

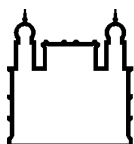
**MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**AVALIAÇÃO DO PAPEL FUNCIONAL DE IDO-1 E DE SEUS
METABÓLITOS NA IMUNOPATOGENESE DA HANSENÍASE**

JÉSSICA ARAUJO DA PAIXÃO DE OLIVEIRA

**Rio de Janeiro
Maio de 2022**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

JÉSSICA ARAUJO DA PAIXÃO DE OLIVEIRA

Avaliação do papel funcional de IDO-1 e de seus metabólitos na imunopatogênese da Hanseníase

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

Orientador (es): Prof. Dr. Roberta Olmo Pinheiro

RIO DE JANEIRO

Maio de 2022

Araujo da Paixão de Oliveira, Jéssica.

Avaliação do papel funcional de IDO-1 e de seus metabólitos na imunopatogênese da Hanseníase / Jéssica Araujo da Paixão de Oliveira. - Rio de Janeiro, 2022.

126 f.; il.

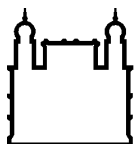
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2022.

Orientadora: Roberta Olmo Pinheiro.

Bibliografia: f. 82-96

1. Indoleamina 2,3 dioxigenase. 2. Célula dendrítica. 3. Hanseníase. I. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/Icict/Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Igor Falce Dias de Lima - CRB-7/6930.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: JÉSSICA ARAUJO DA PAIXÃO DE OLIVEIRA

Avaliação do papel funcional de IDO-1 e de seus metabólitos na imunopatogênese da Hanseníase

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Roberta Olmo Pinheiro

Aprovada em: 30/ 05/ 2022

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Marcia de Berredo Pinho Moreira - **Presidente** (Instituto Oswaldo Cruz)

Prof. Dr. Herbert Leonel de Matos Guedes (Instituto Oswaldo Cruz)

Prof. Dra. Alessandra D' Almeida Filardy (Universidade Federal do Rio de Janeiro)

SUPLENTE:

Prof. Dra. Flávia Ribeiro Gomes (Instituto Oswaldo Cruz)

Prof. Dra. Thais Porto Amadeu (Universidade do Estado do Rio de Janeiro)

Rio de Janeiro, 30 de maio de 2022

A Deus e à minha família por sempre estarem comigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem ele nada seríamos.

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

À minha orientadora, Dr^a Roberta Olmo Pinheiro, por todo companheirismo profissional e pessoal ao longo desses anos de laboratório.

Às minhas amigas de profissão e de vida, Tamiris Lameira, Mariana Athaide, Ana Carolina e Mayara Mendes. A pós-graduação é árdua, mas se você tiver amigos de verdade ao seu lado você passará por dificuldades sorrindo, amo vocês.

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

À Dr^a Verônica por todo cuidado, exemplo e toda ajuda em todos os momentos.

Às funcionárias Eliane e Andressa por todo afeto ao longo desses anos.

Aos queridos amigos Pedro Henrique e Katherine por todo carinho e cuidado durante esse período no laboratório.

Aos pós-docs Mayara Barbosa, Beatriz Junqueira, Rhana Prata, Tatiana Silva, e Bruno Silva, por todos os momentos que se dedicaram aos meus experimentos e sanaram minhas dúvidas.

Aos alunos de iniciação científica e mestrandos Jéssica Brandão, Isabela Forasteiro, e também aos que já passaram pelo laboratório e também contribuíram muito para todo este trabalho e por todas as risadas nas 'horas vagas'.

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

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

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

À minha mãe que não me deixara desistir em nenhum momento, pois é a pessoa que mais acredita em mim nessa vida. Minha rainha!

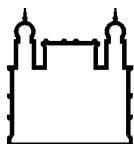
A toda minha família que sempre esteve comigo em todos os momentos da minha vida, sempre incentivaram todas as minhas escolhas.

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

A CAPES, CNPq e ao IOC pelo apoio financeiro.

*“A vida é uma jornada, ela não leva a um destino exatamente,
mas a uma transformação.”*

Filme Para Salvar uma Vida



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

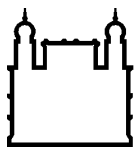
Avaliação do papel funcional de IDO-1 e de seus metabólitos na imunopatogênese da Hanseníase

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Jéssica Araujo da Paixão de Oliveira

Os metabólitos de triptofano e a Indoleamina 2,3 Dioxigenase-1 (IDO-1) estão envolvidos tanto em ambientes microbicidas quanto em ambientes tolerogênicos, e diversos trabalhos do nosso grupo demonstraram que essa enzima é diferencialmente regulada nas diferentes formas clínicas da hanseníase. Esse estudo teve como objetivo investigar avaliar o papel de IDO-1 e dos metabólitos do triptofano na imunopatogênese da Hanseníase. Para isso, pacientes participantes do estudo foram recrutados no Ambulatório Souza Araújo (ASA) da Fiocruz e os *buffy coats* foram obtidos de doadores saudáveis pelo serviço de hemoterapia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), os monócitos foram obtidos a partir de células mononucleares derivadas de monócitos (PBMCs) por seleção positiva. Para diferenciar as mDCs, os monócitos foram estimulados com GM-CSF e IL-4 durante 6 dias. O fenótipo destas células e a expressão de IDO-1 foram avaliados por citometria de fluxo. A atividade de IDO-1 foi avaliada por HPLC e a produção de citocinas nos sobrenadantes foi determinada por ELISA. A imunofluorescência foi utilizada para as análises de expressão de IDO-1 e CD1a nas formas clínicas na hanseníase. O espectrofotômetro foi utilizado para a análise da concentração de NO (Óxido Nítrico) e atividade de Arginase-1 (Arg-1). A viabilidade de *M. leprae* foi realizada utilizando a técnica de RT-PCR. Para um estudo mais robusto, paralelamente ao estímulo do *M. leprae* utilizamos as frações de membrana (MLMA) e solúvel (MLSA). O estímulo com *M. leprae* foi capaz de aumentar a expressão da proteína IDO-1 e sua atividade em mDCs. Entre os estímulos estudados, o MLMA induziu a produção de citocinas pró-inflamatórias em mDCs, enquanto que MLSA induziu a produção de citocinas anti-inflamatórias. A ausência de TLR2 em culturas de mDCs levou a diminuição da atividade de IDO-1 induzida por *M. leprae* e MLMA, mostrando o envolvimento de TLR2 na indução de IDO-1. O bloqueio do TNF em mDCs estimuladas por *M. leprae* e suas frações levou a diminuição da atividade de IDO-1. Nossos dados demonstraram que a pré-incubação de mDCs com *M. leprae* induziu um aumento na frequência de células T reg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ em culturas estimuladas com *M. leprae* e MLSA quando comparadas com as culturas não estimuladas, o que foi revertido na presença do inibidor de IDO-1, o 1 metil triptofano (1-MT). Foram observadas diferenças morfológicas e fenotípicas entre as mDCs de pacientes paucibacilares e multibacilares, a expressão e atividade de IDO-1 foi aumentada em pacientes multibacilares quando comparado aos paucibacilares, e a concentração de NO e atividade de Arg-1 foi aumentada em pacientes paucibacilares. Observou-se que os metabólitos 3-HAA e QUIN afetavam a viabilidade das mDCs, e também foi mostrado que IDO-1 e metabólitos do triptofano são importantes para a sobrevivência do bacilo. Além disso, esses metabólitos modularam a produção de CXCL-10, IL-10 e TNF. Em conjunto, nossos dados mostram que IDO-1 e os metabólitos do triptofano estão envolvidos na imunopatogênese da hanseníase, sendo capazes de mediar os mecanismos tolerogênicos observados na forma multibacilar e ao mesmo tempo mediar os mecanismos microbicidas observados na forma paucibacilar.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Evaluation of the functional role of IDO-1 and its metabolites in the immunopathogenesis of leprosy

ABSTRACT

PHD THESIS IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

Jéssica Araujo da Paixão de Oliveira

Tryptophan metabolites and Indoleamine 2,3 Dioxygenase-1 (IDO-1) are involved in both microbicidal and tolerogenic environments, and several studies by our group have shown that this enzyme is differentially regulated in different clinical forms of leprosy. This study aimed to investigate the role of IDO-1 and tryptophan metabolites in the immunopathogenesis of leprosy. For this, patients participating in the study were recruited at the Souza Araújo Ambulatory (ASA) of Fiocruz and the buffy coats were obtained from healthy donors by the hemotherapy service of the Clementino Fraga Filho University Hospital of the Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), monocytes were obtained from monocyte-derived mononuclear cells (PBMCs) by positive selection. To differentiate mDCs, monocytes were stimulated with GM-CSF and IL-4 for 6 days. The phenotype of these cells and the expression of IDO-1 were evaluated by flow cytometry. IDO-1 activity was evaluated by HPLC and cytokine production in the supernatants was determined by ELISA. Immunofluorescence was used to analyze the expression of IDO-1 and CD1a in clinical forms of leprosy. The spectrophotometer was used to analyze the concentration of NO (Nitric Oxide) and Arginase activity. The viability of *M. Leprae* was performed using the RT-PCR technique. For a more robust study, in parallel with the stimulation of *M. leprae*, we used membrane (MLMA) and soluble (MLSA) fractions. Stimulation with *M. leprae* was able to increase the expression of the IDO-1 protein and its activity in mDCs. Among the stimuli studied, MLMA induced the production of pro-inflammatory cytokines in mDCs, while MLSA induced the production of anti-inflammatory cytokines. The absence of TLR2 in mDC cultures led to a decrease in IDO-1 activity induced by *M. leprae* and MLMA, showing the involvement of TLR2 in the induction of IDO-1. Blockade of TNF in mDCs stimulated by *M. leprae* and its fractions led to a decrease in IDO-1 activity. Our data demonstrated that pre-incubation of mDCs with *M. leprae* induced an increase in the frequency of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ reg T cells in cultures stimulated with *M. leprae* and MLSA when compared to unstimulated cultures, which was reversed in the presence of the IDO-1 inhibitor, 1-methyl tryptophan (1-MT). Morphological and phenotypic differences were observed between the mDCs of paucibacillary and multibacillary patients, the expression and activity of IDO-1 was increased in multibacillary patients when compared to paucibacillary patients, and the concentration of NO and Arg-1 activity was increased in paucibacillary patients. The metabolites 3-HAA and QUIN were observed to affect the viability of mDCs, and it was also shown that IDO-1 and tryptophan metabolites are important for the survival of the bacillus. Furthermore, these metabolites modulate the production of CXCL-10, IL-10 and TNF. Together, our data show that IDO-1 and tryptophan metabolites are involved in the immunopathogenesis of leprosy, being able to mediate the tolerogenic mechanisms observed in the multibacillary form and at the same time mediate the microbicidal mechanisms observed in the paucibacillary form.

ÍNDICE

RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Hanseníase: aspectos históricos e culturais	1
1.2 Hanseníase: aspectos imunes e clínicos	2
1.3 Diagnóstico	7
1.4 Transmissão	9
1.5 Tratamento	11
1.6 Epidemiologia da Hanseníase	14
1.7 Biologia do bacilo	17
1.8 Aspectos gerais da interação <i>M. leprae</i> - célula hospedeira e a importância das células dendríticas	20
1.9 Papel deIDO e de seus metabólitos: aspectos gerais e importância na hanseníase	24
1.10 Justificativa	31
2 OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo Geral	33
2.2 Objetivos Específicos	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Biossegurança e Permissão ética	34
3.2 Obtenção das buffy coats	37
3.3 Separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)	37
3.4 Obtenção de monócitos e células dendríticas derivadas de monócitos (mDCs).....	38
3.5 Estimulação das culturas de PBMCs, monócitos e células dendríticas	38
3.6 Obtenção dos linfócitos autólogos.....	39
3.7 Co-cultura de mDCS com linfócitos autólogos e marcação celular avaliada por citometria de fluxo	39

3.8	Ensaio Imunoenzimático	40
3.9	Citometria Intracelular	40
3.10	Extração de RNA	40
3.11	Quantificação de ácidos nucleicos	41
3.12	Análise da integridade do RNA	41
3.13	Tratamento do RNA com DNase.....	42
3.14	Síntese de cDNA.....	42
3.15	Viabilidade do <i>M. leprae</i>	43
3.16	Cromatografia Líquida de alta Eficiência (HPLC)	43
3.17	Imunofluorescência.....	44
3.18	Marcação celular com Anexina V e Iodeto de Propídeo ...	44
3.19	Detecção de Óxido Nítrico.....	45
3.20	Atividade de arginase	45
3.22	Análises Estatísticas	45
4	RESULTADOS	46
4.1	<i>M. leprae</i> e MLMA aumentam a atividade deIDO-1 em mDCs.....	46
4.2	TNF é importante na indução da atividade daIDO-1 por <i>M. leprae</i> e suas frações em mDCs	48
4.3	TLR2 é importante para a indução da atividade deIDO-1 em mDCs.....	54
4.4	<i>M. leprae</i> e suas frações influenciam o perfil tolerogênico dos linfócitos.....	56
4.5	Atividade deIDO-1 aumentada em pacientes multibacilares.....	58
4.6	Metabólitos da via das quinureninas afetam a viabilidade das mDCs.....	62
5	DISCUSSÃO	72
6	CONCLUSÃO	81

7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
8	ANEXOS	97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Espectro de formas clínicas da hanseníase segundo a classificação de Ridley & Jopling, 1966.	4
Figura 2. Hanseníase tuberculóide.	5
Figura 3. Hanseníase lepromatosa.	6
Figura 4. <i>M. leprae</i> visto em globia e isolados.	8
Figura 5. Diagrama representativo das diferentes formas de <i>M. leprae</i> .	8
Figura 6. Esquema da Poliquimioterapia Única – PQT-U.	13
Figura 7. Distribuição geográfica dos novos casos de Hanseníase ao redor do mundo.	15
Figura 8. Taxa de detecção geral de casos novos de hanseníase por 100.000 habitantes segundo região de residência.	16
Figura 9. Taxa de detecção de novos casos de Hanseníase em função da unidade de federação e capital de residência.	17
Figura 10. Modelo esquemático do envelope celular de <i>M. leprae</i> .	18
Figura 11. Via da quinurenina no metabolismo do triptofano.	26
Figura 12. Visão esquemática do papel central do IDO-1 nas respostas imunes a infecções bacterianas.	27
Figura 13. Efeito neurotóxico e neuroprotetor dos metabólitos do triptofano (TRP).	30
Figura 14. Expressão e atividade do IDO-1 em mDCs.	48
Figura 15. MLMA induziu um aumento na frequência de células IDO-1 ⁺ TNF- α ⁺ .	49
Figura 16. <i>M. leprae</i> e suas frações não foram capazes de induzir um aumento na frequência de células IDO-1 ⁺ IL-10 ⁺ .	50
Figura 17. Efeitos antagônicos das frações de <i>M. leprae</i> na indução de citocinas por mDCs.	51
Figura 18. Importância do TNF na indução da atividade de IDO-1 em mDCs estimuladas por <i>M. leprae</i> e suas frações antigênicas.	53

Figura 19. TLR2 é importante na indução da atividade do IDO-1 em mDCs.	55
Figura 20. <i>M. leprae</i> e MLSA induzem um aumento na expressão de células Treg.	57
Figura 21. mDCs de pacientes multibacilares induzem um aumento da expressão de células CD1a ⁺ IDO-1 ⁺ .	59
Figura 22. Atividade de IDO-1 aumentada em pacientes multibacilares.	60
Figura 23. Concentração de NO aumentada em pacientes paucibacilares.	61
Figura 24. Atividade de Arg-1 aumentada em pacientes paucibacilares e multibacilares.	62
Figura 25. 3-HAA e QUIN afetam a viabilidade das mDCs.	63
Figura 26. Metabólitos do triptofano são importantes para a sobrevivência de <i>M. leprae</i> .	66
Figura 27. Produção de CXCL-10 por mDCs infectadas ou não com <i>M. leprae</i> .	67
Figura 28. Produção de IL-10 por mDCs infectadas ou não com <i>M. leprae</i> .	69
Figura 29. Produção de TNF por mDCs infectadas ou não com <i>M. leprae</i> .	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados dos pacientes e voluntários envolvidos no estudo.	34
Tabela 2. Estímulos utilizados nas culturas celulares.	38

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- 1-MT - 1 Metil triptofano
- 3-HAA - do inglês, *3-hydroxyanthranilic acid*
- 3-HAO - do inglês, *3-hydroxyanthranilate oxidase*
- 3-HK - do inglês, *3-hydroxykynurenine*
- 5-HTP - do inglês, *5-hydroxytryptophan*
- AA - do inglês, *Anthranilic acid*
- AFMID - do inglês, *Kynurenina formamidase*
- AG - Arabinogalactana
- Ag+Ac - Antígeno+Anticorpo
- AIDS - do inglês, *Acquired immune deficiency syndrome*
- ANOVA - Análise de Variância
- AP - do inglês, *Picolinic acid*
- APC - do inglês, *Antigen presenting cells*
- Arg-1 - Arginase-1
- ASA - Ambulatório Souza Araújo
- BAAR - Bacilo álcool-ácido resistente
- BB - Borderline borderline
- BL - Borderline lepromatosa
- BT - Borderline tuberculóide
- cDNA - do inglês, *Complementary deoxyribonucleic acid*
- CMV - Citomegalovírus
- Conitec - Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde
- DC SIGN - do inglês, *Dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin*
- DCs - do inglês, *Dendritic cells*
- DD - dendrócitos dermais
- DNA - do inglês, *Deoxyribonucleic acid*
- EDTA - do inglês, *Ethylenediamine tetraacetic acid*
- ELISA - do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- ENH - Eritema nodoso hanseniano
- ERK - do inglês, *Extracellular signal-regulated kinases*
- FITC - do inglês, *Fluorescein isothiocyanate*

FoxP3 - do inglês, *Forkhead box protein P3*
FoxO1 - do inglês, *Forkhead box protein O1*
GM-CSF- do inglês, *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
HBsAg - do inglês, *Hepatitis B surface antigen*
HCV - do inglês, *Hepatitis C vírus*
HD - do inglês, *Healthy donor*
HIV - do inglês, *Human immunodeficiency virus*
HLA-DR - do inglês, *Human leukocyte antigen DR*
HPLC- do inglês, *High performance liquid chromatography*
IDO - Indoleamina 2, 3 dioxigenase
IFN- γ - Interferon gama
IL- Interleucina
iNOS - do inglês, *Nitric oxide synthase*
IRF3 - do inglês, *Interferon regulatory factor 3*
IOC - Instituto Oswaldo Cruz
JAK/STAT - do inglês, *Janus kinase and Signal transducer activator of transcription*
KAT I ou KAT II - do inglês, *Kynurenine aminotransferase I or II*
KMO - do inglês, *Kynurenina 3-monooxygenase*
KYNA - do inglês, *Kynurenic acid*
KYNU - do inglês, *Kynureninase*
LAM - Lipoarabinomanana
LC - do inglês, *Langerhans cells*
LL - Lepromatoso
LM - Lipomanana
LPS - Lipopolissacarídeo
ManLAM - do inglês, *Mannose-capped lipoarabinomannan*
mDCs - do inglês, *Dendritic cells derived from monocytes*
MEL - Melatonina
MHC - do inglês, *Major histocompatibility complex*
MIF - do inglês, *Mean fluorescence intensity*
MLMA - do inglês, *Cell Membrane Fraction Mycobacterium leprae*
MLSA - do inglês, *Cytosol Fraction Mycobacterium leprae*
MMPI - do inglês, *Major membrane protein I*

MMP-II - do inglês, *Major membrane protein II*
MOI - do inglês, *Multiplicity of infection*
MOPS - do inglês, *3-(N- morpholino) - propanesulfonic acid*
mRNA - do inglês, *Messenger ribonucleic acid*
NF- κ B - do inglês, *Factor nuclear kappa B*
NIH - do inglês, *National Institutes of Health*
NMDA - N-metil D-Aspartato
NO - do inglês, *Nitric oxide*
OMS - Organização Mundial de Saúde
PAMPs - do inglês, *Pattern-associated molecular patterns*
PB - Pacientes paucibacilares
PBMC - do inglês, *Peripheral blood mononuclear cells*
PBS - do inglês, *Phosphate buffered saline*
PCR - do inglês, *Polymerase chain reaction*
pDCs - do inglês, *Plasmacytoid dendritic cells*
PDIMs - do inglês, *Phthiocerol dimycocerosates*
PG - Peptídeoglicana
PGL1 - do inglês, *Phenolic glycolipid-1*
PIMs - do inglês, *Phosphatidyl-myo-inositol mannosides*
PL - do inglês, *Phospholipids*
PQT - Poliquimioterapia
PQT-U - Poliquimioterapia Única
Kyn – do inglês, *kynurenine*
QUIN - do inglês, *Quinolinic acid*
RNA - do inglês, *Ribonucleic acid*
ROS - do inglês, *Reactive oxygen species*
RPM - Rotação por minuto
RR - Reação reversa
RT-PCR - do inglês, *Real-time polymerase chain reaction*
SFB - Soro fetal bovino
SNP - do inglês, *Single nucleotide polymorphism*
TCA - do inglês, *Trichloroacetic acid*
TGF- β - do inglês, *Transforming growth factor beta*
TLR - do inglês, *Toll-like receptors*

TMMs - do inglês, *Trehalose monomycolate*

TNF - do inglês, *Tumor necrosis factor alpha*

Tregs - do inglês, *T regulatory cells*

Tryp - do inglês, *tryptophan*

TT - Tuberculóide

WHO - do inglês, *World Health Organization*

XA - do inglês, *Xanthurenic acid*

xg - Velocidade de sedimentação em unidade gravitacional

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hanseníase: aspectos históricos e culturais

A hanseníase é uma doença infecciosa humana de curso crônico. A doença resulta da infecção por *Mycobacterium leprae* ou *Mycobacterium lepromatosis* (Han & Silva, 2014). *M. leprae* é um parasito intracelular obrigatório que infecta predominantemente macrófagos, células endoteliais e células de Schwann, sendo a única espécie de micobactéria capaz de infectar nervos periféricos (Scollard *et al.*, 2006). Mais recentemente foi descoberto que por esse motivo ao longo do curso da infecção os pacientes podem desenvolver lesões com falta de sensibilidade, deformidades e alto poder incapacitante, principal responsável pelo estigma e discriminação das pessoas acometidas pela doença. As sequelas podem ser por vezes permanentes, comprometendo a vida do paciente e sua inserção ou manutenção no mercado de trabalho (MS, 2002).

A palavra *lepra* teve origem em traduções bíblicas do hebraico para o grego. No entanto, em 1976, no Brasil, esse termo foi substituído por hanseníase, em homenagem a Gerhard Hansen, que descreveu o patógeno causador da doença (Trautman, 1984). Essa substituição foi devido à conotação pejorativa do termo anterior, numa tentativa de amenizar o forte estigma social remetido à palavra. Entretanto, somente em 1995, com a lei federal 1.010/95, foi terminantemente proibida a utilização do termo *lepra* no Brasil (Monot *et al.*, 2005).

A doença é associada a um grande estigma social com registros que datam de mais de dois mil anos. A hanseníase parece ter se originado na África Oriental ou na Índia (Monot *et al.*, 2005). Os primeiros registros escritos com descrições clínicas geralmente aceitas como “lepra” datam de 600 a. C. A doença se espalhou com sucessivas migrações humanas, e acredita-se que exploradores europeus e o provável comércio de escravos introduziram a hanseníase na África Ocidental e nas Américas nos últimos 500 anos (Bennett *et al.*, 2008).

De acordo com Bennett *et al.* (2008) desde os tempos antigos, existe uma ligação entre a hanseníase e o pecado. Devido as potenciais deformidades graves e desfiguração associadas a doenças não tratadas, existe uma história

de medo, estigma e repulsa em relação às vítimas ao longo do tempo e em todas as culturas. Nessa época, os indivíduos que tinham a doença eram excluídos da sociedade ou enviados aos leprosários, pois a doença era vinculada a personificação de forças malignas, ao pecado, castigo divino ou impureza. Por medo de contágio, os enfermos eram proibidos de entrar em igrejas, tinham que usar vestimentas especiais e carregar sinetas que alertassem sobre sua presença (Fiocruz, 2013).

No Brasil, os primeiros casos de hanseníase foram notificados na década de 60, na cidade do Rio de Janeiro, onde, mais tarde, foi criado o primeiro lazareto, local destinado a abrigar os doentes com “lepra”, que também eram chamados na época de lazarentos ou doentes de Lázaro. (Andrade, 1996; Eidt, 2004).

Pela falta de conhecimento específico, a hanseníase era muitas vezes confundida com outras doenças, principalmente doenças dermatológicas e venéreas, por isso o preconceito em relação ao seu portador; tendo em vista que sua transmissão pressupunha um contato corporal, muitas vezes de natureza sexual e, portanto, relacionado ao pecado (Andrade, 1996).

De acordo com Penna *et al.* (2011) a hanseníase figura entre as doenças de notificação compulsória pela sua magnitude, incapacidades e deformidades. A doença apresenta vulnerabilidade pela inexistência de vacina específica, acometendo, sobretudo, adultos jovens, acarretando altos custos econômicos, tanto diretos, relacionados ao tratamento e à reabilitação, quanto indiretos, pela perda de anos produtivos, além do estigma social ainda associado à doença.

Mesmo com uma etiologia já bem descrita, ainda hoje existe uma hostilidade legalizada pela qual passam os pacientes com hanseníase. Alguns países ainda possuem legislação que permite discriminação e segregação dos pacientes. Essas leis vão desde a retirada do paciente do convívio social até a falta de oferta de tratamento pelo poder público (Zamparoni, 2017).

1.2 Hanseníase: aspectos imunes e clínicos

Por apresentar um amplo espectro de manifestações clínicas, imunológicas e histopatológicas, a compreensão da hanseníase requer um

sistema de classificação. As classificações mais usadas no Brasil são as de Madri (1953) e de Ridley e Jopling (1966).

Na Conferência de Madri em 1953, foi sugerida uma classificação que dividiu a doença em quatro formas clínicas. Dois grupos estáveis: tuberculóide e lepromatoso (virchowiano) e dois grupos instáveis: indeterminado e borderline (dimorfo) (Basombrio *et al.*, 1953). A forma virchowiana recebeu esse nome graças ao norueguês Rudolf Virchow, que publicou uma obra conhecida até os tempos atuais sobre a história da *lepra*, o que contribuiu para despertar o interesse da ciência sob a hanseníase (Bechler, 2012).

A classificação de Ridley & Jopling (1966) identifica a doença como espectral, apresentando assim dois polos extremos, de um lado os pacientes lepromatosos (LL) e de outro os pacientes tuberculóides (TT) (Figura 1). Essa classificação permitiu uma melhor compreensão dos aspectos da hanseníase, baseada em aspectos clínico-evolutivos, imunológicos, baciloscópicos e histopatológicos. Além disso, suas subdivisões possuem correlação direta com o número de bacilos detectados nas lesões, o qual é geralmente expresso como uma escala logarítmica que varia de 0 a 6 de índice baciloscópico (IB).

As manifestações clínicas polares se apresentam com nítida dicotomia da resposta imune Th1/Th2. No polo TT é caracterizado por uma resposta imune celular Th1, com citocinas como IFN- γ e IL-2, respostas de células T ao antígeno de *M. leprae*, onde os indivíduos são resistentes, apresentando lesões localizadas, bem demarcadas e com poucos bacilos. Já o polo LL a resposta é do tipo humoral Th2, com citocinas como IL-4 e IL-10 e formação de complexo de anticorpos, onde os indivíduos exibem uma forma disseminada da doença, apresentando muitos bacilos e múltiplas lesões (Misch *et al.*, 2001).

Apesar da caracterização específica nas formas polares da doença, a maioria dos pacientes se enquadram em uma forma intermediária conhecida como borderline, está ainda é subdividida em borderline lepromatosa (BL), borderline borderline (BB) e borderline tuberculóide (BT) (Scollard *et al.*, 2006). Nas formas borderlines, a resposta imune celular é mais intensa de acordo com a proximidade aos polos (Lastoria & Abreu 2013).

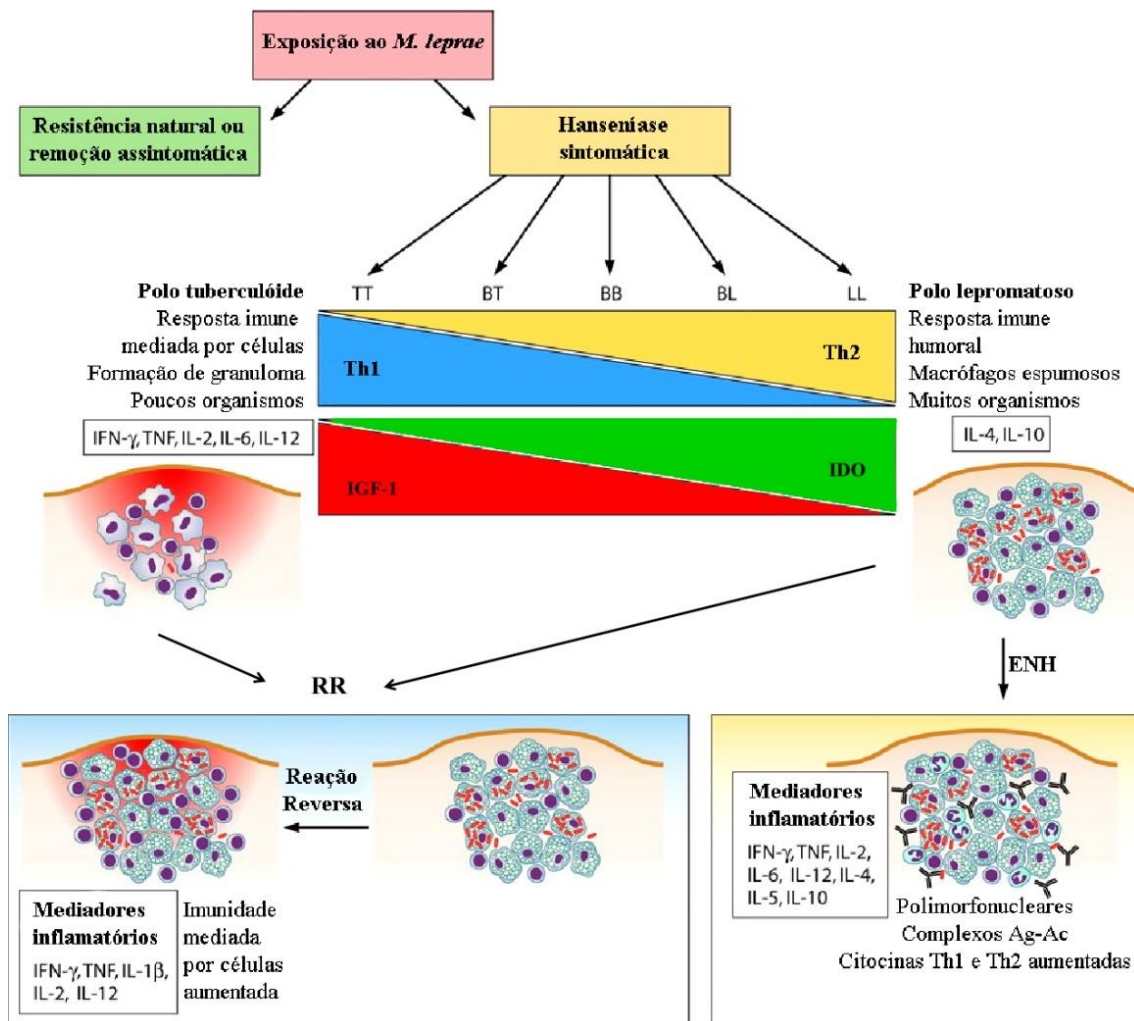


Figura 1. Espectro de formas clínicas da hanseníase segundo a classificação de Ridley & Jopling, 1966. Cerca de 95% dos indivíduos expostos à *M. leprae* são resistentes à infecção ou a removem assintomaticamente. Cerca 5 % restantes irão desenvolver a doença em uma das formas clínicas dependendo da capacidade da resposta imune mediada por células frente aos antígenos de *M. leprae*. Nos pacientes PB, o hospedeiro apresenta uma boa resposta imune celular à *M. leprae*, formando granulomas epitelióides e secretando citocinas pró-inflamatórias, combatendo eficientemente a infecção. Neste polo há um pequeno número de bacilos presentes e de lesões. Já os pacientes do polo lepromatoso apresentam uma resposta imune humoral e secreção de citocinas anti-inflamatórias. Neste polo há intensa proliferação bacilar e múltiplas lesões com a presença de macrófagos espumosos cheios de bacilos no seu interior. Os pacientes “borderline” apresentam características intermediárias, se aproximando mais de um polo ou outro de acordo com seu perfil de resposta imunológica à *M. leprae*. Durante o curso clínico da doença podem ocorrer os episódios reacionais, que são responsáveis por grande destruição de ramos nervosos e consequentes incapacidades. Há dois tipos principais: a reação reversa (RR) ou reação do tipo 1, que ocorre principalmente nas formas “borderline”, e o eritema nodoso da hanseníase (ENH) ou reação do tipo 2, que ocorre principalmente no polo lepromatoso.

Fonte: Adaptado de Misch *et al.*, 2010.

Por conta das grandes dificuldades encontradas na classificação proposta por Ridley e Jopling, esta classificação ficou restrita aos centros especializados e trabalhos de pesquisa. Mediante a isso, a OMS criou uma classificação mais simples, conhecida como classificação operacional, utilizada em áreas endêmicas para o diagnóstico e controle da doença. Esta classificação consiste em duas categorias: doença paucibacilar (PB), que inclui as formas TT e BT, e doença multibacilar (MB), que inclui as formas LL e BL. Com relação ao número de lesões os PB apresentam até cinco lesões cutâneas no total e os casos MB, seis ou mais lesões cutâneas (MS, 2010).

Os pacientes PB com alto grau de imunidade mediada por células e hipersensibilidade tardia, apresentam uma lesão única, bem delimitada com hipopigmentação central e hipoestesia. As biópsias granulomatosas revelam inflamação e raros bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) nos tecidos (Figura 2). Em contrapartida, os pacientes MB não apresentam resistência aparente a *M. leprae*, esses pacientes apresentam numerosas lesões mal demarcadas, elevadas ou nodulares em todas as partes do corpo, cujas biópsias revela camadas de macrófagos espumosos na derme contendo um grande número de bacilos e microcolônias chamadas globias (Figura 3) (Scollard *et al.*, 2006).



Figura 2. Hanseníase tuberculóide. Lesão única com bordas bem definidas e elevadas na mão. Fonte: Talhari *et al.* 2015



Figura 3. Hanseníase lepromatosa. Infiltração difusa da face com envolvimento bilateral dos pavilhões auriculares. Fonte: Talhari *et al.* 2015

Apesar de não ter sido descrita por Ridley & Jopling, uma outra forma clínica possível no curso da hanseníase é a forma neural pura, que corresponde ao desenvolvimento de neuropatia periférica na ausência de lesões cutâneas. A confirmação de um diagnóstico de neural pura requer identificação de *M. leprae* em um fragmento de qualquer nervo sensitivo afetado (Pannikar *et al.*, 1983).

Os pacientes podem ainda apresentar episódios reacionais, que são descritos como episódios agudos de inflamação associados a alterações da resposta imune, que podem ocorrer durante o curso da doença, antes, durante ou, como na maioria dos casos, após o tratamento (MS, 2002).

Existem dois tipos de episódios reacionais. A reação reversa (RR), que também é conhecida como a reação do tipo I e o Eritema nodoso lepromatoso (ENL) ou reação do tipo II. A RR é um episódio de autoreatividade dos linfócitos T aos antígenos da micobactéria, resultado de uma inflamação aguda da pele e dos nervos periféricos, ocorrendo principalmente nos pacientes borderline (Patnaik *et al.*, 2015). A reação do tipo II se manifesta em pacientes do polo lepromatoso. As lesões de pele são normalmente eritematosas e nodulares.

Ainda se observam sintomas sistêmicos, tais como febre, mal-estar, artralgia e edema, comprometendo inúmeros órgãos (Kamath *et al.*, 2014).

1.3 Diagnóstico

O diagnóstico da hanseníase é realizado através do exame clínico, quando se busca sinais dermatoneurológicos da doença. O roteiro de diagnóstico clínico constitui-se: i) história clínica e epidemiológica; ii) avaliação dermatológica (identificação de lesões de pele com alteração de sensibilidade); iii) avaliação neurológica (identificação de neurites, incapacidades e deformidades); iv) diagnóstico dos estados reacionais; v) diagnóstico diferencial; e vi) classificação do grau de incapacidade física (MS, 2002).

A baciloscopia é um exame complementar para o diagnóstico e deve ser solicitado pelo médico da unidade básica em caso de dúvida na classificação operacional, diagnóstico diferencial com outras doenças dermatoneurológicas ou em casos suspeitos de recidiva. O exame baciloscópico de esfregaços cutâneos apresenta baixa sensibilidade e alta especificidade, e ainda possui fácil execução e baixo custo (MS, 2010). O exame é realizado através da contagem de bacilos de *M. leprae* em microscópio óptico após a coloração do esfregaço pelo método de Ziehl-Nilsen) (MS, 2010b). No entanto, é válido ressaltar que existem algumas variáveis possíveis de comprometer a confiabilidade do resultado, como, por exemplo, a subjetividade da análise, as variações na coloração e no tamanho do bacilo, a qualidade óptica do microscópio e o treinamento do profissional (Sampaio, 2008).

Os bacilos podem ser observados ao microscópio de forma isolada ou em grupamentos denominados “globias”, presentes no interior de macrófagos ou das células de Schwann (Figura 4) (Hussain, 2007). Do ponto de vista morfológico, *M. leprae* pode apresentar-se nas formas de bacilo íntegro, fragmentado ou granuloso (Figura 5). Os bacilos fragmentados e os granulosos são considerados inviáveis ou mortos e são frequentemente observados em esfregaço de pacientes após término do tratamento (MS, 2010b).

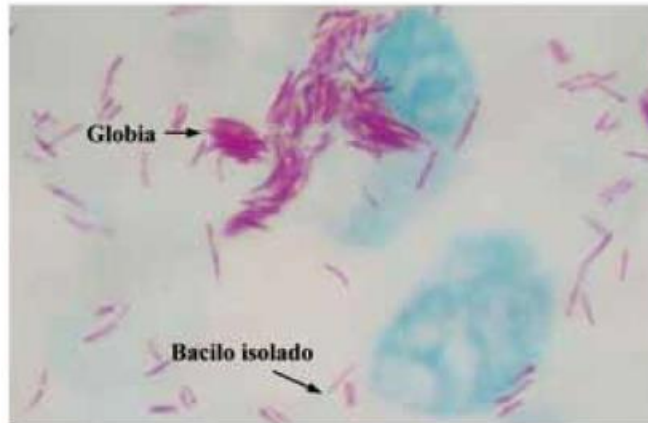


Figura 4. *M. leprae* visto em globia e isolados. (Ziehl- Neelsen 100x).

Fonte: MS, 2010b

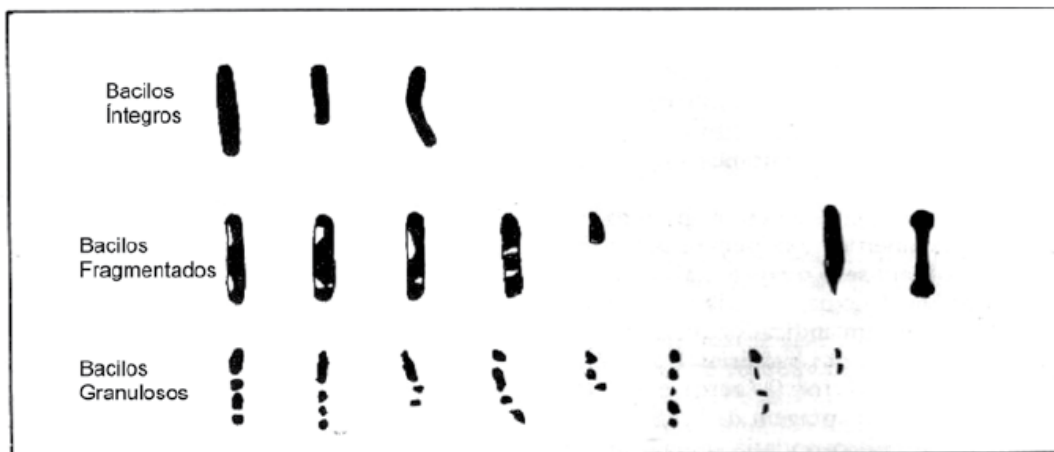


Figura 5. Diagrama representativo das diferentes formas de *M. leprae*.

