

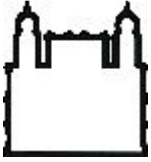
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Parasitária

**PAPEL DO NF- κ B E DA FAGOCITOSE DE CÉLULAS APOPTÓTICAS
NA PATOGÊNESE DA HANSENÍASE**

TATIANA DE OLIVEIRA FULCO

Rio de Janeiro
2010



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós graduação em Biologia Parasitária

TATIANA DE OLIVEIRA FULCO

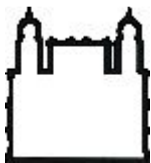
**Papel do NF- κ B e da Fagocitose de Células Apoptóticas na
Patogênese da hanseníase**

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

Orientador (a): Elizabeth Pereira Sampaio

Rio de Janeiro
Abril de 2010

Ficha catalográfica



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: TATIANA DE OLIVEIRA FULCO

**PAPEL DO NF- κ B E DA FAGOCITOSE DE CÉLULAS APOPTÓTICAS
NA PATOGÊNESE DA HANSENÍASE**

ORIENTADOR: Prof. Dr^a Elizabeth Pereira Sampaio

Aprovada em: 05/04/2010

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Patrícia Torres Bozza – IOC/FIOCRUZ - Presidente da Banca
Prof. Dr. Célio Geraldo Freire de Lima – UFRJ - Membro
Prof. Dr. Juliana de Meis - IOC/FIOCRUZ - Membro e Revisora
Prof. Dr. Luzia Maria Oliveira Pinto - IOC/FIOCRUZ- Suplente
Prof. Dr. Geraldo Moura Batista Pereira - IOC/FIOCRUZ - Suplente

Rio de Janeiro, 05 de Abril de 2010

*Ao meu marido Vinicius por
todo amor que nos une.*

*“Não importa como
começar. O importante é
saber o que se quer
alcançar.”*

Roberta Olmo Pinheiro

Agradecimentos

À Dr^a Roberta Olmo Pinheiro por me orientar de fato, por ser verdadeiramente uma cientista e por me ensinar a pensar como uma. Pela sua confiança e acima de tudo sua esperança de que tudo daria certo. E por fim, por toda sua dedicação, paciência e cuidado na realização deste trabalho.

À Dr^a Elizabeth Pereira Sampaio pela oportunidade de realizar este trabalho e por me orientar desde a iniciação científica.

À Dr^a Euzenir Nunes Sarno pela preocupação com a nossa formação e principalmente por representar um exemplo de profissionalismo.

À Dr^a Suzana Côrte Real e a Vanessa Diniz pelo apoio neste trabalho e ajuda na realização dos experimentos de microscopia eletrônica.

Ao Pedro Paulo de Abreu Manso e ao Bernardo Pascarelli pelo suporte nos experimentos de Confocal e pela agradável convivência.

À Dr^a Patricia Bozza e sua equipe pelo interesse e colaboração com este trabalho.

Ao Dr Geraldo Moura Pereira e a Dr^a Iris Maria Peixoto Alvim pela doação das células Jurkat.

Aos meus queridos amigos do laboratório de hanseníase: Ariane, Andressa (por me ajudar com o ELISA), Bruno, Danielle, Daniel Serra, Daniel Pedrosa, Eliane, Jô (pela amizade e pelas caronas), Paula (meu braço direito na realização dos experimentos), Rafael, Priscila, Rose e Thaís (pela ajuda com o microscópio).

A todos os amigos do departamento pelo carinho e amizade.

À Cristiane e o Augusto por serem sempre tão atenciosos e prestativos comigo.

Aos colegas do ambulatório Souza Araújo pelo suporte na coleta de sangue, sem a qual não poderia realizar estas atividades.

À Coordenação de Pós-graduação em Biologia Parasitária e aos funcionários do departamento de ensino.

Aos meus pais e a minha irmã que são minha base sólida. Obrigado pelo amor, incentivo e por entenderem a minha ausência.

Ao Vinicius pelo amor, compreensão e por agüentar as variações de humor características do período pré-tese.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A Deus pela força renovada a cada dia e por Sua grandeza que se faz presente em cada momento da minha vida.

Lista de Abreviaturas

β 2-GPI – glicoproteína β 2

AA – Ácido araquidônico

AIF - Fator indutor de apoptose

Akt – Proteína quinase B

AMPc – adenosina monofosfato cíclica

BAAR – bacilo álcool-ácido resistente

BAFF – *B cell Activating Factor*, Fator ativador de células B

BB – borderline borderline

BL – borderline lepromatosa

BT – borderline tuberculóide

Caco – Células epiteliais de adenocarcinoma coloretal

cDNA – ácido desoxiribonucléico complementar

COX - ciclooxigenase

DTT – ditioneitol

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

EGTA – ácido etilenoglicoltetracético

ELISA – ensaio imunoenzimático

EMSA – ensaio de mobilidade eletroforética

ENL – eritema nodoso leproso

ERK – sinal extracelular regulado por quinase

FITC – isotiocianato de Fluoresceína

FS – fosfatidilserina

Gas6 – growth arrest-specific 6, gene específico de parada do crescimento 6

HLA-DR – antígeno leucocitário humano de classe II, alelo DR

I κ B – Inibidor de NF- κ B

IB – índice bacteriológico

ICAM-1 - molécula de adesão intracelular 1

IKK – I κ B quinase

JNK – c-Jun N-terminal quinase

LAM – lipoarabinomanana

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

LL – pacientes com a forma clínica lepromatosa

LPS – lipopolissacarídeo
M ϕ 1 – macrófago tipo 1
M ϕ 2 – macrófago tipo 2
MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno
MAPKKK – MAPK quinase quinase
MDT – multidroga terapia
MEK – MAPK/ERK
MKK6 – Proteína quinase 6 ativada por mitógeno
mRNA – ácido ribonucléico mensageiro
MyD88 - fator de diferenciação mielóide 88
NF- κ B – fator nuclear kappa B
NIK – Quinase induzida por NF- κ B
NO – óxido nítrico
OMS – Organização Mundial de Saúde
PB – pacientes paucibacilares
PBMC – células mononucleares de sangue periférico
PBS – salina tampão fosfato
PCR – Reação de polimerase em cadeia
PGD₂ – prostaglandina D2
PGE₂ – prostaglandina E2
PGL1 – glicolípido fenólico-1
PI – iodeto de propídeo
PI3K – Fosfatidil inositol 3 quinase
PMA – Acetato de formol miristato
PMSF – fenil metil sulfonil
PQT – poliquimioterapia
RF – RNase free
RR – reação reversa
SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida
SFB – soro fetal bovino
SIRP- α - receptor de proteína regulatória de sinal
TACO – Aspartato triptofano contendo proteína de revestimento
TAD – Domínios de ativação transcricional

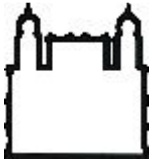
TGF- β 1 – fator transformador de crescimento beta 1

TLR – receptores do tipo Toll like

TT – pacientes com a forma clínica tuberculóide

UV – ultravioleta

x g – velocidade de sedimentação em unidade gravitacional



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

PAPEL DO NF- κ B E DA FAGOCITOSE DE CÉLULAS APOPTÓTICAS NA PATOGÊNESE DA HANSENÍASE

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Tatiana de Oliveira Fulco

Estudos anteriores de nosso grupo demonstraram que o *Mycobacterium leprae* induz apoptose de monócitos humanos por uma via dependente de proteasoma. No presente trabalho nós demonstramos que o *M. leprae* induz a produção de TNF α e induz apoptose de monócitos por uma via dependente de NF- κ B. A talidomida, utilizada no tratamento do Eritema Nodoso Hansênico, possui atividade anti-TNF por um mecanismo ainda não completamente elucidado. Nós demonstramos que a Talidomida suprime a produção de TNF por uma via dependente de p38 MAPK e NF- κ B. O papel da remoção de células apoptóticas também foi avaliado. Apesar de macrófagos ativados pela via alternativa ou M ϕ 2 possuírem maior capacidade de associação com o *M. leprae* quando comparados a macrófagos ativados pela via clássica ou M ϕ 1, o estímulo com células apoptóticas levou ao aumento na associação do *M. leprae* em macrófagos M ϕ 1, mas não M ϕ 2. Esse aumento na associação do *M. leprae* com macrófagos M ϕ 1 estimulados com células apoptóticas está associado ao aumento da expressão gênica de COX-2 e elevados níveis de PGE $_2$, IL-10 e TGF- β , com redução dos níveis de IL-6 e IL-15. Em conjunto, tais dados sugerem que na presença de células apoptóticas, macrófagos pró-inflamatórios estimulados com o *M. leprae*, desviam para um fenótipo antiinflamatório o que pode explicar o estabelecimento da infecção em pacientes com a forma tuberculóide da doença.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

PAPEL DO NF- κ B E DA FAGOCITOSE DE CÉLULAS APOPTÓTICAS NA PATOGÊNESE DA HANSENÍASE

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Tatiana de Oliveira Fulco

Previous studies of our group revealed that *Mycobacterium leprae* induces apoptosis of human monocytes by a proteasome-dependent pathway. In the present work we demonstrated that *M. leprae* induces TNF α and apoptosis by a NF- κ B-dependent pathway. Thalidomide, drug used in treatment of erythema nodosum leprosum, has been described by its anti-TNF α activity although the mechanism is not fully understood. We demonstrated that thalidomide suppress TNF α production by p38 MAPK and NF- κ B – dependent pathways. The role of apoptotic cell clearance was also evaluated. Although macrophages activated by alternative pathway or M ϕ 2 have increased phagocytic activity when compared to macrophages activated by classical pathway or M ϕ 1, apoptotic cell uptake increased the association of *M. leprae* with M ϕ 1 but not M ϕ 2. The increase in *M. leprae* association with apoptotic cell stimulated M ϕ 1 is associated with the increased COX-2 gene expression and higher levels of PGE₂, IL-10 and TGF- β , with reduced levels of IL-6 and IL-15. Together, these data suggest that in the presence of apoptotic cells, *M. leprae* stimulated pro-inflammatory macrophages deviates to an anti-inflammatory phenotype that could explain the establishment of *M. leprae* infection in patients with the tuberculoid form of the disease.

Índice

Conteúdo	Página
Agradecimentos	vii
Lista de Abreviaturas	viii
Resumo	xi
Abstract	xii
Índice	xiii
Introdução	1
1. Hanseníase	1
2. Situação Global da Hanseníase	1
3. Biologia do <i>Mycobacterium leprae</i>	3
4. Formas Clínicas da Hanseníase	5
5. Talidomida e mecanismo anti-TNF	9
6. O fator transcricional NF- κ B	12
7. Polarização dos macrófagos	15
8. Resposta Imune na Hanseníase	21
9. Apoptose e morte celular na Hanseníase	26
10. A interação fagócito/célula apoptótica	29
11. Fagocitose de células apoptóticas e regulação do sistema imune	33
12. Justificativa	36
Objetivos	37
Metodologia	38
1. Biossegurança e permissão ética	38
2. Cultura de células	38
3. Tratamento das células com <i>M. leprae</i>	39
4. Pesquisa da translocação de NF- κ B em PBMC estimuladas com <i>M. leprae</i>	39
5. Avaliação da translocação da subunidade p65 de NF- κ B em monócitos humanos estimulados com <i>M. leprae</i> por citometria de fluxo	40
6. Pesquisa da participação do NF- κ B na apoptose induzida por <i>M. leprae</i>	41
7. Pesquisa do papel importância do NF- κ B na síntese de TNF α em resposta ao <i>M. leprae</i>	42
8. Pesquisa da atividade do NF- κ B em resposta ao <i>M. leprae</i>	42

9. Pesquisa do envolvimento da via de p38 na supressão de TNF pela talidomida	42
10. Geração de macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2 derivados de monócitos	44
11. Obtenção de células em apoptose	44
12. Pesquisa da capacidade fagocítica dos macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2, 41	45
13. Pesquisa do percentual de associação do <i>M. leprae</i> aos macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2 em resposta a fagocitose de células apoptose	45
14. Pesquisa do papel do <i>M. leprae</i> na fagocitose de células apoptóticas em macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2	46
15. Análise da ultraestrutura da fagocitose de células apoptóticas por macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2 em resposta ao <i>M. leprae</i>	47
16. Pesquisa da fagocitose de células apoptóticas na expressão de COX-2 em macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2 induzidos por <i>M. leprae</i>	47
17. Pesquisa da importância da fagocitose de células apoptóticas no fenótipo dos macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2 em resposta ao <i>M. leprae</i>	49
18. Pesquisa da importância da fagocitose de células apoptóticas na secreção de citocinas e mediadores induzidos por <i>M. leprae</i> em macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2	49
19. Análise estatística	50
Resultados	51
1. Análise da translocação nuclear de NF- κ B em células humanas em resposta ao <i>M. leprae</i>	51
2. Estudo da participação do proteossoma e da talidomida na translocação de NF- κ B induzida por <i>M. leprae</i>	53
3. Avaliação da atividade de NF- κ B em células estimuladas com <i>M. leprae</i>	55
4. Avaliação da participação do NF- κ B na apoptose e secreção de TNF- α em resposta ao <i>M. leprae</i>	56
5. Avaliação do papel da talidomida na fosforilação de p38 em resposta ao <i>M. leprae</i>	58
6. Polarização dos macrófagos em M ϕ 1 e M ϕ 2	59
7. Análise da capacidade de internalização do <i>M. leprae</i> por macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2	62
8. Estudo do papel da fagocitose de células apoptóticas na internalização do <i>M. leprae</i>	64
9. Avaliação da participação do <i>M. leprae</i> na fagocitose de células apoptóticas	67
10. Efeito da fagocitose de células apoptóticas na expressão gênica de COX-2	69
11. Estudo da fagocitose de células apoptóticas na produção de PGE ₂	71
12. Análise da fagocitose de células apoptóticas no fenótipo dos macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2	72

13. Análise da fagocitose de células apoptóticas na secreção de citocinas	76
Discussão	79
Conclusões	93
Referências Bibliográficas	94
Anexos	113

1. Hanseníase

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica que afeta principalmente a pele e nervos periféricos [1]. A rota de transmissão da hanseníase ainda não está definitivamente comprovada, mas acredita-se que seja através das vias respiratórias, embora não seja descartada a possibilidade de infecção via lesões de pele. Os primeiros tecidos infectados pelo *Mycobacterium leprae* são sítios superficiais da pele e nervos devido à sua preferência por baixas temperaturas. Porém, órgãos internos podem ser afetados quando a enfermidade não é controlada [2]. A doença apresenta um longo período de incubação e as primeiras manifestações clínicas podem ocorrer entre dois a dez anos após a infecção. O *M. leprae* tem alta infectividade e baixa patogenicidade, isto é, infecta muitas pessoas, no entanto só poucas adoecem. Acredita-se que mais de 90% da população seja resistente à infecção pelo *M. leprae* e não apresente sintomas clinicamente detectáveis [3].

2. Situação global da Hanseníase

A hanseníase é a principal causa de incapacidade física permanente dentre as doenças infecto-contagiosas. A maneira mais eficaz de prevenir as complicações decorrentes da hanseníase se dá através do diagnóstico e tratamento precoce dos casos, antes de ocorrerem lesões nervosas. A doença e as deformidades a ela associadas são responsáveis pelo estigma social e pela discriminação contra os pacientes e suas famílias em muitas sociedades. A erradicação da doença, porém, parece distante, pelo menos em alguns países. No Brasil, em 2007, a doença teve taxa de incidência de 2,3 novos casos a cada 10 mil habitantes, bem abaixo dos 19,5 casos de 1990 e dos 4,52 casos de 2004, mas ainda quase três vezes maior que o índice aceito pela Organização Mundial da Saúde (OMS), de menos de um caso a cada 10 mil

habitantes. O país é responsável por 90% dos casos no continente americano e continua em primeiro lugar no ranking mundial de novos casos por 100 mil habitantes [4, 5].

Hoje há no mundo aproximadamente 200 mil casos de hanseníase e 20 milhões de ex-pacientes. Índia, Brasil, Madagascar, Moçambique, Nepal entre outros contribuem com 83% dos casos registrados e representam os países mais endêmicos do globo [6] (Tabela 1). No Brasil, os estados das regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste detêm o maior número de doentes. Em alguns municípios do estado do Maranhão e do Pará, os índices são alarmantes, chegando a 50 casos para cada 10 mil habitantes [4].

Desde 1985 quando a poliquimioterapia (PQT) foi introduzida observou-se uma redução significativa da prevalência da hanseníase, com cerca de 85% de cura em mais de 9 milhões de pacientes em todo o mundo. Em conjunto, mais de 14,5 milhões de pacientes foram curados através da poliquimioterapia (PQT) [5]. Apesar do número de novos casos globais ter diminuído 4% durante 2007, em comparação a 2006, esse número ainda tem se mantido alto. Em 2007, foram registrados em todo o mundo 254.525 novos casos. A OMS tem atribuído esta persistência a vários fatores, como métodos mais avançados de diagnóstico, a alta transmissão em certas áreas onde existam pacientes assintomáticos, porém transmissores da doença, ou ainda, uma reincidência de casos tratados [5].

Tabela 1. Países mais endêmicos para a Hanseníase no mundo.

Região	Casos registrados no final de 2007 (taxa de prevalência a cada 10 000 habitantes)	Nº de casos novos detectados durante 2007 (taxa de incidência a cada 100 000 habitantes)
Índia	87 228 (0,007)	137 685 (0,12)
Brasil	45 847 (2,4)	39 125 (20,45)
Timor Leste	131 (1,23)	184 (17,23)
Nepal	3 329 (1,18)	4 436 (15,72)

Fonte: Adaptado de WHO, 2008 [5]

3. Biologia do *Mycobacterium leprae*

O *M. leprae*, agente causador da hanseníase, é um patógeno intracelular obrigatório que infecta predominantemente macrófagos e células de Schwann [7]. Possui a forma de um bastonete reto ou ligeiramente encurvado, de 1,5 a 8 micra de comprimento por 0,2 a 0,5 micron de largura. Cora-se em vermelho pela fucsina e não se descora pela lavagem com álcool ácido, é, portanto, um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) [8]. É uma bactéria de crescimento lento, fazendo uma divisão binária a cada 12-14 dias [9].

Compartilha com outras micobactérias características como a abundância de lipídios na forma de ácidos micólicos (ácidos graxos de elevado peso molecular) e lipoarabinomanana (LAM) em seu envelope celular. Além disso, mais externamente, estão localizados glicolipídeos, como o PGL1 (glicolipídeo fenólico-1), encontrado exclusivamente no *M. leprae*. Sua estrutura é composta de um trissacarídeo, fenol, fitiocerol e de ácido micoseossídico (Figura 1) [10]. Estudos anteriores já mostraram que o PGL1 pode ser encontrado em tecidos, no sangue circulante e na urina de doentes multibacilares. Além disso, ele também foi detectado em tatus infectados com o

M. leprae [11]. Este antígeno não apresenta reação cruzada com *M. tuberculosis* ou outras microbactérias e estimula uma potente resposta IgM que é proporcional a carga bacteriana nos pacientes [12].

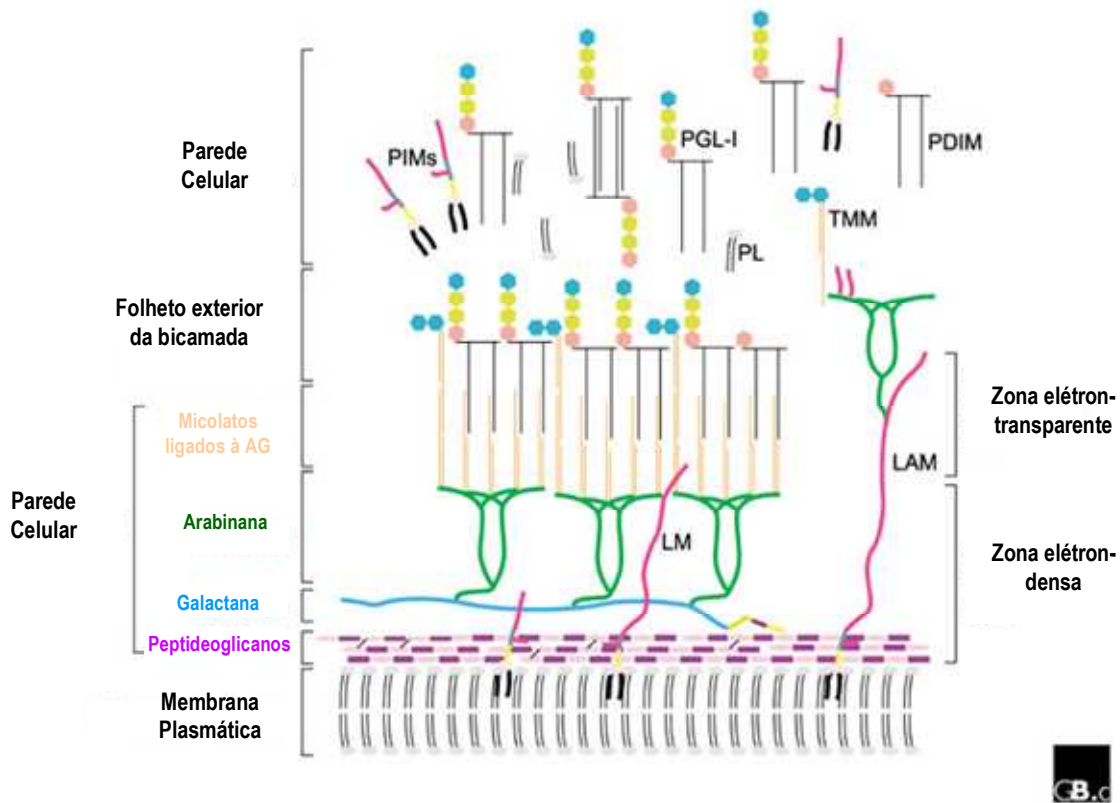


Figura 1: Modelo esquemático da parede celular do *M. leprae*. A membrana plasmática é recoberta por uma parede celular feita de peptideoglicano associada covalentemente a galactana por uma unidade de ligação de arabinogalactana. Por sua vez, três cadeias ramificadas de arabinana são ligadas à galactana. A camada de peptideoglicano-arabinogalactano 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 glicolípido 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 [13].

Desde sua descoberta em 1873 por Armauer Hansen todas as tentativas para cultivar este microorganismo falharam [14]. Entretanto, em 1962, foi demonstrado por Shepard que o coxim plantar de camundongos infectados com 10^3 a 10^4 bacilos promovia uma lesão localizada

de hanseníase durante 9 a 12 meses [15]. Outra fonte de *M. leprae* utilizada para estudos é o tatu nove bandas (*Dasyus novencinctus*). Ele permite o crescimento do bacilo de forma disseminada durante 18 a 24 meses comprometendo pele, nervos periféricos, medula óssea, fígado, baço, linfonodos, pulmões, meninges e olhos. Após a purificação os bacilos podem ser usados vivos por até uma semana ou letalmente irradiados [16].

O genoma do *M. leprae* foi completamente seqüenciado em 2001 e gerou grande expectativa sobre o conhecimento de sua funcionalidade na patogenia da hanseníase. Apenas 49,5% do genoma do *M. leprae* (1605 genes) contêm genes que codificam proteínas sendo o restante constituído de pseudogenes ou genes degenerados [17]. Quando comparado ao *M. tuberculosis* percebe-se uma perda maciça de genes pelo *M. leprae*, o que poderia explicar o seu longo tempo de geração e sua incapacidade de multiplicação *in vitro* [13].

4. Formas clínicas da Hanseníase

A hanseníase se manifesta segundo um espectro de formas clínicas resultante do grau de resposta imune celular desenvolvida por cada indivíduo contra o *M. leprae*. Portanto, a classificação correta dos pacientes é de extrema importância para determinar o tratamento adequado da doença. Existem dois principais sistemas utilizados para classificar os pacientes com hanseníase. De acordo com Ridley e Jopling (1966), os pacientes com hanseníase são classificados em cinco subgrupos (Figura 2) [18]. Em um pólo desse espectro clínico, são encontrados os pacientes tuberculóides, que, na maioria das vezes, desenvolvem apenas uma lesão, com pequeno número de bactérias. Estes pacientes apresentam baixos níveis de anticorpos específicos, mas resposta imune celular eficiente, que é responsável pela restrição do crescimento do patógeno. No outro pólo, os pacientes lepromatosos apresentam doença disseminada, com inúmeras lesões contendo um alto número de bactérias. Estes pacientes apresentam altos níveis de anticorpos e ausência de resposta imune celular. Além das formas

polares, existem formas intermediárias denominadas borderline: borderline tuberculóide (BT), borderline borderline (BB) e borderline lepromatosa (BL). Nestes casos, a resposta imune celular é maior de acordo com a proximidade ao pólo tuberculóide [6].

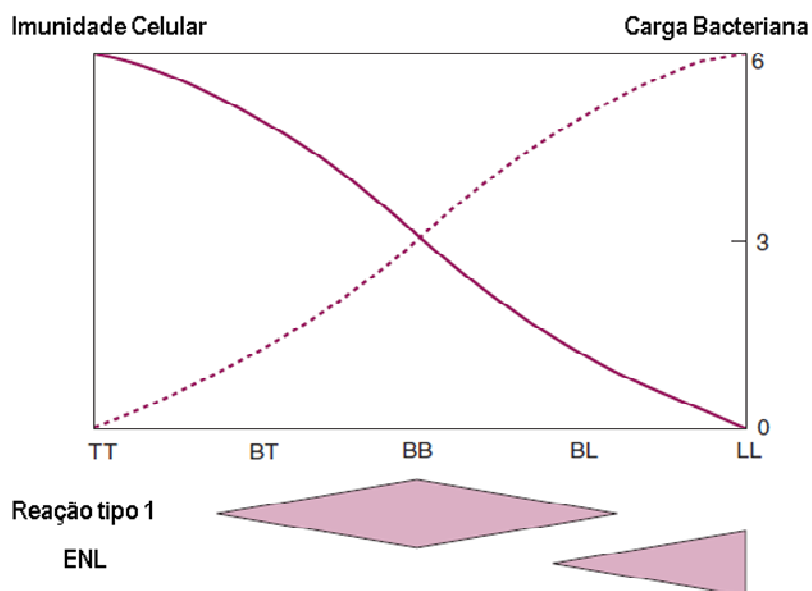


Figura 2: Formas Clínicas da Hanseníase. Classificação segundo Ridley-Jopling. Relação entre carga bacteriana e imunidade celular nas diferentes formas da doença. A forma TT é considerada mais benigna, devido a uma eficiente resposta imune celular e reduzido número de bacilos. Os pacientes LL apresentam numerosos bacilos devido à resposta imune celular ausente. TT, paciente com a forma clínica tuberculóide; BT, “borderline-tuberculóide”; BB, “borderline-borderline”; BL, “borderline-lepromatosa”; LL “lepromatosa-lepromatosa”; ENL, eritema nodoso lepromatosa [19].

A outra classificação bem mais simplificada tem como base o índice bacteriológico (IB) ou o número de lesões. São considerados pacientes paucibacilares (PB) aqueles com até cinco lesões ou IB=0 e multibacilares aqueles com mais de 6 lesões ou IB >0. Na classificação de Ridley e Jopling (1966), pacientes paucibacilares incluem pacientes TT e BT, enquanto pacientes multibacilares incluem pacientes BB, BL e LL [10; 18].

A manifestação inicial da doença pode ser a forma clínica indeterminada (I), onde a resposta do hospedeiro é insuficientemente diferenciada para permitir classificação. Pode evoluir para cura espontânea ou desenvolver aspectos clínicos da doença estabelecida dentro do

espectro, dependendo da capacidade do indivíduo em montar uma resposta imune celular contra o *M. leprae*. A medida padrão da imunidade mediada por célula ao patógeno é a reação de Mitsuda (1953), uma reação de hipersensibilidade do tipo tardio, que é avaliada após uma injeção intradérmica de bacilos mortos aplicada nos pacientes, cuja duração é medida após 3 a 4 semanas [20; 21]. O teste de Mitsuda é positivo quando forma-se infiltração nodular maior que 5 mm de diâmetro ou quando o infiltrado ulcera. Isso indica certo grau de resistência à hanseníase, tanto mais pronunciado quanto mais intensa a resposta. O teste é Mitsuda negativo quando há ausência de reação, indicando resistência deficiente. Este teste pode indicar o prognóstico da doença uma vez que pessoas com Mitsuda positivo tendem a desenvolver a forma tuberculóide (TT) e pessoas com Mitsuda negativo têm maior probabilidade de desenvolver a forma clínica lepromatosa (LL), o pólo de extrema suscetibilidade ao *M. leprae* [22; 23].

O tratamento dos pacientes com hanseníase é realizado com multidrogaterapia (MDT). Para pacientes multibacilares, cujo tratamento dura um ano, são utilizados Rifampicina (600 mg, uma dose por mês), Clofazimina (300 mg, uma dose por mês e 50 mg por dia) e Dapsona (100 mg por dia). Para pacientes paucibacilares, somente Rifampicina e Dapsona são empregados por um período de seis meses [24].

Outra característica marcante da hanseníase é o desenvolvimento de episódios reacionais. Estes episódios podem ser definidos como manifestações clínicas resultantes de alterações no balanço imunológico entre o hospedeiro e o agente infectante, *M. leprae* [6]. Esses episódios agudos, que afetam principalmente pele e nervos, são a principal causa de morbidade e incapacidade da função do nervo periférico. Os episódios reacionais podem se apresentar durante o curso natural da doença, durante o tratamento e até mesmo após a alta, quando o paciente é considerado curado [25]. Dois tipos de reações são conhecidos: a reação reversa (RR) ou reação tipo 1 que ocorre nos pacientes borderline, e o eritema nodoso leproso (ENL) ou reação tipo 2, que ocorre nos pacientes multibacilares [19, 26].

Clinicamente, a reação reversa se manifesta por um aumento do processo inflamatório nas lesões de pele, nervo ou ambas, bem como pelo aparecimento de novas lesões [27]. Edema nas mãos, pés e face também podem ser uma característica da reação, mas sintomas sistêmicos, como febre, são incomuns. O aumento do processo inflamatório nos nervos compromete a função nervosa, e se não for tratada rápida e adequadamente leva à perda permanente dessa função causando neuropatia periférica sensorial e motora. A reação reversa é frequentemente recorrente, e isso pode conduzir a um maior dano nervoso [28]. Além disso, há um aumento do número de receptores de IL-2 nas biópsias de pacientes com RR, assim como dos níveis de mRNA de IL-1 β , TNF α , IL-2 e IFN γ . Entretanto, há um decréscimo dos níveis de outras citocinas, como IL-4, IL-5 e IL-10, dando suporte à hipótese de aumento de resposta imune mediada por células [29;30].

O eritema nodoso leproso (ENL) ou reação tipo 2 é uma complicação imunológica da hanseníase que acomete cerca de 50% dos pacientes lepromatosos e 10% dos pacientes borderline lepromatosos [31]. O risco de se desenvolver o ENL é maior quanto maior for o índice bacteriano (IB) e o infiltrado inflamatório presente na lesão [32]. As lesões cutâneas podem apresentar-se como eritematosas, pápulas ou nódulos que podem ser superficiais ou profundos. Clinicamente, o ENL é caracterizado por sintomas sistêmicos, como febre alta, mal estar, edema da face, mãos e pés [33]. A neurite também pode ser observada nesses pacientes, porém, é muito mais branda do que o observado na reação reversa. Tem sido mostrado que, durante o ENL, há um aumento seletivo na expressão de mRNA de IL-6, IL-8 e IL-10 nas biópsias, assim como aumento dos níveis secretados de citocinas como TNF- α , IL-12p70 e IL-12p40 em pacientes com ENL [29; 34; 35], assim como células presentes nas lesões dos pacientes com ENL expressando receptores para IL-2 (IL-2R) e HLA-DR [36].

A ocorrência dos episódios reacionais é considerada uma emergência clínica e o tratamento antiinflamatório precisa ser prontamente iniciado. Pacientes com RR são tratados

com esteróides (Prednisona a 1,0 mg/kg), enquanto pacientes ENL são tratados preferencialmente com Talidomida (300 mg/dia) ou Pentoxifilina (400 mg de 8 em 8 horas), associada ou não a esteróides [37, 38].

5. Talidomida e mecanismo anti-TNF

A Talidomida chegou ao mercado pela primeira vez na Alemanha em 1 de outubro de 1957. Foi comercializada como sedativo e hipnótico com poucos efeitos colaterais [39]. Esse fármaco foi tão bem aceito que começou a ser utilizado para combater os enjôos matinais provocados pela gravidez [40]. No final da década de 50, uma das empresas que comercializavam a Talidomida começou a receber notificações de neuropatia periférica traduzida por intensas câimbras, fraqueza muscular e perda da coordenação motora pelos indivíduos que haviam utilizado o fármaco, porém, mesmo assim essa droga continuou a ser vendida no mercado [39]. Na década de 60, a Talidomida começou a ser investigada e associada a neuropatias e má-formação em crianças recém-nascidas sendo retirada do mercado em 1961[41].

Em 1998, a Talidomida ressurge com um novo propósito devido à sua atividade antiinflamatória e imunomoduladora. Ela está sendo utilizada no tratamento de algumas neoplasias, por suas propriedades antiangiogênicas, como imunossupressor no tratamento de pacientes submetidos a transplantes renais e de medula e, no tratamento de artrite reumatóide, tuberculose crônica e doença de Crohn [42]. No Brasil, a Talidomida está sendo utilizada em três programas do Governo Federal (DST/AIDS, Tuberculose/TB e Hanseníase), fazendo parte dos insumos do Ministério da Saúde, porém o seu uso é extremamente restrito e controlado, devido à Portaria Número 354 de 15 de agosto de 1997.

A primeira indicação que a Talidomida poderia ser utilizada na hanseníase foi em 1965 quando um pesquisador israelita prescreveu essa droga como sedativo a pacientes com eritema

nodoso leproso (ENL) que sofriam de insônia. Ele observou uma rápida melhora nos sintomas relacionados ao ENL [43]. Estudos posteriores confirmaram esses achados e desde então a talidomida é a droga de escolha no tratamento do ENL [44].

A Talidomida não possui efeito bactericida ou bacteriostático sobre o *M. leprae*. Embora nenhum estudo tenha sido realizado com essa micobactéria, trabalhos realizados com outras bactérias não demonstraram nenhum efeito antimicrobiano [45]. A ação benéfica da talidomida no tratamento ENL se dá através da modulação dos níveis da citocina pro-inflamatória $TNF\alpha$ [46]. Os sintomas clínicos do ENL estão associados a altos níveis de $TNF\alpha$ e $IL-1\beta$ no soro desses pacientes. Os níveis de $TNF\alpha$ secretados por células mononucleares do sangue periférico de pacientes com ENL foram maiores do que qualquer outra forma clínica da doença. Essa secreção foi inibida em 90% durante o tratamento com talidomida. A redução dos níveis de $TNF\alpha$ foi acompanhada de uma diminuição dos sintomas clínicos [47].

Uma via de sinalização que pode participar do processo de redução de $TNF-\alpha$ na hanseníase é a via das MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno). A família das MAPK possui um importante papel em complexos programas celulares como proliferação, diferenciação, transformação e apoptose [48, 49, 50]. As proteínas dessa cascata amplificam e integram diversos sinais extracelulares e então promovem a resposta fisiológica adequada de acordo com cada estímulo. Até o presente momento, três famílias das MAPK foram identificadas: sinal extracelular regulado por quinase (ERK), c-jun N-terminal quinase (JNK/SAPK) e p38 MAPK [50, 51]. A p38 MAPK é um importante mediador da resposta inflamatória, o que o torna candidato para novas estratégias terapêuticas em condições inflamatórias. Essa proteína parece estar envolvida em processos de apoptose, diferenciação, sobrevivência, proliferação, desenvolvimento, inflamação e outras respostas induzidas por estresse [52]. Esta via é preferencialmente ativada por vários tipos de estresses celulares, como radiação por luz

ultravioleta (UV), choque térmico, estresse osmótico e lipopolissacarídeos, por exemplo [53]. São conhecidas quatro isoformas de p38: α , β , γ e δ e todas podem ser ativadas pela MAPK quinase MKK6 [48].

A via de sinalização JNK está envolvida em sinais como apoptose e proliferação [54, 55]. Ela também foi descrita como via transdutora de sinal em processos de diferenciação em sistemas hematopoiéticos e desenvolvimento de embriões [56, 57]. A ativação de JNK também pode ser associada com transformações em muitos oncogenes [58]. Existem três genes que codificam a proteína JNK, com doze isoformas possíveis derivadas de produtos de rearranjo alternativo de RNAm [48].

A via Raf-MEK-ERK representa uma das mais bem caracterizadas vias de sinalização descritas. Ela está principalmente envolvida com processos de proliferação e diferenciação [57, 59]. Receptores de tirosina quinase ou receptores acoplados à proteína G são capazes de promover a ativação da MAPKKK (Raf), que por sua vez, quando ativadas, ativam a MAPKK (MEK1 e MEK2). Finalmente, a MAPKK ativada promove a fosforilação das proteínas ERK1 e ERK2 (MAPK), ativando-as [48]. Após sua ativação, as proteínas p-ERK1/2 translocam para o núcleo e ativam fatores de transcrição como Elk-1, ATF-2, AP-1, NF- κ B e Sp-1 que promovem a transcrição de diversos genes alvos [60, 61].

Diversos estudos têm procurado estabelecer o mecanismo utilizado pela Talidomida para inibição do TNF- α . Em células caco (linhagem de células epiteliais de adenocarcinoma coloretal) a Talidomida inibiu a indução de COX-2 e a ativação de p38 mediada por IL-1 β [62]. Por outro lado, em células CD34⁺ a Talidomida aumentou a fosforilação de p38 observada a partir de 15 minutos [63]. Em monócitos humanos, estudos *in vitro* demonstraram que a Talidomida provoca inibição seletiva da produção de TNF α após estímulo com lipopolissacarídeo (LPS) ou agonistas micobacterianos [64]. Esta inibição está relacionada à

degradação acelerada do mRNA de $TNF\alpha$ [65]. Além disso, evidências sugerem também que, em células murinas estimuladas com LPS, a inibição de $TNF\alpha$ pela Talidomida pode ocorrer através de um mecanismo dependente de MyD88. Esse trabalho mostrou também que a Talidomida reduz a fosforilação de Akt, p38 e JNK em resposta ao LPS [66]. Em adição, um outro trabalho demonstrou que a Talidomida é capaz de modular a ativação de NF- κ B em células de Schwann estimuladas com *M. leprae* [67].

6. O fator transcricional NF- κ B

Em 1986 Baltimore e colaboradores descreveram o fator nuclear κ B (NF- κ B) sendo um fator de transcrição nuclear em células B, e o relacionaram com o aumento de produção da cadeia kappa de imunoglobulina [68]. Desde então, o NF- κ B foi evidenciado em quase todos os tipos celulares e sabe-se que está envolvido na ativação de um número muito grande de genes em resposta a situações que requerem rápida reprogramação da expressão gênica, como nos processos inflamatórios e infecciosos [69].

A família de proteínas NF- κ B é constituída por cinco membros estruturalmente relacionados e funcionalmente conservados: Rel A (p65), Rel B, c-Rel, NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100) [70]. As proteínas do NF- κ B são conservadas de *Drosophila melanogaster* a humanos e relacionadas através de um domínio N-terminal chamado RH (*rel homology*). O domínio RH medeia suas dimerizações, interações com inibidores específicos, translocação para o núcleo e ligação ao DNA [71].

As proteínas do NF- κ B podem ser agrupadas em dois grandes grupos, o primeiro grupo é composto pelas proteínas p105 e p100 [72]. Ambas possuem um domínio C-terminal que contem múltiplas cópias repetidas de anquirinas, que atuam reprimindo a atividade dessas moléculas. Membros desse grupo não funcionam como fatores de transcrição, sendo

sintetizadas na forma de precursores inativos [72]. Quando esses membros são alvo de proteólise dependente da ubiquitinação e degradação pelo proteossoma, ocorre a remoção do domínio C-terminal e a transformação da proteína p105 em p50 e da proteína p100 em p52, gerando proteínas com capacidade transcricional [73]. O segundo grupo de proteínas inclui p65 (Rel A), c-Rel e o Rel B. Essas proteínas além de possuírem um domínio RH possuem um ou mais domínios TAD (domínios de ativação transcricional) na região C-terminal. Os domínios TAD promovem transcrição por facilitarem o recrutamento de co-ativadores e o deslocamento de repressores [74].

A família Rel ou NF- κ B compreende combinações de homo ou hetero-dímeros, nos quais as formas ativas mais comuns são p65/p50 e p65/p52 [75]. Em células não estimuladas os dímeros do NF- κ B estão inativos, sequestrados no citoplasma em função da associação não covalente com membros da família de proteínas inibitórias κ B [73].

