee R. Serum tumor necrosis factor and interleukin 1 in leprosy and during lepra reactions. *Clin Immunol Immunopathol*. 1992 Apr;63(1):23–7.
242. Pavie J, De Castro N, Molina J-M, Flageul B. Severe peripheral neuropathy following HAART initiation in an HIV-infected patient with leprosy. *J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic)*. 2010 Aug;9(4):232–5.
243. Penna G, Amuchastegui S, Giarratana N, Daniel KC, Vulcano M, Sozzani S, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol*. 2007 Jan 1;178(1):145–53.

244. Penna G, Vulcano M, Sozzani S, Adorini L. Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol*. 2002 Dec;63(12):1164–71.
245. Perussia B, Fanning V, Trinchieri G. A leukocyte subset bearing HLA-DR antigens is responsible for in vitro alpha interferon production in response to viruses. *Nat Immun Cell Growth Regul*. 1985;4(3):120–37.
246. Pickl WF, Majdic O, Kohl P, Stöckl J, Riedl E, Scheinecker C, et al. Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14+ peripheral blood monocytes. *J Immunol*. 1996 Nov 1;157(9):3850–9.
247. Pierre P, Turley SJ, Gatti E, Hull M, Meltzer J, Mirza A, et al. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature*. 1997 Aug 21;388(6644):787–92.
248. Pinheiro RO, de Souza Salles J, Sarno EN, Sampaio EP. Mycobacterium leprae-host-cell interactions and genetic determinants in leprosy: an overview. *Future Microbiol*. 2011 Feb;6(2):217–30.
249. Piqueras B, Connolly J, Freitas H, Palucka AK, Banchereau J. Upon viral exposure, myeloid and plasmacytoid dendritic cells produce 3 waves of distinct chemokines to recruit immune effectors. *Blood*. 2006 Apr 1;107(7):2613–8.
250. Plaut M, Pierce JH, Watson CJ, Hanley-Hyde J, Nordan RP, Paul WE. Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc epsilon RI or to calcium ionophores. *Nature*. 1989 May 4;339(6219):64–7.
251. Polycarpou A, Walker SL, Lockwood DN. New findings in the pathogenesis of leprosy and implications for the management of leprosy. *Curr Opin Infect Dis*. 2013 Oct;26(5):413–9.
252. Porcelli SA, Modlin RL. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:297–329.
253. Porcheray F, Viaud S, Rimaniol A-C, Léone C, Samah B, Dereuddre-Bosquet N, et al. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol*. 2005 Dec;142(3):481–9.
254. Pulendran B, Tang H, Denning T. Division of labor, plasticity, and crosstalk between dendritic cell subsets. *Curr Opin Immunol*. 2008 Feb;20(1):61–7.
255. Pulendran B, Tang H, Manicassamy S. Programming dendritic cells to induce T(H)2 and tolerogenic responses. *Nat Immunol*. 2010 Aug;11(8):647–55.
256. Pulendran B. Modulating vaccine responses with dendritic cells and Toll-like receptors. *Immunol Rev*. 2004 Jun;199:227–50.
257. Qi X-F, Kim D-H, Yoon Y-S, Jin D, Huang X-Z, Li J-H, et al. Essential involvement of cross-talk between IFN-gamma and TNF-alpha in CXCL10 production in human THP-1 monocytes. *J Cell Physiol*. 2009 Sep;220(3):690–7.
258. Raffe SF, Thapa M, Khadge S, Tamang K, Hagge D, Lockwood DNJ. Diagnosis and treatment of leprosy reactions in integrated services—the patients' perspective in Nepal. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(3):e2089.
259. Ramakrishnan L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat Rev Immunol*. 2012 May;12(5):352–66.
260. Rambukkana A, Das PK, Krieg S, Faber WR. Association of the mycobacterial 30-kDa region proteins with the cutaneous infiltrates of leprosy lesions. Evidence for the involvement of the major mycobacterial secreted proteins in the local immune response of leprosy. *Scand J Immunol*. 1992 Jul;36(1):35–48.
261. Ratzinger G, Baggers J, de Cos MA, Yuan J, Dao T, Reagan JL, et al. Mature human Langerhans cells derived from CD34+ hematopoietic progenitors stimulate greater cytolytic T lymphocyte activity in the absence of bioactive IL-12p70, by either single peptide presentation or cross-priming, than do dermal-interstitial or monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*. 2004 Aug 15;173(4):2780–91.