Fonte: MS, 2010b

Embora raramente necessária, devido às dificuldades operacionais, a biópsia cutânea, um exame histopatológico, deverá ser feita por profissional capacitado, sendo destinada a centros especializados e trabalhos de pesquisa. Nesse caso, os bacilos presentes nas biópsias podem ser detectados através da coloração pelo método de Wade (Cocito & Delville, 1985).

O glicolípido fenólico 1 (PGL-1) é um antígeno específico de *M. leprae* e constitui 2% da massa total bacteriana, podendo ser facilmente encontrado nos tecidos infectados, sangue circulante e urina de pacientes multibacilares. A detecção do anticorpo anti-PGL-1 pode sugerir infecção por *M. leprae* (Hunter & Brennan, 1981). Ensaio imunoenzimáticos visam a detecção do antígeno PGL-1 foram desenvolvidos, esses ensaios são capazes de indicar os títulos de

anticorpos da classe IgM anti-PGL-1, que são indicativos de exposição *M. leprae*. Apesar da detecção de anticorpos anti-PGL-1 não ser utilizada como um teste de diagnóstico ela pode auxiliar neste processo junto com outros dados clínicos. Além do ELISA detecção de anti-PGL-1 também pode ser realizada através de testes de aglutinação com partículas de gelatina (MLPA), *dipstick* e através do teste fluxo lateral (Bührer-Sékula, 2008).

Além dos métodos descritos acima, os testes moleculares vêm ganhando uma maior atenção atualmente, possibilitando maiores avanços nos estudos diagnósticos em hanseníase. A técnica molecular baseada em RT-PCR (do inglês, *Real-time polymerase chain reaction*) apresenta uma grande vantagem pela sua alta sensibilidade e especificidade, sem a necessidade de cultura bacteriana. Isso é muito importante para detecção de DNA do *M. leprae*, uma vez que o bacilo não é cultivável *in vitro* (Goulart *et al.*, 2007). A identificação molecular do *M. leprae* consiste na amplificação de regiões específicas do DNA do bacilo, para isso, diferentes genes-alvo de *M. leprae* têm sido utilizados e comparados, tais como o elemento repetitivo *RLEP*, *Ag85B* e o 16S RNA ribossomal (Martinez *et al.*, 2006; Martinez *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2011).

Recentemente, um novo teste diagnóstico conhecido como “Kit NAT Hanseníase” foi desenvolvido por pesquisadores da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) em parceria com o Instituto Carlos Chagas (Fiocruz Paraná) e o Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), e pode facilitar na detecção precoce da doença. Este método é baseado na técnica de RT-PCR, que permite a detecção de marcadores específicos do material genético de *M. leprae* extraído de biópsia de pele ou de nervos. O teste deve ser realizado por profissionais da área de saúde com conhecimento específico em biologia molecular, em laboratórios com infraestrutura adequada para realização de testes moleculares e o mesmo obteve o registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) recentemente (Fiocruz, 2021).

1.4 Transmissão

Existem várias teorias sobre a forma de transmissão da doença, a mais aceita é que a hanseníase é transmitida por meio de contato próximo de uma pessoa suscetível (com maior probabilidade de adoecer) com um doente com

hanseníase que não está sendo tratado. Para que essa transmissão ocorra, é necessário que haja contato direto e prolongado com o doente não tratado (Santos, Faria & Menezes, 2008).

A principal via de eliminação e infecção do indivíduo pelo bacilo, são as vias aéreas superiores: mucosa nasal e orofaringe. Existe, também, a possibilidade de um indivíduo doente e não tratado eliminar bacilos por meio das lesões de pele podendo infectar indivíduos saudáveis que não estejam com a pele íntegra (MS, 2010b).

O aparecimento da doença e suas diferentes manifestações clínicas dependem da resposta do sistema imunológico do indivíduo, frente ao bacilo, podendo ocorrer após um longo período de incubação, em média de dois a sete anos (MS, 2002).

Indivíduos PB apresentam uma resposta imunológica melhor e abrigam um pequeno número de bacilos em seu organismo que é insuficiente para infectar outras pessoas, não sendo considerados importantes fontes de transmissão da doença, no entanto, indivíduos MB, devido sua elevada carga bacilar são considerados fonte importante de infecção e manutenção da cadeia epidemiológica da doença (MS, 2010b).

M. leprae possui alta infectividade e baixa patogenicidade e isto pode ser corroborado com o fato de que mais de 95 % dos indivíduos que habitam áreas endêmicas são considerados resistentes à infecção pelo bacilo e não apresentam sintomas clinicamente detectáveis, o que sugere que a imunidade do hospedeiro desempenha um papel importante na progressão e controle da doença. Pode-se dizer que (Godal *et al.*, 1972).

Mesmo que a doença atualmente se mantenha nos países mais pobres e nas populações menos favorecidas, não se sabe ao certo o peso de variáveis como: moradia, estado nutricional, co-infecções, e infecções prévias por outras micobactérias no processo dinâmico do desenvolvimento da hanseníase (Van Beers, De Wit & Klatser, 1996). O papel de fatores genéticos, bem como a distribuição da doença em conglomerados, famílias ou comunidades com antecedentes genéticos comuns, sugere uma importante contribuição do componente genético na susceptibilidade à doença (Cardoso *et al.*, 2011). Estudos recentes sugerem que vários genes envolvidos na diferenciação e respostas Th1, Th2 e Th17 foram encontrados associados à hanseníase. (Mi *et*

al., 2020). Desse modo, a interrupção da transmissão da doença pode estar relacionada com fatores ambientais, sócio-econômicos, resposta imune e predisposição genética de cada indivíduo, representando um grande desafio para os programas de controle da doença (MS, 2002).

1.5 Tratamento

O óleo de chaulmoogra era utilizado como tratamento para os pacientes com hanseníase nos leprosários até a década de 40, esse óleo é um medicamento fitoterápico natural da Índia que era administrado através de injeções ou por via oral, e provavelmente os casos curados devido ao seu uso regrediram para cura de forma espontânea (Opromolla, 1997). Mediante aos avanços da indústria farmacêutica e das pesquisas laboratoriais, no final da década de 40 a primeira droga utilizada no tratamento da hanseníase foi a sulfona (Opromolla, 1997). Entretanto, no fim da década de 70, foram relatados vários casos de resistência medicamentosa e muitos países apresentaram taxas alarmantes de resistência secundária à sulfona (Oliveira, Oliveira e Andrade, 1989). Em vista disso, intensificou-se o temor da perda de um dos medicamentos mais importantes no tratamento da hanseníase. Conscientes disso, a Organização Mundial de Saúde (OMS), propôs, em 1977, a associação de medicamentos para o tratamento da doença; e em 1981, após avaliação de especialistas, a poliquimioterapia (PQT) passou a ser adotada em seu tratamento (Lombardi et al., 1998).

A PQT é constituída pelo conjunto dos seguintes medicamentos: rifampicina, dapsona e clofazimina, que têm efeitos bactericidas e bacteriostáticos. Esse esquema terapêutico tem sido fornecido pela OMS gratuitamente a todos os países endêmicos desde 1995 (Noordeen, 2000).

No esquema multibacilar é utilizada uma combinação da rifampicina, dapsona e de clofazimina, acondicionados numa cartela, no seguinte esquema. Rifampicina: uma dose mensal de 600 mg (2 cápsulas de 300 mg) com administração supervisionada; clofazimina: uma dose mensal de 300 mg (3 cápsulas de 100 mg) com administração supervisionada e uma dose diária de 50mg auto-administrada; e dapsona: uma dose mensal de 100mg supervisionada e uma dose diária autoadministrada; duração do tratamento: 12

doses mensais supervisionadas de rifampicina; critério de alta: 12 doses supervisionadas em até 18 meses (MS, 2002).

No antigo esquema, os pacientes PB eram tratados com uma combinação da rifampicina e dapsona, acondicionados numa cartela, no seguinte esquema: Rifampicina: uma dose mensal de 600 mg (2 cápsulas de 300 mg) com administração supervisionada; dapsona: uma dose mensal de 100mg supervisionada e uma dose diária autoadministrada.; duração do tratamento: 6 doses mensais supervisionadas de rifampicina; critério de alta: 6 doses supervisionadas em até 9 meses (MS, 2002), entretanto, em 2018, a Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde (Conitec), por meio do Relatório de Recomendação N. 399/2018², recomendou ao Ministério da Saúde a ampliação do uso do medicamento clofazimina para tratamento da hanseníase paucibacilar no âmbito do SUS, o que significa dizer que os pacientes acometidos pela forma clínica paucibacilar também deverão ser tratados com poliquimioterapia composta por três medicamentos (rifampicina + dapsona + clofazimina). A análise da Comissão ateu-se apenas à composição da associação medicamentosa, permanecendo, portanto, inalterado o tempo de tratamento, sendo de seis meses (MS, 2021b).

As prescrições para uso da associação rifampicina + dapsona + clofazimina, passaram a figurar com a denominação “Poliquimioterapia Única – PQT-U” (Figura 6), tanto para casos PB, quanto para MB, diferenciando apenas em relação ao tempo de tratamento, para PB são 6 meses e para MB são, normalmente, 12 meses (MS, 2021b).

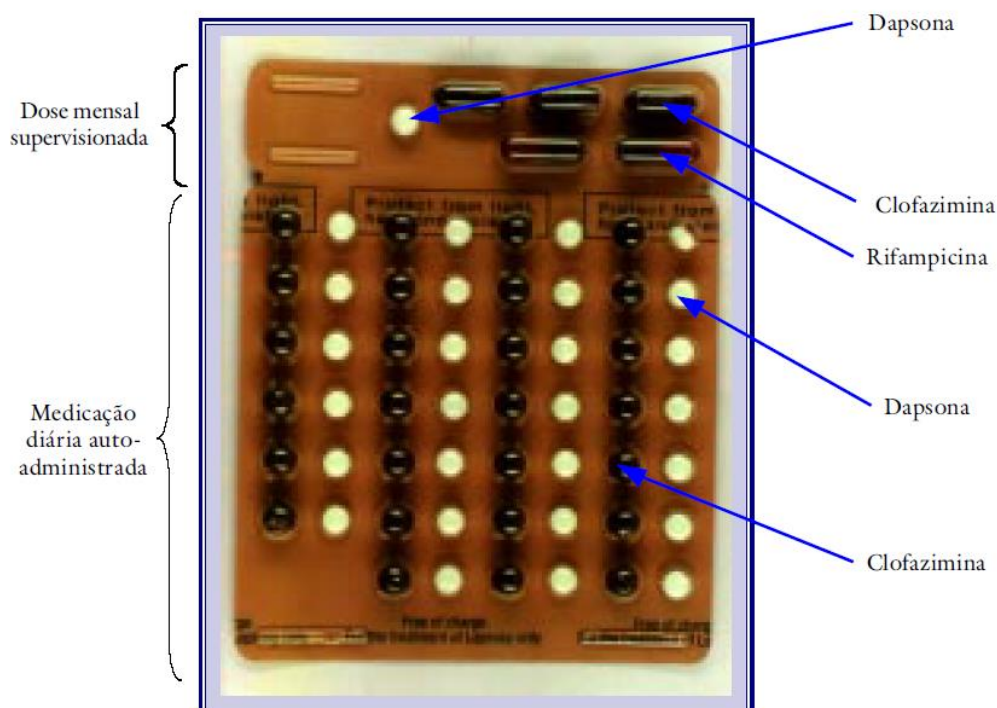


Figura 6. Esquema da Poliquimioterapia Única – PQT-U.

Fonte: MS, 2002

Após a administração do número de doses preconizadas pelo esquema terapêutico, o paciente com hanseníase recebe a denominada alta por cura, e regularidade ao tratamento, de forma que o paciente sai do registro ativo e não mais será computado nos coeficientes de prevalência da doença (MS, 2002).

O tratamento torna inviável o bacilo, porém não recupera nem reverte as deformidades físicas já instaladas. Concomitante ao tratamento farmacológico, medidas de avaliação e prevenção das incapacidades físicas e atividades de educação para a saúde, incluindo o autocuidado, devem ser desenvolvidas (Eidt, 2004).

No caso das reações, o tratamento é específico para cada tipo de episódio reacional, mas o tratamento poliquimioterápico não deve ser interrompido neste período. Na reação do tipo 1, o tratamento é realizado com corticosteróide, geralmente prednisona. Já na reação do tipo 2, tem-se a talidomida, porém alguns critérios precisam ser levados em conta por conta dos seus efeitos colaterais, como é o caso das gestantes. Devido a esses efeitos, em países a talidomida é proibida o tratamento da reação é realizado com prednisona (Naafs, 1998; Ito & Handa, 2012).

O objetivo das estratégias globais de hanseníase publicadas pela OMS é reduzir a carga da doença em todo o mundo. A detecção precoce e o tratamento imediato com a PQT são os princípios básicos do controle da hanseníase. Em suma, as estratégias se concentram em diminuir a cadeia de transmissão e detecção ativa de novos casos da doença. As recomendações incluem equidade e justiça social, enfatizando a inclusão de pessoas afetadas pela hanseníase, reduzindo o estigma e a discriminação dos indivíduos (WHO, 2021).

1.6 Epidemiologia da Hanseníase

Em 2020, foram reportados à Organização Mundial da Saúde (OMS) 127.396 casos novos da doença no mundo. Desses, 19.195 (15,1%) ocorreram na região das Américas e 17.979 foram notificados no Brasil, o que corresponde a 93,6% do número de casos novos das Américas. Brasil, Índia e Indonésia reportaram mais de 10.000 casos novos, correspondendo a 74% dos casos novos detectados no ano de 2020 (WHO, 2021). Nesse contexto, o Brasil ocupa o segundo lugar entre os países com maior número de casos no mundo, atrás apenas da Índia (Brasil, 2022).

Dados atuais sobre a distribuição geográfica dos novos casos de hanseníase em 2020 estão apresentados na Figura 7. Pode-se observar que a maioria dos países com altas taxas de detecção de novos casos concentra-se na África, Sudeste Asiático e no Brasil. Dos 127 países que notificaram em 2020, 31 notificaram 0 novos casos, 31 notificaram 1-10, 16 notificaram 11-100 e 34 notificaram 101-1000 novos casos (WHO, 2021).

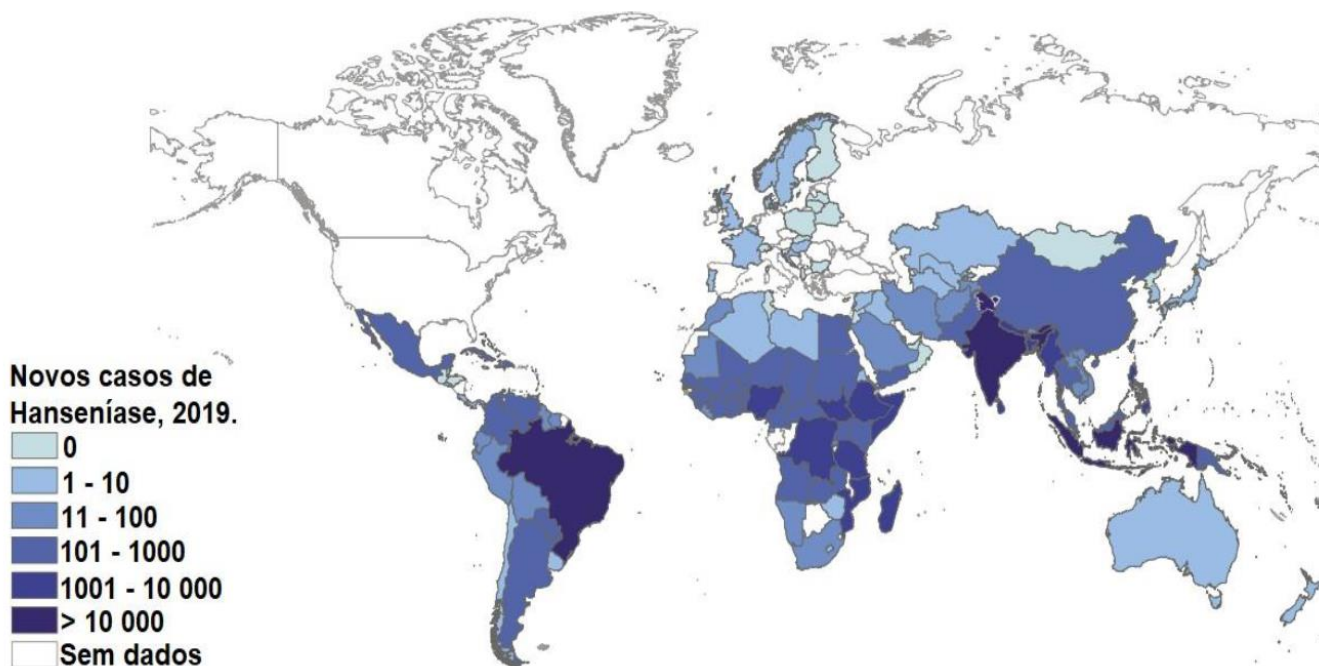


Figura 7. Distribuição geográfica dos novos casos de Hanseníase ao redor do mundo. O Brasil e a Índia são os países que apresentam as maiores taxas de detecção de novos casos. Fonte: WHO, 2021.

A detecção da hanseníase em crianças é um indicador da transmissão ativa da infecção na comunidade, importante sinalizador para o monitoramento da endemia (MS, 2020). Os dados sobre casos infantis foram fornecidos por 124 países, dos quais 62 notificaram novos casos. No ano de 2020 foram detectados 8629 casos novos em crianças, o que corresponde a 6,8% do total de casos novos (WHO, 2021). No período de 2011 a 2020, foram diagnosticados no Brasil 19.101 casos novos de hanseníase em menores de 15 anos. Em relação à taxa de detecção de casos novos nessa população, o país apresentou uma redução de 61,9%, passando de 5,22 em 2011 para 1,99 em 2020, com mudança do parâmetro muito alto para médio (Brasil, 2022).

No Brasil, entre os anos de 2011 a 2020 foram diagnosticados 284.723 casos novos de hanseníase. A taxa de detecção geral de casos novos, nesse período, apresentou uma redução de 51,9%, passando de 17,65 em 2011 para 8,49 casos por 100.000 habitantes em 2020. O parâmetro de endemicidade do país mudou de alto para médio. Essa mudança de parâmetro também foi observada em 16 Unidades da Federação (UF) no ano de 2020. Todas as regiões apresentaram redução na taxa de detecção geral de casos novos de hanseníase entre 2011 a 2020 (Figura 8) (Brasil, 2022).

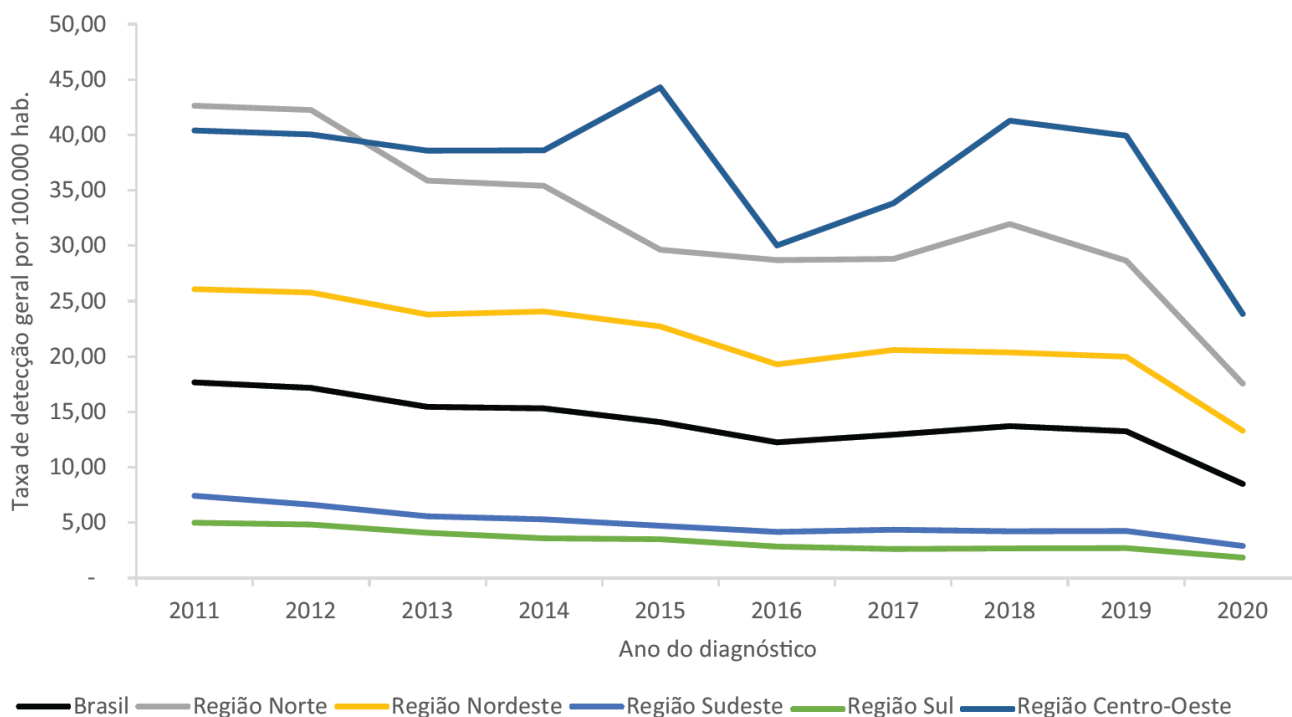


Figura 8. Taxa de detecção geral de casos novos de hanseníase por 100.000 habitantes segundo região de residência. Fonte: Brasil, 2022 (Sinan).

Em 2020, o Mato Grosso foi a UF que apresentou a maior taxa de detecção geral, 71,44 casos novos por 100.000 habitantes; sua capital, Cuiabá, registrou a taxa de 29,78 casos por 100.000 habitantes. O Tocantins ocupou a segunda posição entre as UF, com 53,95 casos novos por 100.000 habitantes, e sua capital, Palmas, registrou uma taxa de 118,51 casos por 100.000 habitantes, a maior entre as capitais do país. As UF do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, assim como suas capitais, apresentam baixa endemicidade (Figura 9).

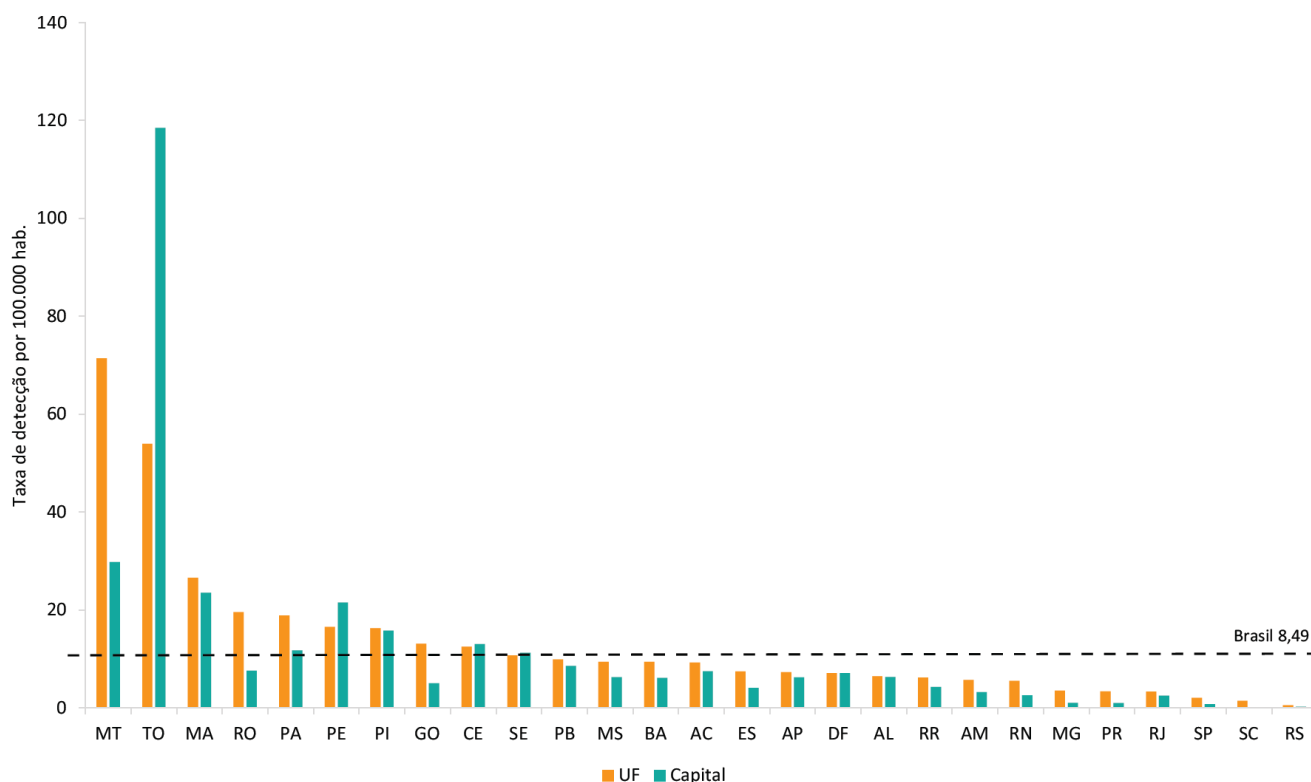


Figura 9. Taxa de detecção de novos casos de Hanseníase em função da unidade de federação e capital de residência. Número de casos novos por 100 mil habitantes. Fonte: Brasil, 2022 (Sinan).

Em função do grande impacto da pandemia de COVID-19, esses dados precisam ser avaliados com cautela nos Sistemas de Saúde. Embora se observe uma diminuição dos casos de hanseníase ao longo dos anos, a redução mais acentuada nos últimos dois anos pode estar relacionada à menor detecção de casos ocasionada pela pandemia de covid-19 (Brasil, 2022).

1.7 Biologia do bacilo

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

Apresenta-se como um bacilo reto ou levemente curvado, variando de 1 a 8 µm de comprimento e 0,2 a 0,5 µm de diâmetro. Assim como outras

micobactérias, é considerado um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), pois se cora em vermelho pela fucsina e é resistente à descoloração pela lavagem com solução álcool-ácida (Ress, 1985).

O bacilo é imóvel, divide-se por bipartição, não forma esporos, e o tempo de geração varia, em média, de 12 a 14 dias, o mais longo já relatado entre as bactérias. A temperatura ideal para o crescimento de *M. leprae* é entre 27 e 33° C, o que pode explicar a sua predileção por áreas superficiais do corpo como a pele e nervos periféricos (Shepard, 1965).

O envelope do bacilo é constituído por três compartimentos: membrana plasmática, parede celular e a cápsula e constitui 40% do peso seco da bactéria e, como para todos os membros do gênero *Mycobacterium*, contém lipídeos, glicolipídeos, proteínas e porinas. A membrana plasmática é uma bicamada assimétrica composta principalmente de fosfolipídeos e proteínas. O lipoarabinomannan (LAM), componente de *M. leprae*, encontra-se ancorado à membrana plasmática via fosfatidilinositol. A parede celular consiste de peptídeoglicana covalentemente ligada a arabinogalactana, que por sua vez se liga aos ácidos micólicos (Figura 10) (Vissa & Brennan, 2001).

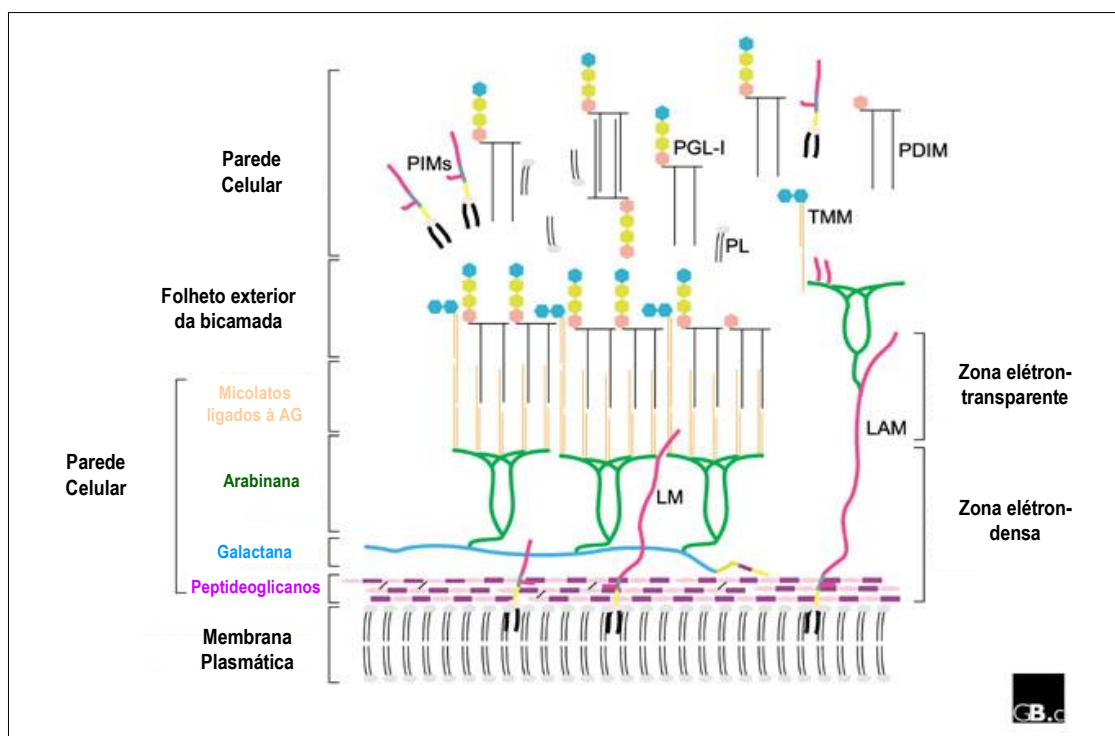


Figura 10. Modelo esquemático do envelope celular de *M. leprae*. *M. leprae* apresenta uma parede celular sobreposta à membrana plasmática. Esta parede é constituída por uma região

eletrondensa, composta por peptidoglicana, galactana, arabinomana, lipomanana, lipoarabinomana, uma região eletrtransparente, constituída por arabinogalactana ligada a micolatos, lipomanana, lipoarabinomanana, e uma cápsula formada por fosfatidilinositol manosídeos, glicolípido fenólico 1, fosfolípidos, monomicolato de trealose e ftiocerol dimicocerosato. Abreviaturas: LM, lipomanana; LAM, lipoarabinomanana; PL, fosfolípido; TMM, monomicolato de trealose; PIMs, fosfatidilinositol manosídeos; PGL-1; PDIM, ftiocerol dimicocerosato.

Fonte: Adaptado de Vissa & Brennan, 2001.

O parasito apresenta uma densa cápsula de lípidos, externa à parede celular, rica em PDIM, no glicolípido ligado a resíduos de manosil-fosfatidil-mioinositol (PIM) e em PGL-1, uma molécula exclusiva do *M. leprae* composta por um trissacarídeo, ligado a um grupamento fenólico e este a um core lipídico de ftiocerol esterificado por duas moléculas de ácido micocerosídicos. Esta cápsula vem sendo relacionada à resistência a radicais livres, permitindo a sobrevivência intracelular da micobactéria e limitando a penetração de drogas antimicrobianas (Hunter *et al.*, 1982).

Ao longo dos anos, os antígenos derivados de *M. leprae* cultivados em tatu ou de proteínas recombinantes têm sido utilizados como reagentes diagnósticos por diversos grupos de pesquisa em ensaios sorológicos. Tanto os lípidos da parede celular quanto as proteínas citosólicas têm sido estudados por sua utilidade no sorodiagnóstico (Kumar *et al.*, 2010). Descobriu-se que essas proteínas estão envolvidas em várias vias metabólicas, revelando a complexidade do envelope da célula micobacteriana (Marques *et al.*, 2008).

As proteínas presentes na fração MLMA (do inglês, *Cell Membrane Fraction Mycobacterium leprae*) foram separadas por gel de eletroforese bidimensional (2-DE) e identificadas por espectrometria de massa. Dessas proteínas, 16 eram novas, ou seja, ainda não haviam sido relatadas anteriormente. Foram identificadas, proteínas de membrana associada ao metabolismo de lipídico e respiração, além das MMP-I e MMP-II (do inglês, *Major membrane protein I and II*) que são proteínas características de membrana (Marques *et al.*, 2004).

Um outro estudo examinou as respostas sorológicas a proteínas recombinantes, bem como a antígenos de glicolípídios e carboidratos para determinar se eles são preditivos da posição de um paciente no espectro da

Hanseníase. No geral, as respostas a ML2028 (Ag85B) e ML2038 (bacterioferritina) foram consistentemente altas nos em pacientes MB e PB, e fracas ou ausentes nos controles endêmicos, enquanto as respostas a outros antígenos mostraram variabilidade considerável. A fração MLSA (do inglês, *Cytosol Fraction Mycobacterium leprae*) foi utilizada para examinar respostas ativas a anticorpos e a LAM. Pacientes MB geralmente apresentaram respostas de anticorpos muito altas para LAM (Spencer *et al.*, 2011).

Já foi demonstrada que tanto o lisado total quanto os antígenos de MLSA foram capazes de inibir a fosforilação de ERK ½ e p38 MAPK, levando à diminuição da expressão de CD25 e CD69, marcadores de ativação inicial de linfócitos, e conseqüentemente à inibição da ativação de células T *in vitro* (Dagur *et al.*, 2010).

No atual diagnóstico de Hanseníase é necessário avaliações dermatológicas e clínicas, o que dificulta sua rapidez. Assim, novos testes sorológicos baseados em antígeno proteico e ou combinações antigênicas são requeridos. Resultados mostram que imunoblot da fração MLSA apresenta uma maior ativação sorológica aos anticorpos IgG, quando comparado as frações MLMA e MLCwA (do inglês, *M. leprae total cell wall antigen*), enquanto que a fração MLMA têm maior número de antígenos para ativar IgA e IgM. Esses resultados sugerem que futuramente peptídeos poderão ser utilizados baseados em combinação sinérgica para teste sorodiagnóstico da Hanseníase (Kumar *et al.*, 2014).

Embora os testes para anticorpos IgM anti-PGL-I tenham sido favoráveis para certas aplicações no diagnóstico da Hanseníase, a maioria não é adequada para aplicação epidemiológica (Lobato *et al.*, 2011). No entanto, os dois novos antígenos, MLCwA e MLSA-LAM, um antígeno solúvel do *M. leprae* sem lipoglicanos micobacterianos, principalmente lipoarabinomanana, mostraram-se promissores em estudos de hipersensibilidade tardia DTH (do inglês, *Delayed-type hypersensitivity*) (Rivoire *et al.*, 2014).

1.8 Aspectos gerais da interação *M. leprae* - célula hospedeira e a importância das células dendríticas

Na hanseníase a resposta inata é mediada principalmente por macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (DCs). Essa resposta inicial é eficiente para detectar características dos agentes patogênicos através de estruturas conhecidas como PAMPs (do inglês, *Pattern-associated molecular patterns*) porém, os PAMPs não são exclusivos de patógenos (Iwasaki & Medzhitov, 2010). Em contrapartida, a resposta adaptativa é mediada pelos linfócitos T e B que utilizam receptores de antígeno altamente específicos (Iwasaki & Medzhitov, 2015). Sabe-se que após a ativação, as células T CD4 naíve podem se diferenciar em várias subpopulações, como: Th1, Th2, Th9, Th17 e Linfócitos T reguladores Treg (do inglês, *T regulatory cells*), que participam de diferentes tipos de respostas imunes, em função da natureza do patógeno (Zhu & Paul, 2010).

A localização do bacilo constitui um dos principais mecanismos de escape do sistema imune (Frehel & Rastogi 1987). A bactéria se protege da imunidade humoral dentro de uma célula hospedeira, nos macrófagos acredita-se que o bacilo iniba com sucesso a fusão do fagossoma com o lisossomo, evitando sua digestão pelas enzimas lisossomais (Montoya & Modlin 2010). A fagocitose de micobactérias ocorre através de receptores de manose, receptores de lectina do tipo C, como o CD209, receptores do complemento 1, 3 e 4 e receptores “scavenger”, como o CD163 (Maeda *et al.*, 2003; Moura *et al.*, 2012). A formação do fagolisossomo é essencial para liberação das enzimas digestivas, bem como as espécies reativas de oxigênio ROS (do inglês, *Reactive oxygen species*) e nitrogênio NO (do inglês, *Nitric oxide*), e sua inibição contribui para a sobrevivência do bacilo no meio intracelular onde o bacilo passa a se multiplicar (Maeda *et al.*, 2003).

Assim como os macrófagos, as DCs atuam na primeira linha de defesa do sistema imune a entrarem em contato com *M. leprae* (Modlin *et al.*, 1984). As DCs se originam na medula óssea e migram para tecidos como pele, fígado e intestino, e vão realizar um papel de vigilância imunológica. O reconhecimento e internalização de antígenos oriundos de patógenos pelas DCs ainda imaturas (iDCs) induz sua migração e maturação tornando-as aptas para a apresentação de antígenos para linfócitos através dos complexos de histocompatibilidade MHC I e MHC II (do inglês, *Major histocompatibility complex*) definido como HLA (Human Leucocyte Antigen) nos humanos (Sieling *et al.*, 1999). De acordo com

o perfil de expressão de moléculas co-estimulatórias e citocinas produzidas pelas DCs diferentes tipos de resposta imune podem ser ativados (Kalinski *et al.*, 1999).

A resposta inata é importante na definição do curso da infecção da hanseníase. Os bacilos são reconhecidos por vários receptores imunes inatos, incluindo receptores da família Toll TLR (do inglês, *Toll-like receptors*). O bacilo é reconhecido predominantemente pelo heterodímero TLR2/1 expresso na membrana de células imunes como macrófagos e DCs. Esse reconhecimento leva à ativação de vias celulares para iniciar a morte de *M. leprae* (Krutzik *et al.*, 2003). Já foi demonstrado que os receptores TLR1 e TLR2 são mais expressos em lesões de pacientes PB em comparação com lesões de MB. Além dessas células, já foi observado que as células de Schwann também podem expressar TLR2 e sua ativação contribui para o dano neurológico na Hanseníase (Oliveira *et al.*, 2003).

As DCs são caracterizadas em subpopulações e esta classificação refere-se à função, localização e expressão de moléculas em sua superfície. As Células de Langerhans (LCs) são descritas como residentes da epiderme e expressam moléculas apresentadoras de lipídeos CD1a e CD207 (Langerina) e são mais abundantes em lesões tuberculoides (Hirai *et al.*, 2016). O aumento no número de LCs foi observado nos dois tipos reações da hanseníase (Mi *et al.*, 2020).

Outra subpopulação de DCs são conhecidas como células dendríticas plasmocitoides (pDCs) que expressam CD123 e dendrócitos dermais (DDs) em sua superfície e são especializadas na produção de interferon tipo 1. Semelhante as LCs, são mais encontradas em lesões de PB em comparação com lesões de MB (Hirai *et al.*, 2016). Pode-se dizer que a atuação das pDCs podem contribuir com a predominante resposta imune celular encontrada no polo de resistência a doença devido ao seu papel de captura e apresentação antigênica nos linfonodos regionais bem como ativação dos linfócitos (Mi *et al.*, 2020).

Macrófagos e alguns subgrupos de DCs expressam em sua superfície um receptor de lectina do tipo C chamado DC-SIGN (do inglês, *Dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin*) que funciona como receptor de entrada para patógenos, e ao contrário do que foi visto para as outras subpopulações LCs e pDCs, a sua detecção foi maior nas lesões de pacientes MB (Krutzik *et al.*, 2005). Além disso, as DCs que expressam DC-SIGN mostraram funções

imunossupressoras relacionadas a secreção da IL-10. Contudo, sabendo que a resposta imune adaptativa se desenvolve em resposta ao estímulo dado primeiramente pelas APCs (do inglês, *Antigen presenting cells*), o conjunto de moléculas expressas bem como citocinas que são secretadas nesse microambiente de ativação é determinante na resposta imunológica da Hanseníase (Kumar *et al.*, 2013).