A família I κ B apresenta sete membros: I κ B- α , I κ B- β , Bcl-3, I κ B ϵ , I κ B- γ e as proteínas precursoras NF- κ B1/p105 e NF- κ B2/p100 que possuem de cinco a sete anquirinas nos domínios C-terminal que se ligam ao domínio RH das proteínas NF- κ B, retendo essa proteína no citoplasma [76]. O I κ B- α também regula a atividade de NF- κ B ao entrar no núcleo onde se liga a subunidade p65 e a conduz para o citoplasma, desse modo reduzindo os níveis de p65 no núcleo e a atividade de NF- κ B [77].

Sinais extracelulares, incluindo citocinas (TNF- α e IL-1- β), o ligante de CD40, bactérias, vírus e agentes que promovam estresse permitem a ativação de quinases inibidoras de I κ B (IKK), que são capazes de fosforilar dois resíduos específicos de serina (Ser 32 e Ser 36) de I κ B- α e nos resíduos de Ser 19 e Ser 23 de I κ B- β [78]. Uma vez fosforiladas as proteínas I κ B são ubiquitinadas e degradadas pelo proteossoma 26S. A destruição de I κ B permite a

translocação para o núcleo dos dímeros de NF- κ B e sua posterior ligação ao promotor de genes alvos [79].

A proteína IKK é um complexo de 700 a 900 kDa composto de três subunidades: as subunidades catalíticas IKK α , a subunidade IKK β e a subunidade IKK γ ou NEMO [80]. A IKK γ é necessária para conectar o complexo IKK aos ativadores que estão acima na via de sinalização [81].

A ativação do complexo IKK envolve a fosforilação de dois resíduos de serina localizados em IKK α (Ser 176 e Ser 180) ou em IKK β (Ser 177 e Ser 181) [80]. Duas teorias são sugeridas para a ativação do complexo IKK. Um modelo sugere o recrutamento do complexo IKK ao receptor na membrana plasmática resultando em sua autofosforilação a subsequente ativação. Enquanto o outro modelo de ativação envolve a participação de MAPK3 [82,83,77].

A via de ativação de NF- κ B pode ser dividida em via clássica ou via canônica e via alternativa [84]. Na via clássica, os dímeros contendo o p65 ou c-Rel associados ao p50 encontram-se inativos no citoplasma por estarem interagindo com as proteínas I κ B. Esta via é disparada por citocinas pró-inflamatórias e infecções virais e bacterianas. Após a ativação, a subunidade IKK β é o maior responsável pela fosforilação de I κ B. Após a fosforilação e degradação pelo proteossoma o NF- κ B move-se para o núcleo onde atua como fator transcricional de mais de 180 genes [77,71]. Já a via alternativa é ativada por membros da família do fator de necrose tumoral, como BAFF (fator ativador de células B), e pelo ligante CD40. Os dímeros contendo as subunidades Rel B/p52 são os alvos principais. Nessa via NIK ativa I κ B α , que então, pode fosforilar p100 que, por sua vez sofre proteólise e transforma-se na forma p52 madura. Dessa forma, os dímeros se movem para o núcleo, onde podem ativar genes específicos [85,86,69]. Ativação diferencial de subunidades de NF- κ B pode resultar em regulações distintas de genes, através de diferentes ligações com o DNA.

A regulação da transcrição do gene que codifica TNF- α envolve a ativação de membros da família NF- κ B. A participação do TNF- α na progressão da hanseníase já foi reportada anteriormente [46,87]. Além disso, modelos *in vivo* e *in vitro* de infecção com *M. tuberculosis* relacionaram o aumento da expressão de TNF α à ativação de NF- κ B [88, 89]. De fato, o NF- κ B é o regulador chave da síntese de TNF α e o tratamento com talidomida bloqueia não só a ativação de NF- κ B em resposta a TNF α , como também a subsequente expressão do gene que codifica esta citocina [90].

Estudos anteriores demonstraram que lipoproteínas de bactérias e PMA induzem translocação do NF- κ B e apoptose em células THP-1 (Linhagem de células monocíticas humanas de leucemia aguda), por um mecanismo dependente da via p38 MAPK [91]. Na hanseníase, foi observado que *M. leprae* induz a ativação dos dímeros p50/p50 e p65/p50 em células de Schwann, em um processo dependente da atividade do proteossoma, e que o tratamento com talidomida inibe a translocação nuclear de p50/p50 [67].

7. Polarização de macrófagos

Os fagócitos mononucleares são células de crucial importância para o desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro. Monócitos saem dos vasos sanguíneos em resposta a antígenos, e nos tecidos se diferenciam em macrófagos e células dendríticas (DCs) [92]. Após a fagocitose, ambos os macrófagos e as DCs apresentam diversos antígenos às células T, orientando a resposta imune adaptativa e levando à expansão e diferenciação de linfócitos específicos [93,94].

A heterogeneidade dos macrófagos é bem reconhecida. Ela pode ser determinada pela herança genética e por estímulos específicos [92,95, 96]. Neste contexto, antígenos microbianos, produtos tumorais, bem como células T efectoras Th1 ou Th2 e seus produtos de secreção influenciam na heterogeneidade e no estado de ativação das populações de macrófagos [97,98].

A resposta mais bem caracterizada de macrófagos a moléculas microbianas é a liberação de produtos inflamatórios ou microbicidas. A inflamação ativa os macrófagos a iniciar ou aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores inflamatórios. No entanto, macrófagos são igualmente importantes na resolução da inflamação através da produção de citocinas antiinflamatórias e quimiocinas e pela maior atividade fagocitária. Com base nos conceitos de polarização Th1/Th2 [99], fenotipicamente macrófagos polarizados são agora denominados de pró-inflamatórios M ϕ 1 ou classicamente ativados, e antiinflamatórios M ϕ 2 ou, alternativamente ativados [100,101].

Experimentalmente, os macrófagos *in vitro* são polarizados para o estado M ϕ 1 através do tratamento com IFN- γ e indutores de TNF- α , como o LPS de bactérias [100,102]. Tipicamente, esses macrófagos produzem altos níveis de IL-12 e IL-23 e baixos níveis de IL-10 [103] e conseqüentemente são fortes indutores da resposta Th1. Em adição, essas células exercem atividade anti-proliferativa e citotóxica resultando em parte na sua capacidade de secretar espécies reativas de nitrogênio e oxigênio e citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6) [100,101,104,105,106]. Esse processo de polarização de macrófagos pode ser reproduzido *in vitro* pela presença das citocinas GM-CSF e M-CSF que estão relacionados à diferenciação de M ϕ 1 e M ϕ 2, respectivamente [103,107].

Assim, no curso de uma resposta, a inflamação é normalmente neutralizada através do desenvolvimento de mecanismos antiinflamatórios. Idealmente, essa regulação deve ser espacialmente e temporalmente controlada. Diferentes mediadores têm sido relatados para inibir o desenvolvimento de macrófagos M ϕ 1 e difundir propriedades antiinflamatórias em macrófagos, como: como IL-4, IL-13, IL-10, TGF-, hormônios, como os glicocorticóides e a vitamina D3 e células em apoptose [108,109].

A heterogeneidade desses macrófagos antiinflamatórios exigiu a necessidade de uma nomenclatura mais refinada. Gordon e colaboradores (2003) propuseram restringir a definição

“ativação alternativa” a macrófagos diferenciados na presença da IL-4 e/ou IL-13 [100]. Posteriormente, Mantovani e colaboradores usaram uma alta produção de IL-10 e baixa produção de IL-12 para classificar macrófagos M ϕ 2 de forma mais genérica [110]. Seguindo esta lógica, mais uma subdivisão foi sugerida M ϕ 2a, M ϕ 2b e M ϕ 2c, representando macrófagos induzidos pela IL-4 ou IL-13, induzidos por complexos imunes e agonistas dos receptores do tipo Toll [111], e induzidos pela IL-10 e alguns hormônios, respectivamente [110,112]. Qualquer forma de classificação ressalta a complexidade da situação *in vivo*, onde os macrófagos são expostos a uma mistura de estímulos, e diversos perfis funcionais podem existir em conformidade.

M ϕ 2a e M ϕ 2b expressam níveis parecidos de CD11a, CD40, CD54, CD58, CD80 e CD86 semelhantes aos M ϕ 1. Além disso, eles exibem forte capacidade fagocítica, expressam altos níveis de moléculas de MHC classe II e são capazes de realizar apresentação de antígeno. Portanto, M ϕ 2a/b, possuem todas as características necessárias para conduzir a resposta imune. Ao contrário dos M ϕ 1, os M ϕ 2a/b promovem a resposta Th2, resultando em funções efetoras como matar parasitas [111,113,114]. Em geral, os macrófagos M ϕ 2 têm níveis reduzidos de citocinas inflamatórias e secretam grandes quantidades de citocinas supressoras como IL-10 e TGF- β , assim, modulando negativamente os processos inflamatórios iniciados pelos M ϕ 1. Uma exceção à regra são os macrófagos M ϕ 2b, que são funcionalmente células antiinflamatórias, enquanto mantêm uma alta produção de citocinas inflamatórias e substâncias tóxicas [111]. Por conseguinte, macrófagos M ϕ 2 exercem funções imunossupressoras e inibem a proliferação de células T [113,115].

Até recentemente, a discriminação entre M ϕ 1 e M ϕ 2a/c (mas não M ϕ 2b) em camundongos foi demonstrado, principalmente em nível bioquímico, no metabolismo de L-arginina. No interior dos macrófagos, a L-arginina pode ser metabolizada por três vias diferentes, que irão resultar na produção de: (i) L-citrulina e nítrico óxido (NO) pela óxido nítrico sintase

induzida (iNOS), (ii) uréia e L-ornitina pela arginase; e/ou (iii) agmatina pela arginina descarboxilase. A regulação do balanço entre iNOS e arginase por mediadores Th1, tais como IFN- γ e LPS, e por citocinas Th2, como IL-4 e IL-13, sugere que a medida dos níveis de NO e a atividade da arginase em populações distintas de macrófagos reflete seu estado de ativação, clássico ou alternativo. No entanto, a distinção entre M ϕ 1 e M ϕ 2a exclusivamente com base no balanço iNOS-arginase é considerado muito simplificado [116].

O reconhecimento, a internalização e a eliminação de patógenos por fagócitos mononucleares são eventos cruciais para a proteção do hospedeiro. Receptores relacionados à ativação do NF- κ B e secreção de citocinas pró-inflamatórias parecem estar associados aos macrófagos M ϕ 1. Na verdade, existem evidências de que o IFN- γ estimula a expressão do receptor Toll-like 4 (TLR4) e dos componentes da via de sinalização de MyD88 em fagócitos mononucleares humanos, enquanto que a IL-10 neutraliza estes efeitos [117]. Além disso, foi demonstrado em células epiteliais que os receptores de reconhecimento padrão citoplasmáticos Nod-1 e Nod-2 possuem sítios de ligação nas suas regiões promotoras para NF- κ B e IRF-1, permitindo que o TNF- α e IFN- γ reforcem a sua expressão gênica [118,119], no entanto, estes dados ainda não foram demonstrados em macrófagos. Recentemente, foi demonstrado que a subunidade p50 do NF- κ B é um regulador chave das reações inflamatórias que direcionam para M ϕ 2 *in vitro* e *in vivo*. A subunidade p50 de NF- κ B inibe a polarização para M ϕ 1 guiadas pelo NF- κ B [120]. Por outro lado, IL-4, IL-13 e IL-10 são capazes de modular positivamente vários receptores como, o receptor de manose (MR ou CD206) [121], a dectina 1 [122], o DC-SIGN [123], o CD163 [124]. Surpreendentemente, nenhum desses receptores associados a macrófagos M ϕ 2 são capazes de reconhecer estruturas próprias ou não próprias, sugerindo uma participação na homeostase e remoção fisiológica em circunstâncias normais [125].

A resposta comum dos macrófagos a infecções bacterianas envolve principalmente o aumento da regulação de genes envolvidos na polarização dos macrófagos M ϕ 1. Estes incluem genes que codificam citocinas, como TNF- α , IL-6, IL 12, IL-1 β , receptores de citocinas como IL-7R e IL-15RA, quimiocinas como CCL2, CCL5 e CXCL8, e o receptor de quimiocinas CCR7. Outros genes associados a macrófagos M ϕ 1 modulados positivamente codificam as enzimas indoleamine-2,3 dioxigenase e NO sintase 2, que estão envolvidos na atividade microbicida de macrófagos e moléculas co-estimulatórias, tais como CD80 e CD86. O IL-1ra parece ser o único gene associado com a polarização M ϕ 2, que é expresso após o desafio bacteriano [126].

Macrófagos ativados através da via clássica são geralmente associados à proteção durante doenças infecciosas agudas. Já foi demonstrado que *Listeria monocytogenes*, que causa a doença em pacientes imunodeprimidos e em mulheres grávidas, induz a polarização de macrófagos M ϕ 1 [127]. Além disso, foi observado que camundongos *knockout* para IFN- γ e TNF- α , dois marcadores canônicos da polarização M ϕ 1, e seus respectivos receptores morrem da infecção por *L. monocytogenes* [128]. Da mesma forma, *Salmonella typhi*, agente da febre tifóide, e *Salmonella typhimurium*, agente da gastroenterite, induzem a polarização de macrófagos M ϕ 1 em humanos e camundongos, e esta indução está associada ao controle da infecção [129,130].

A análise inicial do transcriptoma de macrófagos de camundongos em resposta a infecção com *Mycobacterium tuberculosis* revelou uma sobreposição de genes modulados por micobactérias e IFN- γ , que corresponde à polarização de macrófagos M ϕ 1 [102]. Além disso, durante a fase inicial da infecção por *M. tuberculosis*, os macrófagos são polarizados em direção a um perfil de ativação clássica [131], que está de acordo com os dados clínicos coletados de pacientes com tuberculose ativa. Entretanto, um pequeno número de doentes com tuberculose possuem macrófagos com perfil M ϕ 2, que podem ser revertidos pelo tratamento com antibióticos [132]. Outras doenças micobacterianas tal como a úlcera de Buruli (*Mycobacterium ulcerans*) e

infecções oportunistas (*Mycobacterium avium*) também são caracterizadas pela polarização de macrófagos M ϕ 1 [133,134].

Está bem estabelecido que as bactérias intracelulares subvertem a atividade microbicida para sobreviver no ambiente hostil produzido pelos macrófagos. Um número crescente de estudos mostra que alguns patógenos desenvolveram estratégias diferentes para interferir com a polarização de macrófagos M ϕ 1. Algumas espécies de *Salmonella* ou *Mycobacterium* são capazes de neutralizar as funções efetoras relacionadas aos macrófagos M ϕ 1. Já foi demonstrado que a *S. typhimurium* codifica mediadores que inibem a re-localização do fagossoma, inibindo a atividade microbicida dos macrófagos [135]. Da mesma forma, o *Mycobacterium bovis* interfere com o recrutamento de NOS 2 para o fagossoma, inibindo a liberação de NO [136]. Outras estratégias bacterianas incluem a inibição da expressão ou secreção de citocinas secretadas por macrófagos M ϕ 1. Micobactérias interferem com a polarização de M ϕ 1 através da secreção de fatores de virulência. O ESAT-6 de *M. tuberculosis* inibe diretamente a ativação de NF- κ B e fatores que regulam o IFN- γ através de mecanismos dependentes de Akt [137].

A evolução crônica das doenças infecciosas parece estar associada à polarização dos macrófagos com perfil M ϕ 2. A brucelose crônica está associada à polarização M ϕ 2 mediada por IL-10. A Neutralização de IL-10 e IL-4 produzidas por M ϕ 2, em camundongos suscetíveis permite que estes macrófagos possam matar o patógeno através da produção de IFN- γ e restauração do perfil M ϕ 1 [138]. A presença de macrófagos M ϕ 2 também é crucial para o destino de infecções crônicas causadas por micobactérias [133]. Da mesma forma, nas lesões lepromatosas, foi observado um aumento da expressão de IL-10 [139], DC-SIGN [140] e dos membros da família do receptor de leucócitos Imunoglobulina-like (LIR), incluindo o LIR-7 e o LIR-2 [141,142].

8. Resposta imune na Hanseníase

O *M. leprae* provavelmente entra no organismo através das vias aéreas superiores, e em seguida segue para a pele e nervos periféricos através da circulação. A resposta imunológica montada pelo hospedeiro determina o fenótipo clínico que o paciente irá desenvolver. Patógenos intracelulares são inicialmente reconhecidos por células do sistema imune inato. Um dos principais receptores responsáveis pelo reconhecimento de lipoproteínas micobacterianas são os receptores do tipo Toll like (TLR) que estão presentes na superfície de monócitos e macrófagos [143]. Além disso, esses receptores também participam da ativação nuclear de NF- κ B que modula a transcrição de vários genes relacionados à resposta imune [144]. No caso do *M. leprae* o reconhecimento pelo TLR parece ocorrer principalmente através do heterodímero TLR2/1 levando a diferenciação de monócitos em macrófagos e células dendríticas [140]. Um polimorfismo comum em TLR1 (I602S) parece estar associado ao tráfego inadequado do receptor para a superfície celular e a respostas diminuídas de monócitos do sangue a agonistas bacterianos [145]. Johnson e colaboradores (2007) demonstraram que o alelo 602S está associado com uma reduzida incidência de hanseníase, sugerindo que o *M. leprae* subverte a via Toll como um de seus mecanismos de escape [146].

A proteína TACO (aspartato triptofano contendo proteína de revestimento) inibe a maturação de fagossoma favorecendo o parasitismo intracelular [147,148]. Estudos recentes sugerem que TACO suprime a ativação mediada por TLR2 em macrófagos humanos, e que esta ativação resulta na supressão da expressão de TACO. Uma vez que ambos TLR2 e TACO co-localizam em lesões dérmicas de pacientes com a forma lepromatosa da doença, é possível que o balanço entre a sinalização via Toll (TLR2) e a expressão de TACO determine o curso da infecção com *M. leprae* [149].

As respostas imunes adaptativas mediadas pela interação entre macrófagos e células apresentadoras de antígenos podem ser reguladas pelo TLR [150]. Foi demonstrado que

patógenos como o *M. leprae* se ligam ao DC-SIGN em células dendríticas humanas para ativar Raf-1, uma serina e treonina kinase que leva a acetilação da subunidade p65 do NF- κ B dependente da sinalização via TLR [151].

Em monócitos, o *M. leprae* desempenha um papel ativo no controle da produção de citocinas. O *M. leprae* induz altos níveis de moléculas de regulação negativa como MCP-1 e IL-1 e suprime a produção de IL-6, enquanto induz um aumento da produção de TNF- α e IL-10 através de vias de sinalização dependentes de PI3K, NF- κ B e caspase-1 [152].

Sabendo que a hanseníase possui diferentes formas clínicas e que existem pelo menos dois tipos de macrófagos com funções opostas, alguns trabalhos começaram a avaliar o impacto desses diferentes subgrupos em resposta ao *M. leprae*. Makino e colaboradores (2007) mostraram que após estímulo com *M. leprae* macrófagos diferenciados com M-CSF perdem a capacidade de ativar linfócitos T, enquanto que macrófagos diferenciados com GM-CSF apresentam elevada capacidade estimulatória sobre linfócitos T [153]. Outro trabalho mostrou que M ϕ 2 não são capazes de secretar IL-12 ou IL-23, mas produzem grande quantidade de IL-10 em resposta a infecção por micobactérias. Estas células não induzem a produção de IFN- γ nem são capazes de estimular a proliferação de linfócitos reativos ao *M. leprae*. Além disso, o aumento da interação e internalização das micobactérias pelos M ϕ 2 quando comparados aos M ϕ 1, sugere que esses dois subtipos de macrófagos possuem receptores diferentes na superfície celular e que macrófagos ativado pela via alternativa possuem a endocitose aumentada [103]. O M-CSF, usado para diferenciar M ϕ 2, é uma citocina circulante ubíqua em seres humanos, sugerindo que o M-CSF poderia ser responsável pela diferenciação dos macrófagos sob condições normais [154].

Após sua entrada no macrófago, o *M. leprae* induz a produção de TNF- α , IL-12, IL-10 e TGF- β 1 por macrófagos infectados [155,156,157]. Essas citocinas são opostas em muitas

formas de ação, incluindo suas ações sobre o próprio macrófago. De um lado, o TNF- α promove a ativação de macrófagos para a destruição intracelular de *M. leprae* e potencializa os efeitos do IFN- γ . Por outro lado, TGF- β 1 e IL-10 desativam os próprios macrófagos, aumentando a proliferação bacilar. Desta forma, citocinas como IL-10 e TGF- β contrapõem os efeitos do TNF- α e IFN- γ . É provável que a exposição de macrófagos à citocina apropriada, no tempo apropriado sejam os requisitos para a destruição intracelular do parasito [158]. Montoya e colaboradores (2009) descreveram que enquanto IL-10 induz a via fagocítica em macrófagos, levando à expressão de CD209 (DC-SIGN) e receptores *scavenger*, resultando na fagocitose da micobactéria e lipoproteínas de baixa densidade oxidadas; a IL-15 induz uma via anti-microbiana dependente de vitamina D. Neste trabalho os autores especularam que a programação para fagocitar e respostas anti-microbianas por macrófagos são distintas e diferencialmente reguladas, uma vez que a via mediada por IL-10 foi observada predominantemente em pacientes multibacilares enquanto que a via antimicrobiana, mediada por IL-15, foi observada preferencialmente em pacientes paucibacilares [159]. Dessa forma, o destino da infecção por *M. leprae* em um hospedeiro, depende de quando e como uma determinada citocina está presente em maior quantidade em relação a vários outros produtos.

É importante compreender que a interação do *M. leprae* com o hospedeiro é extremamente complexa. Experimentalmente, as formas polares da doença são consideradas um paradigma imunológico. Pacientes tuberculóides são capazes de restringir o crescimento do patógeno e suas lesões cutâneas são caracterizadas por uma predominância de células TCD4⁺ e citocinas do tipo 1, como a IL-2, IL-12 e o IFN- γ [160]. A IL-12 é um heterodímero de p40 e p53 que impulsiona a polarização das células T *naive* em células T auxiliares e provoca a liberação de IFN γ [161]. O IFN γ por sua vez ativa macrófagos e aumenta a secreção de citocinas como a IL-12 assim como, a apresentação de antígenos e a atividade microbicida dessas células [162]. A IL-2 estimula o crescimento de células T antígeno-específicas, resultando em uma doença

mais branda ou cura. O aumento da secreção de IL-2 e IFN- γ nas lesões tuberculóides provavelmente devem contribuir para a resistência nesses pacientes. O IFN- γ é conhecido por aumentar a produção de reativos intermediários de oxigênio e de nitrogênio em macrófagos, estimulando-os a matar ou restringir a proliferação de micobactérias e outros patógenos intracelulares [163,164]. Além disso, essa citocina também é responsável pelo aumento da expressão de HLA-DR (antígeno leucocitário humano de classe II, alelo DR) e da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), que facilitam a interação da célula apresentadora de antígeno com a célula T [165]. A IL-2, por induzir a expansão clonal de células T imune ativadas e aumentar a produção de IFN- γ , pode contribuir para a defesa do hospedeiro [166]. Ao mesmo tempo, a produção local de TNF- α pelo macrófago, favorece uma ação sinérgica autócrina para manter o macrófago ativado e formar o granuloma [167].

No pólo oposto, os pacientes lepromatosos são incapazes de conter a infecção e suas lesões cutâneas são caracterizadas por uma predominância de células TCD8⁺ e citocinas tipo 2, incluindo a IL-4 e IL-10. A IL-4 estimula a produção de IgE e ambas, IL-4 e IL-10 estimulam células B e inibem a ativação dos macrófagos resultando em infecção progressiva [159]. Dagur e colaboradores (2010) demonstraram que o *M. leprae* inibe os eventos de sinalização induzidos pelo TCR e pelo CD28, resultando em redução na produção de IL-2 e inibição da proliferação de células T, o que pode estar associado à progressão da doença [168]. Ao contrário das lesões tuberculóides, citocinas tipo 2, tais como IL-4, IL-5 e IL-10, devem contribuir para a ineficácia da resposta imune e a falha de ativação do macrófago em pacientes lepromatosos [139,169]. A IL-4 tem um efeito imunorregulatório negativo sobre a imunidade mediada por células, que pode levar ao aumento da proliferação bacteriana porque bloqueia a multiplicação de células T dependente de IL-2 por inibir seus receptores, além de também inibir a ativação de monócitos mediada pelo IFN- γ [170]. Essa citocina também é capaz de reduzir a expressão de CD14 de monócitos assim como a produção de IL-1 β e TNF- α bloqueando a geração de óxido nítrico (NO), necessário

para destruição de patógenos intracelulares [171]. Em adição a IL-4, a IL-13 tem sido incluída no mecanismo de supressão de células T na hanseníase, por seus efeitos sobre células B e macrófagos, similares aos da IL-4. Tem sido demonstrado que, apenas clones de células T tipo 2 de lesões lepromatosas produzem IL-13 [139,170]. Isso sugere que a IL-13 pode ter um papel na imunossupressão em lesões de pacientes.

A presença de IL-10 em lesões lepromatosas, uma citocina que pode inibir a produção de citocinas como, TNF- α , GM-CSF e IFN- γ por células T CD4⁺ na relativa ausência de IFN- γ ou IL-2, sugere um papel imunossupressor para esta citocina [172].

A presença do TGF- β 1, um dos mais potentes fatores imunossupressores endógenos, foi revelada por imunohistoquímica em lesões de pacientes com hanseníase, demonstrando grande quantidade de macrófagos positivos para esta proteína no infiltrado lepromatoso e ausência, no granuloma tuberculóide [173,174]. O TGF- β 1 tem ação supressora sobre macrófagos contrapondo os efeitos do IFN- γ na ativação da atividade antimicrobiana mediada pelo óxido nítrico (NO) e inibindo a produção de TNF- α , e dessa forma poderia contribuir para a perpetuação da infecção [175].

Já foi demonstrado que em lesões de pacientes lepromatosos a expressão de COX-2 está aumentada quando comparado às lesões de pacientes tuberculóides [154]. Esses dados corroboram com estudos anteriores que observaram a liberação de mediadores como PGE₂ (prostaglandina E2) e IL-10 por monócitos de pacientes lepromatosos, mas não de pacientes tuberculóides [171]. Tais mediadores contribuíram para a inibição da linfoproliferação frente ao *M. leprae* em indivíduos sabidamente respondedores à bactéria. A PGE₂ inibe a produção de IL-2 e também de IFN- γ , citocinas em geral, fracamente expressas nas lesões lepromatosas, mas importantes para gerar resposta imune específica [171]. Desta forma, o *M. leprae* parece modular a resposta imune desenvolvida nas lesões, através de componentes de sua parede

celular e também via secreção de substâncias com atividade supressora sobre os macrófagos. Os monócitos infectados parecem contribuir para a fraca ativação dos linfócitos T nos indivíduos lepromatosos devido à liberação de fatores que suprimem a ativação destas células.

9. Apoptose e morte celular na Hanseníase

A apoptose é um tipo de morte celular programada que apresenta um importante papel no desenvolvimento, mantém um número estável de células e controla funções em vários sistemas como o imune, nervoso e o sanguíneo [176]. Diferente de uma célula necrótica que apresenta ruptura na membrana e liberação do conteúdo intracelular, uma célula apoptótica é rapidamente fagocitada como corpos apoptóticos intactos por células do tecido ou fagócitos como os macrófagos e células dendríticas imaturas [177,178].

A morte por apoptose pode ser desencadeada por diversos estímulos que vão desde o estresse em organelas intracelulares até a sinalização mediada por um receptor [179]. Uma importante característica bioquímica deste processo é a ativação de diversas cisteíno proteases, conhecidas como caspases. As caspases são secretadas como zimógenos e após estímulo/ativação são convertidas em proteases ativas. A clivagem proteolítica de diferentes substratos celulares pelas caspases determina as principais características do processo de morte celular por apoptose [180]. Dentre estas características estão: condensação da cromatina, degradação oligonucleossomal do DNA com fragmentação do núcleo, arredondamento da célula com redução do volume e formação de extrusões da membrana plasmática (*blebs*) [181]. A ação de quimioterápicos, radiação ultravioleta e radiação ionizante, também podem induzir mudanças mitocondriais que promovem o aumento da permeabilidade de membrana e a perda do potencial transmembranar [182] mediados geralmente pela formação de radicais livres, com envolvimento do gene supressor de tumores p53, que inicia o processo apoptótico pelo aumento da transcrição de proteínas pró-apoptóticas como Bax [183].

Basicamente existem duas vias de indução da apoptose: a via extrínseca e a via intrínseca. A via extrínseca é ativada pela ligação de receptores conhecidos como “receptores de morte”. Muitos destes receptores à superfamília do TNF são eles: Fas (CD95 ou Apo-1), TNF-R1, DR3 (Apo-3), DR-4 e DR5 (Apo-2). Os ligantes que ativam estes receptores são moléculas estruturalmente relacionadas, tais como: FasL (ligante de Fas), TNF- α , linfotóxina- α , Apo3L, Apo2L ou TRAIL que ativam caspase-8 [183]. A via intrínseca pode ser desencadeada por diversos estímulos, como a ativação do gene p53, irradiação, esteróides, ausência de fatores de crescimento. A ativação desta via acarreta no colapso no potencial de membrana da mitocôndria seguida pela liberação de citocromo c, Smac/Diablo, AIF (Fator indutor de apoptose) e endonuclease G. Após sua liberação o citocromo c forma um complexo denominado apoptossomo. Este complexo leva à clivagem da pró-caspase 9 e inicia a cascata de caspases efetoras como as caspases-3, e -7 [184,185].

Evidências crescentes sugerem que o processo de morte celular é relevante em algumas doenças infecciosas, pela regulação da resposta imune e por afetar diretamente a proliferação bacteriana [186,187,188]. Na hanseníase, Cree e colaboradores (1987) foram os primeiros a descrever a presença de células apoptóticas no granuloma de lesões de pacientes lepromatosos e tuberculóides [189]. Posteriormente foi observado que 56% das biópsias de pacientes paucibacilares e 20% das biópsias de pacientes multibacilares apresentavam células em apoptose. Em adição, nas lesões paucibacilares as células em apoptose foram identificadas como linfócitos T [190]. Além disso, um outro trabalho demonstrou que nas lesões de pacientes paucibacilares o número de macrófagos em apoptose é maior do que nas lesões de pacientes multibacilares [191]. Foi ainda demonstrado que células mononucleares de sangue periférico de pacientes com hanseníase apresentaram elevada apoptose *in vitro* quando comparado aos controles [192].

Mediadores com FasL e os membros da família Bcl-2 podem estar envolvidos na indução e/ou manutenção do processo ativo de morte celular *in vitro* [193]. Na hanseníase, foi observado que as lesões de pacientes apresentam alta expressão de FasL [194]. Este grupo também observou que 84% das células multinucleadas gigantes presentes em granulomas de pacientes com tuberculose expressavam FasL, indicando que infecções micobacterianas podem induzir a expressão de FasL em uma população de macrófagos infectados. Ainda foi descrito que o número de macrófagos expressando o receptor Fas parecia reduzir ao longo da infecção [194]. Estes achados sugerem que a capacidade de inibir a apoptose pode facilitar a sobrevivência do patógeno, sua multiplicação e a manutenção da cronicidade característica da hanseníase.

Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que a indução de apoptose de monócitos por *M. leprae* é dose-dependente com um aumento da expressão das proteínas pró-apoptóticas Bax- α e Bak, pertencentes à família Bcl-2 [195]. Além disso, secreção de TNF α parece participar deste processo já que a adição de Pentoxifilina, uma droga capaz de inibir a síntese desta citocina, foi capaz de reduzir o percentual de apoptose nestas culturas. Adicionalmente, em presença de IFN γ , foi observado um aumento da secreção de TNF α em PBMC estimuladas com *M. leprae* acompanhado do aumento do percentual de morte celular. Neste estudo, também foi observado que o percentual de apoptose espontânea de pacientes reacionais é maior do que o de pacientes sem reação [195]. Resultados adicionais demonstraram que o proteossoma é necessário para a apoptose de monócitos e a secreção de TNF α e IL-10 induzidos pelo *M. leprae* [155].

10. A interação fagócito/célula apoptótica

Uma das características mais importantes do processo de apoptose é a interação e posterior remoção das células apoptóticas ou de seus restos por fagócitos. As modificações sofridas por uma célula em apoptose resultam na expressão ou exposição de ligantes de superfície que interagem com as células fagocíticas do sistema imune inato, como macrófagos e células dendríticas, sendo a fosfatidilserina (FS) um dos principais ligantes estudados nesse contexto [196,197]. Eles podem ser reconhecidos por diversos receptores na membrana dos fagócitos, otimizando a capacidade do organismo em remover rapidamente estas células. Outras moléculas de superfície como o CD47 e o CD31 diferenciam as células apoptóticas das viáveis, facilitando o reconhecimento pelos macrófagos [198]. Por exemplo, o CD47, presente na maioria das células [199], funciona como um “marcador seguro” que envia sinais, através do receptor da proteína regulatória de sinal (SIRP- α) aos macrófagos para que a célula não seja fagocitada [200]. Além disso, Brown e colaboradores (2002) mostraram evidências da existência de um sinal repulsivo entre macrófagos e leucócitos. Foi demonstrado que células fagocíticas expressando o CD31 (molécula de adesão endotelial plaquetária -1) quando entram em contato com leucócitos viáveis são rapidamente repelidos. No entanto, quando leucócitos apoptóticos entram em contato com fagócitos a sinalização através do CD31 é interrompida, de modo que o leucócito não é repellido (Figura 3) [201]. A ligação prolongada do CD31 com o seu receptor é necessária, porém, não é suficiente para induzir a fagocitose das células em apoptose. Assim, a ligação da FS ao seu receptor encontrado nos fagócitos precisa acontecer para que as células apoptóticas sejam completamente fagocitadas [202].

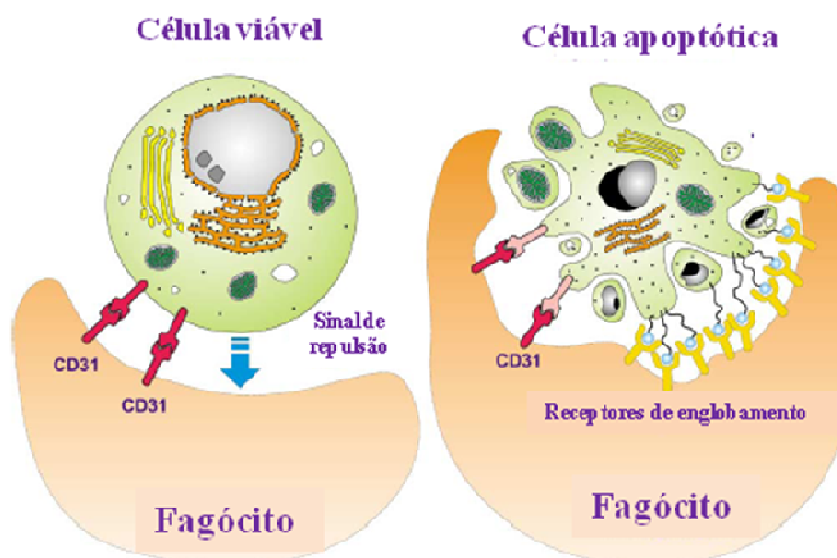


Figura 3. Sinais expostos na superfície das células viáveis e apoptóticas. Fagócitos profissionais frequentemente interagem com alvos potenciais através da molécula de superfície CD31. Se o possível alvo for uma célula viável a sinalização vai resultar na repulsão entre as células. Se o alvo for uma célula em apoptose a sinalização via CD31 é desligada e o alvo é fagocitado [203].

Entre as várias alterações na superfície das células apoptóticas que facilitam o seu reconhecimento, a mais bem caracterizada é a perda da assimetria dos fosfolípidios e posterior exposição da FS [204]. A FS é um fosfolípido estrutural presente no folheto citoplasmático da membrana da bicamada lipídica que é externalizado em resposta a um estímulo apoptótico, caracterizando um dos eventos iniciais desse tipo de morte celular programada [196,197]. Nas células viáveis, a manutenção da assimetria da FS é atribuída a aminofosfolipideo translocase [205]. Nos estágios iniciais da apoptose a inibição dessa translocase, em parte devido a elevação do cálcio intracelular, permite o aparecimento da FS na superfície da célula [204]. A exposição dessa molécula também é facilitada pela ligação dependente de ATP do cassete transportador 1 (ABC1), que desempenha um papel tanto em células fagocitárias como em células-alvo para uma eficiente remoção das células apoptóticas [206]. A exposição da FS foi primeiramente descrita na apoptose de linfócitos e posteriormente foi considerada um evento

essencial na apoptose de qualquer célula de mamíferos [196,207]. Além disso, a exposição de FS é um dos primeiros eventos que acontecem na superfície de uma célula em processo de apoptose, que já começa a ocorrer apenas 5 minutos após a indução da morte por estresse oxidativo [208]. Adicionalmente, a expressão de FS parece ser um evento crítico para o reconhecimento/remoção destas células por macrófagos. Apesar de muitos outros receptores participarem deste processo, na ausência de FS a fagocitose de células apoptóticas é prejudicada [196,207].

As alterações na superfície das células apoptóticas podem também interagir diretamente com os receptores presentes nos macrófagos ou se ligar a proteínas séricas que servem de ponte entre os fagócitos e as células apoptóticas que serão fagocitadas. Essas moléculas extracelulares aumentam a suscetibilidade de fagocitose das células apoptóticas fornecendo um mecanismo adicional de reconhecimento [209]. As moléculas MFG-E8 (*milk-fat-globule-EGF factor 8*), Gas6 (*growth arrest-specific 6*), β 2-GPI (glicoproteína β 2) e a proteína S sérica se ligam a FS na superfície das células apoptóticas. O MFG-E8 pode então ser reconhecido pelas integrinas α v β 3 e α v β 5 através do motivo RGD [210], o Gas6, pelo receptor de tirosina quinase da família Mer, Sky e Axl [211,212] e o β 2-GPI, pelo receptor β 2-GPI [213] (Figura 4).

Outra classe de modificações na superfície de células em apoptose que implicam na sua remoção é a alteração nos carboidratos de membrana. Quando a célula entra em apoptose, o padrão de glicosilação da superfície celular também é alterado, de modo que a célula passa a expor resíduos de açúcar que estavam internalizados antes da apoptose. Os açúcares expostos na superfície da célula apoptótica induzem sua fagocitose mediada pela ligação a lectinas presentes na superfície de fagócitos (Figura 4) [214]. Além disso, trabalhos já mostraram que o aumento na exposição de manose em células apoptóticas facilita a remoção destas células. Tem

vido sugerido que alterações no ICAM-3 na superfície das células apoptóticas facilitam a ligação de células em apoptose ao CD14, receptor de LPS, sem consequências inflamatórias [215,216].

Além destas modificações citadas, há uma série de outros receptores expressos na membrana de fagócitos que estão envolvidos no processo de fagocitose de células apoptóticas, incluindo receptores *scavenger*, receptores de LDL e o CD36 [196]. O CD36 foi um dos primeiros receptores a serem relacionados ao reconhecimento de células em apoptose (Figura 4). Trabalhos anteriores mostraram que o aumento da expressão do CD36 é capaz de fornecer capacidade fagocitária a células normalmente não fagocíticas [217]. Adicionalmente, o CD36 foi identificado como um cofator necessário no reconhecimento de células apoptóticas mediado pela FS [207].

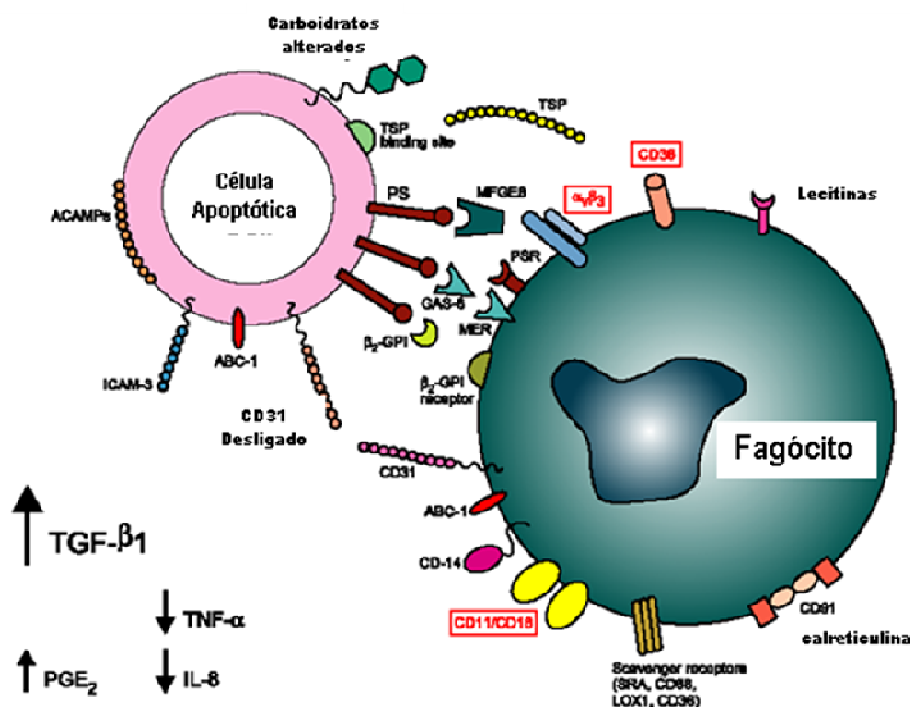


Figura 4. Fagocitose de células apoptóticas e a resolução do processo inflamatório. Vários receptores estão envolvidos na fagocitose de células apoptóticas por fagócitos. Esses receptores interagem diretamente com seus ligantes ou através de proteínas de transição. O aumento da produção de TGF- β e PGE₂ após a fagocitose de células em apoptose está associado à diminuição de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-8. [218].