262. Rees, RFW. The microbiology of leprosy. In: HASTINGS, RC (ed). *Leprosy* Churchill Livingstone Inc. New York. 1985; 31-52.
263. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1966 Sep;34(3):255–73.
264. Robbins G, Tripathy VM, Misra VN, Mohanty RK, Shinde VS, Gray KM, et al. Ancient skeletal evidence for leprosy in India (2000 B.C.). *PLoS ONE*. 2009;4(5):e5669.
265. Robinson CM, Hale PT, Carlin JM. The role of IFN-gamma and TNF-alpha-responsive regulatory elements in the synergistic induction of indoleamine dioxygenase. *J Interferon Cytokine Res*. 2005 Jan;25(1):20–30.
266. Romani N, Gruner S, Brang D, Kämpgen E, Lenz A, Trockenbacher B, et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med*. 1994 Jul 1;180(1):83–93.
267. Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kämpgen E, Eibl B, et al. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods*. 1996 Sep 27;196(2):137–51.
268. Rossi M, Young JW. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol*. 2005 Aug 1;175(3):1373–81.
269. Rubartelli A, Lotze MT. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends Immunol*. 2007 Oct;28(10):429–36.
270. Rutella S, Bonanno G, Procoli A, Mariotti A, de Ritis DG, Curti A, et al. Hepatocyte growth factor favors monocyte differentiation into regulatory interleukin (IL)-10++IL-12low/neg accessory cells with dendritic-cell features. *Blood*. 2006 Jul 1;108(1):218–27.
271. Saini C, Ramesh V, Nath I. CD4+ Th17 cells discriminate clinical types and constitute a third subset of non Th1, Non Th2 T cells in human leprosy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(7):e2338.
272. Salgame P, Abrams JS, Clayberger C, Goldstein H, Convit J, Modlin RL, et al. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science*. 1991 Oct 11;254(5029):279–82.
273. Salina TI, Morozova TI. [Production of gamma-interferon by blood mononuclear cells in patients with various types of a tuberculous process]. *Probl Tuberk Bolezn Legk*. 2004;(10):19–21.
274. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*. 1994 Apr 1;179(4):1109–18.
275. Salvador A, Igartua M, Luis J, Maria R. Dendritic Cells Interactions with the Immune System – Implications for Vaccine Development. In: Gowder S, editor. *Cell Interaction* [Internet]. InTech; 2012 [cited 2014 Apr 21]. Available from: <http://www.intechopen.com/books/cell-interaction/dendritic-cells-interactions-with-the-immune-system-implications-for-vaccine-development>
276. Sampaio EP, Caneshi JR, Nery JA, Duppre NC, Pereira GM, Vieira LM, et al. Cellular immune response to *Mycobacterium leprae* infection in human immunodeficiency virus-infected individuals. *Infect Immun*. 1995 May;63(5):1848–54.
277. Sampaio EP, Moraes MO, Pessolani MCV, Sarno EN. Role of Th1 cytokines in host defenses against *Mycobacterium leprae*. In: Kotb M, Calandra T. *Cytokines and chemokines in infectious diseases handbook*. Humana Totowa: Press Inc.; 2003. p.163-186.
278. Sampaio EP, Sarno EN. Expression and cytokine secretion in the states of immune reactivation in leprosy. *Braz J Med Biol Res*. 1998 Jan;31(1):69–76.
279. Santini SM, Lapenta C, Logozzi M, Parlato S, Spada M, Di Pucchio T, et al. Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *J Exp Med*. 2000 May 15;191(10):1777–88.

280. Santos DO, Castro HC, Bourguignon SC, Bastos OM, Rodrigues CR, Van Heuverswyn H, et al. Expression of B7-1 costimulatory molecules in patients with multibacillary leprosy and reactional states. *Clin Exp Dermatol*. 2007 Jan;32(1):75–80.
281. Sarno EN, Grau GE, Vieira LM, Nery JA. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosy reactional states. *Clin Exp Immunol*. 1991 Apr;84(1):103–8.
282. Sarno EN, Illarramendi X, Nery JAC, Sales AM, Gutierrez-Galhardo MC, Penna MLF, et al. HIV-M. leprae interaction: can HAART modify the course of leprosy? *Public Health Rep*. 2008 Apr;123(2):206–12.