Um subgrupo de DCs chamadas de mDCs (do inglês, *Dendritic cells derived from monocytes*) de indivíduos saudáveis e pacientes com hanseníase apresentaram aumento na expressão de moléculas coestimulatórias como CD40, CD80, CD86 e HLADR quando estimuladas com antígeno sonicado do *M. leprae*, independente da forma clínica. Entretanto, não foi observada a expressão do marcador mais importante de maturação de DCs, a molécula CD83 (Braga *et al.*, 2015). Somado a isso, pacientes MB produziram níveis baixos de IL-12p70, a forma bioativa da IL-12, o que pode estar diretamente relacionado com a incapacidade destes indivíduos em produzirem uma resposta Th1 eficiente contra o bacilo (Braga *et al.*, 2015).

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

Os linfócitos T reguladores (Treg) se enquadram em uma população heterogênea que modula as respostas imunes promovendo a tolerância periférica contra antígenos próprios e evitando a exacerbação de respostas contra patógenos, mas pode suprimir respostas efetivas contra agentes infecciosos, facilitando sua permanência no hospedeiro (Boer, Joosten, & Ottenhoff, 2015). Os Tregs caracterizam-se pela produção de IL-10 e TGF- β , além da expressão do fator de transcrição FoxP3 (do inglês, *Forkhead box protein P3*) (Sehrawat & Rouse, 2011). A ocorrência de células supressoras antígeno específicas na hanseníase é descrita há muito tempo, e parece estar associada com a forma disseminada da doença representada pelos pacientes MB (De Souza Sales *et al.*, 2011; Palermo *et al.*, 2012).

Outra população de linfócitos descrita é a Th17, essas células produzem uma citocina chave desse perfil, a IL-17A, que estimula a expressão de mediadores inflamatórios em macrófagos e células endoteliais. As Th17 diferenciam-se por influência de TGF- β , IL-6, IL-1 β e IL-23 e tem como fator de transcrição ROR γ t (do inglês, *Retinoic acid-related orphan receptor gamma t*) (Volpe *et al.*, 2008). Essas células apresentam papel importante na defesa contra patógenos, em especial nas mucosas, além de participar de processos auto-imunes (Muranski & Restifo, 2013). Dados recentes da literatura mostram que uma combinação de respostas Th1/Th17 podem exercer um efeito protetor durante a infecção pelo bacilo (Santos *et al.*, 2017). Os níveis de IL-17 estão diminuídos em pacientes com hanseníase, principalmente em MB (Attia *et al.*, 2014; De Almeida-Neto *et al.*, 2014), entretanto já foi observado níveis elevados dessa citocina em ENH (Martiniuk *et al.*, 2012), o que sugere um papel da IL-17 na resposta contra *M. leprae*.

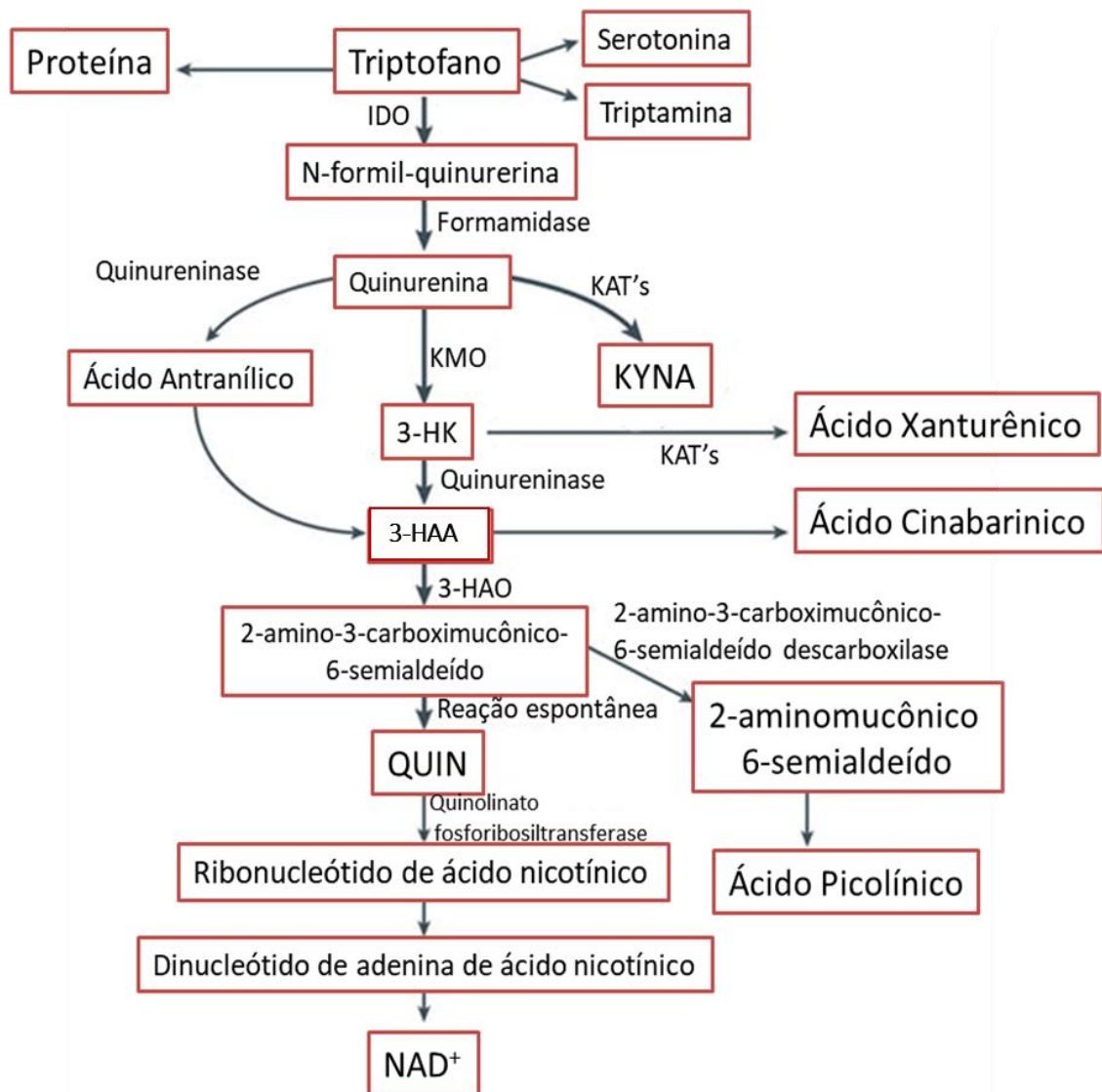
1.9 Papel deIDO e de seus metabólitos: aspectos gerais e importância na hanseníase

Desde a década de 70 acredita-se que a primeira etapa da via da quinurenina é realizada por qualquer uma das duas enzimas: Indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e Triptofano 2,3-dioxigenase (TDO) dependendo do tipo de célula e tecido (Ball *et al.*, 2009). Essas enzimas executam a primeira etapa do catabolismo do triptofano (Tryp), um aminoácido essencial para mamíferos, como a maioria dos microrganismos depende desse aminoácido para sua sobrevivência, sua degradação por células do sistema imune inato foi apontada como um importante mecanismo microbicida (Mello & Munn, 2004). Sabe-se que a enzima IDO apresenta duas isoformas, IDO-1 e IDO-2. A IDO1 é caracterizada pelo seu papel imunomodulador e neuroativo bem conhecidos, enquanto a IDO-2 é expressa constitutivamente no fígado, cérebro e tireóide e, ao contrário da IDO-1, foi descoberta mais recentemente (Ball *et al.*, 2007).

Vários tipos de células, como macrófagos, células epiteliais e DCs produzem a enzima IDO-1, cuja expressão pode ser induzida por citocinas pró-inflamatórias, principalmente o IFN- γ , através de ligantes TLRs, como lipopolissacarídeos (LPS) e interações entre células imunes através de

moléculas co-estimuladoras, como CD80 e CD86. Sabe-se que a enzima IDO-1 pode afetar a imunidade através de dois mecanismos não exclusivos: 1) pelo estabelecimento de uma resposta local com privação de aminoácidos que inibe a proliferação celular e patogênica; 2) através da produção de metabólitos das quinureninas, que apresentam funções imunomoduladoras ou citotóxicas (De Araújo *et al.*, 2017).

O primeiro passo da degradação de Tryp é a sua conversão em N-formilquinurenina via a enzima IDO-1. A N-formilquinurenina é inicialmente convertida em quinurenina, dando o nome a essa via metabólica. Em seguida, pela ação da enzima KMO (do inglês, *Kynurenina 3-monooxygenase*) é convertida à 3-HK (do inglês, *3-hydroxykynurenine*). Ambas, quinurenina e 3-HK podem ser oxidadas pela enzima quinureninase à AA (do inglês, *Anthranilic acid*) ou à 3-HAA (do inglês, *3-hydroxyanthranilic acid*), respectivamente. Estes metabólitos podem também ser convertidos pelas enzimas KAT I ou KAT II (do inglês, *Kynurenine aminotransferase I or II*) à KYNA (do inglês, *Kynurenic acid*) ou XA (do inglês, *Xanthurenic acid*), respectivamente. O metabólito 3-HAA, por sua vez, pode ser oxidado pela enzima 3-HAO (do inglês, *3-hydroxyanthranilate oxidase*) à QUIN (do inglês, *Quinolinic acid*), enquanto que outra enzima é capaz de metabolizar 2-aminomucânico 6-seminaldeído à AP (do inglês, *Picolinic acid*) (Figura 11) (Hu *et al.*, 2017).



Nature Reviews | Neuroscience

Figura 11. Via da quinurenina no metabolismo do triptofano.

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

A enzima IDO-1, inicialmente foi descrita como um mecanismo bactericida ou ligada à imunossupressão de células T e tolerância. Entretanto, nos últimos anos, têm-se acumulado evidências de que esta enzima também desempenha um papel importante durante infecções virais (HIV, influenza e hepatites), infecções por protozoários (*Toxoplasma gondii*) e bacterianas (*Mycobacterium tuberculosis*) (Schmidt & Schultze, 2014; Clement *et al.*, 2017; Sasai *et al.*, 2018). Em infecções bacterianas já foi demonstrado que o aumento da atividade de IDO-1 induz uma potente restrição do crescimento bacteriano, além da indução

de ROS e NOS, a atividade de IDO-1 auxilia na degradação de Tryp, contribuindo para o *starvation* (privação de nutrientes) nas bactérias auxotróficas (Schmidt & Schultze, 2014). Um outro efeito bactericida relacionado a ativação da enzima IDO-1 é a produção de metabólitos tóxicos de quinurenina. O recrutamento de células Treg e níveis crescentes de radicais livres podem ajudar com feedback negativo para encerrar as respostas inflamatórias (Figura 12) (Schmidt & Schultze, 2014).

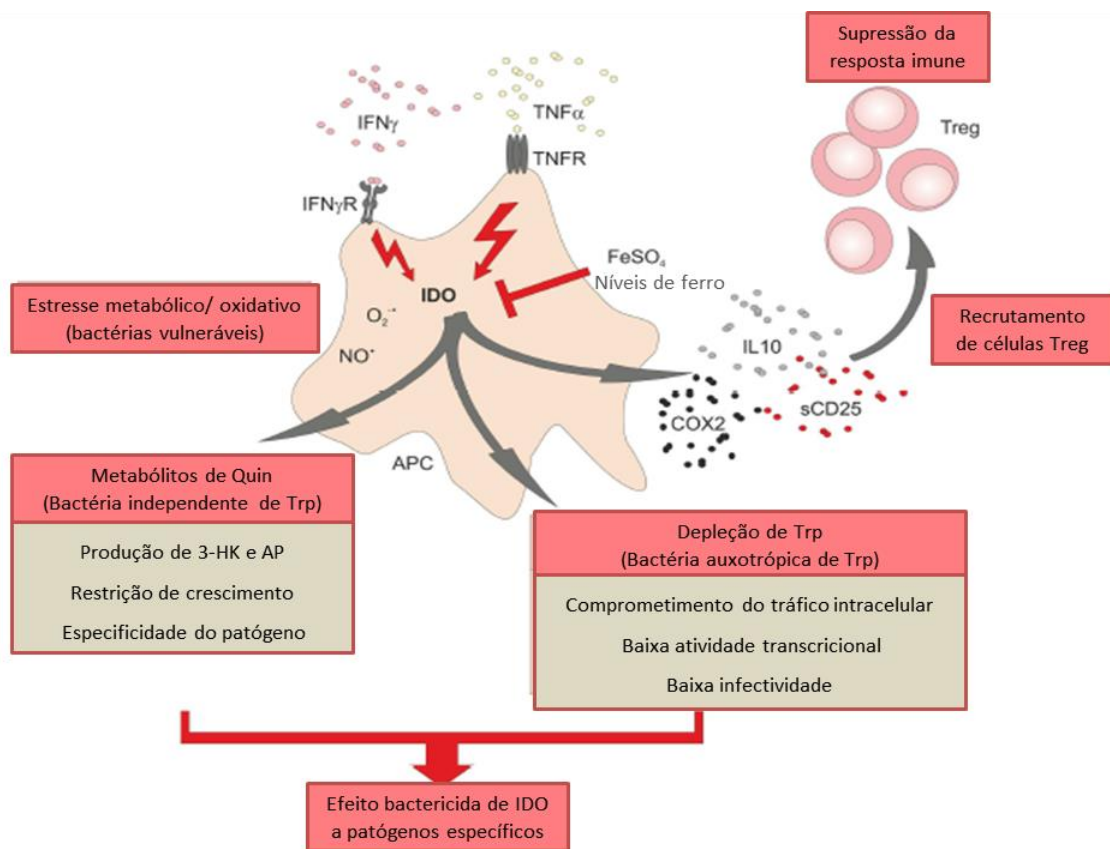


Figura 12. Visão esquemática do papel central do IDO-1 nas respostas imunes a infecções bacterianas.

Fonte: Adaptado de Schmidt & Schultze, 2014

Dados da literatura já mostraram um aumento de células IDO-1⁺ em lesões de pele de pacientes MB, além disso, já foi observado que há um aumento significativo da atividade de IDO-1 nos soros de pacientes MB quando comparados a pacientes PB e voluntários sadios (De Souza Sales *et al.*, 2011).

Outros estudos demonstraram que *M. leprae* induz um aumento da expressão gênica e protéica de IDO-1 em monócitos humanos por um

mecanismo dependente de IL-10. De acordo com esse trabalho, nas lesões lepromatosas também foi observado um aumento de CD163. Foi demonstrado que o CD163 tem um papel duplo na célula, aumentando os estoques intracelulares de ferro, o que é benéfico ao bacilo e, funcionando como um co-receptor para a entrada do bacilo na célula. Esses dados sugeriram um papel tolerogênico de IDO-1 na imunopatogênese da hanseníase (Moura *et al.*, 2012). No entanto, um trabalho mais recente demonstrou um aumento de IDO-1, dependente de IFN- γ , em células de lesão de pele de pacientes MB que desenvolveram reação reversa (Andrade *et al.*, 2015). Juntos esses dados sugerem que a IDO-1 pode apresentar efeitos antagônicos na patogenia da doença.

Os estudos sobre atividades imunoreguladoras em relação aos metabólitos da via de quinureninas ainda são escassos. Sabe-se que o Tryp é metabolizado ao longo da via das quinureninas podendo produzir AP ou QUIN, mas apenas o AP é capaz de inibir o crescimento de *M. tuberculosis* em culturas de DCs *in vitro*, em contraste, macrófagos infectados com micobactérias patogênicas produziram QUIN, em vez de AP, o que não reduz o crescimento de *M. tuberculosis* (Blumenthal *et al.*, 2012). A administração de 3-HAA demonstrou diminuir a inflamação induzida por células Th17 e proteger camundongos contra encefalite autoimune (Platten *et al.*, 2005). Outros dados mostraram que o 3-HAA tem propriedades imunoreguladoras e pode inibir células Th1 e Th2 e aumentar a porcentagem de Tregs (Hayashi *et al.*, 2007). Além disso, o tratamento de DCs com 3-HAA diminuiu a capacidade dessas células de estimular a ativação e diferenciação de células T *in vitro* e *in vivo*, além da diminuição das moléculas co-estimulatórias CD40, CD80, CD86 (Lee *et al.*, 2013). 3-HAA e 3-HK foram capazes de inibir a proliferação de células T, induz o desenvolvimento de células Treg e prolonga a sobrevivência do aloenxerto de córnea.

Propriedades neuroativas vêm sendo atribuídas aos metabólitos da via das quinureninas. Uma vez no cérebro, a quinurenina é absorvida pelas células da glia, onde sua metabolização é iniciada. Ao longo da via, os metabólitos como ácido 3-HK e QUIN são reconhecidos por seus efeitos neurotóxicos, podendo promover neurodegeneração (Allegrì *et al.*, 2003; De La Cruz *et al.*, 2012). O aumento nos níveis de QUIN e 3-HK no fluido cerebrospinal humano foi

correlacionado com disfunções cognitivas e motoras, nas doenças de Huntington e Parkinson, e em doenças psiquiátricas como ansiedade, depressão e esquizofrenia. Acredita-se que a neurotoxicidade da 3-HK ocorra devido à sua capacidade de induzir estresse oxidativo e apoptose neuronal. 3-HK produz ROS e induz a clivagem do DNA nuclear, promovendo assim a apoptose (Okuda *et al.*, 1998; Carvalho *et al.*, 2017).

O metabólito QUIN é um agonista do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) e a estimulação desses receptores glutamatérgicos aumenta o influxo de cálcio nos neurônios, contribuindo para a geração de ROS e radicais livres; estimulando ainda a peroxidação lipídica da membrana, e comprometendo, assim, a sua fluidez e permeabilidade, o que pode, eventualmente, conduzir ao dano neuronal (Carvajal *et al.*, 2016). Enquanto QUIN atua como agonista do NMDA e pode causar excitotoxicidade neural, KYNA tem um papel neuroprotetor através de sua atuação como antagonista do receptor NMDA (Stone, 2001). A estimulação do receptor glutamatérgico NMDA aumenta o influxo de cálcio nos neurônios, contribuindo para a produção de espécies reativas de oxigênio e radicais livres, além de estimular a peroxidação lipídica da membrana, contribuindo para o dano neural (Carvalho *et al.*, 2017). KYNA foi descrito como um ligante endógeno do GPR35 (receptor 35 acoplado à proteína G). A ativação de GPR35 inibe a liberação do fator de TNF por macrófagos, sob condições inflamatórias e destaca a importância do KYNA na regulação das funções imunes, sugerindo seu possível efeito anti-inflamatório (Carvalho *et al.*, 2017).

De acordo com Carvalho *et al.* (2017) a quinurenina periférica bem como o Tryp atravessam a barreira hematoencefálica e atingem o sistema nervoso central (SNC), onde serão metabolizados. As citocinas IL-4 e IL-10 reduzem a atividade da IDO, consequentemente reduzindo o catabolismo do Tryp, sem comprometer a produção de 5-HT (do inglês, *5-hydroxytryptophan*). Entretanto, o IFN- α e o TNF- α estimulam a atividade da IDO, aumentando o metabolismo de Tryp, comprometendo assim a síntese de 5-HT e favorecendo a via e a produção de metabólitos neurotóxicos como 3-HAA e o QUIN. O KYNA age como antagonista dos receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) e dos receptores α 7-nicotínico de acetilcolina (α 7nAChR), exercendo ação neuroprotetora (Figura 13).

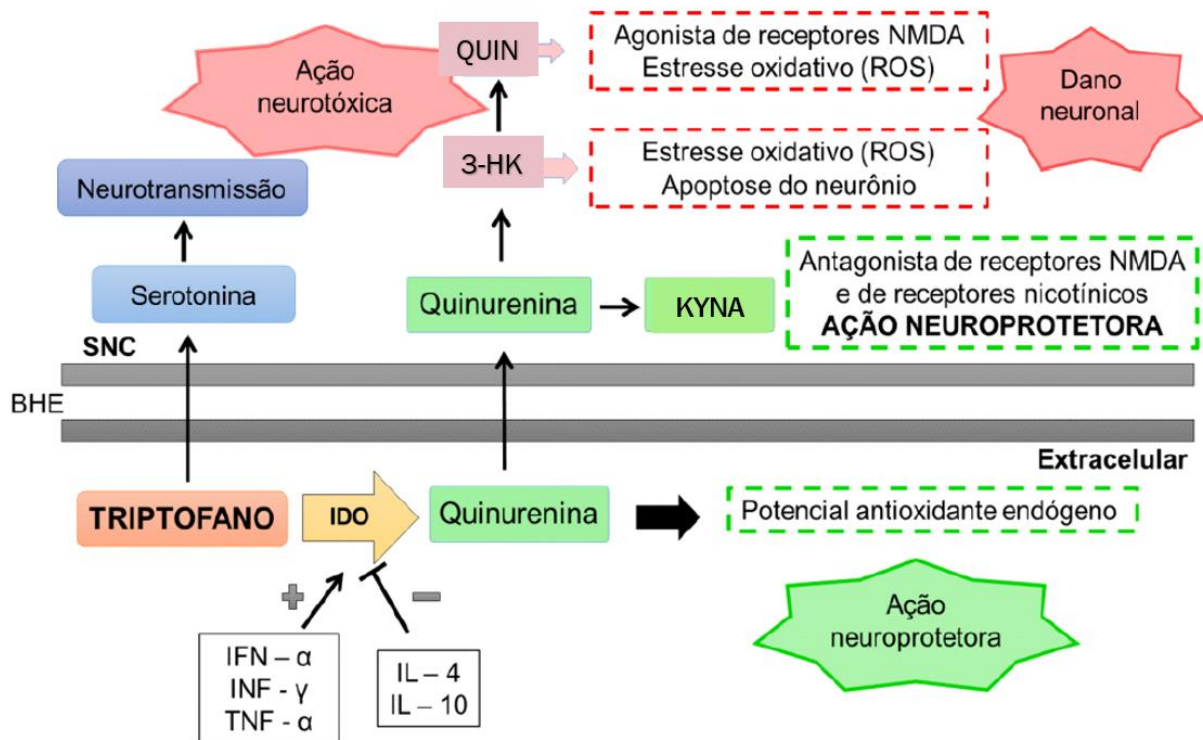


Figura 13. Efeito neurotóxico e neuroprotetor dos metabólitos da via das quinureninas.
 Fonte: Carvalho *et al.*, 2017

O catabolismo do triptofano pode ainda ser desviado para a via da serotonina, principalmente quando a via das quinureninas é *downregulada*. A partir da hidrólise do triptofano ocorre a formação de 5-HTP, que é rapidamente metabolizado à serotonina e posteriormente em melatonina (MEL) pela ação de transferases (Majumdar *et al.*, 2019). Em torno de 95% do Tryp obtido da dieta é metabolizado pela via das quinureninas, e cerca de apenas 1% do Tryp é convertido em 5-HT no sistema nervoso central (SNC), enquanto o restante é direcionado à síntese de proteínas e de melanina (Botting, 1995). A melatonina também é sintetizada, enzimaticamente, a partir de L-triptofano, sendo considerada o produto final da via da serotonina (Calvo *et al.*, 2013).

Dados antigos já mostram que a administração de MEL a camundongos aumenta a apresentação de antígenos pelos macrófagos esplênicos às células T, e esse efeito é consistente com um aumento na expressão de moléculas de MHC de classe II e produção de IL-1 e TNF (Piolo *et al.*, 1993). O tratamento de células PC12, células de feocromocitoma adrenal de rato, com MEL regula positivamente a expressão da proteína FoxO1 (do inglês, *Forkhead box protein*

O1) e induz a expressão de IDO-1, sendo a via de sinalização JNK importante na regulação positiva de IDO-1 induzida por melatonina (Li *et al.*, 2017).

Além dos metabólitos da via de Tryp, outras moléculas também são capazes de regular a ativação de IDO-1. Estudos *in vivo* indicam que o NO produzido pela iNOS (do inglês, *Nitric oxide synthase*) inibe a atividade da IDO-1 interagindo diretamente com a enzima e promovendo sua degradação pela via do proteassoma (Samelson-Jones & Yeh, 2006). A Arginase (Arg-1) compartilha o mesmo substrato, ou seja, L-arginina, com iNOS. Arg-1 hidrolisa a L-arginina em L-ornitina e ureia. Sabe-se que a L-ornitina favorece o crescimento de parasitas (Li *et al.*, 2012).

1.10 Justificativa

Nossos dados anteriores demonstraram que *M. leprae* é capaz de induzir a expressão gênica e proteica de IDO-1 em monócitos humanos por um mecanismo dependente de IL-10 (De Sousa Sales *et al.*, 2011; Moura *et al.*, 2012), contribuindo para a imunossupressão observada em pacientes multibacilares. Por outro lado, em um estudo mais recente avaliando a expressão de IDO-1 em amostras de pacientes multibacilares que desenvolveram reação reversa, um episódio inflamatório agudo mediado por IFN- γ (Andrade *et al.*, 2015), foi observado o aumento da expressão gênica de IDO-1 nas lesões, associado a um declínio da carga bacilar. Diante de algumas possibilidades, nos questionamos se antígenos de *M. leprae* poderiam estar modulando diferencialmente o padrão de resposta imune e se a indução de IDO-1 por diferentes componentes micobacterianos poderia estar associado a tolerância ou ativação celular. Por outro lado, sabe-se que a IDO-1 é uma enzima chave no metabolismo do triptofano e que, no contexto da inflamação é a principal enzima do metabolismo das quinureninas e que os metabólitos desta via possuem uma série de funções biológicas importantes. Assim, o presente trabalho justificou-se pela necessidade de avaliarmos o impacto de diferentes frações micobacterianas na indução de IDO-1 em células apresentadoras de antígeno, bem como na funcionalidade dessas APCs. Em conjunto, uma vez que há escassez de dados sobre o papel dos metabólitos da via das quinureninas na patogênese de doenças causadas por micobactérias, o presente trabalho

buscou avaliar o impacto dos diferentes metabólitos na viabilidade tanto da célula hospedeira quanto na viabilidade do bacilo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral: Avaliar o papel de IDO-1 e dos metabólitos do triptofano na imunopatogênese da Hanseníase.

2.2 Objetivos específicos:

- Investigar se *M. leprae* e suas frações antigênicas são capazes de induzir a expressão e atividade de IDO-1 em mDCs;
- Determinar o papel de IL-10 e TNF- α na indução de IDO-1 nas mDCs;
- Investigar o envolvimento da via TLR2 na indução de IDO-1 por *M. leprae* e suas frações em mDCs;
- Avaliar a capacidade das mDCs estimuladas ou não com *M. leprae* de induzir um fenótipo regulador nos linfócitos T;
- Determinar o fenótipo das mDCs de pacientes com as formas polares da hanseníase;
- Determinar a expressão de IDO-1 e CD1a nas mDCs de pacientes com as formas polares da hanseníase;
- Avaliar a atividade enzimática de IDO-1 e Arginase no soro de pacientes com as formas polares da hanseníase;
- Avaliar a produção de NO no soro de pacientes com as formas polares da hanseníase.
- Analisar a viabilidade das mDCs na presença dos metabólitos da via das quinureninas;
- Analisar o papel dos diferentes metabólitos na viabilidade de *M. leprae*;
- Avaliar o efeito dos metabólitos da via das quinureninas na Hanseníase.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Biossegurança e Permissão ética

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz, parecer número 1.538.467. Os pacientes participantes do estudo foram recrutados no Ambulatório Souza Araújo (ASA) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Foram selecionados pacientes entre 18 e 65 anos diagnosticados com hanseníase pela primeira vez. Foram excluídos pacientes menores de 18 anos, maiores de 65 anos, coinfectados com o vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV) e casos de reação e recidiva da hanseníase. O consentimento livre e esclarecido foi obtido por todos os indivíduos incluídos no estudo. Todas as coletas foram realizadas por profissionais habilitados utilizando materiais descartáveis e/ou esterilizados visando minimizar o desconforto dos pacientes, e de acordo com as normas de biossegurança. As amostras biológicas de pacientes com hanseníase, diagnosticadas de acordo com a classificação de Ridley e Jopling (1966), foram manipuladas na câmara de fluxo laminar, em ambiente estéril, respeitando as normas preconizadas para a manipulação de material biológico.

Identificação	Forma Clínica	Sexo	Data de nascimento	IB	ILB
HD01	-	M	26/08/1985	-	-
HD02	-	F	29/04/1974	-	-
HD03	-	M	24/04/1974	-	-
HD04	-	F	12/06/1983	-	-
HD05	-	M	12/04/1965	-	-
HD06	-	M	12/10/1973	-	-
HD07	-	M	14/11/1979	-	-
HD08	-	F	12/09/1991	-	-
HD09	-	M	22/02/1991	-	-
HD10	-	M	11/10/1991	-	-
HD11	-	F	28/03/1962	-	-
HD12	-	F	16/05/1962	-	-
HD13	-	F	15/10/1976	-	-
HD14	-	M	06/04/1981	-	-
HD15	-	F	20/04/1991	-	-
HD16	-	F	17/10/1981	-	-
HD17	-	M	11/12/1992	-	-
HD18	-	M	09/06/1987	-	-

HD19	-	F	01/06/1990	-	-
HD20	-	F	02/03/1994	-	-
HD21	-	M	26/01/1987	-	-
HD22	-	F	05/03/1978	-	-
HD23	-	F	28/10/1976	-	-
HD24	-	F	30/03/1979	-	-
HD25	-	M	06/03/1982	-	-
HD26	-	F	23/11/1991	-	-
HD27	-	F	25/09/1990	-	-
PB01	TT	F	15/09/1957	0	0
PB02	BT	F	18/03/1965	0	0
PB03	BT	M	20/11/1954	0	0
PB04	BT	M	18/01/1978	0	0
PB05	BT	M	23/01/1984	0	0
PB06	BT	M	29/10/1967	0	0
PB07	BT	F	02/08/1952	0	0
PB08	BT	M	05/07/1961	0	0
PB09	BT	M	06/09/1948	0	0
PB10	BT	M	01/08/1981	0	0
PB11	BT	M	22/01/1957	0	0
PB12	BT	M	13/01/1981	0	0
PB13	BT	F	20/01/1944	0	0
PB14	BT	F	15/09/1942	0	0
PB15	BT	F	06/05/1971	0	0
PB16	BT	F	27/09/1947	0	ni
PB17	BT	M	05/10/1996	0	0
PB18	BT	M	28/05/1946	0,57	0
PB19	BT	F	01/10/1995	0	0
PB20	BT	F	20/01/1984	0	0
PB21	BT	M	19/05/1956	0	0
PB22	BT	M	23/12/1957	0	0
PB23	BT	M	25/02/1961	0	0
PB24	BT	F	14/09/1984	0	0
PB25	BT	F	28/03/1961	0	ni
PB26	BT	M	16/02/1935	0	0
PB27	BT	F	03/09/1962	0	0
PB28	BT	F	09/03/1981	0	0
PB29	BT	F	23/08/1948	0	0
PB30	BT	F	07/05/1925	0	0
PB31	BT	F	10/08/1953	0	0
PB32	BT	F	06/04/1944	0	0
PB33	BT	M	10/11/1953	0	0
PB34	BT	F	20/03/1944	0	0
PB35	BT	F	14/05/1962	0	0
PB36	BT	M	12/04/1988	0	0
PB37	BT	F	02/07/1974	0	0

PB38	BT	F	07/04/1966	1	0
MB01	BL	M	12/06/1985	4,5	3,3
MB02	LL	M	03/11/1973	5,5	3,6
MB03	LL	M	13/08/1983	5,5	5
MB04	LL	M	04/01/1975	5	5,95
MB05	LL	M	14/05/1998	5	ni
MB06	LL	F	05/02/1959	5	ni
MB07	BL	F	25/11/1969	4	4,85
MB08	BL	M	25/10/1948	1,5	3,5
MB09	BL	M	04/03/1956	0,5	2,7
MB10	BL	M	01/08/1969	2,5	4,5
MB11	BL	F	05/03/1981	1	2,6
MB12	BL	M	14/12/1959	5	3,5
MB13	BL	F	12/06/1960	1	3,5
MB14	BL	M	28/02/1970	4,25	4,8
MB15	BL	F	10/05/1955	3,75	3,7
MB16	BL	M	17/11/1954	1	0
MB17	BL	M	28/01/1964	4,76	4,5
MB18	BL	M	25/07/1990	0	3,5
MB19	BL	F	18/10/1965	4,5	3,4
MB20	BL	M	14/09/1933	4,57	4,85
MB21	BL	M	30/01/1960	3,75	3,5
MB22	BL	M	24/07/1951	4,25	4,85
MB23	BL	M	15/09/1942	0	3,85
MB24	BL	M	09/02/1955	1+	4,7
MB25	BL	F	10/09/1986	4,25+	4,5
MB26	LL	F	07/05/1977	4+	0
MB27	LL	F	02/10/1981	5,5	5,6
MB28	LL	F	15/05/1988	4,75	5,9
MB29	LL	M	03/09/1971	5	5,85
MB30	LL	M	24/09/1964	4,75	4,6
MB31	LL	M	29/08/1963	0	5,5
MB32	LL	M	02/04/1975	5	5,6
MB33	LL	M	20/12/1979	5	4,8
MB34	LL	F	06/10/1988	4,25	5,85
MB35	LL	F	12/05/1941	4,5	4,8
MB36	LL	M	20/12/1971	4,8	5,6
MB37	LL	M	02/11/1969	5+	4,9
MB38	LL	M	13/09/1962	4,25	4,3
MB39	LL	M	10/04/1985	4	5,8
MB40	LL	M	12/04/1988	5	5,95
MB41	LL	F	04/12/1958	5	5,86
MB42	LL	F	31/03/1980	5,75+	5,85
MB43	LL	M	24/05/1987	4,25	5,9
MB44	LL	F	07/02/1978	3	5,95
MB45	LL	M	12/06/1989	ni	3,5

MB46	LL	M	26/01/1990	5,25	5,85
MB47	LL	F	18/10/1987	4,75	5,9
MB48	LL	M	06/02/1980	5+	ni
MB49	LL	M	11/06/1957	3,25	3,6
MB50	LL	M	29/05/1947	ni	5,95
MB51	LL	M	22/06/1954	5,5	5,9
MB52	LL	M	18/07/1952	5	3,8
MB53	LL	F	10/11/1988	4	5,95
MB54	LL	F	18/10/1987	4,75	5,9
MB55	LL	M	12/02/1993	5,25+	5+

Tabela 1. Dados dos pacientes e voluntários envolvidos no estudo. Tabela de identificação das amostras utilizadas no estudo, forma clínica, sexo, idade, IB (índice baciloscópio) e ILB (índice logarítmico de biópsia), ni = não identificado. HD (do inglês, *healthy donors*), PB e MB.

3.2 Obtenção das *buffy coats*

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

3.3 Separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

O sangue foi diluído em tampão fosfato salina (PBS) e posteriormente adicionou-se Ficoll Hypaque (GE Healthcare, Suécia) em cada tubo para separação das células por gradiente de densidade. Após a rotação de 2000 rpm por 30 minutos à temperatura ambiente, foi coletada a nuvem de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e posteriormente lavadas com PBS. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas novamente. O sobrenadante foi novamente descartado e o pellet foi ressuspenso em 2 mL de

meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). A viabilidade das células foi verificada através da técnica de exclusão por Azul de Tripán 0,4% (Sigma-Aldrich) na diluição 9 partes de Tripán para 1 de células e a contagem foi realizada em Câmara de Neubauer. Após a contagem, as células foram ressuspensas em meio RPMI (Gibco Invitrogen Corporation 1640, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco Invitrogen Corporation, EUA), L-glutamina (Gibco Invitrogen Corporation, EUA) a 2mM, penicilina a 100U/mL e estreptomicina (Gibco Invitrogen Corporation, EUA) a 100µg/mL (meio completo). Para os experimentos utilizando *M. leprae* viável o antibiótico utilizado foi ampicilina a 50 µg/mL (Sigma-Aldrich, EUA).

3.4 Obtenção de células dendríticas derivadas de monócitos (mDCs)

As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) obtidas de doadores sadios foram marcadas com *beads* magnéticas CD14⁺ (20µl de MicroBeads para 10⁷ de células/ MACS Miltenyi Biotec) por 15 minutos a 4°C. Após esse tempo, as células foram lavadas com uma solução contendo 5% soro fetal bovino, 1mM EDTA e PBS. Em seguida, foi feita a separação em uma coluna magnética, e as células CD14⁺ foram obtidas através da seleção positiva. Após a separação magnética, as células CD14⁺ foram cultivadas na presença de meio contendo IL-4 (10 ng/mL) e GM-CSF (50 ng/mL) (PeproTech, NJ, USA) por 6 dias a 37 °C em 5% de CO₂, para a diferenciação das células CD14⁺ em células dendríticas derivadas de monócitos (mDCs).

3.5 Estimulação das culturas de PBMCs, monócitos e células dendríticas

Estímulo	Concentração	Marca
<i>M. leprae</i> irradiado	0.1, 1 e 10 µg/mL	BEI Resources (NIH/ATCC)
<i>M. leprae</i> viável	MOI 10:1	Instituto Lauro de Souza Lima, SP
MLSA	0.1, 1 e 10 µg/mL	BEI Resources (NIH/ATCC)
MLMA	0.1, 1 e 10 µg/mL	BEI Resources (NIH/ATCC)
1-MT	200 µM	Sigma Aldrich
Pam3Cys	10 µg/mL	Sigma Aldrich
anti-human TNF-α	500 µg/mL	Peprtech
rabbit anti-human IL-10	100 µg/mL	Peprtech
MAB-mTLR2	1 µg/mL	InvivoGen
Brefeldina A	5 mg/mL	BioLegend
peptídeo inibitório MyD88	100 µM	IMGEX, San Diego, CA, EUA

Ácido quinolínico (QUIN)	62,5, 125, 250 e 500 µM	Sigma Aldrich
Ácido quinurênico (KYNA)	62,5, 125, 250 e 500 µM	Sigma Aldrich
Ácido picolínico (AP)	62,5, 125, 250 e 500 µM	Sigma Aldrich
Ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA)	62,5, 125, 250 e 500 µM	Sigma Aldrich
Melatonina (MEL)	50, 100, 150 e 200 µM	Sigma Aldrich

Tabela 2. Estímulos utilizados nas culturas celulares.

3.6 Obtenção dos linfócitos autólogos

Como dito no item 3.4, inicialmente foi feita uma separação positiva dos monócitos pela marcação magnética com *beads* CD14⁺, após esta etapa as células em suspensão passaram por uma coluna imantada ficando retidos monócitos. As células eluídas foram agora separadas pela marcação com *beads* magnéticas CD4⁺ (20µl de MicroBeads para 10⁷ de células/ MACS Miltenyi Biotec) por 15 minutos a 4°C. Após esse tempo, as células foram lavadas com uma solução contendo 5% soro fetal bovino, 1mM EDTA e PBS. Em seguida, essas células foram passadas numa coluna de separação magnética, e as células CD4⁺, obtidas através da seleção positiva, foram avaliadas quanto a expressão de CD4 por citometria de fluxo (Milteny Biotec, Auburn, CA, EUA).

3.7 Co-cultura de mDCS com linfócitos autólogos e marcação celular avaliada por citometria de fluxo

Para avaliar o papel funcional doIDO-1, mDCs foram obtidos conforme descrito anteriormente e plaqueados em placas de 96 poços (2 × 10⁴). Após o período de estímulo, linfócitos autólogos foram adicionados na proporção de 1 (mDC): 20 (linfócitos) por 5 dias a 37 ° C 5% CO₂. Posteriormente, as células foram coletadas, lavadas e marcadas com anticorpos anti-FoxP3- Alexa Fluor 488/ CD4-PE - Cy5/ CD25-PE de acordo com as especificações do True - Nuclear Human Treg Flow Kit (BioLegend, San Diego, CA, EUA). As células foram analisadas por citometria de fluxo (FACS Aria IIu).