11. Fagocitose de células apoptóticas e a regulação do sistema imune

A eliminação de células apoptóticas é de fundamental importância para a manutenção da homeostasia e desenvolvimento tecidual e caracteriza-se por diversas modificações morfológicas e bioquímicas [219].

A remoção das células que morrem por apoptose no organismo inicia-se com a ligação de uma molécula exposta na superfície da célula a um receptor existente na membrana de um fagócito. Esta ligação gera uma sinalização intracelular no fagócito que resulta na internalização endocítica da célula apoptótica, e também altera seu estado de ativação. Na fagocitose é possível observar diferenças entre fagócitos profissionais em diferentes estágios de diferenciação e ativação, com envolvimento de diferentes complexos ligante/receptor. Embora se admita que macrófagos e células dendríticas sejam mais eficientes na fagocitose das células mortas que as células de parênquima tecidual, por exemplo, a remoção das células que entram em apoptose nos tecidos ocorre rapidamente. Desse modo, mesmo no timo onde ocorre intensa apoptose das células T devido à seleção tímica, as células apoptóticas são prontamente fagocitadas por células do microambiente tímico [220,221].

O reconhecimento dos sinais da célula apoptótica sem internalização física são suficientes para induzir resposta antiinflamatória de macrófagos, sugerindo que os sinais para a síntese de citocinas antiinflamatórias são distintos daqueles que induzem fagocitose [222]. A fagocitose de células apoptóticas ocorre devido à expressão ou exposição de ligantes de superfície que interagem com as células fagocíticas do sistema imune inato, como macrófagos e células dendríticas, sendo a FS um dos principais ligantes estudados nesse contexto. Até este momento não está claro se existe um receptor específico para a FS e qual seria esse receptor,

mas existe um consenso atual que o sistema de reconhecimento de ligantes na superfície de células apoptóticas compreende vários receptores na membrana de fagócitos que atuam de modo redundante, otimizando a capacidade do organismo de eliminar rapidamente essas células [223]. O reconhecimento da FS na superfície de células apoptóticas fagocitadas por macrófagos ocasiona uma resposta imune supressora mediada por TGF- β e PGE₂ [224]. A pré-sensibilização de camundongos com lipossomas de FS é insuficiente para inibir uma resposta imune antígeno-específica *in vivo*. Células de linfonodos dos animais pré-sensibilizados com lipossomas de FS aumentam a produção de TGF- β , sugerindo um papel direto da FS na regulação da resposta imune, inibindo a inflamação e mantendo a homeostase do tecido [225].

Na última década tem sido demonstrado que a via de desativação do macrófago induzida pela fagocitose de células apoptóticas é utilizada por diversos patógenos intracelulares como estratégia de replicação por vias dependentes da produção de mediadores antiinflamatórios. Van Zandbergen e colaboradores (2004) demonstraram um mecanismo descrito como “Cavalo de Tróia” em infecções com *Leishmania major*. Neste modelo, formas promastigotas infectam neutrófilos que, por sua vez, entram em apoptose e são fagocitados por macrófagos. A internalização através do reconhecimento do neutrófilo apoptótico evita o contato direto do parasita com receptores macrofágicos e induz a produção de TGF- β . Desta forma, a entrada do parasita no macrófago é facilitada e a ativação desta célula é inibida, resultando no estabelecimento da infecção [226].

Na infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*, grande número de células T CD4+ apoptóticas são evidenciadas no baço de camundongos infectados [187]. O reconhecimento dessas células T apoptóticas pelos macrófagos favorece a proliferação do *T. cruzi* intracelular através da indução da produção de TGF- β 1, poliaminas e PGE₂ pela célula hospedeira e permite que o patógeno escape das reações imunológicas do hospedeiro. Como resultado a infecção é

favorecida e torna-se mais intensa [227]. Na infecção por *L. major*, as conseqüências da fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos apresentam dois comportamentos que dependem do genótipo do hospedeiro. Em camundongos BALB/c, a fagocitose de neutrófilos apoptóticos leva a um aumento de sua carga parasitária em um mecanismo dependente da secreção de TGF- β 1 e PGE₂. Já em camundongos C57BL/6, a carga parasitária diminui de maneira dependente de TNF- α e elastase neutrofílica [228]. Nestes modelos, os parasitas intracelulares aproveitam o ambiente gerado pela interação entre as células apoptóticas e os macrófagos como mecanismo de escape devido à inibição da resposta inflamatória e evasão da morte no momento da infecção da célula hospedeira. Entretanto, recentemente foi evidenciado que a fagocitose de células apoptóticas infectadas com *Staphylococcus epidermidis* induzem a secreção de TNF- α e IL-6, enquanto que a fagocitose de células apoptóticas não infectadas induzem a secreção de citocinas com perfil antiinflamatório [229]. A produção de citocinas próinflamatórias foi relacionada com a translocação nuclear de NF- κ B nos macrófagos. A liberação de TNF- α e IL-6 podem estar relacionadas à ativação da resposta imune adaptativa contribuindo para o desenvolvimento da inflamação crônica observada nessa e em outras infecções bacterianas.

Apoptose e necrose também são eventos importantes na aterosclerose, onde contribuem para a instabilidade da placa aterosclerótica, com conseqüente ruptura da placa e formação de trombos [230]. Embora seja importante que as células apoptóticas sejam removidas rapidamente para que não ocorra necrose secundária a apoptose, a fagocitose destas células parece estar inibida nesta doença [231]. Na autoimunidade, a deficiência na remoção das células apoptóticas parece ser um dos fatores envolvidos no estabelecimento da doença, pois permite a exposição prolongada de estruturas e antígenos próprios do organismo, que, em um microambiente propício, leva ao reconhecimento e à formação de auto-anticorpos [232]. No Lupus Eritematoso, foi mostrado que camundongos suscetíveis apresentam um defeito na

remoção das células apoptóticas devido à deficiência de moléculas do sistema complemento e que isto contribui para o desenvolvimento da autoimunidade [233].

Apesar de inúmeros estudos reforçarem a produção de mediadores antiinflamatórios após a remoção de células apoptóticas, quando se consideram as conseqüências da fagocitose de células apoptóticas no contexto de sinais de TLR induzidos pela infecção, é provável que ambas citocinas pró e anti inflamatórias sejam produzidas pelas células fagocíticas [234]. É possível que o quadro inflamatório induzido pelo reconhecimento simultâneo de ligantes TLR e células apoptóticas compreendem elementos da infecção e injúria tecidual. A natureza desses mecanismos parece ser importante para uma maior compreensão sobre a patogênese de doenças como a hanseníase.

12. Justificativa

Estudos anteriores de nosso grupo demonstraram que o *M. leprae* é capaz de induzir apoptose em monócitos humanos. No entanto, os mecanismos envolvidos na indução de apoptose pelo *M. leprae* bem como o impacto da remoção de células apoptóticas por fagócitos profissionais não foram completamente elucidados. Uma melhor compreensão sobre os mecanismos associados à apoptose e remoção celular poderão dar subsídios ao entendimento do estabelecimento das diferentes formas clínicas da hanseníase, o que poderá contribuir para o desenvolvimento de estratégias profiláticas e/ou terapêuticas de controle da hanseníase.

Objetivo geral

Avaliar o papel do NF- κ B na indução de apoptose em monócitos pelo *M. leprae* e o impacto da remoção de células apoptóticas na modulação da resposta de macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2 estimulados com *M. leprae*.

Objetivos Específicos

- Analisar a ativação de NF- κ B em culturas de PBMC e monócitos expostas ao *M. leprae*;
- Estudar o efeito da inibição do NF- κ B sobre a apoptose de monócitos induzida pelo *M. leprae*;
- Investigar o papel do proteossoma e da talidomida na translocação de NF- κ B em resposta ao *M. leprae*;
- Determinar a via de sinalização associada a modulação da produção de TNF- α pela talidomida em células estimuladas com *M. leprae*;
- Avaliar a capacidade fagocítica dos macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2;
- Estudar o papel da fagocitose de células apoptóticas na internalização do *M. leprae*;
- Investigar o papel da fagocitose de células apoptóticas na expressão gênica e secreção de citocinas em resposta ao *M. leprae*; e
- Pesquisar se a fagocitose de células apoptóticas altera o fenótipo dos macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2 em resposta ao *M. leprae*.

1. Biossegurança e permissão ética

As amostras biológicas foram manipuladas em câmara de segurança biológica em ambiente estéril, respeitando as normas para a manipulação de material biológico.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da FIOCRUZ (CEP FIOCRUZ) em 26/08/09, protocolo nº 518/09.

2. Cultura de células

Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram obtidas de capas leucoplaquetárias resultantes de processamento de bolsas de sangue (*Buffy coat*), cedidas pelo Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (UFRJ), ou de voluntários saudáveis. O sangue periférico heparinizado foi diluído 1:1 em salina tampão fosfato (PBS) para separação das células por gradiente de densidade em Ficoll Hypaque. Após centrifugação a 900 xg, por 30 minutos, à temperatura ambiente, as células mononucleares foram lavadas duas vezes com PBS (500 xg, por 10 minutos, a 4°C) e ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), L-glutamina a 2mM, penicilina a 100U/mL e estreptomicina a 100µg/mL (meio completo). Uma alíquota desta suspensão celular foi diluída em azul de Tripán (1:10) e avaliada em câmara de Neubauer para a estimativa da concentração de células viáveis. As suspensões celulares foram plaqueadas na concentração final de $2,0 \times 10^6$ células viáveis/mL de meio completo em garrafas ou microplacas para culturas de células, dependendo do ensaio a ser realizado.

3. Tratamento das células com *M. leprae*

Nos ensaios de interação entre patógeno e célula hospedeira foram utilizadas suspensões de *M. leprae* irradiado, provenientes de camundongo ou tatu, gentilmente doado pelo Dr. Patrick Brennan (Departament of Microbiology, Immunology and Pathology, Colorado State University, Co, USA) ou Dr^a Cristina Pessolani (Laboratório de microbiologia Celular, Fundação Oswaldo Cruz- RJ). As culturas celulares foram expostas à suspensão de *M. leprae*, de forma a se obter multiplicidade de infecção igual a 2, 10 ou 20 e incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂ por períodos que variaram de 1 hora a 24 horas. A possível contaminação das amostras de *M. leprae* nas culturas com LPS foi avaliada pelo kit Limulus Amebocyte Lysate (Bio Whittaker, Walkersville, MD, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

4. Pesquisa da translocação de NF-κB em PBMC estimuladas com *M. leprae*

Para avaliar o papel do *M. leprae* na translocação de NF-κB, 10 x 10⁶ PBMC foram cultivadas em cubetas de Teflon, estimuladas com *M. leprae* (MOI 2:1 e 20:1) ou LPS (1μg/mL) por 1 hora e avaliadas por ensaio de mobilidade eletroforética (EMSA).

A extração das proteínas nucleares procedeu-se após lavagem das células com PBS gelado e centrifugação a 800 xg por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 400 μL de Tampão A (10mM de HEPES pH 7,9, 10mM de KCl, 0,1 mM de EDTA e 0,1 mM de EGTA, 1mM de DTT, 0,5mM de PMSF). Os tubos foram gentilmente homogeneizados e incubados por 15 minutos em banho de gelo. Após o período de incubação foram adicionados 25 μL da solução de Nonidet P-40 10% (NP-40) e os microtubos foram agitados vigorosamente durante 10 segundos. As células foram centrifugadas durante 1 minuto a 13.000 g, ressuspensas em 50 μL de Tampão C (20mM de HEPES pH 7,9, 0,4mM de NaCl, 1mM de EDTA, 1mM de EGTA, 1mM de DTT, 1mM de PMSF) e, em seguida, colocadas em plataforma de agitação a 4°C, por 15 minutos. Após esse período de agitação o extrato nuclear

foi centrifugado a 13.000 xg, durante 5 minutos a 4°C e o sobrenadante obtido foi coletado e acondicionado em alíquotas a -80°C. Uma pequena alíquota desses extratos foi usada para dosagem de proteínas pelo método de Bradford.

Para o ensaio de alteração de mobilidade eletroforética (EMSA), incubamos 10µg do extrato de proteínas nucleares obtido com a sonda consenso para NF-κB e 2 µg de poli dI-dC em 25µL de tampão de ligação [10mM de Tris HCl (pH 7,5), 75mM de KCl, 5 mM de MgCl₂, 1mM de DTT, 1mM de EDTA, 12,5% de glicerol e 0,1% (vol x vol) Triton-X100] à temperatura ambiente por 30 minutos. Foi utilizado cerca de 40µCi da sonda consenso para NF-κB (5'-GGGACTTTCC-3'), marcada radiotivamente com P³². Como controle de especificidade da ligação de NF-κB ao DNA, uma sonda mutada também foi utilizada nos ensaios. O complexo proteína-DNA foi separado da sonda livre utilizando 2,5µL de tampão de carregamento [250mM de Tris-HCl (pH7,5), 0,2% de azul de bromofenol, 0,2% de xileno cianol e 40% de glicerol] e as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 4% não desnaturante durante 2 horas e 30 minutos a 150 V. As bandas foram visualizadas por autorradiografia.

Os ensaios de *supershift* que visam identificar as proteínas constituintes do fator de transcrição ativado consistiram na adição, ao extrato nuclear, de anticorpos específicos contra as diferentes proteínas do NF-κB (p65, p50, c-rel, RelB ou p52). Após 2 horas de incubação, em banho de gelo, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida, como descrito acima.

5. Avaliação da translocação da subunidade p65 de NF-κB em monócitos humanos estimulados com *M. leprae* por citometria de fluxo.

Células mononucleares do sangue periférico obtidas a partir de doadores saudáveis foram plaqueadas e mantidas em cultura por 2 horas para aderência dos monócitos à microplaca. Após a retirada das células em suspensão os monócitos aderentes foram lavados 2

vezes com PBS quente, pré-tratados por 30 minutos com o inibidor de proteossoma MG132 a 4 μ M (Calbiochem, CA, USA) ou Talidomida 30 μ M e estimulados com *M. leprae* (10:1) por 1 hora. Após o período de incubação, as células foram dissociadas da placa e incubadas com 200 μ L do tampão PIPES-Triton (10mM Pipes, 0.1M NaCl, 2mM MgCl₂ and 0.1% triton X-100) em PBS por 30 minutos a 4°C para extração nuclear. Em seguida, os núcleos foram lavados 2 vezes com PBS contendo 1% de BSA (PBS-FACS) e marcados com 5 μ g/mL do anticorpo monoclonal anti p65 ou seu isotipo (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) por 1 hora a 4°C. Os núcleos foram posteriormente marcados com o anticorpo secundário anti-mouse (IgG1) conjugado ao Alexa fluor 488 (Invitrogen, CA, USA) e contracolorados com Iodeto de próideo (PI) a 1 μ g/mL. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo no equipamento FACS Calibur (BD Bioscience, CA, USA). Em todos os experimentos foram adquiridos 10.000 eventos por amostra. A análise dos dados foi realizada através do Software Summit (Dako Cytomation).

6. Pesquisa da participação do NF- κ B na apoptose induzida por *M. leprae*

Para a realização destes experimentos, 1,0 x 10⁶ monócitos viáveis/mL foram semeados em microplacas de 24 poços, pré-tratados por 30 minutos com o inibidor de NF- κ B, SN50 ou o peptídeo mutado SN50m a 18 μ M (Calbiochem, Darmstadt, DEU) e estimuladas ou não com *M. leprae* (MOI 20:1) por 18 horas a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂.

As células foram dissociadas da placa, lavadas em PBS gelado e ressuspensas em 100 μ l de tampão de ligação para anexina diluído 10 vezes em água deionizada, de acordo com as instruções do fabricante. Foi adicionado à suspensão celular 1 μ l de anexina (BD, NJ, USA) e 1 μ l de PI a 1 μ g/mL (BD, NJ, USA) e em seguida, as células foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e no escuro. Após o período de incubação, 400 μ l do tampão de ligação foi adicionado às células para leitura em citometro de fluxo (FACS Calibur, BD). A análise dos dados foi realizada através do Software Summit (Dako Cytomation).

7. Pesquisa do papel importância do NF- κ B na síntese de TNF α em resposta ao *M. leprae*

Para avaliar o papel do NF- κ B na secreção de TNF α , $1,0 \times 10^6$ monócitos viáveis/mL foram plaqueados, pré-tratados ou não com SN50 ou SN50m (Calbiochem) a $18\mu\text{M}$ e estimuladas ou não com *M. leprae* (MOI 10:1) por 18 horas a 37°C em estufa contendo 5% de CO_2 . A concentração de TNF α liberado no sobrenadante das culturas foi avaliada por ELISA (R&D systems, Minneapolis, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

8. Pesquisa da atividade do NF- κ B em resposta ao *M. leprae*

Para avaliar a atividade transcricional do NF- κ B, a linhagem de células monocíticas humanas de leucemia aguda (THP-1) foram co-transfectadas utilizando FUGENE 6 (ROCHE, Madison, USA) com 750ng IgK-IFN-LUC (Gentilmente doado pelo Dr David Baltimore, California Institute of Technology, USA), e 250ng do plasmídeo pRL-CMV (Promega, Madison, USA). As células transfectadas foram pré-tratadas com talidomida por 30 minutos e estimuladas com *M. leprae* (MOI 10:1) por 18 horas a 37°C em estufa com 5% de CO_2 . Em seguida, as células foram lavadas com PBS e lisadas de acordo com as instruções presentes no Kit da Luciferase (Promega) e analisadas em luminômetro TD-20/20 (Turner designs, Sunnyvale, USA).

9. Pesquisa do envolvimento da via de p38 na supressão de TNF pela talidomida

Para verificar a participação da talidomida na fosforilação de p38 induzida por *M. leprae*, cerca de $2,0 \times 10^6$ de monócitos viáveis/mL foram pré-tratados com talidomida por 30 minutos e estimulados com *M. leprae* (MOI 10:1) pelos tempos de 30 e 90 minutos a 37°C em estufa com 5% de CO_2 .

Para a extração de proteínas totais, as células aderidas foram rinsadas 3 vezes com 1mL de PBS e mecanicamente dissociadas da placa de cultivo. As células foram centrifugadas a

100 xg, por 10 minutos a 4°C, para descarte do sobrenadante e ressuspensão do sedimento celular em 1mL de PBS. Após nova centrifugação, as células foram ressuspensas em tampão de lise (Tris-HCl a 50mM, pH 7,5, EDTA a 5mM, EGTA a 10mM, NaF a 50mM, β-glicerofosfato a 20mM, NaCl a 250mM, Triton X-100 a 0,1% e coquetel de inibidores protease) e incubadas por 30 minutos a 4°C. Ao término da incubação, os lisados celulares foram centrifugados a 18.300 xg, por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi recolhido para posterior dosagem de proteínas pelo método de Bradford.

As proteínas presentes nos lisados celulares foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% (SDS-PAGE), como descrito por Laemmli [235]. Para isso, 30µg de proteína foram acrescidos de tampão de amostra (Tris-HCl a 50mM em pH 8, DTT a 100mM, SDS a 2%, azul de bromofenol a 0,01% e glicerol a 10%) e desnaturados a 100°C, por 5 minutos. Após corrida eletroforética a 100V, em tampão contendo Tris a 25 mM e glicina a 250 mM, foi realizada uma transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose (Amershan, NJ, USA) por corrente elétrica. A transferência para a membrana de nitrocelulose foi feita do catôdo para o ânodo, em tampão de transferência (Tris a 25 mM, glicina a 190 mM e metanol a 20%), a 5V e 264mA por 45 minutos em cuba semi-seca.

Após transferência, as interações inespecíficas foram bloqueadas com aproximadamente 10 mL de tampão contendo Tris a 20mM, pH7,4, NaCl a 137mM e Tween a 0,1% (TBS-Tween) acrescido de leite desnatado a 5%, por 1 hora. Para verificar a presença de p38 fosforilado, a membrana foi incubada com 1µg/mL de anticorpo monoclonal anti-p-p38 (Cell signaling, MA, USA) em TBS-Tween com 5% de leite desnatado, *overnight* a 4°C. Ao término da incubação, a membrana foi lavada três vezes com TBS-Tween, por 5 minutos, e então incubada, por 1 hora, com 10 mL de anticorpo secundário anti-IgG de camundongo ligado a peroxidase (Santa Cruz) em TBS-Tween contendo 5% de leite desnatado. Finalmente, foram realizadas 4

lavagens de 5 minutos com TBS-Tween. Com exceção da incubação com o anticorpo primário, todas as outras etapas descritas acima foram realizadas à temperatura ambiente, sob agitação.

A detecção das bandas foi feita por quimioluminescência, utilizando o reagente Western Blotting Luminol (Santa Cruz). Para isso, partes iguais (500 µl de cada) das soluções fornecidas foram misturadas e aplicadas sobre a membrana, por 2 minutos. Em seguida, a membrana foi exposta a um filme de raio X (Kodak X-OMAT LS), por diversos períodos de tempo, e o filme foi revelado após imersão em solução reveladora e em solução fixadora.

10. Geração de macrófagos Mφ1 e Mφ2 derivados de monócitos

Células mononucleares do sangue periférico obtidas de doadores saudáveis foram mantidas em cultura por 2 horas para aderência dos monócitos a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Após a retirada das células em suspensão os monócitos aderentes foram lavados 2 vezes com PBS morno e cultivados na presença de 50 ng/ml de GM-CSF (PeproTech, NJ, USA) ou 50 ng/ml de M-CSF (PeproTech) durante 6 dias para obtenção de macrófagos do Mφ1 ou Mφ2, respectivamente, conforme protocolo descrito anteriormente por [103].

11. Obtenção de células em apoptose

Células da linhagem Jurkat, gentilmente doadas pelo Dr. Geraldo Pereira (Laboratório de Hanseníase, Fundação Oswaldo Cruz), foram cultivadas em meio completo e mantidas a 37°C sob uma atmosfera de 5% CO₂. Para indução de apoptose as células Jurkat foram irradiadas com 49J/cm² de radiação UVA por 30 minutos usando o equipamento L-PIX Touch (Loccus Biotecnologia, SP, BRA). Em seguida, as células foram re-incubadas a 37°C por 3 horas na ausência de soro. A análise por citometria de fluxo mostrou aproximadamente 50% de células em apoptose. Células Jurkat não irradiadas foram utilizadas como controle (≤ 10%). A apoptose foi confirmada pela marcação com Anexina V-FITC (BD) e iodeto de propídeo (BD), conforme

descrito no item 6. A análise foi realizada no equipamento FACSCalibur (BD). Em todos os experimentos utilizando células Jurkat foi utilizada uma proporção de 3 células para cada macrófago.

12. Pesquisa da capacidade fagocítica dos macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2

Monócitos foram diferenciados em macrófagos M ϕ 1 ou M ϕ 2 na presença de GM-CSF ou M-CSF, respectivamente por 6 dias. Após esse período as células foram estimuladas com *M. leprae* marcado com FITC e cultivadas por 90 minutos na presença de células Jurkat irradiadas ou viáveis coradas em vermelho com PKH26 de acordo com as instruções do fabricante (Sigma, MO, USA). Em seguida, os macrófagos foram lavados 2 vezes com PBS a temperatura ambiente para retirar células não fagocitadas e dissociados da placa de cultura para posterior análise por citometria de fluxo (FACS Calibur, BD).

13. Pesquisa do percentual de associação do *M. leprae* aos macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2 em resposta a fagocitose de células apoptose

Para avaliação do papel da fagocitose na associação do *M. leprae* em macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2, monócitos foram diferenciados, em lamínulas de vidro, estimulados com *M. leprae* e mantidos ou não na presença de células Jurkat viáveis ou em apoptose (3 células Jurkat para cada macrófago) por 90 minutos a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Após esse período, o meio contendo as células em suspensão foi recolhido e os macrófagos aderidos foram lavados 2 vezes com PBS a temperatura ambiente para que as células não fagocitadas fossem completamente retiradas. Os macrófagos foram fixados com metanol por 10 minutos e, em seguida, corados com Fucsina por 20 minutos, lavados 2 vezes com água destilada e diferenciadas cuidadosamente no álcool-ácido. Para interromper a diferenciação as amostras foram mergulhadas em água corrente. Por fim, as células foram contracoradas com azul de metileno por 3 minutos. O excesso de corante foi retirado em água corrente. As lamínulas foram

desidratadas e montadas em Entellan. O percentual de associação do *M. leprae* foi calculado a partir da fórmula abaixo.

$$\% \text{ de associação do ML} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de M}\phi \text{ contendo pelo menos uma bactéria}}{\text{N}^\circ \text{ total de M}\phi \text{ observados}}$$

14. Pesquisa do papel do *M. leprae* na fagocitose de células apoptóticas em macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2

Aproximadamente $2,0 \times 10^6$ monócitos viáveis/mL foram plaqueados sobre lamínulas de vidro e mantidos por 6 dias em estufa a 37°C com 5% de CO₂ em meio completo contendo GM-CSF ou M-CSF. Os macrófagos diferenciados foram corados em verde com PKH67 (Sigma) de acordo com as orientações do fabricante e as células Jurkat foram coradas em vermelho com PKH26 (Sigma). Os macrófagos foram estimulados com *M. leprae* (MOI 10:1) e mantidos ou não na presença das células em apoptose por 90 minutos a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Em seguida, as lamínulas contendo as células aderidas foram lavadas 2 vezes com PBS e fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos a temperatura ambiente. A fagocitose de células apoptóticas foi avaliada por microscopia confocal em microscópio Confocal Zeiss LSM 510 META Microscopy (Heidelberg, DEU). Foram contadas 100 células por campo para quantificar o percentual de fagocitose de células apoptóticas por macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2 em resposta ao *M. leprae*.

15. Análise da ultraestrutura da fagocitose de células apoptóticas por macrófagos

M ϕ 1 e M ϕ 2 em resposta ao *M. leprae*

Para avaliar a ultraestrutura de macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2 5×10^6 macrófagos diferenciados foram estimulados com *M. leprae* (MOI 10:1) e mantidos na presença de células em apoptose por 90 minutos a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Após esse período as células foram lavadas com PBS e fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 com 3,5% de sacarose por 1h a 4°C. Em seguida, lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas com 1% de Tetróxido de Ósmio (OsO₄) por 1h a 4°C. Após estes procedimentos, foram lavadas em tampão cacodilato, desidratadas em série cetônica (30, 50, 70, 90 e 100%) e infiltrados com a mistura de acetona 100% e resina PolyBed 812 e polimerizados à 60°C por 2 dias. Após a polimerização, foram feitos cortes ultrafinos (Ultramicrótomo Reichert OmU3), recolhidos em grades de cobre de 300 mesh, contrastados com acetato de uranila a 5% e citrato de chumbo e observados ao microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM-1011 (Plataforma de Microscopia Eletrônica IOC/FIOCRUZ)

16. Pesquisa da fagocitose de células apoptóticas na expressão de COX-2 em macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2 induzidos por *M. leprae*

Para a análise da expressão gênica $2,0 \times 10^6$ monócitos viáveis/mL foram semeados e diferenciados por 6 dias na presença de GM-CSF e M-CSF em microplacas de 12 poços a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Os macrófagos diferenciados foram estimulados com *M. leprae* (MOI 10:1) e mantidos na presença ou não de células Jurkat irradiadas ou viáveis por 3 horas. Após esse período, as células foram lavadas e lisadas com 1mL de Trizol de acordo com as instruções do fabricante.

O RNA foi ressuspenso em 10 μ l de água livre de RNase (RF) e em seguida esta suspensão foi quantificada. Para a transcrição reversa, foram utilizadas alíquotas correspondendo a 1 μ g de

RNA. Ao RNA, foi adicionado 1µl de oligo dT (500ng/ml; Invitrogen, CA, USA) e o volume final da reação foi elevado para 10µl, com água RF. O microtubo foi incubado por 10 minutos, a 65°C, para o anelamento do oligo dT. Em seguida, foram adicionados 1µl de inibidor de RNase (40U/µl - Applied Biosystems, CA, USA), 1µl de dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP 0,2mM cada - Perkin Elmer Cetus, Massachusetts, USA), 4µl do tampão de transcrição 5X (tris HCl 250mM, KCl 375 mM, MgCl₂ 15mM), 2µl de ditioneitol (DTT 0.1M) e 1µl da enzima transcriptase reversa Super script II RNaseH⁻.(200U/µl - Invitrogen). A reação foi realizada a uma temperatura de 42°C, por 1 hora, e, em seguida, o microtubo foi aquecido a 90°C, por 10 minutos. O volume das amostras foi elevado para 100µl com H₂O deionizada e os tubos armazenados a -20° até o momento de uso.

O sistema Taqman de RT-PCR em tempo real foi realizado para cada amostra usando o ABI Prism[®] 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) para contínuo monitoramento da fluorescência.

Para o PCR em tempo real, as amostras de cDNA foram utilizadas na quantidade de 100ng por reação. Foram então adicionados em cada poço (ABI Prism optical plates, Applied Biosystems), 12,5 µl de 2X TaqMan Universal Master Mix (1X) [contendo AmpliTaq Gold 250U, AmpErase UNG, 10X Taqman Buffer A e dNTPs] e 20X de primer alvo e sonda para COX-2. A reação foi submetida a 1 ciclo a 50°C por 2 minutos para a ativação da enzima AmpErase UNG, 1 ciclo a 95°C por 10 minutos para a ativação da AmpliTaq Gold DNA polimerase, seguida de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto para amplificação. A expressão relativa dos genes foi determinada pelo ABI Prism[®] 7000 Sequence Detection System software (Applied Biosystems).

17. Pesquisa da importância da fagocitose de células apoptóticas no fenótipo dos macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2 em resposta ao *M. leprae*

Neste ensaio macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2 estimulados com *M. leprae* (MOI 10:1) foram cultivados na presença ou não de células Jurkat apoptóticas ou viáveis por 24 horas para a avaliação da expressão dos marcadores de superfície CD14, CD40, CD163, CD206 e HLA-DR por citometria de fluxo.

As células aderidas foram lavadas 2 vezes com PBS, dissociadas da placa e centrifugadas a 500 xg, por 5 minutos, a 15°C. Após nova lavagem com PBS-FACS (PBS com 1% de BSA), foi realizado o bloqueio de receptores de superfície celular Fc γ R com 100 μ l de soro inativado de carneiro a 5% em PBS-FACS, por 30 minutos, em banho de gelo. Seguiu-se incubação por 30 minutos, em gelo, com 1 μ g/mL de anticorpo monoclonal anti-CD14 ou anti-CD40 conjugado a FITC, anti-CD163 ou anti-CD206 conjugado a APC (alofococianina) ou anticorpo monoclonal anti HLA-DR conjugado ao PE (ficoeritrina) (BD) diluídos em PBS-FACS. Ao término da incubação, as células foram lavadas e analisadas com citômetro de fluxo (FACS calibur, BD).

18. Pesquisa da importância da fagocitose de células apoptóticas na secreção de citocinas e mediadores induzidos por *M. leprae* em macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2

Para avaliar o papel da fagocitose de células apoptóticas na secreção de TNF α , IL-6, IL-12, IL-10, IL-15, TGF- β e PGE $_2$ 2,0 x 10 6 células viáveis/mL foram semeadas em microplacas de 24 poços, estimuladas ou não com *M. leprae* e cultivadas ou não com células em apoptose ou viáveis por 18 horas a 37°C em estufa com 5% de CO $_2$. A concentração das citocinas liberadas no sobrenadante das culturas foi avaliada por ELISA (R&D systems ou Cayman Chemical, Michigan, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

19. Análise estatística

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão (SEM). Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas com o teste *one-way ANOVA* seguido de do testes de Tukey ou com o teste T seguido do pós-teste de Wilcoxon. Os valores com p-valor $\leq 0,05$ foram considerados significativos.

1. Análise da translocação nuclear de NF- κ B em células humanas em resposta ao *M. leprae*

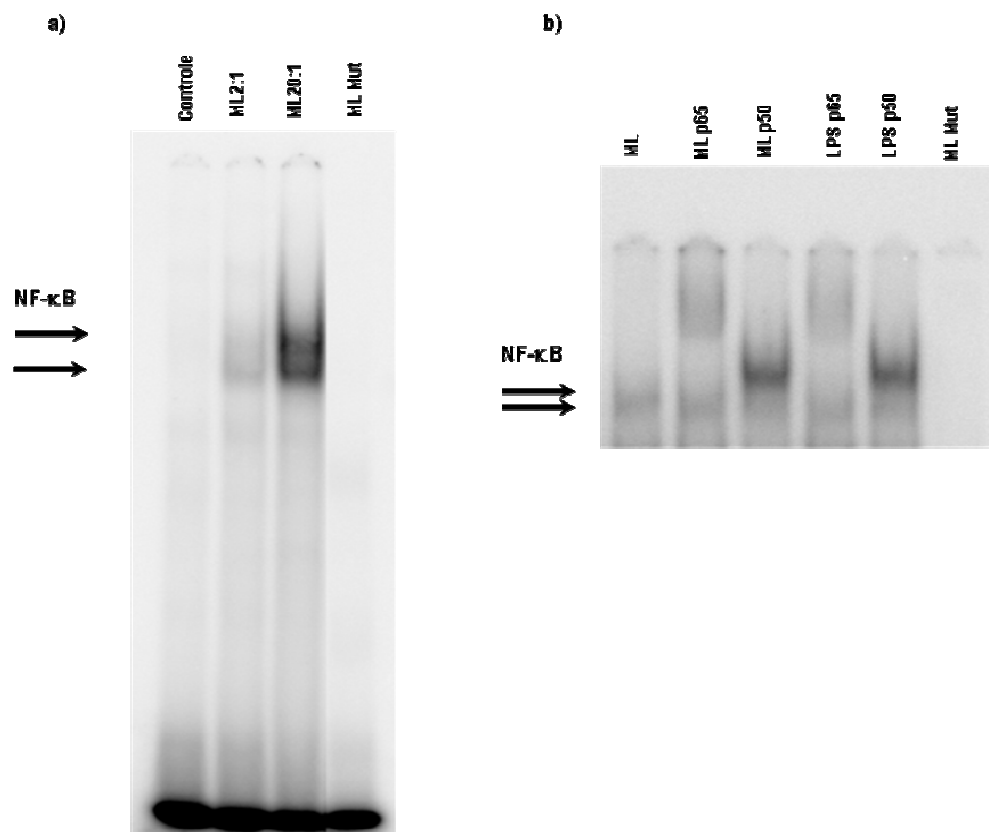
Estudos anteriores de nosso grupo demonstraram que o *M. leprae* é capaz de induzir apoptose em monócitos humanos por um mecanismo dependente de TNF- α [155,195]. Uma vez que diversos estudos anteriores demonstraram uma correlação direta entre a produção de TNF- α e a ativação de NF- κ B, fomos avaliar se o *M. leprae* induz a translocação nuclear de NF- κ B. Para isso, 10^7 células mononucleares do sangue periférico foram cultivadas em cubetas de Teflon e estimuladas com *M. leprae* (MOI 2:1 ou 20:1) por 1 hora. Em seguida, as proteínas nucleares foram extraídas e incubadas com sondas contendo os sítios de ligação para NF- κ B. A translocação nuclear de NF- κ B foi determinada por EMSA.

Os dados mostraram um aumento da ligação do NF- κ B nos extratos nucleares de culturas estimuladas com *M. leprae* quando comparadas às culturas não estimuladas. Essa ligação foi específica, pois nenhuma banda foi observada durante a incubação com a sonda mutada (Figura 5a). Adicionalmente, foram realizados ensaios de Supershift que têm como objetivo identificar as proteínas constituintes do fator de transcrição ativado. Para isso, anticorpos específicos contra as subunidades do NF- κ B foram incubados ao extrato nuclear e avaliados por eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante. Como mostrado na figura 5b, anticorpos contra as subunidades p65 e p50 levaram a uma redução na migração das bandas sugerindo a translocação do heterodímero p65/p50 e do homodímero p50/p50 nestas culturas.

Também foi verificado se o *M. leprae* era capaz de induzir a translocação de NF- κ B em monócitos aderentes. PBMC de indivíduos saudáveis foram plaqueadas e mantidas em cultura

por 2h para aderência dos monócitos. Em seguida as células foram estimuladas com *M. leprae* (MOI 10:1) por 1 hora e a avaliação da translocação do NF- κ B foi realizada por citometria de fluxo após extração da membrana plasmática e do citoplasma e marcação nuclear com anticorpo anti-p65.

Foi observado que em monócitos aderentes o *M. leprae* também induziu a translocação da subunidade p65 de NF- κ B ($60,2 \pm 7,42$ %) quando comparado às células não estimuladas ($31,38 \pm 4,14$ %). Alterações na média de intensidade de fluorescência também foram significativas (C: $19,31 \pm 3,09$ e ML: $33,16 \pm 4,13$) (Figura 5c).



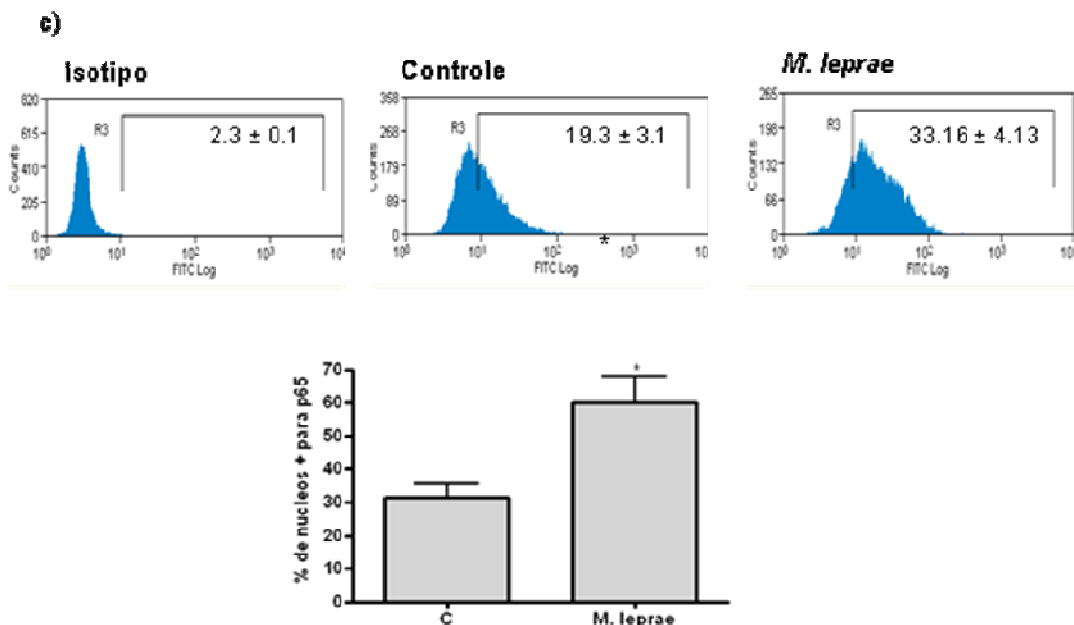


Figura 5. *M. leprae* induz a translocação nuclear de NF- κ B. (a) PBMC foram estimulados ou não com *M. leprae* (ML 2:1 ou ML 20:1) por 1 hora. Proteínas nucleares foram extraídas, incubadas com sonda de DNA mutada (ML mut) ou contendo os sítios de ligação para NF- κ B e analisadas por EMSA. (b) Extratos nucleares de células estimuladas com *M. leprae* (ML, MOI 2:1) foram pré-incubados com anticorpos contra as subunidades p65 (ML p65) e p50 (ML p50) de NF- κ B por 1 hora e avaliados por Supershift. Autorradiografia representativa de 5 experimentos realizados. (c) Análise por citometria de fluxo da subunidade p65 em núcleos extraídos de monócitos estimulados com *M. leprae* (10:1). Histogramas de um experimento representativo realizado. Os números nos histogramas representam as médias de intensidade de fluorescência e o aumento é significativo na presença do *M. leprae* ($p \leq 0,001$). O gráfico representa o percentual de núcleos positivos para p65. Os dados representam as médias e os erros padrões de 5 experimentos realizados (* $p \leq 0,05$). Nos ensaios de citometria de fluxo foram analisadas 10.000 células.

2. Estudo da participação do proteossoma e da talidomida na translocação de NF- κ B induzida por *M. leprae*.

Os resultados obtidos durante minha tese de mestrado mostraram que a inibição do proteossoma interfere na secreção de citocinas induzidas por *M. leprae* [155]. Além disso, resultados obtidos em colaboração com nosso grupo demonstraram que a talidomida é capaz de modular a ativação de NF- κ B em células de Schwann estimuladas com *M. leprae* [67].

