

**MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

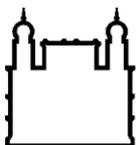
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**Estudo dos mecanismos reguladores da expressão e atividade da enzima
Indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) em células dendríticas estimuladas
por *Mycobacterium leprae***

JÉSSICA ARAUJO DA PAIXÃO DE OLIVEIRA

Rio de Janeiro

Agosto de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Jéssica Araujo da Paixão de Oliveira

**Estudo dos mecanismos reguladores da expressão e atividade da
enzima Indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) em células dendríticas
estimuladas por *Mycobacterium leprae***

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Orientadora: Prof. Dr. Maria Cristina Vidal Pessolani

RIO DE JANEIRO

2017

Oliveira, Jéssica .

Estudo dos mecanismos reguladores da expressão e atividade da enzima Indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) em células dendríticas estimuladas por *Mycobacterium leprae* / Jéssica Oliveira. - Rio de Janeiro, 2017.

81 f.; il.

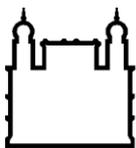
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.

Orientadora: Maria Cristina Pessolani.

Bibliografia: f. 69-79

1. Indoleamina 2,3 dioxigenase. 2. Células dendríticas . 3. *Mycobacterium leprae*. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Jéssica Araujo da Paixão de Oliveira

**Estudo dos mecanismos reguladores da expressão e atividade da enzima
Indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) em células dendríticas estimuladas por
*Mycobacterium leprae***

ORIENTADORA: Prof. Dr. Dr. Maria Cristina Vidal Pessolani

Aprovada em: 08/08/2017

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Elzinandes Leal de Azeredo - Instituto Oswaldo Cruz - Presidente
Prof. Dr. Alessandra D' Almeida Filardy - Universidade Federal do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Herbert Leonel de Matos Guedes - Universidade Federal do Rio de Janeiro

SUPLENTES:

Prof. Dr. Juliana Echevarria Neves de Lima - Universidade Federal do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Veronica Schmitz Pereira - Instituto Oswaldo Cruz - Revisora

Rio de Janeiro, 08 de agosto de 2017

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”.

Charles Chaplin

A Deus e à minha família por sempre estarem comigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Dr^a Euzenir Nunes Sarno, pelo exemplo de profissionalismo dado a todos alunos, pesquisadores e funcionários do laboratório de Hanseníase.

À minha orientadora, Dr^a. Maria Cristina Pessolani, pela oportunidade de realizar meu mestrado e por toda dedicação ao nosso trabalho.

À Dr^a Roberta Olmo Pinheiro, por toda compreensão ao decorrer desses anos, pelo todo afeto e carinho.

À Dr^a Jô, que me possibilitou estar hoje na Fiocruz, por toda ajuda que me forneceu no momento que mais precisei, e por toda confiança que tem sobre a minha pessoa.

À Verônica, Tatina e Bruno Mietto por todo cuidado, exemplo e toda ajuda em todos os momentos.

Aos doutorando/ doutores Mayara Barbosa, Beatriz, Priscila Andrade, Rhana Prata, Pedro Lopes e Bruno Silva, por todos os momentos que se dedicaram aos meus experimentos e minhas dúvidas.

Aos alunos de iniciação científica e mestandos Eduardo, Fabi, Jéssica B., Isabela, Tayná, Michele, Augusto, Marina, Joyce, Carol, Maria e LEO e também aos que já passaram pelo laboratório e também contribuíram muito para todo este trabalho e por todas as risadas nas ‘horas vagas’.

À Eliane e Andressa por todo afeto ao longo desses anos.

Aos queridos da patologia Helen, Vânia, Dr^o Sérgio e Dr^a Alice, por toda ajuda e gratidão ao decorrer de todo esse tempo.

Às minhas queridas que hoje posso chamar de AMIGAS Tamiris Lameira, Mariana Martins (Mestrandas), Mayara Mendes (Doutoranda) e Ana Carolina (Biogata). Que estão a todo tempo comigo, desde o profissional até o pessoal e que me ajudam a superar todas as dificuldades no laboratório e na vida. Eu amo vocês.

A todos os funcionários do LAHAN que se dispusera a me ajudar em todos os serviços extras no laboratório.

Ao pessoal do Ambulatório Souza Araújo, por toda colaboração no meu projeto, em especial ao Daniel Pedrosa que se dispôs a me ajudar a ingressar como aluna de iniciação científica no laboratório de Hanseníase na Fiocruz.

Ao meu noivo, Lucas Azevedo, por todo por todo carinho e atenção nos momentos mais difíceis, principalmente quando estava escrevendo esta dissertação e por todo cuidado que teve comigo por todo esse tempo. Obrigada, meu amor!

À minha mãe, meu pai, meu padrasto, minha madrasta, minhas avós e meu irmãozinho que não me deixaram desistir em nenhum momento, e se não fosse os mesmos com certeza nada daria certo, eu amo vocês!

A toda minha família que sempre esteve comigo em todos os momentos da minha vida, sempre incentivaram todas as minhas escolhas.

Aos meus amigos queridos que acreditam no meu potencial e sempre se dispõem a me ajudar.

Ao CNPq e ao IOC pelo apoio financeiro.

A DEUS, pois a ele toda honra e toda glória, agora e para sempre. Obrigada, Senhor!!!

Lista de Abreviaturas

- 1-MT - 1 Metil triptofano
- 3-HANA - do inglês, *3-hydroxyanthranilic acid*
- 3-HAO - do inglês, *3-hydroxyanthranilate oxidase*
- 3-HK - do inglês, *3-hydroxy kynurenine*
- AA - do inglês, *Anthranilic acid*
- AFMID - do inglês, *Kynurenina formamidase*
- AG - Arabinogalactana
- Ag+Ac - Antígeno+Anticorpo
- AIDS - do inglês, *Acquired immune deficiency syndrome*
- ANOVA - Análise de Variância
- APC - do inglês, *Antigen presenting cells*
- BAAR - Bacilo álcool-ácido resistente
- BB - Borderline borderline
- BL - Borderline lepromatosa
- BT - Borderline tuberculóide
- cDCs - do inglês, *Dendritic cells conventional*
- cDNA - do inglês, *Complementary deoxyribonucleic acid*
- CMV - Citomegalovírus
- DC SIGN - do inglês, *Dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin*
- DCs- do inglês, *Dendritic cells*
- DNA - do inglês, *Deoxyribonucleic acid*
- EDTA - do inglês, *Ethylenediamine tetraacetic acid*
- ELISA - do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- ENH - Eritema nodoso hanseniano
- ERK - do inglês, *Extracellular signal-regulated kinases*
- FITC - do inglês, *Fluorescein isothiocyanate*
- GM-CSF- do inglês, *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
- HBsAg - do inglês, *Hepatitis B surface antigen*
- HCV - do inglês, *Hepatitis C virus*
- HIV - do inglês, *Human immunodeficiency virus*
- HLA-DR - do inglês, *Human leukocyte antigen DR*
- HPLC- do inglês, *High performance liquid chromatography*
- IDCs - do inglês, *Interstitial dendritic cells*
- IDO - Indoleamina 2, 3 dioxigenase

IFN- γ - Interferon gama
IL- Interleucina
IOC - Instituto Oswaldo Cruz
KAT I ou KAT II - do inglês, *Kynurenine aminotransferase I or II*
KMO - do inglês, *Kynurenina 3-monooxygenase*
KYNA- do inglês, *Kynurenic acid*
KYNU - do inglês, *Kynureninase*
LAM - Lipoarabinomanana
LCs - do inglês, *Langerhans cells*
LL - Lepromatoso
LM - Lipomanana
LPS - Lipopolissacarídeo
ManLAM - do inglês, *Mannose-capped lipoarabinomannan*
mDCs- do inglês, *Dendritic cells derived from monocytes*
MHC - do inglês, *Major histocompatibility complex*
MIF - do inglês, *Mean fluorescence intensity*
MLMA - do inglês, *Cell Membrane Fraction Mycobacterium leprae*
MLSA - do inglês, *Cytosol Fraction Mycobacterium leprae*
MMPI - do inglês, *Major membrane protein I*
MMP-II - do inglês, *Major membrane protein II*
MOI - do inglês, *Multiplicity of infection*
mRNA - do inglês, *Messenger ribonucleic acid*
NF- κ B - do inglês, *Factor nuclear kappa B*
NIH - do ingles, *National Institutes of Health*
NO - do ingles, *Nitric oxide*
OMS - Organização Mundial de Saúde
PAMPs - do inglês, *Pattern-associated molecular patterns*
PB - Pacientes paucibacilares
PBMC - do inglês, *Peripheral blood mononuclear cells*
PBS - do inglês, *Phosphate buffered saline*
PCR - do inglês, *Polymerase chain reaction*
PDCs - do inglês, *Plasmacytoid dendritic cells*
PDIMs - do inglês, *Phthiocerol dimycocerosates*
PG - Peptídeoglicana
PGL1 - do inglês, *Phenolic glycolipid-1*

PIMs - do inglês, *Phosphatidyl-myo-inositol mannosides*
PL - do inglês, *Phospholipids*
PQT - Poliquimioterapia
Quin - Quinurenina
QUINA - do inglês, *Quinolinic acid*
RNA - do inglês, *Ribonucleic acid*
ROS - do inglês, *Reactive oxygen species*
RR - Reação reversa
RT-PCR - do inglês, *Real-time polymerase chain reaction*
SFB - Soro fetal bovino
SNP - do inglês, *Single nucleotide polymorphism*
TCA - do inglês, *Trichloroacetic acid*
TGF- β - do inglês, *Transforming growth factor beta*
TLR - do inglês, *Toll-like receptors*
TMMs - do inglês, *Trehalose monomycolate*
TNF- α - do inglês, *Tumor necrosis factor alpha*
Tregs - do inglês, *T regulatory cells*
Trp - Triptofano
TT - Tuberculóide
WHO - do inglês, *World Health Organization*
Xa - do inglês, *Xanthurenic acid*
xg - Velocidade de sedimentação em unidade gravitacional

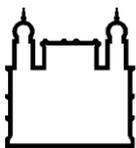
Lista de Figuras

Figura 1: Placa eritematosa anular bem definida no dorso da mão de paciente com a forma tuberculóide da hanseníase.	4
Figura 2: Lesões infiltradas formando placas e nódulos de paciente com a forma lepromatosa da hanseníase.	4
Figura 3: Representação esquemática do espectro clínico da hanseníase.	6
Figura 4: Taxas de incidência de hanseníase no mundo em 2015.	7
Figura 5: Taxas de prevalência de hanseníase no mundo em 2015.	7
Figura 6: Taxas de incidência de hanseníase no Brasil em 2015.	8
Figura 7: Taxas de prevalência de hanseníase no Brasil em 2015.	9
Figura 8: Microscopia eletrônica de varredura de <i>Mycobacterium leprae</i> derivada da pata de camundongo nude.	12
Figura 9: Modelo esquemático da parede celular de <i>M. leprae</i> .	13
Figura 10: Visão esquemática dos diferentes subconjuntos de DCs humanas no sangue e na pele e suas funções na imunidade.	17
Figura 11: Via da quinurenina no metabolismo do triptofano.	21
Figura 12: Visão esquemática do papel central do IDO nas respostas imunes a infecções bacterianas.	22
Figura 13: Eficiência do protocolo de diferenciação de mDC.	38
Figura 14: Histogramas representativos da caracterização fenotípica de PBMCs, monócitos e mDCs diferenciadas <i>in vitro</i> .	39
Figura 15: Caracterização fenotípica de PBMCs, monócitos e mDCs diferenciadas <i>in vitro</i> .	43
Figura 16: <i>M. leprae</i> e suas frações não alteram o fenótipo de mDCs.	46
Figura 17: Expressão intracelular de IDO nas mDCs.	48
Figura 18: <i>M. leprae</i> aumenta a atividade de IDO em mDCs.	49
Figura 19: Efeitos antagônicos das frações de <i>M. leprae</i> na indução de citocinas por mDCs.	50
Figura 20: MLMA induz um aumento na frequência de células IDO ⁺ TNF- α ⁺ .	51

Figura 21: Importância de TNF- α na atividade de IDO pelas mDCs.	52
Figura 22: Expressão de IDO em mDCs estimuladas com Pam3Cys e <i>M leprae</i> .	53
Figura 23: Atividade de IDO em mDCs estimuladas com Pam3cys e <i>M. leprae</i> .	54
Figura 24: TLR2 é importante na indução de atividade de IDO em mDCs.	55
Figura 25: Expressão gênica de AFMID, KMO e KYN induzida por <i>M. leprae</i> em mDCs.	56
Figura 26: <i>M. leprae</i> induz um perfil supressor em linfócitos por mDCs.	57
Figura 27: IDO é importante para a sobrevivência de <i>M. leprae</i> .	58
Figura 28: Esquema ilustrativo de conclusões finais do estudo.	67

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Esquemas terapêuticos utilizados para Paucibacilar	10
Tabela 2 - Esquemas terapêuticos utilizados para Multibacilar	10
Tabela 3 - Estímulos utilizados nas culturas <i>in vitro</i>	30
Tabela 4 - Tabela de Anticorpos usados para citometria de fluxo	31



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

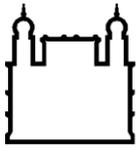
Estudo dos mecanismos reguladores da expressão e atividade da enzima Indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) em células dendríticas estimuladas por *Mycobacterium leprae*

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Jéssica Araujo da Paixão de Oliveira

A Indoleamina 2,3 Dioxigenase (IDO) é uma enzima envolvida na primeira etapa do catabolismo do triptofano e pode apresentar um efeito dúbio, tendo sido descrita em ambientes microbicidas ou tolerogênicos. Diversos trabalhos do nosso grupo demonstraram que a IDO é diferencialmente regulada nas diferentes formas clínicas da hanseníase, sendo capaz de mediar os mecanismos tolerogênicos observados na forma multibacilar e ao mesmo tempo mediar os mecanismos microbicidas observados na forma paucibacilar e nos episódios reacionais. O presente estudo tem como objetivo investigar os mecanismos reguladores da expressão e atividade da IDO em células dendríticas diferenciadas de monócitos (mDCs) estimuladas por *Mycobacterium leprae*. Para isso, monócitos foram obtidos a partir de células mononucleares derivadas de monócitos (PBMCs) de *buffy coats* por seleção positiva. Para diferenciar as mDCs, os monócitos foram estimulados com GM-CSF e IL-4 durante 6 dias. O fenótipo destas células e a expressão de IDO foram avaliados por citometria de fluxo. A atividade de IDO foi avaliada por HPLC e a produção de citocinas nos sobrenadantes foi determinada por ELISA. Foi observado que as mDCs diferenciadas por este protocolo não expressam CD14, mas expressam CD11c, CD123, CD209, CD303, CD304 e HLA-DR. O CD83 foi pouco expresso, enquanto CD86 foi altamente expresso. Não foi observada modulação no fenótipo celular das mDCs estimuladas por *M. leprae*. Paralelamente ao estímulo do *M. leprae* utilizamos as frações de membrana (MLMA) e solúvel (MLSA). O estímulo com *M. leprae* foi capaz de aumentar a expressão da proteína IDO e sua atividade em mDCs, além de aumentar a expressão gênica de outras enzimas da via. Entre os estímulos estudados, o MLMA induziu a produção de citocinas pró-inflamatórias em mDCs. Em conjunto, *M. leprae* e suas frações induziram a expressão e atividade de IDO. A ausência de TLR2 em culturas de mDCs levou a diminuição da atividade de IDO induzida por *M. leprae* e MLMA, mostrando o envolvimento de TLR2 na indução de IDO. O bloqueio do TNF- α em mDCs estimuladas por *M. leprae* e suas frações levou a diminuição da atividade de IDO. Nossos dados demonstraram que a pré-incubação de mDCs com *M. leprae* induziu um aumento na frequência de células T supressoras CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺ em culturas estimuladas com *M. leprae* quando comparadas com as culturas não estimuladas, o que foi revertido na presença do inibidor de IDO, o 1 metil triptofano (1-MT). Também foi mostrado que IDO é importante para a sobrevivência do bacilo. Em conjunto, nossos dados mostram que *M. leprae* e suas frações MLMA e MLSA são capazes de modular a atividade e funcionalidade de IDO em mDCs sugerindo que esta via possa ter um papel importante na imunopatogênese da hanseníase.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Study of the mechanisms regulating the expression and activity of the enzyme Indoleamine 2,3 dioxigenase (IDO) in dendritic cells stimulated by *Mycobacterium leprae*

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Jéssica Araujo da Paixão de Oliveira

Indoleamine 2,3 Dioxygenase (IDO) is an enzyme involved in the first stage of tryptophan catabolism that present a dubious effect, it has been described in microbicidal or tolerogenic environments. Several studies in our group have demonstrated that IDO is differentially regulated in the diverse clinical forms of leprosy, being able to mediate the tolerogenic mechanisms observed in the multibacillary form and at the same time mediate the microbicidal mechanisms noticed in the paucibacillary form and in the reactional episodes. The present study aims to investigate the regulatory mechanisms of IDO expression and its activity in dendritic cells derived from monocytes (mDCs) stimulated by *Mycobacterium leprae*. For this, monocytes were obtained from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of buffy coats by positive selection. To differentiate the mDCs, monocytes were stimulated by GM-CSF and IL-4 for 6 days. The phenotype of these cells and the expression of IDO were evaluated by flow cytometry. IDO activity was assessed by HPLC and cytokine production in the supernatants was determined by ELISA. It was observed that the mDCs differentiated by this protocol do not express CD14, but express CD11c, CD123, CD209, CD303, CD304 and HLA-DR. CD83 was poorly expressed, while CD86 was highly expressed. No modulation was observed in the cellular phenotype of *M. leprae*-stimulated mDCs. Parallel to the stimulation of *M. leprae* we used cell membrane and cytosol *M. leprae* fractions, MLMA and MLSA, respectively. *M. leprae* stimulus was able to increase the expression of the IDO protein and its activity in mDCs, in addition to increasing the gene expression of other pathway enzymes. Among the stimuli studied, MLMA induced the production of pro-inflammatory cytokines in mDCs. Together, *M. leprae* and its fractions induced the expression and activity of IDO. The absence of TLR2 in cultures of mDCs led to a decrease in the IDO activity induced by *M. leprae* and MLMA, showing the involvement of TLR2 in the induction of IDO. Blocking of TNF- α in mDCs stimulated by *M. leprae* and its fractions led to a decrease in the activity of IDO. Our data demonstrated that pre-incubation of *M. leprae* mDCs induced an increase in CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺ suppressor T cell rates in *M. leprae*-stimulated cultures compared to non-stimulated cultures, which was reversed in the presence of the IDO inhibitor, 1-methyl tryptophan (1-MT). It has also been shown that IDO is important for the survival of the bacillus. Taken together, our data show that *M. leprae* and its MLMA and MLSA fractions are able to modulate IDO activity and functionality in mDCs suggesting that this pathway may play an important role in leprosy immunopathogenesis.

ÍNDICE

Conteúdo	Pág
Resumo	xv
Abstract	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 - A Hanseníase	2
1.2 - Formas Clínicas	3
1.3 – Epidemiologia	6
1.4 – Tratamento	9
1.5 - <i>Mycobacterium leprae</i> e suas frações	11
1.6 - Interação entre receptores Toll Like e <i>M. leprae</i>	15
1.7 - Célula dendrítica	16
1.8 - Papel de IDO na hanseníase	19
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVOS	26
3.1 - Objetivo Geral	27
3.2 - Objetivos específicos	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 - Obtenção das <i>buffy coats</i>	29
4.2 - Separação de células mononucleares do sangue periférico	29
4.3 - Obtenção de monócitos e células dendríticas derivadas de monócitos(mDCs)	29
4.4 - Estimulação das culturas de PBMCs, monócitos e células dendríticas	30
4.5 - Ensaio imunoenzimático	30
4.6 - Citometria de fluxo	30
4.6.1 - Citometria extracelular	30
4.6.2 - Citometria intracelular	31
4.7 - Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real	32
4.7.1 - Extração de RNA	32
4.7.2 - Quantificação de ácidos nucleicos	32
4.7.3 - Análise da integridade do RNA	33

4.7.4 - Tratamento do DNA com RNase	33
4.7.5 - Síntese de cDNA	33
4.7.6 - RT-PCR em tempo real para análise da expressão gênica (qRT-PCR)	34
4.8 - Viabilidade do <i>M. leprae</i>	34
4.9 - Cromatografia Líquida de alta Eficiência (HPLC)	35
4.10 - Obtenção dos linfócitos autólogos	35
4.11 - Co-cultura de mDCs e linfócitos e marcação celular avaliada por citometria de fluxo	36
4.12 - Análises estatísticas	36
5. RESULTADOS	37
5.1 - Caracterização fenotípica das mDCs	38
5.2 - <i>M. leprae</i> e suas frações não alteram o fenótipo de mDCs	45
5.3 - <i>M. leprae</i> aumenta a expressão e atividade de IDO em mDCs	47
5.4 - Efeitos antagônicos das frações de <i>M. leprae</i> em mDCs	49
5.5 - TNF-α é importante na indução de atividade IDO por <i>M. leprae</i> e suas frações em mDCs	51
5.6 - Envolvimento de TLR2 na indução de IDO	53
5.7 - Modulação da expressão gênica das enzimas da via da quinurenina por <i>M. leprae</i>	56
5.8 - <i>M. leprae</i> induz um perfil supressor em linfócitos por um mecanismo dependente de IDO	57
5.9 - IDO é importante para a viabilidade do bacilo	58
6. DISCUSSÃO	59
7. CONCLUSÕES	65
8. REFERÊNCIAS	68
9. ANEXOS	80

1. Introdução

1.1 A Hanseníase

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa de curso crônico, que afeta principalmente os nervos periféricos, a pele e a mucosa das vias aéreas superiores. A doença tem como agente etiológico *Mycobacterium leprae*, um bacilo de multiplicação extremamente lenta, com um período de incubação longo, em média de 3 a 10 anos, o que confere à doença uma evolução arrastada e muitas vezes silenciosa. Também é considerada uma doença incapacitante, uma vez que ocorre dano neural causado pela invasão de *M. leprae* e comprometimento do sistema nervoso periférico, irreversível em vários casos (Scollard *et al.*, 2006).

Admite-se que a via de entrada do parasito é o trato respiratório superior, por onde atinge a mucosa e dissemina-se pelo organismo. A hipótese da via de transmissão aérea foi confirmada pela grande quantidade de bacilos íntegros isolados de secreções nasais de pacientes (Martins *et al.*, 2010). O contágio conhecido ocorre de pessoa a pessoa através do convívio de doentes multibacilares sem tratamento e pessoas suscetíveis. Não se pode deixar de mencionar a possibilidade de transmissão por contato direto da pele com lesões de doentes multibacilares não tratados (Margoles *et al.*, 2011).

Como em outras doenças infecciosas, a conversão de infecção em doença depende de interações entre fatores individuais do hospedeiro, ambientais e do próprio agente. A maior parte dos indivíduos expostos ao bacilo oferece resistência, desenvolvendo uma infecção subclínica. Uma minoria desses indivíduos infectados, cerca de 5%, desenvolve a doença em diferentes formas clínicas. A história natural da doença mostra que existe uma forma de resistência à infecção pelo bacilo, paucibacilar, na qual há manifestações em relação à exacerbação da resposta imune celular, com limitação de lesões, formação de granuloma bem definido e destruição dos bacilos. Também pode ocorrer a forma de alta suscetibilidade, forma multibacilar, onde se observa uma redução na resposta imune celular, com excessiva multiplicação de bacilos e disseminação da doença para o tecido nervoso e vísceras (Gallo *et al.*, 2005).

O diagnóstico da hanseníase é primariamente clínico e laboratorial. Na ausência de recursos laboratoriais, o diagnóstico passa a ser essencialmente clínico, baseando-se em sinais e sintomatologia, exames da pele e nervos periféricos e na história epidemiológica. Os principais sinais cardinais da doença são lesões cutâneas e espessamento dos nervos. Para o diagnóstico correto é importante que se entenda o conceito espectral da hanseníase, que possibilita o entendimento do curso clínico-

evolutivo da doença e da extensão do comprometimento cutâneo e neural característico de cada forma clínica da doença. A partir deste entendimento são aplicadas as classificações que facilitam a compreensão e a terapêutica (Souza, 1997).

1.2 Formas Clínicas

As diferenças na resposta imunológica do hospedeiro a *M. leprae* criam um amplo espectro clínico de apresentação da doença (Scollard *et al.*, 2006). Mediante a isto, no meio científico algumas classificações foram adotadas para diferenciar as formas clínicas da hanseníase.

Em 1953, no Congresso Internacional de Madrid, foi proposta uma classificação que dividia o espectro clínico da doença em duas formas: a tuberculóide, que envolve lesões localizadas e baciloscopia negativa, e a virchowiana, em que as lesões encontram-se disseminadas e a baciloscopia é positiva. Porém, na década de 1960, Ridley e Jopling propuseram uma classificação baseada nos aspectos clínico-evolutivos, imunológicos, baciloscópicos e histológicos, que passou a ser a mais usada, especialmente por grupos de pesquisa e centros de referência.

De acordo com Ridley & Jopling (1966), a doença é espectral, apresentando dois polos e três formas intermediárias, podendo ocorrer transição entre as formas clínicas. O pólo lepromatoso é caracterizado pelo fato de que os pacientes possuem ausente ou fraca resposta imune do tipo celular contra os antígenos de *M. leprae*, com alta carga bacilar, nesse polo encontram-se os pacientes lepromatosos (LL). No pólo tuberculóide há presença de resposta imune celular antígeno-específica e baixa carga bacilar, os pacientes tuberculóides (TT) encontram-se nesse pólo do espectro. As formas clínicas intermediárias são chamadas de *borderline* e classificadas como *borderline* lepromatosa (BL), *borderline borderline* (BB) e *borderline* tuberculóide (BT), sendo as formas mais comuns encontradas em pacientes com hanseníase (Figura 3).

Os pacientes tuberculóides, na maioria das vezes, apresentam apenas uma lesão, com carga bacilar baixa ou negativa (por isso são chamados de paucibacilares), formação de granuloma e maior número de lesões nervosas associadas (Figura 1). Baixos níveis de anticorpos específicos e presença de resposta imune celular são observados nestes pacientes, que são capazes de restringir o crescimento do patógeno. No outro pólo, estão os pacientes lepromatosos, que possuem doença disseminada, com inúmeras lesões contendo um alto número de bactérias (Figura 2). Estes pacientes, que

apresentam altos níveis de anticorpos e ausência de resposta imune celular específica aos antígenos micobacterianos. Nas formas borderlines, a resposta imune celular é mais intensa de acordo com a proximidade ao pólo tuberculóide (Lastoria & Abreu 2013).



Figura 1: Placa eritematosa anular bem definida no dorso da mão de paciente com a forma tuberculóide da hanseníase.

Fonte: Lastoria & Abreu 2013



Figura 2: Lesões infiltradas formando placas e nódulos de paciente com a forma lepromatosa da hanseníase.

Fonte: Lastoria & Abreu 2013

Em 1982, um Comitê da Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs uma classificação simplificada e operacional, dividindo os pacientes com hanseníase em dois grupos: multibacilares e paucibacilares. Os pacientes BB, BL e LL, com índice bacilar maior ou igual a 2, são classificados como multibacilares (MB), enquanto os pacientes TT e BT, com índice bacilar menor do que 2, são classificados como paucibacilares (PB) (Ministério da Saúde, 2013).