283. Sato K, Yamashita N, Matsuyama T. Human peripheral blood monocyte-derived interleukin-10-induced semi-mature dendritic cells induce anergic CD4(+) and CD8(+) T cells via presentation of the internalized soluble antigen and cross-presentation of the phagocytosed necrotic cellular fragments. *Cell Immunol*. 2002 Feb;215(2):186–94.
284. Sato K, Yamashita N, Yamashita N, Baba M, Matsuyama T. Regulatory dendritic cells protect mice from murine acute graft-versus-host disease and leukemia relapse. *Immunity*. 2003 Mar;18(3):367–79.
285. Saunders BM, Cooper AM. Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. *Immunol Cell Biol*. 2000 Aug;78(4):334–41.
286. Schenk M, Fabri M, Krutzik SR, Lee DJ, Vu DM, Sieling PA, et al. Interleukin-1 β triggers the differentiation of macrophages with enhanced capacity to present mycobacterial antigen to T cells. *Immunology*. 2014 Feb;141(2):174–80.
287. Schenk M, Krutzik SR, Sieling PA, Lee DJ, Teles RMB, Ochoa MT, et al. NOD2 triggers an interleukin-32-dependent human dendritic cell program in leprosy. *Nat Med*. 2012 Apr;18(4):555–63.
288. Schmidt SV, Nino-Castro AC, Schultze JL. Regulatory dendritic cells: there is more than just immune activation. *Front Immunol*. 2012;3:274.
289. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev*. 2006 Apr;19(2):338–81.
290. Scollard DM, Chaduvula MV, Martinez A, Fowlkes N, Nath I, Stryjewska BM, et al. Increased CXC ligand 10 levels and gene expression in type 1 leprosy reactions. *Clin Vaccine Immunol*. 2011 Jun;18(6):947–53.
291. Secretaria de Saúde do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro; [acesso em 2013 Mai 06]. Disponível em: www.saude.rj.gov.br.
292. Seder RA, Boulay JL, Finkelman F, Barbier S, Ben-Sasson SZ, Le Gros G, et al. CD8+ T cells can be primed in vitro to produce IL-4. *J Immunol*. 1992 Mar 15;148(6):1652–6.
293. Seder RA, Paul WE, Dvorak AM, Sharkis SJ, Kagey-Sobotka A, Niv Y, et al. Mouse splenic and bone marrow cell populations that express high-affinity Fc epsilon receptors and produce interleukin 4 are highly enriched in basophils. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991 Apr 1;88(7):2835–9.
294. Sehgal VN, Bhattacharya SN, Shah Y, Sharma VK, Gupta CK. Soluble interleukin-2 receptors: levels in leprosy, and during and after type 1 (lepra) and type 2 (ENL) reactions. *Lepr Rev*. 1991 Sep;62(3):262–8.
295. Sehgal VN, Joginder, Sharma VK. Immunology of leprosy. A comprehensive survey. *Int J Dermatol*. 1989 Nov;28(9):574–84.
296. Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:421–52.
297. Shepard CC. Temperature optimum of *Mycobacterium leprae* in mice. *J Bacteriol*. 1965 Nov;90(5):1271–5.
298. Shimoji Y, Ng V, Matsumura K, Fischetti VA, Rambukkana A. A 21-kDa surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999 Aug 17;96(17):9857–62.

299. Shortman K, Liu Y-J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol.* 2002 Mar;2(3):151–61.
300. Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol.* 2007 Jan;7(1):19–30.
301. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 2012 Mar 1;122(3):787–95.
302. Sieling PA, Chatterjee D, Porcelli SA, Prigozy TI, Mazzaccaro RJ, Soriano T, et al. CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science.* 1995 Jul 14;269(5221):227–30.
303. Sieling PA, Jullien D, Dahlem M, Tedder TF, Rea TH, Modlin RL, et al. CD1 expression by dendritic cells in human leprosy lesions: correlation with effective host immunity. *J Immunol.* 1999 Feb 1;162(3):1851–8.
304. Sieling PA, Modlin RL. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. *Immunobiology.* 1994 Oct;191(4-5):378–87.