3.8 Ensaio Imunoenzimático

Os sobrenadantes das culturas de mDCs foram recolhidos após o período de incubação e congelados a -20°C . As citocinas foram dosadas por ELISA com kits específicos. Foram avaliadas: TNF- α , IL-6, IL-10, IL-15 e CXCL-10 conforme as instruções do fabricante (eBioscience). A leitura de absorbância foi obtida em leitor de ELISA SpectraMax 190 (Molecular Devices - EUA/Canadá) à 450 nm com correção de comprimento de onda ajustada em 540 nm com uma faixa de detecção variável de acordo com cada kit. Para a análise dos dados foi utilizado o software SoftMax versão 5.3 (Molecular Devices - EUA/Canadá) e para a plotagem dos gráficos foi utilizado o programa Graph Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

3.9 Citometria Intracelular

Nos ensaios para análise da expressão intracelular de citocinas foi utilizado Brefeldina A (BioLegend) na concentração 5 mg/mL, por 12 horas nas culturas. Para a marcação intracelular, após o tempo de estimulação as células foram transferidas da placa para mini tubos de citometria. As células foram lavadas e posteriormente fixadas (PFA 2%). Em seguida, bloqueadas e permeabilizadas (Saponina 0.15%). Subsequentemente as células foram incubadas por 30 minutos e protegidas da luz, com anticorpos monoclonais anti-IDO-1-PE (R&D) ou anti-TNF AlexaFluor700 (eBioscience). Ao término da incubação, as células foram lavadas, ressuspensas para posterior a leitura em citômetro de fluxo (BD Accuri). Para cada amostra, um mínimo de 10.000 eventos foram adquiridos. A análise foi realizada no software BD FlowJo.

3.10 Extração de RNA

O RNA total das culturas de mDCs foi extraído utilizando o regente TRIzol® (Life technologies, EUA) segundo a metodologia descrita pelo fabricante. Após os períodos de estimulação, o sobrenadante das culturas foi retirado e aliquoteado, e então adicionado 500 μL de TRIzol® em cada poço, para lise das células aderentes. Posteriormente, adicionou-se 200 μL de clorofórmio (Merck,

Alemanha) em cada tubo e os mesmos foram homogeneizados por inversão até se obter um aspecto leitoso. Após isso, os tubos foram centrifugados a 12000 x g por 15 min a 4° C. A fase aquosa contendo o RNA (fase superior) foi transferida para novos tubos de 1,5 mL contendo 500 µL de isopropanol (Sigma-Aldrich, EUA), misturada por inversão e incubada a -70° C por no mínimo um dia. As fases intermediária e orgânica foram armazenadas a -20 °C para posterior extração de DNA e proteína. Após o período de incubação, foi adicionado 2 µL de GlycoBlue® (Ambion, EUA) em cada tubo, para melhor visualização do sedimento, e então centrifugados a 14000 x g por 20 min a 4° C. Os sobrenadantes foram descartados e o material sedimentado lavado com 500 µL de etanol 70% por centrifugação a 10000 x g por 10 min a 4° C. Em seguida os sobrenadantes foram removidos, os sedimentos secos à temperatura ambiente por cerca de 10 min e em seguida ressuspensos em 20 µL de água tratada com dietilpírocarbonato 0,01% (DEPC, Life technologies, EUA).

3.11 Quantificação de ácidos nucleicos

A quantificação dos ácidos nucleicos foi realizada por espectrofotometria utilizando o instrumento NanoDrop® ND-1000 (Thermo scientific, EUA). Inicialmente foi lido 1 µL de água ultrapura para determinar o “branco”. Em seguida, 1 µL de cada amostra foi lido contra o “branco” no comprimento de onda de 260 nm. A avaliação da pureza foi determinada pela razão da absorbância (A) em dois comprimentos de onda: A260/280 indica o grau de contaminação por proteínas, enquanto A260/230 indica o grau de contaminação por compostos orgânicos. As amostras foram consideradas com alto grau de pureza quando as razões A260/280 e A260/230 apresentaram valores > 1,8.

3.12 Análise da integridade do RNA

A integridade do RNA extraído foi avaliada por gel desnaturante de 1,2% de agarose (Life technologies, EUA) em tampão MOPS (do inglês, 3-(*N*-morpholino) - propanesulfonic acid) 1X (Sigma-Aldrich, EUA). Inicialmente as amostras foram desnaturadas adicionando-se 200 ng de RNA a 35% formamida, MOPS 1X, 0,125% corante azul de bromofenol e 1 µL de SYBR Green II 100X

(Life technologies, EUA). Em seguida, as amostras foram incubadas em banho seco a 65° C por 15 minutos e depois aplicadas no gel. A corrida de eletroforese foi realizada em corrente elétrica de 100 V por 50 minutos. Após esse período, o gel foi analisado por sistema de fotodocumentação (L-Pix touch, Locus biotecnologia, SP). O RNA foi considerado íntegro quando observadas as subunidades ribossomais esperadas (28S e 18S).

3.13 Tratamento do RNA com DNase

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

3.14 Síntese de cDNA

O cDNA foi obtido a partir do RNA total das culturas de mDCs mediante o uso da enzima transcriptase reversa Superscript III® (Life 33L33hnologies, EUA) em uma reação com volume final de 20 µL. Inicialmente, 500 ng de RNA e de Oligo (dT) (para a análise da expressão gênica de mdTHP-1) ou Random Primer (para análise da expressão gênica de micobactérias) foram incubados a 65° C por 5 min para a linearização da molécula de RNA. Após a incubação foi adicionado o tampão da enzima em concentração de 1X, dNTP 0,125 mM, DTT 10 mM, 40 U de RNase Out® e 200 U da enzima Superscript III®. Essa mistura foi incubada a 50° C por 1 hora para transcrição, seguida de incubação a 70° C por 5 min para

inativação da enzima. Após a incubação as amostras foram armazenadas a -20° C.

3.15 Viabilidade de *M. leprae*

Para os ensaios de viabilidade do bacilo, a fase intermediária armazenada a -20° C foi utilizada para a extração de DNA para a realização dos experimentos de viabilidade bacteriana. Em cada tubo foi adicionado 100 µL de tampão TE (5mM Tris; 0,1 mM EDTA) e 150 µL de clorofórmio. A mistura foi homogeneizada no aparelho FastPrep® 120 (MP biomedical, EUA) na configuração de velocidade a 6,5 metros por segundo (m/s) por 45 seg. Os tubos foram incubados no gelo por 5 min e centrifugados a 12000 x g por 10 min à temperatura ambiente. A fase aquosa (superior) foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL contendo 300 µL de isopropanol (Sigma-Aldrich, EUA), misturada por inversão e armazenada a -70° C por no mínimo um dia. A fase orgânica resultante foi armazenada a -20° C para posterior extração de proteínas. Após a incubação, foi adicionado 2 µL GlycoBlue® (Ambion, EUA) em cada tubo, para melhor visualização do pellet, e então centrifugados a 12000 xg por 30 min em temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram descartados e o material sedimentado lavado com 500 µL de etanol 70% por centrifugação a 12000 x g por 15 min em temperatura ambiente. Em seguida os sobrenadantes foram removidos, os sedimentos secos à temperatura ambiente por 15 min e ressuspensos em 20 µL de água ultrapura.

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

3.16 Cromatografia Líquida de alta Eficiência (HPLC)

A determinação da atividade de IDO nos sobrenadantes de cultura de mDCs foi realizada para determinação dos níveis de quinurenina e triptofano (De Souza Sales *et al.*, 2011) por HPLC. Em um tubo eppendorf, 165 µl do sobrenadante de cultura foram homogeneizados com 5 µl de tirosina e 25 µl de ácido

tricloroacético (TCA). Os tubos foram então centrifugados por 10 minutos a 15800 xg. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e foram injetados 50 µl na coluna de fase reversa C18. A detecção da corrida foi feita em 365 nm, para detectar a quinurenina, e 285 nm, para detectar o triptofano e o normalizador interno, tirosina. A atividade de IDO foi avaliada através da razão da concentração de quinurenina sobre triptofano.

3.17 Imunofluorescência

Após o tempo de estímulo/infecção as células foram fixadas por 20 minutos com PFA 4% à temperatura ambiente, lavadas com tampão fosfato salina (PBS) (Gibco Invitrogen Corporation, USA), bloqueadas e permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 + 10% de Soro Normal de Cabra (NGS) (Sigma-Aldrich, USA) e 5% de albumina de soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich, USA) em PBS por 1h. Foi utilizado o anticorpo monoclonal feito em coelho anti-IDO (Santa Cruz, Texas, USA 1:100 – cat. SC25808) e o anticorpo monoclonal feito em mouse anti-CD1a (DAKO, 1:50 – cat. M0732). Os anticorpos primários foram incubados *overnight* a 4°C. Após a lavagem, as células foram incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho IgG 568 e 488 (Molecular Probes, Oregon, USA 1:1000 – cat. A11011), e 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Molecular Probes, Oregon, USA) para visualização do núcleo. A montagem das lâminas foi feita com o meio de montagem Prolong™ Diamond Antifade Mountant (Invitrogen™ – Cat. P36961). As marcações foram visualizadas através do Microscópio Confocal Zeiss LSM 510 META Microscopy (Heidelberg, DEU).

3.18 Marcação celular com Anexina V e Iodeto de Propídeo

A porcentagem de células viáveis, em apoptose e/ou em necrose foi determinada através do kit FITC Annexin V Apoptosis Detection (BD Pharmingen™, Califórnia, USA) e contabilizada em citômetro de fluxo. Após o tempo de estímulo, as células foram transferidas para tubos de citometria apropriados e lavadas duas vezes com PBS gelado. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 100µL de tampão de ligação e incubadas com 1,5µL de anti-anexina V-FITC por 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. Após a

incubação, foram adicionados 200µL de tampão de ligação e 1,5µL de iodeto de propídio (PI). Em seguida as amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo (FACScalibur) em um intervalo de até 30 minutos conforme instruções do fabricante. Para cada amostra foram adquiridos 10.000 eventos no gate. A análise foi realizada no software BD FlowJo.

3.19 Detecção de Óxido Nítrico

O soro de pacientes e HD foram utilizados para determinar a concentração de NO. Foi utilizado um ensaio colorimétrico onde estes níveis são calculados através da razão dos níveis de Nitrito/ Nitrato pelo kit "Nitric Oxide (NO₂/NO₃⁻) detection kit" (Enzo Technology). A leitura de absorvância foi obtida em leitor de ELISA SpectraMax 190 (Molecular Devices - EUA/Canadá) à 540 - 570 nm.

3.20 Atividade de Arginase

A atividade da Arginase foi determinada medindo a conversão de L-arginina em L- ornitina e uréia usando a metodologia descrita por da Silva et al., 2012. Resumidamente, 25 µl de amostra de soro foram solubilizados com 25 µl de tampão de lise contendo 0,1% Triton X-100, 10 mM MnCl₂ e 50 mM Tris-HCl (pH 7,5). A arginase foi ativada por aquecimento durante 7 min a 56°C. A hidrólise da L-arginina foi feita incubando o lisados com 50 µl de L-arginina (pH 9,7) a 37°C por 60 min. A reação foi interrompida por a adição de 400 µl de solução ácida [H₂SO₄ (96%) /H₃PO₄ (85%) /H₂O,1:3:7, v/v/v]. A concentração de Ureia foi medida a 540 nm após a adição de 20 µl de α-isonitrosopropiofenona (ISPF, dissolvido em etanol 100%; Sigma, St. Louis, MO, EUA) usando um espectrofotômetro (TECAN, EUA) seguido de aquecimento a 100°C por 45 min. A atividade de uma unidade de enzima (ARG) é definida como a quantidade de enzima que catalisou a formação de um µMol de ureia por 60 segundos.

3.21 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. A análise dos experimentos in vitro foi realizada pelo teste Kruskal-Wallis, Mann-Whitney ou

One-Way ANOVA. Para todas as análises estatísticas o valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. As análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

4. RESULTADOS

4.1 *M. leprae* e MLMA aumentam a atividade de IDO-1 em mDCs

No intuito de investigar se *M. leprae* e suas frações eram capazes de induzir um aumento na expressão proteica de IDO-1 em mDCs, as células foram estimuladas com *M. leprae*, MLMA e MLSA em diferentes concentrações (0,1, 1 e 10 µg/mL) por 24 h e a expressão de IDO-1 foi avaliada por citometria de fluxo. O *gate* apresentado na figura 14A mostra a população de mDCs após diferenciação com GM-CSF e IL-4. Observamos que cerca de 68% das células se diferenciaram para mDCs. A curva de dose resposta mostra um aumento do percentual de células IDO-1 positivas quando estimuladas por *M. leprae* e MLMA nas concentrações de 10 e 50 µg/mL, entretanto, o estímulo com a fração antigênica MLSA não apresentou nenhum efeito significativo. (Figura 14B). A partir desses resultados, a concentração de 10 µg/mL foi utilizada para os demais experimentos. Na figura 14C os histogramas representativos mostram que cerca de 1% das mDCs não estimuladas são IDO-1⁺, essa semelhança de baixa expressão da proteína IDO-1 também foi observada no estímulo com a fração antigênica MLSA (2,3%), entretanto, *M. leprae* e fração antigênica MLMA foram capazes de induzir, respectivamente, 12,1% e 7,4% de células IDO-1⁺.

Para avaliar se o aumento da expressão de IDO-1 se refletiria em um aumento de sua atividade enzimática, avaliamos a razão quinurenina/triptofano. Para isto, mDC foram estimuladas com 10 µg/mL de *M. leprae*, MLMA e MLSA por 24h. Após este período os sobrenadantes foram coletados e analisados por HPLC. Conforme observado na Figura 14D, *M. leprae* e MLMA na concentração de 10 µg/mL foram capazes de aumentar significativamente a atividade enzimática de IDO-1, o mesmo não foi observado pela fração MLSA.

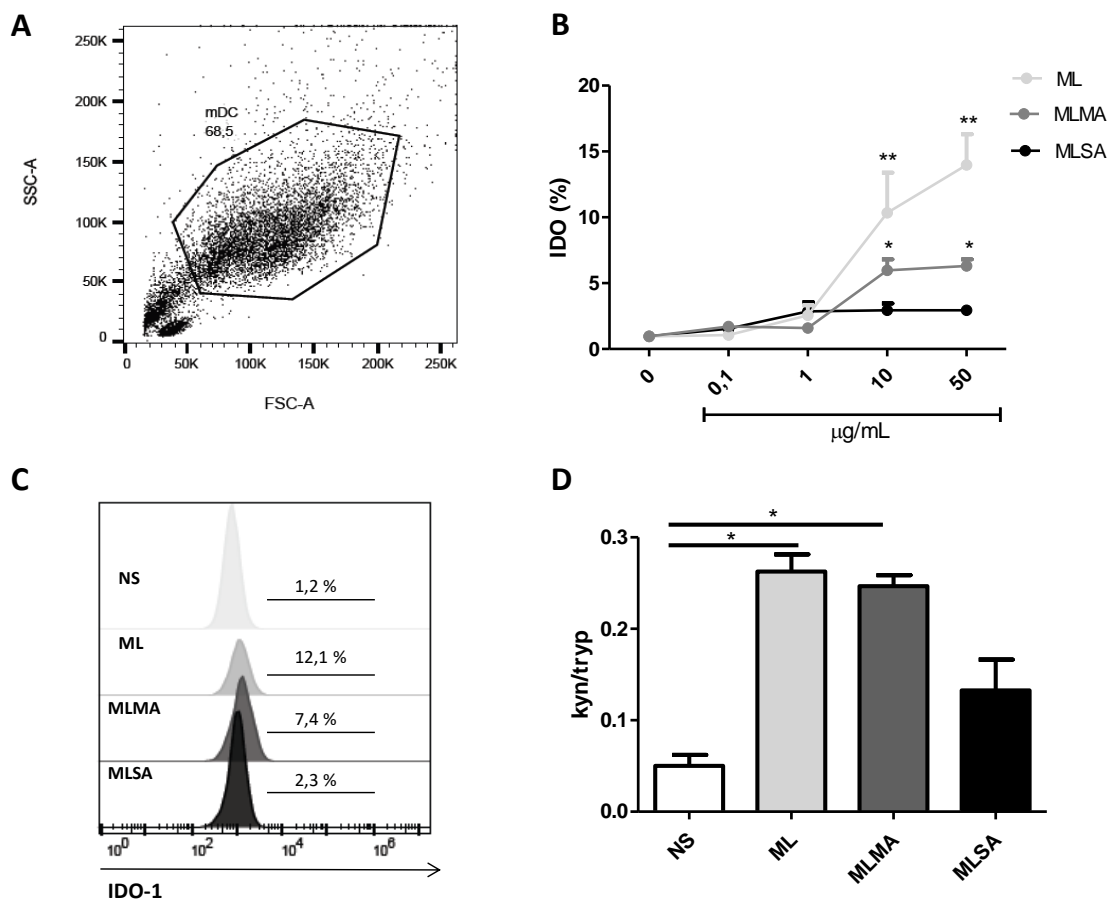


Figura 14. Expressão e atividade de IDO-1 em mDCs. mDCs diferenciadas foram plaqueadas (1×10^6 células por poço). (A) Estratégia de *gate* para análise de citometria de fluxo. (B) Expressão de IDO-1 em mDCs estimuladas ou não com *M. leprae*, MLMA ou MLSA a 0,1, 1 ou 10 $\mu\text{g/mL}$, por 24 horas. Após esse período, as células foram marcadas com anticorpo intracelular anti-IDO-1. A aquisição foi realizada na citometria de fluxo BD FACSAria e a análise realizada no software FlowJo. (C) Histogramas representativos de mDCs estimulados com ML ou suas frações antigênicas (10 $\mu\text{g/mL}$) avaliadas quanto a expressão proteica de IDO-1 por citometria de fluxo. (D) Os sobrenadantes das culturas celulares com as concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$ foram coletados e a atividade do IDO-1 foi avaliada pela razão quinurenina/triptofano (kyn/tryp) por HPLC. Os gráficos representam a média \pm desvio padrão de quatro experimentos realizados independentemente. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ (Mann-Whitney). (NS) do inglês, *not stimulated* – células não estimuladas, (ML) *M. leprae*, (MLMA) fração de membrana de *M. leprae* e (MLSA) fração solúvel de *M. leprae*.

4.2 TNF é importante na indução da atividade da IDO-1 por *M. leprae* e suas frações em mDCs

Nas DCs, INF- γ e TNF ativam a via de sinalização JAK/STAT (do inglês, *Janus kinase and Signal transducer activator of transcription*), bem como o fator regulador IRF3 (do inglês, *Interferon regulatory factor 3*), uma vez ativada, essa cascata de sinalização é capaz de ativar IDO-1 (Robinson *et al.*, 2005). A figura 15A-D mostra histogramas representativos de mDCs estimuladas com *M. leprae*, MLMA e MLSA e a capacidade desses estímulos em induzir a expressão de células IDO⁺TNF⁺. Pode-se observar que a fração MLMA foi capaz de induzir um aumento na frequência de células duplamente positivas, IDO-1⁺TNF⁺, quando comparadas com células não estimuladas (Figura 15E).

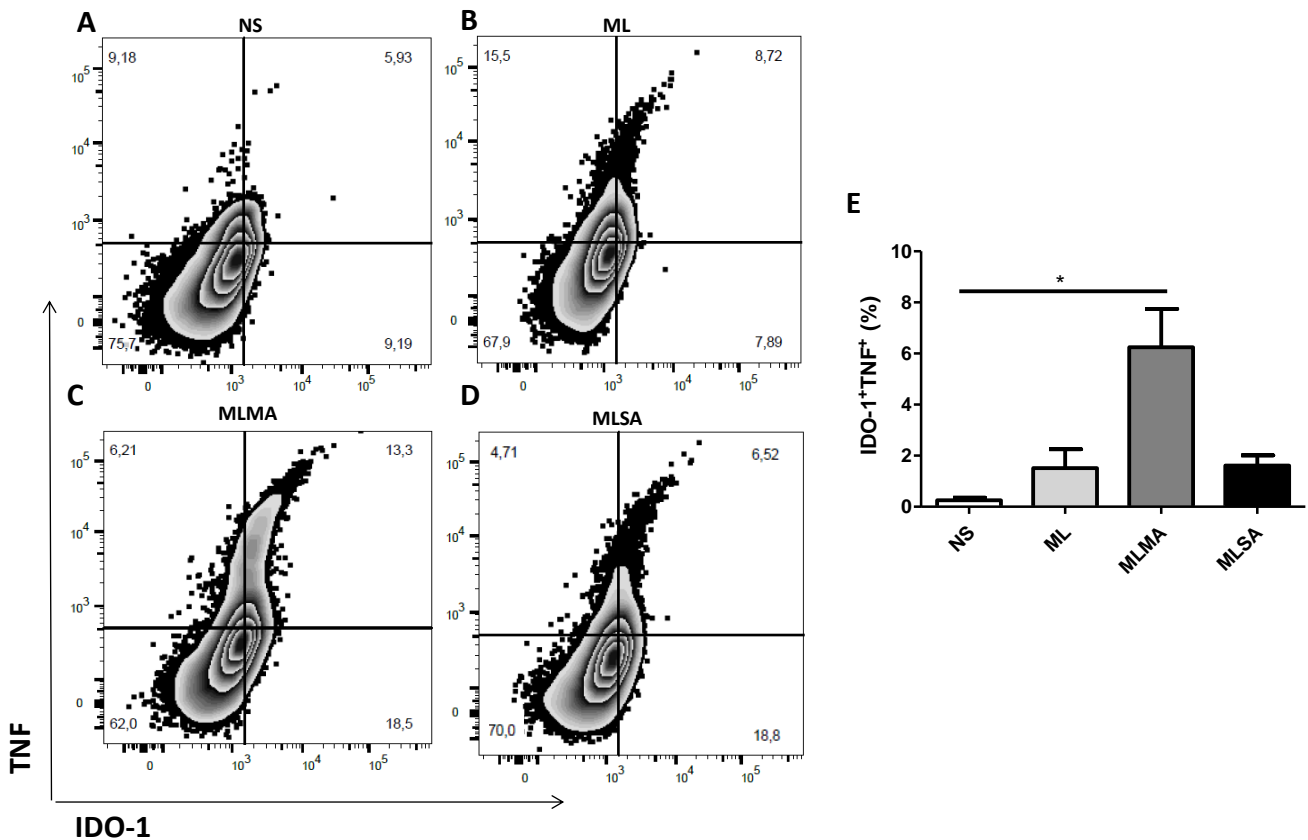


Figura 15. MLMA induziu um aumento na frequência de células IDO-1⁺TNF⁺. mDCs foram plaqueadas (1x10⁶ células por poço) e estimuladas ou não com ML, MLMA ou MLSA na concentração de 10 μ g/mL por 24h. Após esse período, as células foram lavadas e marcadas com anticorpos intracelulares anti-IDO-PE e anti-TNF-Alexa Fluor 700. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo BD FACSaria e a análise realizada usando o software FlowJo. (A-D) *Dot plots* representativos de mDCs estimuladas com ML ou suas frações antigênicas (10 μ g/mL) avaliadas quanto a expressão de células IDO⁺TNF⁺. (E) Gráfico representando o resultado a

porcentagem de expressão de células IDO⁺TNF⁺. O gráfico representa a média ± desvio padrão de quatro experimentos realizados independentemente. *p < 0,05 (Mann-Whitney). (NS) do inglês, *not stimulated* – células não estimuladas, (ML) *M. leprae*, (MLMA) fração de membrana de *M. leprae* e (MLSA) fração solúvel de *M. leprae*.

Ao contrário do TNF, a IL-10 é uma das citocinas anti-inflamatórias capazes de regular a inflamação suprimindo a resposta de DCs e macrófagos e induzindo um aumento de linfócitos Tregs via IDO-1 (Couper *et al.*, 2008). Analisamos então a frequência de células IDO⁺IL-10⁺ por citometria de fluxo, no entanto, *M. leprae* e suas frações antigênicas não foram capazes de induzir um aumento na frequência de células IDO-1⁺IL-10⁺ (Figura 16).

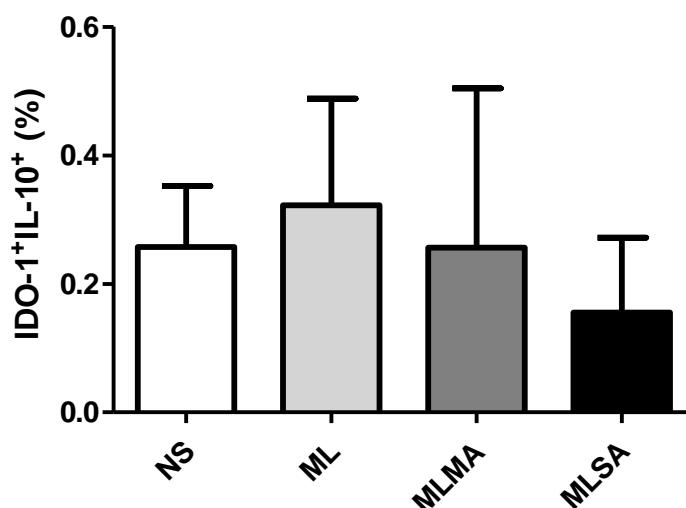


Figura 16. *M. leprae* e suas frações não foram capazes de induzir um aumento na frequência de células IDO-1⁺IL-10⁺. mDCs foram plaqueadas (1x10⁶ células por poço) e estimuladas ou não com ML, MLMA ou MLSA na concentração de 10 µg/mL por 24h. Após esse período, as células foram lavadas e marcadas com anticorpos intracelulares anti-IDO-PE e anti-IL-10-APC. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo BD FACSAria e a análise realizada usando o software FlowJo. O gráfico representa o resultado da porcentagem de expressão de células IDO⁺IL-10⁺. O gráfico representa a média ± desvio padrão de quatro experimentos realizados independentemente. (NS) do inglês, *not stimulated* – células não estimuladas, (ML) *M. leprae*, (MLMA) fração de membrana de *M. leprae* e (MLSA) fração solúvel de *M. leprae*.

Para confirmar os dados observados por citometria de fluxo, e expandir as análises em relação ao efeito de *M. leprae* e das frações antigênicas estudadas sobre a produção de citocinas, foi avaliado por ELISA, o sobrenadante

de cultura de mDCs. Conforme observado na Figura 17, *M. leprae* não foi capaz de modular significativamente a produção das citocinas testadas. No entanto, MLMA foi capaz de induzir um aumento estatisticamente significativo nas concentrações de TNF e IL-6 (Figura 17A e 17C) quando comparado com células não estimuladas. Em contraste, MLSA induziu um aumento nos níveis de IL-10 (Figura 17B). Não houve alteração na produção de IL-15 pelas mDCs após os estímulos com *M. leprae* e suas frações (Figura 17D).

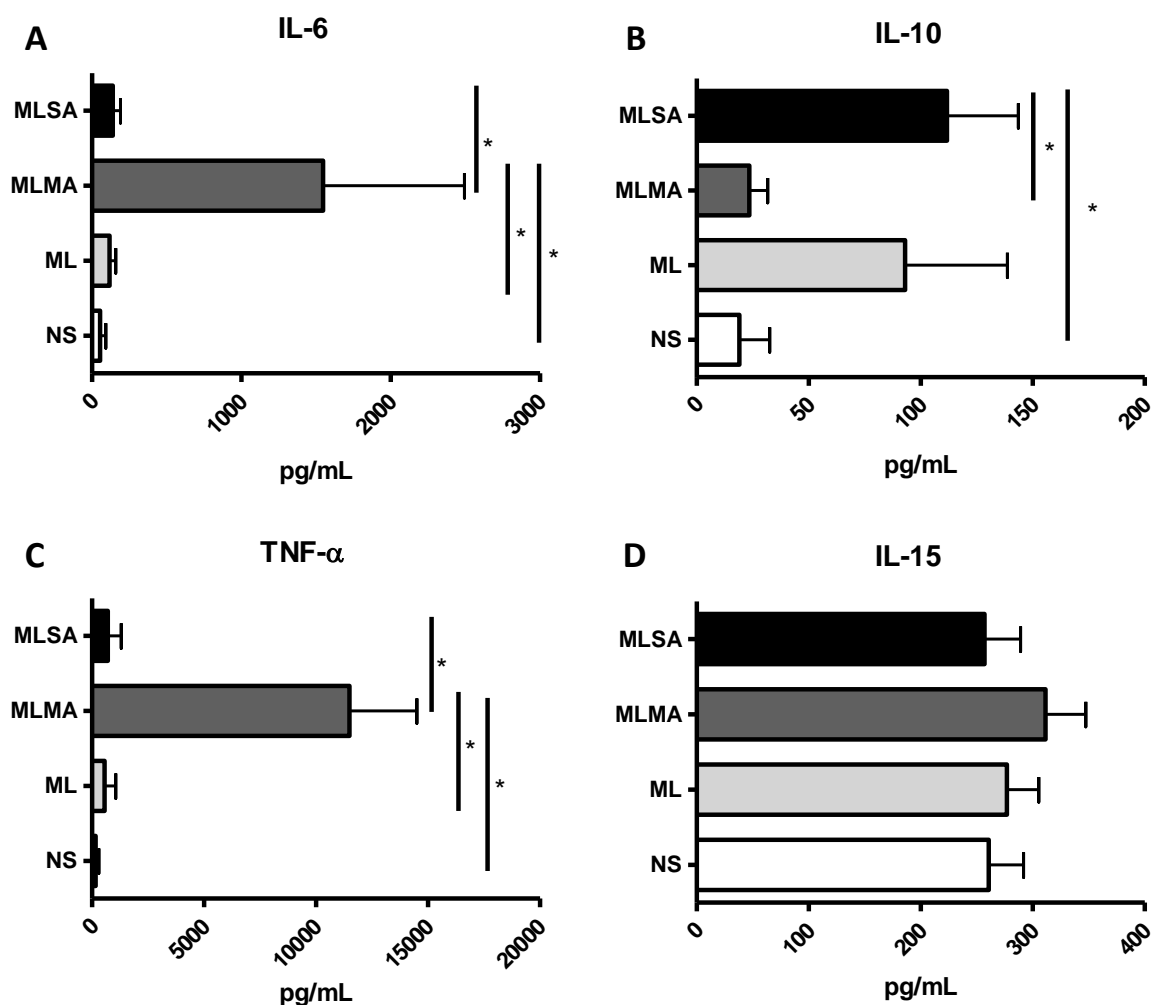
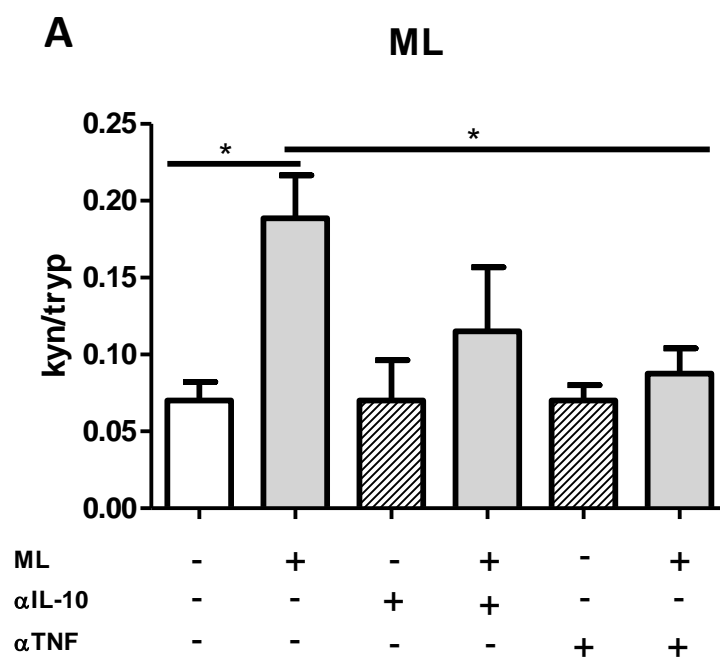


Figura 17. Efeitos antagônicos das frações de *M. leprae* na indução de citocinas por mDCs.

mDCs foram plaqueadas (1×10^6 células por poço) e estimuladas ou não com ML, MLMA ou MLSA na concentração de $10 \mu\text{g/mL}$ por 24h. Após esse período, os sobrenadantes dessas culturas foram coletados e as concentrações das citocinas (A) IL-6, (B) IL-10, (C) TNF e (D) IL-15 foram avaliadas por ELISA. Os gráficos representam a média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentemente realizados. * $p < 0,05$ (Mann-Whitney). (NS) do inglês, *not stimulated* – células não estimuladas, (ML) *M. leprae*, (MLMA) fração de membrana de *M. leprae* e (MLSA) fração solúvel de *M. leprae*.

Como observado anteriormente, a estimulação com MLMA induziu um aumento na produção de TNF pelas mDCs, enquanto que a estimulação com MLSA levou a produção de IL-10 nessas mesmas células. Mediante a isso, fomos investigar o papel de IL-10 e TNF na indução da atividade de IDO-1 por *M. leprae* e suas frações em mDCs. Conforme mostrado na Figura 18A-C, o bloqueio de TNF com anticorpo neutralizante, α TNF, levou a uma diminuição significativa da atividade de IDO-1 em culturas de mDCs estimuladas tanto com *M. leprae* quanto com as frações antigênicas MLMA e MLSA, sugerindo um papel importante desta citocina na indução de IDO-1. Entretanto, o mesmo efeito não foi observado após o bloqueio de IL-10 com o anticorpo neutralizantes, α IL-10, para os estímulos por *M. leprae* e MLMA. Observamos que o bloqueio de IL-10 reduziu a atividade de IDO-1 apenas em mDCs estimuladas com MLSA (Figura 18 A-C).



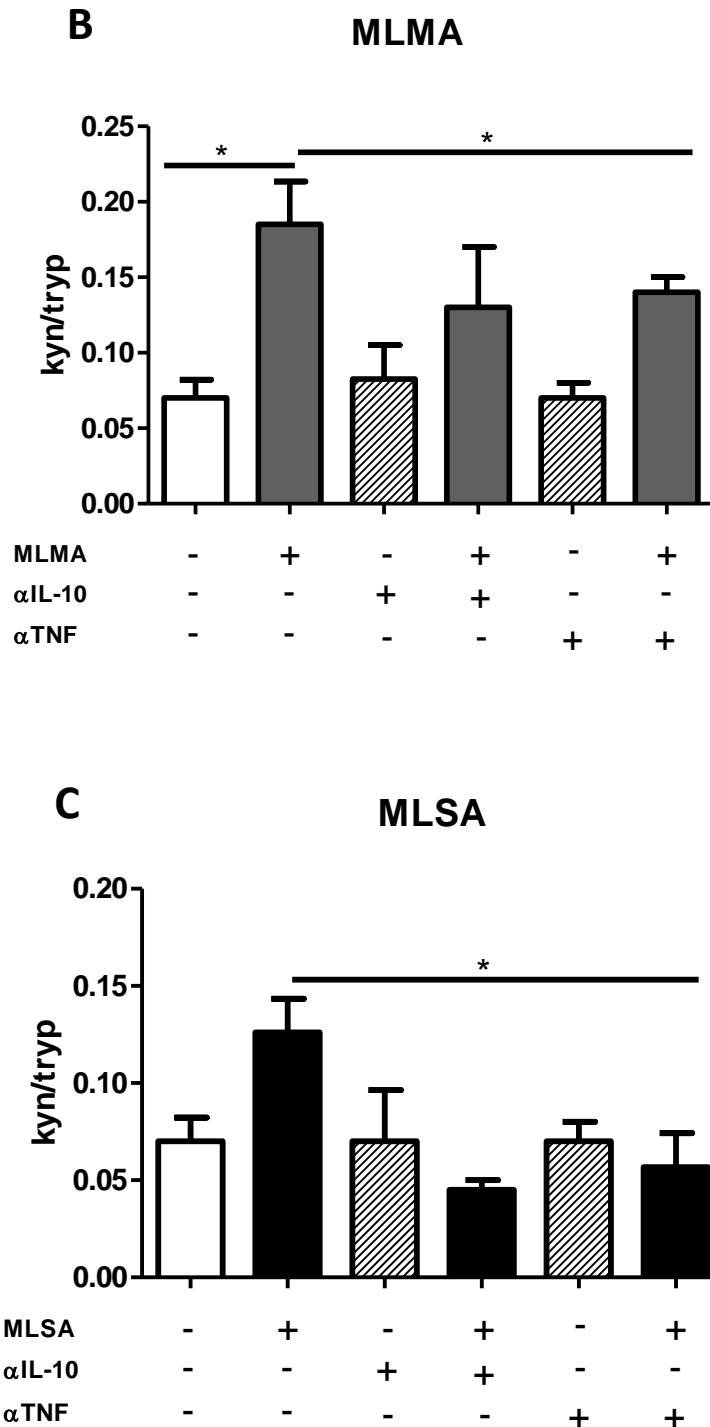


Figura 18. Importância do TNF na indução da atividade de IDO-1 em mDCs estimuladas por *M. leprae* e suas frações antigênicas. mDCs foram plaqueadas (1×10^6 células por poço) e 1 hora antes da adição dos estímulos, os anticorpos neutralizantes α IL-10 humano (100 μ g/mL) ou α TNF humano (500 μ g/mL) foram adicionados nas culturas e, em seguida, estimuladas com ML, MLMA ou MLSA na concentração de 10 μ g/mL por 24 horas. Após esse período, os sobrenadantes foram coletados e a atividade de IDO-1 foi avaliada pela razão quinurenina/triptofano (kyn/trp) por HPLC. (A) ML (B) MLMA (C) MLSA. Os gráficos representam

a média \pm desvio padrão de quatro experimentos realizados independentemente. * $p < 0,05$ (Mann-Whitney). (NS) do inglês, *not stimulated* – células não estimuladas, (ML) *M. leprae*, (MLMA) fração de membrana de *M. leprae* e (MLSA) fração solúvel de *M. leprae*.

4.3 TLR2 é importante para a indução da atividade deIDO-1 em mDCs

Sabendo que a membrana de *M. leprae* contém lipoproteínas que podem ativar a sinalização de TLR2, e que a mesma é capaz de induzir uma resposta inflamatória (Montoya & Modlin, 2010), fomos investigar o possível envolvimento da via de TLR2 na indução deIDO-1 em mDCs estimuladas por *M. leprae*, MLMA e MLSA.

Para avaliar a participação de TLR2 na indução deIDO-1, utilizamos um anticorpo neutralizante (α TLR2). Para a maior compreensão do papel de TLR2, usamos também o agonista de TLR2, Pam3Cys, como controle positivo. Conforme observado na Figura 19A, o Pam3Cys foi capaz de induzir o aumento estatisticamente significativo da atividade deIDO-1 quando comparado a cultura de mDCs não estimuladas. Quando as mDCs foram estimuladas apenas com o anticorpo neutralizando, α TLR2, essas células não foram capazes de induzir a atividade deIDO-1. O bloqueio de TLR2 diminuiu significativamente a atividade deIDO-1 em mDCs induzida por *M. leprae* e por suas frações antigênicas, demonstrando que esse processo de ativação enzimática deIDO-1 envolve TLR2.

Já foi demonstrado que a via de sinalização TLR-MyD88-NF- κ B é requerida para promover o desenvolvimento de doenças inflamatórias (Shon *et al.*, 2015). Mediante a isso e a tudo que fora mostrado nos dados anteriores, utilizamos um inibidor peptídico da proteína adaptadora MyD88 (pMyD88), a fim de confirmar a participação da ativação de TLR na modulação da atividade deIDO-1. Foi possível observar uma diminuição na atividade deIDO-1 quando o peptídeo inibidor foi adicionado às culturas de *M. leprae* e das frações antigênicas MLMA e MLSA (Figura 19B).