Os pacientes com hanseníase podem ainda apresentar episódios agudos de inflamação associados a alterações da resposta imune, que são chamados episódios reacionais, que podem ocorrer durante o curso da doença, antes, durante ou, como na maioria dos casos, após o tratamento.

Os dois tipos de episódios são: Reação reversa (RR) também conhecida como a reação do tipo I e o Eritema nodoso lepromatoso (ENL) ou reação do tipo II. A reação do tipo I é um episódio de autoreatividade dos linfócitos T aos antígenos da micobactéria, resultado de uma inflamação aguda da pele e dos nervos periféricos, ocorrendo principalmente nos pacientes *borderline* (Patnaik *et al.*, 2016). A reação do tipo II se manifesta em pacientes do polo lepromatoso. As lesões de pele são normalmente eritematosas e nodulares. Ainda observam-se sintomas sistêmicos, tais como febre, mal estar, artralgia e edema, comprometendo inúmeros órgãos (Kamath *et al.*, 2014).

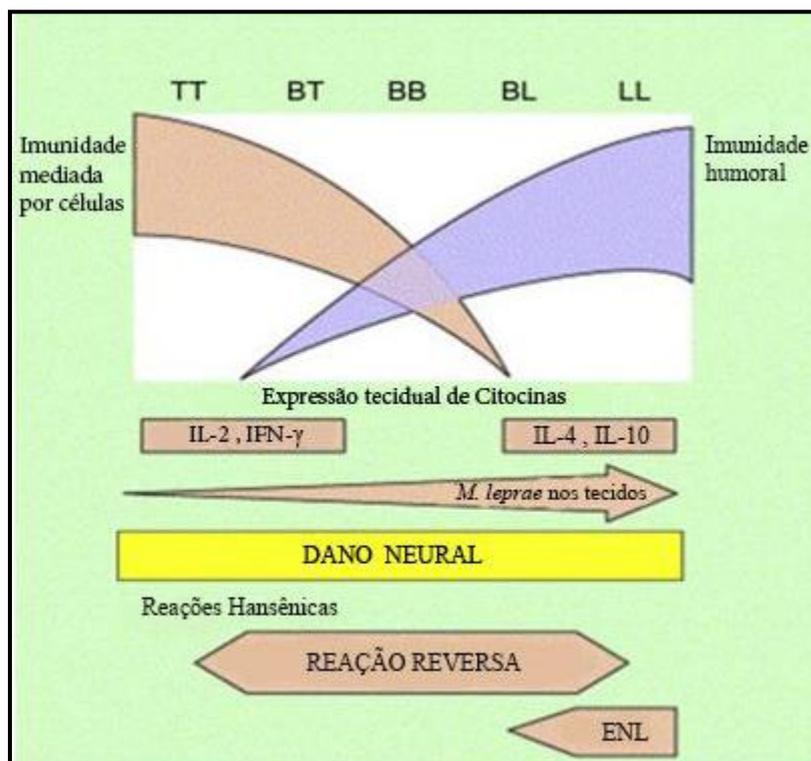


Figura 3: Representação esquemática do espectro clínico da hanseníase.

Fonte: Adaptado de Lockwood & Saunderson (2012)

1.3 Epidemiologia

A hanseníase é considerada um problema de saúde pública, estando o Brasil como 2º colocado no ranking Mundial, superado apenas pela Índia. A introdução da poliquimioterapia (PQT) nos programas de hanseníase em meados da década de 1980 resultou em uma redução significativa na prevalência da doença, de 5,4 milhões de casos na época para algumas centenas de milhares atualmente. A maneira mais eficiente de prevenir as complicações decorrentes da hanseníase se dá através do diagnóstico e tratamento precoce dos casos, antes de ocorrerem lesões nervosas. A erradicação da doença parece distante, pelo menos em alguns países. Segundo a Organização Mundial da Saúde (2015), de acordo com relatórios oficiais recebidos de 138 países de todas as regiões da OMS, a incidência mundial foi de 210.758 casos (Figura 4) e a prevalência global de hanseníase foi de 174.608 casos (Figura 5) (WHO 2016).

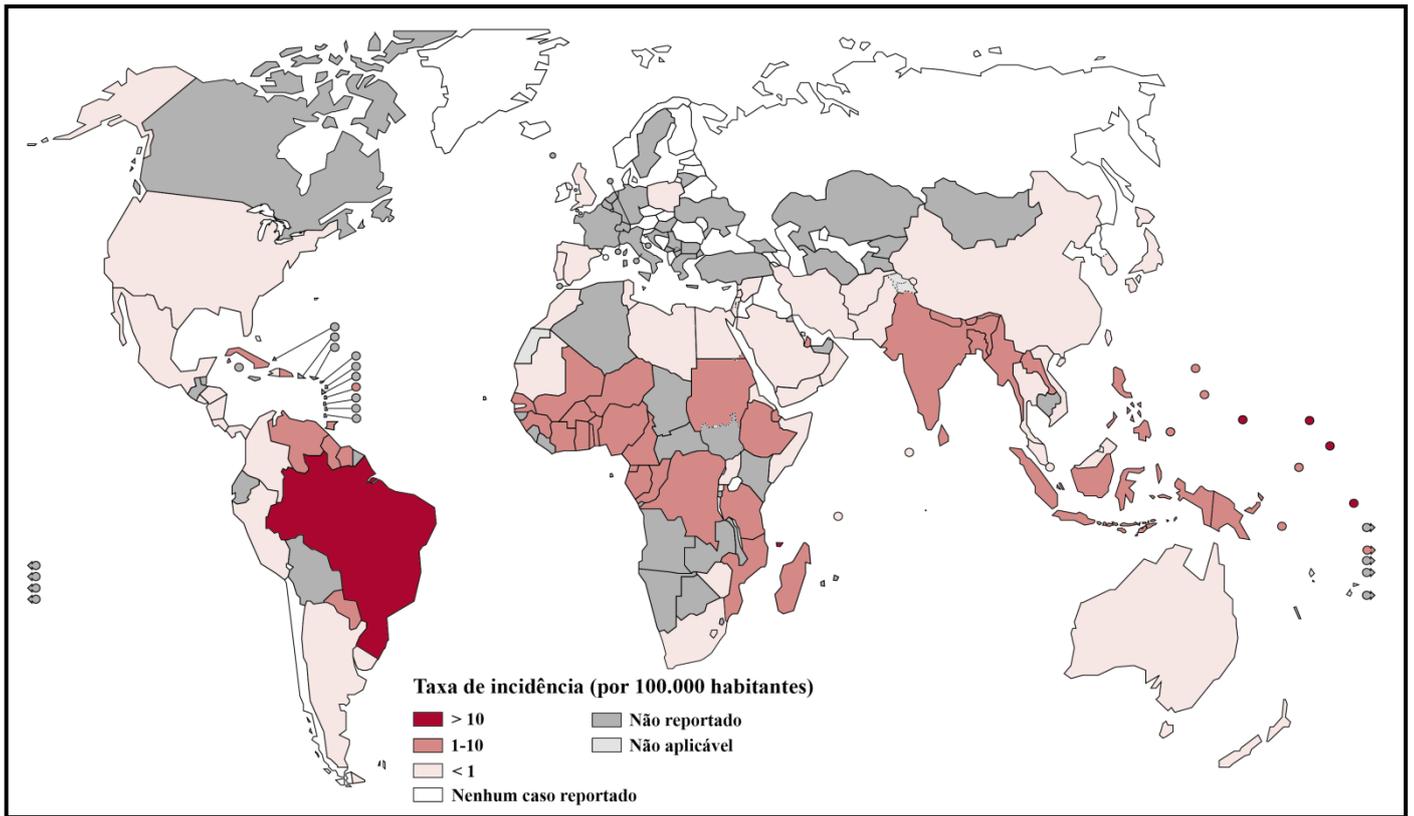


Figura 4: Taxas de incidência de hanseníase no mundo em 2015.

Fonte: Adaptado de WHO 2016

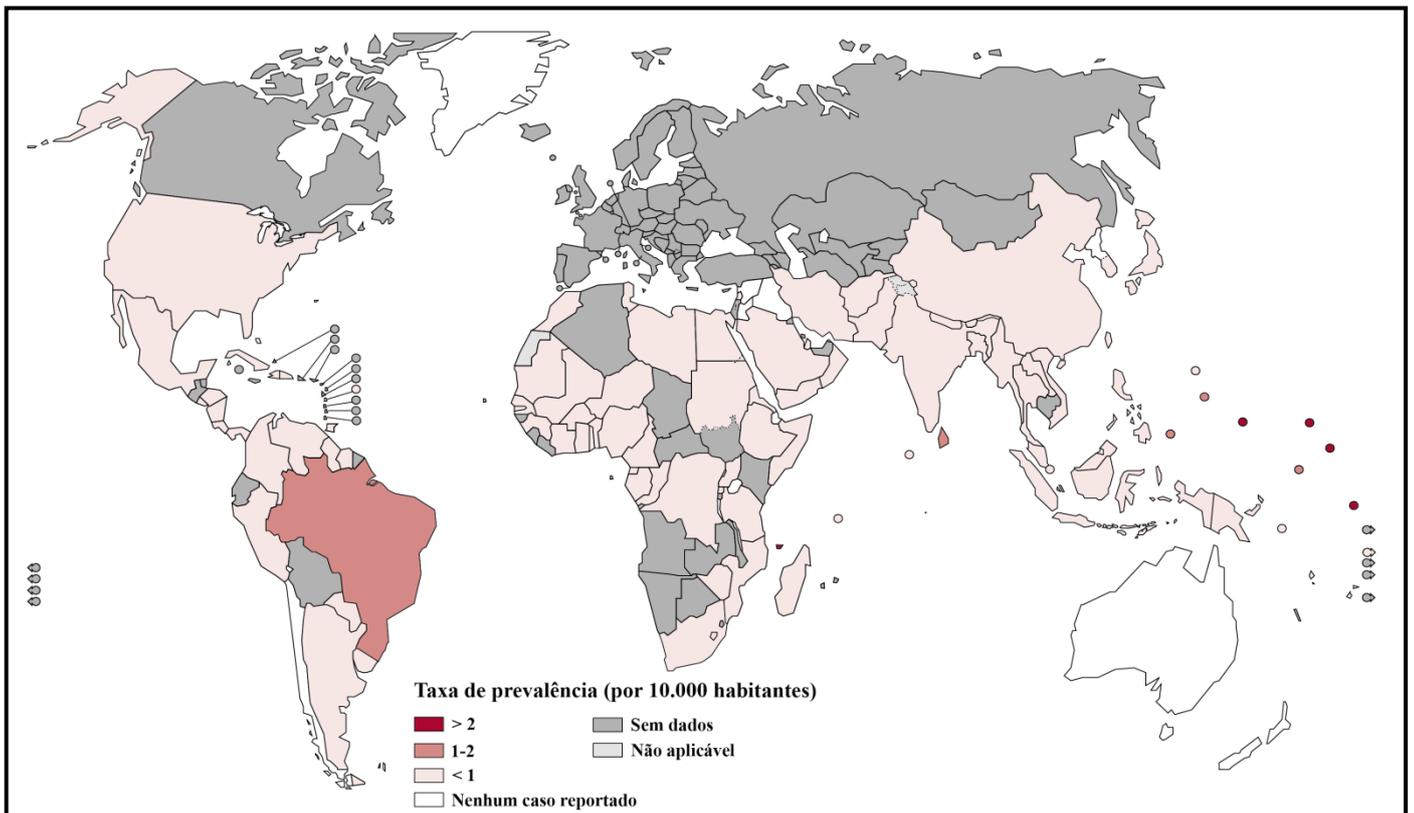


Figura 5: Taxas de prevalência de hanseníase no mundo em 2015.

Fonte: Adaptado de WHO 2016

O número de novos casos indica o grau de transmissão contínua da infecção. As estatísticas globais mostram que 199.992 (94%) dos novos casos de hanseníase foram notificados em 14 países que relataram mais de 1000 novos casos cada um e apenas 6% dos novos casos foram relatados no resto do mundo. A Índia relatou 127 326 novos casos, representando 60% dos novos casos globais de hanseníase; o Brasil representou 13% dos novos casos globais; já a Indonésia relatou 8% da carga global. No Brasil, em 2015, foram detectados 28.761 casos novos (Figura 6), a menor taxa de incidência dos últimos 10 anos, mostrando uma redução de quase 19.000 casos quando comparado ao ano de 2006, porém com um índice ainda maior (coeficiente geral de aproximadamente 14,07) do que a meta estabelecida pela OMS para erradicação da hanseníase, que é de até 10 casos a cada 100 mil habitantes (Brasil 2016).

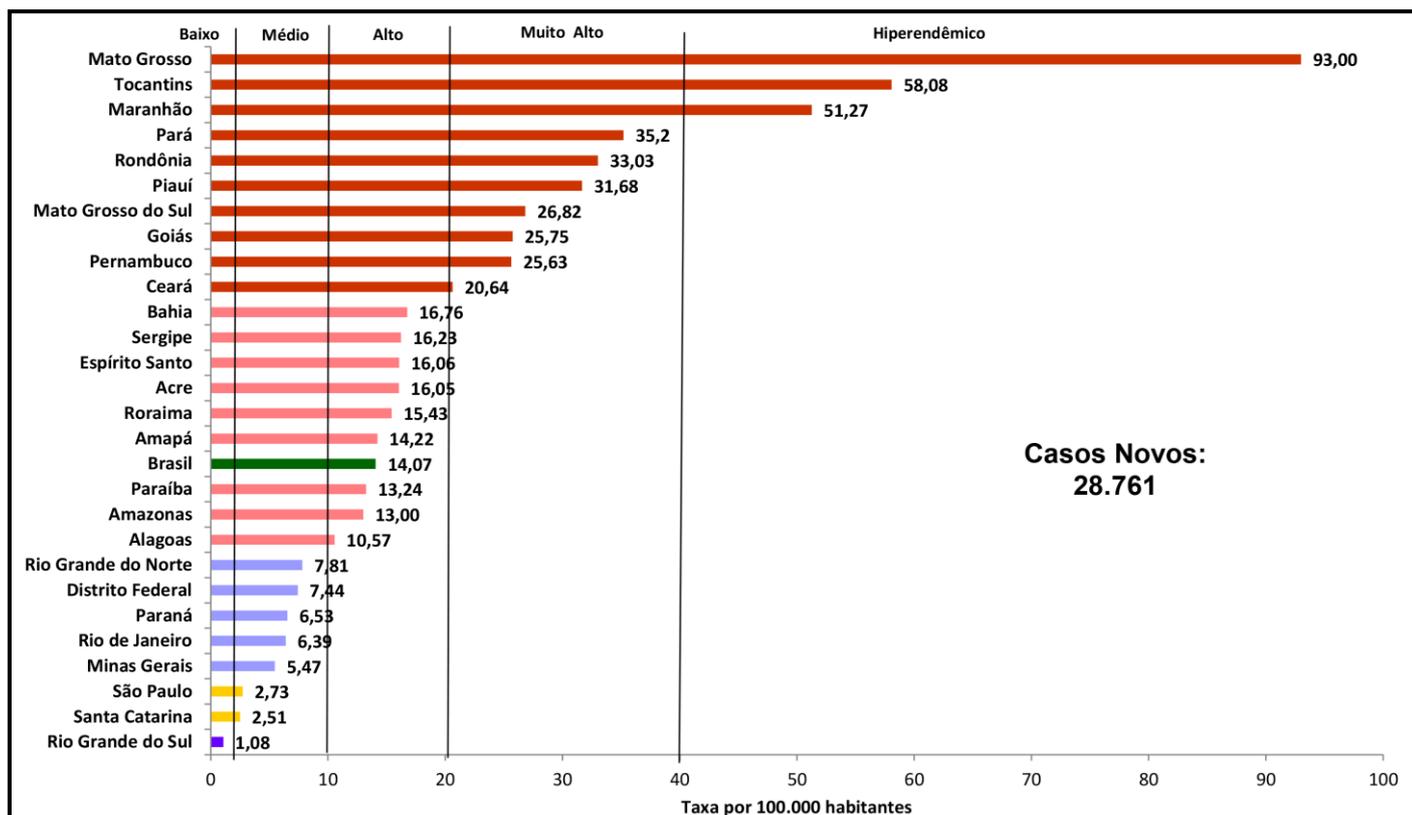


Figura 6: Taxas de incidência de hanseníase no Brasil em 2015.

Fonte: Adaptado de Brasil 2016

As bolsas de alta endemicidade ainda permanecem em algumas áreas de muitos países, incluindo países que relatam menos de 1000 novos casos. Algumas dessas áreas mostram taxas de notificação muito altas para novos casos e podem ainda testemunhar uma transmissão intensa. Índia, Brasil e Indonésia são os países mais endêmicos do globo, sendo responsáveis por 81% dos casos novos no mundo. O número total de casos com registro ativo no Brasil em 2015 foi de 20.702 (Figura 7), sendo o país responsável por 85,8% dos casos no continente americano e pelo segundo lugar mundial em número total de casos novos; além disso, ocupa o primeiro lugar na classificação mundial de novos casos por 100 mil habitantes (WHO 2016). No Brasil, os estados das regiões Nordeste, Centro-Oeste e Norte, detêm o maior número de doentes. Mato Grosso, Tocantins e Maranhão, são os estados com maior número de casos do país, sendo considerados hiperendêmicos em 2015, em função de apresentarem coeficiente de detecção superior a 40 casos por 100 mil habitantes (Brasil 2016).

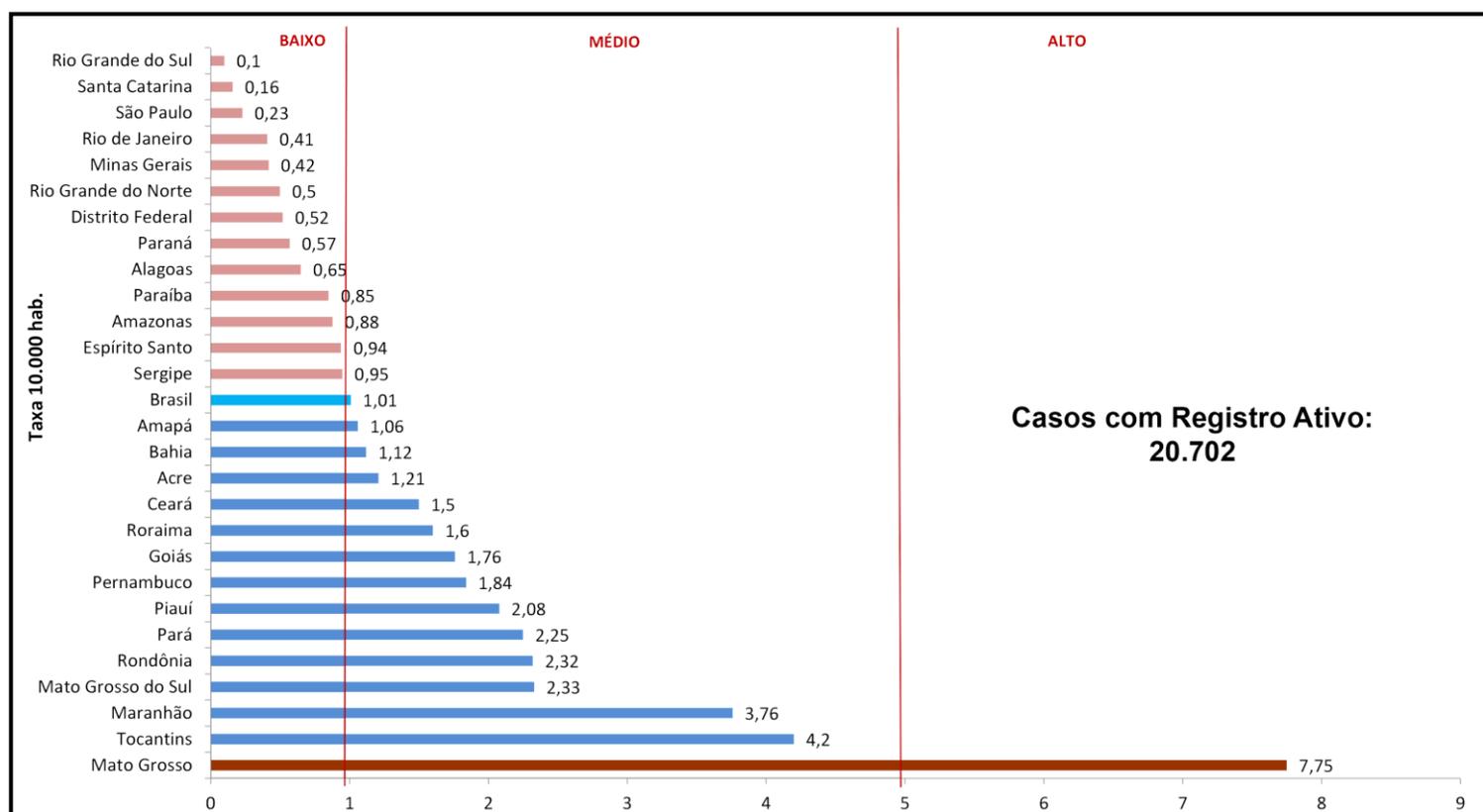


Figura 7: Taxas de prevalência de hanseníase no Brasil em 2015.

Fonte: Adaptado de Brasil 2016

1.4 Tratamento

O tratamento específico da hanseníase, recomendado pela OMS e preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil é a PQT, uma associação de Rifampicina, Dapsona e

Clofazimina (apenas para multibacilares) na apresentação de blister. Essa associação evita a resistência medicamentosa do bacilo que ocorre, com frequência, quando se utiliza apenas um medicamento, impossibilitando a cura da doença. É administrada através de esquema padrão, de acordo com a classificação operacional do doente: PB, 6 meses de tratamento e MB, 12 meses de tratamento (Tabelas 1 e 2). A poliquimioterapia, primeiramente recomendada pelo Comitê de Peritos da OMS em 1984, rapidamente se tornou o tratamento padrão da hanseníase e tem sido fornecida pela OMS gratuitamente a todos os países endêmicos desde 1995 (Ministério da Saúde, 2014).

Adulto	Rifampicina: dose mensal de 600mg (02 cápsulas de 300mg) com administração supervisionada.
	Dapsona: dose mensal de 100mg supervisionada e dose diária de 100mg autoadministrada.
Criança	Rifampicina: dose mensal de 450mg (01 cápsula de 150mg e 01 cápsula de 300mg) com administração supervisionada.
	Dapsona: dose mensal de 50mg supervisionada e dose diária de 50mg autoadministrada.
<p>Duração: 06 doses.</p> <p>Seguimento dos casos: comparecimento mensal para dose supervisionada.</p> <p>Critério de alta: o tratamento estará concluído com seis (06) doses supervisionadas em até 09 meses. Na 6ª dose, os pacientes deverão ser submetidos ao exame dermatológico, à avaliação neurológica simplificada e do grau de incapacidade física e receber alta por cura.</p>	

Tabela 1: Esquemas terapêuticos utilizados para Paucibacilar.

Fonte: Ministério da Saúde, 2014

Adulto	Rifampicina: dose mensal de 600mg (02 cápsulas de 300mg) com administração supervisionada.
	Dapsona: dose mensal de 100mg supervisionada e uma dose diária de 100mg autoadministrada.
	Clofazimina: dose mensal de 300mg (03 cápsulas de 100mg) com administração supervisionada e uma dose diária de 50mg autoadministrada.
Criança	Rifampicina: dose mensal de 450mg (01 cápsula de 150mg e 01 cápsula de 300mg) com

	administração supervisionada.
	Dapsona: dose mensal de 50mg supervisionada e uma dose diária de 50mg autoadministrada.
	Clofazimina: dose mensal de 150mg (03 cápsulas de 50mg) com administração supervisionada e uma dose de 50mg autoadministrada em dias alternados.
<p>Duração: 12 doses.</p> <p>Seguimento dos casos: comparecimento mensal para dose supervisionada.</p> <p>Critério de alta: o tratamento estará concluído com doze (12) doses supervisionadas em até 18 meses. Na 12ª dose, os pacientes deverão ser submetidos ao exame dermatológico, à avaliação neurológica simplificada e do grau de incapacidade física e receber alta por cura.</p> <p>Os pacientes MB que excepcionalmente não apresentarem melhora clínica, com presença de lesões ativas da doença, no final do tratamento preconizado de 12 doses (cartelas) deverão ser encaminhados para avaliação em serviço de referência (municipal, regional, estadual ou nacional) para verificar a conduta mais adequada para o caso.</p>	

Tabela 2: Esquemas terapêuticos utilizados para Multibacilar.

Fonte: Ministério da Saúde, 2014

A informação sobre a classificação operacional do doente é fundamental para se selecionar o esquema de tratamento adequado ao seu caso. Para crianças com hanseníase, a dose dos medicamentos do esquema padrão é ajustada de acordo com a idade e peso. Já no caso de pessoas com intolerância a um dos medicamentos do esquema padrão, são indicados esquemas substitutivos. A alta por cura é dada após a administração do número de doses preconizado pelo esquema terapêutico, dentro do prazo recomendado. O tratamento da hanseníase é ambulatorial, utilizando os esquemas terapêuticos padronizados.

1.5 *Mycobacterium leprae* e suas frações

M. leprae, agente causador da hanseníase, foi identificado em 1873, na Noruega, por Gerhard Henrik Armauer Hansen, o mesmo pertence à família Mycobacteriaceae da ordem Actinomycetales. É um parasito intracelular obrigatório que infecta predominantemente macrófagos, células endoteliais e células de Schwann, sendo a única espécie de micobactéria capaz de infectar o nervo periférico (Scollard *et al.*, 2006).

É um bacilo gram-positivo, reto ou ligeiramente encurvado (Figura 8). Assim como outras micobactérias, é considerado um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), pois se cora em vermelho pela fucsina e é resistente à descoloração pela lavagem com solução álcool-ácida (Ress, 1985). Em cortes histopatológicos, os bacilos podem se apresentar de forma isolada ou agrupada. Uma das características do *M. leprae* é o seu padrão de alta infectividade e baixa patogenicidade. A temperatura ótima de crescimento do *M. leprae* é abaixo de 37° C, o que pode explicar a sua predileção por áreas superficiais do corpo como a pele e nervos periféricos (Shepard, 1965).

M. leprae não é cultivável em meio de cultura artificial, resultando na impossibilidade de realização de diversos estudos que seriam necessários para elucidar vários aspectos de sua patogenia. Atualmente o modelo de infecção experimental em camundongos atímicos (*nude*), é o método que permite adquirir uma grande quantidade de bacilos viáveis para fins experimentais, pois os altos graus de imunodeficiência desses animais são extremamente susceptíveis à infecção por *M. leprae* (Lahiri *et al.*, 2005).