Para estudar a participação do proteossoma e da talidomida na translocação de NF- κ B em resposta ao *M. leprae*, monócitos de controles saudáveis foram pré-tratados por 30 minutos

com as drogas e estimulados com *M. leprae* (MOI 10:1) por 1 hora. A avaliação da translocação do NF- κ B foi realizada por citometria de fluxo.

Foi observado que as células que foram pré-tratadas com MG132, um inibidor de proteossoma, e estimuladas com *M. leprae* têm uma redução significativa dos níveis de p65 translocados ($19,54 \pm 5,17$) quando comparado as células estimuladas com *M. leprae* ($39,15 \pm 6,41$) (Figura 6a). Quando as células foram pré-tratadas com a talidomida e estimuladas com *M. leprae* observou-se uma inibição da média de intensidade de fluorescência de p65 ($17,44 \pm 3,13$) quando comparada as células estimuladas com somente com *M. leprae* ($27,88 \pm 4,39$) (Figura 6b).

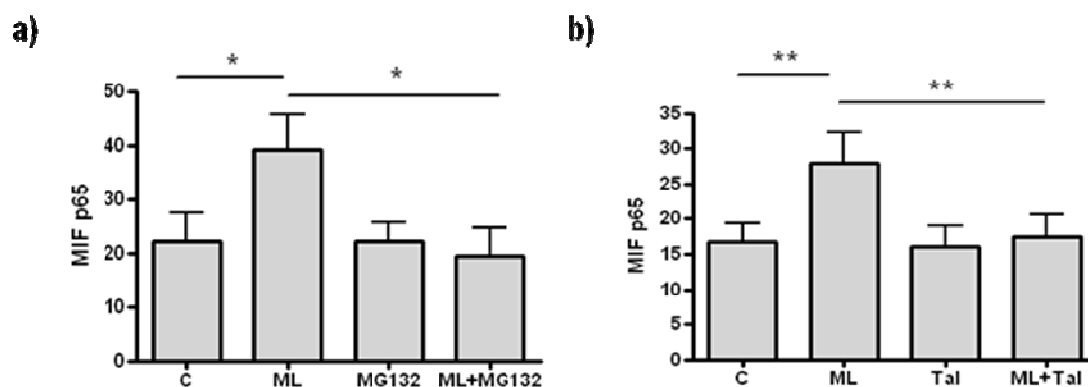


Figura 6. MG132 e Talidomida reduzem a translocação de NF- κ B em resposta ao *M. leprae*. A translocação de NF- κ B foi determinada por citometria de fluxo após marcação dos núcleos com anticorpo anti-p65 marcado com FITC. (a) * $p \leq 0,05$ quando monócitos pré-tratados com MG132 ($4 \mu\text{M}$) e estimulados com *M. leprae* (ML, MOI 10:1) foram comparados ao *M. leprae* ou quando o controle não estimulado foi comparado as células estimuladas com *M. leprae*. (b) ** $p \leq 0,01$ quando culturas foram pré-tratadas com talidomida (Tal, $30 \mu\text{M}$) e estimuladas com *M. leprae* (MOI 10:1) foram comparados as células estimuladas com *M. leprae* ou quando o controle não estimulado foi comparado ao *M. leprae*. Os gráficos representam as médias e os erros padrões de 7 experimentos realizados. Em todos os ensaios realizados foram analisadas 10.000 células.

3. Avaliação da atividade de NF- κ B em células estimuladas com *M. leprae*

Para determinar a atividade transcricional dependente do NF- κ B, células da linhagem monocítica humana THP-1 foram transfectadas utilizando o ensaio repórter da luciferase que contém 6 sítios de ligação para o NF- κ B e um promotor constitutivo ativo contendo o gene da renilla luciferase que foi usado para normalização da atividade da luciferase. Um dia após a transfecção, as células foram pré-tratadas por 30 minutos com talidomida e estimuladas com *M. leprae* por 24 horas. Após a incubação as células foram lisadas e a atividade da luciferase dependente de NF- κ B foi avaliada em luminômetro.

O tratamento com *M. leprae* induziu aumento da atividade transcricional de NF- κ B ($0,101 \pm 0,003$) quando comparado ao controle não estimulado ($0,045 \pm 0,003$). Além disso, a talidomida foi capaz de inibir de forma significativa a atividade de NF- κ B em resposta ao *M. leprae* ($0,018 \pm 0,04$) (Figura 7).

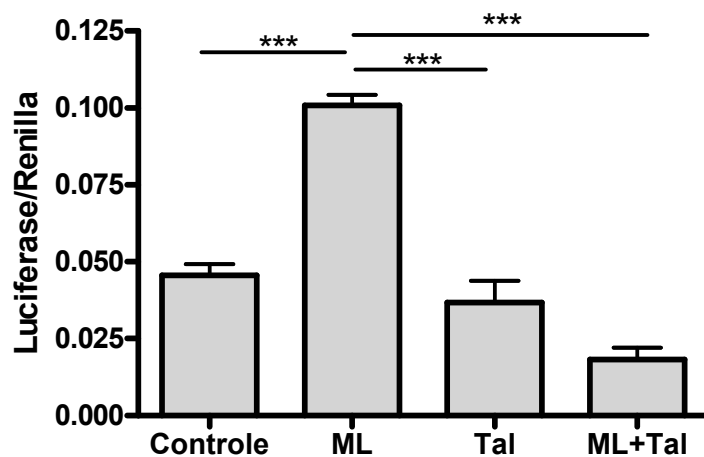


Figura 7. Talidomida reduz a atividade de NF- κ B em resposta ao *M. leprae*. A atividade do NF- κ B foi determinada através do ensaio do gene repórter da luciferase $***p \leq 0,001$ quando células THP-1 estimuladas com *M. leprae* (ML, MOI 10:1) foram comparados ao controle não estimulado, a talidomida (Tal, $30\mu\text{M}$) ou as células pré-tratadas com talidomida e estimuladas com *M. leprae* por 24 horas. O gráfico mostra as média e os erros padrões de 3 experimentos realizados.

4. Avaliação da participação do NF- κ B na apoptose e secreção de TNF- α em resposta ao *M. leprae*

Para investigar a participação de NF- κ B na apoptose e nos níveis de TNF α secretados, 10⁶ monócitos foram plaqueados e pré-tratadas por 30 minutos com o inibidor de NF- κ B SN50 ou com o peptídeo mutado (SN50m) e estimulados com *M. leprae* (MOI 20:1 nos experimentos de apoptose e MOI 10:1 nos ensaios para dosagem de TNF- α) por 20 horas. O percentual de apoptose foi avaliado por marcação com Anexina V e PI e a concentração de TNF α no sobrenadante das culturas foi avaliada por ELISA.

A análise dos dados mostrou que o *M. leprae* induz a apoptose das células CD14 positivas (C: 13,14 \pm 2,6 vs ML: 28,01 \pm 6,7). No entanto, quando as culturas são pré-tratadas com o SN50 e estimuladas com *M. leprae* há uma redução do percentual de células em apoptose (8,47 \pm 4,57). Como mostrado na figura 10b os níveis de TNF- α secretados na presença do *M. leprae* (1034 \pm 310,4 pg/mL) foram fortemente inibidos quando as células foram pré-tratadas com SN50 e estimuladas com *M. leprae* por 20h (12,61 \pm 7,69 pg/mL). Contudo, na presença do SN50 mutado e *M. leprae* não foi verificada diferença estatística na secreção de TNF- α (849,9 \pm 245,8) quando comparado as células mantidas somente com *M. leprae*.

Além disso, a translocação de NF- κ B também foi pesquisada na presença de SN50. Os resultados mostraram que o pré- tratamento com SN50 seguido de estímulo com *M. leprae* reduz de forma significativa a translocação da subunidade p65 para o núcleo (15,88 \pm 2,22) em relação às culturas estimuladas somente com *M. leprae* (26,03 \pm 2,06). Adicionalmente, foi observado que na presença do SN50 mutado e do *M. leprae* não houve diferença significativa na translocação de p65 (24,57 \pm 3,30) em relação às culturas estimuladas com *M. leprae*.

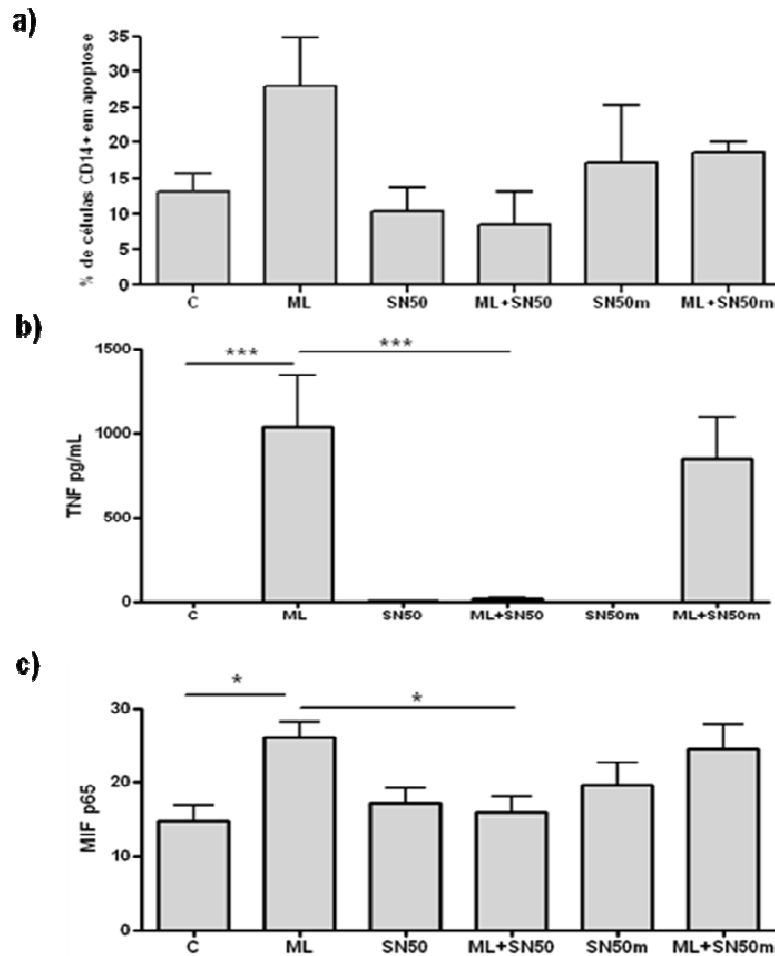


Figura 8. NF- κ B participa da secreção de TNF- α em resposta ao *M. leprae*. (a) O percentual de monócitos em apoptose foi avaliado pela marcação com anexina V-FITC e PI, após pré-tratamento das células com SN50 (18 μ M) ou com o peptídeo mutado (SN50m, 18 μ M) e estimulação com *M. leprae* (ML, MOI 20:1) por 20 horas. O gráfico mostra as médias e os erros padrões de 3 experimentos realizados. (b) Os níveis de TNF- α foram determinados por ELISA. O gráfico mostra as médias e os erros padrões de 7 experimentos realizados. *** $p \leq 0,001$ quando culturas estimuladas com *M. leprae* (ML, MOI 10:1) foram comparadas as culturas não estimuladas ou mantidas na presença de SN50 e *M. leprae*. (c) A translocação da subunidade p65 de NF- κ B foi verificada por citometria de fluxo, após marcação dos núcleos com anticorpo anti-p65 marcado com FITC. O gráfico mostra as médias e os erros padrões de 7 experimentos realizados. * $p \leq 0,05$ quando células estimuladas com *M. leprae* (ML, MOI 10:1) foram comparadas ao controle não estimulado ou a culturas pré-tratadas com SN50 e estimuladas com *M. leprae*. Nos ensaios de citometria de fluxo foram analisadas 10.000 células.

5. Avaliação do papel da talidomida na fosforilação de p38 em resposta ao *M. leprae*

Para avaliar o papel da talidomida na fosforilação de p38 MAPK, cerca de $2,0 \times 10^6$ monócitos foram plaqueados, pré-tratados com a talidomida e estimulados com *M. leprae* (MOI 10:1) por 30 e 90 minutos. A fosforilação de p38 foi verificada por Western Blot.

A análise densitométrica das bandas demonstrou que o tratamento com *M. leprae* por 30 minutos aumentou a fosforilação de p38 (1,95) em relação ao controle não estimulado (1,00). No entanto a fosforilação de p38 volta a níveis basais quando as células foram mantidas por 90 minutos na presença do *M. leprae* (1,02). Foi observada uma redução da fosforilação de p38 quando as células foram pré-tratadas com talidomida e estimuladas com *M. leprae* por 30 minutos (1,07) quando comparado as culturas estimuladas somente com a micobactéria pelo mesmo período de tempo (Figura 9b).

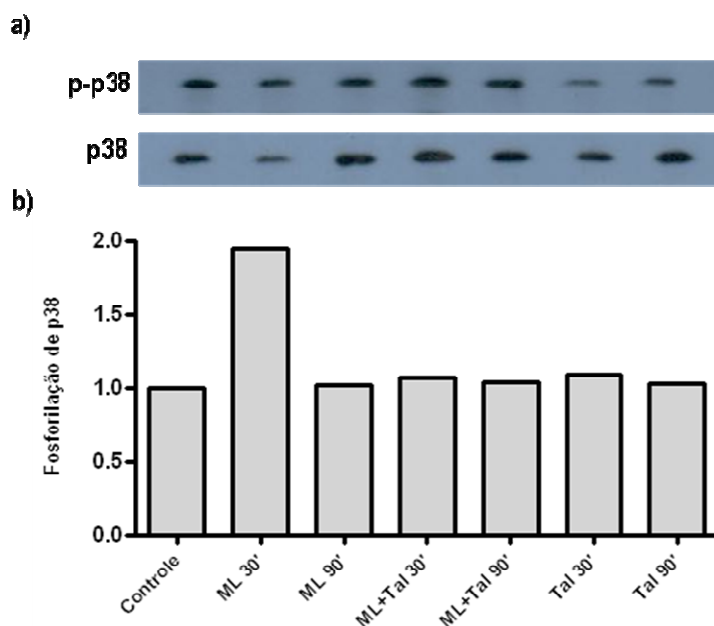


Figura 9. Talidomida reduz a fosforilação de p38 em resposta ao *M. leprae*. Lisados de monócitos pré-tratados com talidomida (Tal, $30\mu\text{M}$) e estimulados com *M. leprae* (ML, MOI 10:1) foram analisados por Western Blot. p38 total foi utilizado como controle. (a) Autorradiografia de um Western Blot representativo de 2 realizados. A primeira linha mostra o p38 fosforilado e a segunda linha mostra o p38 total. (b) O gráfico representa a densitometria das bandas considerando os valores do controle não estimulado como 1.

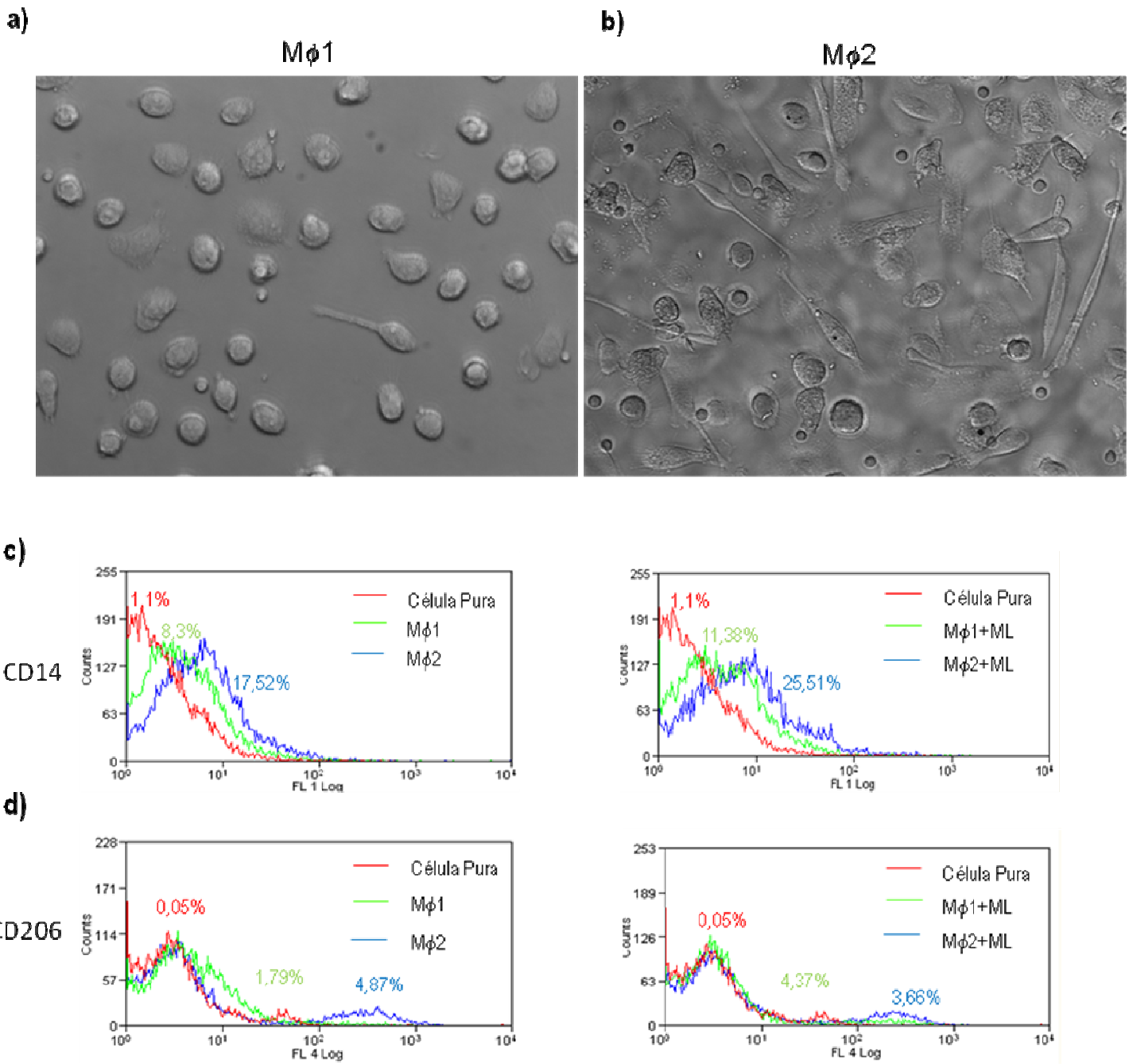
6. Polarização dos macrófagos em M ϕ 1 e M ϕ 2

Para diferenciação dos macrófagos, monócitos obtidos a partir de células mononucleares do sangue periférico foram cultivados por 6 dias na presença de GM-CSF para diferenciação em macrófagos pró-inflamatórios, M ϕ 1 ou de M-CSF para diferenciação em macrófagos antiinflamatórios, M ϕ 2. Os macrófagos M ϕ 1 são mais arredondados e os M ϕ 2 são menos aderentes e com formatos irregulares. Em seguida, foram avaliados marcadores de superfície para tentar caracterizar estes dois tipos de macrófagos. A análise por citometria de fluxo demonstrou que macrófagos M ϕ 1 estimulados ou não com *M. leprae* possuem maior expressão da molécula co-estimulatória CD40. Em contrapartida, os macrófagos M ϕ 2 têm um aumento da expressão de CD14, do receptor de manose, CD206 e do receptor *scavenger*, CD163 em macrófagos estimulados ou não com *M. leprae* (Figura 10a). O HLA-DR também foi avaliado, porém não foi observada diferença na expressão dessa molécula na superfície dos macrófagos M ϕ 1 ou M ϕ 2.

Já foi demonstrado que citocinas como IL-12 e IL-10 são produzidas de forma diferente por macrófagos ativados pela via clássica (M ϕ 1) ou pela via alternativa (M ϕ 2) [103]. Portanto, para avaliar a produção destas citocinas por macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2 em nosso modelo, os macrófagos diferenciados foram estimulados com *M. leprae* (MOI 10:1) por 20 horas e os níveis de IL-10 e IL-12 foram determinados por ELISA.

Nossos resultados mostram que os macrófagos M ϕ 1 produzem aproximadamente 3 vezes mais IL-12 ($426,8 \pm 111,5$ pg/mL) quando comparado aos macrófagos M ϕ 2 ($127,6 \pm 31,12$ pg/mL). No entanto, apesar dos M ϕ 1 estimulados com *M. leprae* produzirem mais IL-12p40 quando comparado aos M ϕ 2 nas mesmas condições essa diferença não foi estatisticamente significativa. (Figura 10b). Por outro lado, a secreção de IL-10 parece ter um

perfil inverso. Os macrófagos M ϕ 2 produzem em média 7 vezes mais IL-10 ($1436 \pm 396,6$ pg/mL) que os macrófagos M ϕ 1 ($185,1 \pm 54,07$ pg/mL). Além disso, na presença do *M. leprae* os macrófagos M ϕ 2 tem um aumento na produção de IL-10 (2302 ± 539 pg/mL) quando comparado aos macrófagos M ϕ 1 estimulados com *M. leprae* ($361,8 \pm 156,5$ pg/mL) ou aos macrófagos M ϕ 1 não estimulados ($185,1 \pm 54,07$ pg/mL) (Figura 10c).



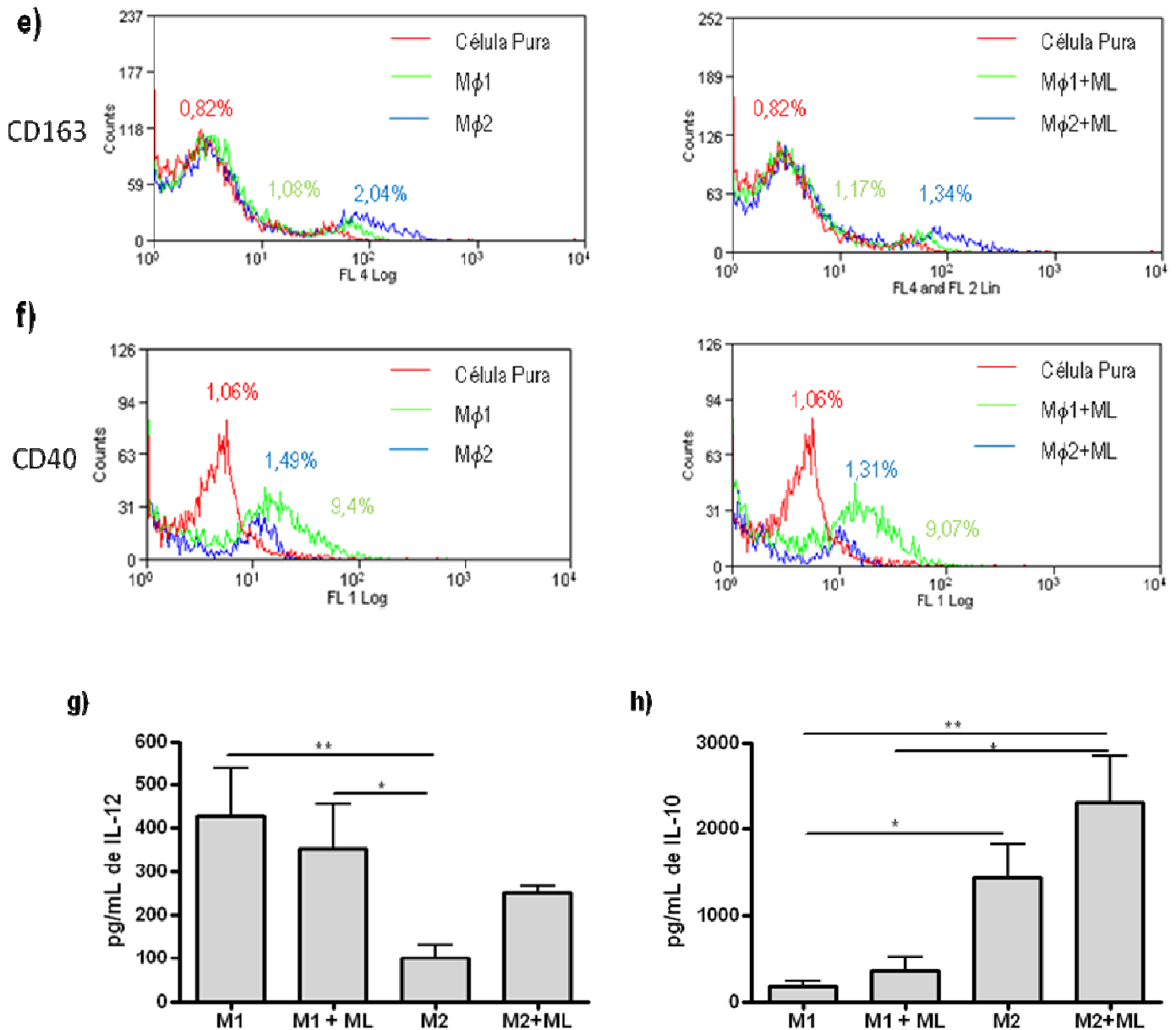


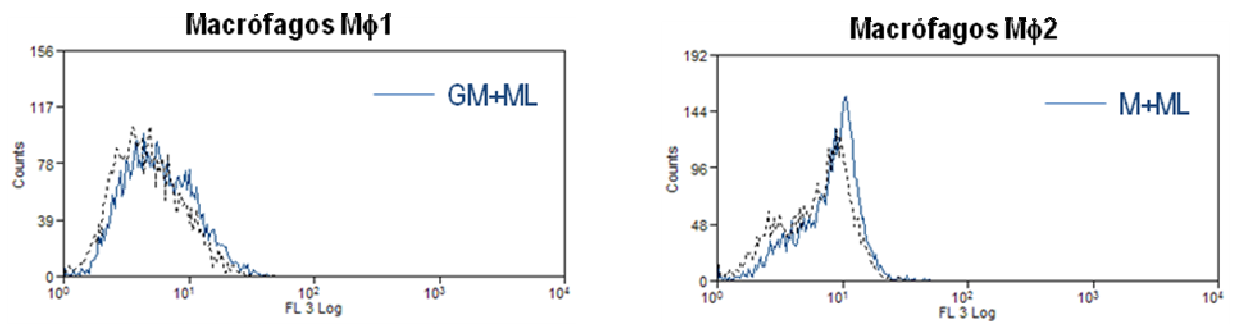
Figura 10. Diferenciação dos monócitos humanos em dois subtipos funcionalmente distintos, Mφ1 e Mφ2. (a; b) Macrófagos Mφ1 e Mφ2 foram diferenciados por 6 dias na presença de GM-CSF ou M-CSF, respectivamente. As fotos mostram a morfologia de dois diferentes tipos de macrófagos. As imagens foram obtidas usando o microscópio Colibri Led Light (Carl Zeiss, Sliedrecht, The Netherlands). (c, d, e; f) Análise por citometria de fluxo das moléculas de superfície CD14, CD206, CD40 e CD163 em macrófagos Mφ1 ou Mφ2 estimulados ou não com *M. leprae* (10:1). Histogramas representativos de um experimento realizado. Os números nos histogramas representam o percentual de células positivas. Nos ensaios de citometria de fluxo foram analisadas 10.000 células. (g) O gráfico representa as médias e os erros padrões de 8 experimentos realizados. ** $p \leq 0,01$ quando macrófagos Mφ1 foram comparados aos macrófagos Mφ2. * $p \leq 0,05$ quando macrófagos Mφ1 estimulados com *M. leprae* (ML, MOI 10:1) foram comparados aos macrófagos Mφ2. (h) O gráfico representa as médias e os erros padrões de 8 experimentos realizados. ** $p \leq 0,01$ e * $p \leq 0,05$ quando macrófagos Mφ2 estimulados com *M. leprae* são comparados a macrófagos Mφ1 e a macrófagos Mφ1 estimulados com *M. leprae*, respectivamente. * $p \leq 0,05$ quando macrófagos Mφ2 foram comparados aos macrófagos Mφ1.

7. Análise da capacidade de internalização do *M. leprae* por macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2

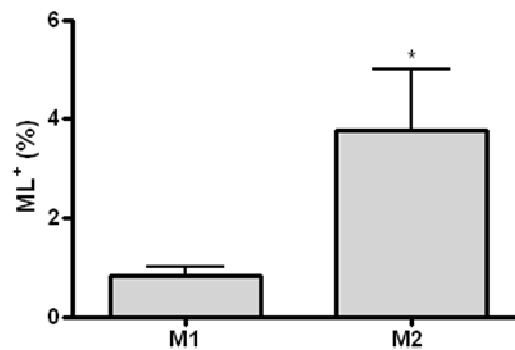
Uma vez que foi sugerido que a talidomida parece inibir a translocação da sub-unidade p65 do NF- κ B por um mecanismo dependente de p38 MAPK o que parece contribuir para o aumento dos níveis de TNF- α e indução de apoptose, fomos avaliar o papel da fagocitose dessas células apoptóticas no desenvolvimento da doença. Uma vez que a doença acomete principalmente macrófagos teciduais, fomos investigar ainda o comportamento do *M. leprae* frente a macrófagos derivados de monócitos diferenciados *in vitro* com GM-CSF (M ϕ 1) ou com M-CSF (M ϕ 2). Para avaliar a capacidade de internalização do *M. leprae* pelos macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2, monócitos foram cultivados por 6 dias na presença de GM-CSF ou M-CSF, conforme descrito na metodologia. Após esse período os macrófagos foram estimulados com *M. leprae* marcado com ou não com FITC na multiplicidade de infecção igual a 10, por 90 minutos. A internalização do *M. leprae* foi avaliada por citometria de fluxo e microscopia eletrônica de transmissão.

A análise dos dados mostrou um aumento significativo do percentual de internalização do *M. leprae* por macrófagos M ϕ 2 ($3,78 \pm 1,22\%$) quando comparado aos macrófagos M ϕ 1 ($0,84 \pm 0,17\%$) (Figura 11b). Os ensaios realizados através da microscopia eletrônica confirmam esses resultados, mostrando que os vacúolos dos macrófagos M ϕ 2 estão repletos de *M. leprae*, enquanto que os vacúolos dos M ϕ 1 possuem apenas algumas bactérias (Figura 11c).

a)



b)



c)

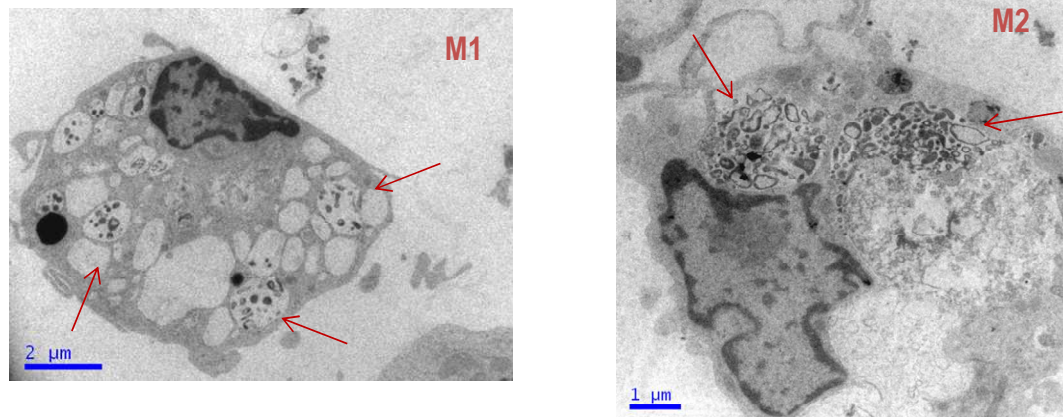


Figura 11. Macrófagos Mφ2 são mais fagocíticos do que macrófagos Mφ1. (a) Macrófagos Mφ1 diferenciados com GM-CSF e Mφ2 diferenciados com M-CSF foram estimulados com *M. leprae* marcado com FITC por 90 minutos. Histograma representativo de uma citometria de fluxo de 4 realizadas. ---- macrófagos não estimulados e — *M. leprae* (ML, MOI 10:1). (b) O gráfico representa as médias e os erros padrões de 4 experimentos independentes realizados. * $p \leq 0,05$ quando os macrófagos Mφ2 foram comparados aos macrófagos Mφ1. Em todos os ensaios foram analisadas 10.000 células. (c) Análise por microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos Mφ1 e Mφ2 estimulados com *M. leprae* por 90 minutos, embebidos em Epon e corados com uranila e chumbo. As setas vermelhas indicam os bacilos dentro de vacúolos.

8. Estudo do papel da fagocitose de células apoptóticas na internalização do *M. leprae*

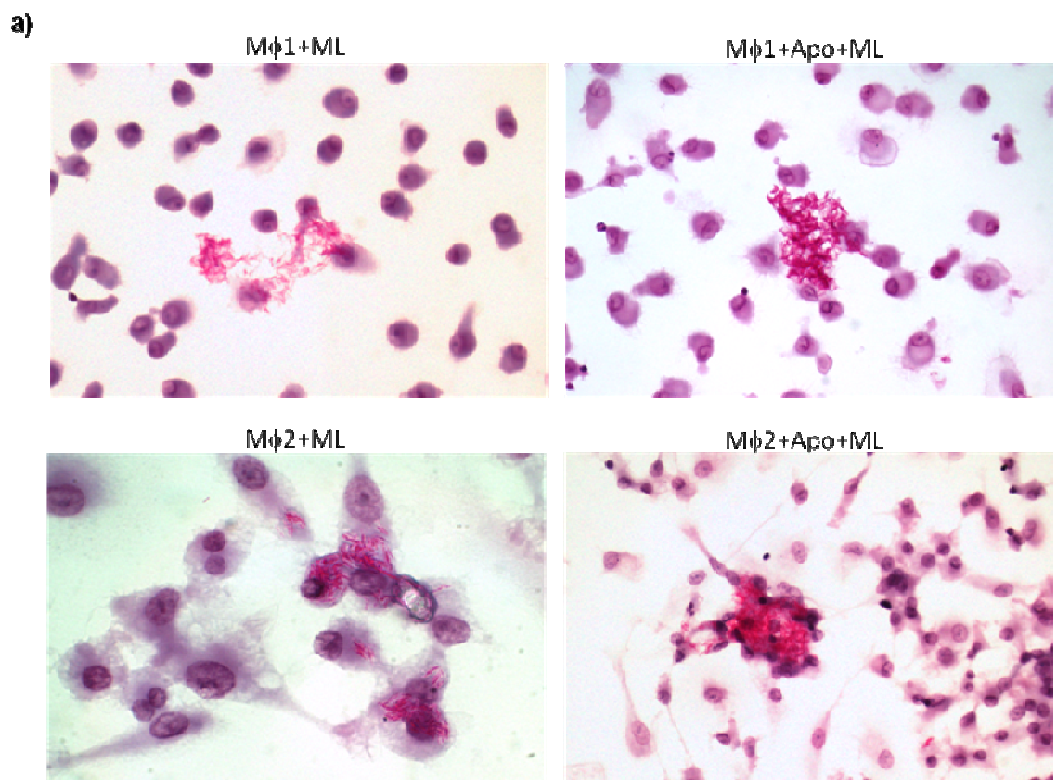
Para avaliar o papel da fagocitose de células apoptóticas na associação do *M. leprae* em macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2, células Jurkat foram expostas a radiação UV e mantidas em cultura na ausência de soro por 3h. Em seguida os macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2 foram estimulados com *M. leprae* (MOI 10:1) na presença ou não de células em apoptose por 90 minutos. O percentual de associação do *M. leprae* foi avaliado através da coloração com Ziehl-Neelsen (Figura 12a).

Foi observado que na presença de células apoptóticas há um aumento da associação do *M. leprae* tanto em macrófagos M ϕ 1 quanto em macrófagos M ϕ 2. No entanto, verificou-se uma maior diferença na associação do *M. leprae* na presença de células em apoptose nos macrófagos M ϕ 1 quando comparado a estes mesmos macrófagos estimulados apenas com *M. leprae*. Apesar dos macrófagos M ϕ 2 mostrarem-se mais fagocíticos do que os macrófagos M ϕ 1, a presença de células apoptóticas parece não influenciar de forma significativa a associação do *M. leprae* (Figura 12a).

Também foram realizados ensaios utilizando o *M. leprae* marcado com FITC para complementar os dados anteriores. Macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2 foram estimulados com *M. leprae* e cultivados na presença de células em apoptose ou células viáveis por 90 minutos. Em seguida o percentual de internalização do *M. leprae* foi avaliado por citometria de fluxo (Figura 12c). Os resultados mostraram que há um aumento no percentual de internalização do *M. leprae* na presença de células apoptóticas nos macrófagos M ϕ 1 ($5,46 \pm 1,23\%$) e M ϕ 2 ($4,18 \pm 1,70\%$) quando comparados aos macrófagos estimulados somente com *M. leprae* ($1,082 \pm 0,26\%$ nos M ϕ 1 e $3,03 \pm 1,51\%$ nos M ϕ 2) ou nos macrófagos que foram mantidos na presença de células viáveis estimuladas com esta micobactéria ($1,51 \pm 0,53\%$ nos M ϕ 1 e $1,36 \pm 0,80\%$ nos M ϕ 2) (Figura 12c).

Outro ensaio avaliou o percentual de fagocitose de células apoptóticas e da internalização do *M. leprae* por macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2, para isso células Jurkat viáveis e apoptóticas foram marcadas em vermelho com o corante vital PKH26 e o *M. leprae* foi marcado em verde com FITC. O percentual de células duplo marcadas foi verificado por citometria de fluxo (Figura 12d).

Esses dados mostraram que os macrófagos M ϕ 2 foram capazes de internalizar mais células em apoptose e *M. leprae* ($5,5 \pm 0,88\%$) quando comparados aos macrófagos M ϕ 1 ($2,52 \pm 0,52\%$) nas mesmas condições. No entanto, na presença de células vivas não foi observada nenhuma diferença significativa no percentual de fagocitose dos macrófagos M ϕ 1 ($0,95 \pm 0,2\%$) e M ϕ 2 ($1,65 \pm 0,94\%$), respectivamente.



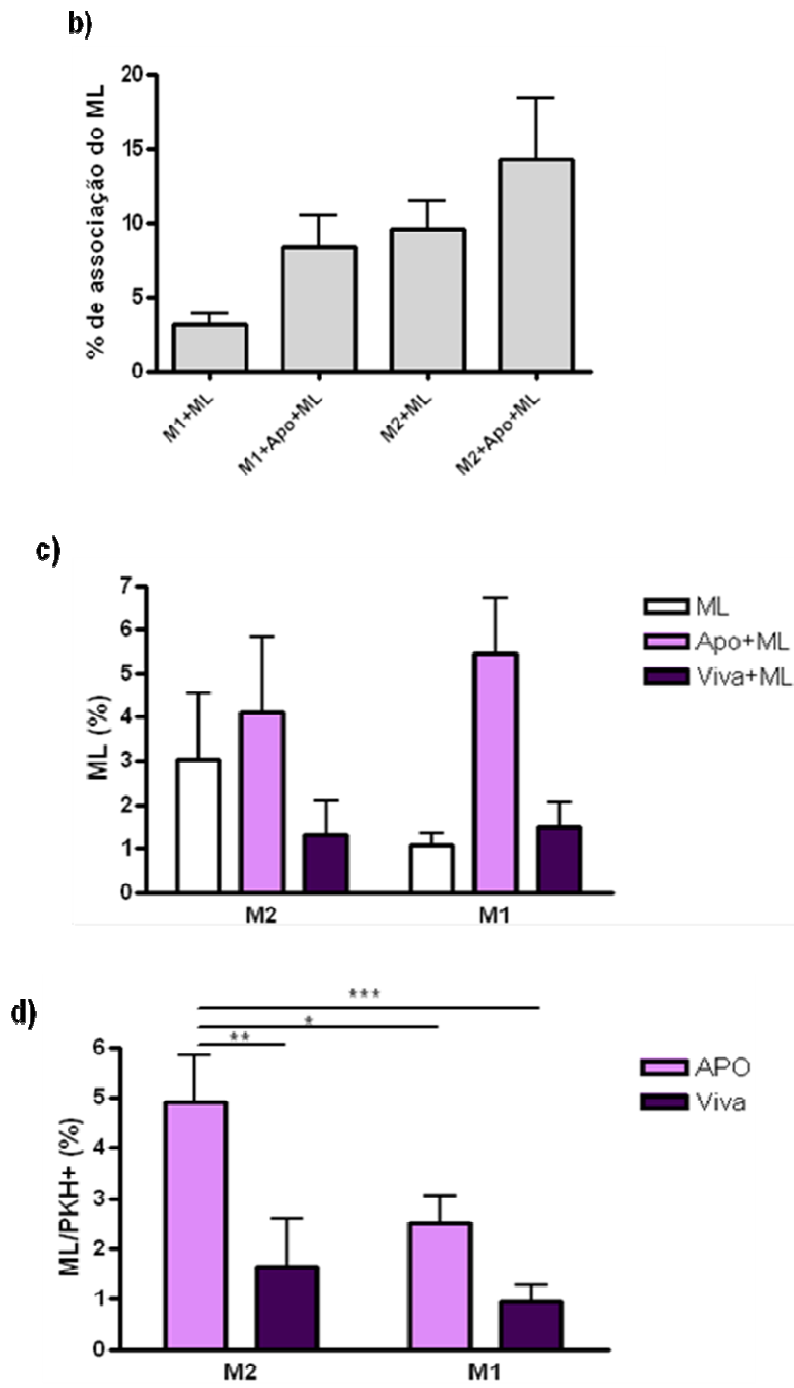


Figura 12. A fagocitose de células apoptóticas favorece a internalização do *M. leprae*. (a) As figuras mostram a associação do *M. leprae* a macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2 após marcação da bactéria com Ziehl-Nielsen e coloração dos macrófagos com azul de metileno. Os macrófagos foram estimulados com *M. leprae* (MOI 10:1) por 90 minutos. (b) O gráfico representa as médias e os erros padrões do percentual de associação do *M. leprae* (ML, MOI 10:1) na presença ou não de células em apoptose (Apo) obtidos a partir de 4 experimentos realizados. (c) O percentual de internalização do *M. leprae* (MOI 10:1) foi determinado por citometria de fluxo em culturas de macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2 estimuladas com *M. leprae* marcados com FITC na presença ou não de células Jurkat em apoptose ou vivas. Os resultados representam médias e erros padrões obtidos a partir de 5 experimentos independentes. (d) O gráfico representa o percentual de internalização do *M. leprae* (MOI 10:1) marcado com FITC e de células Jurkat coradas com PKH 26 por M ϕ 1 e M ϕ 2. * $p \leq 0,05$ quando culturas de macrófagos M ϕ 2 na presença de *M. leprae* e de células em apoptose foram comparados a macrófagos M ϕ 1 nas mesmas condições. ** $p \leq 0,01$

quando macrófagos M ϕ 2 na presença de *M. leprae* e células em apoptose foram comparados a macrófagos M ϕ 2 estimulados com *M. leprae* e células vivas. *** $p \leq 0,001$ quando macrófagos M ϕ 2 estimulados por *M. leprae* e células em apoptose foram comparados a macrófagos M ϕ 1 na presença do *M. leprae* e células vivas. Os resultados representam as médias e erros padrões obtidos a partir de 5 experimentos independentes. Todos os ensaios realizados foram analisadas 10.000 células.