305. Sieling PA, Torrelles JB, Stenger S, Chung W, Burdick AE, Rea TH, et al. The human CD1-restricted T cell repertoire is limited to cross-reactive antigens: implications for host responses against immunologically related pathogens. *J Immunol.* 2005 Mar 1;174(5):2637–44.
306. Sieling PA, Wang XH, Gately MK, Oliveros JL, McHugh T, Barnes PF, et al. IL-12 regulates T helper type 1 cytokine responses in human infectious disease. *J Immunol.* 1994 Oct 15;153(8):3639–47.
307. Sierra-Filardi E, Vega MA, Sánchez-Mateos P, Corbí AL, Puig-Kröger A. Heme Oxygenase-1 expression in M-CSF-polarized M2 macrophages contributes to LPS-induced IL-10 release. *Immunobiology.* 2010 Oct;215(9-10):788–95.
308. Sieweke MH, Allen JE. Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. *Science.* 2013 Nov 22;342(6161):1242974.
309. Simões Quaresma JA, de Oliveira MFA, Ribeiro Guimarães AC, de Brito EB, de Brito RB, Pagliari C, et al. CD1a and factor XIIIa immunohistochemistry in leprosy: a possible role of dendritic cells in the pathogenesis of *Mycobacterium leprae* infection. *Am J Dermatopathol.* 2009 Aug;31(6):527–31.
310. Smith AM, Rahman FZ, Hayee B, Graham SJ, Marks DJB, Sewell GW, et al. Disordered macrophage cytokine secretion underlies impaired acute inflammation and bacterial clearance in Crohn's disease. *J Exp Med.* 2009 Aug 31;206(9):1883–97.
311. Souza CS. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. *Medicina (Ribeirão Preto).* 1997 Sep;30(3):325–334
312. Spector WG. The granulomatous inflammatory exudate. *Int Rev Exp Pathol.* 1969;8:1–55.
313. Spierings E, De Boer T, Zulianello L, Ottenhoff TH. The role of Schwann cells, T cells and *Mycobacterium leprae* in the immunopathogenesis of nerve damage in leprosy. *Lepr Rev.* 2000 Dec;71 Suppl:S121–129.
314. Stefani MM, Guerra JG, Sousa ALM, Costa MB, Oliveira MLW, Martelli CT, et al. Potential plasma markers of Type 1 and Type 2 leprosy reactions: a preliminary report. *BMC Infect Dis.* 2009;9:75.
315. Steinbrink K, Graulich E, Kubsch S, Knop J, Enk AH. CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood.* 2002 Apr 1;99(7):2468–76.
316. Steinbrink K, Wöfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol.* 1997 Nov 15;159(10):4772–80.
317. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature.* 2007 Sep 27;449(7161):419–26.
318. Stoner GL. Importance of the neural predilection of *Mycobacterium leprae* in leprosy. *Lancet.* 1979 Nov 10;2(8150):994–6.

319. Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol*. 2005 Jul 1;175(1):342–9.
320. Stout RD, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol*. 2004 Sep;76(3):509–13.
321. Suzuki K, Takeshita F, Nakata N, Ishii N, Makino M. Localization of CORO1A in the macrophages containing *Mycobacterium leprae*. *Acta Histochem Cytochem*. 2006 Aug 30;39(4):107–12.
322. Svetić A, Madden KB, Zhou XD, Lu P, Katona IM, Finkelman FD, et al. A primary intestinal helminthic infection rapidly induces a gut-associated elevation of Th2-associated cytokines and IL-3. *J Immunol*. 1993 Apr 15;150(8 Pt 1):3434–41.
323. Takeuchi S, Furue M. Dendritic cells: ontogeny. *Allergol Int*. 2007 Sep;56(3):215–23.
324. Talhari C, Mira MT, Massone C, Braga A, Chrusciak-Talhari A, Santos M, et al. Leprosy and HIV coinfection: a clinical, pathological, immunological, and therapeutic study of a cohort from a Brazilian referral center for infectious diseases. *J Infect Dis*. 2010 Aug 15;202(3):345–54.
325. Tang HL, Cyster JG. Chemokine Up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells. *Science*. 1999 Apr 30;284(5415):819–22.
326. Tanigawa K, Suzuki K, Kimura H, Takeshita F, Wu H, Akama T, et al. Tryptophan aspartate-containing coat protein (CORO1A) suppresses Toll-like receptor signalling in *Mycobacterium leprae* infection. *Clin Exp Immunol*. 2009 Jun;156(3):495–501.