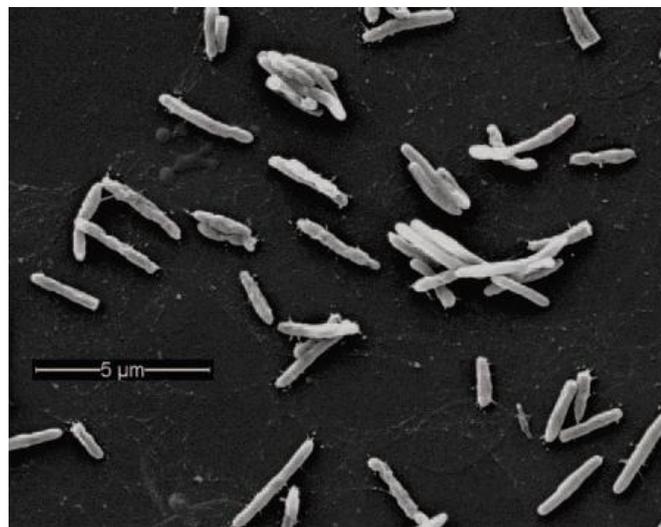


Figura 8: Microscopia eletrônica de varredura de *Mycobacterium leprae* derivada da pata de camundongo nude.

Fonte: Scollard *et al.*, 2006

M. leprae tem um genoma de aproximadamente 3.2 Mb, que é significativamente menor do que as demais micobactérias e, a ausência de genes fundamentais pode implicar na carência de vias enzimáticas críticas, sendo, desta forma, necessário o parasitismo (Cole *et al.*, 2001).

O envelope de *M. leprae* é constituído por três compartimentos: membrana plasmática, parede celular e a cápsula e constitui 40% do peso seco da bactéria e, como para todos os membros do gênero *Mycobacterium*, contém lipídeos, glicolipídeos, proteínas e porinas. Esse envelope consiste de membrana plasmática, uma bicamada de fosfolipídeos, ácido turbeculoesteárico e fosfatidilinositolmanosídeos (PIMs). A membrana plasmática é uma bicamada assimétrica composta principalmente de fosfolipídeos e proteínas. O lipoarabinomannan (LAM), componente de *M. leprae*, encontra-se ancorado à membrana plasmática via fosfatidilinositol. A parede celular consiste de peptídeoglicana covalentemente ligada a arabinogalactana, que por sua vez se liga aos ácidos micólicos (Figura 9) (Vissa & Brennan, 2001).

O parasito apresenta uma densa cápsula de lipídeos, externa à parede celular, que é rica em PGL-1 (glicolipídeo fenólico específico de *M. leprae*). Sua estrutura é composta de um trissacarídeo, fenol, fitiocerol e de ácido micoseossídico. Esta cápsula vem sendo relacionada à resistência a radicais livres, permitindo a sobrevivência intracelular da micobactéria e limitando a penetração de drogas antimicrobianas (Hunter *et al.*, 1982).

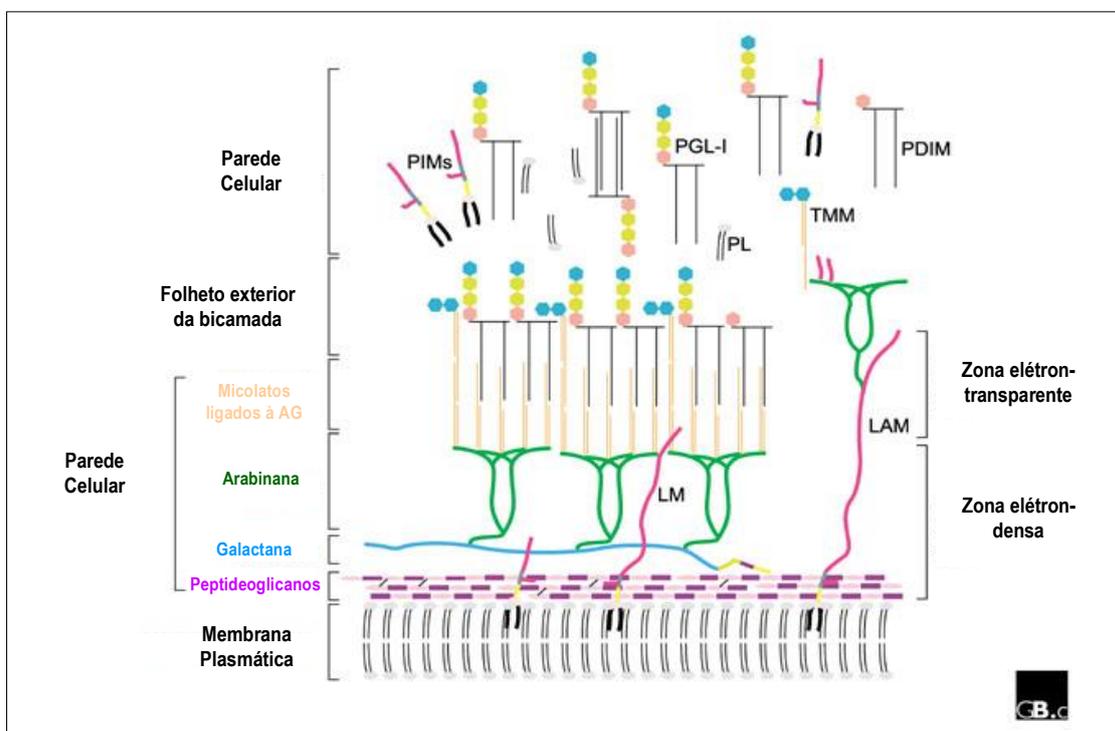


Figura 9: Modelo esquemático da parede celular de *M. leprae*. A membrana plasmática é recoberta por uma parede celular feita de peptídeoglicano associada covalentemente à galactana por uma unidade de ligação de arabinogalactana. Por sua vez, três cadeias ramificadas de arabinana são ligadas à galactana. A camada de peptídeoglicana-arabinogalactana forma a zona elétron-densa. Ácidos micólicos estão

ligados no final da cadeia de arabinana para formar o folheto interno da bicamada lipídica. O folheto externo é formado por ácidos micólicos da trealose monomicolato (TMMs) e ácidos micocerosóicos de ftiocerol dimicocerosato (PDIMs) e glicolípídeo fenólico (PGLs) como indicado no esquema. A bicamada forma a zona elétron-transparente. Uma cápsula composta basicamente de PGLs e outras moléculas como PDIMs, PIMs (fosfatidilinositol manosídeos) e PL (fosfolípídeos) rodeiam a bactéria. Lipoglicanas como PIMs, LM (lipomanana) e LAM, conhecidos por se ancorarem a membrana plasmática, também são encontrados na cápsula. Fonte: Adaptado de Vissa & Brennan (2001).

Os estudos utilizando frações celulares das micobactérias se baseiam na tentativa de identificar antígenos que sejam eficientes para o diagnóstico de doenças, porém existem dois fatores principais que são limitantes no caso da hanseníase: o primeiro é o fato da micobactéria não crescer em cultura, e também a grande quantidade de antígenos compartilhados por outras micobactérias (Brennan, 2000).

Os estudos de proteoma permitiram a identificação de algumas frações de *M. leprae* solúveis ou insolúveis altamente específicas. O proteoma da fração de membrana de *M. leprae* (MLMA) foi identificado por espectrometria de massas e gel. Nessa fração, há predomínio de dois antígenos de proteína de membrana (MMP-I e MMP-II – do inglês *Major membrane protein I and II*) que estão ausentes ou fracamente abundantes em outras micobactérias (Marques *et al.*, 1998). No entanto, o MLMA também é composto de grandes quantidades de lipomananas e lipoarabinomanana (LAM), que causam reatividade cruzada com outras micobactérias. (Marques *et al.*, 2004).

De acordo com Dagur *et al.* (2010) tanto o lisado total de *M. leprae* quanto a fração solúvel do *M. leprae* (MLSA) foram capazes de inibir a fosforilação de ERK ½ e p38 MAPK, levando à diminuição da expressão dos marcadores de ativação inicial CD25 e CD69 e à inibição da ativação de células T *in vitro*.

Ao contrário da fração de membrana, MLMA, a fração solúvel MLSA, tem sido mais bem estudada e, a fração MLSA sem LAM, e foi utilizada em teste clínico de fase II com o objetivo de ser utilizada para avaliação de resposta de hipersensibilidade em pacientes com hanseníase (Rivoire *et al.*, 2014).

Existem estudos que utilizam a lipoarabinomanana manosilada (ManLAM), a ManLAM foi capaz de prejudicar parcialmente a maturação de células dendríticas (DCs) e a resposta imune ativada por lipopolissacarídeo (LPS), contudo essas alterações na função de DCs foram revertidas com o *knockdown* do receptor DC-SIGN (Wu *et al.*,

2011). A interação do DC-SIGN com o ManLAM em DCs leva à produção de IL-10 dependente da ativação do fator de transcrição NF- κ B e à inibição da proliferação de células T em pacientes multibacilares da hanseníase (BL/LL) (Kumar *et al.*, 2013).

1.6 Interação entre Receptores do tipo Toll e *M. leprae*

Receptores do tipo Toll, (TLR – do inglês, *Toll like receptor*) representam um mecanismo pelo qual o sistema imune inato reconhece padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs – do inglês, *Pathogen-associated molecular pattern*) que são relativamente conservados entre microrganismos, mas estão ausentes nos hospedeiros. Esses receptores que são amplamente expressos por uma variedade de células imunes tais como monócitos, macrófagos, células dendríticas e algumas células epiteliais (Li *et al.*, 2013).

Embora o TLR2 tenha a capacidade de dimerizar com vários co-receptores TLRs, o heterodímero TLR2/1 são os principais pelos quais as células imunes reconhecem lipoproteínas micobacterianas. Exemplos de tais agonistas micobacterianos incluem *M. leprae* e *M. tuberculosis* (Hart & Tapping 2012). O heterodímero TLR2/1 pode ser ativado por lipoproteínas triaciladas, como por exemplo, lipoarabinomanana (Takeuchi *et al.* 2002), enquanto o heterodímero TLR2/6 é ativado por lipoproteínas diaciladas ativando uma resposta inflamatórias (Montoya & Modlin 2010).

As lipoproteínas 19-kD e 33-kD do *M. leprae* ativam monócitos e DCs através de TLR2. Em conjunto, as análises de lesões de pele de pacientes com hanseníase mostraram que o TLR2 foi fortemente expresso nesses tipos celulares em pacientes tuberculóides, que são caracterizados pela resistência ao crescimento de *M. leprae*, em contraste, o TLR2 foi fracamente expresso em lesões de pacientes lepromatosos, que são caracterizados pela grande quantidade de bacilos na pele (Krutzik *et al.*, 2003). Um estudo posterior do mesmo grupo mostrou que a ativação de TLR2/1 leva a uma rápida diferenciação de monócitos periféricos humanos em células dendríticas CD1b⁺, nos paciente tuberculoides e em células DC SIGN⁺, nos pacientes lepromatosos (Krutzik *et al.*, 2005).

Oliveira *et al.* (2003) descreveram que a sinalização via TLR2/1 ativa células de Schwann humanas através da lipoproteína 19-kD o que provoca um aumento no número de células apoptóticas, produção de citocinas inflamatórias, como IL-6 e IL-8, que

poderiam contribuir para a lesão no tecido, inclusive danos nos nervos periféricos na hanseníase.

Polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) nas regiões codificadoras das moléculas de TLR1 e TLR2 podem estar associados a uma maior suscetibilidade a hanseníase (Montoya *et al.*, 2009). Um estudo feito na Etiópia mostrou que o SNP no gene do TLR2 estava associado com suscetibilidade à forma lepromatosa da hanseníase (Bochud *et al.*, 2008). Um trabalho mais recente mostra que o mesmo SNP no gene TLR1 está fortemente associado a aumento da suscetibilidade a hanseníase (Wong *et al.*, 2010).

Alguns outros receptores da família TLR parecem correlacionar-se com a resistência ou suscetibilidade a hanseníase. O receptor TLR9 reconhece CpG DNA não metilado micobacteriano (Bafica *et al.*, 2005). É provável que TLR8 também esteja relacionado à defesa contra o *M. leprae*, já que foi descrita uma associação entre polimorfismos no gene de TLR8 e resistência a tuberculose (Montoya & Modlin 2010).

1.7 Célula Dendrítica

As DCs são as principais células apresentadoras de antígenos (APCs – do inglês, *antigen presenting cells*) e importantes células na ligação das respostas imunes inatas e adaptativas, pois estas células são especializadas para a captação, processamento, transporte e apresentação de antígenos para células T e ainda são capazes de realizar o *priming* de células T naïve (Demangel & Britton, 2000).

De acordo com Joffre *et al.* (2009) apesar das DCs constituírem apenas 1% de leucócitos mononucleares no sangue periférico, estas células estão localizadas em outros tecidos periféricos onde atuam como sentinelas do sistema imunológico, “patrulhando” antígenos.

Existem duas linhagens principais de DCs nos seres humanos, as DCs mielóides (MDCs), também denominadas DCs convencionais (cDCs) e DCs plasmocitóides (PDCs). As MDCs são originados de um progenitor mielóide na medula óssea, enquanto que as PDCs originam-se de um progenitor linfóide em órgãos linfóides. As MDCs dividem-se em células de Langerhans (LCs), células dendríticas intersticiais (IDCs) e células dendríticas derivadas de monócitos (mDCs). Os subtipos de DC migram para diferentes locais específicos (tecidos) ou circulam no sangue. As DCs

humanos no sangue e na pele são as mais caracterizadas, embora as essas células possam ser encontrados em outros locais, como pulmões ou intestinos (Conti *et al.*, 2014).

Os diferentes subtipos de DCs são classificados pela expressão de moléculas de superfície distintas, sendo assim, em humanos as PDCs são caracterizadas pela expressão de CD303 (BDCA-2), CD123 (IL-3R α) e CD304 (BDCA-4) e MDCs por CD11c. No sangue, as MDCs são subdivididas em três subctipos, chamados CD1c⁺ DCs, CD141⁺DCs e CD16⁺DCs. Na pele existem três tipos de MDCs, as células de LCs e as DCs cutâneas CD1a⁺ e CD14⁺, que apresentam diferenças fenotípicas e funcionais (Figura 10) (Salvador *et al.*, 2012).

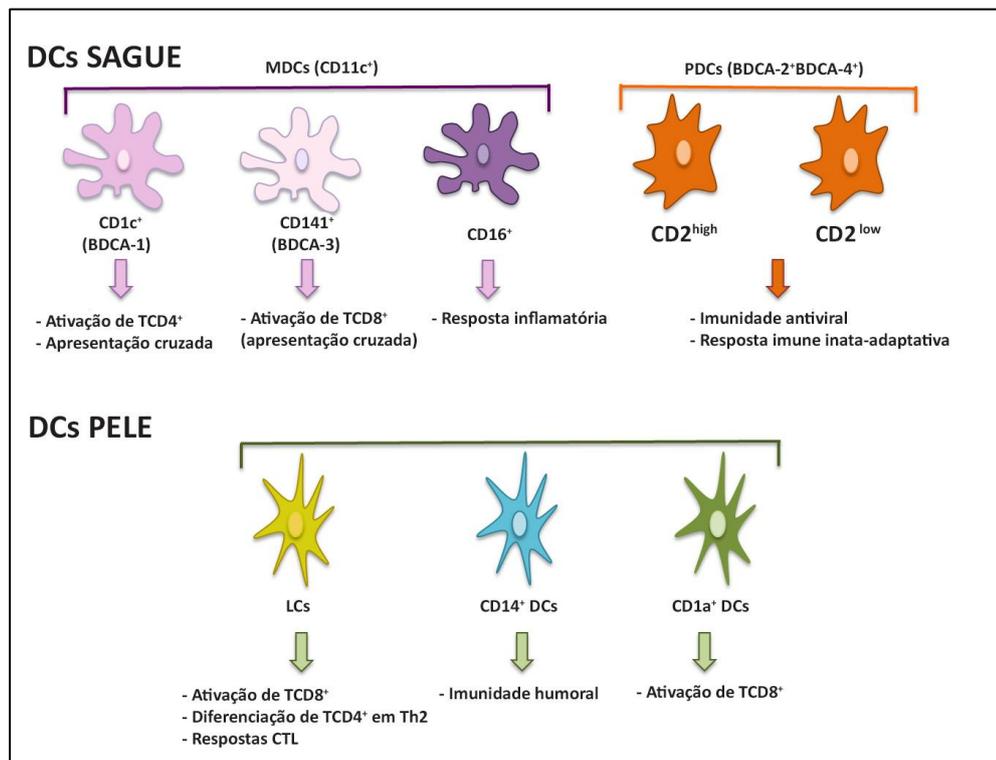


Figura 10: Visão esquemática dos diferentes subconjuntos de DCs humanas no sangue e na pele e suas funções na imunidade.

Fonte: Adaptado de Salvador *et al.*, 2012

Salluto & Lanzavecchia (1994) descreveram que as mDCs humanas podem ser diferenciadas *in vitro* a partir de monócitos na presença de IL-4, que inibe a diferenciação de monócitos em macrófagos, em conjunto com o fator estimulador do crescimento de granulócitos e macrófagos (GM-CSF). A diferenciação utilizando IL-4 e GM-CSF foi estabelecida no propósito de obter culturas de DCs imaturas *in vitro* sem

alterar as características fenotípicas e funcionais e também com a finalidade de explorar sua capacidade apresentadora de antígeno, comparando-as com outras APCs.

Embora o desenvolvimento de DCs a partir de precursores hemopoiéticos iniciais não seja totalmente compreendido, os estádios terminais de desenvolvimento de DCs e seu ciclo de vida durante uma resposta imune estão bem definidos (Banchereau *et al.*, 2000). As DCs imaturas residem nos tecidos periféricos e captam constantemente antígenos do ambiente local, processam e migram para os linfonodos e baço, onde ativam células T não sensibilizadas em associação com as moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de superfície (Shortman & Liu 2002). A migração e a transição funcional de DCs correlacionam-se com: diminuição da absorção do antígeno, aumento dos complexos MHC-peptídeo de superfície, regulação positiva das moléculas co-estimuladoras, expressão alterada dos receptores de quimiocinas e produção de citocinas que são cruciais para a célula T efetora ou citotóxica (Wu & Dakic 2004).

As DCs são provavelmente as primeiras células do sistema imune a entrar em contato com *M. leprae* (Modlin *et al.*, 1984) e as mesmas podem apresentar antígenos protéicos via MHC de classe I e MHC de classe II ou antígenos glicolipídicos via CD1 para linfócitos $\gamma\delta$ (Sieling *et al.*, 1999).

A polarização Th da resposta imune é induzida pela captação de bacilos e a produção de citocinas pelas DCs que regulam a inflamação local. As DCs de pacientes com a forma tuberculóide da hanseníase, assim como seus macrófagos ativados, são capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias, como a IL-12, que estimularão uma resposta imune do tipo Th1. Porém as DCs de pacientes com a forma lepromatosa da doença produzem IL-4 e IL-10, polarizando a resposta para o pólo Th2 (Maeda *et al.*, 2003).

Monócitos periféricos de pacientes com a forma lepromatosa da hanseníase (LL) não se diferenciam em DCs CD1⁺ (Sieling *et al.*, 1999). Além disso, lesões de pacientes LL/BL apresentam um déficit acentuado nas DCs, tanto na derme quanto na epiderme (Lee *et al.*, 2007). Observa-se um aumento da expressão da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), que suprime a apresentação de antígenos de *M. leprae* para células T, nos pacientes multibacilares (De Souza Sales *et al.*, 2011).

De acordo com Austyn (2016) as DCs podem suprimir as respostas de células T. Essas células apresentadoras com atividade imunossupressora parecem desempenhar um importante papel na manutenção da tolerância periférica de células T. A célula T Foxp3+, atualmente, é a célula mais estudada do sistema imune dentre as células reguladoras (Massone *et al.*, 2010). Em um estudo de Fontenot *et al.* (2003), mostrou que as células TCD4+ expressam constitutivamente o fator de transcrição nuclear FOXP3, sendo essenciais para prevenir a auto-imunidade e regular respostas imunes exacerbadas, pela produção de citocinas como IL-10 e TGF- β , ou pelo contato célula-célula, suprimindo assim a ativação de células TCD4⁺ e TCD8⁺.

Um estudo de imunohistoquímica nas lesões de pacientes com as diversas formas clínicas de hanseníase mostrou que em média 2,9% das células TCD4+ presentes nas lesões dos pacientes são Foxp3+. Esse estudo não apresentou diferença estatística na contagem de células T regs entre formas TT, BT, BL e LL. No entanto foi possível observar que as células Foxp3⁺ permaneciam fora do granuloma (Massone *et al.*, 2010).

1.8 Papel de IDO na hanseníase

A IDO é uma enzima intracelular que catalisa a etapa inicial do catabolismo do triptofano (Trp) ao longo da via das quinureninas (Mellor & Munn, 2004). Vários tipos de células, como macrófagos, células epiteliais e DCs expressam IDO que pode ser induzida por citocinas pró-inflamatórias, como o IFN- γ , ligantes de TLRs, como LPS, e interações entre células imunes através de moléculas co-estimuladoras, como CD80 e CD86. Sabe-se que a IDO pode afetar a imunidade através de dois mecanismos não exclusivos: o estabelecimento de uma resposta local com “privação de aminoácidos” que inibe a proliferação celular e patogênica; a produção de metabólitos de Trp com funções imunomoduladoras ou citotóxicas específicas que inibem a ativação de células T e modulam a diferenciação de células T naïve em células T reguladoras (Tregs) (De Araújo *et al.*, 2017).

O primeiro passo da rota das quinureninas é a conversão do Trp em N-formilquinurenina pela enzima IDO. A N-formilquinurenina é inicialmente convertida em quinurenina e, então, pela enzima quinurenina 3- monooxigenase (KMO), na 3-hidroxiquinurenina (3-HK). Ambas, quinurenina e 3-hidroxiquinurenina podem ser oxidadas pela enzima quinureninase (KINU) a ácido antranílico (AA) ou ácido 3-

hidroxiantranílico (3-HANA), respectivamente; ou eles podem ser convertidos pelas enzimas quinurenina aminotransferase I ou II (KATI ou KATII) a ácido quinurênico (KYNA) ou ácido xanturênico (XA), respectivamente. O ácido 3-HANA, por sua vez, pode ser oxidado pelo ácido 3-hidroxiantranílico oxidase (3-HAO) para formar ácido quinolínico (QUINA) (Figura 11) (Braidly & Grant, 2017).

Os metabólitos dessa via, comumente chamados de quinureninas, podem estar envolvidos em vários processos fisiológicos e patológicos e, diversos trabalhos vêm mostrando a participação das quinureninas na fisiopatologia de várias doenças neurodegenerativas. Os metabólicos 3-HANA e 3-HK geram espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês, *Reactive Oxygen Species*) e pode induzir dano neural, e o QUINA, um agonista de N-metil-D aspartato pode causar morte neural do tipo necrótica ou apoptótica (Mackay *et al.*, 2006).

Em hospedeiros imunocompetentes a infecção pelo *Toxoplasma gondii* leva a produção de IFN- γ e conseqüentemente um aumento de IDO, que converte Trp em quinurerinas que inibem o crescimento do protozoário (Notarangelo *et al.*, 2014). Além disso, um trabalho recente mostrou que o 3-HK, gerado durante a infecção, é ativo contra o *Trypanosoma cruzi* (Knubel *et al.*, 2017).

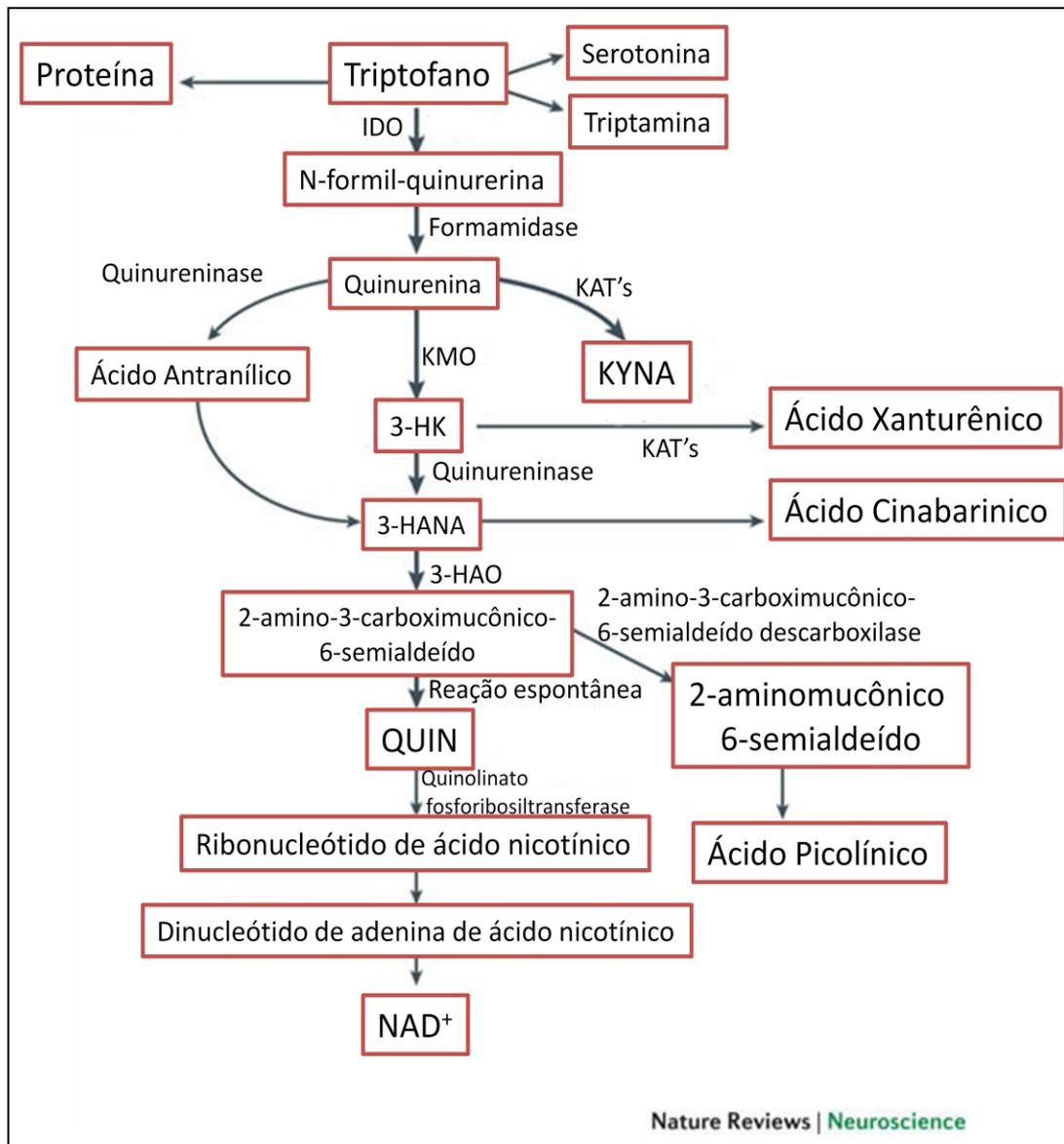


Figura 11: Via da quinurenina no metabolismo do triptofano.

Fonte: Adaptado de Schwarcz *et al.*, 2012

Já que a maioria dos microrganismos depende desse aminoácido essencial para sua sobrevivência, a degradação dessa molécula por células do sistema imune inato foi apontada como um importante mecanismo microbicida (Mellor & Munn, 2004). Entretanto, essa enzima tem sido descrita na promoção de respostas imunorreguladoras (Plain *et al.*, 2011; Pallotta *et al.*, 2011).