9. Avaliação da participação do *M. leprae* na fagocitose de células apoptóticas

Para investigar o papel do *M. leprae* na fagocitose de células apoptóticas $2,0 \times 10^6$ células foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro e deixadas em cultura por 2h para aderência dos monócitos. Em seguida as células não aderentes foram removidas e os monócitos permaneceram em estufa com CO₂ por seis dias em presença de meio contendo GM-CSF ou M-CSF para diferenciação em macrófagos M ϕ 1 ou M ϕ 2. Após esse período os macrófagos foram corados com PKH67 (verde) e estimulados com *M. leprae* (MOI 10:1) e mantidos na presença ou não de células em apoptose marcadas com PKH26 por 90 minutos. A fagocitose de células apoptóticas por avaliada microscopia confocal.

Como mostrado nas fotografias e no gráfico abaixo os macrófagos M ϕ 2 fagocitam 1,7 vezes mais células em apoptose quando comparados aos M ϕ 1. Entretanto, quando os macrófagos foram estimulados com *M. leprae* observou-se uma redução da fagocitose de células apoptóticas nos dois tipos de macrófagos (Figura 13).

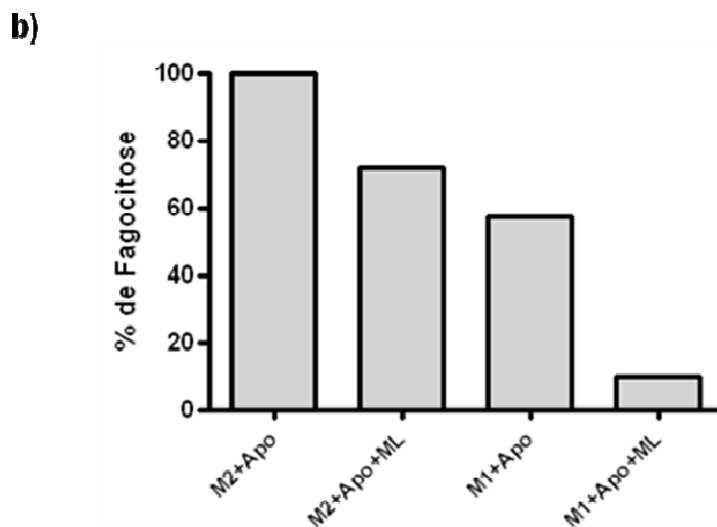
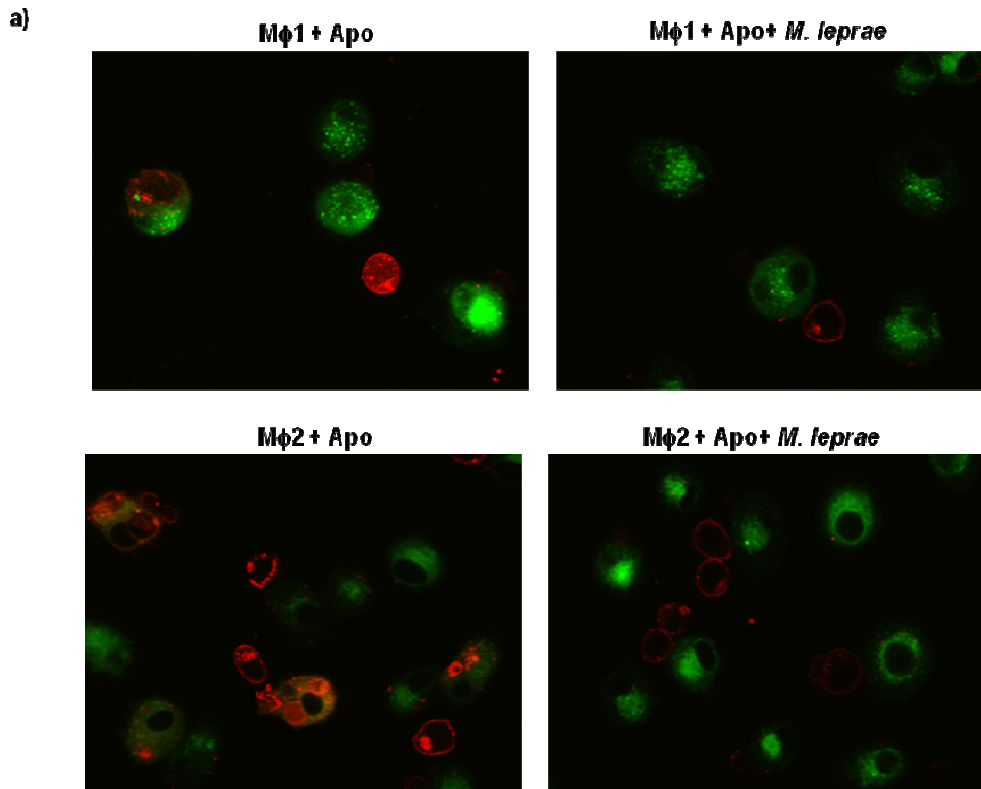


Figura 13. *M. leprae* reduz a fagocitose de células apoptóticas. (a) Os macrófagos diferenciados foram estimulados com *M. leprae* (MOI 10:1) e mantidos na presença ou não de células Jurkat em apoptose (Apo) por 90 minutos. As fotos representam a marcação em verde dos macrófagos Mφ1 e Mφ2 pelo corante PKH67 e das células apoptóticas em vermelho com o corante PKH26. Este resultado mostra um experimento representativo de dois ensaios independentes realizados por microscopia confocal. (b) O gráfico representa a quantificação do percentual de fagocitose de células apoptóticas por macrófagos Mφ1 e Mφ2 em resposta ao *M. leprae* (ML, MOI 10:1).

10. Efeito da fagocitose de células apoptóticas na expressão gênica de COX-2

Já foi demonstrado que lesões de pacientes lepromatosos possuem mais células positivas para COX-2 quando comparado as lesões de pacientes tuberculóides [236]. Além disso, altas concentrações de PGE₂ produzidas por COX-2 nos pacientes LL podem inibir a produção de citocinas Th1, contribuindo para a anergia das células T observadas nesses pacientes.

Para pesquisar o papel da fagocitose de células apoptóticas na expressão gênica de COX-2, macrófagos diferenciados com GM-CSF ou M-CSF foram estimulados ou não com *M. leprae* (MOI 10:1) e cultivados na presença de células Jurkat viáveis ou em apoptose.

Como mostrado na figura 14a, a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos M ϕ 1 induziu um aumento significativo do número de cópias relativas de COX-2 ($0,091 \pm 0,033$) quando comparado ao controle não estimulado ($0,005 \pm 0,003$). No entanto, na presença do *M. leprae* a fagocitose de células em apoptose não alterou a expressão gênica de COX-2 ($0,027 \pm 0,015$). Da mesma forma, na presença de células vivas não foi observada diferença na expressão de COX-2 em relação ao controle (M ϕ 1+cel viva: $0,021 \pm 0,012$ e M ϕ 1+cel viva+ML: $0,006 \pm 0,003$).

Nos macrófagos M ϕ 2 o *M. leprae* parece aumentar a expressão de COX-2 ($0,1636 \pm 0,1085$) quando comparado ao controle ($0,0009 \pm 0,0004$) e a fagocitose de células apoptóticas induzida por *M. leprae* aumenta significativamente o número de cópias relativas para COX-2 ($0,4392 \pm 0,1117$) quando comparado a qualquer um dos outros tratamentos utilizados (M ϕ 2+cel viva: $0,0039 \pm 0,0008$; M ϕ 2+cel viva+ML: $0,0411 \pm 0,0189$ e M ϕ 2+Apo: $0,0327 \pm 0,0175$).

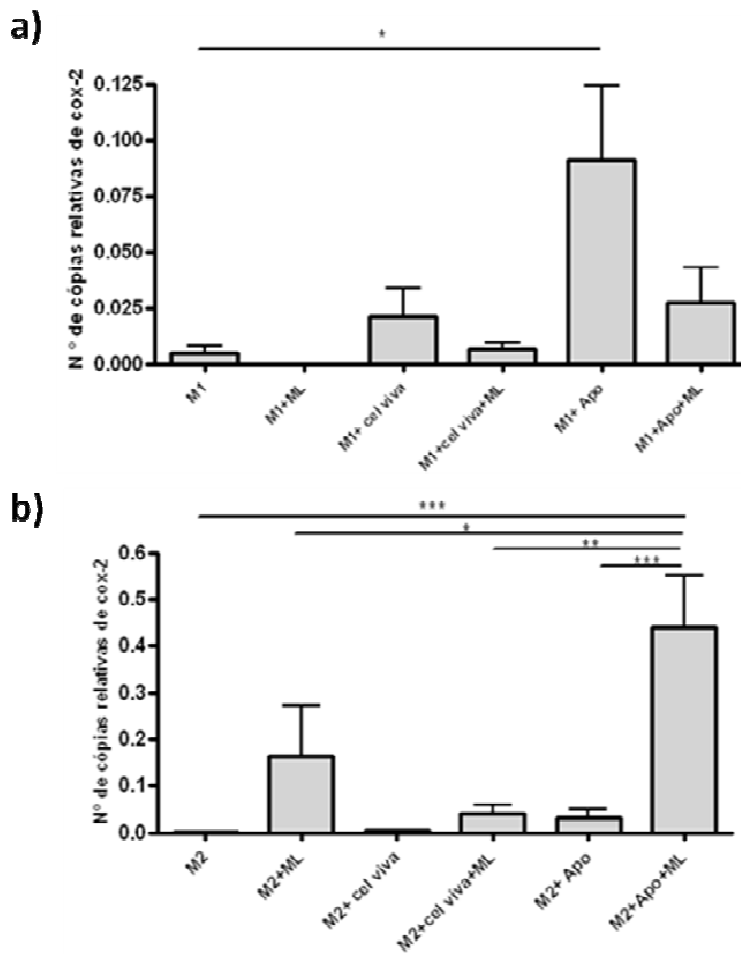


Figura 14. A fagocitose de células apoptóticas reduz a expressão de COX-2 induzida por *M. leprae* em macrófagos M ϕ 1 e aumenta em macrófagos M ϕ 2. Macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2 foram estimulados com *M. leprae* (ML, MOI 10:1) e mantidos na presença ou não de células Jurkat viáveis ou em apoptose (Apo) por 3 horas. A expressão de COX-2 foi determinada por RT-PCR em tempo real. (a) * $p \leq 0,05$ quando macrófagos M ϕ 1 não estimulados foram comparados a macrófagos M ϕ 1 na presença de células apoptóticas por 3 horas. (b) * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$ quando macrófagos M ϕ 2 estimulados com células apoptóticas e *M. leprae* foram comparados a macrófagos estimulados com *M. leprae*, células vivas e *M. leprae* e células apoptóticas ou controle não estimulado, respectivamente. Os resultados representam médias e erros padrões de 6 experimentos realizados.

11. Estudo da fagocitose de células apoptóticas na produção de PGE₂

Sabendo que a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos M ϕ 1 induz aumento de COX-2, nós fomos pesquisar a participação de PGE₂ nesse processo. Para isso, macrófagos diferenciados com GM-CSF ou M-CSF foram estimulados ou não com *M. leprae* (MOI 10:1) e cultivados na presença de células Jurkat viáveis ou em apoptose por 20 horas. A secreção de PGE₂ foi avaliada por ELISA.

Foi observado que a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos M ϕ 1 induz um aumento significativo da secreção de PGE₂ ($3,41 \pm 0,80$ pg/mL) quando comparado ao controle ($0,22 \pm 0,15$ pg/mL) ou com as células estimuladas com *M. leprae* ($0,20 \pm 0,20$ pg/mL) (Figura 15a).

Nos macrófagos M ϕ 2 o *M. leprae* foi capaz de induz um aumento significativo na produção de PGE₂ ($2,43 \pm 0,41$ pg/mL) quando comparado às células não estimuladas ($0,06 \pm 0,06$ pg/mL) ou as células mantidas na presença de jurkat viáveis e *M. leprae* ($0,10 \pm 0,06$ pg/mL). A fagocitose de células apoptóticas também aumentou a produção de PGE₂ ($2,06 \pm 0,68$ pg/mL) quando comparado aos macrófagos M ϕ 2 não estimulados ($0,06 \pm 0,06$ pg/mL) ou aos macrófagos mantidos na presença de células Jurkat viáveis ($0,47 \pm 0,21$ pg/mL). Por fim, a fagocitose de células apoptóticas em resposta ao *M. leprae* aumentou a secreção de PGE₂ ($1,76 \pm 0,61$ pg/mL) quando comparado ao controle não estimulado ($0,06 \pm 0,06$ pg/mL) ou aos macrófagos mantidos na presença de células Jurkat vivas e *M. leprae* ($0,10 \pm 0,06$ pg/mL) (Figura 15b).

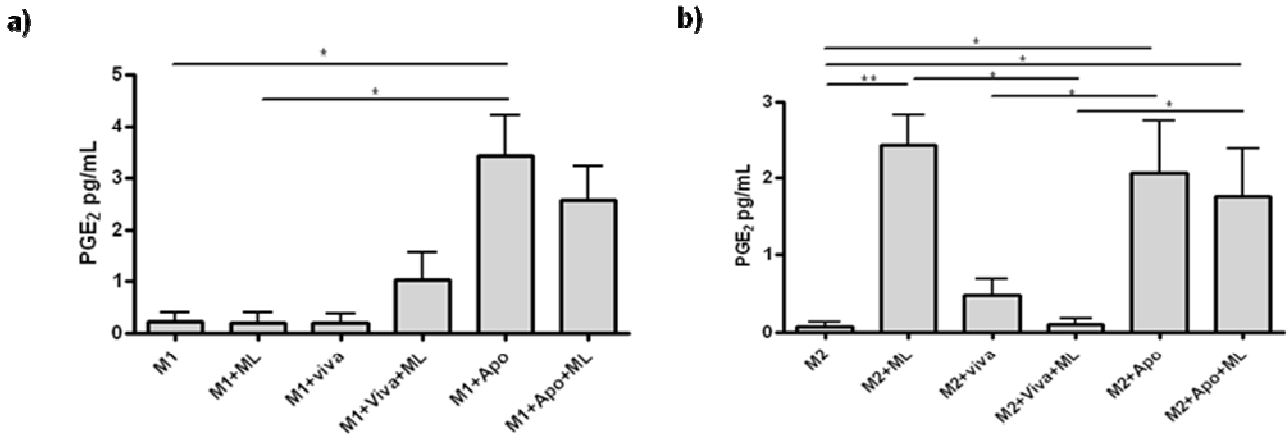


Figura 15. A fagocitose de células apoptóticas aumenta a secreção de PGE₂ em macrófagos Mφ1 e Mφ2. Macrófagos Mφ1 e Mφ2 foram estimulados com *M. leprae* (ML, MOI 10:1) e mantidos na presença de células Jurkat vivas ou em apoptose (Apo) por 20 horas. A produção de PGE₂ foi determinada por ELISA. (a) *p≤0,05 quando macrófagos Mφ1 não estimulados ou estimulados com *M. leprae* foram comparados a macrófagos Mφ1 na presença de células apoptóticas por 20 horas. (b) *p≤0,05 quando macrófagos Mφ2 não estimulados foram comparados a Mφ2 co-cultivados com células apoptóticas na presença ou não do *M. leprae*, quando Mφ2 cultivados na presença de células apoptóticas foram comparados a Mφ2 mantidos na presença de células viáveis ou quando Mφ2 estimulados com *M. leprae* foram comparados a Mφ2 mantidos na presença de células Jurkat e *M. leprae* **p≤0,01 quando macrófagos Mφ2 não estimulados foram comparados a macrófagos Mφ2 estimulados com *M. leprae*. Os resultados representam médias e erros padrões de 6 experimentos realizados.

12. Análise da fagocitose de células apoptóticas no fenótipo dos macrófagos Mφ1 e Mφ2

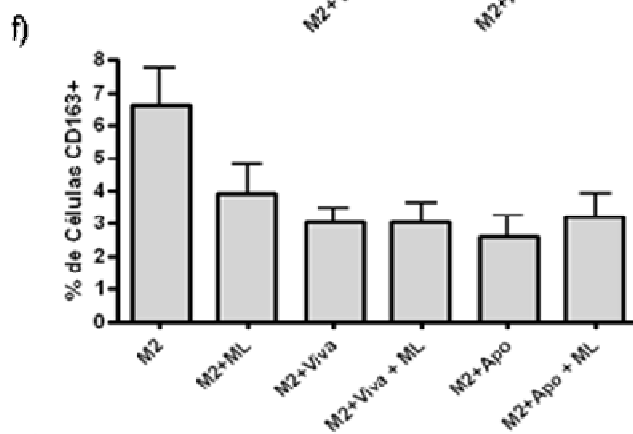
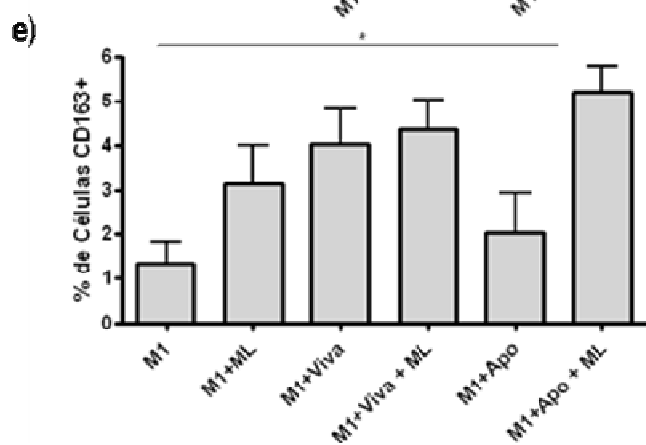
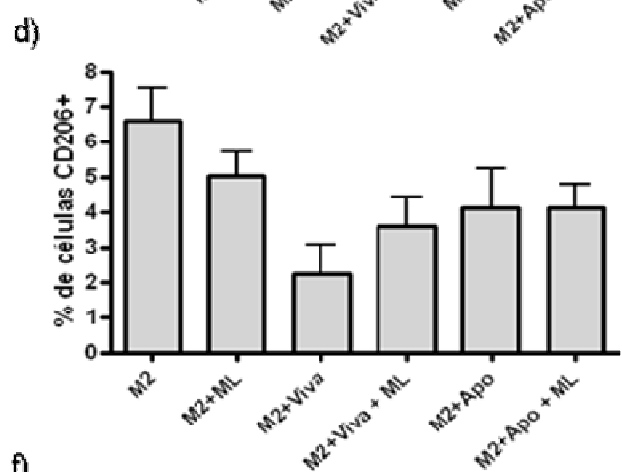
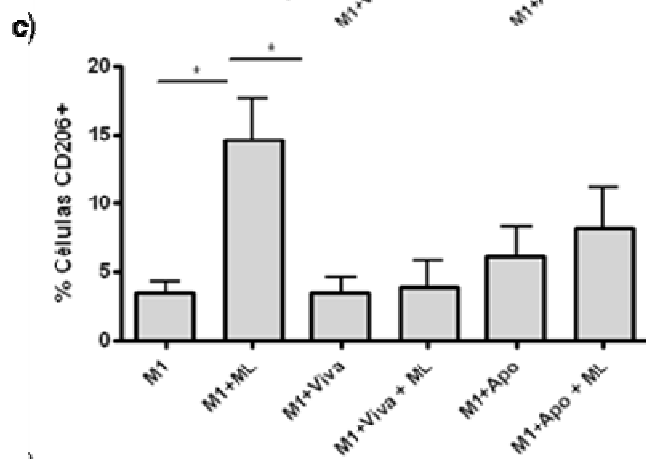
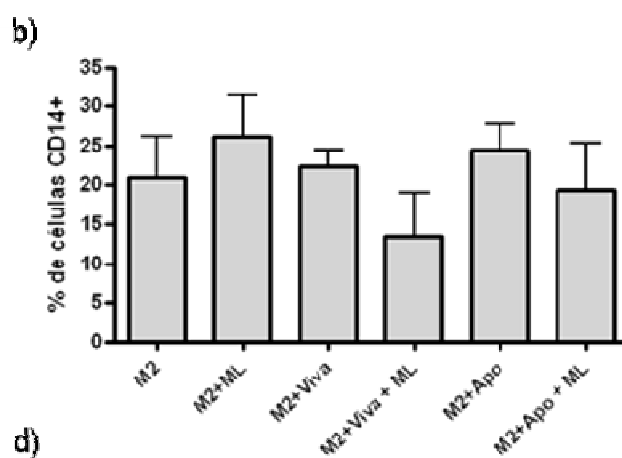
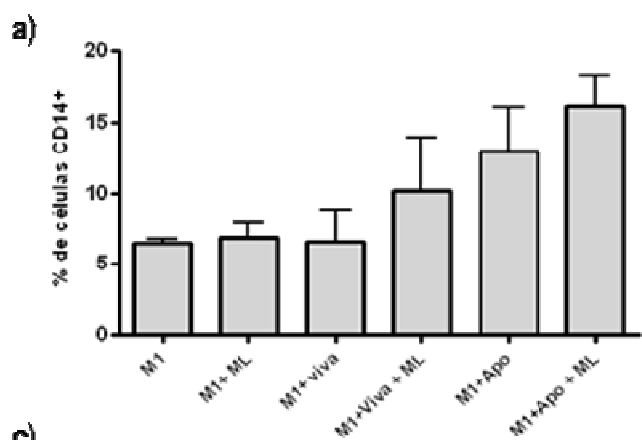
Para investigar o papel da fagocitose de células apoptóticas na modulação do fenótipo dos macrófagos Mφ1 e Mφ2, macrófagos diferenciados na presença de GM-CSF ou M-CSF foram estimulados ou não com *M. leprae* (MOI 10:1) e mantidos na presença ou não de células em apoptose por 24 horas. O percentual de macrófagos positivos para CD14, CD206, CD163, HLA-DR e CD40 foram avaliados por citometria de fluxo (Figura 16).

Os resultados mostram que o *M. leprae* aumenta significativamente o percentual de CD206 (14,55 ± 2,97%) em macrófagos Mφ1 quando comparado ao controle (3,42 ± 0,89%) e

reduz os níveis de HLA-DR ($3,87 \pm 0,70\%$) em comparação ao controle não estimulado ($6,38 \pm 1,51\%$). Nos macrófagos M ϕ 2 o *M. leprae* reduz o percentual de CD163 ($3,91 \pm 0,87\%$) e HLA-DR ($1,91 \pm 0,60\%$) quando comparados ao controle ($6,57 \pm 1,13\%$ de CD163 e $3,69 \pm 0,45\%$ de HLA-DR).

A fagocitose de células apoptóticas foi capaz de aumentar o percentual de macrófagos M ϕ 1 positivos para CD14 ($12,97 \pm 3,02\%$) quando comparado tanto com o controle não estimulado ($6,41 \pm 0,30\%$) quanto com o *M. leprae* ($6,86 \pm 1,03\%$). E a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos M ϕ 2 reduziu o percentual de células positivas para CD163 ($2,59 \pm 0,61\%$) quando comparado ao controle ($6,57 \pm 1,16\%$).

A fagocitose de células apoptóticas em resposta ao *M. leprae* por macrófagos M ϕ 1 aumentou significativamente os níveis de CD163 ($5,19 \pm 0,59\%$) quando comparado ao controle não estimulado ($1,35 \pm 0,46\%$). Já a remoção de células apoptóticas por macrófagos M ϕ 2 em resposta ao *M. leprae* aumentou o percentual de células positivas para CD40 ($7,52 \pm 2,56\%$) e reduziu o percentual de CD163 ($3,17 \pm 0,74\%$) quando comparados ao controle não estimulado ($2,96 \pm 0,75\%$ de CD40 e $6,57 \pm 1,16\%$).



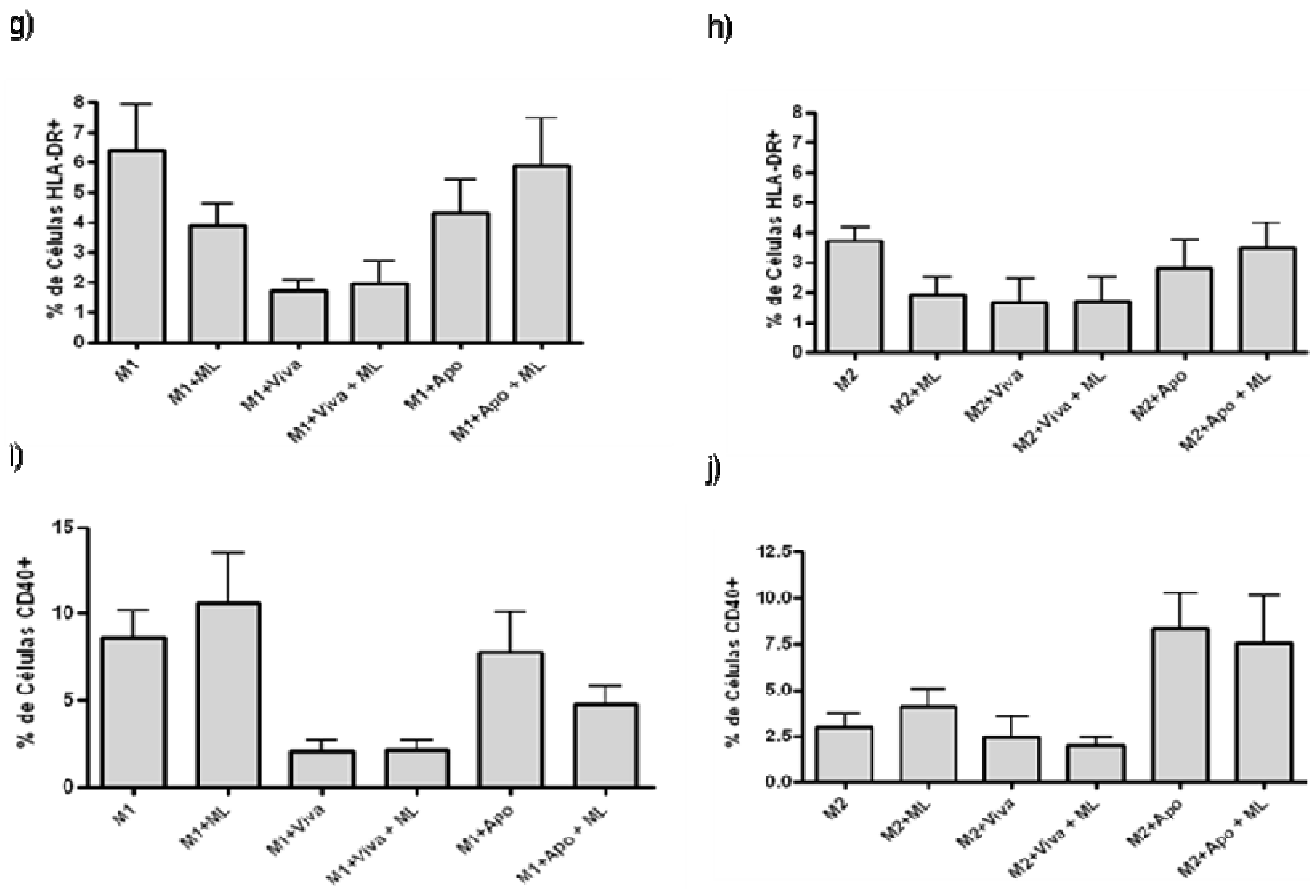


Figura 16. A fagocitose de células apoptóticas por macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2 modula os marcadores de superfície em resposta ao *M. leprae*. Macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2 foram estimulados com *M. leprae* (ML, MOI 10:1) e mantidos na presença ou não de células vivas ou em apoptose (Apo) por 20 horas. Os gráficos representam as médias e erros padrões dos percentuais de CD14, CD206, CD163, CD40 e HLA-DR, determinados por citometria de fluxo, de 5 experimentos independentes.

13. Análise da fagocitose de células apoptóticas na secreção de citocinas

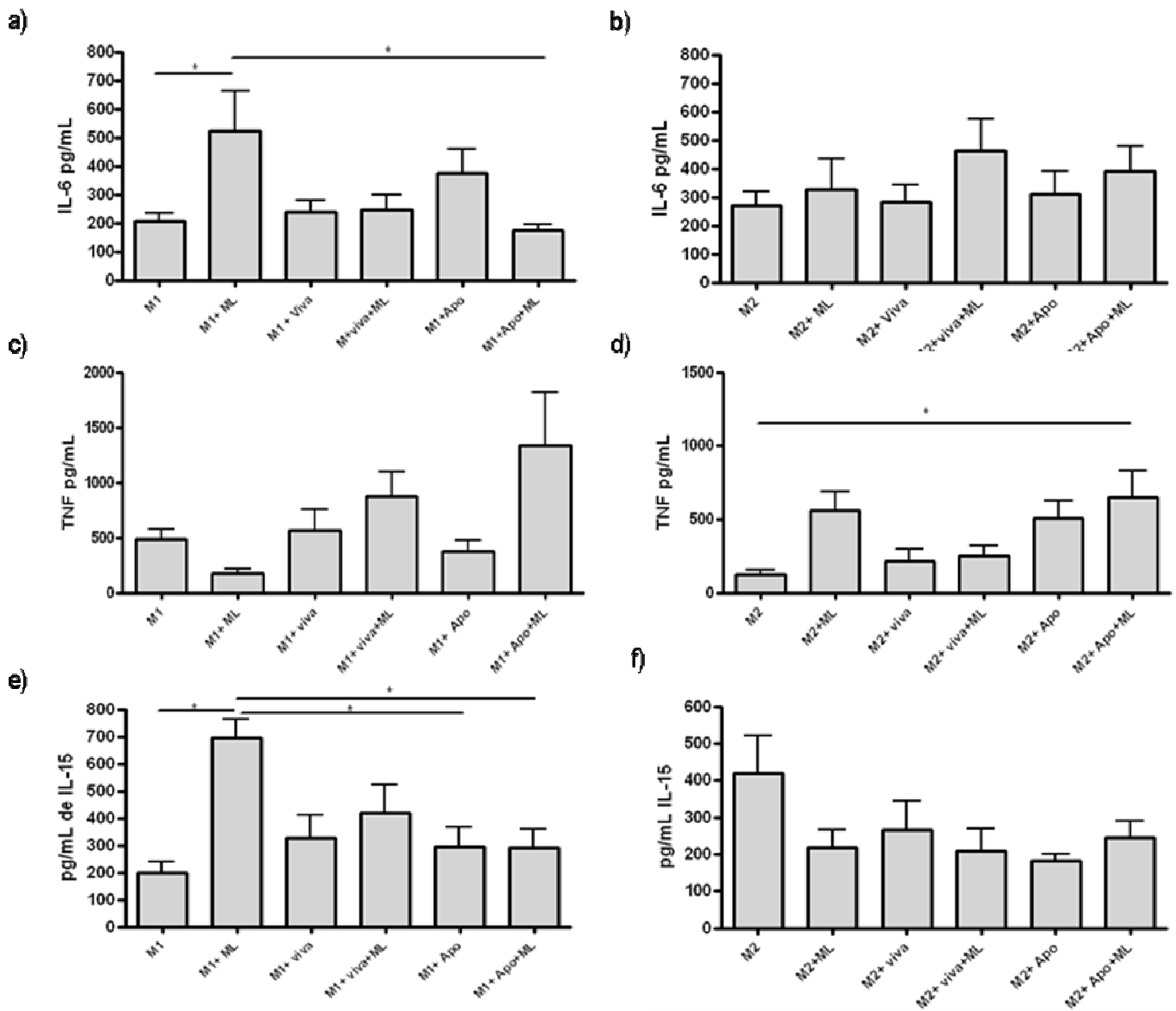
Para avaliar a participação da fagocitose de células apoptóticas na secreção de citocinas pelos macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2, monócitos recuperados do sangue periférico foram diferenciados em macrófagos M ϕ 1 ou M ϕ 2 na presença de GM-CSF ou M-CSF, respectivamente. Em seguida, os macrófagos foram estimulados com *M. leprae* e cultivados na presença de células apoptóticas ou viáveis por 20h. A secreção de citocinas foi avaliada por ELISA.

Os resultados mostram que o *M. leprae* aumenta de forma significativa a secreção de IL-6 e IL-15 em macrófagos M ϕ 1 (522,9 \pm 141,5 pg/mL de IL-6 e 695,5 \pm 66,63 pg/mL de IL-15) quando comparado ao controle não estimulado (204,7 \pm 31,43 pg/mL de IL-6 e 197,3 \pm 43,38 pg/mL de IL-15). Nos macrófagos M ϕ 2 estimulados com *M. leprae* observou-se um aumento da secreção de TNF- α , TGF- β e IL-10 (563,5 \pm 125,5 pg/mL de TNF- α , 1919 \pm 251 pg/mL de TGF- β e 2080 \pm 493 pg/mL de IL-10) quando comparado ao controle (126,4 \pm 27,17 pg/mL de TNF- α e 119,1 \pm 27,82 pg/mL de TGF- β e 296,4 \pm 68,93 pg/mL de IL-10). No entanto, os níveis de TNF- α secretados por macrófagos M ϕ 2 em resposta aos estímulos utilizados são semelhantes a produção desta citocina por macrófagos M ϕ 1 não estimulados (Figura 17).

A fagocitose de células apoptóticas induz aumento da secreção de TGF- β tanto em macrófagos M ϕ 1 (1006 \pm 244,1 pg/mL) quando em macrófagos M ϕ 2 (1710 \pm 449,2 pg/mL) quando comparados ao controle (M ϕ 1: 112,7 \pm 39,08 pg/mL e M ϕ 2: 119,1 \pm 27,82 pg/mL).

Na presença do *M. leprae* a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos M ϕ 1 reduz significativamente a secreção de IL-6 e IL-15 (173,8 \pm 20,20 pg/mL de IL-6 e 291,4 \pm 66,40 pg/mL de IL-15) quando comparado as células que foram estimuladas com *M. leprae* (522,9 \pm 141,5 pg/mL de IL-6 e 695,5 \pm 66,63 pg/mL de IL-15). Além disso, na presença do *M. leprae* a fagocitose de células apoptóticas aumenta a secreção de TGF- β e IL-10 (1658 \pm 420,1

pg/mL de TGF- β e $2333 \pm 959,5$ pg/mL de IL-10) quando comparado ao controle não estimulado ($112,7 \pm 39,08$ pg/mL de TGF- β e $185,1 \pm 54,07$ pg/mL de IL-10). Já nos macrófagos M ϕ 2 a fagocitose de células apoptóticas em resposta ao *M. leprae* aumenta significativamente a secreção de TNF- α , TGF- β , e IL-12 ($649,5 \pm 178,3$ pg/mL de TNF- α , $1488 \pm 367,9$ pg/mL de TGF- β , e $409,8 \pm 44,67$ pg/mL de IL-12) em relação ao controle ($126,4 \pm 27,17$ pg/mL de TNF- α e $119,1 \pm 27,82$ pg/mL de TGF- β , $296,4 \pm 68,93$ pg/mL de IL-10 e $127,6 \pm 31,12$ pg/mL de IL-



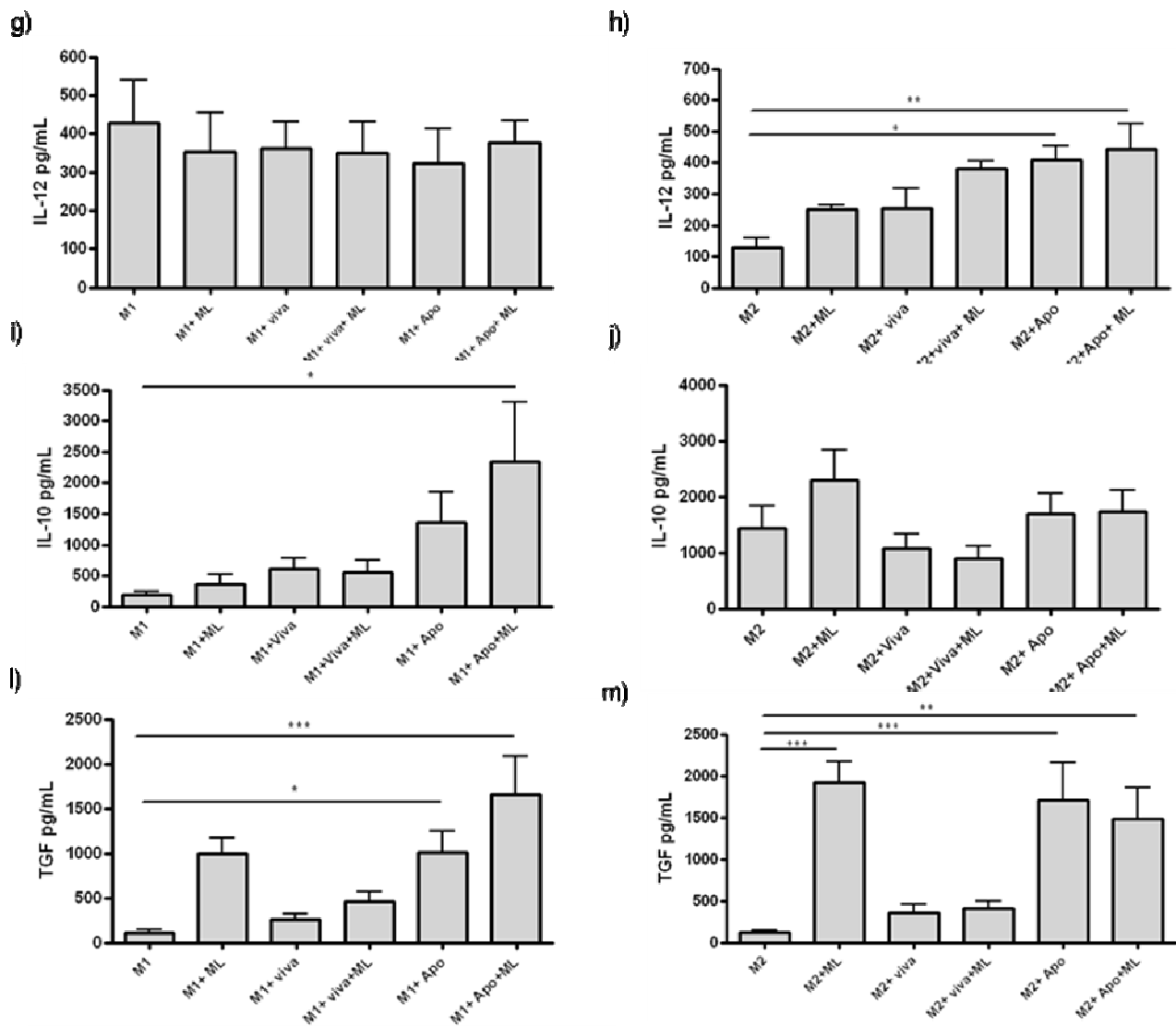


Figura 16. A fagocitose de células apoptóticas por macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2 modula diferentemente a secreção de citocinas em resposta ao *M. leprae*. Macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2 estimulados com *M. leprae* (ML, MOI 10:1) foram cultivados na presença ou não de células vivas ou em apoptose (Apo) por 20 horas. Os gráficos representam as médias e erros padrões das concentrações de IL-6, TNF- α , IL-12, IL-15, TGF- β e IL-10 (pg/mL), determinadas por ELISA, nos sobrenadantes de culturas de macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2 em 8 experimentos independentes.