327. Teles RMB, Graeber TG, Krutzik SR, Montoya D, Schenk M, Lee DJ, et al. Type I interferon suppresses type II interferon-triggered human anti-mycobacterial responses. *Science*. 2013 Mar 22;339(6126):1448–53.
328. Teles RMB, Teles RB, Amadeu TP, Moura DF, Mendonça-Lima L, Ferreira H, et al. High matrix metalloproteinase production correlates with immune activation and leukocyte migration in leprosy reactional lesions. *Infect Immun*. 2010 Mar;78(3):1012–21.
329. Torrelles JB, Sieling PA, Arcos J, Knaup R, Bartling C, Rajaram MVS, et al. Structural differences in lipomannans from pathogenic and nonpathogenic mycobacteria that impact CD1b-restricted T cell responses. *J Biol Chem*. 2011 Oct 14;286(41):35438–46.
330. Trinchieri G, Santoli D, Dee RR, Knowles BB. Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Identification of the anti-viral activity as interferon and characterization of the human effector lymphocyte subpopulation. *J Exp Med*. 1978 May 1;147(5):1299–313.
331. Trombetta ES, Mellman I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:975–1028.
332. Truman R. Leprosy in wild armadillos. *Lepr Rev*. 2005 Sep;76(3):198–208.
333. Tung KS, Umland E, Matzner P, Nelson K, Schauf V, Rubin L, et al. Soluble serum interleukin 2 receptor levels in leprosy patients. *Clin Exp Immunol*. 1987 Jul;69(1):10–5.
334. Turk JL, Narayanan RB. The origin, morphology, and function of epithelioid cells. *Immunobiology*. 1982 Apr;161(3-4):274–82.
335. Uhlig HH, McKenzie BS, Hue S, Thompson C, Joyce-Shaikh B, Stepankova R, et al. Differential activity of IL-12 and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology. *Immunity*. 2006 Aug;25(2):309–18.
336. Uyemura K, Ho CT, Ohmen JD, Rea TH, Modlin RL. Selective expansion of V delta 1 + T cells from leprosy skin lesions. *J Invest Dermatol*. 1992 Dec;99(6):848–52.
337. Van Brakel WH, Nicholls PG, Das L, Barkataki P, Suneetha SK, Jadhav RS, et al. The INFIR Cohort Study: investigating prediction, detection and pathogenesis of neuropathy and reactions in leprosy. Methods and baseline results of a cohort of multibacillary leprosy patients in north India. *Lepr Rev*. 2005 Mar;76(1):14–34.

338. Van Krinks CH, Matyszak MK, Gaston JSH. Characterization of plasmacytoid dendritic cells in inflammatory arthritis synovial fluid. *Rheumatology (Oxford)*. 2004 Apr;43(4):453–60.
339. Varughese N, Petrella T, Singer M, Carlson JA. Plasmacytoid (CD68+CD123+) monocytes may play a crucial role in the pathogenesis of hydroa vacciniforme: a case report. *Am J Dermatopathol*. 2009 Dec;31(8):828–33.
340. Veldhoen M, Moncrieffe H, Hocking RJ, Atkins CJ, Stockinger B. Modulation of dendritic cell function by naive and regulatory CD4+ T cells. *J Immunol*. 2006 May 15;176(10):6202–10.
341. Vermi W, Lonardi S, Morassi M, Rossini C, Tardanico R, Venturini M, et al. Cutaneous distribution of plasmacytoid dendritic cells in lupus erythematosus. Selective tropism at the site of epithelial apoptotic damage. *Immunobiology*. 2009;214(9-10):877–86.
342. Verreck FAW, de Boer T, Langenberg DML, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, et al. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 Mar 30;101(13):4560–5.
343. Virchow, R. (1863) *Die krankhaften Geschwülste*, 208 August Hirschwald Berlin, Germany.
344. Vissa VD, Brennan PJ. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. *Genome Biol*. 2001;2(8):REVIEWS1023.
345. Vremec D, Zorbas M, Scollay R, Saunders DJ, Ardavin CF, Wu L, et al. The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J Exp Med*. 1992 Jul 1;176(1):47–58.
346. Wade HW. A tuberculoid-like reaction in lepromatous leprosy; a reactional reversal phenomenon. *Int J Lepr*. 1955 Dec;23(4 Part 1):443–6.