Inicialmente, a IDO foi descrita como um mecanismo efetor bactericida e também ligada à imunossupressão de células T e tolerância. Mas nos últimos anos, tem-se acumulado evidências de que o IDO também desempenha um papel importante

durante infecções virais, incluindo HIV, influenza e hepatite B e C e sepse (Schmidt & Schultze, 2014).

Schmidt & Schultze, 2014 descreveram que o aumento da atividade de IDO em células infectadas por bactérias induz uma potente restrição do crescimento bacteriano. Além da indução de ROS e radicais óxido nítrico, a atividade de IDO auxilia na degradação de Trp para o *starve* (morte de fome) das bactérias auxotróficas Trp. Um outro efeito bactericida espécie –específico de aumento da ativação de IDO é a produção de metabólitos de quinurenina tóxicos. O recrutamento de células Treg e níveis crescentes de íons livres podem ajudar como loop de feedback negativo para encerrar as respostas inflamatórias (Figura 12).

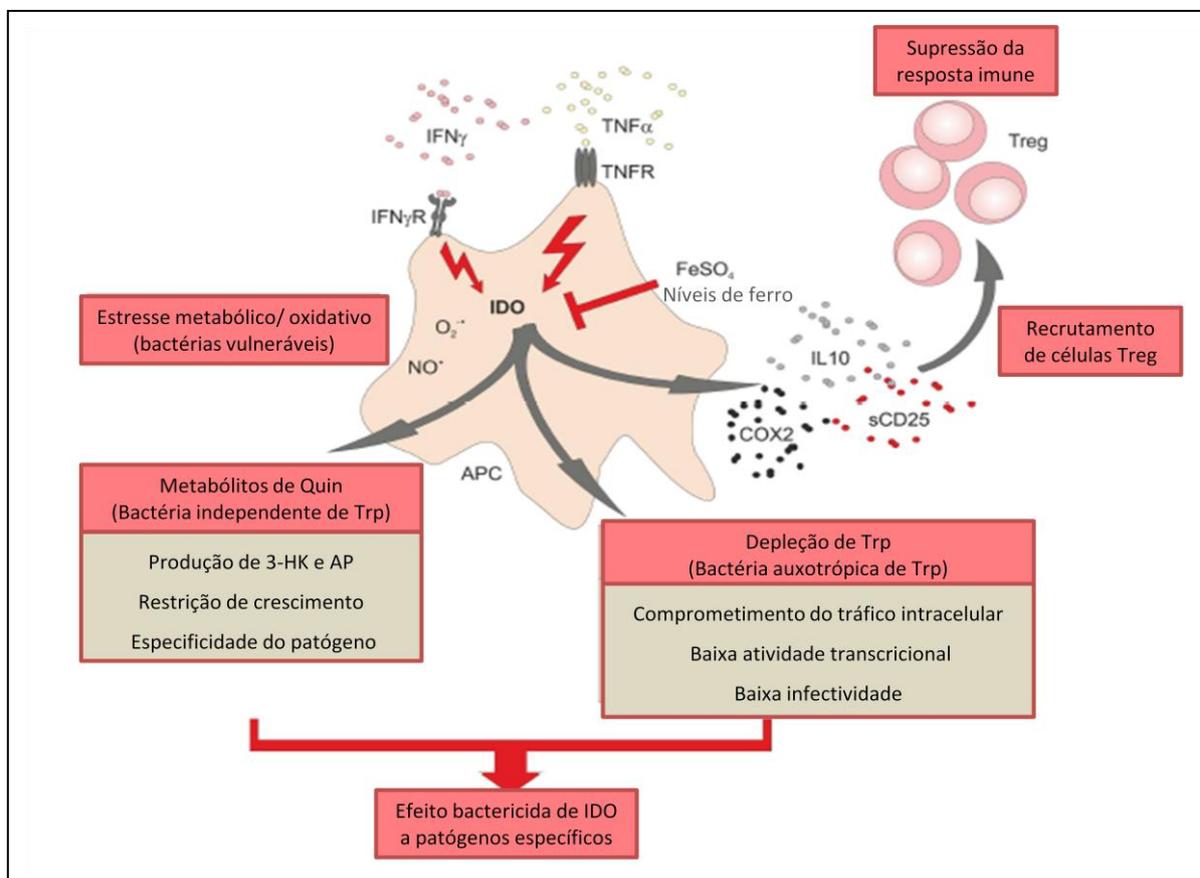


Figura 12: Visão esquemática do papel central do IDO nas respostas imunes a infecções bacterianas.

Fonte: Adaptado de Schmidt & Schultze, 2014

De Souza Sales *et al.* (2011) demonstraram um aumento de células IDO+ em lesões de pele de pacientes lepromatosos. A razão quinurenina/triptofano e os níveis de

concentração de quinurenina avaliados por cromatográfica líquida de alta eficiência (HPLC) são índices que refletem a atividade enzimática de IDO. A atividade de IDO foi avaliada no soro de pacientes com hanseníase. Foi observado um aumento significativo da atividade de IDO nos soros de pacientes lepromatosos em relação aos pacientes paucibacilares e as voluntários saudáveis.

Os estudos *in vitro* demonstraram que *M. leprae* induz um aumento da expressão gênica e protéica de IDO em monócitos humanos por um mecanismo dependente de IL-10 (Moura *et al.*, 2012). De acordo com esse trabalho, nas lesões lepromatosas também foi observado um aumento de CD123, um receptor do tipo *scavenger* capaz de reconhecer complexos de Hemoglobina-Haptoglobina, demonstrou-se que o CD163 tem um papel duplo na célula, aumentando os estoques intracelulares de ferro, o que é benéfico ao bacilo e, funcionando como um co-receptor para a entrada do bacilo na célula. No polo lepromatoso da doença, *M. leprae* induz IL-10 que aumenta a expressão de CD163 e IDO, que contribuem para a sobrevivência do bacilo. Esses dados sugeriram um papel tolerogênico de IDO na imunopatogênese da hanseníase.

No entanto, um trabalho mais recente demonstrou um aumento de IDO, dependente de IFN- γ , em células de lesão de pele de pacientes multibacilares que desenvolveram um episódio inflamatório agudo conhecido como reação reversa, sugerindo que a IDO pode apresentar efeitos antagônicos na patogenia da doença (Andrade *et al.*, 2015).

2. Justificativa

As pesquisas sobre os mecanismos subjacentes à infecção, patogênese e sequelas clínicas pela infecção de *M. leprae* tem sido limitada pelo fato do bacilo infectar apenas humanos e não poder ser cultivado *in vitro*. Na tentativa de elucidar mecanismos que podem ser utilizados pelo bacilo para modular a resposta à infecção, algumas moléculas que possuem um papel na defesa contra patógenos vem sendo investigadas, entre elas, a IDO.

Dados anteriores do nosso grupo demonstraram que há um aumento da expressão gênica e protéica da enzima IDO em amostras de lesão de pele e no soro de pacientes com a forma multibacilar da doença (De Souza Sales *et al.*, 2011). Em conjunto, foi demonstrado que *M. leprae* induz aumento na expressão e atividade dessa enzima em monócitos humanos por um mecanismo dependente de IL-10 (Moura *et al.*, 2012).

Em contraste, a análise da expressão de IDO demonstrou um aumento ainda maior nas lesões de pacientes multibacilares que desenvolveram um episódio de inflamação aguda conhecido como reação reversa, onde há uma intensa morte micobacteriana, por um mecanismo mediado por IFN- γ (Andrade *et al.*, 2015).

Na literatura, já foi descrito que o aumento da atividade enzimática de IDO pode ocorrer por diferentes citocinas como IFN- γ , IL-6, IL-10 e TGF- β (Orabona *et al.*, 2008; Pallota *et al.*, 2011, Moura *et al.*, 2012; Andrade *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016). Apesar de nossos estudos *in vitro* apontarem para o envolvimento de IL-10 na indução de IDO em macrófagos lepromatosos e de IFN- γ na reação reversa, o papel funcional da enzima nesses dois modelos ainda não está completamente elucidado. Sabendo que as DCs desempenham um papel fundamental na modulação da resposta imune inicial no local da invasão por *M. leprae* (Modlin *et al.*, 1984), o presente estudo justificou-se pela necessidade de avaliarmos os mecanismos reguladores da expressão e atividade de IDO em mDCs estimuladas por *M. leprae* e suas frações.

A compreensão do papel funcional da IDO na hanseníase abrirá perspectivas para o uso de substâncias moduladoras da atividade dessa enzima de modo complementar a poliquimioterapia, uma vez que a realidade do tratamento de pacientes multibacilares hoje é que cerca de 50% recebem alta clínica sem apresentarem cura baciloscópica, o que gera a demanda por fármacos que atuem especificamente para diminuir a quantidade de bacilos.

3. Objetivos

Objetivo Geral

Estudar os mecanismos reguladores da expressão e atividade da enzima IDO em células dendríticas diferenciadas de monócitos (mDCs) estimuladas por *M. leprae* e suas frações.

Objetivos Específicos

- 3.1 Avaliar a eficiência do protocolo de diferenciação de mDCs;
- 3.2 Avaliar a capacidade de *M. leprae* e suas frações de alterarem o fenótipo de mDCs;
- 3.3 Determinar a produção de citocinas em DCs estimuladas por *M. leprae* e suas frações;
- 3.4 Investigar se *M. leprae* e suas frações são capazes de induzir a expressão e atividade de IDO em mDCs;
- 3.5 Determinar o papel de IL-10 e TNF- α na indução de IDO nas mDCs;
- 3.6 Investigar o envolvimento da via TLR2 na indução de IDO por *M. leprae* e suas frações em mDCs;
- 3.7 Determinar a via de indução de IDO por *M. leprae* em mDCs estimuladas *in vitro* por 24h;
- 5.7** Avaliar a capacidade das mDCs estimuladas ou não com *M. leprae* de induzir um fenótipo supressor nos linfócitos T;
- 3.9 Investigar a importância de IDO na viabilidade do bacilo na mDC.

4. Materiais e Métodos

4.1 Obtenção das *buffy coats*

Os *buffy coats* foram obtidos de doadores saudáveis pelo serviço de hemoterapia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro através de parceria técnico-científica aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz, sob o parecer 1.538.467. Os critérios de inclusão e exclusão foram os mesmos utilizados para a triagem em bancos de sangue, tendo sido excluídos nesse estudo voluntários com menos de 18 anos e cuja triagem sorológica tenha sido positiva para Hepatite B (HbsAg e Anti-HBc), Hepatite C (Anti-HCV), AIDS/SIDA (HIV I/II – teste combinado Ag+Ac), Doença de Chagas (Anti-T. cruzi), Sífilis (VDRL – não treponêmico), HTLV-I e HTLV-II, Malária e Citomegalovírus (CMV). Também foram excluídos pacientes com doenças autoimunes, gestantes e pacientes com anemia.

4.2 Separação de células mononucleares do sangue periférico

O sangue foi diluído em tampão fosfato salina (PBS) e posteriormente adicionou-se Ficoll Hypaque (GE Healthcare, Suécia) em cada para separação das células por gradiente de densidade. Após a rotação por 30 minutos, à temperatura ambiente, foi coletada a nuvem de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e posteriormente lavadas com PBS. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas novamente. O sobrenadante foi novamente descartado e o *pellet* foi ressuspenso em 2 mL de meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). A viabilidade das células foi verificada através da solução de Azul de Tripán 0,4% (Sigma-Aldrich) na diluição 9 partes de Tripán para 1 de células e a contagem foi realizada em Câmara de Neubauer.

Após a contagem, as células foram ressuspenso em meio RPMI (Gibco Invitrogen Corporation 1640, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco Invitrogen Corporation, EUA), L-glutamina (Gibco Invitrogen Corporation, EUA) a 2mM, penicilina a 100U/mL e estreptomicina (Gibco Invitrogen Corporation, EUA) a 100µg/mL (meio completo). Para os experimentos utilizando *M. leprae* viável o antibiótico utilizado ampicilina a 50 µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich, EUA).

4.3 Obtenção de monócitos e células dendríticas derivadas de monócitos (mDCs)

As células mononucleares do sangue periférico obtidas de doadores saudáveis foram marcadas com *beads* magnéticas para CD14 (20µl de MicroBeads para 10⁷ de células / MACS Miltenyi Biotec) por 15 minutos a 4°C. Após esse tempo, as células foram lavadas com uma solução contendo 5% soro fetal bovino, 1mM EDTA e PBS. Em seguida, essas células foram passadas numa coluna de separação magnética, e as células CD14⁺ foram obtidas através da seleção positiva. As células CD14⁺ foram plaqueadas e estimuladas por 24 horas. Alternativamente, após a separação dos monócitos, as células CD14⁺ foram cultivadas na presença de meio contendo IL-4 (10 ng/mL) e GM-CSF (50 ng/mL) (PeproTech, NJ, USA) por 6 dias, para a diferenciação das células CD14⁺ em células dendríticas derivadas de monócitos (mDCs).

4.4 Estimulação das culturas de PBMCs, monócitos e células dendríticas

Estímulo	Concentração	Marca
<i>M. leprae</i> irradiado	0.1, 1 e 10 µg/mL	BEI Resources (NIH/ATCC)
<i>M. leprae</i> viável	MOI 10:1	Instituto Lauro de Souza Lima, SP
MLSA	0.1, 1 e 10 µg/mL	BEI Resources (NIH/ATCC)
MLMA	0.1, 1 e 10 µg/mL	BEI Resources (NIH/ATCC)
1-MT	4 µM	Sigma Aldrich
Pam3Cys	10 µg/mL	Sigma Aldrich
anti-human TNF-α	500 µg/mL	Peptotech
rabbit anti-human IL-10	100 µg/mL	Peptotech
Mab-mTLR2	1 µg/mL	InvivoGen
Brefeldina A	5 mg/mL	BioLegend

Tabela 3. Estímulos utilizados nas culturas *in vitro*

4.5 Ensaio Imunoenzimático

Os sobrenadantes das culturas de 24 horas foram recolhidos após o período de incubação e congelados a -20°C. As citocinas nos sobrenadantes foram dosadas por ELISA com kits específicos. As citocinas avaliadas foram: TNF-α, IL-6, IL-10 e IL-15, conforme as instruções do fabricante (eBioscience).

4.6 Citometria de Fluxo

4.6.1 Citometria Extracelular

Para a análise fenotípica das mDCs foi realizada a técnica de citometria de fluxo. Dois parâmetros foram avaliados: o percentual de células positivas e, a média de

intensidade de fluorescência (MIF) para CD14, HLA-DR, CD11c, CD209, CD86, CD83, CD303, CD304 e CD123 (Tabela 3).

Para a marcação e posterior análise por citometria, as células que ficaram em cultura foram lavadas com PBS-FACS (PBS + 0,1% de BSA + 0.01% de azida). Após a lavagem, as células foram incubadas por mais 30 minutos, em gelo, com anticorpos monoclonais já mencionados. Ao término da incubação, as células foram lavadas, e fixadas com PFA 2%. As células foram lavadas novamente e ressuspensas em 500µl de PBS-FACS e em seguida foi feita a aquisição em citômetro de fluxo (BD Accuri). Para cada amostra, um mínimo de 10.000 eventos foram adquiridos. A análise foi realizada no *software* BD Cflow.

4.6.2 Citometria Intracelular

Nos ensaios para análise da expressão intracelular de citocinas foi utilizado Brefeldina A (BioLegend) na concentração 5 mg/mL, por 12 horas nas culturas. Para a marcação intracelular, após o tempo de estimulação as células foram transferidas da placa para mini tubos de citometria. As células foram lavadas e posteriormente fixadas (PFA 2%). Em seguida, bloqueadas e permeabilizadas (Saponina 0.15%). Subsequentemente as células foram incubadas por 30 minutos e protegidas da luz, com anticorpos monoclonais IDO ou TNF- α . Ao término da incubação, as células foram lavadas, ressuspensas para posterior a leitura em citômetro de fluxo (BD Accuri). Para cada amostra, um mínimo de 10.000 eventos foram adquiridos. A análise foi realizada no *software* BD FlowJo.

Anticorpo	Clone	Nº de catálogo	Marca	Fluorocromo
CD14	61D3	120149-42	eBioscience	PE
HLADR	G46-6	555811	BD eBioscience	FITC
CD11c	3.9	301606	BioLegend	PE
CD209	eB-h209	11-209973	eBioscience	FITC
CD86	IT2.2	15-0869-71	eBioscience	PE-Cy5
CD83	HB1Se	305320	BioLegend	PerCP-Cy5.5
CD303	201 ^a	354280	BioLegend	FITC
CD304	AD5-17F6	130-090-900	Milteny Biotec	APC
CD123	6H6	306012	BioLegend	APC
IDO	700838	IC6030P	R&D	PE
TNF- α	Mab11	561023	BD eBioscience	AlexaFluor700
CD4	S3.5	MHCD0412	Catalg	PeCy7
CD25	BC96	17-0259-42	BD eBioscience	APC
CTLA4	14D3	12-1529-73	eBioscience	PE

Tabela 4. Anticorpos utilizados para citometria de fluxo

4.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

4.7.1 Extração de RNA

O RNA total das culturas de mDCs foi extraído utilizando o regente TRIzol® (Lif technologies, EUA) segundo a metodologia descrita pelo fabricante. Após os períodos de estimulação, o sobrenadante das culturas foi retirado e aliquoteado, e então adicionado 500 µL de TRIzol® em cada poço, para lise das células aderentes. Posteriormente, adicionou-se 200 µL de clorofórmio (Merck, Alemanha) em cada tubo e os mesmos foram homogeneizados por inversão até se obter um aspecto leitoso. Após isso, os tubos foram centrifugados a 12000 x g por 15 min a 4° C. A fase aquosa contendo o RNA (fase superior) foi transferida para novos tubos de 1,5 mL contendo 500 µL de isopropanol (Sigma-Aldrich, EUA), misturada por inversão e incubada a -70° C por no mínimo um dia. As fases intermediária e orgânica foram armazenadas a -20 °C para posterior extração de DNA e proteína. Após o período de incubação, foi adicionado 2 µL de GlycoBlue® (Ambion, EUA) em cada tubo, para melhor visualização do sedimento, e então centrifugados a 14000 x g por 20 min a 4° C. Os sobrenadantes foram descartados e o material sedimentado lavado com 500 µL de etanol 70% por centrifugação a 10000 x g por 10 min a 4° C. Em seguida os sobrenadantes foram removidos, os sedimentos secos à temperatura ambiente por cerca de 10 min e em seguida ressuspensos em 20 µL de água tratada com dietilpirocarbonato 0,01% (DEPC, Life technologies, EUA).

4.7.2 Quantificação de ácidos nucleicos

A quantificação dos ácidos nucleicos foi realizada por espectrofotometria utilizando o instrumento NanoDrop® ND-1000 (Thermo scientific, EUA). Inicialmente foi lido 1 µL de água DEPC/água ultrapura para determinar o “branco”. Em seguida, 1 µL de cada amostra foi lido contra o “branco” no comprimento de onda de 260 nm. A avaliação da pureza foi determinada pela razão da absorbância (A) em dois comprimentos de onda: $A_{260/280}$ indica o grau de contaminação por proteínas, enquanto $A_{260/230}$ indica o grau de contaminação por compostos orgânicos. As amostras foram consideradas com alto grau de pureza quando as razões $A_{260/280}$ e $A_{260/230}$ apresentaram valores > 1,8.

4.7.3 Análise da integridade do RNA

A integridade do RNA extraído foi avaliada por gel desnaturante de 1,2% de agarose (Life technologies, EUA) em tampão MOPS 1X (Sigma-Aldrich, EUA). Inicialmente as amostras foram desnaturadas adicionando-se 200 ng de RNA a 35% formamida, MOPS 1X, 0,125% corante azul de bromofenol e 1 µL de SYBR Green II 100X (Life technologies, EUA). Em seguida as amostras foram incubadas em banho seco a 65° C por 15 minutos e depois aplicadas no gel. A corrida de eletroforese foi realizada em corrente elétrica de 100 V por 50 minutos. Após esse período, o gel foi analisado por sistema de fotodocumentação (L-Pix touch, Loccus biotecnologia, SP). O RNA foi considerado íntegro quando observadas as subunidades ribossomais esperadas (28S e 18S).

4.7.4 Tratamento do RNA com DNase

Após a quantificação e confirmada a integridade do RNA extraído, o mesmo foi submetido ao tratamento com DNase. Para tal, foi utilizado o kit TURBO DNA-free™ (Life technologies, EUA) seguindo as recomendações do fabricante, em uma reação com volume final de 30 µL. Inicialmente, em tubos de 0,6 mL, foi adicionado 3 µg de RNA, 0,1 volume de tampão de enzima 10X e 1 µL da enzima Turbo DNase, seguido por incubação a 37° C durante 30 min. Após o período de incubação, foi adicionado 0,1 volume do reagente de inativação enzimática. Em seguida, os tubos foram incubados à temperatura ambiente durante 5 min, agitando os tubos manualmente 2-3 vezes durante esse período para homogeneizar o conteúdo. Após isso, os tubos foram centrifugados a 10000 xg por 2 min, os sobrenadantes contendo o RNA foram cuidadosamente transferidos para novos tubos e o RNA novamente quantificado como descrito no item 4.5.3.

4.7.5 Síntese de cDNA

O cDNA foi obtido a partir do RNA total das culturas de mdTHP-1 mediante o uso da enzima transcriptase reversa Superscript III® (Life 33L33hnologies, EUA) em uma reação com volume final de 20 µL. Inicialmente, 500 ng de RNA e de Oligo (dT) (para a análise da expressão gênica de mdTHP-1) ou Random Primer (para análise da expressão gênica de micobactérias) foram incubados a 65° C por 5 min para a linearização da molécula de RNA. Após a incubação foi adicionado o tampão da enzima

em concentração de 1X, dNTP 0,125 mM, DTT 10 mM, 40 U de RNase Out® e 200 U da enzima Superscript III®. Essa mistura foi incubada a 50° C por 1 hora para transcrição, seguida de incubação a 70° C por 5 min para inativação da enzima. Após a incubação as amostras foram armazenadas a -20° C.

4.7.6 RT-PCR em tempo real para análise da expressão gênica (RT-qPCR)

Para análise da expressão gênica, a reação de RT-PCR em tempo real foi realizada utilizando-se o reagente TaqMan®Fast Universal PCR MasterMix (2x) (Applied Biosystems, USA), seguindo as instruções do fabricante.

Para o RT-PCR em tempo real foram utilizadas amostras de cDNA, obtidas anteriormente, na concentração de 10 ng por reação. Para isso, a reação de PCR foi realizada com volume final de 10 µL, onde foram adicionados 1 µL de cada cDNA, 3,5µL de água destilada ultrapura, livre de DNase / RNase (Life Technologies, USA) e 5µL de TaqMan®Fast Universal PCR MasterMix (2x) (Applied Biosystems). Para cada amostra foram amplificados os genes de interesse e o gene constitutivo GAPDH (Hs99999905_m1) (Life Life Technologies, USA). As reações foram incubadas no equipamento de PCR em tempo real StepOne Plus® (Applied Biosystems, USA) e submetidas a ciclos de 95° C por 20 segundos, 40 ciclos de 95° C por 1 segundo e 60° C por 20 segundos.

Para os ensaios acima, os seguintes ensaios TaqMan® foram utilizados: AFMID (Hs00895838_m1), KMO (Hs00175738-m1) e KYNU (Hs01114099_m1) (Life Life Technologies, USA).

A expressão gênica foi quantificada pelo o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

4.8 Viabilidade do *M. leprae*

Para os ensaios de viabilidade do bacilo, a fase intermediária armazenada a -20° C foi utilizada para a extração de DNA para a realização dos experimentos de viabilidade bacteriana. Em cada tubo foi adicionado 100 µL de tampão TE (5mM Tris; 0,1 mM EDTA) e 150 µL de clorofórmio. A mistura foi homogeneizada no aparelho FastPrep® 120 (MP biomedical, EUA) na configuração de velocidade a 6,5 metros por segundo (m/s) por 45 seg. Os tubos foram incubados no gelo por 5 min e centrifugados a 12000 x g por 10 min à temperatura ambiente. A fase aquosa (superior) foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL contendo 300 µL de isopropanol (Sigma-Aldrich, EUA),

misturada por inversão e armazenada a -70°C por no mínimo um dia. A fase orgânica resultante foi armazenada a -20°C para posterior extração de proteínas. Após a incubação, foi adicionado 2 μL GlycoBlue® (Ambion, EUA) em cada tubo, para melhor visualização do pellet, e então centrifugados a 12000 x g por 30 min em temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram descartados e o material sedimentado lavado com 500 μL de etanol 70% por centrifugação a 12000 x g por 15 min em temperatura ambiente. Em seguida os sobrenadantes foram removidos, os sedimentos secos à temperatura ambiente por 15 min e ressuspensos em 20 μL de água ultrapura.

A viabilidade do *M. leprae* foi avaliada como previamente descrito (Martinez *et al.*, 2009), sendo calculada a partir dos níveis de RNA ribossomal 16S normalizados contra os níveis medidos de DNA 16S, usando um ensaio de PCR em tempo real TaqMan.

4.9 Cromatografia Líquida de alta Eficiência (HPLC)

A determinação da atividade de IDO nos sobrenadantes de cultura de mDCs foi realizada para determinação dos níveis de quinurenina e triptofano (De Souza Sales *et al.*, 2011) por HPLC. Em um tubo eppendorf, 165 μL do sobrenadante de cultura foram homogeneizados com 5 μL de tirosina e 25 μL de ácido tricloroacético (TCA). Os tubos foram então centrifugados por 10 minutos a 15800 *xg*. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e foram injetados 50 μL na coluna de fase reversa C18. A detecção da corrida foi feita em 365 nm, para detectar a quinurenina, e 285 nm, para detectar o triptofano e o normalizador interno, tirosina. A atividade de IDO foi avaliada através da razão da concentração de quinurenina sobre triptofano.

4.10 Obtenção dos linfócitos autólogos

Os linfócitos dos mesmos doadores foram obtidos através da purificação da população pelo kit de separação por seleção magnética positiva CD14, pois as células não aderentes a coluna magnética (CD14^{-}) foram marcadas com *beads* magnéticas para CD4 (20 μL de MicroBeads para 10^7 de células / MACS Miltenyi Biotec) por 15 minutos a 4°C . Após esse tempo, as células foram lavadas com uma solução contendo 5% soro fetal bovino, 1mM EDTA e PBS. Em seguida, essas células foram passadas numa coluna de separação magnética, e as células CD4^{+} foram obtidas através da seleção

positiva, em seguida foram avaliadas quanto a expressão de CD4 por citometria de fluxo (Milteny Biotec, Auburn, CA, EUA).