A capacidade de microorganismos patogênicos de modular as vias de apoptose nas células do hospedeiro tem se revelado como um mecanismo bastante difundido utilizado para o estabelecimento bem sucedido da infecção [237,238]. A modulação da maquinaria apoptótica durante infecções bacterianas e virais é um mecanismo bem estabelecido que favorece a sobrevivência das células afetadas [239]. Por outro lado, em alguns modelos infecciosos como na tuberculose, tem sido mostrado que na infecção *in vitro* com *M. tuberculosis* ou estimulação com PPD, monócitos de indivíduos TST⁺ entram em apoptose, enquanto monócitos de pacientes com tuberculose pulmonar desenvolvem tanto apoptose quanto necrose [240,241]. Estudos recentes demonstraram que a indução de apoptose pelo *M. tuberculosis* é dependente da via TLR2/TLR4/MyD88/p38/ERK/PI3-kinase [242].

A questão se a morte celular apresenta função fisiológica durante a infecção é um passo chave na compreensão das interações célula hospedeira-patógeno e a patogênese da doença de modo a estabelecermos possíveis estratégias para o controle de doenças infecciosas.

Estudos anteriores sugerem que a produção de TNF- α em resposta ao *M. leprae* pode contribuir para a patologia da hanseníase [243,244]. No entanto, os mecanismos intracelulares que levam à resposta de citocinas induzida pela micobactéria não estão completamente caracterizados. Estudos anteriores de nosso grupo demonstraram que o *M. leprae* induz apoptose de monócitos humanos de forma dose-dependente e o TNF α parece ser o mediador deste processo, pois o tratamento das culturas com pentoxifilina inibiu a apoptose nestas células [195]. Em adição, a secreção de TNF α é crucial para a imunidade contra infecções bacterianas e possui um importante papel na formação do granuloma. Entretanto, quando produzido em excesso pode causar dano neural e tecidual, fenômeno freqüentemente observado na hanseníase e seus episódios reacionais. Portanto a regulação desta citocina é de grande

importância para a redução da inflamação observada nesse período. Durante o desenvolvimento da minha tese de mestrado, foi observado que proteossoma desempenha um importante papel na apoptose e na secreção de TNF- α induzidos por *M. leprae* em monócitos [155]. A regulação da transcrição do gene que codifica TNF α envolve a ativação de membros da família NF- κ B. Quando organizados em homo ou heterodímeros, os membros desta família (p50, p52, p65, RelB e c-Rel) podem atuar como fatores de transcrição. Para isso, os dímeros precisam ser translocados para o núcleo, onde se ligam a seqüências polinucleotídicas consenso localizadas na região promotora do gene a ser regulado [70].

Foi demonstrado por Pereira e colaboradores (2005) que o *M. leprae* induz a translocação nuclear de dois dímeros de NF- κ B (p65-p50 e p50-p50) em células de Schwann em um mecanismo dependente da atividade do proteossoma e que o tratamento com talidomida foi capaz de inibir a translocação do homodímero p50/p50 [67].

No presente estudo, nós investigamos o envolvimento do NF- κ B na secreção de TNF- α induzida por *M. leprae*. E, sabendo da importância dessa citocina na indução de apoptose em pacientes com hanseníase, nós também avaliamos o impacto da remoção das células apoptóticas por macrófagos e suas implicações no estabelecimento das diferentes formas clínicas da hanseníase.

Nossos resultados apontam para uma participação do NF- κ B na apoptose e secreção de citocinas em células estimuladas com *M. leprae*. Primeiramente, os ensaios de retardo da mobilidade eletroforética (EMSA) mostraram que o *M. leprae*, em baixo MOI 2:1 já foi capaz de induzir a translocação das subunidades p65 e p50 de NF- κ B em PBMC de controles saudáveis, sugerindo a translocação e ligação ao DNA do heterodímero p65/p50 e do homodímero p50/p50. Em seguida, a translocação de NF- κ B em monócitos foi avaliada por citometria de fluxo. Em conjunto, o papel da talidomida nesse processo foi avaliado. A talidomida é conhecida por sua

capacidade de inibir citocinas pró-inflamatórias e a sua capacidade de modular a secreção de TNF- α está fortemente associada ao seu mecanismo de ação [243,245].

Foi observado que o *M. leprae* induz a ativação do NF- κ B em monócitos humanos e que a talidomida pode suprimir a indução de NF- κ B pela micobactéria *in vitro*. A capacidade da talidomida de diminuir a translocação de NF- κ B induzida pelo *M. leprae* parece explicar o potente efeito inibitório desta droga no controle das manifestações inflamatórias da hanseníase. Uma vez que os dados anteriores do nosso grupo demonstraram que a talidomida inibe o complexo p50/p50 e inibe a repressão da transcrição gênica induzidos pelo *M. leprae* em células de Schwann, estes resultados sugerem que o efeito inibitório da talidomida sobre a estimulação com *M. leprae* não é específico a um determinado tipo celular.

O efeito da talidomida sobre o NF- κ B não foi observado em resposta ao LPS [246] e PMA [247]. Isto sugere que a capacidade da droga de modular a expressão gênica através da supressão de NF- κ B pode estar associada a via induzida pelo estímulo [247]. No entanto, um estudo mais recente descreveu que a talidomida inibe a produção de TNF- α e a ativação de NF- κ B em células RAW 264.7 através da inibição da fosforilação de I κ B quinase, via regulação negativa de MyD88 [66].

Foi realizado o ensaio utilizando o "reporter" da Luciferase que permite avaliar o efeito que uma seqüência regulatória de um determinado gene, artificialmente inserido à montante de um outro gene (chamado de "repórter"), exerce sobre o nível de transcrição deste último. Nossos resultados mostraram que o *M. leprae* aumenta a atividade transcricional de NF- κ B e que a talidomida inibe a atividade deste fator de transcrição em THP-1 estimulados com *M. leprae*. A via ubiquitina-proteossoma controla diversos processos celulares e modula a regulação de NF- κ B através do processamento proteolítico de precursores de NF- κ B, poliubiquitinação e degradação de I κ B- α . No presente estudos nós observamos que a inibição do proteossoma

reduziu a atividade de NF- κ B em resposta ao *M. leprae*, e isso parece estar associado a baixa produção de citocinas descritas anteriormente [155].

Uma vez que observamos que o *M. leprae* induz a atividade de NF- κ B, fomos investigar o envolvimento deste fator de transcrição na apoptose e na secreção de TNF- α induzidos por *M. leprae* em monócitos. Para isso, monócitos foram pré-tratados com o inibidor de NF- κ B, SN50 ou seu análogo sem função ativa, o SN50m e estimulados com *M. leprae* por 20 horas. A apoptose foi avaliada por citometria de fluxo e a secreção de TNF- α por ELISA. Os resultados obtidos através da marcação das células com anexina V-FITC e PI sugerem a participação do NF- κ B na apoptose induzida por *M. leprae*, demonstrada pela inibição do percentual de células em apoptose nas culturas tratadas com SN50 e estimuladas com a bactéria. No entanto, mais experimentos precisam ser realizados para confirmar a participação deste fator de transcrição na apoptose induzida por *M. leprae*. Na secreção de TNF- α , a participação do NF- κ B foi mais evidente, pois o tratamento com SN50 inibiu completamente a secreção de TNF- α em resposta ao *M. leprae*. Adicionalmente, na presença do peptídeo inativo a secreção de TNF- α em resposta ao micobactéria não foi alterada. Em conjunto, tais dados indicam que o *M. leprae* induz a produção de TNF- α e apoptose de monócitos por um mecanismo dependente de NF- κ B.

Vários tipos de bactérias ativam uma série de vias de sinalização quando entram em contato com os receptores de membrana dos macrófagos. Essas vias iniciam a produção de citocinas, quimiocinas e metabólitos antimicrobianos que são importantes no controle dessas infecções. Uma das principais vias de sinalização envolvidas no processo inflamatório e na atividade antimicrobiana é a via das MAP quinases. A sinalização por esta via resulta na ativação de vários fatores de transcrição, incluindo o NF- κ B [248].

Trabalhos já demonstraram que micobactérias como o *M. avium* induzem uma rápida fosforilação das três subfamílias de MAP quinases, no entanto na presença de inibidores de p38

a secreção de IL-10 foi completamente extinguida [245]. Também já foi demonstrado que a talidomida inibe a fosforilação de Akt, p38 e JNK induzidos por LPS [66]. No entanto, a via de sinalização envolvida no efeito anti-TNF da talidomida em células estimuladas com *M. leprae* não foi bem estabelecido. Para avaliar o envolvimento da via de MAPK nesse processo, monócitos foram pré-tratados com talidomida e estimulados com *M. leprae* por 30 e 90 minutos, respectivamente. Os extratos celulares foram avaliados por western blot. Nós observamos que o *M. leprae* induz um aumento da fosforilação de p38 em 30 minutos e que o tratamento com talidomida reduz a fosforilação desta proteína em níveis basais. A estimulação das células com *M. leprae* por 90 minutos não alterou a fosforilação de p38, o que nos sugere que a ativação da via p38 MAPK ocorre nos primeiros 30 minutos após o estímulo com *M. leprae*. Esses dados indicam que a talidomida inibe a secreção de TNF- α em monócitos estimulados com *M. leprae* por uma via dependente de p38 MAPK.

Estudos anteriores mostraram que células de pacientes do pólo tuberculóide da hanseníase possuem um maior percentual de células em apoptose e maiores níveis de TNF- α circulantes quando comparados às células de pacientes do pólo lepromatoso [190,191]. Uma vez que o *M. leprae* induz apoptose em monócitos e que pacientes paucibacilares apresentam elevados percentuais de células T em apoptose, fomos investigar o papel da fagocitose de células apoptóticas na patogênese da hanseníase.

Os macrófagos são os alvos preferidos para infecção de patógenos intracelulares, incluindo as micobactérias. Eles possuem um papel duplo na defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas ainda pouco conhecido. Os macrófagos contribuem para a imunidade celular e eliminação bacteriana, mas também proporcionam um ambiente essencial nos quais a micobactéria sobrevive e escapa dos mecanismos de defesa do hospedeiro.

Foi demonstrado que macrófagos diferenciados na presença de GM-CSF, identificados como M ϕ 1 promovem a imunidade celular, são microbicidas e pró-inflamatórios. Por outro lado,

macrófagos diferenciados na presença de M-CSF ou M ϕ 2 são incapazes de ativar as células T CD4⁺, mesmo depois do tratamento dessas células com o ligante de CD40 e IFN- γ [153].

Os macrófagos M ϕ 2 produzem citocinas anti-inflamatórias e expressão em sua superfície moléculas como o receptor de manose (CD206) e o receptor *scavenger* de hemoglobina, o CD163 [103]. Tanto o GM-CSF quanto o M-CSF são fatores de crescimento essenciais, não só para a geração de macrófagos *in vitro*, mas também para a diferenciação de macrófagos *in vivo*. Camundongos Op/Op não produzem M-CSF e desenvolvem uma deficiência profunda nos macrófagos que pode ser parcialmente corrigida pela implantação de câmaras de difusão contendo células produtoras de M-CSF [250], confirmando que o M-CSF é crucial para diferenciação dos macrófagos. Já camundongos *knockout* para GM-CSF não apresentam deficiências importantes nos macrófagos, embora eles sejam menores do que o normal [251,252]. Em condições normais, o M-CSF é o único fator de crescimento de macrófagos detectável no sangue [154]. Em contrapartida, o GM-CSF é geralmente visto como uma citocina pró-inflamatória envolvida na inflamação e é dificilmente detectável em circulação [253]. Assim, sobre condições normais, o M-CSF pode ser a citocina responsável pela diferenciação dos macrófagos.

Os macrófagos residentes são heterogêneos no que diz respeito aos aspectos funcionais [254], portanto, para estudar o papel da fagocitose de células apoptóticas nós resolvemos utilizar os macrófagos M ϕ 1 e os macrófagos M ϕ 2 para tentar mimetizar as condições observadas nos pacientes com hanseníase. Dados recentes de nosso grupo sugerem que macrófagos provenientes de biópsias de pele de pacientes lepromatosos apresentam fenótipo similar ao de macrófagos ativados pela via alternativa (M ϕ 2), com elevada expressão de CD163, CD206 e CD209. Ao contrário, macrófagos de pacientes tuberculóides apresentam fenótipo equivalente ao de macrófagos classicamente ativados (M ϕ 1) (D.F de Moura dados não publicados).

Verreck e colaboradores (2004) observaram que macrófagos M ϕ 1 secretam IL-12 e IL-23 após estímulo com LPS ou *M. tuberculosis* e macrófagos M ϕ 2 secretam IL-10 na presença destes estímulos em comparação a M ϕ 1 ou células dendríticas [103]. Tendo como base esse trabalho, a secreção das citocinas IL-12 e IL-10 por macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2 estimulados ou não com *M. leprae* foi avaliada por ELISA. Os nossos resultados mostraram que os macrófagos M ϕ 1 secretam mais IL-12p40 e os macrófagos M ϕ 2 produzem mais IL-10, corroborando os dados obtidos por Verreck e colaboradores (2004) [103]. Outras citocinas como TNF- α , IL-6, TGF- β e IL-15 também foram avaliadas, no entanto não foram observadas diferenças na produção dessas citocinas quando comparamos macrófagos M ϕ 1 não estimulados ou estimulados com *M. leprae* a macrófagos M ϕ 2 nestas mesmas condições.

Makino e colaboradores (2007) também mostraram que macrófagos M ϕ 2 secretam mais IL-10 em resposta ao *M. leprae* quando comparado aos M ϕ 1. No entanto, eles não observaram alterações na secreção de IL-12 e sim na produção de TNF- α . Essas diferenças poderiam ser explicadas pela quantidade de *M. leprae* usado [153]. Nos nossos experimentos foram utilizadas 10 bactérias para cada célula, no entanto esse trabalho usou 20 e 40 bactérias para cada célula. As cepas usadas também foram diferentes assim como a técnica para diferenciar os macrófagos.

Estudos utilizando células em apoptose demonstraram que macrófagos M ϕ 2 têm maior capacidade de se ligar a 4°C e de fagocitar a 37°C células em apoptose do que macrófagos M ϕ 1 [255]. Além disso, já foi evidenciado por Verreck e colaboradores (2004) que M ϕ 2 internalizam mais BCG do que M ϕ 1 [103], no entanto, Makino e colaboradores (2007), mostraram não haver diferença na internalização de BCG por estes dois tipos de macrófagos [153].

Nossos resultados mostraram que macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2 são capazes de internalizar o *M. leprae*, porém macrófagos M ϕ 2 têm uma maior capacidade fagocítica quando comparado aos

macrófagos M ϕ 1, o que corrobora com os resultados mostrados por Verreck e colaboradores em relação ao BCG [103]. Tais achados reforçam a hipótese de que pacientes tuberculóides - paucibacilares - apresentam predomínio de macrófagos M ϕ 1 nas lesões enquanto pacientes lepromatosos - multibacilares- apresentam predomínio de macrófagos M ϕ 2 nas lesões.

Vários trabalhos já associaram a fagocitose de células apoptóticas com a internalização de microorganismos. A indução da apoptose de linfócitos por *T. cruzi* e a fagocitose das células apoptóticas por macrófagos aumenta a pré-disposição ao parasita. Sugerindo que a fagocitose de células apoptóticas possui um papel na persistência da doença [227]. De forma semelhante, a *Leishmania sp.* infecta neutrófilos que entram em apoptose e são fagocitados por macrófagos. Essas células em apoptose funcionariam como um “Cavalo de Tróia”, pois o reconhecimento do neutrófilo apoptótico evita o contato do parasita com os receptores do macrófago e a *Leishmania* consegue chegar a seu hospedeiro final, o macrófago, resultando no estabelecimento da infecção [226,256]. Por outro lado, o tratamento de células com cepas de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de piocianina compromete a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos. Sugerindo que essa bactéria possa manipular o microambiente inflamatório através da inibição da remoção de células apoptóticas [257].

Em nosso modelo nós verificamos que a presença de células apoptóticas favorece a associação do *M. leprae* à célula hospedeira. Macrófagos M ϕ 2 internalizam mais *M. leprae* do que macrófagos M ϕ 1, no entanto, na presença de células apoptóticas os macrófagos M ϕ 1 apresentaram aumento no percentual de associação do *M. leprae* superior ao observado em macrófagos M ϕ 2. Então, em seguida nós fomos avaliar se os macrófagos que internalizaram o *M. leprae* também foram capazes de fagocitar as células em apoptose. Nós observamos que os macrófagos M ϕ 2 fagocitam mais células em apoptose e *M. leprae* quando comparado aos macrófagos M ϕ 1 nas mesmas condições. Cabe ressaltar que tanto em macrófagos M ϕ 1 quanto em M ϕ 2 a presença do *M. leprae* reduziu a fagocitose de células apoptóticas. Portanto, a

remoção e a internalização do *M. leprae* não depende da célula hospedeira ter fagocitado a célula em apoptose, mas parece ser influenciado pelo ambiente gerado pela remoção das células apoptóticas do sistema.

No sistema *in vitro* aqui estabelecido os macrófagos parecem receber dois estímulos distintos: um pró-inflamatório gerado pela bactéria, e outro anti-inflamatório gerado pela remoção das células em apoptose. O balanço deste dois sinais é o resultante do curso da infecção em humanos e pode ser mimetizada *in vitro*. A inflamação é desencadeada pela liberação de mediadores químicos originados dos tecidos lesados, que provocam distúrbios na membrana celular ocasionando a ativação da fosfolipase A_2 e liberação do ácido araquidônico [258]. O ácido araquidônico, quando liberado, não tem ação inflamatória, entretanto, os produtos de sua degradação, são mediadores fundamentais para o desenvolvimento do processo inflamatório [259]. A oxidação do ácido araquidônico pode ser realizada por duas vias enzimáticas: cicloxigenase (também conhecida como PGH sintetase) e a lipoxigenase [259]. A ação do sistema enzimático da cicloxigenase sobre os fosfolípidios de membrana converte o ácido araquidônico em uma prostaglandina endoperóxida estável (PGG_2), que é subseqüentemente reduzida para PGH_2 . Esta então pode ser usada como substrato para sintetizar várias prostaglandinas, como a PGE_2 , PGD_2 , $PGF_{2\alpha}$. A PGH_2 pode ser ainda convertida em prostacilinas (PGI_2) ou tromboxano (TXA_2) [260].

Por muito tempo, somente um tipo de enzima cicloxigenase era conhecido, mas verificou-se a existência de pelo menos dois tipos de cicloxigenases, que determinam no organismo funções fisiológicas diferentes, sendo referidas então, como COX-1 (constitutiva) e COX-2 (induzida) [260,261]. A COX-1 é uma enzima que precisa estar disponível e funcional no organismo. Ela produz prostaglandinas responsáveis pela função fisiológica de citoproteção gástrica, manutenção da homeostase renal e da função plaquetária [262]. Diferentemente, a COX-2 é indetectável na maioria dos tecidos, mas pode ser expressa em resposta a certos

estímulos, tais como a presença de citocinas (IL-1 e TNF- α), fatores de crescimento (fator de crescimento epidermal – EGF e fator de crescimento de fibroblastos – FGF), endotoxinas bacterianas e oncogenes [263,264].

Na hanseníase já foi demonstrado que as lesões dos pacientes lepromatosos apresentam um aumento de COX-2 quando comparado às lesões dos pacientes tuberculóides [236]; além disso, estudos anteriores demonstraram que monócitos infectados de pacientes lepromatosos, mas não de pacientes tuberculóides, liberam mediadores como IL-10 e PGE₂ [172], sugerindo que altas concentrações de PGE₂ produzidas por COX-2 em pacientes LL poderiam inibir a produção de citocinas inflamatórias, contribuindo para a anergia celular antígeno-específica observada nestes pacientes.

Nossos resultados mostram que os macrófagos M ϕ 2 possuem aumento na expressão gênica de COX-2 em resposta ao *M. leprae*, o que não ocorre quando há estímulo em conjunto com células apoptóticas. Ao contrário, em macrófagos M ϕ 1 o *M. leprae* sozinho não foi capaz de induzir aumento da expressão gênica de COX-2, apenas após o estímulo conjunto com células apoptóticas. Tais dados sugerem que macrófagos M ϕ 2, naturalmente supressores, não são tão afetados pelo estímulo com a célula apoptótica quanto macrófagos M ϕ 1.

Estudos anteriores demonstraram que os corpúsculos lipídicos são inclusões preenchidas principalmente por triglicerídeos e ésteres de colesterol, sendo também depósitos intracelulares de ácido araquidônico (AA) [265]. A participação de corpúsculos lipídicos na geração eicosanóides por células hematopoiéticas é suportada pela localização de proteínas envolvidas na cascata metabólica do AA e co-localização do produto final desta via, a prostaglandina E₂ (PGE₂). A PGE₂ é o principal metabólito do AA sendo um potente mediador capaz de modular a sobrevivência celular, proliferação celular e angiogênese [265,266].

Em infecções micobacterianas, foi recentemente demonstrado que o BCG, mas não o *M. smegmatis*, induz um aumento na formação de corpúsculos lipídicos mediado pelo

reconhecimento do BCG pelo TLR-2. Em adição também foi demonstrado que os corpúsculos formados eram os principais sítios de produção de PGE₂ em macrófagos ativados por BCG [267,268], sugerindo que os corpúsculos lipídicos possuem um papel fundamental na inflamação e imunidade. Na hanseníase, foi recentemente observado um aumento de corpúsculos lipídicos nos macrófagos das lesões LL, sugerindo um envolvimento desta organela na biosíntese de PGE₂ e patogênese da hanseníase [269]. Uma das características clássicas da hanseníase é o acúmulo de lipídios em lesões de pacientes LL quando comparado às lesões de pacientes TT [270,271]. Porém, não se sabia se essa produção de lipídios era proveniente da bactéria ou do hospedeiro. Um estudo recente mostrou que o acúmulo de lipídios nas lesões de pacientes LL é resultado do metabolismo dos macrófagos. Esse mesmo estudo evidenciou que estes lipídios eram capazes de regular negativamente a resposta imune inata [191], sugerindo que este acúmulo nas células infectadas possa favorecer o crescimento bacteriano e a persistência do *M. leprae* no hospedeiro. No modelo murino, Mattos e colaboradores (2010) demonstraram uma correlação entre a formação de corpúsculos lipídicos e a produção de prostaglandina E₂ (PGE₂), indicando que os corpúsculos lipídicos induzidos pelo *M. leprae* constituem sítios intracelulares para síntese eicosanóides [269]. Nossos dados de microscopia eletrônica demonstraram aumento de corpúsculos lipídicos em macrófagos Mφ1 estimulados com *M. leprae* e células apoptóticas, sugerindo possível participação de mediadores lipídicos na modulação da resposta por células apoptóticas em macrófagos Mφ1 (dados não mostrados). Para confirmar o envolvimento de mediadores lipídicos na modulação da resposta fomos avaliar a produção de PGE₂ em macrófagos estimulados com *M. leprae* na presença ou não de células apoptóticas. Corroborando os dados anteriores da literatura, na presença de *M. leprae* e células apoptóticas verificamos um aumento da produção de PGE₂ em macrófagos Mφ1 e Mφ2. Além disso, nos macrófagos Mφ2 o *M. leprae* sozinho já foi capaz de induz aumento de PGE₂.

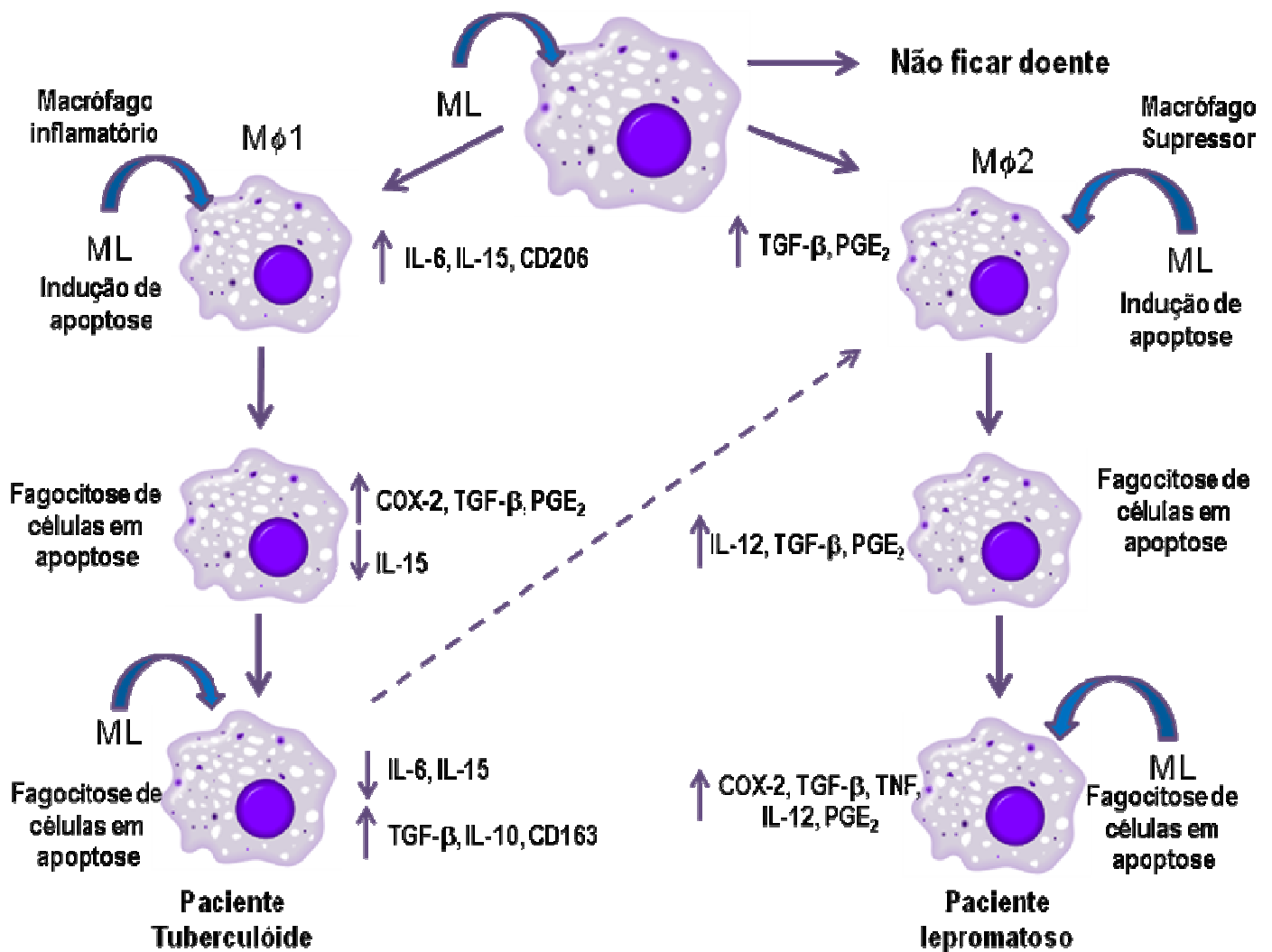
O papel da fagocitose de células apoptóticas por macrófagos na modulação do fenótipo de M ϕ 1 e M ϕ 2 e na secreção de citocinas também foi investigado. Em macrófagos M ϕ 1 o estímulo com células apoptóticas e *M. leprae* aumentou a expressão do receptor *scavenger* CD163, presente em macrófagos M ϕ 2, sugerindo que o estímulo com *M. leprae* na presença de células apoptóticas está alterando o fenótipo funcional dos macrófagos. Já que foi demonstrado por diversos trabalhos que o CD163 é um receptor específico de macrófagos M ϕ 2 [272,273,274]. Para validarmos essa hipótese, fomos avaliar a produção de citocinas nessas culturas. Em nosso modelo nós observamos que a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos M ϕ 1 aumenta a secreção de TGF- β em relação ao controle não estimulado e reduz a secreção de IL-15 em relação aos macrófagos estimulados com *M. leprae*. Já a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos M ϕ 2 reduz a secreção de IL-12p40 e aumenta a secreção de TGF- β em relação às culturas não estimuladas.

A fagocitose de células apoptóticas por macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2 em resposta ao *M. leprae* também mostrou resultados interessantes. Na presença do *M. leprae* a remoção de células apoptóticas por macrófagos M ϕ 1 resultou em uma redução da secreção de IL-6 e IL-15 e um aumento da produção de IL-10 e TGF- β . Nos macrófagos M ϕ 2 a fagocitose de células apoptóticas em resposta ao *M. leprae* aumentou os níveis de TNF- α , IL-12p40 e TGF- β .

Estudos anteriores demonstraram aumento da expressão de IL-15 mRNA e proteína em macrófagos de pacientes tuberculóides quando comparados aos macrófagos de pacientes lepromatosos [275]. A IL-15 produzidas por células infectadas *in situ* pode representar uma das citocinas chave envolvidas na formação do granuloma e pode aumentar as respostas imunes celulares direcionadas contra antígenos micobacterianos [276]. Uma vez que os macrófagos diferenciados *in vitro* com GM-CSF possuem aumento dos níveis de IL-15, esses dados reforçam a nossa hipótese de que esses macrófagos M ϕ 1 mimetizam o fenótipo dos macrófagos encontrados nos pacientes tuberculóides. O balanço entre as citocinas pró e anti-inflamatórias na

hanseníase tem sido bastante explorado. Montoya e colaboradores (2009) demonstraram que a IL-10 é a citocina associada à via fagocítica enquanto a IL-15 participa da via antimicrobiana dependente de vitamina D nas infecções por *M. leprae* [159]. O estímulo com células apoptóticas em macrófagos M ϕ 1 na presença ou não do *M. leprae* foi capaz de reduzir os níveis de IL-15 levando ao aumento de TGF- β , sugerindo que em pacientes tuberculóides o aumento percentual de células apoptóticas contribua para uma possível reversão do fenótipo desses macrófagos, o que permite que mesmo na presença de resposta imune celular, a infecção se estabeleça. Na presença do *M. leprae*, o estímulo com células apoptóticas aumentou os níveis de IL-10, sugerindo polarização para a via fagocítica nestes macrófagos. Apesar de dados anteriores demonstrarem que a síntese de IL-6 após o estímulo com célula apoptótica ser pouco afetado, nós observamos uma redução nos níveis de IL-6 em macrófagos M ϕ 1 estimulados com célula apoptótica e *M. leprae* (Esquema 1). Por outro lado, os macrófagos M ϕ 2, naturalmente anti-inflamatórios, parecem sofrer pouca influência sob estímulo da célula apoptótica, tendo sido observado aumento da citocina TGF- β na presença ou ausência de *M. leprae*.

Em conjunto, nossos dados demonstram que o *M. leprae* induz a apoptose em monócitos de forma dependente de TNF- α por um mecanismo dependente de NF- κ B. A talidomida utilizada no controle do ENL diminui os níveis de TNF- α induzidos pelo *M. leprae* ao suprimir as vias de ativação de NF- κ B e p38 MAPK. Em paralelo, a remoção de células apoptóticas em macrófagos M ϕ 1 estimulados com o *M. leprae* leva a mudança de um macrófago pró-inflamatório, com capacidade de produzir IL-6 e IL-15 em resposta a infecção, para um macrófago produtor de mediadores anti-inflamatórios, como PGE₂, IL-10 e TGF- β . Tais dados, em conjunto, sugerem que a apoptose induzida pelo *M. leprae* contribui para a formação de microambiente favorável ao estabelecimento da infecção em pacientes tuberculóides e migração dos pacientes do pólo tuberculóide para o pólo lepromatoso.



Esquema 1. Resumo dos mecanismos imunoregulatórios envolvidos na resposta de macrófagos Mφ1 e Mφ2 ao *M. leprae* na presença ou não de células em apoptose. Em macrófagos Mφ1 a remoção de células em apoptose leva ao aumento da expressão gênica de COX-2, que é acompanhada por um aumento de PGE₂ e da citocina imunorregulatória TGF-β. Em adição, a remoção de células apoptóticas por macrófagos Mφ1 leva a redução da citocina IL-15, previamente descrita como participando de atividade microbicida de macrófagos. O estímulo com o *M. leprae* na presença de células apoptóticas em macrófagos Mφ1 parece levar a mudança de fenótipo, com aumento da expressão do receptor scavenger CD163 (marcador de macrófagos Mφ2) e aumento de citocinas imunorregulatórias como TGF-β e IL-10. Macrófagos Mφ2, naturalmente supressores (TGF-β, PGE₂), na presença de células em apoptose, com ou sem o estímulo com o *M. leprae*, não alteram o seu fenótipo funcional.

CONCLUSÕES

- O *M. leprae* induz a translocação nuclear de NF- κ B em PBMC e monócitos;
- O inibidor de proteossoma MG132 e a talidomida inibem a translocação de NF- κ B em monócitos estimulados com o *M. leprae*;
- A talidomida reduz a atividade de NF- κ B em resposta ao *M. leprae*;
- A inibição do NF- κ B parece reduzir a apoptose induzida por *M. leprae* em monócitos;
- A inibição da subunidade p50 de NF- κ B reduz a secreção de TNF α e a translocação de p65 em monócitos estimulados com *M. leprae*;
- A talidomida reduz a fosforilação de p38 em monócitos estimulados com *M. leprae*;
- Macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2 possuem diferenças morfológicas, expressam moléculas de superfície e secretam citocinas diferentes;
- Macrófagos M ϕ 2 são mais fagocíticos do que macrófagos M ϕ 1;
- A presença de células em apoptose favorece a internalização do *M. leprae*;
- A fagocitose de células apoptóticas aumenta a expressão de COX-2 em macrófagos M ϕ 1 e a secreção de PGE₂ em macrófagos M ϕ 1 e M ϕ 2;
- A fagocitose de células apoptóticas em resposta ao *M. leprae* aumenta a expressão de CD163 em macrófagos M ϕ 1;
- A fagocitose de células apoptóticas na presença do *M. leprae* por macrófagos M ϕ 1 reduz a secreção de IL-6 e IL-15 e aumenta a secreção de TGF- β e IL-10.
- A fagocitose de células apoptóticas por macrófagos M ϕ 2 aumenta os níveis de TNF- α e IL-12 em resposta ao *M. leprae*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lockwood D. Leprosy. *Clin Evid*. 2004 Dez;(12):1103-1114.
2. Jopling WH. Clinical aspects of leprosy. *Tubercle*. 1982 Dez;63(4):295-305.
3. Godal T, Lofgren M, Negassi K. Immune response to *M. leprae* of healthy leprosy contacts. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis*. 1972 Set;40(3):243-250.
4. FIOCRUZ. 2008. RADIS. Comunicação em saúde. Ediouro gráfica e Editora S.A. Nº68 p. 10.
5. WHO, 2008. Global leprosy situation, beginning of 2008. p.293.
6. Britton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. *Lancet*. 2004 Abr 10;363(9416):1209-1219.
7. Bloom BR. Learning from leprosy: a perspective on immunology and the Third World. *J. Immunol*. 1986 Jul 1;137(1):i-x.
8. Rees RJ. LEPROA's elective period student programme, 1973-1983. *Lepr Rev*. 1984 Dez;55(4):321-325.
9. WHO, 1987. Laboratory techniques for leprosy. p.62.
10. Hunter SW, Brennan PJ. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. *J. Bacteriol*. 1981 Set;147(3):728-735. Martinet W, Kockx MM. Apoptosis in atherosclerosis: focus on oxidized lipids and inflammation. *Curr. Opin. Lipidol*. 2001 Out;12(5):535-541.
11. Hunter SW, Stewart C, Brennan PJ. Purification of phenolic glycolipid I from armadillo and human sources. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis*. 1985 Set;53(3):484-486
12. Cho SN, Yanagihara DL, Hunter SW, Gelber RH, Brennan PJ. Serological specificity of phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. *Infect. Immun*. 1983 Sep;41(3):1077-1083.
13. Vissa VD, Brennan PJ. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. *Genome Biol*. 2001;2(8):REVIEWS1023.
14. Hansen GHA (1874). "Undersøgelser Angående Spedalskhedens Årsager (Investigations concerning the etiology of leprosy)" (in Norwegian). *Norsk Mag. Laegervidenskaben* 4: pp. 1-88.
15. Shepard CC. Multiplication of *Mycobacterium leprae* in the foot-pad of the mouse. *Int J Lepr*. 1962 Set;30:291-306.
16. Kirchheimer WF, Storrs EE. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis*. 1971 Set;39(3):693-702.
17. Cole ST, Supply P, Honoré N. Repetitive sequences in *Mycobacterium leprae* and their impact on genome plasticity. *Lepr Rev*. 2001 Dec;72(4):449-461.

18. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 1966 Set;34(3):255-273.
19. Walker SL, Lockwood DNJ. Leprosy type 1 (reversal) reactions and their management. *Lepr Rev.* 2008 Dec;79(4):372-386.
20. Mitsuda K The significance of skin tests using leprosy nodule extracts. *Jpn J Dermatol Urolog*19, 8, 1919.
21. Narayan NP, Ramu G, Desikan KV, Vallishayee RS. Correlation of clinical, histological and immunological features across the leprosy spectrum. *Indian J Lepr.* 2001 Dez;73(4):329-342.
22. Lastoria LC, Opromolla DV, Fleury RN, Habermann F, Curi PR. Serial Mitsuda tests for identification of reactional tuberculoid and reactional borderline leprosy forms. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 1998 Jun;66(2):190-200.
23. de Souza FC, Marcos EVC, Ura S, Opromolla PA, Nogueira MES. [Comparative study between the Mitsuda test and the human leukocyte antigens in leprosy patients]. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2007 Abr;40(2):188-191.
24. Hastings RC. MDT and transmission. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 1998 Jun;66(2):224.
25. Naafs B. Leprosy reactions. New knowledge. *Trop Geogr Med.* 1994;46(2):80-84.
26. Cuevas J, Rodríguez-Peralto JL, Carrillo R, Contreras F. Erythema nodosum leprosum: reactional leprosy. *Semin Cutan Med Surg.* 2007 Jun;26(2):126-130.
27. Jih MH, Kimyai-Asadi A, Levis WR. Reversal reaction to Hansen's disease. *J Drugs Dermatol.* 2002 Jul;1(1):70-71.
28. Van Brakel WH, Khawas IB, Lucas SB. Reactions in leprosy: an epidemiological study of 386 patients in west Nepal. *Lepr Rev.* 1994 Sep;65(3):190-203.
29. Yamamura M, Wang XH, Ohmen JD, Uyemura K, Rea TH, Bloom BR, et al. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. *J. Immunol.* 1992 Aug 15;149(4):1470-1475.
30. Moraes MO, Sarno EN, Almeida AS, Saraiva BC, Nery JA, Martins RC, et al. Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon-gamma and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). *Scand. J. Immunol.* 1999 Nov;50(5):541-549.
31. Pocaterra L, Jain S, Reddy R, Muzaffarullah S, Torres O, Suneetha S, et al. Clinical course of erythema nodosum leprosum: an 11-year cohort study in Hyderabad, India. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006 Maio;74(5):868-879.
32. Manandhar R, LeMaster JW, Roche PW. Risk factors for erythema nodosum leprosum. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 1999 Sep;67(3):270-278.
33. Pfaltzgraff RE, Ramu G. Clinical leprosy. In: Hastings RC (ed). *Leprosy*, 2nd edn. Edinburgh:
34. Barnes PF, Chatterjee D, Brennan PJ, Rea TH, Modlin RL. Tumor necrosis factor production in patients with leprosy. *Infect. Immun.* 1992 Apr;60(4):1441-1446.