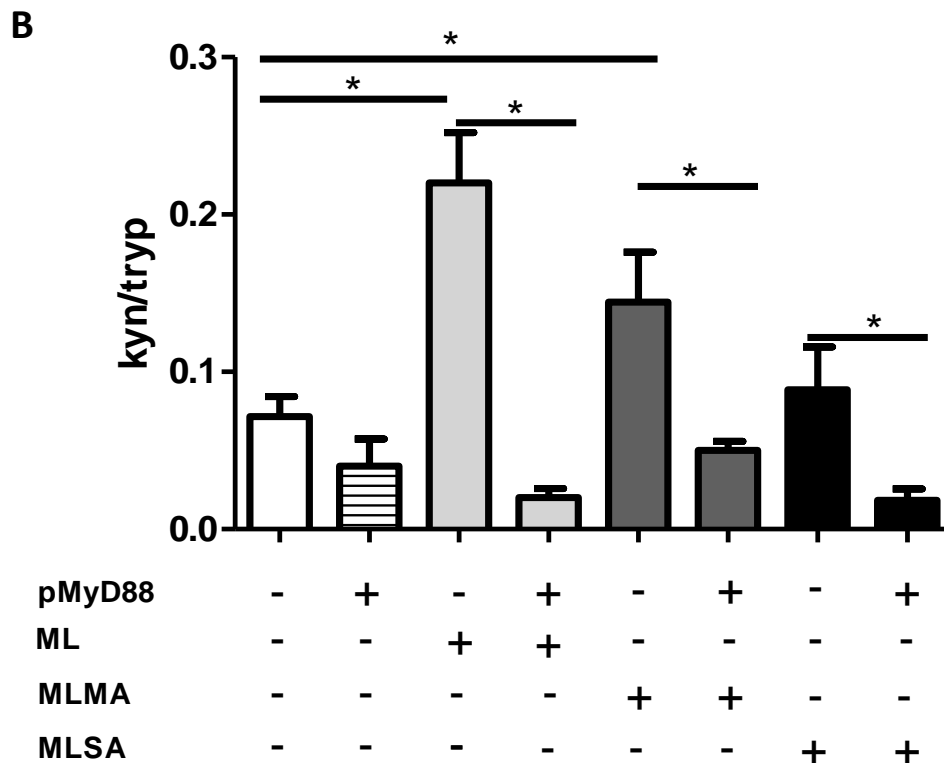
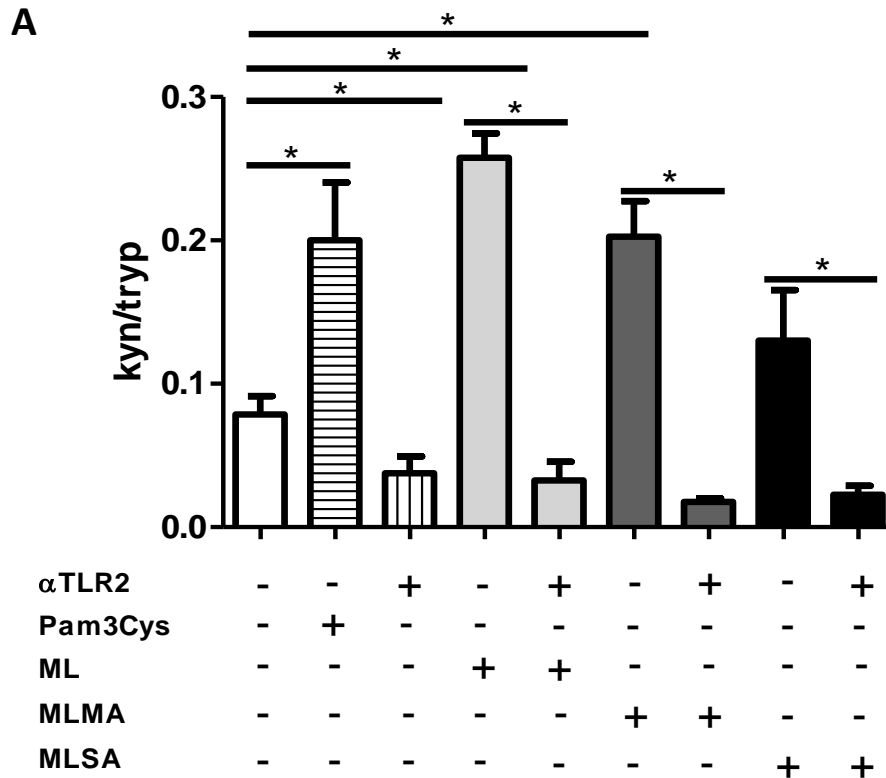


Figura 19. TLR2 é importante na indução da atividade do IDO-1 em mDCs. mDCs foram plaqueadas (1×10^6 células por poço) e 1 hora antes do estímulo, foi adicionado o agonista de TLR2, Pam3Cys (controle positivo) (10 μ g/mL), o anticorpo neutralizante α TLR2 humano (1

µg/mL) ou o peptídeo inibidor de MyD88 (pMyD88) (MyD88i; IMGENEX, San Diego, CA) (1 µg/mL), em seguida, as células foram estimuladas com ML, MLMA ou MLSA a 10 µg/mL, por 24 horas. Após esse período, os sobrenadantes dessas culturas foram coletados e a atividade do IDO-1 foi avaliada pela razão quinurenina/triptofano (kyn/Tryp) por HPLC. (A) αTLR2 (B) pMyD88. Os gráficos representam a média ± desvio padrão de quatro experimentos realizados independentemente. *p < 0,05 (Mann-Whitney). (NS) do inglês, *not stimulated* – células não estimuladas, (ML) *M. leprae*, (MLMA) fração de membrana de *M. leprae* e (MLSA) fração solúvel de *M. leprae*.

4.4 *M. leprae* e suas frações influenciam o perfil tolerogênico dos linfócitos

Com o intuito de verificarmos se o aumento na expressão e atividade de IDO-1 influenciam no fenótipo dos linfócitos após o *priming* pelas mDCs, foi realizado um ensaio de co-cultura utilizando as mDCs previamente estimuladas com *M. leprae* e suas frações antigênicas por 24 horas e, posteriormente, foi adicionado os linfócitos autólogos na proporção de 20 linfócitos: 1 mDC. Após o período de 5 dias de cultura, fomos analisar o fenótipo desses linfócitos por citometria de fluxo analisando a expressão de células CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, ou seja, células Tregs. Foi possível observar um aumento no percentual de células CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ nas culturas estimuladas com *M. leprae* e MLSA quando comparadas as células não estimuladas, mas não nas culturas estimuladas com MLMA (Figura 20 A-D).

Um análogo sintético do Tryp, o 1-metil triptofano (1-MT), é um inibidor seletivo da atividade enzimática da IDO-1 (Lewis *et al.*, 2017). O 1-MT foi utilizado nas culturas com a intenção de avaliarmos se esse fenótipo Tregs dos linfócitos induzidos pelas mDCs era dependente da atividade de IDO-1. Como observado na figura 20E-H, os *dot plots* representativos mostram que com a inibição de IDO-1 ocorreu uma diminuição na indução da expressão de células CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ nas culturas estimuladas com *M. leprae* e as frações antigênicas MLMA e MLSA. O gráfico representa as diferenças estatisticamente significativa em relação ao aumento da expressão de células Tregs por *M. leprae* e MLSA que são diminuídas na presença do 1-MT.

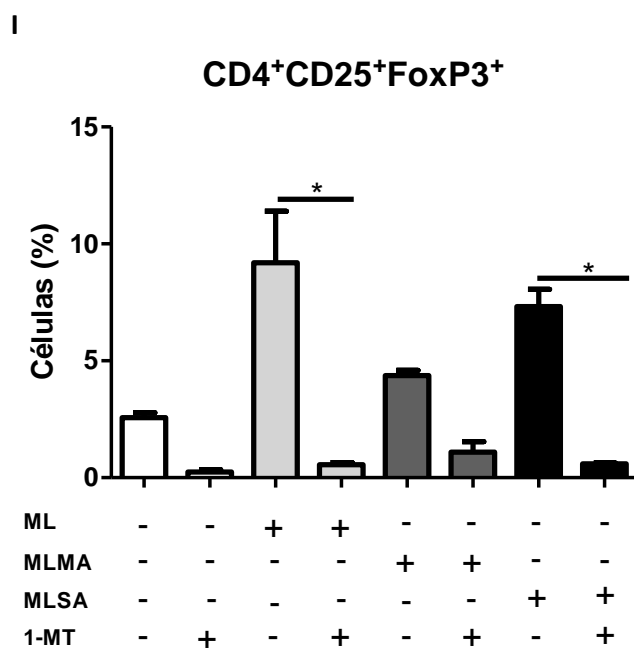
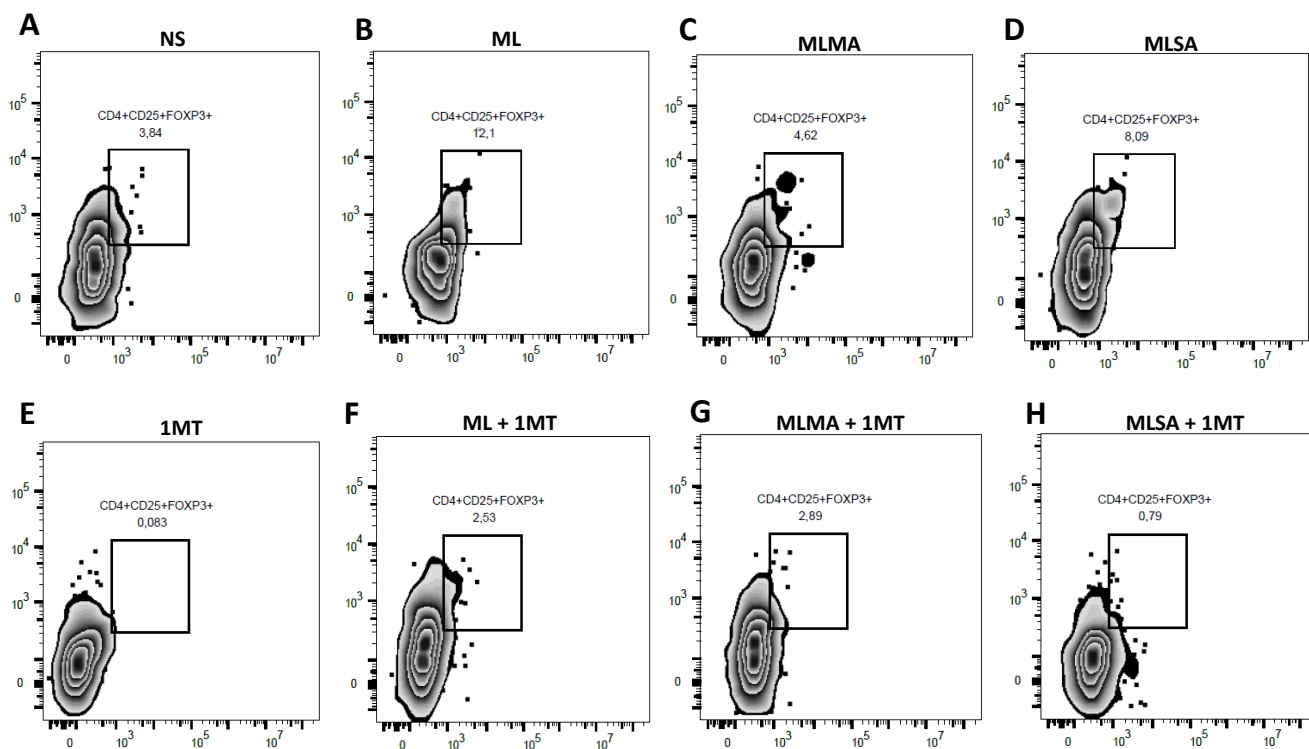


Figura 20. *M. leprae* e MLSA induzem um aumento na expressão de células Treg. mDCs foram plaqueadas (1×10^4 células por poço) e 1 hora antes e estimulados, o 1-MT (inibidor de IDO-1) foi adicionado a cultura, em seguida, as células foram estimuladas com ML, MLMA ou MLSA a $10 \mu\text{g/mL}$, por 24 horas. Após esse período, as células foram lavadas e os linfócitos autólogos (20 linfócitos: 1 mDC) foram cultivados por 5 dias. Em seguida, as células foram marcadas com anticorpos intracelulares anti-CD4, CD25 e Foxp3 ou anticorpos isotipos. A aquisição foi realizada na citometria de fluxo BD FACSAriaII e a análise realizada no software

FlowJo. (A-D) *Dot plots* representativos de co-culturas (20 linfócitos: 1 mDC) estimuladas com ML ou suas frações antigênicas (10 µg/mL) avaliadas quanto a expressão de células CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. (E-H) *Dot plots* representativos de co-culturas (20 linfócitos: 1 mDC) estimuladas com 1-MT, ML ou suas frações antigênicas (10 µg/mL) avaliadas quanto a expressão de células CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. (I) Gráfico representando o resultado a porcentagem de expressão de células CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. O gráfico representa a média ± desvio padrão de quatro experimentos realizados independentemente. *p < 0,05 (Mann-Whitney). (NS) do inglês, not stimulated – células não estimuladas, (ML) *M. leprae*, (MLMA) fração de membrana de *M. leprae* e (MLSA) fração solúvel de *M. leprae*.

4.5 Atividade de IDO-1 aumentada em pacientes multibacilares

Sabendo que *M. leprae* é capaz de induzir um aumento da expressão e atividade de IDO-1 em mDCs de voluntários sadios e que suas frações antigênicas MLMA e MLSA apresentam efeitos antagônicos que podem estar envolvidos na resposta imunológica da Hanseníase, fomos avaliar as mDCs de pacientes MB e PB. Para isso, monócitos provenientes de sangue periférico de pacientes MB e PB foram diferenciados em mDCs, na presença de GM-CSF e IL-4, por 6 dias. Após esse período, avaliamos a expressão de CD1a, um marcador característico de mDCs, e IDO-1 por imunofluorescência. O resultado mostra um perfil de diferenciação das mDCs morfológicamente distinto entre os dois grupos testados, observamos que as mDCs de PB apresentam uma morfologia mais arredondada e com menos dendritos quando comparada as mDCs de pacientes MB (Figura 21A-B). Além disto, fomos avaliar o percentual de células CD1a⁺ nessas células. Apesar de não ter sido observado uma diferença significativa na porcentagem de células CD1a⁺ entre as formas clínicas (Figura 21C), foi detectado um aumento significativo tanto no percentual de expressão de IDO-1 (Figura 21D), quanto na porcentagem de células CD1a⁺IDO-1⁺ nos pacientes MB quando comparado aos PB (Figura 21E).

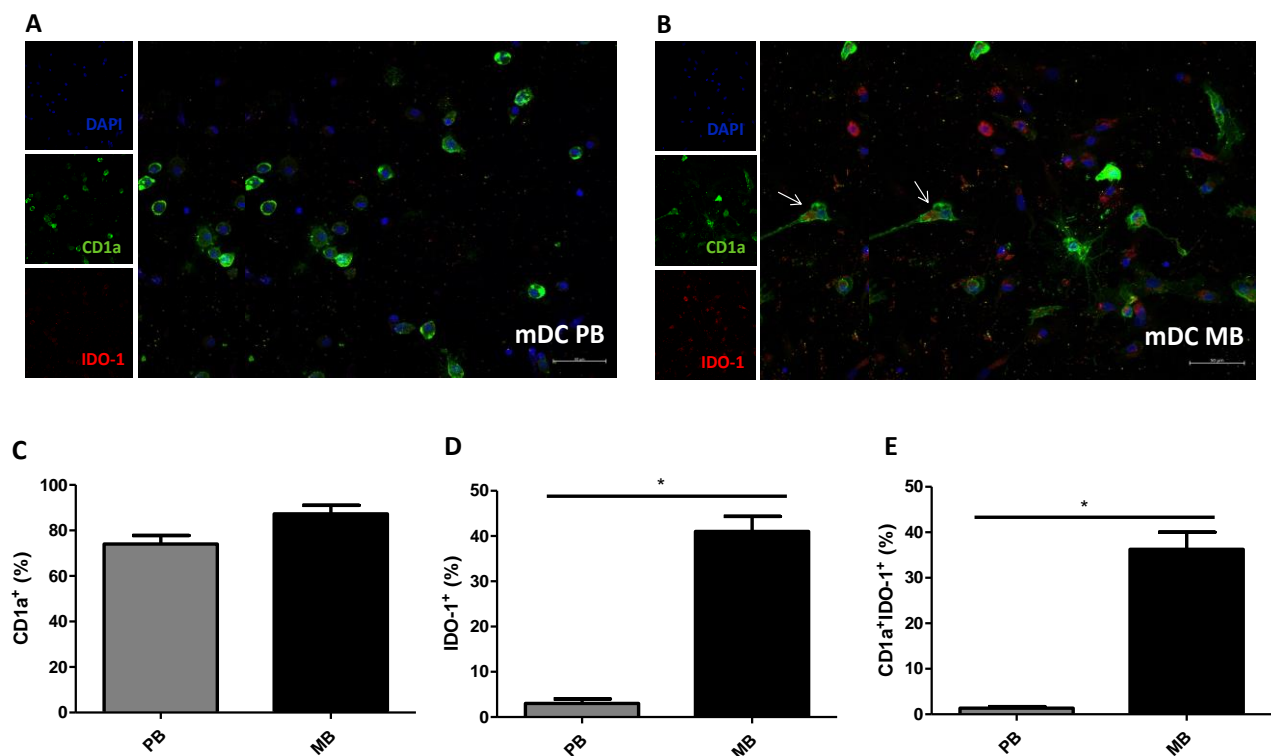


Figura 21. mDCs de pacientes multibacilares induzem um aumento da expressão de células CD1a⁺IDO-1⁺. mDCs de pacientes PB e MB foram plaqueadas (1×10^5 células por poço), fixadas e imunomarcadas com anticorpos específicos para anti-CD1a Mouse (verde), anti-IDO-1 rabbit (vermelho). O núcleo celular foi marcado com DAPI (azul). As imagens da imunofluorescência foram obtidas através do microscópio LSM 710 (Zeiss) e a análise realizada no programa ZENsoftware. (A) A imagem representa a lâmina de mDCs de um paciente PB representativo do grupo. (B) A imagem representa a lâmina de mDCs de um paciente MB representativo do grupo. (C) O gráfico representa a expressão de mDCs CD1a⁺. (D) O gráfico representa a expressão de mDCs IDO-1⁺. (E) O gráfico representa a expressão de mDCs CD1a⁺IDO-1⁺. As barras de aumento representam 50 μ m. As setas indicam o local onde ocorre a dupla marcação dos anticorpos anti-CD1a e anti-IDO-1. Os gráficos representam a média \pm desvio padrão dos dados obtidos. * $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis). (PB n=5/ pacientes BT e TT) e (MB n=4/ pacientes BL e LL).

Para confirmar se a diferença de expressão de IDO-1 em mDCs observada entre pacientes MB e PB se refletiria ao nível sistêmico, o soro de pacientes com as formas MB (BL e LL) e PB (BT e TT) foram avaliados quanto a razão quinurenina/triptofano (kyn/tryp) que nos permite avaliar a atividade de IDO-1. Como observado na figura 22, a atividade enzimática de IDO-1 foi maior em pacientes MB quando comparado aos PB.

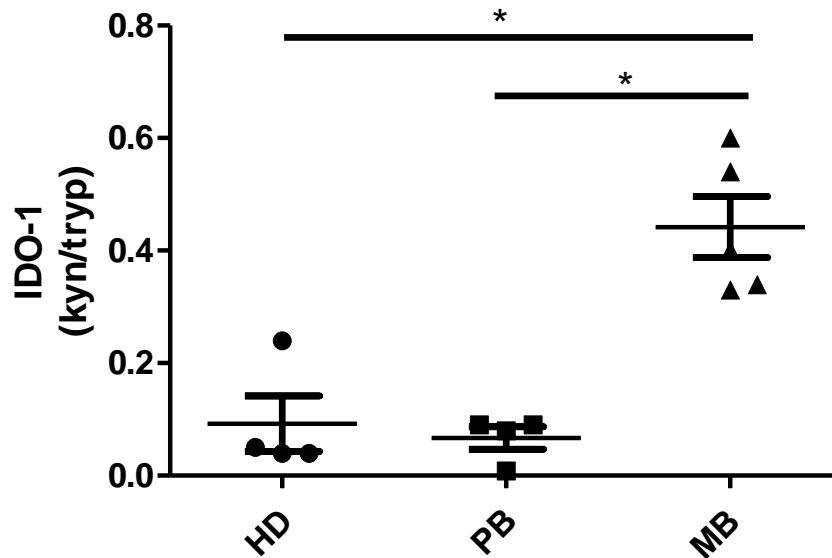


Figura 22. Atividade de IDO-1 aumentada em pacientes multibacilares. Amostras de soros dos pacientes foram utilizadas e a atividade IDO-1 foi avaliada pela razão quinurenina/triptofano (kyn/Tryp) por HPLC. O gráfico representa a média \pm desvio padrão dos dados obtidos. * $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis). (HD= 4) (PB n=5/ pacientes BT e TT) e (MB n=4/ pacientes BL e LL).

NO é um importante regulador da enzima IDO-1. No sistema imunológico, NO é produzido pela iNOS. NO inibe a enzima IDO-1 impedindo assim sua expressão induzida por IFN- γ (Salmelson-Jones & Yeh, 2006). A fim de avaliar a influência de NO nas diferentes formas clínicas da Hanseníase, dosamos a concentração de NO em soro de pacientes PB e MB. Observamos que a concentração de NO foi maior em pacientes PB quando comparados aos voluntários sadios. Observamos também que os soros de pacientes PB apresentam um aumento na concentração de NO significativamente maior quando comparado aos soros dos pacientes MB (Figura 23).

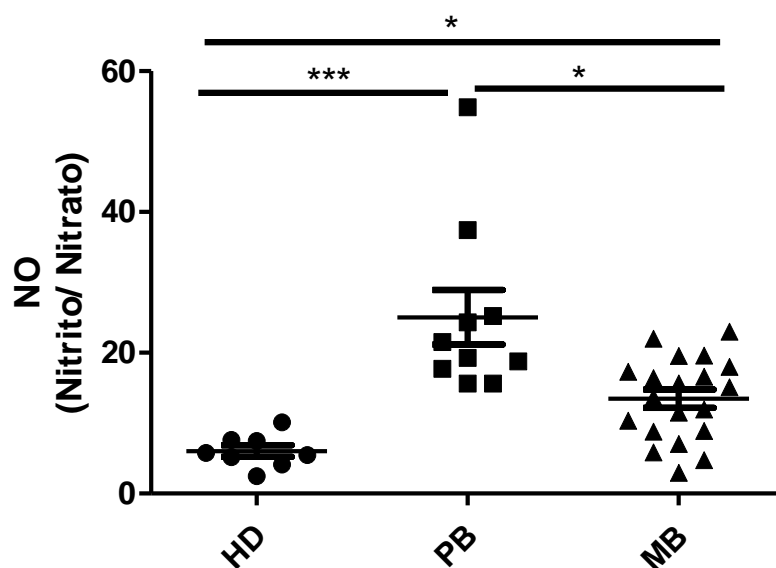


Figura 23. Concentração de NO aumentada em pacientes paucibacilares. Amostras de soros dos pacientes foram utilizadas em um ensaio colorimétrico onde os níveis NO foram calculados através da razão dos níveis de Nitrito/ Nitrato pelo kit "Nitric Oxide (NO₂/NO₃⁻) detection kit" (Enzo Technology). O gráfico representa a média ± desvio padrão dos dados obtidos. *p < 0,05 ***p < 0,001 (Kruskal-Wallis). (HD= 8) (PB n=10/ pacientes BT e TT) e (MB n=19/ pacientes BL e LL).

Mondanelli *et al.* (2017) descreveram que a atividade de Arg-1 é importante para a indução deIDO-1 em mDCs. Além disso, sabe-se que macrófagos ativados convertem L-arginina em L-citrulina, NO e NRS (do inglês, *reactive nitrogen species*) e que esse é o principal mecanismo citotóxico dessas células. Mediante a isso, fomos investigar o envolvimento de Arg-1 na nas diferentes formas clínicas da Hanseníase. Como observado na figura 24, a atividade de Arg-1 foi significativamente aumentada tanto em pacientes PB quanto em pacientes MB quando comparados aos voluntários sadios.

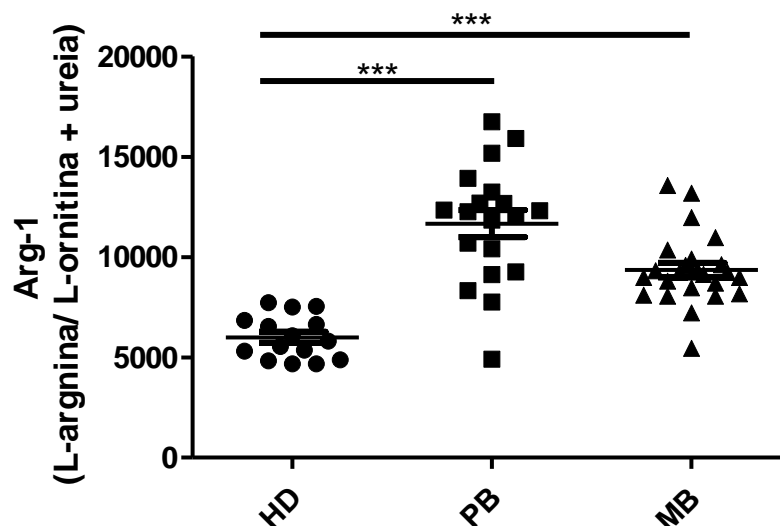
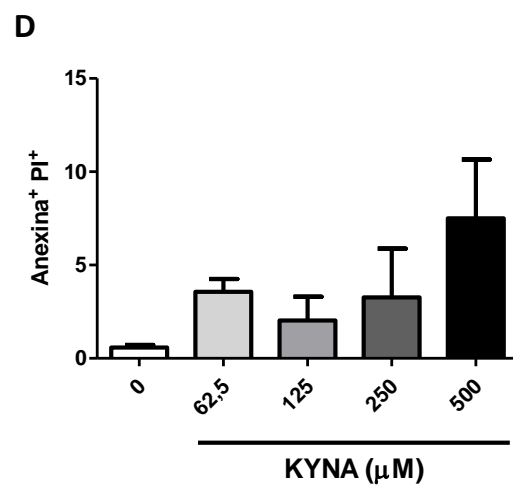
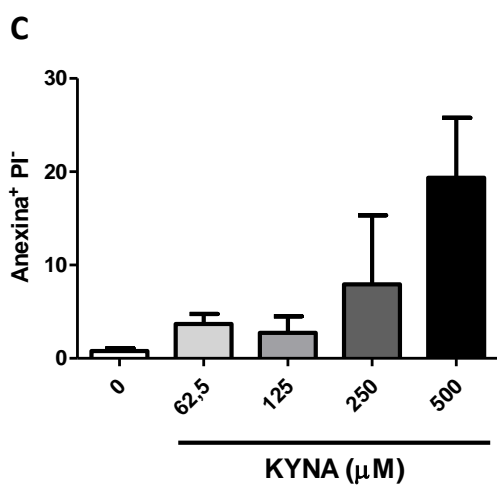
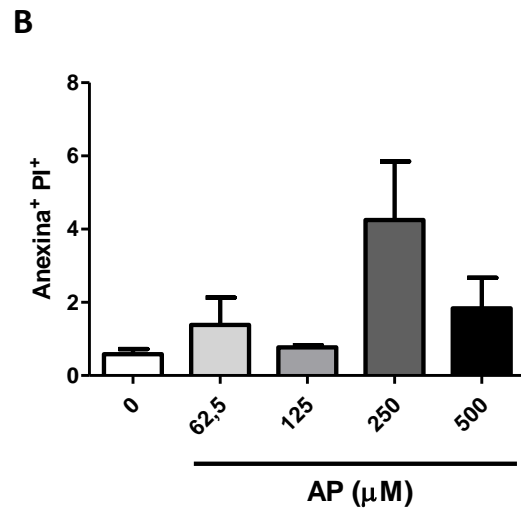
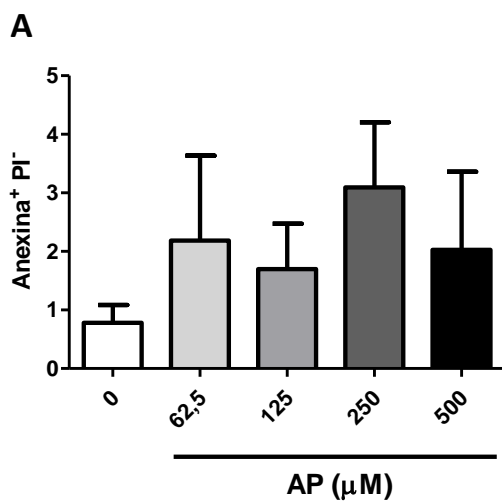


Figura 24. Atividade de Arg-1 aumentada em pacientes paucibacilares e multibacilares. Amostras de soros dos pacientes foram utilizadas em um ensaio de atividade de Arg-1 que mediu a conversão de L-arginina em L- ornitina e uréia. A concentração de Ureia foi medida a 540 nm usando um espectrofotômetro (TECAN, EUA). O gráfico representa a média \pm desvio padrão dos dados obtidos. *** $p < 0,001$ (Kruskal-Wallis). (HD= 14) (PB n=19/ pacientes BT e TT) e (MB n=19/ pacientes BL e LL).

4.6 Metabólitos do triptofano afetam a viabilidade das mDCs

A ativação de IDO-1 pode produzir efeitos imunossupressores através dos metabólitos da via das quinureninas, uma das principais vias do metabolismo do Tryp (Dounay, 2015). Os metabólitos analisados nesta etapa do projeto foram: ácido picolinínico (AP), ácido quinurênico (KYNA), ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA) e o ácido quinolínico (Quin). Além da via das quinureninas, o Tryp pode ser metabolizado à melatonina (MEL) que, assim como os metabólitos das quinureninas, inibe a produção de NO. (Gilad *et al.*, 1998). Para compreender melhor a participação destes metabólitos na Hanseníase, inicialmente foi analisado o envolvimento de AP, KYNA, 3-HAA, QUIN e MEL na viabilidade das mDCs. Para isso, foram adicionadas concentrações crescentes dos diferentes metabólitos nas culturas de mDCs purificadas. A viabilidade celular foi analisada por ensaios de citometria de fluxo avaliando a expressão de marcadores de morte celular como Anexina-V, gráficos à esquerda, e a incorporação de Iodeto de propídeo (PI, do inglês *Propidium Iodide*), gráficos à direita. O resultado observado mostra que tanto

AP quanto KYNA não afetaram a viabilidade das mDCs em nenhuma das concentrações utilizadas (Figura 25A - D), entretanto, o metabólito 3-HAA na concentração de 125 μM , foi capaz de aumentar significativamente a morte celular por apoptose das mDCs, com mais de 90% de células AnexinaV⁺PI⁺ (Figura 25F). O QUIN induziu a necrose apenas na concentração de 500 μM (Figura 25G), entretanto foi observado células AnexinaV⁺PI⁺ na presença de 62,5 μM de QUIN, sugerindo também morte por apoptose destas células (Figura 25H). Também observamos que a MEL não foi capaz de afetar a viabilidade das mDCs em nenhuma das concentrações utilizadas (Figura 25I - J).



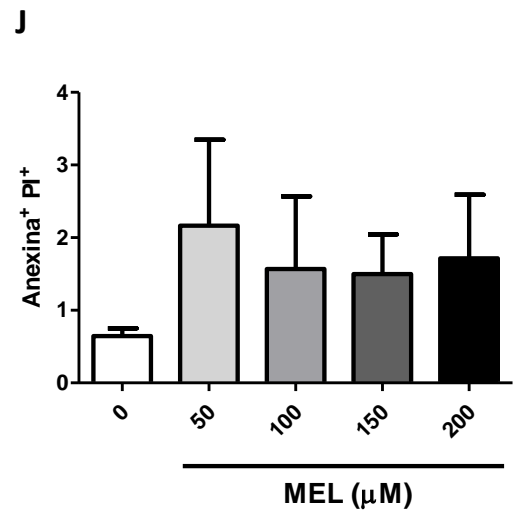
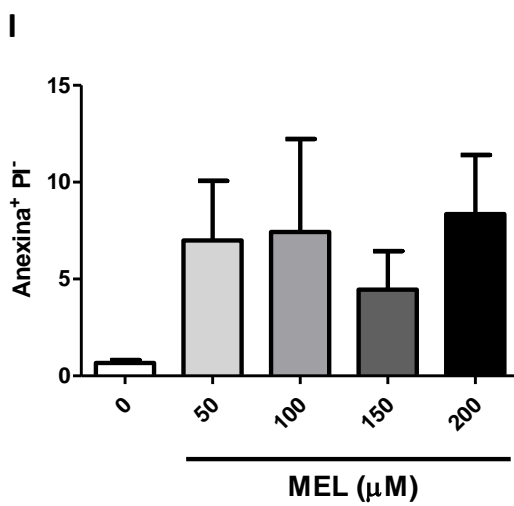
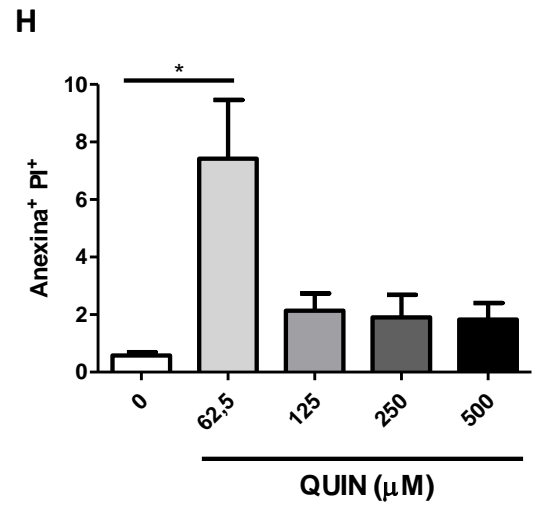
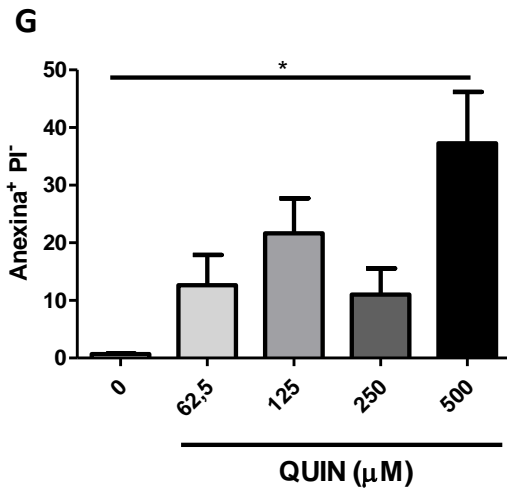
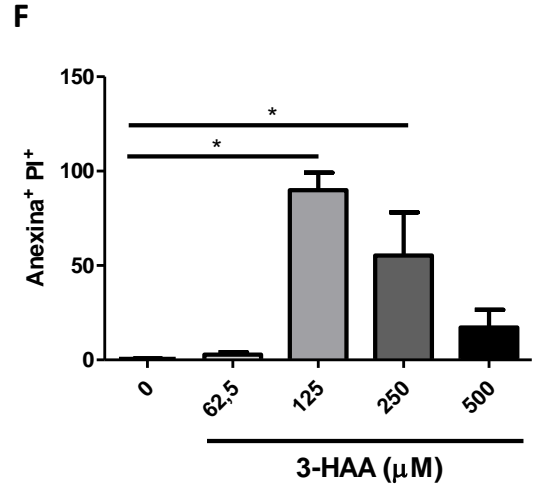
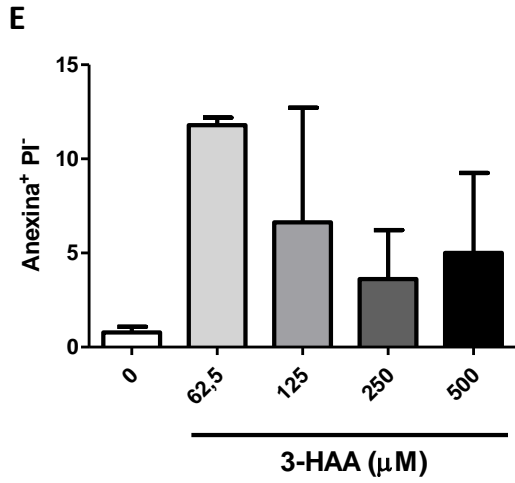


Figura 25. 3-HAA e QUIN afetam a viabilidade das mDCs. mDCs foram plaqueadas (1×10^6 por poço) e estimuladas na presença de ácido picolínico (AP) (A-B), ácido quinurênico (KYNA) (C-D), ácido 3-hidroxi-antranílico (3-HAA) (E-F) e ácido quinolínico (QUIN) (G-H) nas concentrações de 62, 125, 250 e 500 μM ou melatonina (MEL) (I-J) nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 μM . Após 24 h, a viabilidade celular foi avaliada por citometria de fluxo usando o anticorpo anti-Anexina V-FITC e o corante PI. A aquisição foi realizada na citometria de fluxo BD FACSAriaIIu e a análise realizada no software FlowJo. Para cada amostra, foram analisados no mínimo 10.000 eventos. Os gráficos representam a média \pm desvio padrão de quatro experimentos realizados independentemente. * $p < 0,05$ (Mann-Whitney).

A partir dos dados do efeito dos metabólitos de Tryp sobre a citotoxicidade de mDCs e sabendo que alguns deles apresentam efeitos protetores e outros efeitos citotóxicos, fomos avaliar se os mesmos afetariam a viabilidade intracelular de *M. lepra*. Com o objetivo explorarmos um pouco mais o impacto desses metabólitos na Hanseníase, a sobrevivência de *M. leprae* foi avaliada na presença das seguintes moléculas: AP, KYNA, 3-HAA, QUIN e MEL. Como observado na Figura 26, apenas 3-HAA, QUIN e MEL foram capazes de aumentar significativamente a viabilidade de *M. leprae*. Esses dados demonstram que esses metabólitos são importantes para a sobrevivência do bacilo em mDCs.