4.11 Co-cultura de mDCs e linfócitos e marcação celular avaliada por citometria de fluxo

Para avaliar o papel funcional de IDO nas células T, as mDCs obtidas como já descrito foram colocadas em cultura em placa de 96 poços (1×10^5) e em seguida, os linfócitos foram adicionados em co-cultura juntos com as mDCs na proporção de 1:1. Essas células foram estimuladas com *M. leprae* ($2 \mu\text{g/mL}$) na presença ou ausência do inibidor de IDO 1-Metil Triptofano ($4 \mu\text{M}$) por 24 horas. Após esse período de tempo, as células foram recolhidas, lavadas com PBS-FACS duas vezes e marcadas com anticorpo anti-CD4, -CD25, -CTLA-4 por 30 minutos a 4°C . As células foram lavadas novamente com PBS-FACS e analisadas por citometria de fluxo (BD Accuri).

4.12 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão. A análise dos experimentos *in vitro* foi realizada pelo teste Kruskal-Wallis, Mann-Whitney ou One-Way ANOVA. Para todas as análises estatísticas o valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. As análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

5. Resultados

5.1 Caracterização fenotípica das mDCs

As células dendríticas foram geradas a partir de culturas de monócitos originários de PBMCs de doadores saudáveis. A expressão de CD14 é característica de monócitos e inexistente em mDCs (Macey *et al.*, 1998). Com o objetivo de investigarmos a eficiência de nosso protocolo de diferenciação, a expressão de CD14 foi avaliada antes e depois da diferenciação de monócitos em mDCs.

Como observado na figura 13, aproximadamente 14% da população de PBMCs foram CD14⁺ (Figura 13^a). Após a marcação com *beads* magnéticas CD14 e posterior seleção positiva de células utilizando coluna magnética, aproximadamente 70% das células foram CD14⁺ (Figura 13B). Em seguida, essas células foram deixadas em cultura por 6 dias na presença de GM-CSF e IL-4 e foi então realizado um *gate* na população de mDCs (Figura 13C). As mDCs diferenciadas foram então marcadas com anticorpo anti-CD14 e analisadas por citometria. Foi observado uma diminuição na média da intensidade de fluorescência (MIF) de CD14 nas mDCs, mostrando a eficiência do protocolo de diferenciação *in vitro*.

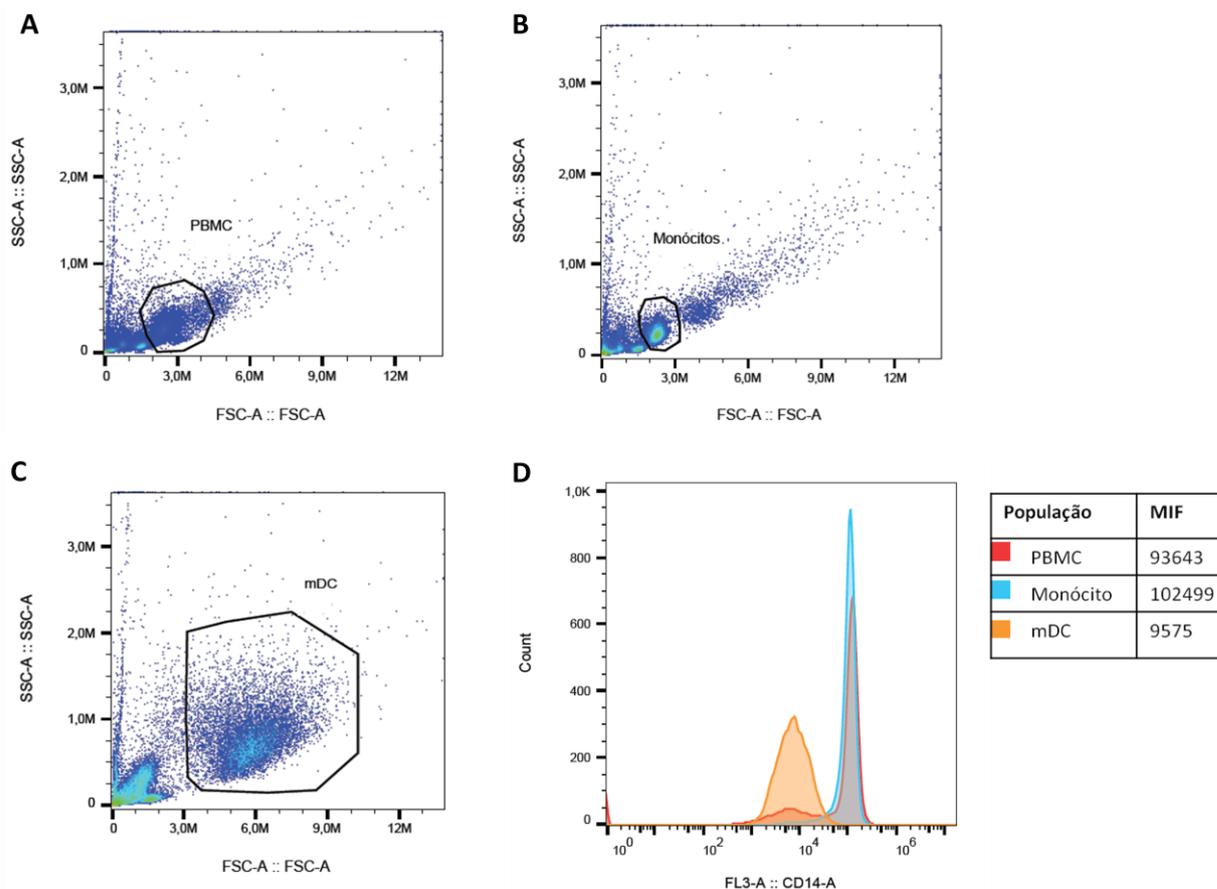
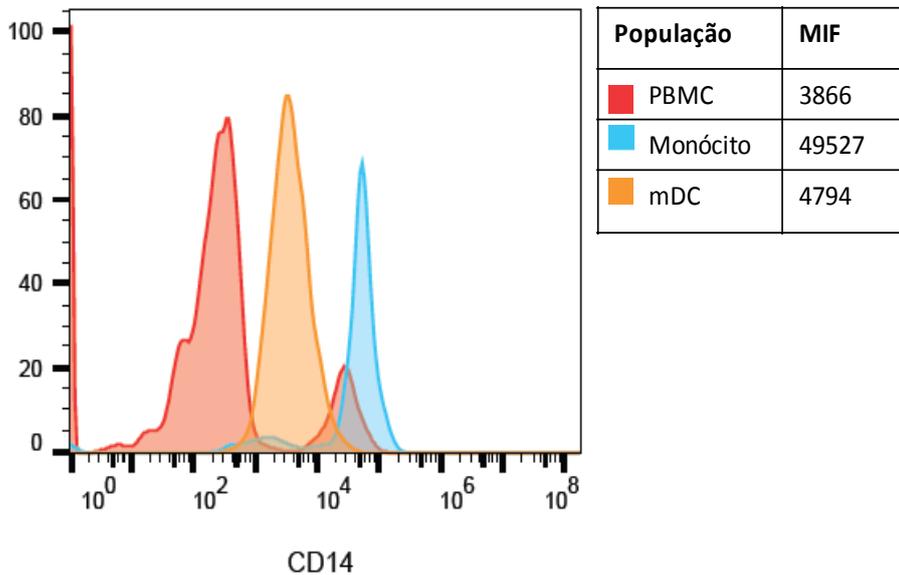
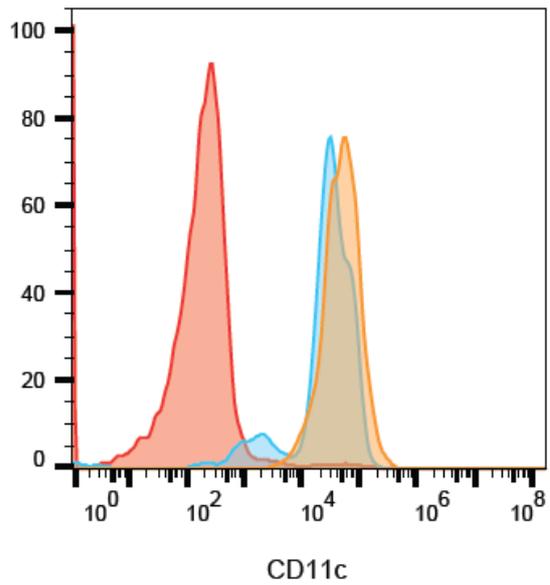


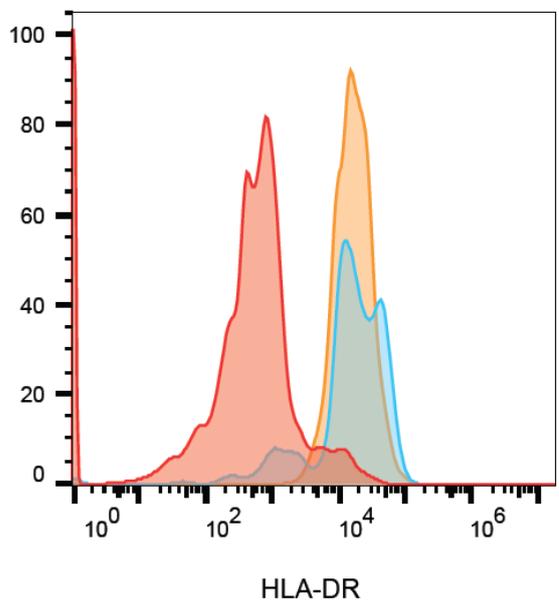
Figura 13: Eficiência do protocolo de diferenciação de mDCs. (A) Inicialmente $1,5 \times 10^9$ PBMCs foram adquiridas após a separação por gradiente de Ficoll, e em seguida 1×10^6 de células por poço foram plaqueadas e analisadas por citometria de fluxo, o gate identifica a população de PBMCs. (B) $1,8 \times 10^8$ de monócitos foram obtidos por seleção positiva de CD14 utilizando uma coluna magnética, o gate identifica a população de monócitos. (C) 1×10^6 de mDCs, após 6 dias de cultura com GM-CSF e IL-4, foram plaqueadas por poço e analisadas por citometria de fluxo, o gate identifica a população de mDCs. (D) Histograma representativo da análise das três diferentes populações (PBMCs, monócitos e mDCs) analisadas quanto a expressão de CD14. Os dados são representativos de células de uma *buffy coat* utilizada no estudo. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo BD Accuri e a análise realizada usando o *software* FlowJo.

Em geral, os artigos consideram que uma boa diferenciação ocorre quando se observa a redução da expressão de marcadores de monócitos/macrófagos e aumento da expressão de marcadores clássicos de mDCs. Assim, as expressões de CD14, CD11c, HLD-DR, CD209, CD123, CD304, CD303, CD86 e CD83 foram avaliadas em PBMCs, monócitos e mDCs por citometria (Figura 14 e 15).

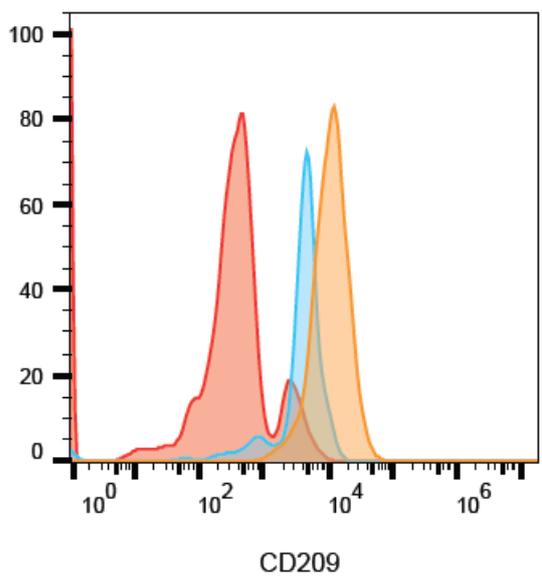




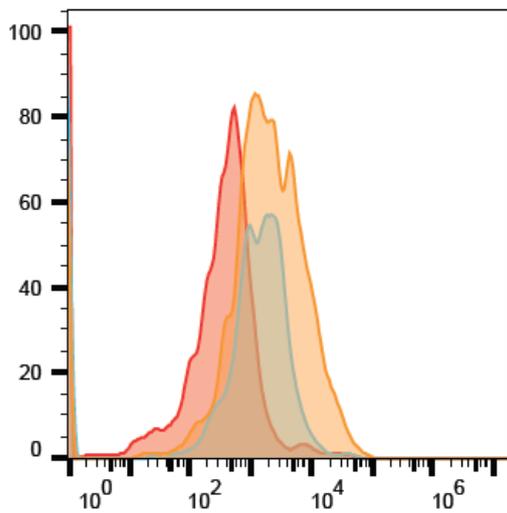
População	MIF
PBMC	1091
Monócito	37011
mDC	59894



População	MIF
PBMC	1041
Monócito	11725
mDC	9942

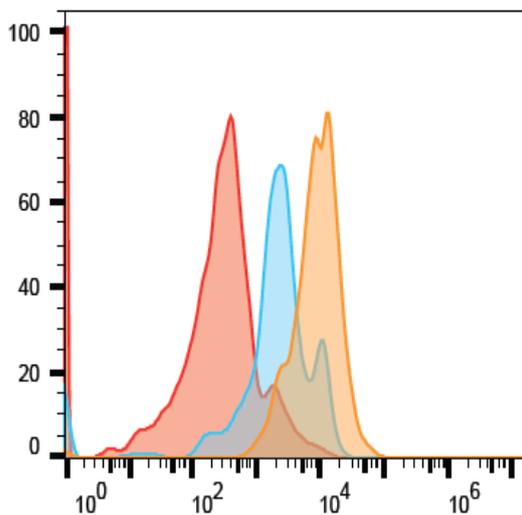


População	MIF
PBMC	660
Monócito	4544
mDC	12832



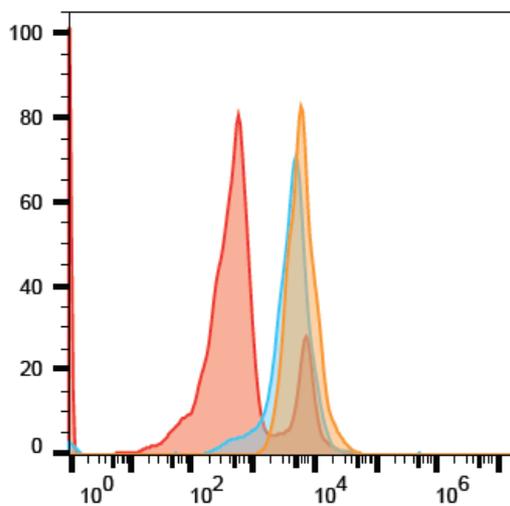
População	MIF
■ PBMC	661
■ Monócito	2120
■ mDC	4341

CD123



População	MIF
■ PBMC	447
■ Monócito	3410
■ mDC	11196

CD304



População	MIF
■ PBMC	1876
■ Monócito	7012
■ mDC	7472

CD303

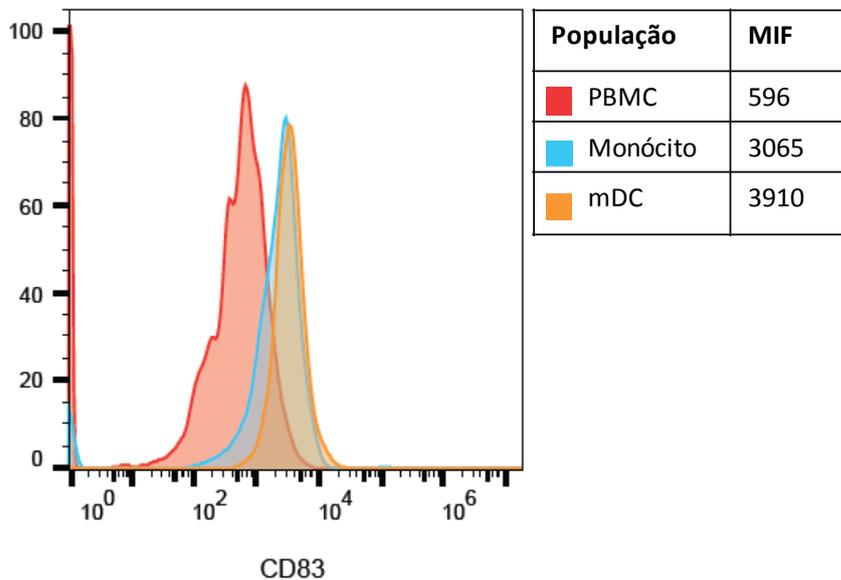
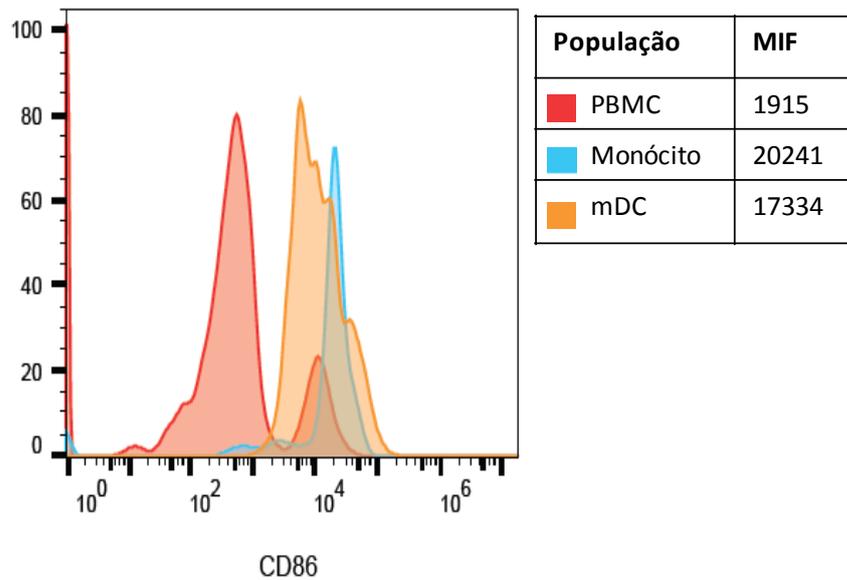
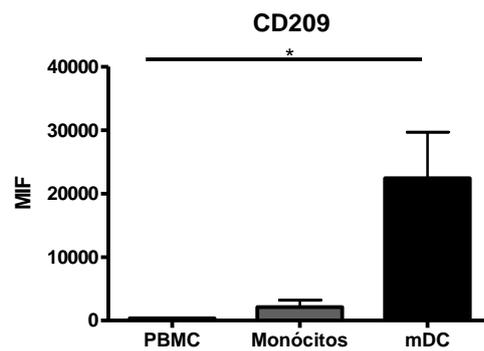
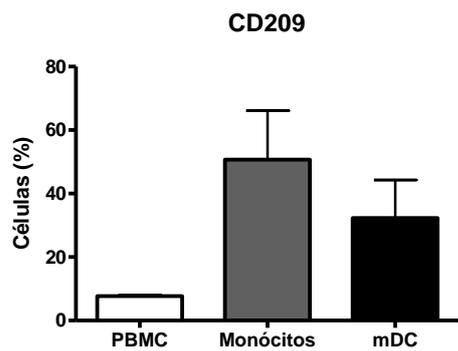
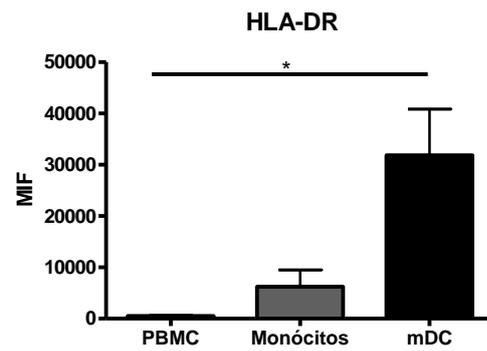
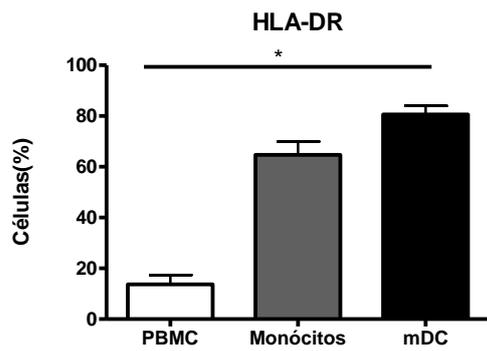
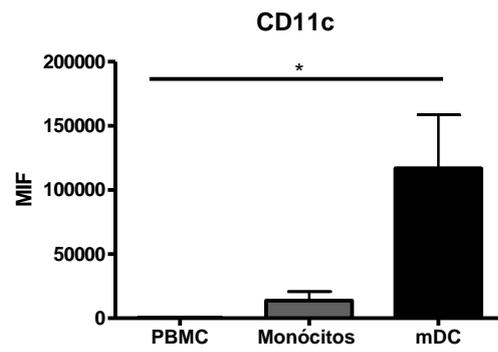
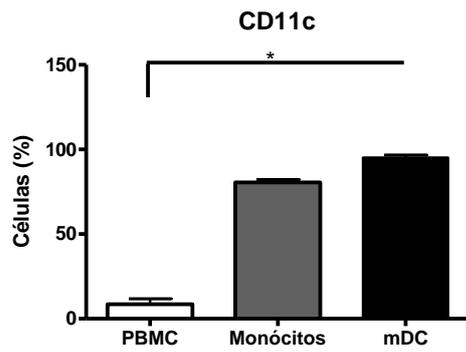
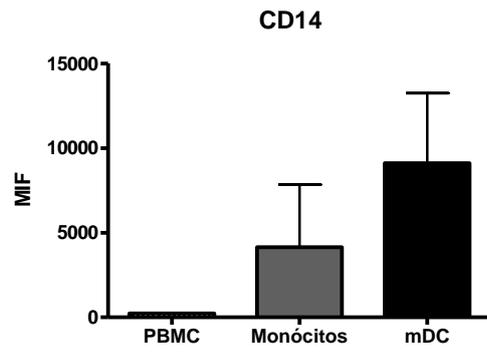
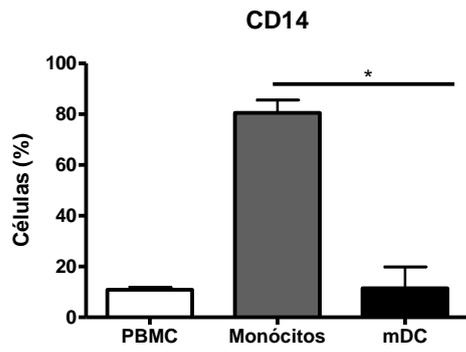
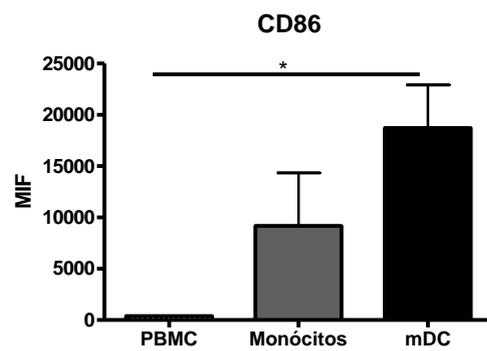
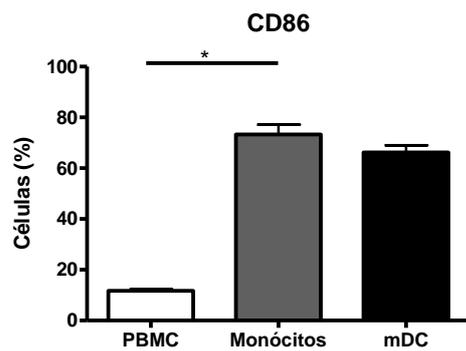
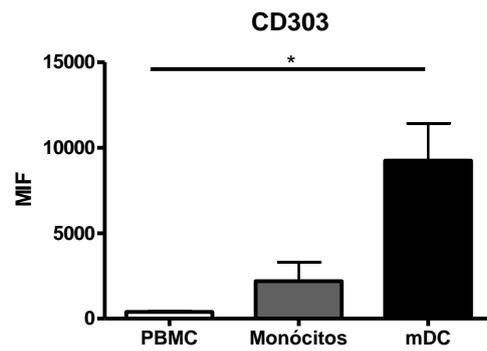
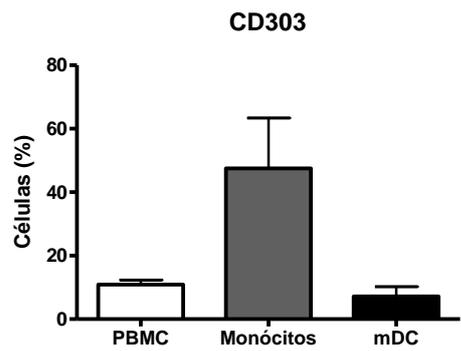
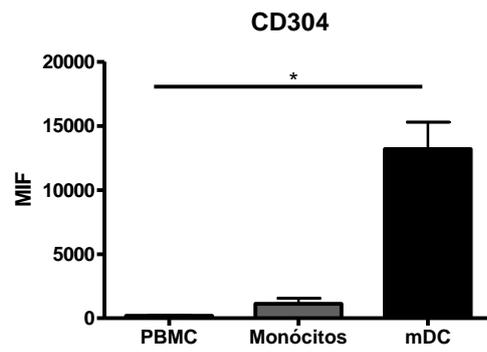
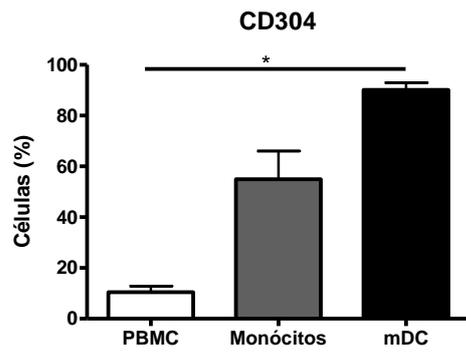
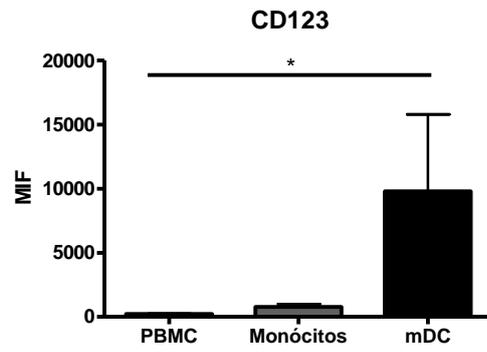
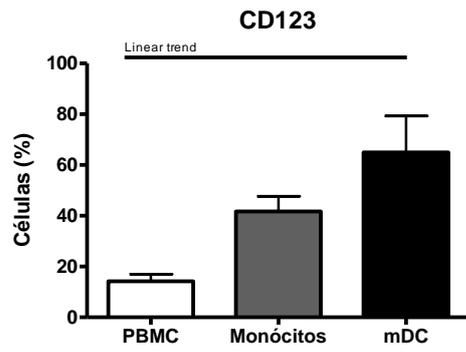


Figura 14: Histogramas representativos da caracterização fenotípica de PBMCs, monócitos e mDCs diferenciadas *in vitro*. As PBMCs foram obtidas a partir de *buffy coats* através de gradiente de Ficoll, 1×10^6 de células foram plaqueadas e marcadas com anticorpos anti-CD14, CD11c, HLA-DR, CD209, CD123, CD304, CD303, CD86 e CD83 e avaliadas por citometria de fluxo. 1×10^6 de monócitos, obtidos por seleção positiva de CD14, foram plaqueados e marcadas com os mesmos anticorpos citados anteriormente. As mDCs foram obtidas após 6 dias de cultura de monócitos com GM-CSF e IL-4, 1×10^6 de mDCs foram plaqueadas e marcadas com os mesmos anticorpos citados. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo BD Accuri e a análise realizada usando o *software* FlowJo. Os histogramas são representativos das três diferentes populações para cada marcador utilizado, as tabelas indicam a média de intensidade de fluorescência (MIF). Para cada amostra, um mínimo de 10.000 eventos foram analisados. Os gráficos representam a média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentemente realizados. * $p < 0.05$ (One-Way ANOVA).