347. Wagner H. Endogenous TLR ligands and autoimmunity. *Adv Immunol*. 2006;91:159–73.
348. Wahl SM, Swisher J, McCartney-Francis N, Chen W. TGF-beta: the perpetrator of immune suppression by regulatory T cells and suicidal T cells. *J Leukoc Biol*. 2004 Jul;76(1):15–24.
349. Wahl SM. Transforming growth factor-beta: innately bipolar. *Curr Opin Immunol*. 2007 Feb;19(1):55–62.
350. Walker SL, Waters MFR, Lockwood DNJ. The role of thalidomide in the management of erythema nodosum leprosum. *Lepr Rev*. 2007 Sep;78(3):197–215.
351. Walsh DS, Lane JE, Abalos RM, Myint KSA. TUNEL and limited immunophenotypic analyses of apoptosis in paucibacillary and multibacillary leprosy lesions. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2004 Jul 1;41(3):265–9.
352. Wang J, Zheng L, Lobito A, Chan FK, Dale J, Sneller M, et al. Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell*. 1999 Jul 9;98(1):47–58.
353. Watanabe N, Hanabuchi S, Soumelis V, Yuan W, Ho S, de Waal Malefyt R, et al. Human thymic stromal lymphopoietin promotes dendritic cell-mediated CD4+ T cell homeostatic expansion. *Nat Immunol*. 2004 Apr;5(4):426–34.
354. WHO, World Health Organization [homepage na internet]. Leprosy [acesso 2012]. Disponível em: <http://www.who.int/lep/en/>
355. WHO, World Health Organization. Weekly Epidemiological Record: Leprosy update, 2012. *World Health Organization* 2012; 87(34):317-328.
356. WHO, World Health Organization. Weekly Epidemiological Record: Leprosy update, 2013. *World Health Organization* 2013; 88(35):365-380.
357. Wilson MS, Madala SK, Ramalingam TR, Gochuico BR, Rosas IO, Cheever AW, et al. Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. *J Exp Med*. 2010 Mar 15;207(3):535–52.

358. Wollenberg A, Wagner M, Günther S, Towarowski A, Tuma E, Moderer M, et al. Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol*. 2002 Nov;119(5):1096–102.
359. Woollard KJ, Geissmann F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol*. 2010 Feb;7(2):77–86.
360. Wu L, Dakic A. Development of dendritic cell system. *Cell Mol Immunol*. 2004 Apr;1(2):112–8.
361. Wu L, Liu Y-J. Development of dendritic-cell lineages. *Immunity*. 2007 Jun;26(6):741–50.
362. Xu H, Zhang G-X, Ciric B, Rostami A. IDO: a double-edged sword for T(H)1/T(H)2 regulation. *Immunol Lett*. 2008 Nov 16;121(1):1–6.
363. Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, et al. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science*. 1991 Oct 11;254(5029):277–9.
364. Yang Y, Yin C, Pandey A, Abbott D, Sasseti C, Kelliher MA. NOD2 pathway activation by MDP or Mycobacterium tuberculosis infection involves the stable polyubiquitination of Rip2. *J Biol Chem*. 2007 Dec 14;282(50):36223–9.
365. Yoneyama H, Narumi S, Zhang Y, Murai M, Baggiolini M, Lanzavecchia A, et al. Pivotal role of dendritic cell-derived CXCL10 in the retention of T helper cell 1 lymphocytes in secondary lymph nodes. *J Exp Med*. 2002 May 20;195(10):1257–66.
366. Yoshimoto T, Bendelac A, Watson C, Hu-Li J, Paul WE. Role of NK1.1+ T cells in a TH2 response and in immunoglobulin E production. *Science*. 1995 Dec 15;270(5243):1845–7.
367. Zanoni I, Granucci F. The regulatory role of dendritic cells in the induction and maintenance of T-cell tolerance. *Autoimmunity*. 2011 Feb;44(1):23–32.
368. Zhou LJ, Tedder TF. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996 Mar 19;93(6):2588–92.
369. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010 Oct 21;116(16):e74–80.
370. Ziegler-Heitbrock L, Hofer TP. Toward a refined definition of monocyte subsets. *Front Immun*. 2013;4:23.
371. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2007 Mar;81(3):584–92.