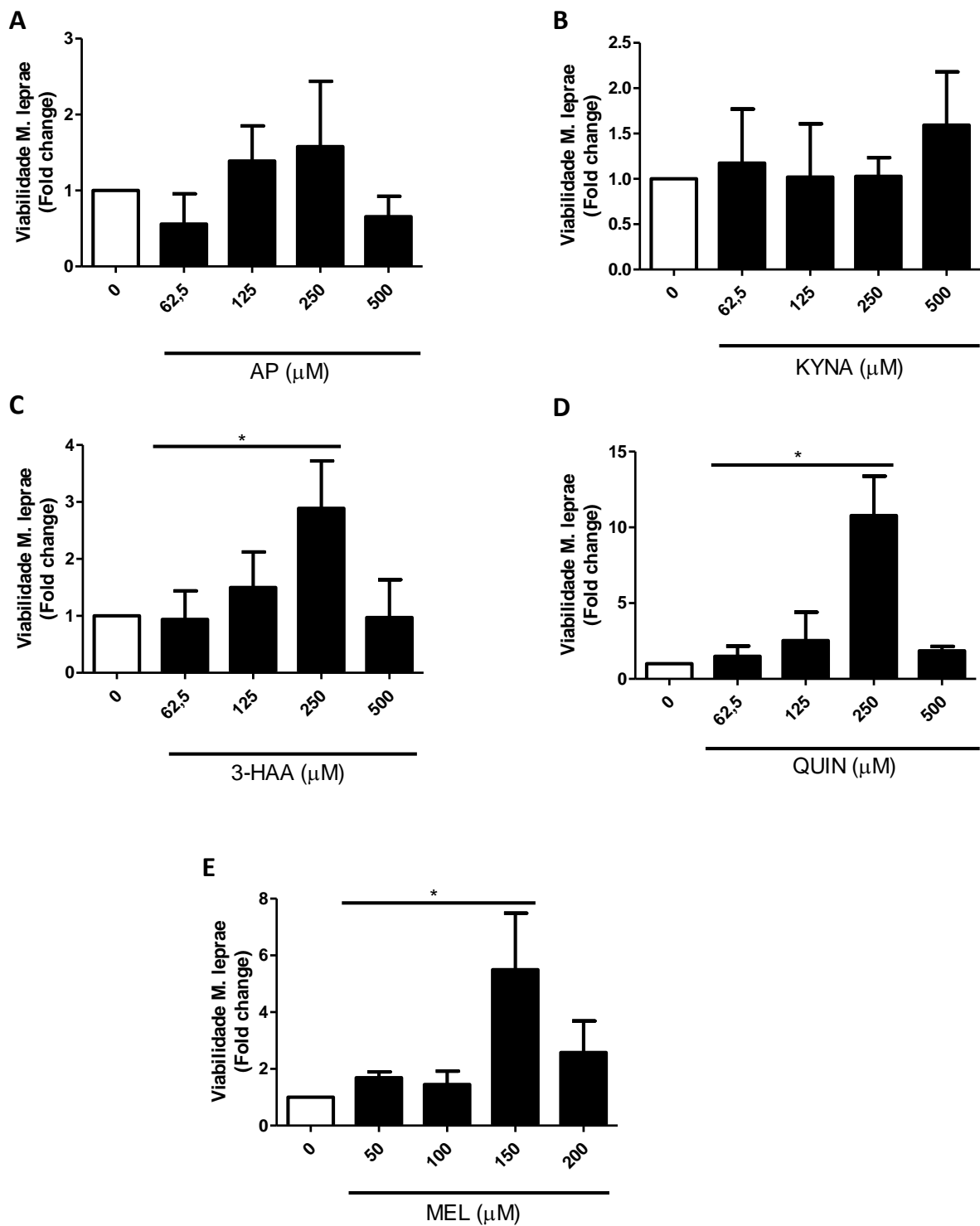
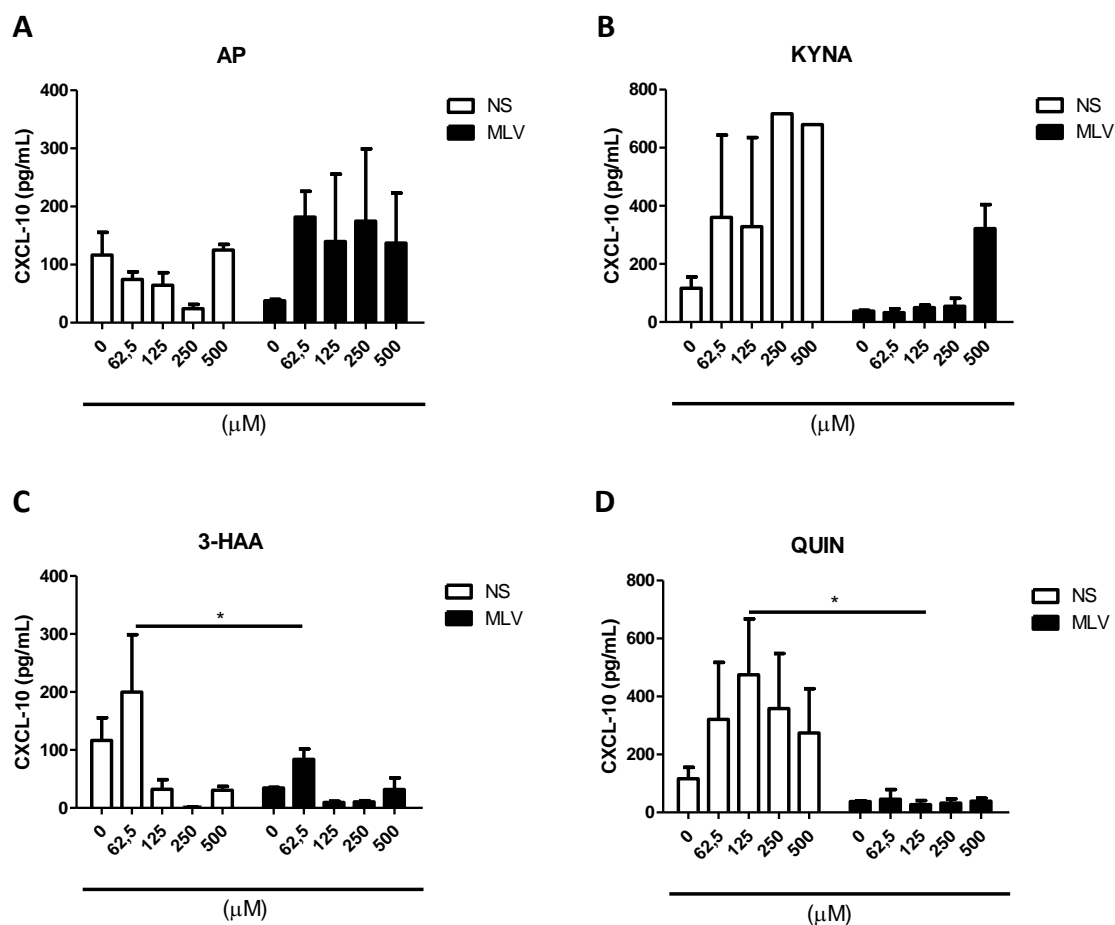


Figura 26. Metabólitos do triptofano são importantes para a sobrevivência de *M. leprae*. mDCs foram plaqueadas (1×10^5 células por poço) e infectadas com *M. leprae* viável (MLV) no MOI de 10:1 (10 bactérias:1 célula) e incubadas por 4h. Após esse período, essas células foram estimuladas com ácido picolínico (AP) (A), ácido quinurênico (KYNA) (B), ácido 3-hidroxiantranílico (3HAA) (C) e ácido quinolínico (QUIN) (D) nas concentrações de 62, 125, 250 e 500 μM ou melatonina (MEL) (E) nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 μM e incubados por 24 horas. Em seguida, a viabilidade intracelular de *M. leprae* foi estimada a partir da razão

entre 16S RNA e 16S DNA detectada por RT-PCR. Os gráficos representam a média \pm desvio padrão de quatro experimentos realizados independentemente. * $p < 0,05$ (Mann-Whitney). (NS) do inglês, *not stimulated* – células não estimuladas e (MLV) *M. leprae* viável.

A expressão de CXCL-10 é observada em muitas doenças inflamatórias do tipo Th1, onde seu papel é importante no recrutamento de células T para locais de inflamação tecidual (Dufour *et al.*, 2002). Com intuito de analisar se o efeito desses metabólitos sobre as mDCs afetaria a produção de algumas citocinas, avaliamos a produção de CXCL-10, IL-10 e TNF no sobrenadante de mDCs estimuladas ou não com *M. leprae* viável e os metabólitos de Tryp. Como observado na figura abaixo, *M. leprae* foi capaz de reduzir significativamente a produção de CXCL-10 em culturas de mDCs estimuladas com 3-HAA e QUIN, nas concentrações de 62,5 e 125 μ M, respectivamente. (Figura 29C-D). Entretanto, *M. leprae* induziu um aumento da produção de CXCL-10 em mDCs estimuladas com MEL (Figura 29E).



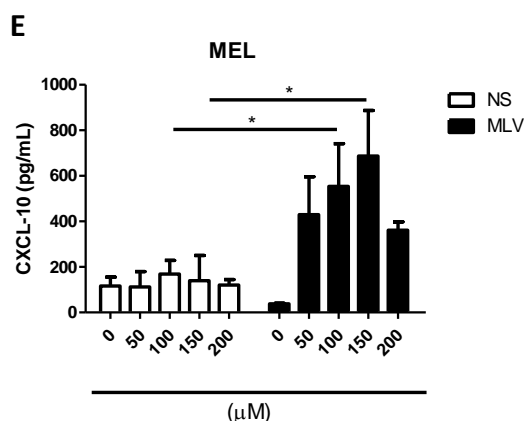


Figura 27. Produção de CXCL-10 por mDCs infectadas ou não com *M. leprae*. mDCs foram plaqueadas (1×10^5 células por poço) e infectadas com MLV no MOI de 10:1 (10 bactérias:1 célula), ou não, por 4 horas. Após esse período, essas células foram estimuladas com ácido picolínico (AP) (A), ácido quinurênico (KYNA) (B), ácido 3-hidroxiantranílico (3HAA) (C) e ácido quinolínico (QUIN) (D) nas concentrações de 62, 125, 250 e 500 μM ou melatonina (MEL) (E) nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 μM por 24h. Em seguida, os sobrenadantes foram coletados e a produção de CXCL-10 foi avaliada por ELISA. Os gráficos representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentemente realizados. * $p < 0.05$ (One-Way ANOVA). (NS) do inglês, *not stimulated* – células não estimuladas e (MLV) *M. leprae* viável.

A IL-10 suprime muitas funções de células T, principalmente ao impedir a produção de citocinas pro-inflamatórias pelas APCs (Trinchieri, 2007). Nesse contexto, também analisamos a produção IL-10 nesses ambientes. Diferentemente do que observamos no dado anterior, a infecção por *M. leprae* foi essencial para aumentar a produção de IL-10 quando as mDCs foram estimuladas com AP e KYNA (Figura 28A-B). No entanto, a produção dessa citocina não regulada por *M. leprae* frente aos outros metabólitos utilizados no estudo (Figura 28C-E).

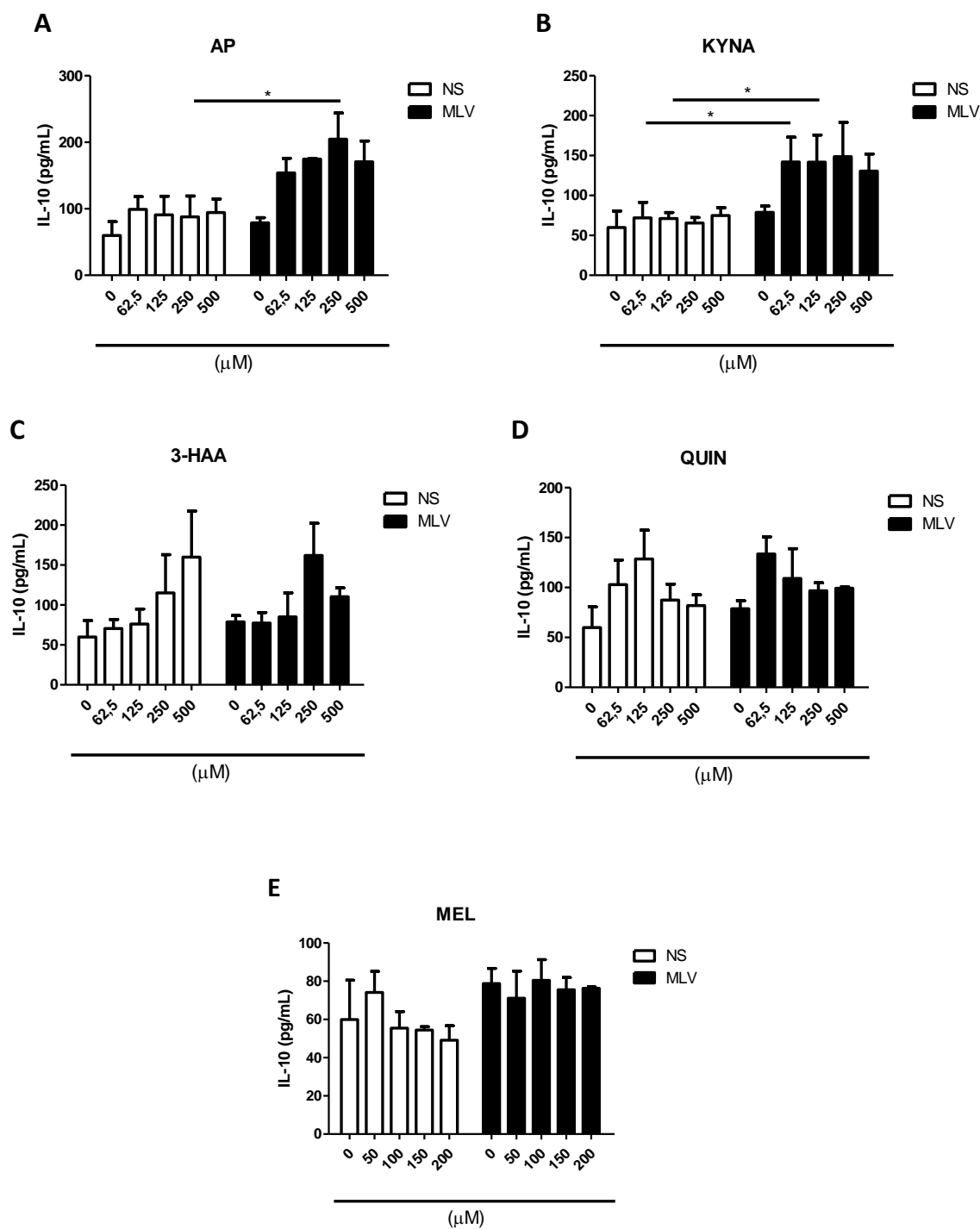
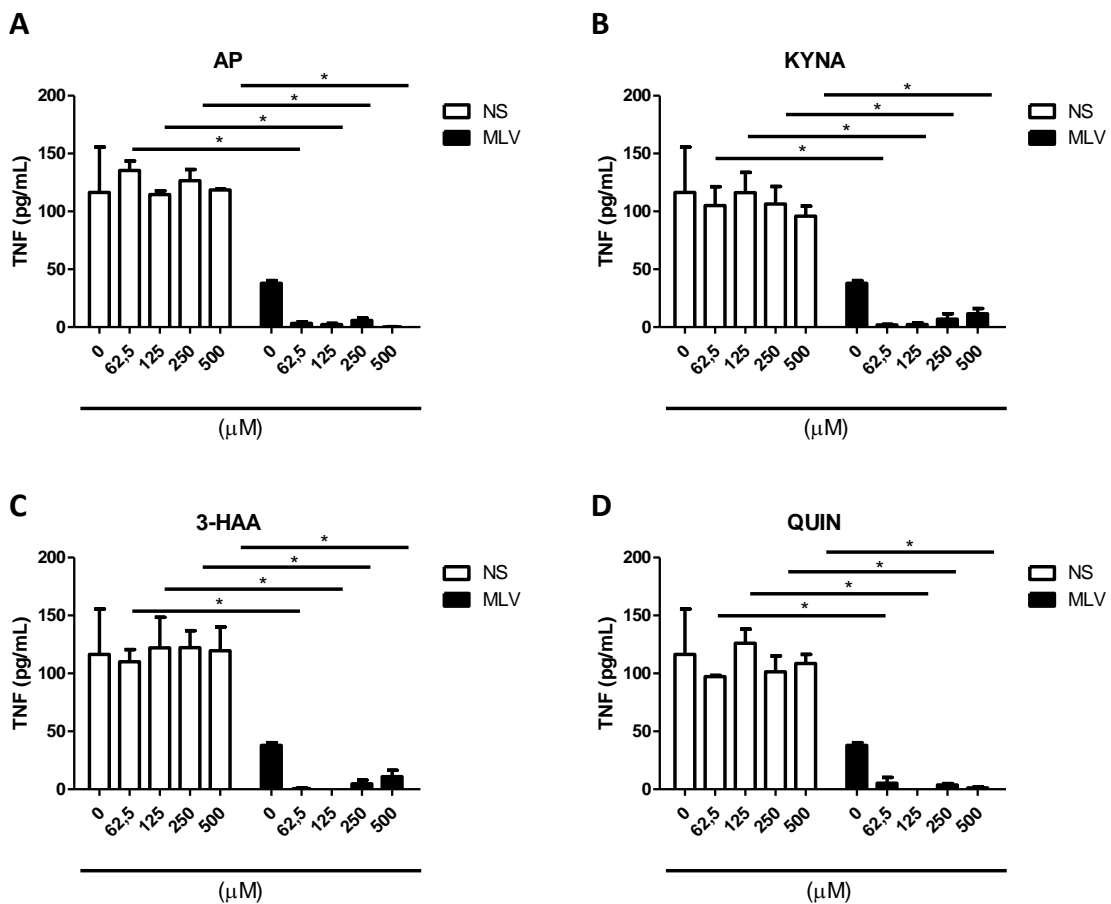


Figura 28. Produção de IL-10 por mDCs infectadas ou não com *M. leprae*. mDCs foram plaqueadas (1×10^5 células por poço) e infectadas com MLV no MOI de 10:1 (10 bactérias:1 célula), ou não, por 4 horas. Após esse período, essas células foram estimuladas com ácido picolínico (AP) (A), ácido quinurênico (KYNA) (B), ácido 3-hidroxiantranílico (3HAA) (C) e ácido quinolínico (QUIN) (D) nas concentrações de 62, 125, 250 e 500 μM ou melatonina (MEL) (E) nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 μM por 24h. Em seguida, os sobrenadantes foram coletados e a produção de IL-10 foi avaliada por ELISA. Os gráficos representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentemente realizados. * $p < 0.05$ (One-Way ANOVA). (NS) do inglês, *not stimulated* – células não estimuladas e (MLV) *M. leprae* viável.

O TNF em conjunto com o IFN- γ desempenha um papel importante no recrutamento de linfócitos (Hasan et al., 2004). Posteriormente, analisamos a produção de TNF por mDCs infectadas com *M. leprae* na presença dos metabólitos. Na figura 31 observamos que *M. leprae* foi capaz de diminuir significativamente a produção de TNF quando as culturas foram estimuladas com todos os metabólitos estudados, mostrando que esse pode ser um dos mecanismos utilizado pelo bacilo para manter sua sobrevivência na célula hospedeira.



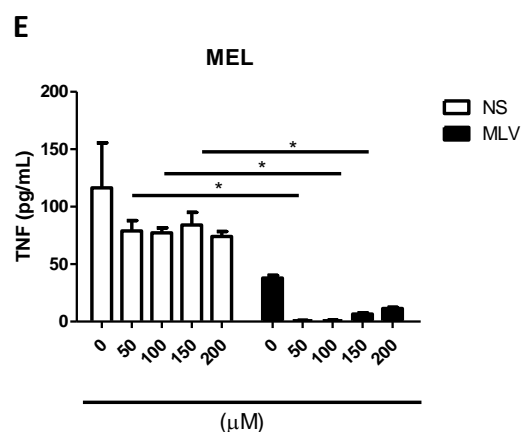


Figura 29. Produção de TNF por mDCs infectadas ou não com *M. leprae*. mDCs foram plaqueadas (1×10^5 células por poço) e infectadas com MLV no MOI de 10:1 (10 bactérias:1 célula), ou não, por 4 horas. Após esse período, essas células foram estimuladas com ácido picolínico (AP) (A), ácido quinurênico (KYNA) (B), ácido 3-hidroxiantranílico (3HAA) (C) e ácido quinolínico (QUIN) (D) nas concentrações de 62, 125, 250 e 500 μM ou melatonina (MEL) (E) nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 μM por 24h. Em seguida, os sobrenadantes foram coletados e a produção de TNF foi avaliada por ELISA. Os gráficos representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentemente realizados. * $p < 0.05$ (One-Way ANOVA). (NS) do inglês, *not stimulated* – células não estimuladas e (MLV) *M. leprae* viável.

5. DISCUSSÃO

A enzima IDO-1 catalisa a primeira etapa da via de degradação do aminoácido essencial triptofano e é expressa por células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs), células epiteliais, endotélio vascular e células tumorais. Os produtos catabólicos mediados por IDO-1, que são denominados quinureninas, exercem importantes funções imunossupressoras principalmente através da regulação da anergia das células T efetoras e induzindo a proliferação de células T reguladoras (Wu *et al.*, 2018). A enzima IDO-1 tem sido implicada em vários processos na saúde e na doença, mas seu papel na tolerância imunológica ainda é controverso. Inicialmente, a IDO-1 foi descrita associado a processos bactericidas relacionados à imunossupressão e tolerância de células T (Harden & Egilmez, 2012; Mellor & Munn 2014). Nos últimos anos, IDO-1 é reconhecida como uma molécula reguladora da imunidade em uma variedade de situações fisiopatológicas, incluindo infecções, transplantes e câncer (Schmidt & Schultze, 2014; Laurans *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2021).

A caracterização de ambientes infecciosos é importante para definir como a imunidade inata influencia o desenvolvimento subsequente da imunidade adaptativa. Mecanismos regulatórios que operam em ambos os estágios da imunidade também são críticos para determinar como a resposta imune ditará a gravidade de um processo infeccioso. Nesse contexto, exploramos os mecanismos regulatórios exercidos pela enzima IDO-1 através da infecção por *M. leprae*. No pólo lepromatoso da hanseníase, a alta expressão de IDO-1 juntamente com altos níveis de IL-10 e TGF- β podem ser responsáveis pela redução pronunciada da resposta imune celular antígeno-específica observada nesses pacientes (De Souza Salles *et al.*, 2011; Moura *et al.*, 2012). No polo tuberculóide da doença, onde predomina a expressão de IFN- γ , a IDO-1 seria induzida principalmente por essa citocina (Andrade *et al.*, 2015) e poderia estar associada à atividade microbicida, sugerindo que na hanseníase a IDO-1 pode ter um duplo papel, sendo tolerogênico ou microbicida dependendo do ambiente e das citocinas envolvidas em sua indução.

Nas lesões de pele de pacientes com hanseníase, além dos bacilos intactos, algumas frações de membrana e do citosol de *M. leprae*, expostas após

a morte do parasito, resultante tanto da resposta imune do hospedeiro quanto do tratamento com PQT, podem ser reconhecidos por diferentes tipos de receptores de reconhecimento padrão e, conseqüentemente, desencadearem padrões de resposta imune diferentes (Scollard *et al.*, 2006). No presente estudo, além do uso de *M. leprae* irradiado, as mDCs foram estimuladas pelas frações antigênicas MLMA e MLSA, de modo a entendermos como as diferentes frações modulam a função de mDCs.

Demonstramos que *M. leprae* é capaz de induzir um aumento na atividade de IDO-1 em mDCs quando comparado a células não estimuladas. Em paralelo, a expressão intracelular de IDO-1 foi analisada por citometria de fluxo e observamos que *M. leprae* e suas frações aumentaram a expressão de IDO-1, sendo este aumento maior após estimulação com MLMA. Já foi demonstrado que a infecção por *M. tuberculosis* leva à regulação positiva da expressão de IDO-1 em macrófagos murinos (Blumenthal *et al.*, 2012). Além disso, a atividade elevada de IDO-1 foi descrita em muitas síndromes inflamatórias crônicas, incluindo câncer, infecções, alergias e também durante a gravidez (Huang *et al.*, 2010; Bigenzahn *et al.*, 2017; Zhai *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2021; Esmaeili & Hajavi 2022).

A produção de citocinas nesses ambientes foi avaliada. Ressalta-se que entre os estímulos estudados, MLMA induziu um aumento na produção de citocinas inflamatórias, como TNF e IL-6. Observou-se também que a fração MLMA foi capaz de induzir um aumento na frequência de células IDO⁺TNF⁺. O TNF tem sido sugerido como uma das citocinas mais importantes para a indução de IDO-1. A contribuição do TNF para a ativação de IDO-1 induzida por LPS já foi observada (Fujigaki *et al.*, 2001). Além disso, o TNF medeia a depressão induzida pelo estresse regulando positivamente a enzima IDO-1 (Liu *et al.*, 2015). O TNF modula a resposta à citotoxicidade e à produção de citocinas inflamatórias (Chu, 2013), portanto, nossos dados sugerem que a fração MLMA pode estar envolvida em um efeito microbicida.

A relação IDO-1 e IL-10 tem sido descrita na literatura, em estudos de infecção de células por *E. coli* foi mostrado a associação de altos níveis de IDO-1 e IL-10 (Kassianos *et al.*, 2012). Makala *et al.* (2011) mostraram que o bloqueio de IDO-1 diminuiu a produção de IL-10, o que se correlacionou com a redução da inflamação local e da carga parasitária de *Leishmania major*. Outro dado

interessante que mostra essa relação, foi evidenciado por Tounsi *et al.* 2015, que observaram que a lisofosfatidilcolina (LPC) reverteu o equilíbrio imunológico IL-10 versus TNF e IL-6, em direção a um fenótipo tolerogênico, através da regulação positiva de IDO-1 (Tounsi *et al.*, 2015). Nossos resultados mostraram que *M. leprae* e MLSA induziram um aumento na secreção de IL-10, o que poderia sugerir um efeito regulatório, uma vez que um estudo anterior (Moura *et al.*, 2012) demonstrou que *M. leprae* foi capaz de induzir IDO-1 tanto ao de expressão gênica quanto proteica em monócitos humanos por um mecanismo dependente de IL-10.

Sabe-se que os principais ligantes de TLR2 são encontrados entre os compostos micobacterianos, incluindo lipoproteínas, lipomanana (LM) e fosfatidilinositol-manosídeos (PIMs). A resposta imune desencadeada pelos vários glicolipídios ou lipoproteínas micobacterianas nas APCs é equilibrada, dependendo dos receptores de reconhecimento de padrão, como por exemplo, os TLRs, DC-SIGN e receptor de manose, que estão envolvidos entre uma resposta inflamatória protetora caracterizada pela síntese de IL -12 e IFN γ , e uma resposta com liberação de IL-10 levando a uma inibição de células T (Moigne *et al.*, 2020).

Nossos dados também mostram que o bloqueio de TNF diminui a atividade de IDO-1 em mDCs por *M. leprae* e suas frações, diferentemente do bloqueio de IL-10. Esses resultados nos levaram a levantar a hipótese de que o TNF é induzido em diferentes níveis por diferentes antígenos presentes no citosol e na membrana celular do bacilo e que esta citocina é importante para a expressão e atividade de IDO-1 em mDCs humanas. Em contraste, a IL-10 não é tão eficiente na indução da expressão e atividade de IDO-1 em mDCs como observado anteriormente em monócitos humanos estimulados com *M. leprae* (Moura *et al.*, 2012).

O reconhecimento de componentes da parede celular micobacteriana, como açúcares, lipídios e peptídeos, pode induzir os macrófagos a secretar TNF e outras citocinas essenciais para o desenvolvimento de uma resposta inflamatória (Underhill *et al.*, 1999). A ativação de TLR2 através de LAM é capaz de induzir um aumento na produção de TNF em macrófagos infectados por *M. tuberculosis* (De Araújo *et al.*, 2017). Estudos anteriores mostraram ainda que a

expressão de IDO-1 em DCs pode ser induzida por citocinas inflamatórias e ligantes de TLRs (De Araújo *et al.*, 2017).

Nossos dados mostram que a presença do agonista de TLR2 (Pam3Cys) induziu um aumento na expressão e atividade de IDO-1 em mDCs. Além disso demonstramos que a ausência de TLR2 em mDCs foi suficiente para diminuir a atividade de IDO-1 induzida por *M. leprae* e por MLMA. Portanto, é possível que as lipoproteínas formadoras de membrana do *M. leprae* induzam IDO-1 em mDCs por um mecanismo que envolve a ativação de TLR2, levando a um efeito microbicida com a produção de citocinas inflamatórias.

A sinalização via TLR2/1 ativa as células de Schwann humanas, via lipoproteína de 19 kDa, causa um aumento no número de células apoptóticas, produção de citocinas inflamatórias como IL-6 e IL-8, que podem contribuir para danos nos tecidos, incluindo danos nos nervos periféricos na hanseníase (Oliveira *et al.*, 2003). As lipoproteínas de *M. tuberculosis*, como a de 19kD e ManLAM, são ligantes de TLR2 e envolvem o desenvolvimento de respostas imunes regulatórias (Gehring *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2006; Garg *et al.*, 2010). Estudos anteriores mostraram que o LPC subverte a sinalização mediada por TLR em DCs, o que impulsiona a diferenciação celular para um fenótipo tolerogênico (Tounsi *et al.*, 2015). Os efeitos tolerogênicos induzidos por IDO-1 dependem da sinalização de JNK induzida por TLR2/6 por *Faecalibacterium prausnitzii* e atividade de ectonucleotidase (Alameddine *et al.*, 2019). Nossos dados demonstraram que *M. leprae* induz um aumento na expressão e atividade de IDO-1 em mDCs, e que os componentes da membrana do bacilo desempenham um papel importante neste contexto via sinalização TLR2 associada à produção de citocinas inflamatórias. IDO-1 pode exigir sinalização TLR-MyD88-NF- κ B para promover o desenvolvimento de colite (Shon *et al.*, 2015). Como a ativação de NF- κ B depende de MyD88, realizamos ensaios com um inibidor de MyD88 e observamos que a ausência de MyD88 em culturas de mDCs leva a uma diminuição da atividade de IDO-1 em culturas estimuladas com *M. leprae* e suas frações.

Um mecanismo chave envolvido na imunossupressão mediada por mDCs é a expressão de IDO-1 (Mellor *et al.*, 2017). Nossos dados de co-cultura mostraram que *M. leprae* e MLSA, que induziram aumento da secreção de IL-10, são capazes de aumentar a expressão de linfócitos T reguladores

CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺. A interação de DCs com TLR2 e TLR4 infectadas com *Trichinella spiralis*, bem como seus produtos excretorios-secretorios de larvas musculares (ES L1) promovem a expansão de células CD4⁺ CD25^{high}Foxp3^{high} produtoras de IL-10 e TGF- β na forma dependente deIDO-1 (Ilic *et al.*, 2018). As DCs tratadas com FICZ (6-Formilindolo(3,2-b)carbazol), um ligante AhR de alta afinidade, são capazes de induzir a diferenciação de linfócitos T virgens em células T reguladoras (Jurado-Manzano, 2017). Esses achados fornecem uma nova visão sobre os mecanismos do fenótipo tolerogênico induzido pelo receptor Toll em DCs, o que pode ajudar a entender melhor os processos envolvidos na indução e resolução da inflamação crônica e tolerância.

Estudos recentes demonstraram que o sistema imune inato também trabalha para direcionar a resposta imune adaptativa, não apenas apresentando antígenos, mas também fornecendo os principais sinais para a diferenciação de células T CD4 virgens em subtipos funcionalmente distintos, como Treg e Th17 (Walsh & Mills, 2013). In vitro, a perda do equilíbrio Th17/Treg é mediada pelaIDO-1 levando à manutenção de um estado inflamatório crônico pelo HIV (Favre *et al.*, 2010). O equilíbrio imunológico mediado pelo eixoIDO/AhR é fundamental para determinar o equilíbrio entre as células Th17/Treg e controlar a gravidade da paracoccidiodomicose pulmonar (De Araujo *et al.*, 2017). Nossos dados demonstraram que *M. leprae* induz um aumento na expressão e atividade deIDO-1 em mDCs, e que os componentes da membrana do bacilo desempenham um papel importante neste contexto via sinalização de TLR2 associada à produção de citocinas inflamatórias. Além disso, demonstramos que essas mDCs estimuladas com *M. leprae* e MLSA induzem as células T a um perfil regulatório por um mecanismo dependente deIDO-1, mas não afetam a produção de IL-17 (dados não mostrados).

Nesse trabalho, demonstramos pela primeira vez uma mudança morfológica nas mDCs diferenciadas de pacientes MB quando comparado a pacientes PB. A expressão de proteínas CD1a em mDCs especifica subconjuntos funcionalmente distintos com diferentes propriedades inflamatórias (Simon *et al.*, 2012). Ambos pacientes apresentaram células com expressão CD1a, corroborando com dados da literatura (Mester *et al.*, 2015). As mDCs de MB apresentaram-se em forma não-arredondada, com vários dendritos, já as mDCs de pacientes PB diferenciaram-se de forma mais arredonda. Já foi

observado que DCs infectadas com *Theileria annulata* no décimo quinto dia pós-infecção diferenciou-se de forma arredondada e em proliferação contínua (Liu *et al.*, 2019).

Nosso grupo vem demonstrando ao longo dos anos que *M. leprae* induz o aumento de IDO-1 em tipos celulares diferentes e levando a funcionalidades imunológicas diferentes (De Souza Sales *et al.*, 2011; Moura *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2021). Nesse trabalho mostramos que as mDCs de MB induziram um aumento da expressão de células IDO-1⁺, quando comparado aos pacientes PB. Concomitantemente, o soro de MB apresenta significativamente atividade enzimática de IDO-1 aumentada. Trabalhos anteriores mostraram que a imunohistoquímica de biópsias granulomatosas de pele de diferentes doenças infecciosas detectaram a enzima IDO-1 dentro do infiltrado granulomatoso inflamatório (Bubnoff *et al.*, 2011). Um trabalho posterior mostrou que a infecção por Paracoccidiodomicose aumentou o número de pDCs pulmonares expressando IDO-1, um efeito imunorregulador foi observado com um aumento de células Treg (Frank de Araújo *et al.*, 2016). Já foi observado também que *M. tuberculosis* induziu a expressão de IDO-1, em macrófagos e nos pulmões de camundongos e macacos com doença ativa, sendo assim a supressão da atividade de IDO-1 reduziu a carga bacteriana, patologia e sinais clínicos de doença, levando ao aumento da sobrevivência do hospedeiro (Gautam *et al.*, 2018). Recentemente foi demonstrado que a infecção pelo Vírus Sincicial Respiratório (RSV) reduziu a produção de KYNA e inibiu a transformação de Tregs Th17 para Foxp3⁺ (balanço Th17/Treg) pela modulação de moléculas de IDO-1 em pDCs (Jin *et al.*, 2020).

Pacientes PB também apresentaram um aumento na concentração de NO. O NO que é conhecido por contribuir para a patogênese de várias doenças neurológicas têm sido detectado em tecidos e urina de pacientes com (Boga *et al.*, 2010). O NO desempenha um papel não apenas na limitação do crescimento bacteriano, mas também na limitação das consequências imunopatológicas da infecção crônica por micobactérias (Elesawy *et al.*, 2015). NO, iNOS, heme oxigenase (HO-1) e IDO-1 são expressos simultaneamente em macrófagos murinos estimulados com IFN- γ e LPS. O NO produzido por iNOS suprime a expressão de IDO-1 e também induz a expressão de HO-1 (Oh *et al.*, 2004). Estudos *in vivo* indicam que NO produzido pela iNOS inibe a atividade da IDO-1

interagindo diretamente com ela e promovendo sua degradação pela via do proteassoma (Samelson-Jones *et al.*, 2006).

Nossos dados mostraram um aumento na atividade de Arg-1 no soro de pacientes PB e MB, quando comparados aos voluntários sadios. Já foi observado que macrófagos de pacientes com hanseníase aumentam a expressão de Arg-1 (De Sousa *et al.*, 2016). Dados mais recentes mostram que a infecção por *Leishmania major* induziu um aumento na produção de quinurenina pelaIDO-1 e a atividade da Arg-1 em detrimento da iNOs (Tounsi *et al.*, 2015).

Os metabólitos do triptofano formados ao longo da via das quinureninas podem afetar a proliferação celular e a função tecidual (Matysik-Woźniak *et al.*, 2017). Mediante a esse contexto realizamos ensaios de viabilidade celular com as mDCs estimuladas com os metabólitos AP, KYNA, 3-HAA e QUIN. Observamos que apenas 3-HAA e QUIN foram capazes de induzir a apoptose nas mDCs. Dados anteriores mostram que o 3-HAA foi tóxico para culturas primárias de neurônios de insetos (Cerstiaen *et al.*, 2003). Um outro dado mais recente demonstrou que concentrações de 5-20 μM de QUIN levaram à diminuição da viabilidade de células PC12, uma linhagem celular derivada de um feocromocitoma de rato, e concomitantemente a um aumento da expressão de proteínas relacionadas à apoptose (Huang *et al.*, 2016). Em relação aos metabólitos de Tryp, apenas o 3-HAA e QUIN levaram a um aumento da viabilidade do bacilo de maneira significativa. O 3-HAA é um metabólito que possui atividade anti-inflamatória. O pré-tratamento de 3-HAA inibe acentuadamente a produção de NO e citocinas em culturas de células Raw 264,7 (Lee *et al.*, 2016). Um trabalho recente mostrou que alguns extratos de *Mixobactérias*, bactérias que pertencem à classe das δ -proteobactérias, podem atenuar significativamente a formação de ROS e NO induzidas por QUIN de neurônios humanos (Dehghani *et al.*, 2019).

Sabe-se que em torno de 95% do triptofano obtido da dieta é metabolizado pela via das quinureninas, e o restante é oxidado em serotonina e seu derivado, a melatonina (Botting *et al.*, 1995). Nas últimas décadas, vários estudos documentaram que a melatonina, uma molécula antioxidante natural amplamente distribuída entre os organismos vivos, desempenha um papel fundamental na neuroimunomodulação (Ren *et al.*, 2017). Além disso, a

melatonina mostrou ter propriedades oncostáticas e pró-apoptóticas em uma infinidade de modelos de tumores experimentais e em diferentes linhagens de células tumorais humanas (Moreno *et al.*, 2013). Não foram observadas alterações na viabilidade das mDCs frente ao estímulo com MEL, porém observou-se um aumento na viabilidade de *M. leprae* frente a esse mesmo estímulo. Dados publicados mostram que a viabilidade de bactérias e a fagocitose podem ser afetadas por esse metabólito, uma vez que 1 mM de MEL após 60 min de incubação aumenta em cerca de 76% o número de *Staphylococcus aureus* viáveis dentro do neutrófilo de (De Oliveira Silva *et al.*, 2006). Um estudo retrospectivo recente forneceu evidências de que a infecção por COVID-19 pode ser notavelmente menos comum naqueles que usam melatonina suplementar. Sugere-se que este fenômeno pode refletir o fato de que, através da indução do regulador de informação silenciosa 1 (Sirt1), a melatonina pode regular positivamente a poliubiquitinação K63 da proteína de sinalização antiviral mitocondrial, aumentando assim a indução mediada por vírus de interferons tipo 1 (DiNicolantonio *et al.*, 2021).

Alterações nos níveis de expressão de CXCL-10 em leucócitos, neutrófilos, eosinófilos, monócitos, epitélios e queratinócitos têm sido associadas a doenças inflamatórias, incluindo doenças infecciosas (Liu *et al.*, 2011). Em nossos dados podemos observar que houve uma diminuição significativa na produção de CXCL-10 quando adicionamos *M. leprae* viável à cultura de células tratadas com 3-HAA e QUIN, em contrapartida, observamos um aumento de CXCL-10 nas culturas tratadas com MEL. Um dado recente do grupo mostrou que pacientes com hanseníase que não reduziram o índice baciloscópico após a PQT apresentaram diminuição nos níveis séricos de CXCL-10. Além disso, uma análise das respostas imunes celulares contra antígenos de *M. leprae* revelou que células de pacientes que apresentaram redução do índice baciloscópico após a liberação da PQT aumentaram a produção de CXCL-10 em resposta ao *M. leprae* (Ferreira *et al.*, 2021).

Nossos dados ainda demonstram que o MLV foi capaz de diminuir a produção de IL-10 e aumentar a produção de TNF nas culturas estimuladas com os diferentes metabólitos de triptofano. Esse efeito antagônico observado nessas culturas parece permitir uma maior sobrevivência do bacilo em resposta aos metabólitos da via. A literatura fala que *M. leprae* favorece sua infecção por

evocar pouca reação do hospedeiro através da indução de baixos níveis de citocinas pró-inflamatórias, mas uma quantidade substancial de citocinas imunossupressoras (Suzuki *et al.*, 1993). Corroborando com os nossos dados, *M. leprae* viável em cultura de macrófagos induziu uma diminuição de IL-1 β , IL-6 e TNF e aumento de IL-10 e expressão de CD163 (Yang *et al.*, 2016).

Contudo, nossos dados nos levam a imaginar que o eixo IDO-1 induzido por *M. leprae* pode desempenhar um papel importante no controle da imunidade e gravidade da Hanseníase. Em termos clínicos, nossa hipótese é que em pacientes MB, o alto fluxo de bacilos vivos e mortos induz IDO-1 por um mecanismo dependente de IL-10, que por sua vez leva a um efeito tolerogênico, diminuindo a resposta imune celular. Nos pacientes PB, a exposição dos antígenos de membrana do bacilo favorece um contexto semelhante ao descrito após a estimulação das mDCs com MLMA, ou seja, o aumento da IDO-1 devido à ativação do TNF, que conseqüentemente leva à um aumento da resposta pró-inflamatória e pode contribuir para a diminuição da carga bacilar.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- *M. leprae* e suas frações são capazes de aumentar a expressão e atividade de IDO-1 em mDCs.
- O TNF é importante na indução da atividade da IDO-1 por *M. leprae* e suas frações em mDCs.
- TLR2 é importante para a indução da atividade de IDO-1 em mDCs.
- *M. leprae* e suas frações influenciam o perfil tolerogênico dos linfócitos.
- As mDCs de pacientes paucibacilares e multibacilares apresentam diferenças morfológica e fenotípicas.
- Expressão e atividade de IDO-1 aumentada em pacientes multibacilares quando comparado aos paucibacilares.
- A concentração de NO e atividade de Arg-1 estão aumentadas em pacientes paucibacilares.
- Os metabólitos 3-HAA e QUIN afetam a viabilidade das mDCs.
- 3-HAA, QUIN e MEL foram capazes de aumentar significativamente a viabilidade de *M. leprae*.
- *M. leprae* foi capaz de reduzir a concentração de CXCL-10 em culturas estimuladas com 3-HAA e QUIN.
- AP e KYNA foram capazes de aumentar significativamente a produção de IL-10 com a infecção pelo *M. leprae* viável.
- *M. leprae* foi capaz de diminuir significativamente a produção de TNF quando as culturas foram estimuladas com todos os metabólitos estudados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adu-Gyamfi CG, Snyman T, Hoffmann CJ, Martinson NA, Chaisson RE, George JA, et al. Plasma Indoleamine 2, 3-Dioxygenase, a Biomarker for Tuberculosis in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients. *Clin Infect Dis*. 2017 Oct 1;65(8):1356–63.

Allegri G, Costa CVL, Bertazzo A, Biasiolo M, Ragazzi E. Enzyme activities of tryptophan metabolism along the kynurenine pathway in various species of animals. *Farmacol*. 2003 Sep 1;58(9):829–36.

Andrade PR, Pinheiro RO, Sales AM, Illarramendi X, De Mattos Barbosa MG, Moraes MO, et al. Type 1 reaction in leprosy: A model for a better understanding of tissue immunity under an immunopathological condition. Vol. 11, *Expert Review of Clinical Immunology*. Expert Reviews Ltd.; 2015. p. 391–407.