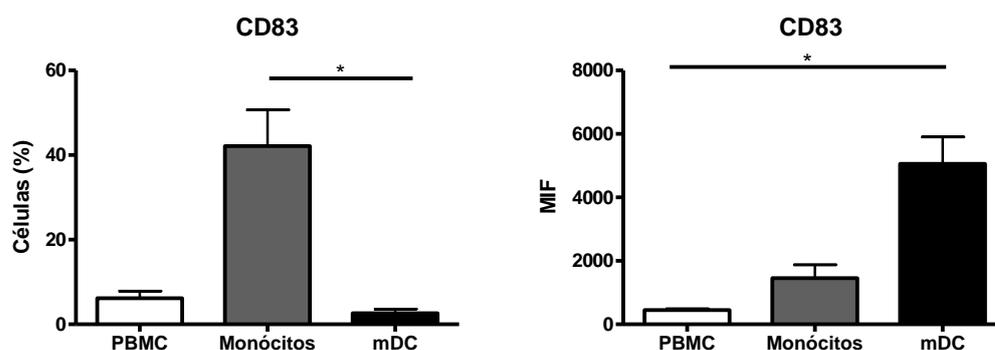


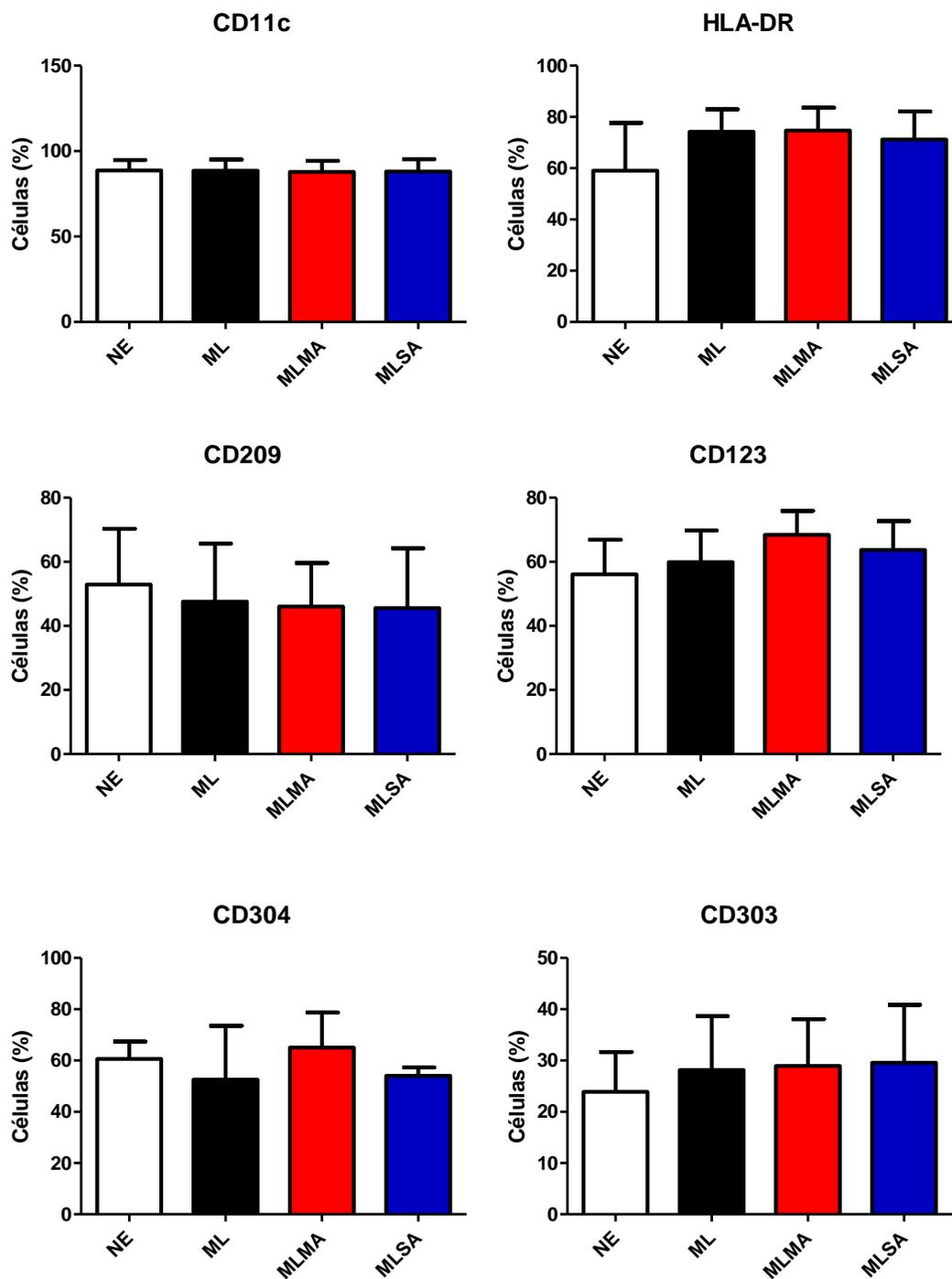
Figura 15: Caracterização fenotípica de PBMCs, monócitos e mDCs diferenciadas *in vitro*. As PBMCs foram obtidas a partir de *buffy coats* através de gradiente de Ficoll, 1×10^6 de células foram plaqueadas e marcadas com anticorpos anti-CD14, CD11c, HLA-DR, CD209, CD123, CD304, CD303, CD86 e CD83 e avaliadas por citometria de fluxo. 1×10^6 de monócitos, obtidos por seleção positiva de CD14, foram plaqueados e marcadas com os mesmos anticorpos citados anteriormente. As mDCs foram obtidas após 6 dias de cultura de monócitos com GM-CSF e IL-4, 1×10^6 de mDCs foram plaqueadas e marcadas com os mesmos anticorpos citados. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo BD Accuri e a análise realizada usando o *software* Cflow. Para cada marcador, o gráfico à esquerda mostra o percentual de células positivas (Células %) e o gráfico à direita, a média de intensidade de fluorescência (MFI). Para cada amostra, um mínimo de 10.000 eventos foram analisados. Os gráficos representam a média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentemente realizados. * $p < 0.05$ (One-Way ANOVA).

Como observado na Figura 15, a expressão de CD11c, CD304 e HLA-DR estava significativamente aumentada nas mDCs quando comparadas às PBMCs. A análise da intensidade de fluorescência revela ainda o aumento de CD209, CD123, CD303, CD83 e CD86 nas mDCs quando comparadas às PBMCs (Figura 15).

5.2 *M. leprae* e suas frações não alteram o fenótipo de mDCs

Durante a infecção por *M. leprae*, a resposta imune pode levar à morte micobacteriana e, a célula hospedeira interage não somente com o bacilo íntegro como também com frações antigênicas. Desse modo, foi avaliado se *M. leprae* e suas frações: fração de membrana (MLMA) e fração solúvel (MLSA) foram capazes de modular o fenótipo das mDCs. Para isso, mDCs foram estimuladas com *M. leprae*, MLMA e MLSA por 24 h. Os nossos resultados demonstraram que nem o *M. leprae*, nem suas frações foram capazes de modular a expressão dos marcados utilizados (Figura 16). A

intensidade de fluorescência coincidiu com a porcentagem de células positivas na maioria dos marcadores testados (dados não mostrados).



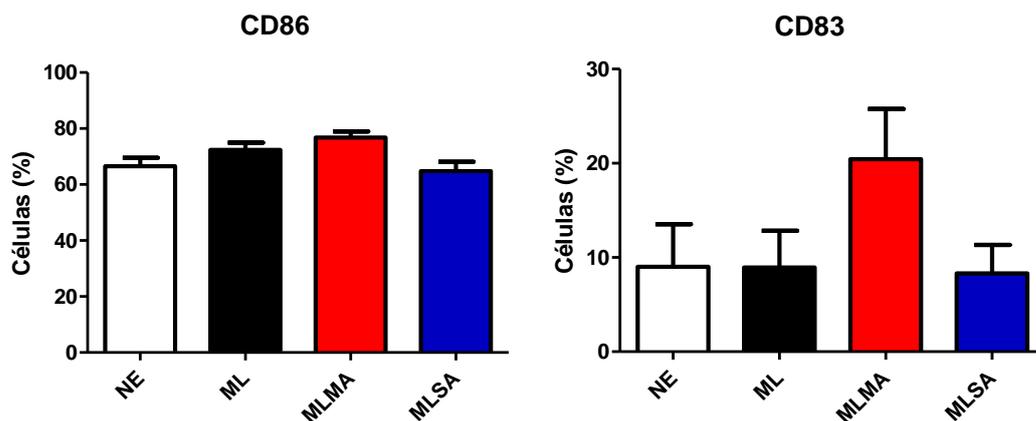


Figura 16: *M. leprae* e suas frações não alteram o fenótipo de mDCs. As mDCs diferenciadas de monócitos foram plaqueadas (1×10^6 células por poço) e estimuladas com *M. leprae* (ML), fração de membrana do *M. leprae* (MLMA) e fração solúvel do *M. leprae* (MLMA) a $10 \mu\text{g/mL}$, por 24h ou não (NE – célula não estimulada). Após esse período, as células foram marcadas com anticorpos anti-CD11c, HLA-DR, CD209, CD123, CD304, CD303, CD86 e CD83. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo BD Accuri e a análise realizada usando o *software* Cflow. Os gráficos mostram o percentual de células positivas (Células %). Para cada amostra, um mínimo de 10.000 eventos foram analisados. Os gráficos representam a média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentemente realizados.

5.3 *M. leprae* aumenta a expressão e atividade de IDO em mDCs

Dados anteriores de nosso grupo demonstraram que *M. leprae* induz a expressão e atividade de IDO em monócitos humanos (De Souza Sales *et al.*, 2011). No intuito de investigar se *M. leprae* e suas frações eram capazes de induzir um aumento na expressão proteica de IDO em mDCs, essas células foram estimuladas com *M. leprae*, MLMA e MLSA em diferentes concentrações (0,1, 1 e $10 \mu\text{g/mL}$) por 24 hrs e a expressão de IDO foi avaliada por citometria de fluxo.

Como observado na Figura 17, *M. leprae* a $10 \mu\text{g/mL}$ induziu um aumento na expressão de IDO quando comparado com as concentrações de 0,1 e $1 \mu\text{g/mL}$. A fração solúvel (MLSA) parece induzir um aumento na expressão de IDO em relação às células não estimuladas (NE) na concentração de $0,1 \mu\text{g/mL}$ e depois o percentual de células positivas se manteve constante nas concentrações de 1 e $10 \mu\text{g/mL}$. Já a fração de membrana (MLMA) induziu um aumento no percentual de células IDO⁺ na concentração de $1 \mu\text{g/mL}$ que se manteve na mesma proporção a $10 \mu\text{g/mL}$ (Figura 17).

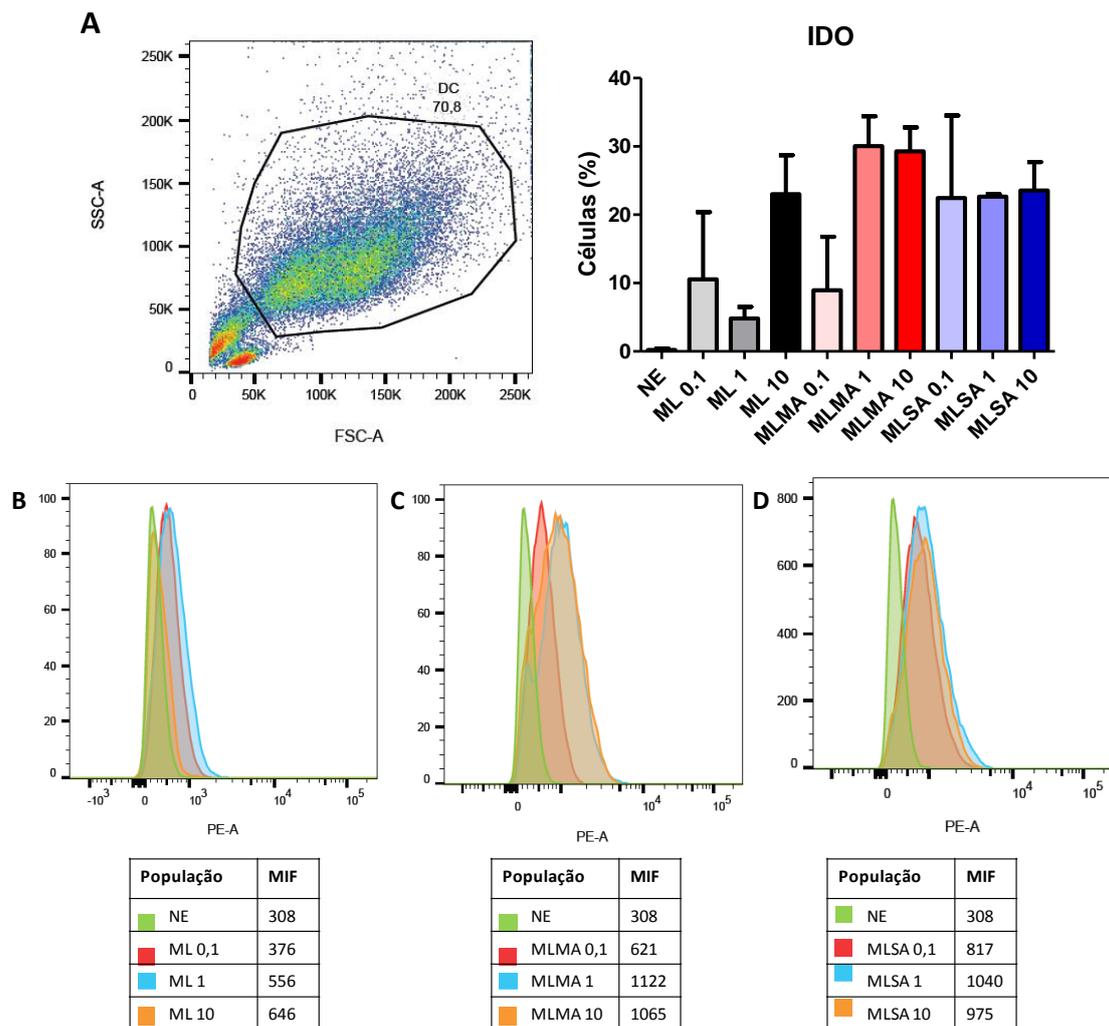


Figura 17: Expressão intracelular de IDO nas mDCs. As mDCs diferenciadas foram plaqueadas (1×10^6 células por poço) e estimuladas com *M. leprae* (ML), fração de membrana do *M. leprae* (MLMA) e fração solúvel do *M. leprae* (MLSA) a 0.1, 1 ou 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, por 24h, ou não (NE – célula não estimulada). Após esse período, as células foram marcadas com anticorpo intracelular anti-IDO. A) Estratégia de gate na população de mDCs e o percentual de células positivas (Células %). B) C) D) Histogramas representativos e as respectivas análises da MIF para cada estímulo utilizado. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo BD ARIA e a análise realizada usando o *software* FlowJo. Para cada amostra, um mínimo de 10.000 eventos foram analisados. O gráfico representa a média \pm desvio padrão de dois experimentos independentemente realizados.

A atividade de IDO, obtida através da razão quinurenina/triptofano, é um parâmetro constantemente observado na literatura. A atividade de IDO foi avaliada por HPLC nos sobrenadantes de mDCs. Conforme observado na Figura 18, *M. leprae* e

MLMA na concentração de 10 µg/mL foram capazes de aumentar significativamente a atividade enzimática de IDO.

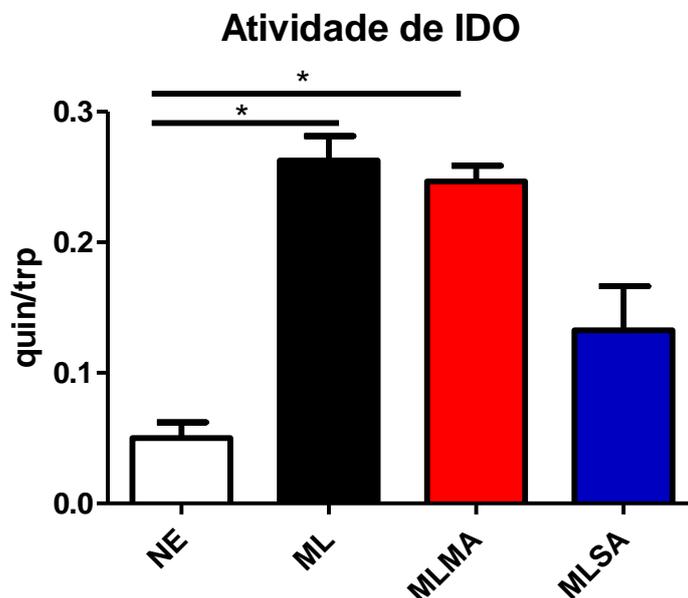


Figura 18: *M. leprae* aumenta a atividade de IDO em mDCs. As mDCs diferenciadas de monócitos foram plaqueadas (1×10^6 células por poço) e estimuladas com *M. leprae* (ML), fração de membrana do *M. leprae* (MLMA) e fração solúvel do *M. leprae* (MLSA) a 10 µg/mL, por 24h, ou não (NE – célula não estimulada). Após esse período, os sobrenadantes dessas culturas foram coletados e a atividade de IDO foi avaliada através da razão quinurenina/triptofano (quin/Trp) por HPLC. O gráfico representa a média \pm desvio padrão de três experimentos independentemente realizados. * $p < 0.05$ (Mann-Whitney).

5.4 Efeitos antagônicos das frações de *M. leprae* em mDCs

As concentrações de citocinas nos sobrenadantes de culturas das mDCs após a diferenciação, estimuladas por 24 horas com *M. leprae*, MLSA e MLMA foram avaliadas por ELISA. Como observado na Figura 19, *M. leprae* não foi capaz de modular de forma significativa a produção das citocinas testadas. No entanto, a fração de membrana de *M. leprae* (MLMA) foi capaz de induzir um aumento significativo nas concentrações de TNF- α e IL-6 (Figura 19). Ao contrário, a fração solúvel (MLSA) induziu aumento de IL-10, assim como o *M. leprae*. Não houve alteração na produção de IL-15 pelas mDCs após os estímulo com *M. leprae* e suas frações (Figura 19).

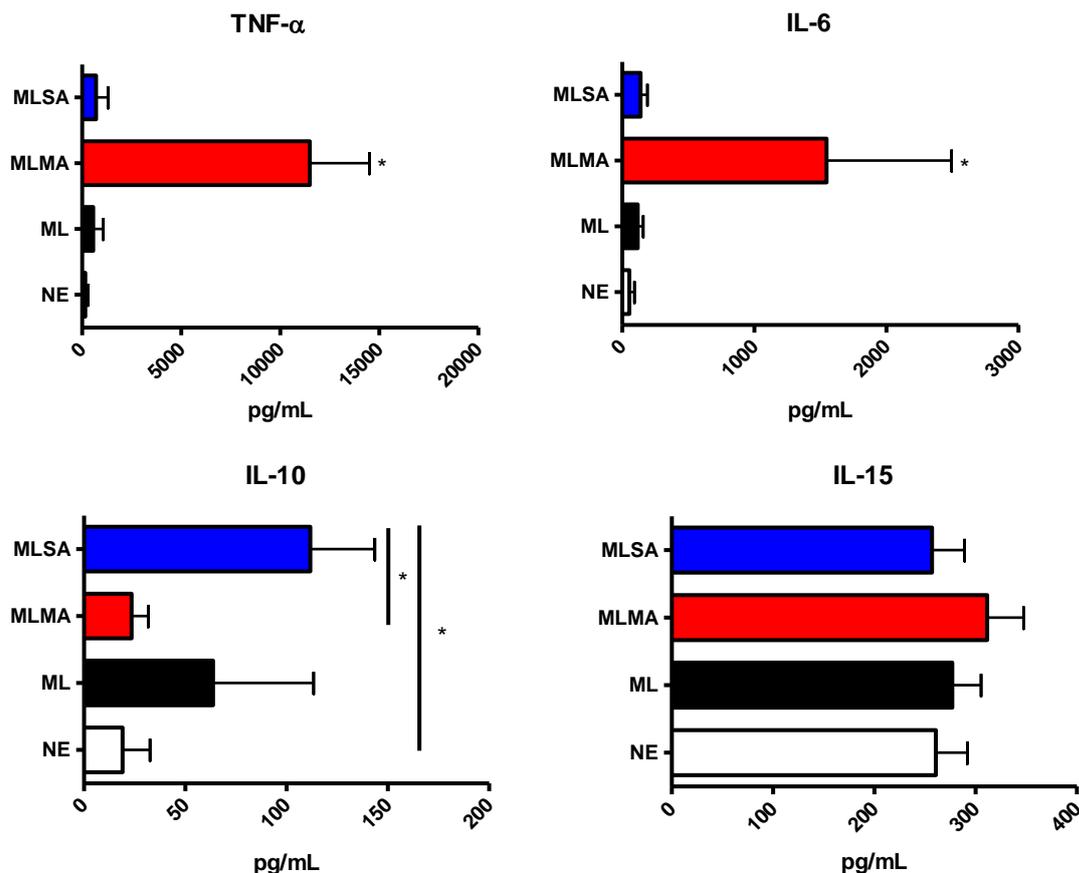


Figura 19: Efeitos antagônicos das frações de *M. leprae* na indução de citocinas por mDCs. As mDCs diferenciadas de monócitos foram plaqueadas (1×10^6 células por poço) e estimuladas com *M. leprae* (ML), fração de membrana do *M. leprae* (MLMA) e fração solúvel do *M. leprae* (MLSA) a $10 \mu\text{g/mL}$, por 24h, ou não (NE – célula não estimulada). Após esse período, os sobrenadantes dessas culturas foram coletados e a produção das citocinas TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-15 foram avaliadas por ELISA. Os gráficos representam a média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentemente realizados. * $p < 0.05$ (One-Way ANOVA).

Uma vez que foi observado que *M. leprae* e suas frações aumentam a expressão e atividade de IDO (Figuras 17 e 18, respectivamente) e que a fração de membrana (MLMA) foi capaz de induzir um aumento da produção de citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-6 pelas mDCs (Figura 19), em seguida, foi investigada a relação da produção de TNF- α e a expressão de IDO pelas mDCs estimuladas 24 hrs com *M. leprae*, MLMA e MLSA. Como observado na Figura 20, 6,72% das mDCs estimuladas com MLMA expressavam IDO e TNF- α após 24h de cultura, enquanto 4,40% expressavam somente TNF- α .

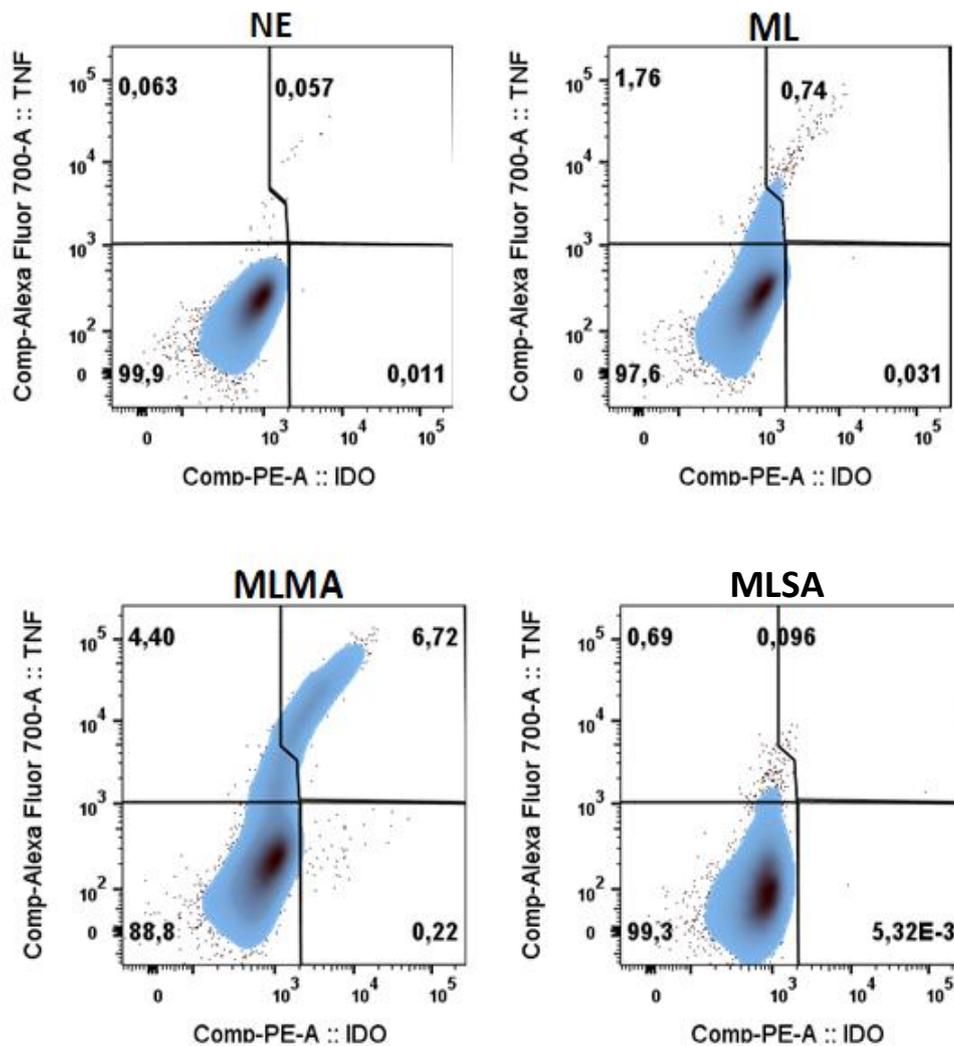


Figura 20: MLMA induziu um aumento na frequência de células $\text{IDO}^+\text{TNF-}\alpha^+$. As mDCs diferenciadas de monócitos foram plaqueadas (1×10^6 células por poço) e estimuladas com *M. leprae* (ML), fração de membrana do *M. leprae* (MLMA) e fração solúvel do *M. leprae* (MLSA) a 0.1, 1 ou 10 $\mu\text{g/mL}$, por 24h, ou não (NE – célula não estimulada). Após esse período, as células foram marcadas com anticorpos intracelular anti-IDO PE e $\text{TNF-}\alpha$ Alexa Fluor 700. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo BD ARIA e a análise realizada usando o *software* FlowJo. A análise é representativa de células de um doador. Para cada amostra, um mínimo de 10.000 eventos foram analisados.