35. Singh S, Narayanan NP, Jenner PJ, Ramu G, Colston MJ, Prasad HK, et al. Sera of leprosy patients with type 2 reactions recognize selective sequences in *Mycobacterium leprae* recombinant LSR protein. *Infect. Immun.* 1994 Jan;62(1):86-90.
36. Sampaio EP, Sarno EN. Expression and cytokine secretion in the states of immune reactivation in leprosy. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1998 Jan;31(1):69-76.
37. Ustianowski AP, Lockwood DNJ. Leprosy: current diagnostic and treatment approaches. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2003 Oct;16(5):421-427.
38. Walker SL, Waters MFR, Lockwood DNJ. The role of thalidomide in the management of erythema nodosum leprosum. *Lepr Rev.* 2007 Sep;78(3):197-215.
39. Dredge K, Marriott JB, Dalgleish AG. Immunological effects of thalidomide and its chemical and functional analogs. *Crit. Rev. Immunol.* 2002;22(5-6):425-437.
40. Chong L, Hsu Y, Chiu Y, Yang K, Huang Y. Anti-fibrotic effects of thalidomide on hepatic stellate cells and dimethylnitrosamine-intoxicated rats. *J. Biomed. Sci.* 2006 Maio;13(3):403-418.
41. Borges LDG, Fröhlich PE. [Thalidomide: new perspectives for its use as antiinflammatory, immunosuppressive and antiangiogenic drug]. *Rev Assoc Med Bras.* 2003 Mar;49(1):96-102.
42. Podar K, Tai Y, Hideshima T, Vallet S, Richardson PG, Anderson KC. Emerging therapies for multiple myeloma. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2009 Mar;14(1):99-127.
43. Sheskin J. Thalidomide in the treatment of lepra reactions. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1965 Jun;6:303-306.
44. Sheskin J. [Incorporation of thalidomide to the therapeutic arsenal of Hansen's disease (award of the Spanish Academy of Dermatology 1968)]. *Actas Dermosifiliogr.* 1966 Abr;60(3):57-72.
45. Arunthathi S, Ebenezer G, Daniel E, Sugumaran ST. *Nocardia farcinica* pleuritis in a lepromatous patient with severe necrotizing reaction: an unusual presentation. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 2001 Jun;69(2):104-107.
46. Sampaio EP, Kaplan G, Miranda A, Nery JA, Miguel CP, Viana SM, et al. The influence of thalidomide on the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum. *J. Infect. Dis.* 1993 Aug;168(2):408-414.
47. Shannon EJ, Ejigu M, Haile-Mariam HS, Berhan TY, Tasesse G. Thalidomide's effectiveness in erythema nodosum leprosum is associated with a decrease in CD4+ cells in the peripheral blood. *Lepr Rev.* 1992 Mar;63(1):5-11.
48. Chang F, Steelman LS, Lee JT, Shelton JG, Navolanic PM, Blalock WL, et al. Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia.* 2003 Jul;17(7):1263-1293.
49. Plataniias LC. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood.* 2003 Jun 15;101(12):4667-4679.

50. Schaeffer EM, Debnath J, Yap G, McVicar D, Liao XC, Littman DR, et al. Requirement for Tec kinases Rlk and Itk in T cell receptor signaling and immunity. *Science*. 1999 Apr 23;284(5414):638-641.
51. Rincón M, Davis RJ. Regulation of the immune response by stress-activated protein kinases. *Immunol. Rev.* 2009 Mar;228(1):212-224.
52. Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, et al. MAP kinases. *Chem. Rev.* 2001 Aug;101(8):2449-2476.
53. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.* 2002 Mar;12(1):9-18.
54. Kuan C, Whitmarsh AJ, Yang DD, Liao G, Schloemer AJ, Dong C, et al. A critical role of neural-specific JNK3 for ischemic apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003 Dec 9;100(25):15184-15189.
55. Wei L, Liu Y, Kaneto H, Fanburg BL. C-Jun N-terminal Kinase (JNK) Regulates Serotonin-mediated Proliferation and Migration of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*
56. Nishina H, Wada T, Katada T. Physiological roles of SAPK/JNK signaling pathway. *J. Biochem.* 2004 Aug;136(2):123-126.
57. Geest CR, Buitenhuis M, Groot Koerkamp MJA, Holstege FCP, Vellenga E, Coffey PJ. Tight control of MEK-ERK activation is essential in regulating proliferation, survival, and cytokine production of CD34+-derived neutrophil progenitors. *Blood*. 2009 Oct 15;114(16):3402-3412.
58. Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*. 2007 May 14;26(22):3100-3112.
59. Shin S, Rath O, Choo S, Fee F, McFerran B, Kolch W, et al. Positive- and negative-feedback regulations coordinate the dynamic behavior of the Ras-Raf-MEK-ERK signal transduction pathway. *J. Cell. Sci.* 2009 Feb 1;122(Pt 3):425-435.
60. Kim SI, Kim HJ, Han DC, Lee HB. Effect of lovastatin on small GTP binding proteins and on TGF-beta1 and fibronectin expression. *Kidney Int. Suppl.* 2000 Sep;77:S88-92.
61. Kondoh K, Torii S, Nishida E. Control of MAP kinase signaling to the nucleus. *Chromosoma* 2005 Jul;114(2):86-91.
62. Jin SH, Kim TI, Yang KM, Kim WH. Thalidomide destabilizes cyclooxygenase-2 mRNA by inhibiting p38 mitogen-activated protein kinase and cytoplasmic shuttling of HuR. *Eur. J. Pharmacol.* 2007 Mar 8;558(1-3):14-20.
63. Aerbajinai W, Zhu J, Gao Z, Chin K, Rodgers GP. Thalidomide induces gamma-globin gene expression through increased reactive oxygen species-mediated p38 MAPK signaling and histone H4 acetylation in adult erythropoiesis. *Blood*. 2007 Oct 15;110(8):2864-2871.
64. Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, Cohn ZA, Kaplan G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *J. Exp. Med.* 1991 Mar 1;173(3):699-703.

65. Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinas A, Frindt P, Smith KA, Kaplan G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *J. Exp. Med.* 1993 Jun 1;177(6):1675-1680.
66. Noman ASM, Koide N, Hassan F, I-E-Khuda I, Dagvadorj J, Tumurkhuu G, et al. Thalidomide inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production via down-regulation of MyD88 expression. *Innate Immun.* 2009 Feb;15(1):33-41.
67. Pereira RMS, Calegari-Silva TC, Hernandez MO, Saliba AM, Redner P, Pessolani MCV, et al. Mycobacterium leprae induces NF-kappaB-dependent transcription repression in human Schwann cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005 Set 16;335(1):20-26.
68. Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell.* 1986 Dez 26;47(6):921-928.
69. Moynagh PN. The NF-kappaB pathway. *J. Cell. Sci.* 2005 Oct 15;118(Pt 20):4589-4592.
70. Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol.* 2002 Mar;3(3):221-227.
71. Zhou Y, Eppenberger-Castori S, Eppenberger U, Benz CC. The NFkappaB pathway and endocrine-resistant breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer.* 2005 Jul;12 Suppl 1:S37-46.
72. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 2009;27:693-733.
73. Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF-kB in development and progression of human cancer. *Virchows Arch.* 2005 May;446(5):475-482.
74. Ghosh S. Regulation of inducible gene expression by the transcription factor NF-kappaB. *Immunol. Res.* 1999;19(2-3):183-189.
75. Feuillard J, Körner M, Israel A, Vassy J, Raphael M. Differential nuclear localization of p50, p52, and RelB proteins in human accessory cells of the immune response in situ. *Eur. J. Immunol.* 1996 Nov;26(11):2547-2551.
76. Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell.* 2004 Set;6(3):203-208.
77. Yamamoto Y, Gaynor RB. I kappa B kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway. *Trends Biochem. Sci.* 2004 Feb;29(2):72-79.
78. Krasnow SW, Zhang LQ, Leung KY, Osborn L, Kunkel S, Nabel GJ. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1, and phorbol myristate acetate are independent activators of NF-kappa B which differentially activate T cells. *Cytokine.* 1991 Set;3(5):372-379.
79. Amir RE, Haecker H, Karin M, Ciechanover A. Mechanism of processing of the NF-kappa B2 p100 precursor: identification of the specific polyubiquitin chain-anchoring lysine residue and analysis of the role of NEDD8-modification on the SCF(beta-TrCP) ubiquitin ligase. *Oncogene.* 2004 Abr 1;23(14):2540-2547.

80. Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M. The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation. *Cell*. 1997 Oct 17;91(2):243-252.
81. Clément J, Meloche S, Servant MJ. The IKK-related kinases: from innate immunity to oncogenesis. *Cell Res*. 2008 Sep;18(9):889-899.
82. Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Li J, et al. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation. *Science*. 1997 Oct 31;278(5339):860-866.
83. Hu MC, Wang YP, Qiu WR, Mikhail A, Meyer CF, Tan TH. Hematopoietic progenitor kinase-1 (HPK1) stress response signaling pathway activates I κ B kinases (IKK- α / β) and IKK- β is a developmentally regulated protein kinase. *Oncogene*. 1999 Sep 30;18(40):5514-5524.
84. Hauer J, Püschner S, Ramakrishnan P, Simon U, Bongers M, Federle C, et al. TNF receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5-mediated activation of the noncanonical NF- κ B pathway by TRAF-binding TNFRs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005 Feb 22;102(8):2874-2879.
85. Solan NJ, Miyoshi H, Carmona EM, Bren GD, Paya CV. RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100. *J. Biol. Chem*. 2002 Jan 11;277(2):1405-1418.
86. Müller JR, Siebenlist U. Lymphotoxin beta receptor induces sequential activation of distinct NF- κ B factors via separate signaling pathways. *J. Biol. Chem*. 2003 Apr 4;278(14):12006-12012.
87. Sampaio EP, Oliveira RB, Warwick-Davies J, Neto RB, Griffin GE, Shattock RJ. T cell-monocyte contact enhances tumor necrosis factor- α production in response to *Mycobacterium leprae*. *J. Infect. Dis*. 2000 Nov;182(5):1463-1472.
88. Yamada H, Mizuno S, Reza-Gholizadeh M, Sugawara I. Relative importance of NF- κ B p50 in mycobacterial infection. *Infect. Immun*. 2001 Nov;69(11):7100-7105.
89. Islam N, Kanost AR, Teixeira L, Johnson J, Hejal R, Aung H, et al. Role of cellular activation and tumor necrosis factor- α in the early expression of *Mycobacterium tuberculosis* 85B mRNA in human alveolar macrophages. *J. Infect. Dis*. 2004 Jul 15;190(2):341-351.
90. Keifer JA, Guttridge DC, Ashburner BP, Baldwin AS. Inhibition of NF- κ B activity by thalidomide through suppression of I κ B kinase activity. *J. Biol. Chem*. 2001 Jun 22;276(25):22382-22387.
91. O'Sullivan AW, Wang JH, Redmond HP. The role of P38 MAPK and PKC in BLP induced TNF- α release, apoptosis, and NF κ B activation in THP-1 monocyte cells. *J. Surg. Res*. 2009 Jan;151(1):138-144.
92. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol*. 2005 Dec;5(12):953-964.
93. Pozzi LM, Maciaszek JW, Rock KL. Both dendritic cells and macrophages can stimulate

- naive CD8 T cells in vivo to proliferate, develop effector function, and differentiate into memory cells. *J. Immunol.* 2005 Ago 15;175(4):2071-2081.
94. Preynat-Seauve O, Schuler P, Contassot E, Beermann F, Huard B, French LE. Tumor-infiltrating dendritic cells are potent antigen-presenting cells able to activate T cells and mediate tumor rejection. *J. Immunol.* 2006 Jan 1;176(1):61-67.
 95. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol.* 2000 Jun 15;164(12):6166-6173.
 96. Kuroda E, Kito T, Yamashita U. Reduced expression of STAT4 and IFN-gamma in macrophages from BALB/c mice. *J. Immunol.* 2002 Jun 1;168(11):5477-5482.
 97. Elgert KD, Alleva DG, Mullins DW. Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. *J. Leukoc. Biol.* 1998 Set;64(3):275-290.
 98. Munder M, Mallo M, Eichmann K, Modolell M. Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J. Exp. Med.* 1998 Jun 15;187(12):2103-2108.
 99. Romagnani S. The role of lymphocytes in allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000 Mar;105(3):399-408.
 100. Gordon S. Do macrophage innate immune receptors enhance atherogenesis? *Dev. Cell.* 2003 Nov;5(5):666-668.
 101. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci.* 2008;13:453-461.
 102. Ehrt S, Schnappinger D, Bekiranov S, Drenkow J, Shi S, Gingeras TR, et al. Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and *Mycobacterium tuberculosis*: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase. *J. Exp. Med.* 2001 Out 15;194(8):1123-1140.
 103. Verreck FAW, de Boer T, Langenberg DML, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, et al. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004 Mar 30;101(13):4560-4565.
 104. Urban JL, Shepard HM, Rothstein JL, Sugarman BJ, Schreiber H. Tumor necrosis factor: a potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1986 Jul;83(14):5233-5237.
 105. Stuehr DJ, Nathan CF. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J. Exp. Med.* 1989 Maio 1;169(5):1543-1555.
 106. Bonnotte B, Larmonier N, Favre N, Fromentin A, Moutet M, Martin M, et al. Identification of tumor-infiltrating macrophages as the killers of tumor cells after immunization in a rat model system. *J. Immunol.* 2001 Nov 1;167(9):5077-5083.
 107. Fleetwood AJ, Lawrence T, Hamilton JA, Cook AD. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for

- CSF blockade in inflammation. *J. Immunol.* 2007 Apr 15;178(8):5245-5252.
108. Goerdts S, Politz O, Schledzewski K, Birk R, Gratchev A, Guillot P, et al. Alternative versus classical activation of macrophages. *Pathobiology.* 1999;67(5-6):222-226.
 109. Gough MJ, Melcher AA, Ahmed A, Crittenden MR, Riddle DS, Linardakis E, et al. Macrophages orchestrate the immune response to tumor cell death. *Cancer Res.* 2001 Oct 1;61(19):7240-7247.
 110. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004 Dec;25(12):677-686.
 111. Anderson CF, Gerber JS, Mosser DM. Modulating macrophage function with IgG immune complexes. *J. Endotoxin Res.* 2002;8(6):477-481.
 112. Loke P, Gallagher I, Nair MG, Zang X, Brombacher F, Mohrs M, et al. Alternative activation is an innate response to injury that requires CD4⁺ T cells to be sustained during chronic infection. *J. Immunol.* 2007 Sep 15;179(6):3926-3936.
 113. Loke P, MacDonald AS, Robb A, Maizels RM, Allen JE. Alternatively activated macrophages induced by nematode infection inhibit proliferation via cell-to-cell contact. *Eur. J. Immunol.* 2000 Sep;30(9):2669-2678.
 114. Ramalingam TR, Reiman RM, Wynn TA. Exploiting worm and allergy models to understand Th2 cytokine biology. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2005 Oct;5(5):392-398.
 115. Brys L, Beschin A, Raes G, Ghassabeh GH, Noël W, Brandt J, et al. Reactive oxygen species and 12/15-lipoxygenase contribute to the antiproliferative capacity of alternatively activated myeloid cells elicited during helminth infection. *J. Immunol.* 2005 May 15;174(10):6095-6104.
 116. Raes G, Van den Bergh R, De Baetselier P, Ghassabeh GH, Scotton C, Locati M, et al. Arginase-1 and Ym1 are markers for murine, but not human, alternatively activated myeloid cells. *J. Immunol.* 2005 Jun 1;174(11):6561; author reply 6561-6562.
 117. Bosisio D, Polentarutti N, Sironi M, Bernasconi S, Miyake K, Webb GR, et al. Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon-gamma: a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide. *Blood.* 2002 May 1;99(9):3427-3431.
 118. Hisamatsu T, Suzuki M, Podolsky DK. Interferon-gamma augments CARD4/NOD1 gene and protein expression through interferon regulatory factor-1 in intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 2003 Aug 29;278(35):32962-32968.
 119. Rosenstiel P, Fantini M, Bräutigam K, Kühbacher T, Waetzig GH, Seeger D, et al. TNF- α and IFN- γ regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology.* 2003 Apr;124(4):1001-1009.
 120. Porta C, Rimoldi M, Raes G, Brys L, Ghezzi P, Di Liberto D, et al. Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor kappaB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009 Sep 1;106(35):14978-14983.

121. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.* 1992 Jul 1;176(1):287-292.
122. Willment JA, Lin H, Reid DM, Taylor PR, Williams DL, Wong SYC, et al. Dectin-1 expression and function are enhanced on alternatively activated and GM-CSF-treated macrophages and are negatively regulated by IL-10, dexamethasone, and lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 2003 Nov 1;171(9):4569-4573.
123. Puig-Kröger A, Serrano-Gómez D, Caparrós E, Domínguez-Soto A, Relloso M, Colmenares M, et al. Regulated expression of the pathogen receptor dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin in THP-1 human leukemic cells, monocytes, and macrophages. *J. Biol. Chem.* 2004 Jun 11;279(24):25680-25688.
124. Buechler C, Ritter M, Orsó E, Langmann T, Klucken J, Schmitz G. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J. Leukoc. Biol.* 2000 Jan;67(1):97-103.
125. Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin H, Brown GD, Gordon S. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 2005;23:901-944.
126. Hoebe K, Janssen E, Beutler B. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat. Immunol.* 2004 Oct;5(10):971-974.
127. Shaughnessy LM, Swanson JA. The role of the activated macrophage in clearing *Listeria monocytogenes* infection. *Front. Biosci.* 2007;12:2683-2692.
128. Pfeffer K, Matsuyama T, Kündig TM, Wakeham A, Kishihara K, Shahinian A, et al. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell.* 1993 May 7;73(3):457-467.
129. Withanage GSK, Wigley P, Kaiser P, Mastroeni P, Brooks H, Powers C, et al. Cytokine and chemokine responses associated with clearance of a primary *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in the chicken and in protective immunity to rechallenge. *Infect. Immun.* 2005 Aug;73(8):5173-5182.
130. Caron J, Larivière L, Nacache M, Tam M, Stevenson MM, McKerly C, et al. Influence of *Slc11a1* on the outcome of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection in mice is associated with Th polarization. *Infect. Immun.* 2006 May;74(5):2787-2802.
131. Chacón-Salinas R, Serafín-López J, Ramos-Payán R, Méndez-Aragón P, Hernández-Pando R, Van Soolingen D, et al. Differential pattern of cytokine expression by macrophages infected in vitro with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin. Exp. Immunol.* 2005 Jun;140(3):443-449.
132. Raju B, Hoshino Y, Belitskaya-Lévy I, Dawson R, Ress S, Gold JA, et al. Gene expression profiles of bronchoalveolar cells in pulmonary TB. *Tuberculosis (Edinb).* 2008 Jan;88(1):39-51.
133. Kiszewski AE, Becerril E, Aguilar LD, Kader ITA, Myers W, Portaels F, et al. The local immune response in ulcerative lesions of Buruli disease. *Clin. Exp. Immunol.* 2006 Mar;143(3):445-451.

134. Murphy JT, Sommer S, Kabara EA, Verman N, Kuelbs MA, Saama P, et al. Gene expression profiling of monocyte-derived macrophages following infection with *Mycobacterium avium* subspecies *avium* and *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Physiol. Genomics*. 2006 Dez 13;28(1):67-75.
135. Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Mastroeni P, Ischiropoulos H, Fang FC. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro. *J. Exp. Med.* 2000 Jul 17;192(2):227-236.
136. Miller BH, Fratti RA, Poschet JF, Timmins GS, Master SS, Burgos M, et al. *Mycobacteria* inhibit nitric oxide synthase recruitment to phagosomes during macrophage infection. *Infect. Immun.* 2004 Maio;72(5):2872-2878.
137. Pathak SK, Basu S, Basu KK, Banerjee A, Pathak S, Bhattacharyya A, et al. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. *Nat. Immunol.* 2007 Jun;8(6):610-618.
138. Fernandes PD, Araujo HM, Riveros-Moreno V, Assreuy J. Depolymerization of macrophage microfilaments prevents induction and inhibits activity of nitric oxide synthase. *Eur. J. Cell Biol.* 1996 Dez;71(4):356-362.
139. Sieling PA, Modlin RL. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. *Immunobiology.* 1994 Oct;191(4-5):378-387.
140. Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE, et al. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat. Med.* 2005 Jun;11(6):653-660.
141. Bleharski JR, Li H, Meinken C, Graeber TG, Ochoa M, Yamamura M, et al. Use of genetic profiling in leprosy to discriminate clinical forms of the disease. *Science.* 2003 Set 12;301(5639):1527-1530.
142. Lee DJ, Sieling PA, Ochoa MT, Krutzik SR, Guo B, Hernandez M, et al. LILRA2 activation inhibits dendritic cell differentiation and antigen presentation to T cells. *J. Immunol.* 2007 Dez 15;179(12):8128-8136.
143. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science.* 1999 Jul 30;285(5428):732-736.
144. Texereau J, Chiche J, Taylor W, Choukroun G, Comba B, Mira J. The importance of Toll-like receptor 2 polymorphisms in severe infections. *Clin. Infect. Dis.* 2005 Nov 15;41 Suppl 7:S408-415.
145. Hawn TR, Misch EA, Dunstan SJ, Thwaites GE, Lan NTN, Quy HT, et al. A common human TLR1 polymorphism regulates the innate immune response to lipopeptides. *Eur. J. Immunol.* 2007 Ago;37(8):2280-2289.
146. Johnson CM, Lyle EA, Omueti KO, Stepensky VA, Yegin O, Alpsoy E, et al. Cutting edge: A common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. *J. Immunol.* 2007 Jun 15;178(12):7520-7524.

147. Ferrari G, Langen H, Naito M, Pieters J. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell*. 1999 Maio 14;97(4):435-447.
148. Jayachandran R, Sundaramurthy V, Combaluzier B, Mueller P, Korf H, Huygen K, et al. Survival of mycobacteria in macrophages is mediated by coronin 1-dependent activation of calcineurin. *Cell*. 2007 Jul 13;130(1):37-50.
149. Tanigawa K, Suzuki K, Kimura H, Takeshita F, Wu H, Akama T, et al. Tryptophan aspartate-containing coat protein (CORO1A) suppresses Toll-like receptor signalling in *Mycobacterium leprae* infection. *Clin. Exp. Immunol*. 2009 Jun;156(3):495-501.
150. Zarembek KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J. Immunol*. 2002 Jan 15;168(2):554-561.
151. Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, van Het Hof B, van Kooyk Y, Geijtenbeek TBH. C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB. *Immunity*. 2007 Maio;26(5):605-616.
152. Sinsimer D, Fallows D, Peixoto B, Krahenbuhl J, Kaplan G, Manca C. *Mycobacterium leprae* actively modulates the cytokine response in naive human monocytes. *Infect. Immun*. 2010 Jan;78(1):293-300.
153. Makino M, Maeda Y, Fukutomi Y, Mukai T. Contribution of GM-CSF on the enhancement of the T cell-stimulating activity of macrophages. *Microbes Infect*. 2007 Jan;9(1):70-77.
154. Bartocci A, Mastrogiannis DS, Migliorati G, Stockert RJ, Wolkoff AW, Stanley ER. Macrophages specifically regulate the concentration of their own growth factor in the circulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1987 Set;84(17):6179-6183.
155. Fulco TO, Lopes UG, Sarno EN, Sampaio EP, Saliba AM. The proteasome function is required for *Mycobacterium leprae*-induced apoptosis and cytokine secretion. *Immunol. Lett*. 2007 May 15;110(1):82-85.
156. Moura DF, Teles RMB, Ribeiro-Carvalho MM, Teles RB, Santos IMCF, Ferreira H, et al. Long-term culture of multibacillary leprosy macrophages isolated from skin lesions: a new model to study *Mycobacterium leprae*-human cell interaction. *Br. J. Dermatol*. 2007 Aug;157(2):273-283.
157. Kiszewski CA, Becerril E, Baquera J, Aguilar LD, Hernández-Pando R. Expression of transforming growth factor-beta isoforms and their receptors in lepromatous and tuberculoid leprosy. *Scand. J. Immunol*. 2003 Mar;57(3):279-285.
158. Rojas-Espinosa O, Jiménez-Zamudio L, Arce-Paredes P. [Sequential activation of cellular and humoral immunity in leprosy: considerations based on recent findings]. *Rev. Latinoam. Microbiol*. 1994 Sep;36(3):213-219.
159. Montoya D, Cruz D, Teles RMB, Lee DJ, Ochoa MT, Krutzik SR, et al. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. *Cell Host Microbe*. 2009 Out 22;6(4):343-353.
160. Modlin RL. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. *J. Invest. Dermatol*. 1994 Jun;102(6):828-832.

161. Trinchieri G. Interleukin-12 and interferon-gamma. Do they always go together? *Am. J. Pathol.* 1995 Dez;147(6):1534-1538.
162. Raupach B, Kaufmann SH. Immune responses to intracellular bacteria. *Curr. Opin. Immunol.* 2001 Ago;13(4):417-428.
163. Murray HW. Interferon-gamma and host antimicrobial defense: current and future clinical applications. *Am. J. Med.* 1994 Nov;97(5):459-467.
164. Kaplan G, Nathan CF, Gandhi R, Horwitz MA, Levis WR, Cohn ZA. Effect of recombinant interferon-gamma on hydrogen peroxide-releasing capacity of monocyte-derived macrophages from patients with lepromatous leprosy. *J. Immunol.* 1986 Ago 1;137(3):983-987.
165. Dustin ML, Singer KH, Tuck DT, Springer TA. Adhesion of T lymphoblasts to epidermal keratinocytes is regulated by interferon gamma and is mediated by intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1). *J. Exp. Med.* 1988 Apr 1;167(4):1323-1340.
166. Kasahara T, Hooks JJ, Dougherty SF, Oppenheim JJ. Interleukin 2-mediated immune interferon (IFN-gamma) production by human T cells and T cell subsets. *J. Immunol.* 1983 Apr;130(4):1784-1789.
167. Silva CL, Foss NT. Tumor necrosis factor in leprosy patients. *J. Infect. Dis.* 1989 Apr;159(4):787-790.
168. 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. *Mol. Immunol.* 2010 Feb;47(5):943-952.
169. Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, et al. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science.* 1991 Oct 11;254(5029):277-279.
170. Sieling PA, Modlin RL. Regulation of cytokine patterns in leprosy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1994 Aug 15;730:42-52.
171. Salgame P, Abrams JS, Clayberger C, Goldstein H, Convit J, Modlin RL, et al. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science.* 1991 Oct 11;254(5029):279-282.
172. Misra N, Selvakumar M, Singh S, Bharadwaj M, Ramesh V, Misra RS, et al. Monocyte derived IL 10 and PGE2 are associated with the absence of Th 1 cells and in vitro T cell suppression in lepromatous leprosy. *Immunol. Lett.* 1995 Dec;48(2):123-128.
173. Goulart IM, Figueiredo F, Coimbra T, Foss NT. Detection of transforming growth factor-beta 1 in dermal lesions of different clinical forms of leprosy. *Am. J. Pathol.* 1996 Mar;148(3):911-917.
174. Goulart IM, Mineo JR, Foss NT. Production of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) by blood monocytes from patients with different clinical forms of leprosy. *Clin. Exp. Immunol.* 2000 Dec;122(3):330-334.
175. Bermudez LE, Covaro G, Remington J. Infection of murine macrophages with *Toxoplasma gondii* is associated with release of transforming growth factor beta and

- downregulation of expression of tumor necrosis factor receptors. *Infect. Immun.* 1993 Oct;61(10):4126-4130.
176. Welburn SC, Barcinski MA, Williams GT. Programmed cell death in trypanosomatids. *Parasitol. Today (Regul. Ed.)*. 1997 Jan;13(1):22-26.
 177. Warny M, Kelly CP. Monocytic cell necrosis is mediated by potassium depletion and caspase-like proteases. *Am. J. Physiol.* 1999 Mar;276(3 Pt 1):C717-724.
 178. Duke RC, Ojcius DM, Young JD. Cell suicide in health and disease. *Sci. Am.* 1996 Dec;275(6):80-87.
 179. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000 Oct 12;407(6805):770-776.
 180. Sun Y, Peng Z. Programmed cell death and cancer. *Postgrad Med J.* 2009 Mar;85(1001):134-140.
 181. Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenberghe P, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* 2005 Nov;12 Suppl 2:1463-1467.
 182. Bossy-Wetzel E, Green DR. Assays for cytochrome c release from mitochondria during apoptosis. *Meth. Enzymol.* 2000;322:235-242.
 183. Saikumar P, Dong Z, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury. *Oncogene*. 1998 Dec 24;17(25):3341-3349.
 184. Movassagh M, Foo RS. Simplified apoptotic cascades. *Heart Fail Rev.* 2008 Jun;13(2):111-119.
 185. Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*. 2005 Mar;22(3):355-370.
 186. Zychlinsky A, Prevost MC, Sansonetti PJ. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature*. 1992 Jul 9;358(6382):167-169.
 187. Lopes MF, da Veiga VF, Santos AR, Fonseca ME, DosReis GA. Activation-induced CD4+ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. *J. Immunol.* 1995 Jan 15;154(2):744-752.
 188. Arai T, Hiromatsu K, Nishimura H, Kimura Y, Kobayashi N, Ishida H, et al. Endogenous interleukin 10 prevents apoptosis in macrophages during *Salmonella* infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995 Aug 15;213(2):600-607.
 189. Cree IA, Nurbhai S, Milne G, Beck JS. Cell death in granulomata: the role of apoptosis. *J. Clin. Pathol.* 1987 Nov;40(11):1314-1319.
 190. Walsh DS, Lane JE, Abalos RM, Myint KSA. TUNEL and limited immunophenotypic analyses of apoptosis in paucibacillary and multibacillary leprosy lesions. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2004 Jul 1;41(3):265-269.
 191. Cruz D, Watson AD, Miller CS, Montoya D, Ochoa M, Sieling PA, et al. Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy. *J. Clin.*

- Invest. 2008 Aug;118(8):2917-2928.
192. Gupta A, Sharma VK, Vohra H, Ganguly NK. Spontaneous apoptosis in peripheral blood mononuclear cells of leprosy patients: role of cytokines. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1999 May;24(1):49-55.
 193. Raff M. Cell suicide for beginners. *Nature.* 1998 Nov 12;396(6707):119-122.
 194. Mustafa T, Bjune TG, Jonsson R, Pando RH, Nilsen R. Increased expression of fas ligand in human tuberculosis and leprosy lesions: a potential novel mechanism of immune evasion in mycobacterial infection. *Scand. J. Immunol.* 2001 Dec;54(6):630-639.
 195. Hernandez MO, Neves I, Sales JS, Carvalho DS, Sarno EN, Sampaio EP. Induction of apoptosis in monocytes by *Mycobacterium leprae* in vitro: a possible role for tumour necrosis factor-alpha. *Immunology.* 2003 May;109(1):156-164.
 196. Henson PM, Bratton DL, Fadok VA. Apoptotic cell removal. *Curr. Biol.* 2001 Oct 2;11(19):R795-805.
 197. Moreira MEC, Barcinski MA. Apoptotic cell and phagocyte interplay: recognition and consequences in different cell systems. *An. Acad. Bras. Cienc.* 2004 Mar;76(1):93-115.
 198. Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, et al. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell.* 2005 Oct 21;123(2):321-334.
 199. Brown EJ, Frazier WA: Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trend Cell Biol* 2001, 11:130-135.
 200. Oldenburg PA, Zheleznyak A, Fang YF, Lagenaur CF, Gresham HD, Lindberg FP. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science.* 2000 Jun 16;288(5473):2051-2054.
 201. Brown S, Heinisch I, Ross E, Shaw K, Buckley CD, Savill J. Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. *Nature.* 2002 Jul 11;418(6894):200-203.
 202. Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2002 Dec;2(12):965-975.
 203. Lauber K, Blumenthal SG, Waibel M, Wesselborg S. Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol. Cell.* 2004 May 7;14(3):277-287.
 204. Frasch SC, Henson PM, Kailey JM, Richter DA, Janes MS, Fadok VA, et al. Regulation of phospholipid scramblase activity during apoptosis and cell activation by protein kinase Cdelta. *J. Biol. Chem.* 2000 Jul 28;275(30):23065-23073.
 205. Verhoven B, Schlegel RA, Williamson P. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1995 Nov 1;182(5):1597-1601.
 206. Hamon Y, Broccardo C, Chambenoit O, Luciani MF, Toti F, Chaslin S, et al. ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nat. Cell Biol.* 2000 Jul;2(7):399-406.

207. Fadok VA, Chimini G. The phagocytosis of apoptotic cells. *Semin. Immunol.* 2001 Dez;13(6):365-372.
208. Mourdjeva M, Kyurkchiev D, Mandinova A, Altankova I, Kehayov I, Kyurkchiev S. Dynamics of membrane translocation of phosphatidylserine during apoptosis detected by a monoclonal antibody. *Apoptosis.* 2005 Jan;10(1):209-217.
209. Ravichandran KS, Lorenz U. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nat. Rev. Immunol.* 2007 Dez;7(12):964-974.
210. Hanayama R, Tanaka M, Miyasaka K, Aozasa K, Koike M, Uchiyama Y, et al. Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. *Science.* 2004 Maio 21;304(5674):1147-1150.
211. Ishimoto Y, Ohashi K, Mizuno K, Nakano T. Promotion of the uptake of PS liposomes and apoptotic cells by a product of growth arrest-specific gene, gas6. *J. Biochem.* 2000 Mar;127(3):411-417.
212. Scott RS, McMahon EJ, Pop SM, Reap EA, Caricchio R, Cohen PL, et al. Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature.* 2001 Maio 10;411(6834):207-211.
213. Balasubramanian K, Chandra J, Schroit AJ. Immune clearance of phosphatidylserine-expressing cells by phagocytes. The role of beta2-glycoprotein I in macrophage recognition. *J. Biol. Chem.* 1997 Dez 5;272(49):31113-31117.
214. Yamanaka M, Eda S, Beppu M. Carbohydrate chains and phosphatidylserine successively work as signals for apoptotic cell removal. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005 Mar 4;328(1):273-280.
215. Moffatt OD, Devitt A, Bell ED, Simmons DL, Gregory CD. Macrophage recognition of ICAM-3 on apoptotic leukocytes. *J. Immunol.* 1999 Jun 1;162(11):6800-6810.
216. Devitt A, Parker KG, Ogden CA, Oldreive C, Clay MF, Melville LA, et al. Persistence of apoptotic cells without autoimmune disease or inflammation in CD14^{-/-} mice. *J. Cell Biol.* 2004 Dez 20;167(6):1161-1170.
217. Ren Y, Silverstein RL, Allen J, Savill J. CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *J. Exp. Med.* 1995 Maio 1;181(5):1857-1862.
218. Maderna P, Godson C. Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation. *Biochim. Biophys. Acta.* 2003 Nov 20;1639(3):141-151.
219. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature.* 2000 Out 12;407(6805):784-788.
220. Surh CD, Sprent J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature.* 1994 Nov 3;372(6501):100-103.
221. Quaglino D, Ronchetti IP. Cell death in the rat thymus: a minireview. *Apoptosis.* 2001 Out;6(5):389-401.
222. Cvetanovic M, Ucker DS. Innate immune discrimination of apoptotic cells: repression of proinflammatory macrophage transcription is coupled directly to specific recognition. *J.*

- Immunol. 2004 Jan 15;172(2):880-889.
223. Bratton DL, Henson PM. Apoptotic cell recognition: will the real phosphatidylserine receptor(s) please stand up? *Curr. Biol.* 2008 Jan 22;18(2):R76-79.
224. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J. Clin. Invest.* 1998 Feb 15;101(4):890-898.
225. Hoffmann PR, Kench JA, Vondracek A, Kruk E, Daleke DL, Jordan M, et al. Interaction between phosphatidylserine and the phosphatidylserine receptor inhibits immune responses in vivo. *J. Immunol.* 2005 Feb 1;174(3):1393-1404.
226. Van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, et al. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J. Immunol.* 2004 Dez 1;173(11):6521-6525.
227. Freire-de-Lima CG, Nascimento DO, Soares MB, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, de Mello FG, et al. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature.* 2000 Jan 13;403(6766):199-203.
228. Ribeiro-Gomes FL, Otero AC, Gomes NA, Moniz-De-Souza MCA, Cysne-Finkelstein L, Arnholdt AC, et al. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *J. Immunol.* 2004 Abr 1;172(7):4454-4462.
229. Wilsson A, Lind S, Ohman L, Nilsson-Augustinsson A, Lundqvist-Setterud H. Apoptotic neutrophils containing *Staphylococcus epidermidis* stimulate macrophages to release the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2008 Jun;53(1):126-135.
230. Martinet W, Kockx MM. Apoptosis in atherosclerosis: focus on oxidized lipids and inflammation. *Curr. Opin. Lipidol.* 2001 Out;12(5):535-541.
231. Schrijvers DM, De Meyer GRY, Kockx MM, Herman AG, Martinet W. Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005 Jun;25(6):1256-1261.
232. Cacciapaglia F, Spadaccio C, Chello M, Gigante A, Coccia R, Afeltra A, et al. Apoptotic molecular mechanisms implicated in autoimmune diseases. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2009 Feb;13(1):23-40.
233. Potter PK, Cortes-Hernandez J, Quartier P, Botto M, Walport MJ. Lupus-prone mice have an abnormal response to thioglycolate and an impaired clearance of apoptotic cells. *J. Immunol.* 2003 Mar 15;170(6):3223-3232.
234. Torchinsky MB, Garaude J, Blander JM. Infection and apoptosis as a combined inflammatory trigger. *Curr Opin Immunol [Internet].* 3 Feb 2010.
235. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Ago 15;227(5259):680-685.
236. Kiszewski AEC, Becerril E, Baquera J, Ruiz-Maldonado R, Hernández Pando R. Expression of cyclooxygenase type 2 in lepromatous and tuberculoid leprosy lesions. *Br.*

- J. Dermatol. 2003 Apr;148(4):795-798.
237. Bhavsar AP, Guttman JA, Finlay BB. Manipulation of host-cell pathways by bacterial pathogens. *Nature*. 2007 Oct 18;449(7164):827-834.
 238. Böhme L, Rudel T. Host cell death machinery as a target for bacterial pathogens. *Microbes Infect*. 2009 Nov;11(13):1063-1070.
 239. Busca A, Saxena M, Kryworuchko M, Kumar A. Anti-apoptotic genes in the survival of monocytic cells during infection. *Curr. Genomics*. 2009 Ago;10(5):306-317.
 240. Sánchez MD, García Y, Montes C, París SC, Rojas M, Barrera LF, et al. Functional and phenotypic changes in monocytes from patients with tuberculosis are reversed with treatment. *Microbes Infect*. 2006 Ago;8(9-10):2492-2500.
 241. Gil DP, León LG, Correa LI, Maya JR, París SC, García LF, et al. Differential induction of apoptosis and necrosis in monocytes from patients with tuberculosis and healthy control subjects. *J. Infect. Dis*. 2004 Jun 1;189(11):2120-2128.
 242. Sánchez D, Rojas M, Hernández I, Radzioch D, García LF, Barrera LF. Role of TLR2- and TLR4-mediated signaling in *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage death. *Cell. Immunol*. 2010;260(2):128-136.
 243. Sarno EN, Sampaio EP. The role of inflammatory cytokines in the tissue injury of leprosy. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis*. 1996 Dez;64(4 Suppl):S69-73; discussion S73-74.
 244. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin. Microbiol. Rev*. 2006 Abr;19(2):338-381.
 245. Zwingenberger K, Wnendt S. Immunomodulation by thalidomide: systematic review of the literature and of unpublished observations. *J. Inflamm*. 1995;46(4):177-211.
 246. Majumdar S, Lamothe B, Aggarwal BB. Thalidomide suppresses NF-kappa B activation induced by TNF and H2O2, but not that activated by ceramide, lipopolysaccharides, or phorbol ester. *J. Immunol*. 2002 Mar 15;168(6):2644-2651.
 247. Rowland TL, McHugh SM, Deighton J, Ewan PW, Dearman RJ, Kimber I. Differential effect of thalidomide and dexamethasone on the transcription factor NF-kappa B. *Int. Immunopharmacol*. 2001 Jan;1(1):49-61.
 248. Koul A, Herget T, Klebl B, Ullrich A. Interplay between mycobacteria and host signalling pathways. *Nat. Rev. Microbiol*. 2004 Mar;2(3):189-202.
 249. Reiling N, Blumenthal A, Flad HD, Ernst M, Ehlers S. Mycobacteria-induced TNF-alpha and IL-10 formation by human macrophages is differentially regulated at the level of mitogen-activated protein kinase activity. *J. Immunol*. 2001 Sep 15;167(6):3339-3345.
 250. Wiktor-Jedrzejczak W, Gordon S. Cytokine regulation of the macrophage (M phi) system studied using the colony stimulating factor-1-deficient op/op mouse. *Physiol. Rev*. 1996 Out;76(4):927-947.
 251. Stanley E, Lieschke GJ, Grail D, Metcalf D, Hodgson G, Gall JA, et al. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major

- perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994 Jun 7;91(12):5592-5596.
252. Cook AD, Braine EL, Hamilton JA. Stimulus-dependent requirement for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in inflammation. *J. Immunol.* 2004 Oct 1;173(7):4643-4651.
253. Hamilton JA. GM-CSF in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol.* 2002 Ago;23(8):403-408.
254. Akagawa KS. Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages. *Int. J. Hematol.* 2002 Jul;76(1):27-34.
255. Xu W, Schlagwein N, Roos A, van den Berg TK, Daha MR, van Kooten C. Human peritoneal macrophages show functional characteristics of M-CSF-driven anti-inflammatory type 2 macrophages. *Eur. J. Immunol.* 2007 Jun;37(6):1594-1599.
256. Ritter U, Frischknecht F, van Zandbergen G. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? *Trends Parasitol.* 2009 Nov;25(11):505-510.
257. Bianchi SM, Prince LR, McPhillips K, Allen L, Marriott HM, Taylor GW, et al. Impairment of apoptotic cell engulfment by pyocyanin, a toxic metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2008 Jan 1;177(1):35-43.
258. Khanapure SP, Garvey DS, Janero DR, Letts LG. Eicosanoids in inflammation: biosynthesis, pharmacology, and therapeutic frontiers. *Curr Top Med Chem.* 2007;7(3):311-340.
259. Schneider C, Boeglin WE, Yin H, Stec DF, Voehler M. Convergent oxygenation of arachidonic acid by 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2. *J. Am. Chem. Soc.* 2006 Jan 25;128(3):720-721.
260. Hara S, Kamei D, Sasaki Y, Tanemoto A, Nakatani Y, Murakami M. Prostaglandin E synthases: Understanding their pathophysiological roles through mouse genetic models. *Biochimie.* 2010 Feb 14.
261. Tanaka K, Suemasu S, Ishihara T, Tasaka Y, Arai Y, Mizushima T. Inhibition of both COX-1 and COX-2 and resulting decrease in the level of prostaglandins E2 is responsible for non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-dependent exacerbation of colitis. *Eur. J. Pharmacol.* 2009 Jan 28;603(1-3):120-132.
262. Subbaramaiah K, Telang N, Ramonetti JT, Araki R, DeVito B, Weksler BB, et al. Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 1996 Oct 1;56(19):4424-4429.
263. Burleigh ME, Babaev VR, Oates JA, Harris RC, Gautam S, Riendeau D, et al. Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice. *Circulation.* 2002 Apr 16;105(15):1816-1823.
264. Kraus VB. Cyclooxygenase-2 inhibitors and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the management of arthritis. *Foot Ankle Clin.* 2003 Jun;8(2):187-200, vii.
265. Bozza PT, Payne JL, Morham SG, Langenbach R, Smithies O, Weller PF. Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation: cyclooxygenase-independent inhibition

- by aspirin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996 Oct 1;93(20):11091-11096.
266. Bozza PT, Bandeira-Melo C. Mechanisms of leukocyte lipid body formation and function in inflammation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2005 Mar;100 Suppl 1:113-120.
267. D'Avila H, Melo RCN, Parreira GG, Werneck-Barroso E, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *J. Immunol.* 2006 Mar 1;176(5):3087-3097.
268. D'Avila H, Roque NR, Cardoso RM, Castro-Faria-Neto HC, Melo RCN, Bozza PT. Neutrophils recruited to the site of *Mycobacterium bovis* BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and prostaglandin E production by macrophages. *Cell. Microbiol.* 2008 Dec;10(12):2589-2604.
269. Mattos KA, D'Avila H, Rodrigues LS, Oliveira VGC, Sarno EN, Atella GC, et al. Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *J. Leukoc. Biol.* 2010 Mar;87(3):371-384.
270. Virchow R. *Die krankhaften Geschwülste*. Berlin, Germany, August Hirschwald, 208.
271. Sakurai I, Skinsnes OK. Lipids in leprosy. 2. Histochemistry of lipids in human leprosy. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 1970 Dec;38(4):389-403.
272. Kurahara H, Shinchi H, Mataka Y, Maemura K, Noma H, Kubo F, et al. Significance of M2-Polarized Tumor-Associated Macrophage in Pancreatic Cancer. *J. Surg. Res* [Internet]. 2009 Jun 16.
273. Nomura Y, Takeuchi M, Yoshida S, Sugita Y, Niino D, Kimura Y, et al. Phenotype for activated tissue macrophages in histiocytic necrotizing lymphadenitis. *Pathol. Int.* 2009 Sep;59(9):631-635.
274. Komohara Y, Ohnishi K, Kuratsu J, Takeya M. Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *J. Pathol.* 2008 Sep;216(1):15-24.
275. Jullien D, Sieling PA, Uyemura K, Mar ND, Rea TH, Modlin RL. IL-15, an immunomodulator of T cell responses in intracellular infection. *J. Immunol.* 1997 Jan 15;158(2):800-806.
276. Maeurer M, Seliger B, Trinder P, Gerdes J, Seitzer U. Interleukin-15 in mycobacterial infection of antigen-presenting cells. *Scand. J. Immunol.* 1999 Sep;50(3):280-288.