Angela Marques MM, Chitale S, Brennan PJ, Cristina Pessolani M V. Mapping and Identification of the Major Cell Wall-Associated Components of *Mycobacterium leprae*. Vol. 66, *INFECTION AND IMMUNITY*. 1998.

Antonio de Castro Santos L, Faria L, Fernandes de Menezes R. Contrapontos da história da hanseníase no Brasil: cenários de estigma e confinamento *.

Attia EA, Abdallah M, El-Khateeb E, Saad AA, Lotfi RA, Abdallah M, El-Shennawy D. Serum Th17 cytokines in leprosy: correlation with circulating CD4(+) CD25 (high)FoxP3 (+) T-reg cells, as well as down regulatory cytokines. *Arch Dermatol Res*. 2014 Nov;306(9):793-801.

Ball HJ, Sanchez-Perez A, Weiser S, Austin CJD, Astelbauer F, Miu J, et al. Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. *Gene*. 2007 Jul 1;396(1):203–13.

Ball HJ, Yuasa HJ, Austin CJ, Weiser S, Hunt NH. Indoleamine 2,3-dioxygenase-2; a new enzyme in the kynurenine pathway. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 41(3):467–471.

Basombrio, G; Pietro, J. Gay; Kitamura, Kanehiko; Rabello, F. E. A; Wade, H. W; Cochrane, R. G; Khanolkar, V. R; Latapí, F; Vegas, M; Arnold, Harry. *In. Congresso Internacional de Leprologia, 6. Congresso Internacional de Leprologia, 6/Memoria. Madrid, Asociacion Internacional de la Lepra, Oct. 1953. p.75-86.*

Bechler, R. G. Hansen versus Neisser: controvérsias científicas na 'descoberta' do bacilo da lepra. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, v. 19, n. 3, 2012.

Beers SM, Wit MYL, Klatser PR. The epidemiology of *mycobacterium leprae*: Recent insight . *FEMS Microbiol Lett*. 1996 Mar;136(3):221–30.

Bennett BH, Parker DL, Robson M. Leprosy: steps along the journey of eradication. *Public Health Rep.* 2008 Mar-Apr;123(2):198-205.

Bigenzahn S, Juergens B, Mahr B, Pratschke J, Koenigsrainer A, Becker T, et al. No augmentation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity through belatacept treatment in liver transplant recipients. *Clin Exp Immunol.* 2018 May 1;192(2):233–41.

Boer MC, Joosten SA, Ottenhoff TH. Regulatory T-Cells at the Interface between Human Host and Pathogens in Infectious Diseases and Vaccination. *Front Immunol.* 2015; 11(6):217.

Boga P, Shetty VP, Khan Y. Nitric Oxide metabolites in sera of patients across the spectrum of leprosy. *Indian J Lepr,* 2010; 82(3): 123–129.

Botting NP. Chemistry and neurochemistry of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism. *Chem Soc Rev.* 1995;24(6):401–12.

Botting NP. Chemistry and neurochemistry of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism. *Chem Soc Rev.* 1995;24(6):401–12.

Braga AF, Moretto DF, Gigliotti P, Peruchi M, Vilani-Moreno FR, Campanelli AP, et al. Activation and cytokine profile of monocyte derived dendritic cells in leprosy: In vitro stimulation by sonicated *Mycobacterium leprae* induces decreased level of IL-12p70 in lepromatous leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015 Aug 1;110(5):655–61.

Bührer-Sékula S. PGL-I leprosy serology. Vol. 41, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2008.

Calvo JR, Gonzalez-Yanes C, Maldonado MD. The role of melatonin in the cells of the innate immunity: A review. Vol. 55, *Journal of Pineal Research.* 2013. p. 103–20.

Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Duraes SMB, Ribeiro-Alves M, Nery JAC, et al. TNF -308G>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians: A genetic epidemiology assessment, meta-analysis, and functional study. *J Infect Dis.* 2011 Oct 15;204(8):1256–63.

Carvajal FJ, Mattison HA, Cerpa W. Role of NMDA Receptor-Mediated Glutamatergic Signaling in Chronic and Acute Neuropathologies. Vol. 2016, *Neural Plasticity.* Hindawi Limited; 2016.

Carvalho MS, Dal Mas C, Nunes FS, Yonamine CM, Hayashi MAF. Metabolismo do triptofano em transtornos mentais: Um enfoque na esquizofrenia. 2017.

Cerstiaens A, Huybrechts J, Kotanen S, Lebeau I, Meylaers K, De Loof A, et al. Neurotoxic and neurobehavioral effects of kynurenines in adult insects. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Dec 26;312(4):1171–7.

Chu WM. Tumor necrosis factor. Vol. 328, Cancer Letters. Elsevier Ireland Ltd; 2013. p. 222–5.

Cocito C, Delville J. Biological, Chemical, Immunological and Staining Properties of Bacteria Isolated from Tissues of Leprosy Patients. Vol. 1, European Journal of Epidemiology. 1985.

Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol*. 2008 May 1;180(9):5771-7.

Cruz VPD La, Carrillo-Mora P, Santamaría A. Quinolinic acid, an endogenous molecule combining excitotoxicity, oxidative stress and other toxic mechanisms. Vol. 5, International Journal of Tryptophan Research. 2013. p. 1–8.

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):943–52.

de Almeida-Neto FB, Assis Costa VM, Oliveira-Filho AF, de Souza Franco E, Tavares Julião de Lima EV, Barros de Lorena VM, Oliveira de Souza VM, de Sousa Maia MB. TH17 cells, interleukin-17 and interferon- γ in patients and households contacts of leprosy with multibacillary and paucibacillary forms before and after the start of chemotherapy treatment. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015 Jul;29(7):1354-61.

de Araújo EF, Feriotti C, de Lima Galdino NA, Preite NW, Calich VLG, Loures FV. The IDO-AhR axis controls Th17/Treg immunity in a pulmonary model of fungal infection. *Front Immunol*. 2017 Jul 24;8(JUL).

de Araújo EF, Medeiros DH, Galdino NA de L, Condino-Neto A, Calich VLG, Loures FV. Tolerogenic Plasmacytoid Dendritic Cells Control *Paracoccidioides brasiliensis* Infection by Inducing Regulatory T Cells in an IDO-Dependent Manner. *PLoS Pathog*. 2016 Dec 19;12(12).

de Mattos Barbosa MG, da Silva Prata RB, Andrade PR, Ferreira H, de Andrade Silva BJ, da Paixão de Oliveira JA, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase and iron are required for *Mycobacterium leprae* survival. *Microbes Infect*. 2017 Nov 1;19(11):505–14.

de Sousa JR, de Sousa RPM, de Souza Aarão TL, Dias LB, Carneiro FRO, Fuzii HT, et al. In situ expression of M2 macrophage subpopulation in leprosy skin lesions. *Acta Trop*. 2016 May 1;157:108–14.

de Souza Sales J, Lara FA, Amadeu TP, de Oliveira Fulco T, da Costa Nery JA, Sampaio EP, et al. The role of indoleamine 2, 3-dioxygenase in lepromatous leprosy immunosuppression. *Clin Exp Immunol*. 2011 Aug;165(2):251–63.

Dehghani M, Tan V, Heng B, Braidy N, Mohammadipanah F, Guillemin GJ. Neuroprotective Effect of Mycobacterial Extracts on Quinolinic Acid-Induced Toxicity in Primary Human Neurons. *Neurotox Res.* 2019 Feb 1;35(2):281–90.

DiNicolantonio JJ, McCarty M, Barroso-Aranda J. Melatonin may decrease risk for and aid treatment of COVID-19 and other RNA viral infections. Vol. 8, *Open Heart.* BMJ Publishing Group; 2021.

Dounay AB, Tuttle JB, Verhoest PR, Paragon A, Environment P. Challenges and Opportunities in the Discovery of New Therapeutics Targeting the Kynurenine Pathway.

Dufour JH, Dziejman M, Liu MT, Leung JH, Lane TE, Luster AD. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J Immunol.* 2002 Apr 1;168(7):3195-204.

Elesawy FM, Mikhael NW, Sabry JH. Serum nitric oxide metabolites in leprosy patients as a parameter of prognostic value. *J Egypt Women's Dermatologic Soc.* 2015;12(1):44–8.

Esmaeili SA, Hajavi J. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in allergic disorders. Vol. 49, *Molecular Biology Reports.* Springer Science and Business Media B.V.; 2022. p. 3297–306.

Favre D, Mold J, Hunt PW, Kanwar B, Loke P, Seu L, et al. Tryptophan catabolism by indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 alters the balance of TH17 to regulatory T cells in HIV disease. *Sci Transl Med.* 2010;2(32).

Ferreira H, Mendes MA, de Mattos Barbosa MG, de Oliveira EB, Sales AM, Moraes MO, et al. Potential Role of CXCL10 in Monitoring Response to Treatment in Leprosy Patients. *Front Immunol.* 2021 Jul 20;12.

Fiocruz, Saúde e ciência para todos. Hanseníase. Agência Fiocruz de Notícias, 2013. Disponível em: <http://www.agencia.fiocruz.br/hansenia>. Acesso em: 14-12-2021.

Fiocruz, 2021. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=3758&sid=32>. Acesso em: 10-12-2021.

Frehll C, Rastogi N. Mycobacterium leprae Surface Components Intervene in the Early Phagosome-Lysosome Fusion Inhibition Event. Vol. 55, *INFECTION AND IMMUNITY.* 1987.

Fujigaki S, Saito K, Sekikawa K, Tone S, Takikawa O, Fujii H, et al. Lipopolysaccharide induction of indoleamine 2,3-dioxygenase is mediated dominantly by an IFN- γ -independent mechanism.

Garg A, Barnes PF, Roy S, Quiroga MF, Wu S, García VE, et al. Mannose-capped lipoarabinomannan- and prostaglandin E2-dependent expansion of regulatory T cells in human Mycobacterium tuberculosis infection. *Eur J Immunol*. 2008 Feb;38(2):459–69.

Gautam US, Foreman TW, Bucsan AN, Veatch A V., Alvarez X, Adekambi T, et al. In vivo inhibition of tryptophan catabolism reorganizes the tuberculoma and augments immune-mediated control of Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Jan 2;115(1):E62–71.

Gehring AJ, Rojas RE, Canaday DH, Lakey DL, Harding C V., Boom WH. The Mycobacterium tuberculosis 19-kilodalton lipoprotein inhibits gamma interferon-regulated HLA-DR and FcγR1 on human macrophages through toll-like receptor 2. *Infect Immun*. 2003 Aug 1;71(8):4487–97.

Gilad E, Wong HR, Zingarelli B, Virág L, O'Connor M, Salzman AL, Szabó C. Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NFκappaB activation. *FASEB J*. 1998 Jun;12(9):685-93.

Godal T, Myrvang B, Froland SS, Shao J, Melaku G. Evidence that the mechanism of immunological tolerance ("central failure") is operative in the lack of host resistance in lepromatous leprosy. *Scand J Immunol*. 1972;1(4):311-21.

Goulart IMB, Cardoso AM, Santos MS, Gonçalves MA, Pereira JE, Goulart LR. Detection of Mycobacterium leprae DNA in skin lesions of leprosy patients by PCR may be affected by amplicon size. *Arch Dermatol Res*. 2007 Aug;299(5–6):267–71.

Han XY, Silva FJ. On the age of leprosy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(2):e2544.

Harden JL, Egilmez NK. Indoleamine 2,3-dioxygenase and dendritic cell tolerogenicity. *Immunol Invest*. 2012 Aug;41(6–7):738–64.

Hasan Z, Mahmood A, Zafar S, Khan AA, Hussain R. Leprosy patients with lepromatous disease have an up-regulated IL-8 response that is unlinked to TNF-alpha responses. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 2004 Mar;72(1):35-44.

Hayashi T, Mo JH, Gong X, Rossetto C, Jang A, Beck L, Elliott GI, Kufareva I, Abagyan R, Broide DH, Lee J, Raz E. 3-Hydroxyanthranilic acid inhibits PDK1 activation and suppresses experimental asthma by inducing T cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Nov 20;104(47):18619-24.

Hirai KE, Araújo TL de S, Silva LM, de Sousa JR, de Souza J, Dias LB, et al. Langerhans cells (CD1a and CD207), dermal dendrocytes (FXIIIa) and plasmacytoid dendritic cells (CD123) in skin lesions of leprosy patients. *Microb Pathog*. 2016 Feb 1;91:18–25.

Hu P, Hunt NH, Arfuso F, Shaw LC, Uddin MN, Zhu M, et al. Increased indoleamine 2,3-dioxygenase and quinolinic acid expression in microglia and

müller cells of diabetic human and rodent retina. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2017 Oct 1;58(12):5043–55.

Huang X, Yang K, Zhang Y, Wang Q, Li Y. Quinolinic acid induces cell apoptosis in PC12 cells through HIF-1-dependent RTP801 activation. *Metab Brain Dis*. 2016 Apr 1;31(2):435–44.

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

Hussain T. Leprosy and tuberculosis: An insight-review. Vol. 33, *Critical Reviews in Microbiology*. 2007. p. 15–66.

Ilic N, Gruden-Movsesijan A, Cvetkovic J, Tomic S, Vucevic DB, Aranzamendi C, et al. *Trichinella spiralis* excretory-secretory products induce tolerogenic properties in human dendritic cells via toll-like receptors 2 and 4. *Front Immunol*. 2018 Jan 24;9(JAN).

Ito T, Handa H. Deciphering the mystery of thalidomide teratogenicity. Vol. 52, *Congenital Anomalies*. 2012. p. 1–7.

Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*. 2010; 327(5963):291-5.

Jin L, Hu Q, Hu Y, Chen Z, Liao W. Respiratory syncytial virus infection reduces kynurenic acid production and reverses th17/treg balance by modulating indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) molecules in plasmacytoid dendritic cells. *Med Sci Monit*. 2020 Dec 2;26.

Jurado-Manzano BB, Zavala-Reyes D, Turrubiarres-Martínez EA, Portales-Pérez DP, González-Amaro R, Layseca-Espinosa E. FICZ generates human tDCs that induce CD4⁺ CD25^{high} Foxp3⁺ Treg-like cell differentiation. *Immunol Lett*. 2017 Oct 1;190:84–92.

Kaliński P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today*. 1999 Dec;20(12):561-7.

Kamath S, Vaccaro SA, Rea TH, Ochoa MT. Recognizing and managing the immunologic reactions in leprosy. Vol. 71, *Journal of the American Academy of Dermatology*. Mosby Inc.; 2014. p. 795–803.

Kassianos AJ, Hardy MY, Ju X, Vijayan D, Ding Y, Vulink AJE, et al. Human CD1c (BDCA-1) + myeloid dendritic cells secrete IL-10 and display an immunoregulatory phenotype and function in response to *Escherichia coli*. *Eur J Immunol*. 2012 Jun;42(6):1512–22.

Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med*. 2003 May 1;9(5):525–32.

Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE, Graeber TG, Sieling PA, Liu YJ, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat Med*. 2005 Jun;11(6):653-60.

Kumar S, Naqvi RA, Ali R, Rani R, Khanna N, Rao DN. CD4+CD25+ T regs with acetylated FoxP3 are associated with immune suppression in human leprosy. *Mol Immunol*. 2013 Dec 31;56(4):513–20.

Kumar A, Parkash O, Girdhar BK. Analysis of antigens of *Mycobacterium leprae* by interaction to sera IgG, IgM, and IgA response to improve diagnosis of leprosy. *Biomed Res Int*. 2014 :283278.

Lastória JC, de Abreu MAMM. Leprosy: Review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - Part 1. *An Bras Dermatol*. 2014;89(2):205–18.

Laurans L, Venteclef N, Haddad Y, Chajadine M, Alzaid F, Metghalchi S, et al. Genetic deficiency of indoleamine 2,3-dioxygenase promotes gut microbiota-mediated metabolic health. *Nat Med*. 2018 Aug 1;24(8):1113–20.

Le Moigne V, Roux AL, Jobart-Malfait A, Blanc L, Chaoui K, Burlet-Schiltz O, et al. A TLR2-Activating Fraction From *Mycobacterium abscessus* Rough Variant Demonstrates Vaccine and Diagnostic Potential. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Aug 27;10.

Lee DJ, Sieling PA, Ochoa MT, Krutzik SR, Guo B, Hernandez M, et al. LILRA2 Activation Inhibits Dendritic Cell Differentiation and Antigen Presentation to T Cells. *J Immunol*. 2007 Dec 15;179(12):8128–36.

Lee K, Kwak JH, Pyo S. Inhibition of LPS-induced inflammatory mediators by 3-hydroxyanthranilic acid in macrophages through suppression of PI3K/NF-κB signaling pathways. *Food Funct*. 2016 Jul 1;7(7):3073–82.

Lee WS, Lee SM, Kim MK, Park SG, Choi IW, Choi I, et al. The tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid suppresses T cell responses by inhibiting dendritic cell activation. *Int Immunopharmacol*. 2013;17(3):721–6.

Leprae M, Hunter SW, Fujiwaras T, Brennan PJ. Structure and Antigenicity of the Major Specific Glycolipid Antigen of. Vol. 257, *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Printed in U.S.A. 1982.

Li Y, Hu N, Yang D, Oxenkrug G, Yang Q. Regulating the balance between the kynurenine and serotonin pathways of tryptophan metabolism. *FEBS J*. 2017 Mar 1;284(6):948–66.

Liu H, Komai-Koma M, Xu D, Liew FY. Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4 CD25 regulatory T cells [Internet]. 2006. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0601554103

Liu J, Rashid M, Wang J, Liu A, Guan G, Li Y, et al. *Theileria annulata* transformation altered cell surface molecules expression and endocytic function of monocyte-derived dendritic cells. *Ticks Tick Borne Dis.* 2020 May 1;11(3).

Liu M, Guo S, Hibbert JM, Jain V, Singh N, Wilson NO, et al. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. Vol. 22, *Cytokine and Growth Factor Reviews.* 2011. p. 121–30.

Liu S, Hong L, Li Y, Lian R, Wang X, Zeng Y. Association between endometrial indoleamine 2,3-dioxygenase expression level and pregnancy outcomes in women undergoing first in vitro fertilization treatment. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2021 Dec 1;21(1).

Liu YN, Peng YL, Lei-Liu, Wu TY, Zhang Y, Lian YJ, et al. TNF α mediates stress-induced depression by upregulating indoleamine 2,3-dioxygenase in a mouse model of unpredictable chronic mild stress. *Eur Cytokine Netw.* 2015;26(1):15–25.

Lobato J, Costa MP, Reis Ede M, Goncalves MA, Spencer JS. Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. *Lepr Rev* 2011; 82: 389–401.

Lombardi C, T Martolli CM, Almeida Silva S, Gil Suárez RE. La eliminación de la lepra de las Américas: situación actual y perspectivas.

Maeda N, Nigou J, Herrmann JL, Jackson M, Amara A, Lagrange PH, et al. The cell surface receptor DC-SIGN discriminates between *Mycobacterium* species through selective recognition of the mannose caps on lipoarabinomannan. *J Biol Chem.* 2003 Feb 21;278(8):5513–6.

Majumdar T, Sharma S, Kumar M, Hussain MA, Chauhan N, Kalia I, et al. Tryptophan-kynurenine pathway attenuates β -catenin-dependent pro-parasitic role of STING-TICAM2-IRF3-IDO1 signalosome in *Toxoplasma gondii* infection. *Cell Death Dis.* 2019 Mar 1;10(3).

Makala LHC, Baban B, Lemos H, El-Awady AR, Chandler PR, Hou DY, et al. *Leishmania major* attenuates host immunity by stimulating local indoleamine 2,3-dioxygenase expression. *J*

Marques MAM, Espinosa BJ, Xavier Da Silveira EK, Pessolani MC V., Chapeaurouge A, Perales J, et al. Continued proteomic analysis of *Mycobacterium leprae* subcellular fractions. *Proteomics.* 2004 Oct;4(10):2942–53.

Marques MAM, Neves-Ferreira AGC, Xavier Da Silveira EK, Valente RH, Chapeaurouge A, Perales J, et al. Deciphering the proteomic profile of *Mycobacterium leprae* cell envelope. *Proteomics*. 2008 Jun;8(12):2477–91.

Martinez AN, Britto CFPC, Nery JAC, Sampaio EP, Jardim MR, Sarno EN, et al. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. *J Clin Microbiol*. 2006 Sep;44(9):3154–9.

Martinez AN, Lahiri R, Pittman TL, Scollard D, Truman R, Moraes MO, et al. Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2009;47(7):2124–30.

Martinez AN, Ribeiro-Alves M, Sarno EN, Moraes MO. Evaluation of qPCR-Based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Oct;5(10).

Martiniuk F, Giovinazzo J, Tan AU, Shahidullah R, Haslett P, Kaplan G, Levis WR. Lessons of leprosy: the emergence of TH17 cytokines during type II reactions (ENL) is teaching us about T-cell plasticity. *J Drugs Dermatol*. 2012 May;11(5):626-30.

Matysik-Woźniak A, Paduch R, Turski WA, Maciejewski R, Jünemann AG, Rejdak R. Effects of tryptophan, kynurenine and kynurenic acid exerted on human reconstructed corneal epithelium in vitro. *Pharmacol Reports*. 2017 Aug 1;69(4):722–9.

Mellor AL, Lemos H, Huang L. Indoleamine 2,3-Dioxygenase and tolerance: Where Are We Now? Vol. 8, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2017.

Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: Tolerance and tryptophan catabolism. Vol. 4, *Nature Reviews Immunology*. 2004. p. 762–74.

Mester B, Bauer E, Wood CE, Hermans IF, Gasser O. Expression of CD1a and type-1 polarization are dissociated in human monocyte-derived dendritic cells. *PLoS One*. 2015 Oct 13;10(10).

Mi Z, Liu H, Zhang F. *Advances in the Immunology and Genetics of Leprosy*. Vol. 11, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2020.

Ministério da Saúde, Brasil. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia para o Controle da hanseníase. Brasília, 2002. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_de_hanseníase.pdf. Acesso em 14 de janeiro de 2022.

Ministério da Saúde. Manual de prevenção de incapacidades / elaboração: área técnica de dermatologia, 2010.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase. Brasília, 2010b.

Ministério da Saúde, Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Boletim Epidemiológico: Hanseníase. Brasília, 2020.

Ministério da Saúde, Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Boletim Epidemiológico: Hanseníase. Brasília, 2021.

Misch EA, Berrington WR, Vary JC, Hawn TR. Leprosy and the Human Genome. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010 Dec;74(4):589–620.

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

Mondanelli G, Ugel S, Grohmann U, Bronte V. The immune regulation in cancer by the amino acid metabolizing enzymes ARG and IDO. Vol. 35, *Current Opinion in Pharmacology.* Elsevier Ltd; 2017. p. 30–9.

Monot M, Honoré N, Garnier T, Araoz R, Coppée JY, Lacroix C, et al. On the origin of leprosy. *Science (80-).* 2005 May 13;308(5724):1040–2.

Montoya D, Modlin RL. Learning from Leprosy. Insight into the human innate immune response. In: *Advances in Immunology.* Academic Press Inc.; 2010. p. 1–24.

Moreno ACR, Clara RO, Coimbra JB, Júlio AR, Albuquerque RC, Oliveira EM, et al. The expanding roles of 1-methyl-tryptophan (1-MT): In addition to inhibiting kynurenine production, 1-MT activates the synthesis of melatonin in skin cells. *FEBS J.* 2013 Oct;280(19):4782–92.

Moura DF, de Mattos KA, Amadeu TP, Andrade PR, Sales JS, Schmitz V, et al. CD163 favors *Mycobacterium leprae* survival and persistence by promoting anti-inflammatory pathways in lepromatous macrophages. *Eur J Immunol.* 2012 Nov;42(11):2925–36.

Muranski P, Restifo NP. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood.* 2013 Mar 28;121(13):2402-14.

Murray RA, Siddiqui MR, Mendillo M, Krahenbuhl J, Kaplan G. *Mycobacterium leprae* Inhibits Dendritic Cell Activation and Maturation. *J Immunol.* 2007 Jan 1;178(1):338–44.

Naafs Bernard. Clinical aspects of the reversal reaction. *Hansenologia Internationali. Hansen. Int. Special* 1998.

Noordeen SK. Leprosy research and elimination.

Oliveira MLW, Oliveira GP, Andrade VLG. Gradual setting up multidrug therapy in Brazil. *Int J Lepr* 1989; 57(Suppl.): 333.

Oh GS, Pae HO, Choi BM, Chae SC, Lee HS, Ryu DG, et al. 3-Hydroxyanthranilic acid, one of metabolites of tryptophan via indoleamine 2,3-dioxygenase pathway, suppresses inducible nitric oxide synthase expression by enhancing heme oxygenase-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Aug 6;320(4):1156–62.

Okuda S, Nishiyama N, Saito H, Katsuki H. 3-Hydroxykynurenine, an Endogenous Oxidative Stress Generator, Causes Neuronal Cell Death with Apoptotic Features and Region Selectivity. Vol. 70, *J. Neurochem*. 1998.

Oliveira Penna G, A S Domingues CM, Bosco Siqueira Jr J, Nilce M Elkhoury AS, Cechinel MP, Aparecida de Faria Grossi M, et al. Dermatological diseases of compulsory notification in Brazil Médico dermatologista-Doutor em Medicina Tropical-Médico e pesquisador do [Internet]. Vol. 86, *An Bras Dermatol*. 2011. Available from: www.saude.gov.br/sinanweb.

Oliveira JAP, Gandini M, Sales JS, Fujimori SK, Barbosa MGM, Frutuoso VS, et al. *Mycobacterium leprae* induces a tolerogenic profile in monocyte-derived dendritic cells via TLR2 induction of IDO. *J Leukoc Biol*. 2021 Jul 1;110(1):167–76.

Oliveira RB, Ochoa MT, Sieling PA, Rea TH, Rambukkana A, Sarno EN, et al. Expression of toll-like receptor 2 on human schwann cells: A mechanism of nerve damage in leprosy. *Infect Immun*. 2003 Mar 1;71(3):1427–33.

Palermo ML, Pagliari C, Trindade MAB, Yamashitafuji TM, Duarte AJS, Cacere CR, et al. Increased expression of regulatory T cells and down-regulatory molecules in lepromatous leprosy. *Am J Trop Med Hyg*. 2012 May;86(5):878–83.

Pannikar VK, Arunthathi S, Chacko CJ, Fritschi EP. A clinico-pathological study of primary neuritic leprosy. *Lepr India*. 1983 Apr; 55(2): 212-21.

Patnaik N, Agarwal S, Sharma S, Sharma S, Pandhi D, Resident S. 201767 Evaluation of apoptosis in skin biopsies of patients of borderline leprosy and lepra type 1 reaction [Internet]. Available from: <http://www.e>

Pereira GFM. Guia para o controle da Hanseníase. Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde, Departamento de Atenção Básica; 2002. 89 p.

Pioli C, Caroleo MC, Nistico G, Doria G. Melatonin increases antigen presentation and amplifies specific and non specific signals for T-cell proliferation. *Int J Immunopharmacol*. 1993 May;15(4):463-8.

Platten M, Ho PP, Youssef S, Fontoura P, Garren H, Hur EM, Gupta R, Lee LY, Kidd BA, Robinson WH, Sobel RA, Selley ML, Steinman L. Treatment of

autoimmune neuroinflammation with a synthetic tryptophan metabolite. *Science*. 2005 Nov 4;310(5749):850-5.

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

Ren W, Liu G, Chen S, Yin J, Wang J, Tan B, et al. Melatonin signaling in T cells: Functions and applications. Vol. 62, *Journal of Pineal Research*. Blackwell Publishing Ltd; 2017.

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

Rivoire BL, TerLouw S, Groathouse NA, Brennan PJ. The Challenge of Producing Skin Test Antigens with Minimal Resources Suitable for Human Application against a Neglected Tropical Disease; Leprosy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(5).

Robinson CM, Shirey KA, Carlin JM. Synergistic Transcriptional Activation of Indoleamine Dioxygenase by IFN- γ and Tumor Necrosis Factor- α . *J Interferon Cytokine Res*. 2005 Jan;25(1):20-30.

Sadhu S, Khaitan BK, Joshi B, Sengupta U, Nautiyal AK, Mitra DK. Reciprocity between Regulatory T Cells and Th17 Cells: Relevance to Polarized Immunity in Leprosy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Jan 11;10(1).

Samelson-Jones BJ, Yeh SR. Interactions between nitric oxide and indoleamine 2,3-dioxygenase. *Biochemistry*. 2006 Jul 18;45(28):8527–38.

Sampaio SAP, Rivitti EA. *Dermatologia*. 3a ed. São Paulo: Artes médicas; 2008, Capítulo 41, Hanseníase; p.625-51.

Santos MB, de Oliveira DT, Cazzaniga RA, Varjão CS, dos Santos PL, Santos MLB, et al. Distinct Roles of Th17 and Th1 Cells in Inflammatory Responses Associated with the Presentation of Paucibacillary Leprosy and Leprosy Reactions. *Scand J Immunol*. 2017 Jul 1;86(1):40–9.

Sasai M, Pradipta A, Yamamoto M. Host immune responses to *Toxoplasma gondii*. *Int Immunol*. 2018 Mar 1;30(3):113–9.

Schmidt S V., Schultze JL. New insights into IDO biology in bacterial and viral infections. *Front Immunol*. 2014;5(AUG):1–12.

Schwarcz R, Bruno JP, Muchowski PJ, Wu HQ. Kynurenines in the mammalian brain: When physiology meets pathology. Vol. 13, *Nature Reviews Neuroscience*. 2012. p. 465–77.

Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. Vol. 19, *Clinical Microbiology Reviews*. 2006. p. 338–81.

Sehrawat S, Rouse BT. Tregs and infections: on the potential value of modifying their function. *J Leukoc Biol*. 2011 Dec;90(6):1079-87.

Shepard CC. Temperature Optimum of *Mycobacterium leprae* in Mice. Vol. 90, *Journal of bacteriology*. 1965.

Shon WJ, Lee YK, Shin JH, Choi EY, Shin DM. Severity of DSS-induced colitis is reduced in *Ido1*-deficient mice with down-regulation of TLR-MyD88-NF- κ B transcriptional networks. *Sci Rep*. 2015 Nov 27;5.

Silva SDO, Carvalho SRQ, Ximenes VF, Okada SS, Campa A. Melatonin and its kynurenin-like oxidation products affect the microbicidal activity of neutrophils. *Microbes Infect*. 2006 Feb;8(2):420–5.

Simon T, Gogolák P, Kis-Tóth K, Jelinek I, László V, Rajnavölgyi É. Histamine modulates multiple functional activities of monocyte-derived dendritic cell subsets via histamine receptor 2. *Int Immunol*. 2012 Feb 1;24(2):107–16.

Song X, Si Q, Qi R, Liu W, Li M, Guo M, et al. Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1: A Promising Therapeutic Target in Malignant Tumor. Vol. 12, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2021.

Spencer JS, Kim HJ, Wheat WH, Chatterjee D, Balagon MV, Cellona RV, Tan EV, Gelber R, Saunderson P, Duthie MS, Reece ST, Burman W, Belknap R, Mac Kenzie WR, Geluk A, Oskam L, Dockrell HM, Brennan PJ; IDEAL Consortium. Analysis of antibody responses to *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I, lipoarabinomannan, and recombinant proteins to define disease subtype-specific antigenic profiles in leprosy. *Clin Vaccine Immunol*. 2011 Feb;18(2):260-7.

Stone TW. Kynurenines in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance. Vol. 64, *Progress in Neurobiology*. 2001.

Suzuki K, Fukutomi Y, Matsuoka M, Torii K, Hayashi H, Takii T, et al. Differential Production of Interleukin 1 (IL-1), IL-6, Tumor Necrosis Factor, and IL-1 Receptor Antagonist by Human Monocytes Stimulated with *Mycobacterium leprae* and *M. bovis* BCG1. *International Journal of Leprosy*. Vol. 61.

Talhari C, Talhari S, Penna GO. Clinical aspects of leprosy. *Clin Dermatol*. 2015 Jan-Feb;33(1):26-37.

Tedder P, Rea TH, Modlin RL, Peter A Sieling SA, Jullien D, Dahlem M. Host Immunity Leprosy Lesions: Correlation with Effective CD1 Expression by Dendritic Cells in Human. Vol. 162, *J Immunol*. 2021.

Tounsi N, Meghari S, Moser M, Djerdjouri B. Lysophosphatidylcholine exacerbates *Leishmania major*-dendritic cell infection through interleukin-10 and

a burst in arginase1 and indoleamine 2,3-dioxygenase activities. *Int Immunopharmacol.* 2015;25(1):1–9.

Trautman JR. *Bulletin of the new york academy of medicine a brief history of hansen's disease**. Vol. 60. 1983.

Trinchieri G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J Exp Med.* 2007;204(2):239-243.

Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. 1999.

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

Vladmir Araújo Opromolla D. Simpósio: Hanseníase 30: 345-350, jul./set. 1997.

Volpe E, Servant N, Zollinger R, Bogiatzi SI, Hupé P, Barillot E, Soumelis V. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol.* 2008 Jun;9(6):650-7.

Von Bubnoff D, Scheler M, Wilms H, Wenzel J, Von Bubnoff N, Häcker G, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing myeloid dendritic cells and macrophages in infectious and noninfectious cutaneous granulomas. *J Am Acad Dermatol.* 2011 Oct;65(4):819–32.

Walsh KP, Mills KHG. Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation. Vol. 34, *Trends in Immunology.* 2013. p. 521–30.

World Health Organization. Global leprosy (Hansen disease) update, 2019: time to step-up prevention initiatives; 2020. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9536>. Acessado em 30 de março de 2022.

Wu H, Gong J, Liu Y. Indoleamine 2, 3-dioxygenase regulation of immune response (Review). Vol. 17, *Molecular Medicine Reports.* Spandidos Publications; 2018. p. 4867–73.

Yang D, Shui T, Miranda JW, Gilson DJ, Song Z, Chen J, et al. *Mycobacterium leprae*-Infected Macrophages Preferentially Primed Regulatory T Cell Responses and Was Associated with Lepromatous Leprosy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Jan 11;10(1).

Zaher SS, Germain C, Fu H, Larkin DF, George AJ. 3-hydroxykynurenine suppresses CD4+ T-cell proliferation, induces T-regulatory-cell development, and prolongs corneal allograft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011 Apr 22;52(5):2640-8.

Zamparoni V. Leprosy: Disease, isolation, and segregation in colonial Mozambique. *Hist Ciencias, Saude - Manguinhos*. 2017 Jan 1;24(1):13–39.

Zhai L, Ladomersky E, Lenzen A, Nguyen B, Patel R, Lauing KL, et al. IDO1 in cancer: a Gemini of immune checkpoints. Vol. 15, *Cellular and Molecular Immunology*. Chinese Soc Immunology; 2018. p. 447–57.

Zhu J, Paul WE. Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol Rev*. 2010; 238(1):247-62.

8. ANEXOS


8.1 Artigo Científico

DOI: 10.1002/JLB.4A0320-188R

JLB JOURNAL OF
LEUKOCYTE
BIOLOGY

ARTICLE

Mycobacterium leprae induces a tolerogenic profile in monocyte-derived dendritic cells via TLR2 induction of IDO

Jéssica A. P. Oliveira¹ | Mariana Gandini² | Jorgenilce S. Sales¹ | Sérgio K. Fujimori³ |
Mayara G. M. Barbosa⁴ | Valber S. Frutuoso⁵ | Milton O. Moraes¹ | Euzenir N. Sarno¹ |
Maria C. V. Pessolani² | Roberta O. Pinheiro¹ 

¹Leprosy Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

²Laboratory of Cellular Microbiology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

³Laboratory for Development and Analytical Validation, Oswaldo Cruz Foundation, Farmanguinhos, Rio de Janeiro, Brazil

⁴Cascalho-Platt Laboratory, Department of Surgery, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, USA

⁵Immunopharmacology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute/Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

Correspondence

Roberta Olmo Pinheiro, Researcher in Public Health, Leprosy Laboratory, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Rio de Janeiro, Brazil.
Email: robertaolmo@gmail.com; rolmo@ioc.fiocruz.br

Abstract

The enzyme IDO-1 is involved in the first stage of tryptophan catabolism and has been described in both microbicidal and tolerogenic microenvironments. Previous data from our group have shown that IDO-1 is differentially regulated in the distinctive clinical forms of leprosy. The present study aims to investigate the mechanisms associated with IDO-1 expression and activity in human monocyte-derived dendritic cells (mDCs) after stimulation with irradiated *Mycobacterium leprae* and its fractions. *M. leprae* and its fractions induced the expression and activity of IDO-1 in human mDCs. Among the stimuli studied, irradiated *M. leprae* and its membrane fraction (MLMA) induced the production of proinflammatory cytokines TNF and IL-6 whereas irradiated *M. leprae* and its cytosol fraction (MLSA) induced an increase in IL-10. We investigated if TLR2 activation was necessary for IDO-1 induction in mDCs. We observed that in cultures treated with a neutralizing anti-TLR2 antibody, there was a decrease in IDO-1 activity and expression induced by *M. leprae* and MLMA. The same effect was observed when we used a MyD88 inhibitor. Our data demonstrate that coculture of mDCs with autologous lymphocytes induced an increase in regulatory T (Treg) cell frequency in MLSA-stimulated cultures, showing that *M. leprae* constituents may play opposite roles that may possibly be related to the dubious effect of IDO-1 in the different clinical forms of disease. Our data show that *M. leprae* and its fractions are able to differentially modulate the activity and functionality of IDO-1 in mDCs by a pathway that involves TLR2, suggesting that this enzyme may play an important role in leprosy immunopathogenesis.

KEYWORDS

dendritic cells, IDO, lepromatous leprosy, leprosy, *Mycobacterium leprae*, reversal reaction

1 | INTRODUCTION

Leprosy is a chronic infectious disease, which mainly affects the peripheral nerves and skin. The disease is caused by *Mycobacterium leprae*, an obligate intracellular parasite that predominantly infects macrophages, endothelial cells, and Schwann cells, being

the unique specie of mycobacteria capable of infecting peripheral nerves.¹

Previous studies have demonstrated that *M. leprae* induces an increase in the gene and protein expression of the enzyme IDO-1 in human monocytes.² IDO-1 is an intracellular enzyme that catalyzes the early stage of tryptophan (trp) catabolism along the kynurenine (kyn)

Abbreviations: CMV, cytomegalovirus; HCV, Hepatitis C virus; HTLV, Human T cell lymphotropic virus; IDO, Indoleamine 2,3-dioxygenase; kyn, kynurenine; 1-MT, 1-methyl tryptophan; MLMA, *M. leprae* membrane fraction; MLSA, *M. leprae* cytosol fraction; mDCs, monocyte-derived dendritic cells; PBMCs, Peripheral blood mononuclear cells; TLR, Toll-like receptor; trp, tryptophan; Tregs, regulatory T cells; VDRL, Venereal Disease Research Laboratory test.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2020 The Authors. *Journal of Leukocyte Biology* published by Wiley Periodicals LLC on behalf of Society for Leukocyte Biology

Received: 20 March 2020 | Revised: 3 September 2020 | Accepted: 22 September 2020

J Leukoc Biol. 2021;110:167–176.

www.jleukbio.org | 167

pathway.³ Several cell types such as macrophages, epithelial cells, and dendritic cells (DCs) express IDO-1 that can be induced by proinflammatory cytokines, such as IFN- γ , TLR ligands, such as LPS, and interactions between immune cells through costimulatory molecules such as CD80 and CD86.³⁻⁵ It is known that IDO-1 can affect immunity through two nonexclusive mechanisms: the establishment of a local response with "amino acid deprivation" that inhibits pathogen growth and the production of trp metabolites with immunomodulatory functions or cytotoxic agents that inhibit T-cell activation and modulate the differentiation of naïve T cells into regulatory T cells (Tregs).^{6,7}

Our group has previously demonstrated a significant increase of IDO-1 in cells present in skin lesions of patients with multibacillary leprosy (lepromatous leprosy) compared to patients with the paucibacillary form (tuberculoid leprosy).⁸⁻¹⁰ Lipoproteins (19 and 33 kDa) present in *M. leprae* plasma membrane are well known to activate monocytes and DCs through TLR2.¹¹ Analyses of skin lesions from leprosy patients show that TLR2 is strongly expressed in cells of paucibacillary patients, in contrast to poor expression in cells from multibacillary patient lesions.¹¹ A subsequent study showed that activation of TLR2/1 leads to rapid differentiation of human peripheral monocytes in CD1b⁺ DCs in paucibacillary patients and in DC-SIGN⁺ cells in multibacillary patients,¹² suggesting that TLR-induced monocyte differentiation in macrophages or DCs influences the host response to *M. leprae* infection. Here, we investigated the ability of *M. leprae* and subcellular fractions to modulate IDO-1 expression and activity as well as their capacity to induce a tolerogenic or microbicidal phenotype in human monocyte-derived dendritic cells (mDCs).