5.5 $\text{TNF-}\alpha$ é importante na indução de atividade IDO por *M. leprae* e suas frações em mDCs

Já que o estímulo com MLMA induz o aumento de $\text{TNF-}\alpha$ e o estímulo com MLSA induz aumento de IL-10, foi avaliada a importância de IL-10 e $\text{TNF-}\alpha$ na

indução de IDO pelas mDCs. Para isso foram utilizados anticorpos monoclonais neutralizantes anti- TNF- α e anti- IL-10.

Foi demonstrado na Figura 21, que o bloqueio de TNF- α nas culturas levou a uma diminuição significativa da atividade de IDO nas culturas de mDCs, sugerindo um papel importante dessa citocina na indução de IDO pelo *M. leprae* e suas frações. Ao contrário do esperado, o bloqueio de IL-10 não foi suficiente para diminuir significativamente a atividade de IDO nas mDCs estimuladas com *M. leprae* e suas frações.

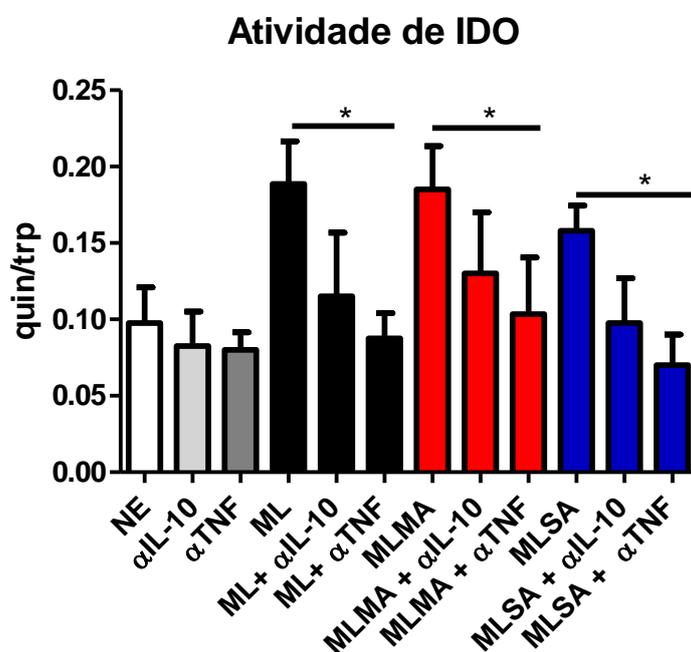


Figura 21: Importância de TNF- α na atividade de IDO pelas mDCs. As mDCs diferenciadas de monócitos foram plaqueadas (1×10^6 células por poço) e 1 hr antes da estimulação, adicionou-se anticorpos neutralizantes anti-Human IL-10 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou anti-Human TNF- α (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) às culturas, e em seguida os estímulos: *M. leprae* (ML), fração de membrana do *M. leprae* (MLMA) e fração solúvel do *M. leprae* (MLMA) a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, por 24h, ou não (NE – célula não estimulada). Após esse período, os sobrenadantes dessas culturas foram coletados e a atividade de IDO foi avaliada através da razão quinurenina/triptofano (quin/Trp) por HPLC. O gráfico representa a média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentemente realizados. * $p < 0.05$ (Kruskall-Wallis).

5.6 Envolvimento de TLR2 na indução de IDO

Sabendo que a membrana do *M. leprae* contém lipoproteínas que podem ativar a sinalização de TLR2, e que a mesma é capaz de induzir uma resposta inflamatória (Montoya & Modlin, 2010), fomos investigar um possível envolvimento da via de TLR2 na indução de IDO em mDCs estimuladas por *M. leprae*, MLMA e MLSA.

Inicialmente, foi investigado se o estímulo com Pam3Cys (agonista de TLR2) era capaz de modular a expressão e atividade de IDO em mDCs. Os dados apresentados na Figura 22 demonstraram que o estímulo com Pam3Cys foi suficiente para aumentar a expressão de IDO em relação à célula não estimulada e esse aumento foi maior quando houve a associação entre o Pam3Cys e *M. leprae* a 10 e 50 µg/mL.

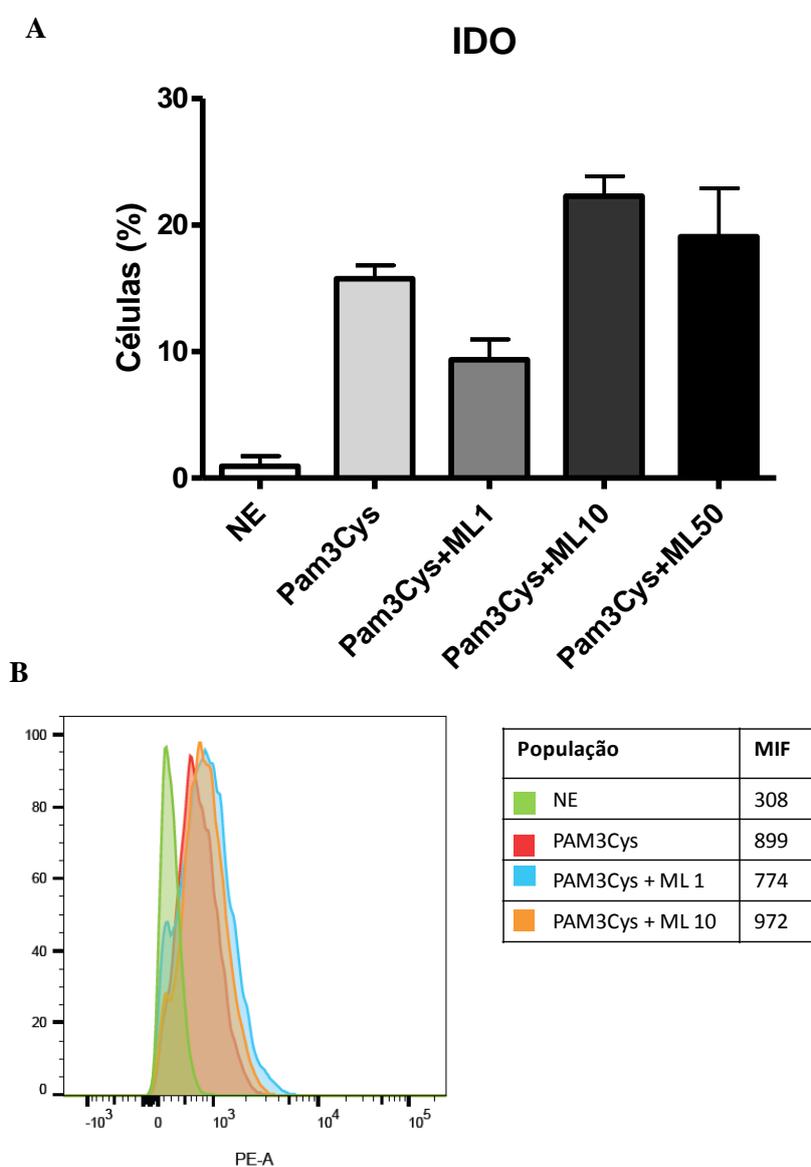


Figura 22: Expressão de IDO em mDCs estimuladas com Pam3Cys e *M. leprae*. As mDCs diferenciadas foram plaqueadas (1×10^6 células por poço) e estimuladas com Pam3Cys (10 $\mu\text{g/mL}$), Pam3Cys (10 $\mu\text{g/mL}$) + *M. leprae* nas diferentes concentrações 1, 10 e 50 $\mu\text{g/mL}$, por 24h, ou não (NE – célula não estimulada). Após esse período, as células foram marcadas com anticorpo monoclonal anti-IDO. A) O gráfico mostra o percentual de células positivas (Células %). B) Histograma representativo e respectiva análises da MIF para cada estímulo utilizado. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo BD ARIA e a análise realizada usando o *software* FlowJo. Para cada amostra, um mínimo de 10.000 eventos foram analisados. O gráfico representa a média \pm desvio padrão de dois experimentos independentemente realizados.

Os nossos resultados sugeriram que o Pam3Cys foi capaz de aumentar a expressão intracelular de IDO, assim como a atividade de IDO nos sobrenadantes das mDCs por HPLC, porém, devido ao tamanho amostral não foi possível realizar teste estatístico (Figura 23).

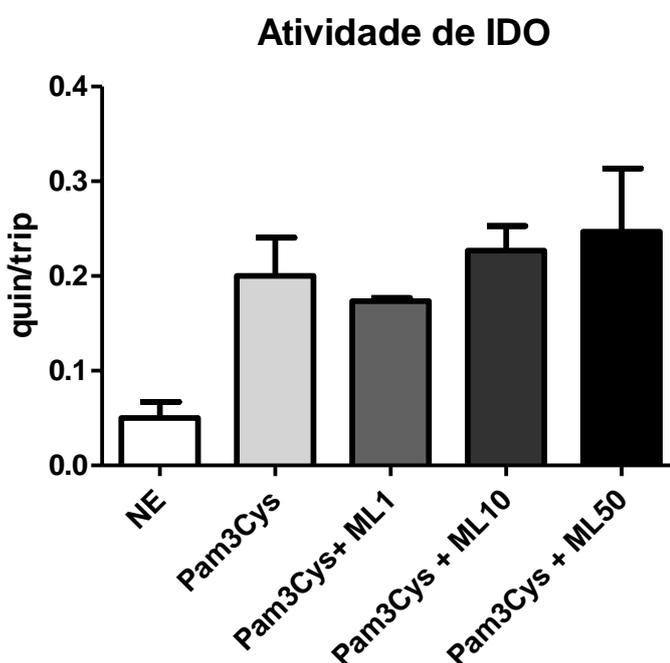


Figura 23: Atividade de IDO em mDCs estimuladas com Pam3cys e *M. leprae*. As mDCs diferenciadas foram plaqueadas (1×10^6 células por poço) e estimuladas com Pam3Cys (10 $\mu\text{g/mL}$), Pam3Cys (10 $\mu\text{g/mL}$) + *M. leprae* nas diferentes concentrações 1, 10 e 50 $\mu\text{g/mL}$, por 24h, ou não (NE – célula não estimulada). Após esse período, os sobrenadantes dessas culturas foram coletados e a atividade de IDO foi avaliada através da razão quinurenina/triptofano

(quin/Trp) por HPLC. O gráfico representa a média \pm desvio padrão de dois experimentos independentemente realizados.

Em seguida, utilizamos um anticorpo neutralizante para avaliar melhor a participação de TLR2 na indução deIDO. Sendo assim, as mDCs foram incubadas com anti-Human TLR2 (1 μ g/mL) 1 hora antes da estimulação com *M. leprae*, MLMA e MLSA. Como observado na Figura 24, a análise da atividade deIDO mostrou que *M. leprae* e MLMA foram capazes de aumentar a atividade deIDO em mDCs e a ausência de TLR2 nesses ambientes foi suficiente para diminuir a atividade deIDO.

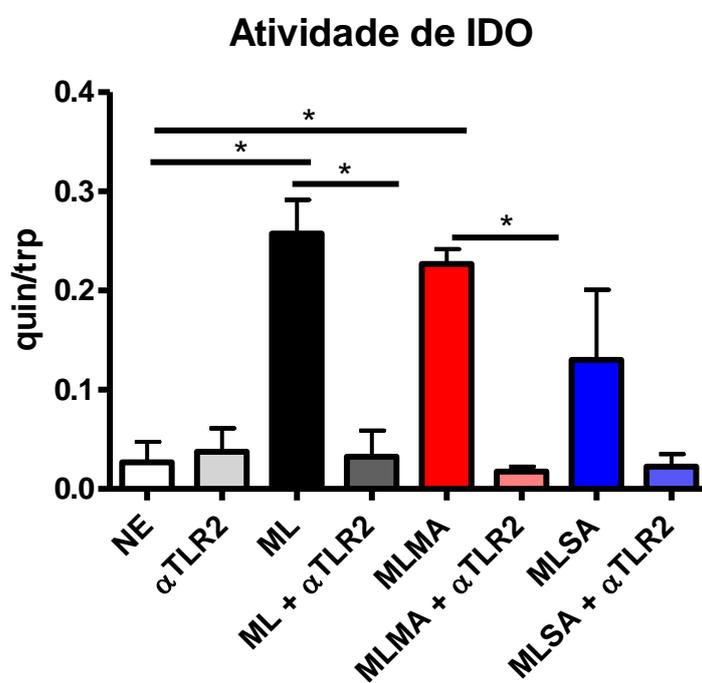


Figura 24: TLR2 é importante na indução de atividade deIDO em mDCs. As mDCs diferenciadas de monócitos foram plaqueadas (1×10^6 células por poço) e 1 hr antes da estimulação, adicionou-se anticorpo neutralizante anti-Human TLR2 (1 μ g/mL) às culturas, e em seguida os estímulos: *M. leprae* (ML), fração de membrana do *M. leprae* (MLMA) e fração solúvel do *M. leprae* (MLMA) a 10 μ g/mL, por 24h, ou não (NE – célula não estimulada). Após esse período, os sobrenadantes dessas culturas foram coletados e a atividade deIDO foi avaliada através da razão quinurenina/triptofano (quin/Trp) por HPLC. O gráfico representa a média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentemente realizados. * $p < 0.05$ (Mann-Whitney).

5.7 Modulação da expressão gênica das enzimas da via da quinurenina por *M.*

leprae

A IDO participa da primeira etapa do catabolismo do Trp na via das quinureninas, mas além da IDO existem outras enzimas que são capazes de degradar os metabólitos dessa via (Curti *et al.*, 2008). Com o objetivo de investigarmos outras enzimas da via das quinureninas que poderiam estar sendo moduladas por *M. leprae*, a expressão gênica de *kynurenina formamidase (AFMID)*, *kynurenina 3-monooxygenase (KMO)* e *kynureninase (KYN)* foi avaliada por PCR em tempo real. Após 24h de estimulação foi observado que *M. leprae* modula a expressão das diferentes enzimas, o que é revertido na presença do inibidor de IDO, o 1-MT (Figura 25).

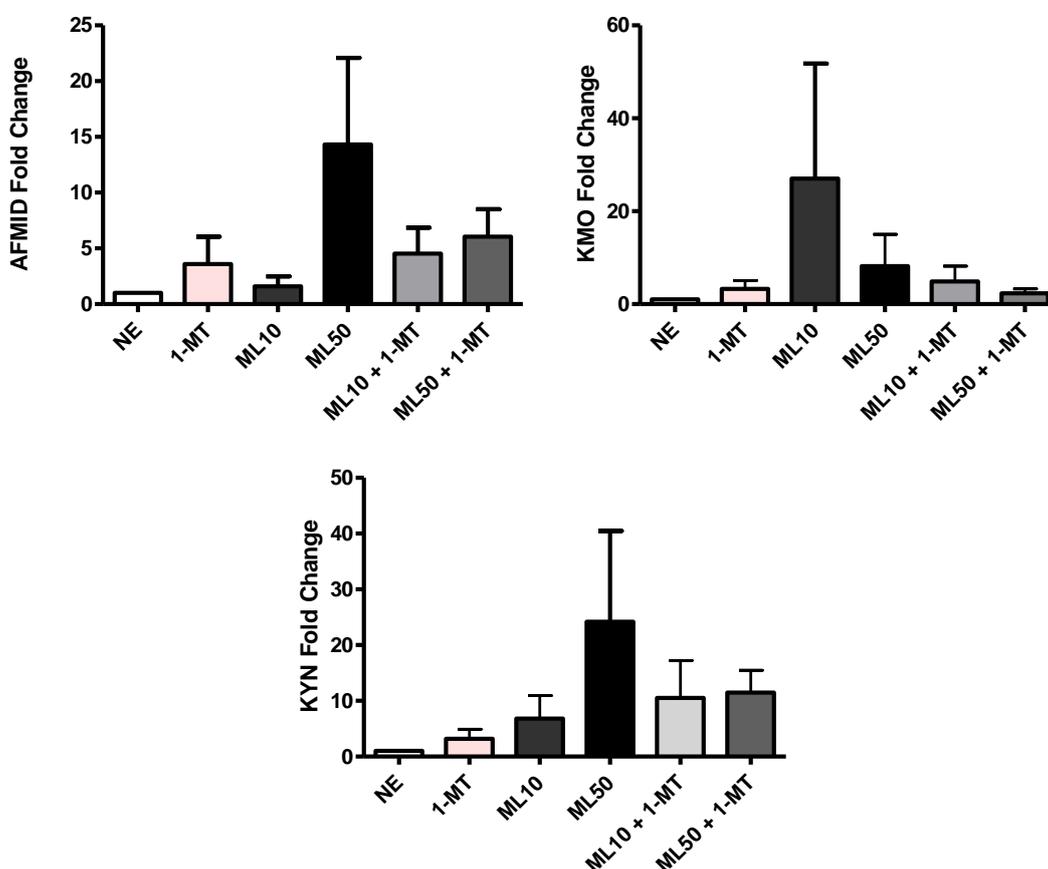


Figura 25: Expressão gênica de AFMID, KMO e KYN induzida por *M. leprae* em mDCs. As mDCs diferenciadas de monócitos foram plaqueadas (1×10^6 células por poço) e estimuladas com *M. leprae* 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ML 10), *M. leprae* 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ML 50), na presença ou ausência de 1 metil triptofano (1-MT) por 24h, ou não (NE – célula não estimulada). Após esse período, a expressão gênica de *kynurenina formamidase (AFMID)*, *kynurenina 3-monooxygenase (KMO)* e *kynureninase (KYN)* foi avaliada por PCR em tempo real e quantificada pelo o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os

gráficos representam a média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentemente realizados.

5.8 *M. leprae* induz um perfil supressor em linfócitos por um mecanismo dependente de IDO

Com o intuito de verificarmos se o aumento na expressão e atividade de IDO seria indicativo de atividade supressora, as mDCs foram cultivadas na presença de linfócitos T CD4⁺ autólogos, estimuladas com *M. leprae* presença ou não do inibidor de IDO, 1-MT, por 24 horas e avaliadas por citometria de fluxo.

Foi observado um aumento no percentual de células CD4⁺CD25⁺CTLA4⁺ positivas nas culturas estimuladas com *M. leprae* (10 μ g/mL) (Figura 26). Em contraste, a presença do 1-MT reduziu de forma significativa o percentual de células T com fenótipo supressor.

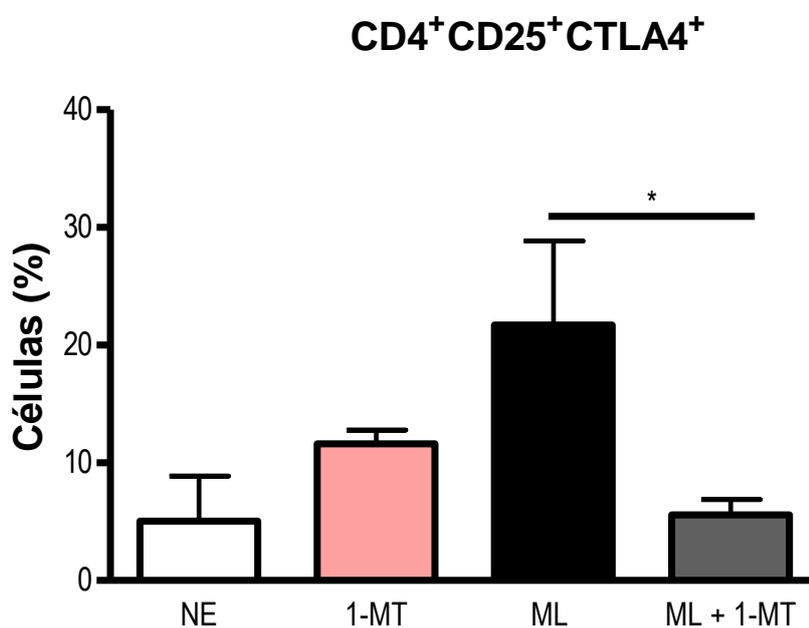


Figura 26: *M. leprae* induz um perfil supressor em linfócitos por mDCs. As mDCs diferenciadas de monócitos foram plaqueadas (1×10^6 células por poço) e estimuladas com *M. leprae* 10 μ g/mL (ML), na presença ou ausência de 1 metil triptofano (1-MT) por 24h, ou não (NE – célula não estimulada). Após esse período, as células foram marcadas com anticorpos intracelular anti-CD4, CD25 e CTLA4. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo BD

Accuri e a análise realizada usando o *software* Cflow. O gráfico representa a média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentemente realizados. * $p < 0.05$ (One-Way ANOVA).

5.9 IDO é importante para a viabilidade do bacilo

Com o objetivo de investigarmos se a enzima IDO é importante para a sobrevivência do *M. leprae*, foi avaliada a viabilidade do bacilo na presença do inibidor de IDO (1- MT). Como observado na Figura 27, quando adicionamos o 1- MT nas culturas de mDCs houve uma diminuição da viabilidade do bacilo mostrando que IDO é importante para a sobrevivência da micobactéria.

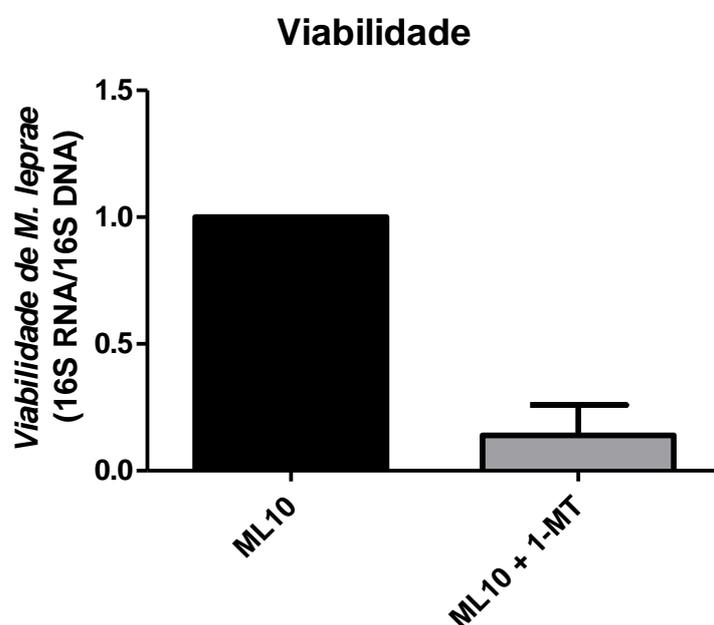


Figura 27: IDO é importante para a sobrevivência de *M. leprae*. As mDCs diferenciadas de monócitos foram infectadas com *M. leprae* viável no MOI de 10:1 (10 bactérias:1 célula) (ML) ou na presença de 1 metil triptofano (ML 10 + 1-MT). Após 24 horas (33°C e 5% CO₂) de cultura a viabilidade intracelular do *M. leprae* foi estimada a partir da razão entre 16S RNA e 16S DNA detectado por PCR em tempo real. Os gráficos mostram a média \pm desvio padrão de dois experimentos independentemente realizados.

6. Discussão

A caracterização de ambientes infecciosos é importante para definir como a imunidade inata influencia no subsequente desenvolvimento da imunidade adaptativa. Os mecanismos regulatórios que operam em ambas as fases da imunidade são também fundamentais para determinar como a resposta imune ditará a gravidade de um processo infeccioso. Nesse contexto, temos explorado os mecanismos regulatórios exercidos pela enzima IDO mediante a infecção por *M. leprae*. Dados anteriores do nosso grupo demonstraram que *M. leprae* é capaz de aumentar a expressão e subsequente atividade enzimática de IDO em monócitos humanos (De Souza Sales *et al.*, 2011). A fim de analisarmos se essa habilidade da micobactéria era executada em outro tipo celular, as mDCs foram estimuladas por *M. leprae*, e suas frações.

Nas lesões de pele de pacientes com hanseníase são observadas além de bacilos íntegros algumas frações micobacterianas provenientes da membrana e do citosol de *M. leprae* expostas após a morte do parasito, que pode ser resultado tanto da resposta imunológica hospedeira quanto do tratamento com a PQT (Scollard *et al.*, 2006). Sendo assim, além da utilização de *M. leprae* irradiado, as mDCs foram submetidas a estimulação por frações de *M. leprae*, como a fração de membrana de *M. leprae* (MLMA) e a fração solúvel de *M. leprae* (MLSA).

Os protocolos de diferenciação de monócitos em mDCs variam, porém, atualmente, a maioria utiliza os recombinantes de GM-CSF e IL-4, com um tempo de incubação que pode variar de 4 a 7 dias de cultura, dependendo da concentração estabelecida em cada protocolo (Donovan *et al.*, 2012; Yi & Lu 2012; Shahbazi *et al.*, 2013). Shahbazi *et al.* (2013) descreveram que quando DCs imaturas são geradas a partir de monócitos de sangue cultivados com GM-CSF e IL-4, o processo de diferenciação é acompanhado pela regulação negativa do marcador de monócitos, CD14, e positiva do marcador CD1a. No presente estudo, otimizamos o protocolo de diferenciação de DCs utilizando a suplementação de GM-CSF com IL-4 por 6 dias. Foi observado a redução da expressão de CD14, com aumento de marcadores de DCs como, CD11c, CD123, HLA-DR, CD83, CD303 e CD304.

O CD14 é geralmente expresso em monócitos e partindo desse princípio, analisamos a expressão desse marcador nas culturas de PBMCs, monócitos e DCs. Após a diferenciação, as mDCs perderam a expressão de CD14, que estavam bem expressos pelos monócitos. Este processo também foi observado por Macey *et al.* (1998). A análise do fenótipo das mDCs demonstrou um aumento da porcentagem de células

positivas e MIF de CD11c, CD123, CD304 e HLA-DR. Esses dados corroboram com os resultados obtidos por Masten, *et al.* (2006) e Korthals *et al.* (2007), que relataram que as mDCs são predominantemente CD11c⁺, HLA-DR⁺ e CD86⁺, o que caracteriza essas células como DCs funcionais, com a capacidade de estimular células T e uma resposta imune adaptativa. Korthals *et al.* (2007) também observaram níveis elevados de DCs plasmocitóides CD123⁺ e baixos níveis de CD209⁺, descrito como marcador de DCs mielóides, dados estes também observados em nossos resultados de fenotipagem celular.

Os marcadores CD303 (BDCA-2) e CD304 (BDCA-4) são mais expressos em células dendríticas humanas plasmocitóides no sangue e na medula óssea, respectivamente. Foi observado na análise por citometria de fluxo que as mDCs apresentaram uma baixa porcentagem de células positivas para CD303, apesar de apresentarem elevada intensidade de fluorescência para esse marcador e, uma alta porcentagem de células positivas para CD304. Dzioneck *et al.* (2014) observaram em seu estudo, com populações de DCs obtidas de sangue periférico, que ao contrário de CD303, o CD304 também é expresso em vários tipos de populações de células dendríticas diferenciadas *in vitro*. Os autores também descreveram que o uso desses marcadores fornece uma maneira conveniente e eficiente para detectar, enumerar e isolar rapidamente populações de células dendríticas do sangue, sem alteração funcional aparente.

Foi observada uma baixa expressão de CD83 pelas mDCs, após sua diferenciação, o que pode indicar que essas células estão imaturas, já que alguns trabalhos descrevem o CD83 como um marcador expresso em células dendríticas maduras. Xia *et al.* (2008); Royer *et al.* (2006) descreveram que o estado de maturação das DCs é importante para a indução de uma resposta imune eficiente. Seus estudos de preparações de DCs maduras mostraram uma alta expressão apenas do marcador de maturação, CD83, o que é um resultado das condições de cultura. Como observado por citometria de fluxo, os estímulos com *M. leprae*, MLMA e MLSA não foram suficientes para alterar o fenótipo das mDCs.