Anexo 1

Artigo Submetido a Journal of innate immunity

Thalidomide modulates *M. leprae*-induced NF- κ B and TNF α secretion

Maristela de Oliveira Hernandez^{1*}, Tatiana de Oliveira Fulco^{1*}, Renata de Meirelles Santos Pereira², Paulo Redner^{1, 2}, Roberta Olmo Pinheiro¹, Euzenir Nunes Sarno¹, Ulisses Gazos Lopes², Elizabeth Pereira Sampaio¹

1. Leprosy Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

2. Laboratory of Molecular Parasitology, Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

**These authors contributed equally to this work.*

Running title: Thalidomide modulates *M. leprae* response

Key words: NF- κ B, TNF α , thalidomide, *M. leprae*, leprosy

Send correspondence to: Elizabeth Pereira Sampaio

Leprosy Laboratory

Oswaldo Cruz Foundation

Avenida Brasil 4365, Manguinhos

Cep 21040-360 – Rio de Janeiro, RJ – Brazil

Fax: (55 - 21) 2270 9997

e-mail: esampaio@ioc.fiocruz.br

ABSTRACT

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*. It is widely accepted that TNF α plays a critical role in the development of tissue and nerve damage in leprosy and in the pathogenesis of the episodes of acute inflammatory reaction and erythema nodosum leprosum. Mycobacteria are also known to induce nuclear translocation of NF- κ B, which is a group of dimeric transcription factors composed of various combinations of members of the NF- κ B/Rel family. Thalidomide (N- α -phthalimidoglutarimide) is known to inhibit pro-inflammatory cytokines, while its TNF α modulating property seems to be greatly related to drug activity. Here we asked whether thalidomide presents an inhibitory effect on NF- κ B induced by *M. leprae*. We found that thalidomide reduces *M. leprae*-induced TNF α production through NF- κ B inhibition. Definition of the activation mechanisms in cells stimulated with *M. leprae* can lead to the development of new therapy applications to control the inflammatory manifestations due to TNF α response and NF- κ B activation observed in leprosy and in leprosy reactions.

INTRODUCTION

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* that affects the skin and peripheral nerves. The disease presents a clinical spectrum that correlates with the immune response of the host to the pathogen [1]. It is widely accepted that TNF α plays a critical role in the development of tissue and nerve damage in leprosy and in the pathogenesis of the episodes of acute inflammatory reaction (reversal reaction [RR] and erythema nodosum leprosum [ENL]) [2]. These episodes may occur during the chronic course of the disease and are treated either with steroids and/or thalidomide. The clinical benefits of thalidomide in ENL have been attributed to its ability to inhibit TNF α secretion both *in vitro* and *in vivo* [2, 3], among other attributions.

Nuclear factor- κ B (NF- κ B) constitutes a group of dimeric transcription factors composed of various combinations of members of the NF- κ B/Rel family. NF- κ B proteins are usually found in the cytoplasm in association with inhibitory proteins (inhibitory κ B factors or simply I κ Bs). Degradation of I κ Bs allows NF- κ B to translocate to the nucleus, bind to DNA binding sites, and regulate the transcription of a large number of genes including cytokines, chemokines, and antimicrobial peptides [4].

Mycobacteria and their cell wall components, such as lipoarabinomannan, have been described to induce NF- κ B nuclear translocation [5, 6]. In our previous work we showed that *M. leprae* also induces activation of NF- κ B complexes in a human Schwannoma cell line [7].

Thalidomide (N- α -phthalimidoglutarimide) is a known anti-angiogenic, anti-tumor, and anti-proliferative agent, widely used for the treatment of several immunological disorders, mainly leprosy reaction (ENL) and cancers [8]. It is also known to inhibit pro-inflammatory cytokines while its TNF α modulating property seems to be greatly related to drug activity [3, 9]. Thalidomide inhibits TNF α via enhanced degradation of the TNF α mRNA [10, 11]. Also, it has

been described to inhibit NF- κ B activation in response to different stimuli and in a variety of cell types [12, 13].

Thus, we asked whether thalidomide presents an inhibitory effect on NF- κ B induced by *M. leprae*. Here we show that *M. leprae* leads to nuclear translocation of NF- κ B that is essential for mycobacteria-induced TNF α response in human cells and that thalidomide modulates both *M. leprae*-induced NF- κ B and TNF α secretion *in vitro*.

MATERIAL AND METHODS

Studied population: A total of 13 leprosy patients who attended the Leprosy Outpatient Unit, Leprosy Laboratory, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil, were enrolled in the study. Patients (11 males, 2 females) were diagnosed according to Ridley and Jopling classification [1], were multibacillary (bacillary index > 0), and were previously treated with multidrug therapy, as recommended by the World Health Organization. Blood from healthy donors (n=5) was obtained from the Hemotherapy Unit, Clementino Fraga Filho Hospital, Federal University of Rio de Janeiro. After informed consent, venous blood was withdrawn from all individuals and experiments were performed.

Cell isolation and culture condition: Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from heparinized venous blood in heparin under endotoxin-free conditions through Ficoll-Hypaque (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) density centrifugation. PBMC were suspended at 10^6 cells/ml in RPMI 1640 medium supplemented with 100U/ml penicillin, 100mg/ml streptomycin, 2mM L-glutamine, 10% FCS (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), and subsequently cultured in 24-well plates (Costar Corporation, Cambridge, MA) at 37°C. For *in vitro* stimulation, whole *M. leprae* (irradiated bacteria, 2×10^9 bacteria/mg provided by Dr. P. Brennan, Microbiology Department, Colorado State University, Fort Collins, CO) was used at 1 or 10 μ g/ml

(multiplicity of infection, MOI, 2 and 20, respectively); Lipopolisaccharide (LPS) from *Salmonella Minnesota* Re 595 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) was used at 1 μ g/ml.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and supershift assay: PBMC (10^7 cells) were cultured in Teflon beakers (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ) and treated as already described [14]. After the stimulation period, cells were washed in PBS when nuclear protein extracts were obtained and EMSA and supershift assays were performed, as detailed elsewhere [7, 15].

Detection of NF- κ B translocation by flow cytometry: PBMC were maintained in culture for 2h, wells were washed, and the resulting adherent monocyte population stimulated with *M. leprae* at 1 or 10 μ g/ml. After 1h, nuclei from the adherent cells were obtained by using 200 μ L Pipes–Triton buffer (10mM Pipes, 0.1M NaCl, 2mM MgCl₂ and 0.1% Triton X-100; Sigma) in PBS (30min, 4°C), washed, and stained with anti-p65 monoclonal or isotype control antibodies (5mg/ml; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Nuclei were subsequently incubated with FITC-conjugated goat anti-mouse anti-Ig antibody and counterstained with propidium iodide (1mg/ml; Sigma). Samples were analyzed by flow cytometry on a FACS Calibur (BD Biosciences, San Jose, CA). A total of 10^4 events were recorded for each sample [16].

Cytokine detection: For detection of TNF α , culture supernatants were harvested 20-24h after cell stimulation and stored at -20°C until use. Cytokine levels were assayed by a commercial specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and processed according to the manufacturer's specifications (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN). Detection limit of the assay was 4 pg/ml.

Immunofluorescence and confocal microscopy: Monocytes settled on glass coverslips were stimulated with the mycobacteria for 1h, washed and fixed in paraformaldehyde 3.7%. Cells were permeabilized with PBS-0.5% Triton X-100, labeled with a primary antibody against phospho-p65 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), followed by incubation with the secondary antibody

(Chemicon International, Temecula, CA). Nuclei were stained with DAPI and images were acquired on a Laser Scanning Confocal Microscopy LSM 510-META (Zeiss, Thornwood, NY).

Luciferase assay: To measure NF- κ B transcriptional activity, THP-1 cells were co-transfected using FUGENE 6 reagent (Roche, Madison, Wisconsin) with 750 ng IgK-IFN-LUC (kindly provided by Dr. David Baltimore, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge) and 250 ng pRL-CMV plasmids (Promega, Madison, Wisconsin). After incubation with thalidomide and *M. leprae* at 10 μ g/ml, cells were then washed with PBS, lysed according to Dual Luciferase System protocol (Promega), and analyzed in TD-20/20 Luminometer (Turner Designs, Sunnyvale, CA).

Statistical analysis: Results are expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed by using one-way ANOVA test. Flow cytometry data were analyzed using a paired *t* test (InStat/Prism software; GraphPad Software, San Diego, CA). Differences were significant at $p < 0.05$.

RESULTS

M. leprae* induces NF- κ B nuclear translocation in primary human cells *in vitro

NF- κ B activation was investigated through EMSA in freshly isolated PBMCs obtained from leprosy patients and normal donors, following *in vitro* stimulation with *M. leprae*. Enhanced NF- κ B binding was observed in nuclear cell extracts from stimulated cultures when compared to non-stimulated cells (Fig.1A). NF- κ B/DNA binding induced by the mycobacteria showed to be specific, as bands were not observed in the presence of the mutant probe. Results were similar when using cells from patients or healthy donors.

To characterize the protein composition of the NF- κ B complex, specific antibodies against the NF- κ B subunits were used in the supershift assay. As shown in Figure 1B, antibodies against p65 and p50 subunits led to slower migrating complexes in the gels. Addition of anti-p50 antibody

shifted both complexes in stimulated cells (*M. leprae* and LPS) whereas antibody against the p65 protein shifted the top complex only (Fig.1B). Antibodies against p52 or c-Rel proteins did not modify the pattern of complex migration (not shown). We observed the formation and nuclear localization of NF- κ B complexes composed mainly of p65/p50 and p50/p50 dimers. We then evaluated NF- κ B p65 nuclear translocation in adherent monocytes by flow cytometry and observed a total of $60.2\pm 7.4\%$ p65 labeled cells in the *M. leprae*-stimulated cultures vs. $31.3\pm 4.1\%$ in the control wells ($p=0.03$; Fig.1C, lower panel). Accordingly, mean fluorescence intensity (MFI) was 33 ± 4.1 and 19.3 ± 3 , respectively (Fig.1C). Confocal microscopy confirmed, at a single cell level, the nuclear translocation of the p65 protein triggered by *M. leprae* in the monocyte cultures (Fig.2).

Activation of NF- κ B is essential for *M. leprae*-induced TNF α production

To investigate whether NF- κ B is involved in *M. leprae*-induced TNF α secretion, monocytes were pre-incubated with SN50, and then stimulated with the mycobacteria. Cells pre-treated in the presence of *M. leprae* with SN50 showed impaired p65 nuclear staining ($p<0.05$; Fig.3A). This was not observed when we used the mutated peptide SN50m. As shown in Figure 3B, TNF α levels in culture supernatants that lasted 20 to 24h following mycobacteria stimulation (1150 ± 44 pg/ml) were significantly lower in the presence of the NF- κ B inhibitor (15 ± 4.1 pg/ml; $p<0.001$). Addition of SN50m did not affect the mycobacteria-induced response ($p>0.05$). Previous work demonstrated that inhibition of the proteasome interfered with *M. leprae*-induced cytokine release [17]. In this study, we pre-incubated the cells with MG132 (4 μ M) and observed, with flow cytometry, that the p65 staining was also decreased in the treated mycobacteria-stimulated wells (Fig.3C; $p=0.03$).

Thalidomide reduces NF- κ B activation and the production of TNF α *in vitro*

To investigate whether thalidomide can interfere with the NF- κ B activity induced by *M. leprae*, PBMC were stimulated with the mycobacteria in the presence of the drug (25 μ g/ml) and assayed by EMSA. Pre-treated cultures showed decreased NF- κ B nuclear translocation in response to *M. leprae* (Fig.4A). When assayed by flow cytometry (Table 1), a lower p65 staining was also observed in the thalidomide-treated cells. MIF was enhanced (27.9 \pm 4.4) following addition of *M. leprae*, and such response was down-regulated in the presence of thalidomide (16 \pm 3.1; p=0.007). To evaluate the NF- κ B transcriptional activity, we did a reporter assay using a plasmid with binding sites for NF- κ B and a constitutively active plasmid for normalization. The treatment with *M. leprae* induced the NF- κ B transcription activity, which was repressed when cells were previously treated with thalidomide (Fig.4B). Viability of the cells in culture was not affected by thalidomide (not shown). Secretion of TNF α in the stimulated cells was reduced in the 20-hour cultures treated with thalidomide (p<0.01; Fig.4C).

DISCUSSION

Accumulating evidence suggests that production of TNF α in response to *M. leprae* infection can contribute to the pathology of leprosy [2, 18]. However, the intracellular mechanisms leading to mycobacteria-induced cytokine response are not yet fully characterized. Results from our group [19] and from others indicate that *M. leprae* triggers the TLR2 signaling pathway [20, 21] and as shown herein it enhances both the nuclear translocation and the DNA binding activity of NF- κ B p65/p50 and p50/p50 complexes in primary human cells. Our results also implicate the involvement of NF- κ B with the *M. leprae*-induced TNF α release *in vitro*.

Here we showed that *M. leprae* induces NF- κ B activation in primary human cells (PBMCs and monocytes) and that thalidomide can suppress mycobacteria-induced NF- κ B *in vitro*. We also

found that both hetero and homodimer forms of NF- κ B were inhibited and showed the reduced TNF α response. The ability of thalidomide to down-regulate *M. leprae*-induced NF- κ B activity poses a broader picture for the potent inhibitory effect this drug has over controlling the inflammatory manifestations of leprosy. Previous data from our group showed that thalidomide inhibits the complex p50/p50 and abolishes *M. leprae*-induced gene transcriptional repression in a human Schwann cell line [7]. These results suggest that the inhibitory effect of thalidomide over *M. leprae* stimulation is not cell-type specific.

The effect of thalidomide on NF- κ B was not observed in response to LPS [13] or Phorbol Myristate Acetate (PMA)-stimulated cells [21]. It has been suggested that the drug's ability to modulate gene expression through suppression of NF- κ B might be related to the pathway that is activated by the inducer [13]. However, in a more recent study it has been described that thalidomide inhibits LPS-induced TNF α production and NF- κ B activation in RAW 264.7 cells by preventing phosphorylation of I κ B α and I κ B kinases (IKK- α and β), via down-regulation of MyD88 [22].

The ubiquitin-proteasome pathway controls various cellular processes and modulates NF- κ B regulation through proteolytic processing of NF- κ B precursors, polyubiquitination, and degradation of the inhibitory protein I κ B α . We have also shown herein that inhibition of proteasome reduces NF- κ B activity in response to *M. leprae*, and that this inhibition is related with the lower induced cytokine production reported previously [17].

Further experiments are still necessary to clarify the molecular mechanisms by which thalidomide modulates *M. leprae*-induced NF- κ B and whether it occurs through multiple mechanisms.

Our data show that thalidomide reduces *M. leprae*-induced TNF α production through NF- κ B inhibition. Definition of the activation mechanisms in cells stimulated with *M. leprae* can lead to the development of new therapy applications to control the inflammatory manifestations due to TNF response and NF- κ B activation observed in leprosy and in leprosy reactions.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to J.A.C. Nery and A.M. Sales at the Leprosy Outpatient Unit, FIOCRUZ, to E.B. Oliveira and R. Teles for technical assistance, to P.A. Manso for assistance with the confocal experiments, and to Dr. David Baltimore for the plasmid supply. This study was supported in part by CNPq Fellowship Program and CNPq Research Grant, Brazil.

REFERENCES

1. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1966;34:255-73.
2. Sarno EN, Sampaio EP. The role of inflammatory cytokines in the tissue injury of leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1996;64:S69-73.
3. Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, Cohn ZA, Kaplan G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *J Exp Med* 1991;173:699-703.
4. Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002;2:725-34.
5. Zhang Y, Broser M, Rom WN. Activation of the interleukin 6 gene by *Mycobacterium tuberculosis* or lipopolysaccharide is mediated by nuclear factors NF-IL6 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:2225-9.
6. Toossi Z, Hamilton BD, Phillips MH, Averill LE, Ellner JJ, Salvekar A. Regulation of nuclear factor-kappa B and its inhibitor I kappa B-alpha/MAD-3 in monocytes by *Mycobacterium tuberculosis* and during human tuberculosis. *J Immunol* 1997;159:4109-16.
7. Pereira RM, Calegari-Silva TC, Hernandez MO, Saliba AM, Redner P, Pessolani MC, Sarno EN, Sampaio EP, LopesUG. *Mycobacterium leprae* induces NF-kappaB-dependent transcription repression in human Schwann cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;335:20-6.
8. Eisen T, Boshoff C, Mak I. Continuous low dose thalidomide: a phase II study in advanced melanoma, renal cell, ovarian and breast cancer. *Br J Cancer* 2000;82:812-7.

9. Zwingenberger K, Wenendt S. Immunomodulation by thalidomide: systematic review of the literature and of unpublished observations. *J Inflamm* 1995;46:177-211.
10. Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinas A, Frindt P, Smith KA, Kaplan G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *J Exp Med* 1993;177:1675-80.
11. Kim YS, Kim JS, Jung HC, Song IS. The effect of thalidomide on the stimulation of NF-kappaB activity and TNF-alpha production by lipopolysaccharide in a human colonic epithelial cell line. *Mol Cells* 2004;17:210-6.
12. Keifer JA, Guttridge DC, Ashburner BP, Baldwin Jr AS. Inhibition of NF-kappa B activity by thalidomide through suppression of IkappaB kinase activity. *J Biol Chem* 2001;276:22382-7.
13. Majumdar S, Lamothe B, Aggarwal BB. Thalidomide suppresses NF-kappa B activation induced by TNF and H2O2, but not that activated by ceramide, lipopolysaccharides, or phorbol ester. *J Immunol* 2002;168:2644-51.
14. Hernandez MO, Neves I, Sales JS, Carvalho DS, Sarno EN, Sampaio EP. Induction of apoptosis in monocytes by *Mycobacterium leprae* in vitro: a possible role for tumour necrosis factor-alpha. *Immunology* 2003; 109(1):156-64.
15. Scheinman RI, Gualberto A, Jewell CM, Cidowski JA, Baldwin Jr AS. Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappaB by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol* 1995;15:943-53.
16. Cognasse F, Sabido O, Béniguel L, Genin C, Garraud O. A flow cytometry technique to study nuclear factor-kappa B (NFkappaB) translocation during human B cell activation. *Immunol Lett* 2003;90:49-52.
17. Fulco TO, Lopes UG, Sarno EN, Sampaio EP, Saliba AM. The proteasome function is required for *Mycobacterium leprae*-induced apoptosis and cytokine secretion. *Immunol Lett* 2007;110:82-5.
18. Scollard DM, Joyce MP, Gillis TP. Development of leprosy and type 1 leprosy reactions after treatment with infliximab: a report of 2 cases. *Clin Infect Dis* 2006;43:e19-22.
19. Oliveira RB, Ochoa MT, Sieling PA, Rea TH, Rambukkana A, Sarno EN, Modlin RL. Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy. *Infect Immun* 2003;71:1427-33.
20. Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, Liu PT, Cole ST, Godowski PJ, Maeda Y, Sarno EN, Norgard MV, Brennan PJ, Akira S, Rea TH, Modlin

- RL. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med* 2003;9:525-32.
21. Rowland TL, McHugh SM, Deighton J, Ewan PW, Dearman RJ, Kimber I. Differential effect of thalidomide and dexamethasone on the transcription factor NF-kappa B. *Int Immunopharmacol* 2001;1:49-61.
22. Noman ASM, Koide N, Hassan F, I-E-Khuda I, Dagvadorj J, Tumurkhuu G, Islam S, Naiki Y, Yoshida T, Yokochi T. Thalidomide inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α production via down-regulation of MyD88 expression. *Innate Immun* 2009;15:33-41.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. *M. leprae* induces NF- κ B nuclear translocation in primary human cells. (A) PBMC were stimulated or not (control) with *M. leprae* 1 and 10 μ g/ml (ML, MOI 2, and 20, respectively) for 1h when nuclear proteins were extracted, incubated with a DNA probe containing a wild-type or mutant (Mut) NF- κ B-binding site and analyzed by EMSA; (B) Nuclear extracts from cells stimulated with *M. leprae* (10mg/ml) and LPS (1mg/ml) were pre-incubated with antibodies against the p65 and p50 subunits of the NF- κ B complex and analyzed in supershift assays. Data are representative of 5 individual experiments; (C) Flow cytometry analysis of p65 subunit assayed in isolated nuclei from monocyte cultures stimulated with *M. leprae*. Histograms from one representative experiment are presented. Left panel, isotype control antibody; middle panel, control cells; right panel, *M. leprae*-stimulated wells. Numbers represent mean fluorescence intensity and are significant in the presence of the mycobacteria ($p=0.001$). Graph shows percentage of positive labeled cells. Data are mean \pm SEM ($n=5$; $*p=0.03$).

Figure 2. Immunofluorescence staining and confocal microscopy show translocation of NF- κ B p65 subunit to the nucleus in monocyte cultures after stimulation with *M. leprae* (lower panel) as opposed to non-stimulated cells (upper panel). One experiment out of four is presented. Visualization of cells was carried out by confocal microscopy using a 40x oil immersion objective and a 2x zoom magnification.

Figure 3. NF- κ B is involved in *M. leprae*-induced TNF α response. (A) Monocytes were pre-incubated with SN50 or SN50m and cells stimulated with *M. leprae* (ML). Flow cytometry analysis of p65 subunit showed decreased mean fluorescence intensity (MIF) in *M. leprae*-stimulated cells as compared to the control (C) cells; (B) TNF α levels were evaluated in supernatants from parallel cultures maintained for 20h; (C) Monocytes pre-incubated with the proteasome inhibitor MG132 (MG) were stimulated with *M. leprae* and assayed for nuclear p65 (MIF) as above. Data are mean of 5 experiments (*p<0.05; **p<0.01).

Figure 4. Thalidomide down-regulates NF- κ B activation and TNF α production. (A) PBMC were pre-incubated with thalidomide (THAL, 25mg/ml) for 1h and stimulated with *M. leprae* (ML). Nuclear proteins were extracted, incubated with a DNA probe containing a wild-type or mutant (Mut) NF- κ B-binding site and analyzed by EMSA. Data are representative of 4 experiments; (B) THP-1 cells were transiently transfected using a reporter plasmid containing NF- κ B consensus-binding sites upstream of firefly luciferase reporter gene and a constitutive active reporter containing renilla luciferase gene. Figure shows control cells, cells treated with *M. leprae* alone (ML), with thalidomide alone (THAL), or thalidomide plus *M. leprae* (ML + THAL). Whole cell lysates were prepared and analyzed for luciferase activity; (C) TNF α was assessed in the 20h culture supernatants. C = unstimulated cells. Data are mean \pm SEM (n=4; *p<0.05, **p< 0.01).

Figure 1

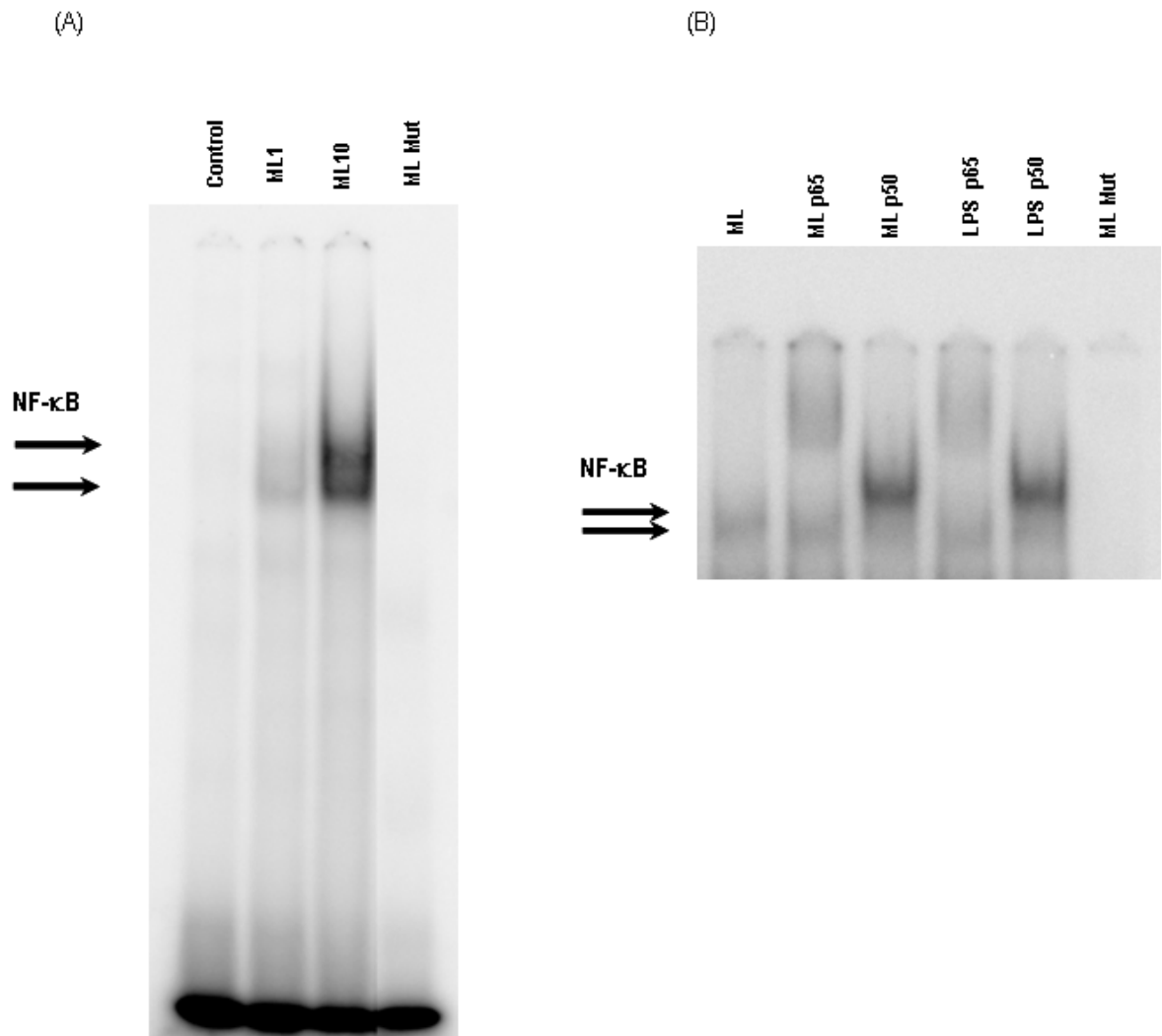


Figure 1

(C)

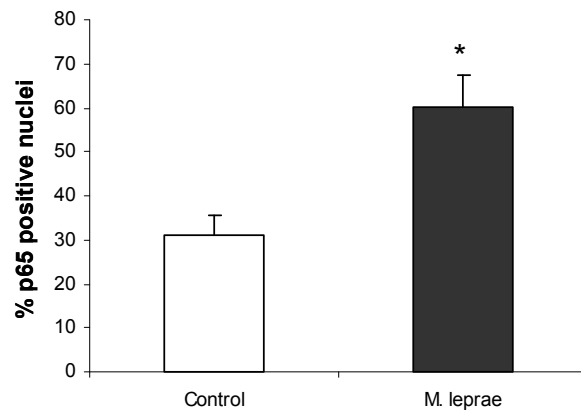
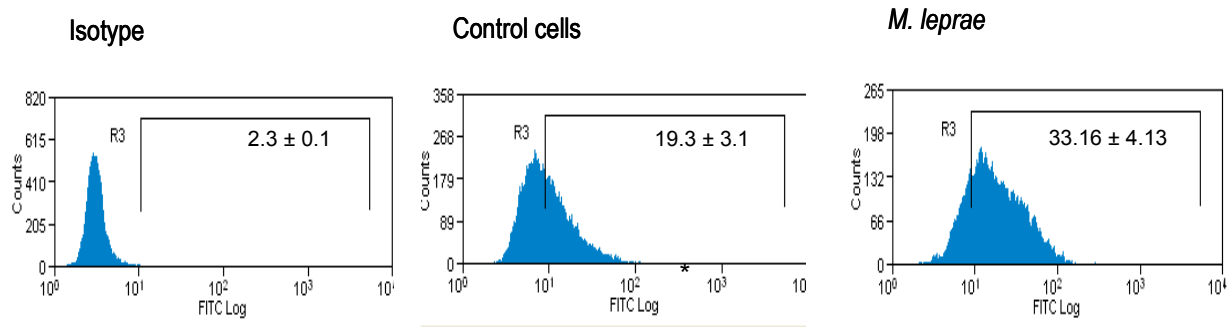
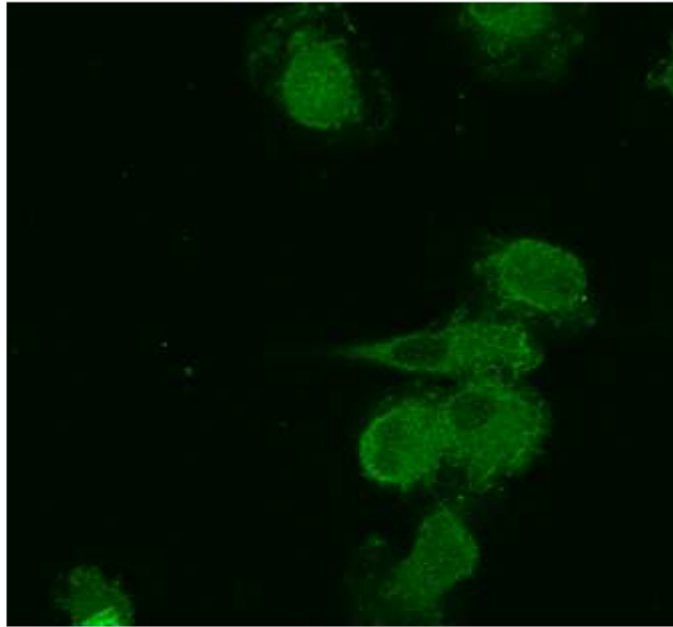


Figure 2

Control



M. leprae

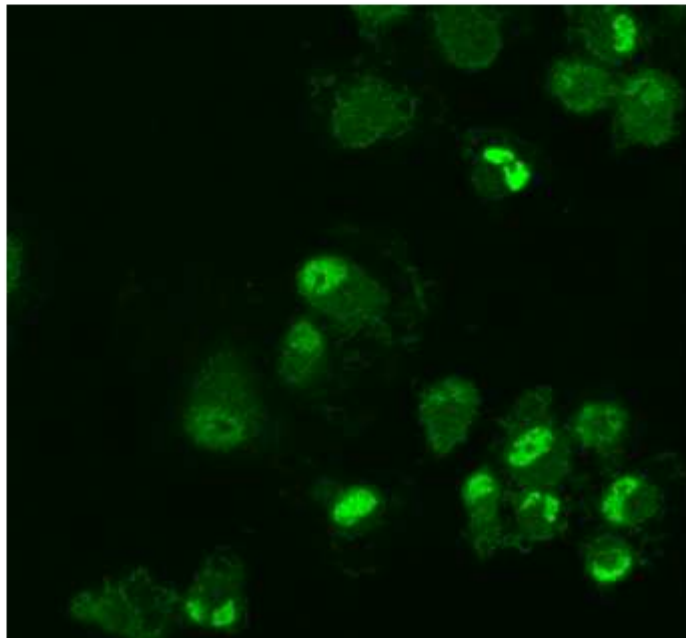
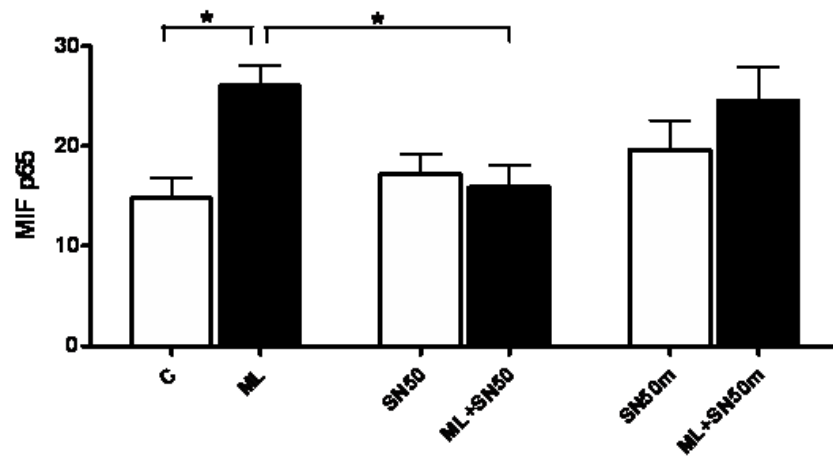


Figure 3

(A)



(B)

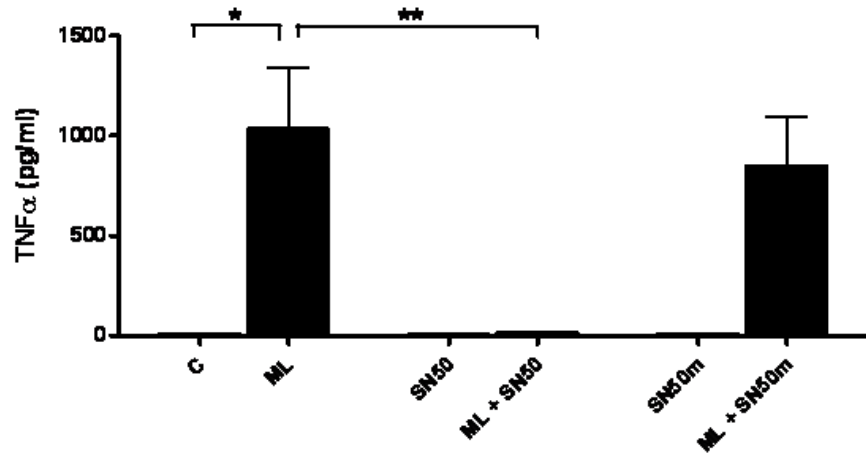


Figure 3

(C)

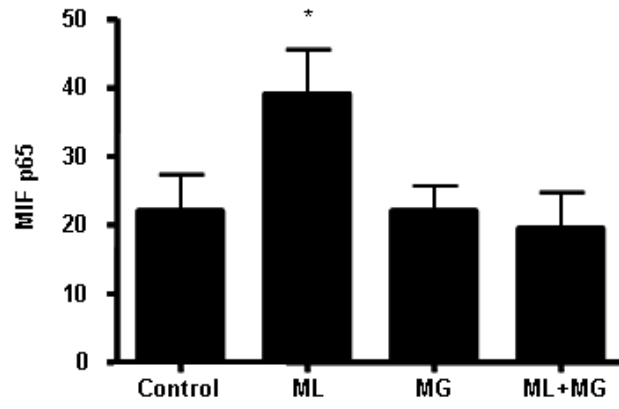
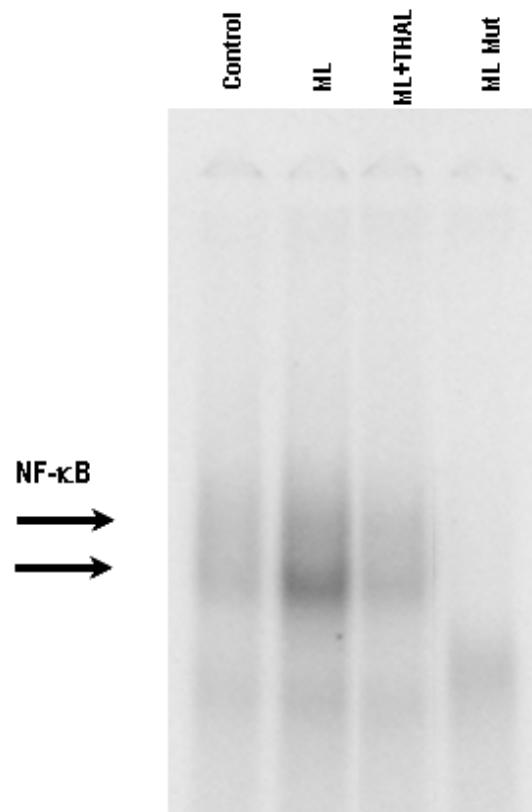
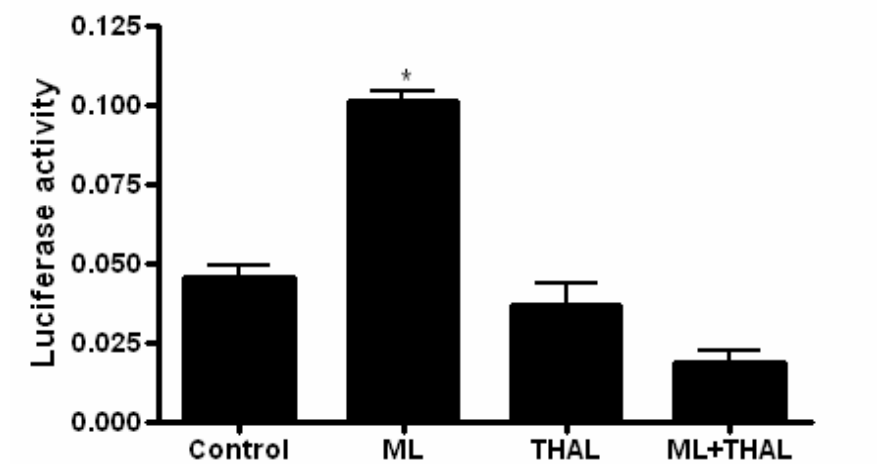


Figure 4

(A)



(B)



(C)