Nós demonstramos pela primeira vez que *M. leprae* foi capaz de induzir um aumento na atividade deIDO em mDCs quando comparado a células não estimuladas. Paralelamente, a expressão intracelular deIDO foi analisada por citometria e observamos que *M. leprae* e suas frações parecem induzir aumento na expressão de

IDO, porém não foi possível fechar essa questão pelo fato de termos um tamanho amostral baixo. Além disso, a produção de citocinas nesses ambientes foi avaliada. Cabe ressaltar que entre os estímulos estudados, o MLMA induziu significativamente um aumento na produção de citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-6, já a fração MLSA, de forma contrária, induziu um aumento na produção de IL-10. Foi observado também que a fração MLMA foi capaz de induzir um aumento na frequência de células IDO⁺TNF- α ⁺.

Esses resultados nos levaram a hipotetizar que essas frações de *M. leprae* poderiam estar induzindo IDO por mecanismos diferentes e consequentemente poderiam levar a efeitos diferentes na célula hospedeira. Mediante a isto, fomos investigar o envolvimento de TNF- α e IL-10, utilizando anticorpos neutralizantes na indução de atividade IDO em mDCs estimuladas por *M. leprae*, MLMA e MLSA. Foi observado que o TNF- α é importante na indução de atividade de IDO ao contrário da IL-10. Tal achado sugerem que os mecanismos de indução de IDO nas mDCs e em monócitos humanos sejam diferentes, uma vez que um estudo anterior (Moura *et al.* 2012), demonstrou que *M. leprae* é capaz de induzir a expressão gênica e proteica de IDO em monócitos humanos por um mecanismo dependente de IL-10.

De acordo com Underhill *et al.* (1999) o reconhecimento de componentes da parede celular micobacteriana, como açúcares, lipídios e peptídeos fazem com que macrófagos secretem TNF- α e outras citocinas que são essenciais para o desenvolvimento de uma resposta inflamatória. Esse trabalho mostrou que TLR2, ativado por LAM, é necessário para a indução de TNF- α em macrófagos por *M. tuberculosis*. Já foi demonstrado que a expressão de IDO em DCs pode ser induzida por citocinas inflamatórias e ligantes de TLRs (De Araújo *et al.*, 2017). Mesmo apresentando um tamanho amostral pequeno e não suficiente para realizar análises estatísticas, o agonista de TLR2 (Pam3Cys) pareceu induzir um aumento na expressão e atividade de IDO em mDCs. Também mostramos que a ausência de TLR2 em mDCs foi suficiente para diminuir a atividade de IDO induzida por *M. leprae* e MLMA. É possível que lipoproteínas constituintes da membrana de *M. leprae* estejam induzindo IDO em mDCs por um mecanismo que envolva a ativação de TLR2, levando a um efeito microbicida com a produção de citocinas inflamatórias.

Tem-se aumentando o interesse nos estudos que envolvam a via de quinureninas e seus metabólitos, já que os mesmos podem afetar ou até mesmo controlar uma

variedade de neurotransmissores direta e indiretamente, além disso, o metabolismo dessa via tem sido modulado em condições de infecção e estresse (Schwarz *et al.*, 2017). Com o objetivo de avaliar se *M. leprae* modula outras enzimas da via, foi realizada a análise por PCR em tempo real que revelou um aumento de mRNA de enzimas que compõem a via das quinureninas, como, *AFMID*, *KMO* e *KYN* nas mDCs de doadores saudáveis após serem estimuladas com *M. leprae* na concentração de 10 e 50 µg/mL, sugerindo que *M. leprae* tem a capacidade de modular a expressão de *AFMID*, *KMO* e *KYN*. Alvos da via tem sido descritos como agentes específicos que podem controlar infecções. O 3-HK, um metabólico da via das quinureninas, catabolizado pela ação da enzima *KMO* e gerado durante a infecção é ativo contra o *Trypanosoma cruzi* (Knubel *et al.*, 2017).

De Souza Sales *et al.* (2011) demonstraram que o aumento de *IDO* em pacientes com hanseníase estava associado à indução de um perfil tolerogênico. Com o intuito de verificarmos se o aumento na expressão e atividade de *IDO* seria indicativo de atividade supressora, as mDCs foram cultivadas na presença de linfócitos T CD4⁺. Foi observado um aumento no percentual de células CD4⁺CD25⁺CTLA4⁺ nas células estimuladas com *M. leprae*, sugerindo que os linfócitos estão sendo diferenciados em células T supressoras, após a interação com as mDCs. Já foi demonstrado que pacientes lepromatosos aumentam a expressão de células T reg, um dos fatores que pode explicar a grande quantidade de bacilos nesses indivíduos (Palermo *et al.*, 2012).

M. leprae entra e reside em macrófagos, DCs e células de Schwann, a entrada é o primeiro passo para a vida intracelular do patógeno (Nath *et al.*, 2015). Os nossos dados demonstraram que *IDO* é importante para a sobrevivência do bacilo em mDCs, uma vez que quando adicionamos o 1-MT nas culturas de mDCs houve uma diminuição da viabilidade do bacilo quando comparado a célula não estimulada. O mesmo resultado foi obtido quando macrófagos humanos foram infectados com *M. leprae* na presença de 1-MT, tal achado pode ser associado com o aumento de ferro intracelular que também regula a expressão de *IDO* e aumenta a sobrevivência intracelular de *M. leprae* (De Mattos Brabosa *et al.*, 2017). Blumenthal *et al.* (2012) demonstraram que embora *M. tuberculosis* induza uma expressão robusta de *IDO* e ativação do metabolismo do Trp, a deficiência de *IDO*, em modelo de tuberculose em camundongos, não foi suficiente para impactar no controle imunológico da infecção.

Os nossos dados demonstraram que *M. leprae* induz um aumento na expressão e atividade de IDO em mDCs, e que a membrana da micobactéria possui um papel importante neste contexto via a sinalização de TLR2 associada à produção de citocinas inflamatórias e controle do bacilo. Além disso, demonstramos que estas mDCs estimuladas com *M.leprae* induzem células T para um perfil supressor por um mecanismo dependente de IDO. Em conjunto, o eixo IDO induzido por *M. leprae* pode ter um papel importante no controle da imunidade e na gravidade da hanseníase.

7. Conclusões

Com base nos resultados demonstrados nesse estudo, podemos concluir que:

- *M. leprae*, MLMA e MLSA não foram capazes de modular o fenótipo das mDCs diferenciadas *in vitro*;
- *M. leprae* e MLMA induzem um aumento da atividade de IDO em mDCs;
- A fração solúvel (MLSA) induz um aumento na produção de IL-10, enquanto que a fração de membrana (MLMA) induz significativamente um aumento na produção de citocinas pró inflamatórias e um aumento da produção de TNF- α pelas mDCs;
- O bloqueio de TNF- α diminuiu a expressão de IDO por *M. leprae* e suas frações em mDCs;
- TLR2 é importante na indução de atividade enzimática de IDO por *M. leprae* e MLMA em mDCs;
- IDO é importante para a sobrevivência de *M. leprae* em mDCs.

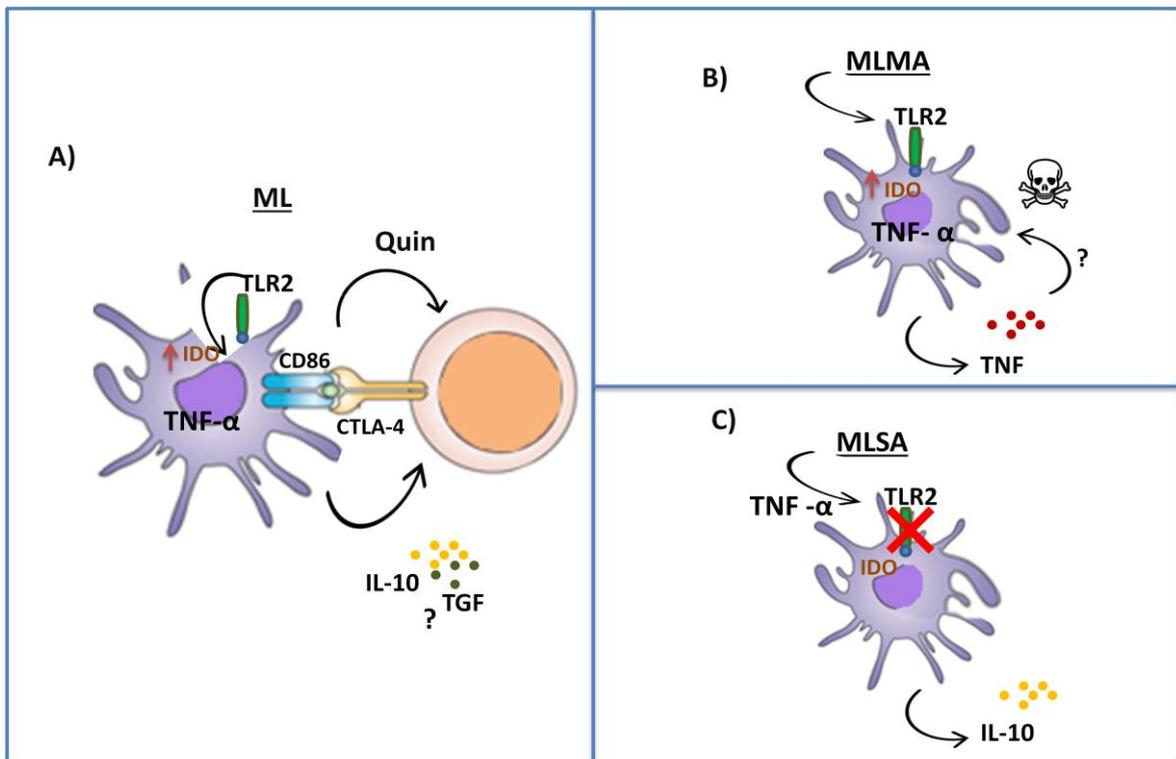


Figura 28: Esquema ilustrativo de conclusões finais do estudo. A) No estímulo com *M. leprae* a expressão e atividade de IDO nas mDCs pode está sendo aumentada por um mecanismo dependente de TLR2, levando então a um aumento na produção de citocinas como IL-10 e TGF, assim como a expressão de moléculas co-estimulatórias como CD86, e também a produção de metabólitos da via das quinureninas. Tais mecanismos possivelmente influenciam na indução de linfócitos Treg. B) O estímulo com a fração de membrana de *M. leprae*, MLMA, induz um aumento da atividade de IDO, por um mecanismo no qual TLR2 também parece ser importante, levando então a uma via pró-inflamatória com consequente aumento na produção de TNF o qual sugerimos um possível efeito microbicida. Por outro lado, o estímulo com a fração solúvel de *M. leprae*, MLSA, induz um aumento moderado da expressão e atividade de IDO, por um mecanismo independente da via de TLR2, que consequentemente ativa mecanismos antiinflamatórios com aumento da produção de IL-10.

8. Referências

Andrade PR, Pinheiro RO, Sales AM, Illarramendi X, de Mattos Barbosa MG, Moraes MO, et al. Type 1 reaction in leprosy: a model for a better understanding of tissue immunity under an immunopathological condition. *Expert Review of Clinical Immunology*. 4 de março de 2015;11(3):391–407.

Austyn J M. Dendritic Cells in the Immune System—History, Lineages, Tissues, Tolerance, and Immunity. *Microbiology Spectrum* . *Microbiol Spectr*. 2016 Dec;4(6) 1-50.

Bafica A, Scanga CA, Feng CG, Leifer C, Cheever A, Sher A. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Experimental Medicine*. 19 de dezembro de 2005;202(12):1715–24.

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y-J, et al. Immunobiology of Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology*. abril de 2000;18(1):767–811.

Blumenthal A, Nagalingam G, Huch JH, Walker L, Guillemin GJ, Smythe GA, et al. *M. tuberculosis* Induces Potent Activation of IDO-1, but This Is Not Essential for the Immunological Control of Infection. Tailleux L, organizador. *PLoS ONE*. 23 de maio de 2012;7(5):e37314.

Bochud P, Hawn TR, Siddiqui MR, Saunderson P, Britton S, Abraham I, et al. Toll-Like Receptor 2 (*TLR2*) Polymorphisms Are Associated with Reversal Reaction in Leprosy. *The Journal of Infectious Diseases*. 15 de janeiro de 2008;197(2):253–61.

Braidy N, Grant R. Kynurenine pathway metabolism and neuroinflammatory disease. *Neural Regeneration Research*. 2017;12(1):39.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2016 [homepage na internet]. Hanseníase [acesso em maio 2017]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1466.

Brennan PJ. Skin test development in leprosy: progress with first-generation skin test antigens, and an approach to the second generation. *Lepr Rev*. dezembro de 2000;71 Suppl:S50-54.

Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*. 22 de fevereiro de 2001;409(6823):1007–11.

Conti BJ, Santiago KB, Sforzin JM. Dendritic cells: a short review. *Biosaúde*. 2014; Londrina 16(1):28-33.

Curti A, Trabanelli S, Salvestrini V, Baccarani M, Lemoli RM. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the induction of immune tolerance: focus on hematology. *Blood*. 12 de março de 2009;113(11):2394–401.

Dagur PK, Sharma B, Kumar G, Khan NA, Katoch VM, Sengupta U, et al. Mycobacterial antigen(s) induce anergy by altering TCR- and TCR/CD28-induced signalling events: Insights into T-cell unresponsiveness in leprosy. *Molecular Immunology*. fevereiro de 2010;47(5):943–52.

De Araújo EF, Feriotti C, Galdino NA de L, Preite NW, Calich VLG, Loures FV. The IDO–AhR Axis Controls Th17/Treg Immunity in a Pulmonary Model of Fungal Infection. *Frontiers in Immunology*. 24 de julho de 2017; 8, 1-15.

De Mattos Barbosa MG, da Silva Prata RB, Andrade PR, Ferreira H, de Andrade Silva BJ, da Paixão de Oliveira JA, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase and iron are required for *Mycobacterium leprae* survival. *Microbes and Infection*. julho de 2017. 1-10.

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: IDO is involved in immunosuppression during lepromatous leprosy. *Clinical & Experimental Immunology*. agosto de 2011;165(2):251–63.

Demangel C, Britton WJ. Interaction of dendritic cells with mycobacteria: Where the action starts. *Immunology and Cell Biology*. agosto de 2000;78(4):318–24.

Donovan MJ, Tripathi V, Favila MA, Geraci NS, Lange MC, Ballhorn W, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) induced by *Leishmania* infection of human

dendritic cells: *Leishmania-induced IDO*. *Parasite Immunology*. outubro de 2012;34(10):464–72.

Dzionic 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. *The Journal of Immunology*. 1º de dezembro de 2000;165(11):6037–46.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature Immunology*. abril de 2003;4(4):330–6.

Gallo MEN, Sampaio S, Nery JA, Moraes MO, Antunes ALG, Pessolani M C V et al. Hanseníase: aspectos epidemiológicos, clínicos e imunológicos. In: Coura JR, editor. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. 2005. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Editora. 1383-1394.

Hart BE, Tapping RI. Genetic Diversity of Toll-Like Receptors and Immunity to *M. leprae* Infection. *Journal of Tropical Medicine*. 2012; 2012:1–12.

Hunter SW, Fujiwara T, Brennan PJ. Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae*. *J Biol Chem*. 25 de dezembro de 1982;257(24):15072–8.

Joffre O, Nolte MA, Spörri R, Sousa CR e. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunological Reviews*. janeiro de 2009;227(1):234–47.

Kamath S, Vaccaro SA, Rea TH, Ochoa MT. Recognizing and managing the immunologic reactions in leprosy. *Journal of the American Academy of Dermatology*. outubro de 2014;71(4):795–803.

Knubel CP, Insfran C, Martinez FF, Diaz Lujan C, Fretes RE, Theumer MG, et al. 3-Hydroxykynurenine, a Tryptophan Metabolite Generated during the Infection, Is

Active Against *Trypanosoma cruzi*. ACS Medicinal Chemistry Letters. 13 de julho de 2017;8(7):757–61.

Korthals M, Safaian N, Kronenwett R, Maihöfer D, Schott M, Papewalis C, et al. Monocyte derived dendritic cells generated by IFN- α acquire mature dendritic and natural killer cell properties as shown by gene expression analysis. Journal of Translational Medicine. 2007;5(1):46.

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. Nature Medicine. maio de 2003;9(5):525–32.

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. Nature Medicine. junho de 2005;11(6):653–60.

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. dezembro de 2013;218(12):1488–96.

Lahiri R, Randhawa B, Krahenbuhl J. Application of a viability-staining method for Mycobacterium leprae derived from the athymic (nu/nu) mouse foot pad. Journal of medical microbiology 2005;54(3)235.

Lastória JC, Abreu MAMM de. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - Part 1. Anais Brasileiros de Dermatologia. abril de 2014;89(2):205–18.

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. The Journal of Immunology. 15 de dezembro de 2007;179(12):8128–36.

Li J, Lee DSW, Madrenas J. Evolving Bacterial Envelopes and Plasticity of TLR2-Dependent Responses: Basic Research and Translational Opportunities. Frontiers in Immunology. 2013(4):1-11.

Li Q, Harden JL, Anderson CD, Egilmez NK. Tolerogenic Phenotype of IFN- γ -Induced IDO⁺ Dendritic Cells Is Maintained via an Autocrine IDO-Kynurenine/AhR-IDO Loop. *The Journal of Immunology*. 1^o de agosto de 2016;197(3):962-70.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. dezembro de 2001;25(4):402-8.

Lockwood DN, Saunderson PR. Nerve damage in leprosy: a continuing challenge to scientists, clinicians and service providers. *International Health*. junho de 2012;4(2):77-85.

Macey MG, McCarthy DA, Vogiatzi D, Brown KA, Newland AC. Rapid flow cytometric identification of putative CD14- and CD64- dendritic cells in whole blood. *Cytometry*. 1^o de março de 1998;31(3):199-207.

Mackay GM, Forrest CM, Stoy N, Christofides J, Egerton M, Stone TW, et al. Tryptophan metabolism and oxidative stress in patients with chronic brain injury. *European Journal of Neurology*. janeiro de 2006;13(1):30-42.

Maeda Y, Mukai T, Spencer J, Makino M. Identification of an Immunomodulating Agent from *Mycobacterium leprae*. *Infection and Immunity*. 1^o de maio de 2005;73(5):2744-50.

Margoles L, Del Ri C, Franco-Paredes C. Leprosy: a modern assessment of an ancient neglected disease. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2011; 68(2):110-116.

Marques MA, Chitale S, Brennan PJ, Pessolani MC. Mapping and identification of the major cell wall-associated components of *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun*. junho de 1998;66(6):2625-31.

Marques MAM, Espinosa BJ, Xavier da Silveira EK, Pessolani MCV, Chapeaurouge A, Perales J, et al. Continued proteomic analysis of *Mycobacterium leprae* subcellular fractions. *Proteomics*. outubro de 2004;4(10):2942-53.

Martinez AN, Lahiri R, Pittman TL, Scollard D, Truman R, Moraes MO, et al. Molecular Determination of Mycobacterium leprae Viability by Use of Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 1º de julho de 2009;47(7):2124–30.

Martins AC da C, Miranda A, Oliveira MLW-R de, Bühner-Sékula S, Martinez A. Nasal mucosa study of leprosy contacts with positive serology for the phenolic glycolipid 1 antigen. *Braz J Otorhinolaryngol*. outubro de 2010;76(5):579–87.

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?: *The American Journal of Dermatopathology*. janeiro de 2010;1.

Masten BJ, Olson GK, Tarleton CA, Rund C, Schuyler M, Mehran R, et al. Characterization of Myeloid and Plasmacytoid Dendritic Cells in Human Lung. *The Journal of Immunology*. 1º de dezembro de 2006;177(11):7784–93.

Mellor AL, Munn DH.IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nature Reviews Immunology*. outubro de 2004;4(10):762–74.

Ministério da Saúde. 2014 [página da internet] [acesso em maio 2017]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/705-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/hanseníase/11299-tratamento>.

Ministério da Saúde. Indicadores epidemiológicos e operacionais de hanseníase. Brasil 2001-2012. Fonte: Portal da Saúde. 2013; Endereço eletrônico: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31200. Acesso em 24/05/2015.

Modlin RL, Hofman FM, Horwitz DA, Husmann LA, Gillis S, Taylor CR, et al. In situ identification of cells in human leprosy granulomas with monoclonal antibodies to interleukin 2 and its receptor. *J Immunol*. junho de 1984;132(6):3085–90.

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*. outubro de 2009;6(4):343–53.

Montoya D, Modlin RL. Learning from Leprosy. In: *Advances in Immunology*. Elsevier; 2010. p. 1–24.

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: Immunity to infection. *European Journal of Immunology*. novembro de 2012;42(11):2925–36.

Nath I, Saini C, Valluri VL. Immunology of leprosy and diagnostic challenges. *Clinics in Dermatology*. janeiro de 2015;33(1):90–8.

Notarangelo FM, Wilson EH, Horning KJ, Thomas MAR, Harris TH, Fang Q, et al. Evaluation of kynurenine pathway metabolism in *Toxoplasma gondii*-infected mice: Implications for schizophrenia. *Schizophrenia Research*. janeiro de 2014;152(1):261–7.

Oliveira RB, Ochoa MT, Sieling PA, Rea TH, Rambukkana A, Sarno EN, et al. Expression of Toll-Like Receptor 2 on Human Schwann Cells: a Mechanism of Nerve Damage in Leprosy. *Infection and Immunity*. 1º de março de 2003;71(3):1427–33.

Orabona C, Pallotta MT, Volpi C, Fallarino F, Vacca C, Bianchi R, et al. SOCS3 drives proteasomal degradation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and antagonizes IDO-dependent tolerogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 30 de dezembro de 2008;105(52):20828–33.

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. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1º de maio de 2012;86(5):878–83.

Pallotta MT, Orabona C, Volpi C, Vacca C, Belladonna ML, Bianchi R, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nature Immunology*. 31 de julho de 2011;12(9):870–8.

Patnaik N, Agarwal S, Sharma S, Sharma S, Pandhi D. Evaluation of apoptosis in skin biopsies of patients of borderline leprosy and lepra type 1 reaction. *Indian Journal of Dermatology*. 2015; 60(1):60-65.

Plain KM, de Silva K, Earl J, Begg DJ, Purdie AC, Whittington RJ. Indoleamine 2,3-Dioxygenase, Tryptophan Catabolism, and Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: a Model for Chronic Mycobacterial Infections. *Infection and Immunity*. 1º de setembro de 2011;79(9):3821–32.

Ress RFW. The microbiology of leprosy. In: Hastings RC (ed) *Leprosy*, 1st edition, Churchill Livingstone Inc, New York. 1985.

Ridley D S, Jopling W H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterium Diseases*, 1966, 34(3):255-273.

Rivoire BL, TerLouw S, Groathouse NA, Brennan PJ. The Challenge of Producing Skin Test Antigens with Minimal Resources Suitable for Human Application against a Neglected Tropical Disease; Leprosy. Vinetz JM, organizador. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 29 de maio de 2014;8(5):e2791.

Royer P-J, Tanguy-Royer S, Ebstein F, Sapede C, Simon T, Barbieux I, et al. Culture medium and protein supplementation in the generation and maturation of dendritic cells. *Scand J Immunol*. junho de 2006;63(6):401–9.

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*. 1º de abril de 1994;179(4):1109–18.

Salvador A, Igartua M, Luis J, Maria R. Dendritic Cells Interactions with the Immune System – Implications for Vaccine Development. In: Gowder S, organizador. Cell Interaction. 2012. 70-92

Schmidt SV, Schultze JL. New Insights into IDO Biology in Bacterial and Viral Infections. *Frontiers in Immunology*. 11 de agosto de 2014. 5:1-12.

Schwarcz R, Bruno JP, Muchowski PJ, Wu H-Q. Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology. *Nature Reviews Neuroscience*. 8 de junho de 2012;13(7):465–77.

Schwarcz R, Stone TW. The kynurenine pathway and the brain: Challenges, controversies and promises. *Neuropharmacology*. janeiro de 2017;112:237–47.

Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The Continuing Challenges of Leprosy. *Clinical Microbiology Reviews*. 1º de abril de 2006;19(2):338–81.

Shahbazi M, Kwang TWX, Purwanti YI, Fan W, Wang S. Inhibitory effects of neural stem cells derived from human embryonic stem cells on differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Journal of the Neurological Sciences*. julho de 2013;330(1–2):85–93.

Shepard CC. Temperature optimum of *Mycobacterium leprae* in mice. *J Bacteriol* 1965;90(5):1271–5.

Shortman K, Liu Y-J. MOUSE AND HUMAN DENDRITIC CELL SUBTYPES. *Nature Reviews Immunology*. março de 2002;2(3):151–61.

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*. 1º de fevereiro de 1999;162(3):1851–8.

Souza C S. Hanseníase: Formas clínicas e diagnóstico diferencial. Simpósio: hanseníase *cap. I*. 1997 30: 325-334.

Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, et al. Cutting Edge: Role of Toll-Like Receptor 1 in Mediating Immune Response to Microbial Lipoproteins. *The Journal of Immunology*. 1º de julho de 2002;169(1):10–4.

Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*. 7 de dezembro de 1999;96(25):14459–63.

Vissa VD, Brennan PJ. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. *Genome Biol*. 2001;2(8):REVIEWS1023.

WHO, World Healthy Organization [homepage na internet]. **Leprosy** [acesso em maio de 2017]. Disponível em: <http://www.who.int/lep/en/>

WHO, World Healthy Organization. **Weekly Epidemiological Record**: Leprosy update, 2016. World Health Organization 2016.

Wong SH, Gochhait S, Malhotra D, Pettersson FH, Teo YY, Khor CC, et al. Leprosy and the Adaptation of Human Toll-Like Receptor 1. Bishai WR, organizador. *PLoS Pathogens*. 1º de julho de 2010;6(7):e1000979.

Wu L, Dakic A. Development of dendritic cell system. *Cell Mol Immunol*. abril de 2004;1(2):112–8.

Wu T, Guo S, Wang J, Li L, Xu L, Liu P, et al. Interaction between mannosylated lipoarabinomannan and dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin influences dendritic cells maturation and T cell immunity. *Cellular Immunology*. janeiro de 2011;272(1):94–101.

Xia Y, Dai J, Lu P, Huang Y, Zhu Y, Zhang X. Distinct Effect of CD40 and TNF-Signaling on the Chemokine/Chemokine Receptor Expression and Function of the Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Cellular and Molecular Immunology*. abril de 2008;5(2):121–31.

Yi H-J, Lu G-X. Adherent and non-adherent dendritic cells are equivalently qualified in GM-CSF, IL-4 and TNF- α culture system. Cellular Immunology. maio de 2012;277(1-2):44-8.

9. Anexos

O artigo de título “Indoleamine 2,3-dioxygenase and iron are required for *Mycobacterium leprae* survival” foi aceito dia 5 de julho de 2017 pela revista *Microbes and Infection*, o mesmo foi um trabalho em colaboração durante o mestrado.