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Obtaining buffy coats

Buffy coats were obtained from healthy blood donors in the hemotherapy service of Clementino Fraga Filho University Hospital of the Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ) through a technical-scientific partnership approved by the Research Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Foundation (approval number: 1.538.467). Inclusion and exclusion criteria were the same as those used for screening in blood banks, and volunteers under 18 yr of age whose serologic screening was positive for hepatitis B (HbsAg and anti-HBc), hepatitis C (HCV), AIDS (HIV-1/2 Ag + Ab combined test), Chagas disease (anti-*Trypanosoma cruzi*), syphilis (Venereal Disease Research Laboratory)–nontreponemal, (Human T-cell lymphotropic virus)-I and HTLV-II, malaria, and CMV were excluded.

2.2 | Obtaining human dendritic cells differentiated from monocytes

Human PBMCs were obtained under endotoxin-free conditions by the Ficoll-Paque PLUS method (GE, Chicago, Illinois, USA). PBMCs were labeled with CD14 magnetic beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) microbeads for 15 min at 4°C and passed through a

positive separation column. After monocyte separation, CD14⁺ cells were cultured in the presence of medium containing IL-4 (10 ng/ml) and GM-CSF (50 ng/ml) (PeproTech, Cranbury, NJ, USA) for 6 d at 37°C with 5% CO₂. After this time the nonadherent cells (mDCs) were then counted and plated.

2.3 | Cell culture stimuli and infection

mDCs were stimulated with 0.1, 1, or 10 μ g/ml of irradiated *M. leprae*, and its membrane (MLMA) and cytosol fractions (MLSA) (BEI Resources [NIH/ATCC], Manassas, VA, USA, 200 μ M of the IDO inhibitor 1-methyl-D-tryptophan (1-MT, SigmaAldrich, Saint Louis, MO, USA), 500 μ g/ml of the anti-human TNF (PeproTech), 100 μ g/ml of the anti-human IL-10 (PeproTech), 10 μ g/ml of the TLR2 agonist Pam3Cys-Ser-(Lys)4 (SigmaAldrich), 100 μ M of the inhibitory peptide for MyD88 homodimerization (IMGEX, San Diego, CA, USA), or 1 μ g/ml of Mab-mTLR2 (InvivoGen, San Diego, CA, USA), and incubated for 24 h at 37°C in 5% CO₂. *M. leprae* and its fractions were tested for purity and the absence of endotoxin. According to the limulus amoebocyte lysate assay (Lonza, Basel, Switzerland), all stimuli used for in vitro cultures were shown to contain less than 0.1 U/ml endotoxin.

2.4 | Flow cytometry

Panels of antibodies used for phenotypic detection and intracellular cytokine detection are described in Table 1. Following stimulation, 1×10^6 mDCs were transferred from the plate to cytometry minitubes. Cells were washed and then fixed (2% paraformaldehyde). Subsequently, mDCs were permeabilized (0.15% saponin in PBS) and incubated for 30 min at 4°C with their respective antibodies. At the end of the incubation, cells were washed, suspended, and cell phenotype was evaluated by flow cytometry (FACS Aria IIu, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). For each sample, a minimum of 10,000 events were acquired. The analysis was performed using the FlowJo software.

2.5 | ELISA

Supernatants were tested for the presence of TNF, IL-6, IL-10, IL-12, and IL-15 cytokines using commercially available ELISA (eBioscience, San Diego, CA, USA) following the protocols supplied by the manufacturer.

2.6 | HPLC

Determination of IDO-1 activity in mDC culture supernatants was performed by determination of kyn and trp levels¹³ by HPLC. In an Eppendorf tube, 165 μ l of culture supernatant were homogenized with 5 μ l tyrosine and 25 μ l Trichloroacetic acid (TCA). The tubes were then centrifuged for 10 min at 15,800 \times g. After centrifugation, the supernatant was collected and 50 μ l were injected into the reverse phase C18 column. Run detection was performed at 365 nm to detect kyn and 285 nm for trp and the internal normalizer tyrosine. IDO activity was assessed by the ratio of kyn to trp.

TABLE 1 Antibodies used in flow cytometry

Antibody	Clone	Catalogue number	Company	Fluorochrome
CD14	61D3	120149-42	eBioscience	PE
HLA-DR	G46-6	555811	BD Biosciences	FITC
CD11c	3.9	301606	BioLegend	PE
CD209	eB-h209	11-209973	eBioscience	FITC
CD86	IT2.2	15-0869-71	eBioscience	PE-Cy5
CD83	HB1Se	305320	BioLegend	PerCP-Cy5.5
CD304	AD5-17F6	130-090-900	Miltenyi Biotec	APC
CD123	6H6	306012	BioLegend	APC
IDO	700838	IC6030P	R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)	PE
TNF- α	MAB11	561023	BD eBioscience	AlexaFluor700
IL-10	127107	IC2172A	R&D	APC

2.7 | Coculture of mDCs and lymphocytes

To assess the functional role of IDO-1, mDCs were obtained as described earlier and plated in 96-well plates (2×10^4). After the stimulus period, autologous lymphocytes were added at a ratio of 1 (mDC):20 (lymphocytes) for 5 d at 37°C 5% CO₂. Subsequently, cells were harvested, washed, and labeled with anti-FoxP3 Alexa Fluor 488/CD4 PE-Cy5/CD25 PE antibodies according to the specifications of the True-Nuclear Human Treg Flow Kit (BioLegend, San Diego, CA, USA). Cells were analyzed by flow cytometry (FACS Aria II).

2.8 | Statistical analysis

Analyses of the experiments were performed by Kruskal-Wallis test or 1-way ANOVA. For all statistical analyses the value of $P \leq 0.05$ was considered significant. Statistical analyses were performed using the Windows GraphPad Prism version 8.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3 | RESULTS

3.1 | *M. leprae* increases IDO-1 expression and activity in mDCs

Previous data from our group have demonstrated that *M. leprae* induces the expression and activity of IDO-1 in human monocytes.⁸ In order to investigate whether *M. leprae* and its fractions are capable of modulating IDO-1 protein expression in mDCs, cells were stimulated with *M. leprae*, MLMA, or MLSA for 24 h. DCs were analyzed by flow cytometry to evaluate IDO-1 expression (Fig. 1A) and a panel of specific markers was used to confirm their differentiation (Supporting Information Fig. S1A–R). *M. leprae* and MLMA fraction were efficient in inducing IDO-1 expression at 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, but not MLSA (Fig. 1B, C). The kyn/trp ratio in the supernatants reflects IDO-1 activity. To confirm if the enzymatic activity of IDO-1 was also modulated by different mycobacterial stimuli, the kyn/trp ratio in the supernatants was ana-

lyzed by HPLC. As observed in Fig. 1D, *M. leprae* (0.3 ± 0.02 in ML vs. 0.05 ± 0.01 in NS, $P = 0.01$) and MLMA (0.24 ± 0.01 in MLMA vs. 0.05 ± 0.01 in NS, $P = 0.02$) were able to significantly increase the enzymatic activity of IDO-1, but the same was not observed with the MLSA fraction. These data show that antigens present in membrane of the bacilli are able to induce IDO-1 activity.

3.2 | TNF is important in the induction of IDO-1 activity by *M. leprae* and its fractions in mDCs

Analysis of TNF⁺ cells by flow cytometry revealed that the MLMA fraction was able to induce an increase in the frequency of double positive IDO-1⁺TNF⁺ cells when compared with nonstimulated cells (8.35 ± 2.17 in MLMA vs. 0.92 ± 0.24 in NS, $P = 0.022$) (Fig. 2A–E). However, neither *M. leprae* nor its fractions were able to induce an increase in the frequency of IDO-1⁺ IL-10⁺ cells (Supporting Information Fig. S2). Cytokine concentrations in the culture supernatants of mDCs stimulated with *M. leprae*, MLSA and MLMA for 24 h were evaluated by ELISA. As observed in Figure 3, *M. leprae* was not able to significantly modulate the production of the cytokines tested. However, MLMA was able to induce a significant increase in TNF, IL-6, and IL-12 concentrations (Fig. 3A, C,) when compared to nonstimulated cells. In contrast, MLSA induced an increase in IL-10 levels (Fig. 3B). There was no change in IL-15 production by mDCs after the stimuli with *M. leprae* and its fractions (not shown).

TNF, which is normally present in infectious environments, synergistically enhances IFN- γ -induced IDO-1 activity.¹⁴ Because the stimulation with MLMA induced an increase in TNF and stimulation with MLSA-induced IL-10, we investigated the role of both IL-10 and TNF in the induction of IDO-1 expression and activity by *M. leprae* and its fractions on mDCs. As shown in Figure 4, the blockade of TNF in cultures stimulated with *M. leprae* or its fractions led to a significant decrease in IDO-1 activity in mDCs cultures, suggesting an important role of this cytokine in the induction of IDO-1 by *M. leprae* and its fractions. The same effect was not observed after IL-10 blockade (Fig. 4A–C).

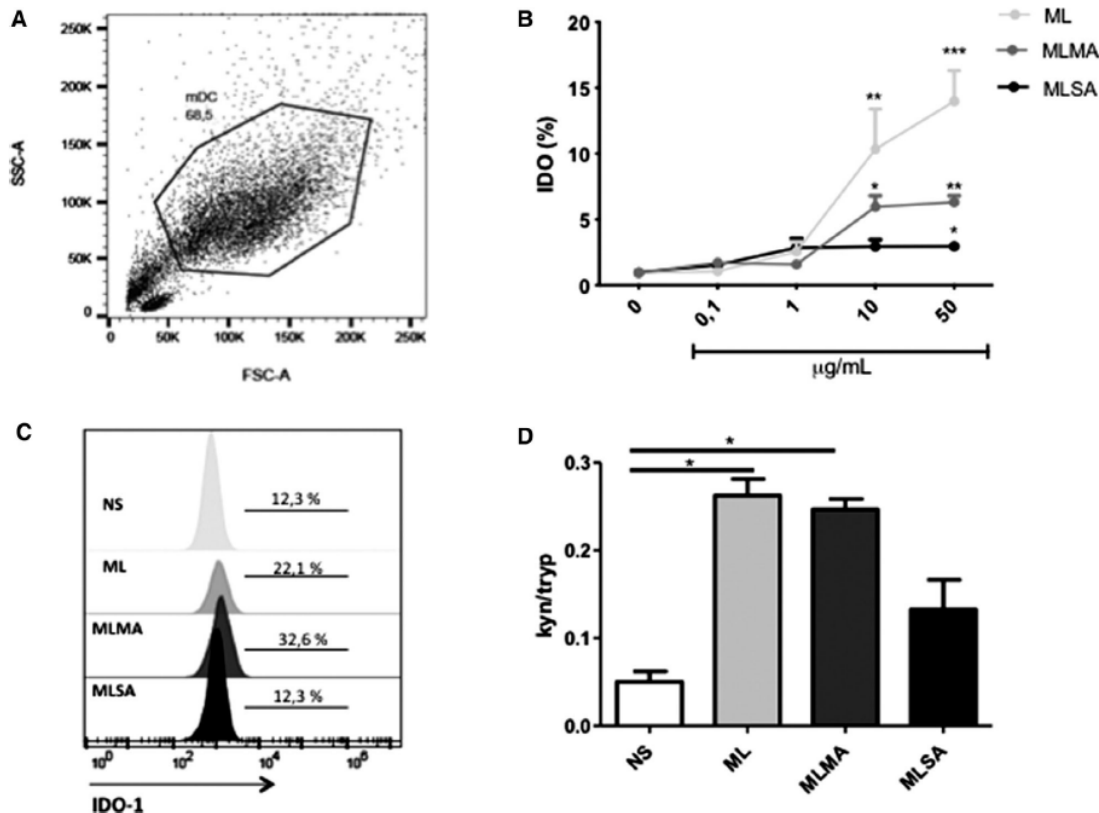


FIGURE 1 IDO-1 activity and expression in human monocyte-derived dendritic cells (mDCs). The differentiated mDCs were plated (1×10^6 cells per well). (A) Gate strategy for flow cytometry analysis. (B) mDCs were stimulated with *M. leprae* (ML), membrane fraction of *M. leprae* (MLMA), or soluble fraction of *M. leprae* (MLSA) at 0.1, 1, 10, or 50 $\mu\text{g/mL}$, for 24 h. After this time, cells were labeled with anti-IDO-1 intracellular antibody. Acquisition was performed in a BD FACS Aria IIu flow cytometer and analysis performed using FlowJo software. NS—unstimulated cell. The graph shows the percentage of IDO-1-positive mDC of three independent experiments performed in triplicate. (C) Representative histograms of mDCs stimulated with ML or its fractions. (D) Supernatants from cell cultures were collected and IDO-1 activity was assessed by the kynurenine/tryptophan ratio (kyn/tryp) by HPLC. The plot represents the mean \pm SD of three independently performed experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; and *** $P < 0.001$

3.3 | TLR2 is important for the induction of IDO-1 activity in mDCs

M. leprae membrane contains lipoproteins that can activate TLR2 signaling triggering an inflammatory response^{15,16} and therefore a role for this signaling pathway on IDO-1 induction in stimulated mDCs was investigated. As observed in Figure 5A, the blockade of TLR2 decreased IDO-1 activity induced by *M. leprae* and its fractions, demonstrating that IDO-1 activity and expression in *M. leprae*-stimulated mDCs is TLR2 dependent. The TLR2 agonist Pam3Cys was used as positive control, suggesting that TLR2 pathway is involved in IDO-1 induction in mDCs (0.25 ± 0.01 in ML vs. 0.03 ± 0.01 in ML + TLR2, $P = 0.20$; 0.20 ± 0.02 in MLMA vs. 0.01 ± 0.002 in MLMA + TLR2, $P = 0.01$; 0.13 ± 0.03 in MLSA vs. 0.02 ± 0.006 in MLSA + TLR2, $P = 0.01$). In addition, we used a peptide inhibitor of the MyD88 pathway in parallel to a peptide control of the same pathway. A decrease in IDO-1 activity was observed when the inhibitory peptide was added to the cultures

(0.22 ± 0.03 in ML vs. 0.02 ± 0.005 in ML + αMyD88 , $P = 0.01$; 0.18 ± 0.02 in MLMA vs. 0.05 ± 0.005 in MLMA + αMyD88 , $P = 0.007$; 0.08 ± 0.02 in MLSA vs. 0.01 ± 0.007 in MLSA + αMyD88 , $P = 0.03$) (Fig. 5B).

3.4 | *M. leprae* and its fractions influence the tolerogenic profile of lymphocytes

In order to verify whether the increase in IDO-1 expression and activity influenced the lymphocyte phenotype after priming by the mDCs, a coculture assay was performed in which the mDCs stimulated with *M. leprae* and its fractions were cultivated with autologous lymphocytes in a proportion of 20 lymphocytes:1 mDC.

Through flow cytometric analysis (Supporting Information Fig. S3; Fig. 6A–H), an overall increase in Treg frequencies in MLSA or ML-stimulated mDCs cocultures was observed. Inhibition of IDO-1

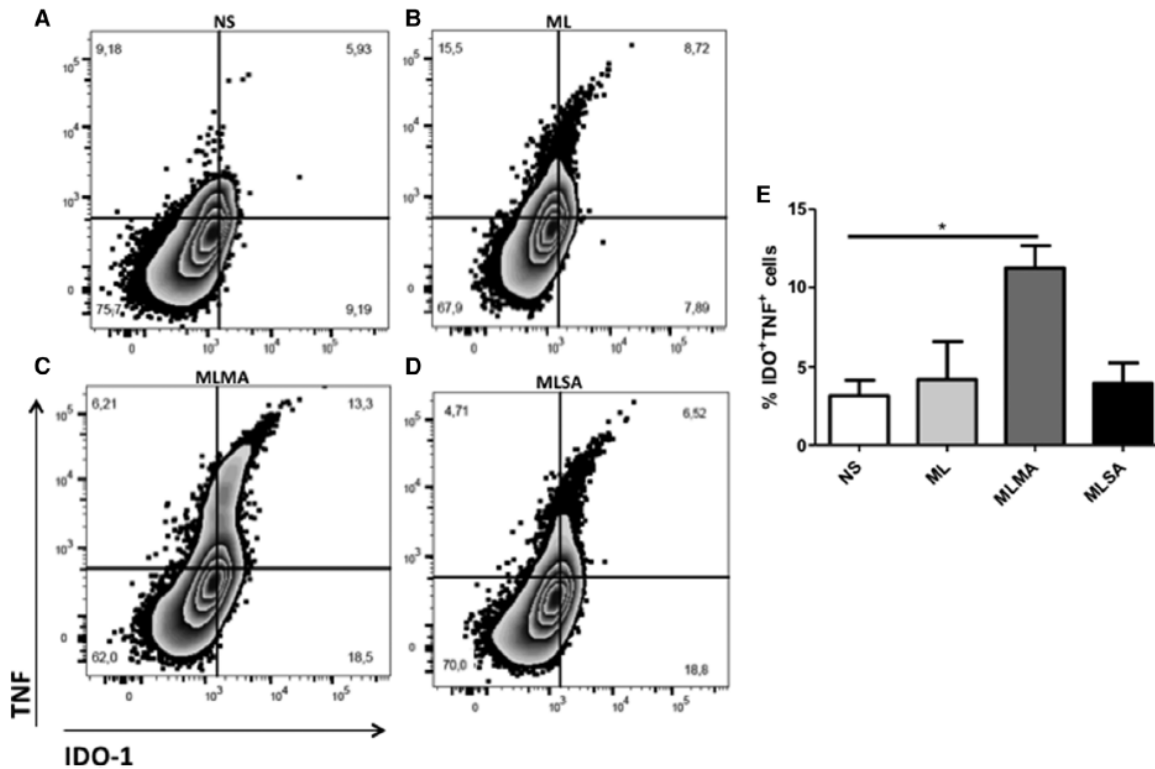


FIGURE 2 MLMA is able to increase the frequency of IDO-1⁺TNF⁺ human monocyte-derived dendritic cells (mDCs). DCs differentiated from monocytes were plated (1×10^6 cells per well) and stimulated with *M. leprae* (ML), membrane fraction of *M. leprae* (MLMA), and soluble fraction of *M. leprae* (MLSA) at $10 \mu\text{g/ml}$, for 24 h, or not (NS—unstimulated cell). Cells were labeled with anti-IDO-1 PE and Alexa Fluor 700 TNF intracellular antibodies. Acquisition was performed in a BD FACS Aria IIu flow cytometer and analysis performed using FlowJo software. Analysis is representative of cells from a donor from four experiments. For each sample, a minimum of 10,000 events were analyzed. * $P < 0.05$ (Mann-Whitney)

activity significantly abrogated Treg differentiation for those stimuli, suggesting that acquisition of the regulatory profile during cocultures may be IDO-1 dependent (9.19 ± 2.20 in ML vs. 0.24 ± 0.10 in ML + 1MT, $P = 0.007$ and 7.32 ± 0.73 in MLSA vs. 0.24 ± 0.10 in MLSA + 1MT, $P = 0.007$) (Fig. 6I).

4 | DISCUSSION

The characterization of infectious environments is important to define how innate immunity influences the subsequent development of adaptive immunity. Regulatory mechanisms that operate at both stages of immunity are also critical in determining how the immune response will dictate the severity of an infectious process. In this context, we have explored the regulatory mechanisms exerted by the enzyme IDO-1 during *M. leprae* infection. At the lepromatous leprosy pole, high IDO-1 expression along with high levels of IL-10 and TGF- β could be responsible for the pronounced reduction of the antigen-specific cellular immune response observed in these patients.²⁸ At the tuberculoid pole of the disease, where the expression of IFN- γ predominates, IDO-1 would be induced mainly by this cytokine¹⁰

and could be associated with microbicidal activity, suggesting that in leprosy IDO-1 may have a dual role, being tolerogenic or microbicidal depending on the environment and the cytokines involved in its induction.

In skin lesions of leprosy patients, in addition to intact bacilli, some mycobacterial fractions from the membrane and the *M. leprae* cytosol exposed after bacterial death, which may be a result of both the host immune response and the treatment, should induce immune responses.¹ Thus, in addition to the use of irradiated *M. leprae*, mDCs were stimulated by the MLMA and MLSA, mimicking the tissue microenvironment.

We are the first to demonstrate that *M. leprae* is able to induce IDO-1 activity in mDCs when compared to unstimulated cells. In parallel, the intracellular expression of IDO-1 was analyzed by flow cytometry and we observed that *M. leprae* and its fractions were able to increase IDO-1 expression, with a higher increase after MLMA stimulation, but not MLSA. It has already been shown that *M. tuberculosis* infection leads to up-regulation of IDO-1 expression in murine macrophages.¹⁷ In addition, elevated IDO-1 activity was described in many chronic inflammatory syndromes, including cancer, infections, allergies, and pregnancy.¹⁸

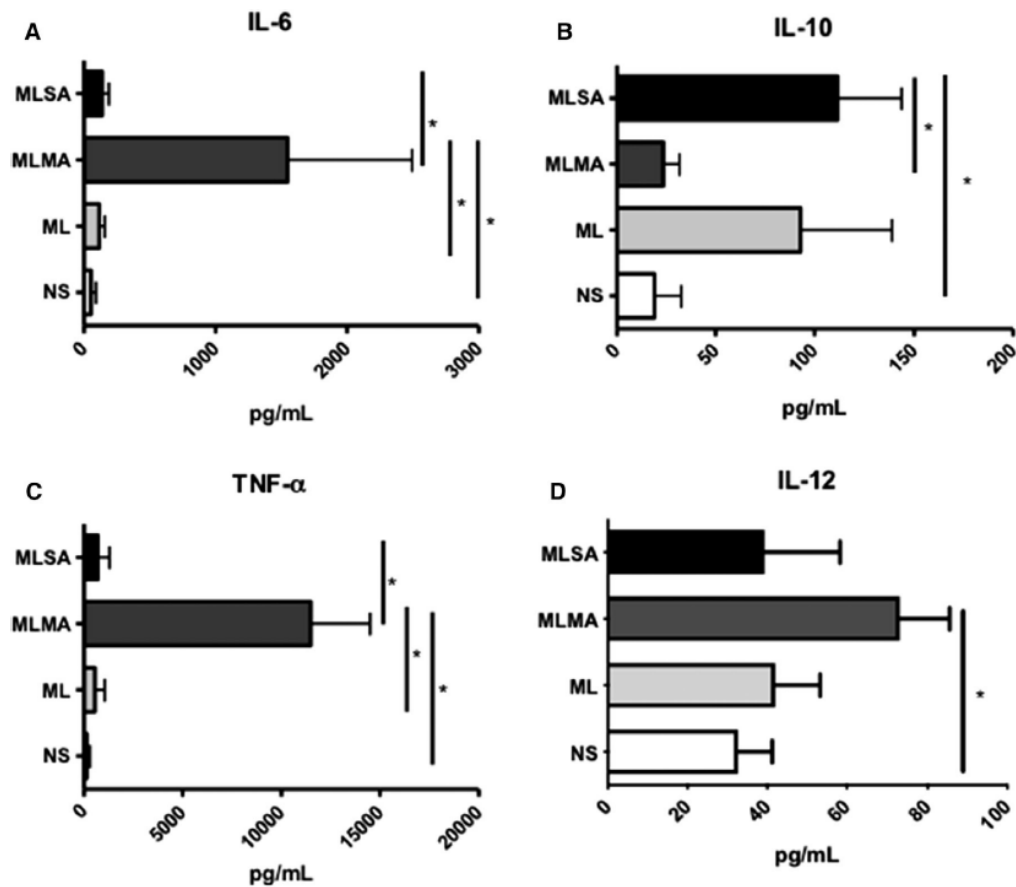


FIGURE 3 Differential cytokine production in cell supernatants from MLMA or MLSA-stimulated human monocyte-derived dendritic cells (mDCs). mDCs were plated (1×10^6 cells per well) and stimulated with *M. leprae* (ML), membrane fraction of *M. leprae* (MLMA), and soluble fraction of *M. leprae* (MLSA) at $10 \mu\text{g/ml}$, for 24 h, or not (NS—unstimulated cell). (A–D) Supernatants from these cultures were then collected and TNF, IL-6, IL-10, and IL-12 concentrations were evaluated by ELISA. Graphs represent the mean \pm SD of four independently performed experiments. * $P < 0.05$ (1-way ANOVA)

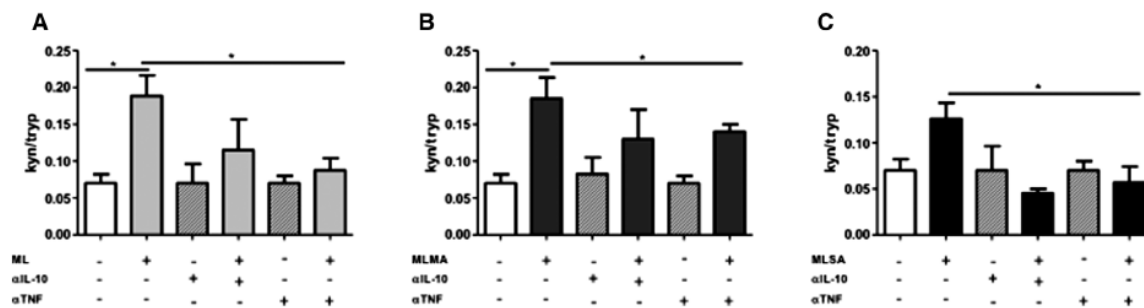


FIGURE 4 Importance of TNF in the induction of IDO-1 activity in *M. leprae*-stimulated human monocyte-derived dendritic cells (mDCs). mDCs were plated (1×10^6 cells per well) and 1 h prior to challenge, anti-human IL-10 ($100 \mu\text{g/ml}$) or anti-human TNF ($500 \mu\text{g/ml}$) neutralizing antibodies were added at cultures followed by stimuli: *M. leprae* (ML), membrane fraction of *M. leprae* (MLMA), or soluble fraction of *M. leprae* (MLSA) were added $10 \mu\text{g/ml}$ or not (NS—nonstimulated cell). After 24 h, supernatants were collected and IDO-1 activity was assessed by the kynurenine/tryptophan ratio (kyn/tryp) by HPLC. The plot represents the mean \pm SD of four independently performed experiments. * $P < 0.05$ (Kruskal-Wallis)

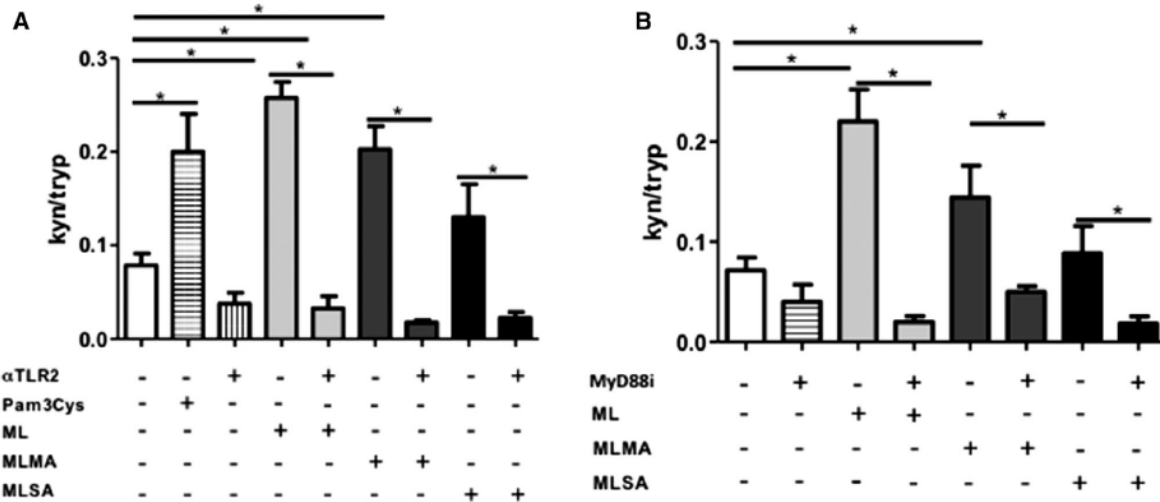


FIGURE 5 TLR2 is important in inducing IDO-1 activity in human monocyte-derived dendritic cells (mDCs). mDCs were plated (1×10^6 cells per well) and 1 h prior to challenge, anti-human TLR2 (1 $\mu\text{g/ml}$) neutralizing antibody or MyD88 peptide inhibitor (MyD88i; IMGENEX) (100 μM) was added, followed by stimuli: *M. leprae* (ML), membrane fraction (MLMA), or soluble fraction (MLSA) was added at 10 $\mu\text{g/ml}$, TLR2 agonist Pam3Cys was used as positive control (10 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h at 37°C 5%CO₂. Controls are nonstimulated cultures. Supernatants from these cultures were collected and IDO-1 activity was assessed by the kynurenine/tryptophan ratio (kyn/trp) by HPLC. The plot represents the mean \pm SD of five independently performed experiments. * $P < 0.05$ (Mann-Whitney)

The production of cytokines in these environments was evaluated. It should be noted that among the stimuli studied, MLMA significantly induced an increase in the production of inflammatory cytokines, such as TNF, IL-6, and IL-12. It was also observed that the MLMA fraction induced an increase in the frequency of IDO⁺TNF⁺ cells. TNF has been suggested to be one of the most important cytokines for the induction of IDO-1. The contribution of TNF to the activation of IDO-1 induced by LPS has already been observed.¹⁹ In addition, TNF mediates stress-induced depression by positively regulating the IDO-1 enzyme.²⁰ As TNF modulates the response to cytotoxicity and the production of inflammatory cytokines,²¹ our data suggest that the MLMA fraction may be involved in a microbicidal effect.

Our results showed that *M. leprae* and MLSA led to an increase in IL-10 secretion, which could suggest a regulatory effect, because an earlier study² demonstrated that *M. leprae* is able to induce the gene and protein expression of IDO-1 in human monocytes by an IL-10-dependent mechanism. In leprosy, IL-15 induces the vitamin D-dependent antimicrobial pathway and this ability is consistent with the expression of this cytokine in self-limited tuberculoid lesions.²² Here, we investigated the secretion of this cytokine in cell supernatants and observed that there was no change between the stimuli used (not shown).

Our data also show that blocking TNF decreases IDO-1 activity in mDCs by *M. leprae* and its fractions, unlike IL-10 blockade. These results led us to hypothesize that TNF is induced at different levels by different antigens present in cytosol and on bacilli cell membrane and that this cytokine is important for IDO-1 expression and activity in human mDCs. In contrast, IL-10 is not as efficient in inducing IDO-1 expression and activity in mDCs as observed previously in human monocytes stimulated with *M. leprae*.²

Recognition of components of the mycobacterial cell wall, such as sugars, lipids, and peptides can induce macrophages to secrete TNF and other cytokines like IL-12 that are essential for the development of an inflammatory response.²³ TLR2, activated by lipoarabinomannan, is required for the induction of TNF in macrophages by *M. tuberculosis*. Previous studies have further shown that the expression of IDO-1 in DCs can be induced by inflammatory cytokines and TLR ligands.⁶

Lipoproteins from *M. tuberculosis*, such as 19 kD and mannose-capped lipoarabinomannan, are TLR2 ligands that trigger the development of regulatory immune responses.^{24–26} Previous studies have shown that lysophosphatidylcholine subverts TLR-mediated signaling in DCs, which drives cell differentiation to a tolerogenic phenotype.²⁷ In addition, it was demonstrated that tolerogenic effects induced by IDO-1 depend on TLR2/6-induced JNK signaling by *Faecalibacterium prausnitzii* and ectonucleotidase activity.²⁸ Our data demonstrated that *M. leprae* induces an increase in IDO-1 expression and activity in mDCs, and that the membrane components of the bacilli play an important role in this context via TLR2 signaling associated with the production of inflammatory cytokines. We cannot exclude the involvement of TLR4 on IDO-1 activation induced by *M. leprae*. Although *M. leprae* is an acid-fast intracellular gram-positive bacillus, there are evidences that it can activate TLR4.²⁹ Mycobacterial glycolipids such as the lipooligosaccharides contain the lipid A portion, which is responsible for the LPS interaction with TLR4.

IDO-1 may require TLR-MyD88-NF- κ B signaling to promote the development of colitis.³⁰ Because NF- κ B activation depends on MyD88 we performed assays using a MyD88 inhibitor, and we observed that the absence of MyD88 in cultures of mDCs leads to a decrease in the activity of IDO-1 also suggesting it might be the case.

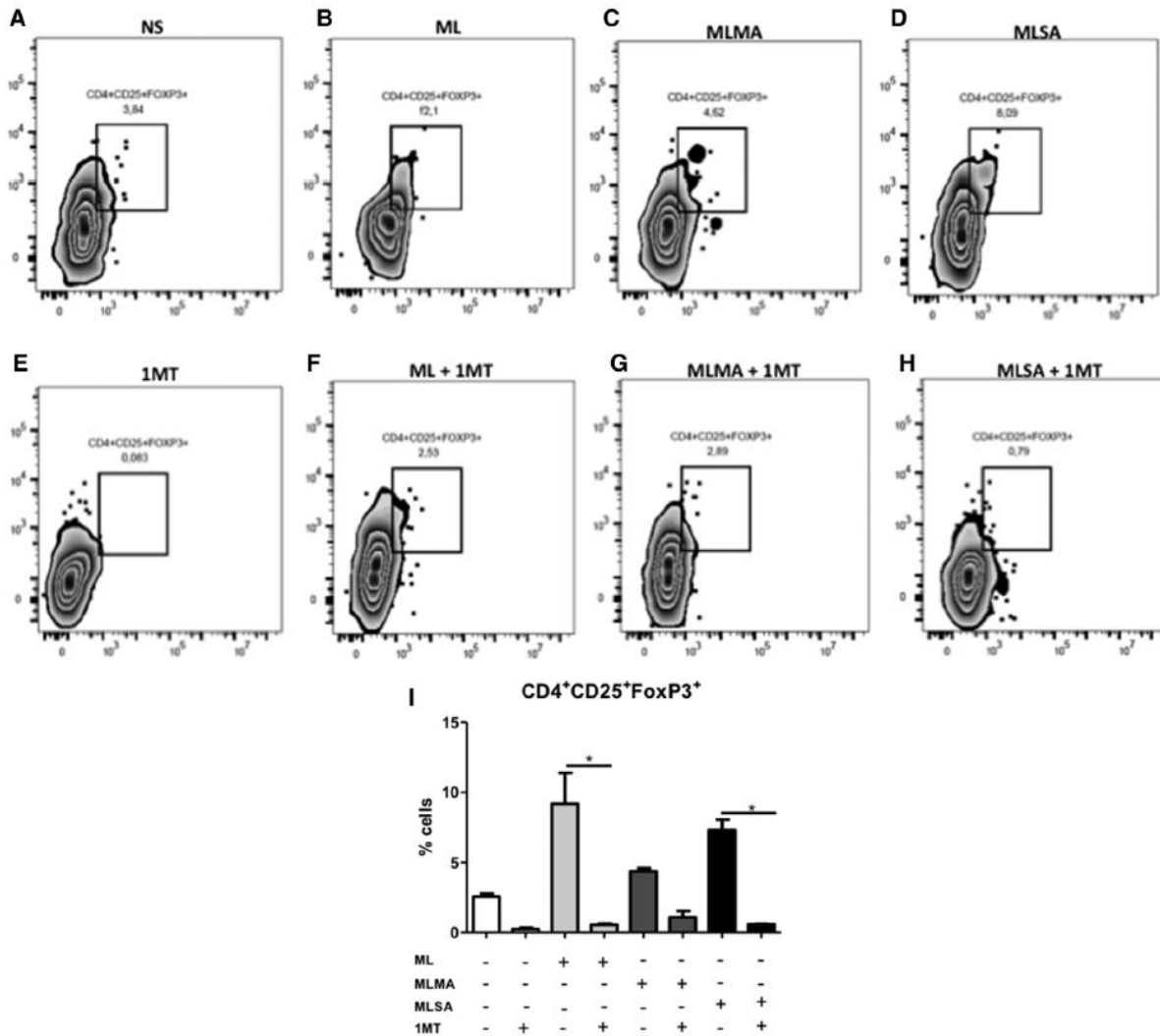


FIGURE 6 Increased regulatory T (Treg) cell expression by *M. leprae* and MLSA. Human monocyte-derived dendritic cells (mDCs) were plated (1×10^4 cells per well) and stimulated with *M. leprae* (ML), membrane fraction of *M. leprae* (MLMA) and soluble fraction of *M. leprae* (MLSA) at $10 \mu\text{g/ml}$, for 24 h, or 1MT (IDO inhibitor—1 h before other stimuli) or not (NS—unstimulated cell). Cells were washed and the autologous lymphocytes (20 lymphocytes:1 mDC) were cultured for 5 d. Cells were then labeled with intracellular anti-CD4, CD25, and FoxP3 or isotype antibodies. Acquisition was performed by BD FACS Aria IIu flow cytometry and analysis performed using FlowJo software. Analysis is representative of cells from a donor from four experiments. For each sample, a minimum of 10,000 events were analyzed. * $P < 0.05$ (Mann-Whitney)

A key mechanism involved in mDCs-mediated immunosuppression is the expression of IDO-1.³¹ The interaction of DCs with TLR2 and TLR4 treated with ES L1 (excretory-secretory muscle larvae) promotes the expansion of CD4⁺ CD25^{high}Foxp3^{high} producing IL-10 and TGF- β cells in an IDO-1-dependent form.³² The 6-formylindolo[3,2-b]carbazole-treated DCs are able to induce differentiation of naive T lymphocytes into regulatory-like T cells.³³ Our coculture data showed that *M. leprae* is capable of enhancing the expression of Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ lymphocytes by an IDO-1-dependent form. MLSA, which increased IL-10 secretion, is capable of enhancing the expression of Treg by an IDO-1-independent form. It has also been shown that lepromatous patients increase the expression of Treg

cells, one factor that may explain the large number of bacilli in these individuals.³⁴ These findings provide a new insight into the mechanisms of TLR-induced tolerogenic phenotype in DCs, which may help to better understand the processes involved in the induction and resolution of chronic inflammation and tolerance.

Together, *M. leprae*-induced IDO-1 axis may play an important role in controlling the immunity and severity of leprosy. In clinical terms, our hypothesis is that in multibacillary patients, the high flow of living and dead bacilli induces IDO-1 by an IL-10-dependent mechanism that in turn leads to a tolerogenic effect, decreasing the cellular immune response. In paucibacillary patients and in the reaction episodes, the exposure of bacilli membrane antigens favors a context similar to that

described by mDCs stimulation with MLMA, that is, the increase of IDO-1 due to the activation of TNF and IL-12, which consequently leads to an increase in the pro-inflammatory response and could contribute to a decrease in bacillary load.

AUTHORS

ROP, MOM, VSF, MCVP and ENS contributed to the design and implementation of the research. JAPO, MG and ROP to the writing of the manuscript. JAPO, MG, JSS, SKF, MGMB and ROP processed the experimental data and performed the analysis. All authors provided critical feedback and helped shape the research, analysis and manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Hemotherapy service of Clementino Fraga Filho University Hospital of the Federal University of Rio de Janeiro (HUCFF/UFRJ/Brazil) for the buffy coats. The following reagents were kindly obtained from the NIH Biodefense and Emerging Infections Research Resources Repository, NIAID, NIH: *M. leprae*, MLSA, and MLMA. We also thank Dr. John Spencer and Dr. Márcia Berredo for the MLMA antigen; Dr. Elzinandes Leal for the MyD88 inhibitor peptide; the Laboratory for Development and Analytical Validation (LDVA) for their support in HPLC; and the flow cytometry platform of Oswaldo Cruz Institute (IOC/FIOCRUZ) for acquisition and analysis of samples. Finally we thank CAPES, FAPERJ, and CNPq funding institutions for all their financial support.

ORCID

Roberta O. Pinheiro  <https://orcid.org/0000-0001-8471-4227>

REFERENCES

- Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:338-381.
- Moura DF, de Mattos KA, Amadeu TP, et al. CD163 favors *Mycobacterium leprae* survival and persistence by promoting anti-inflammatory pathways in lepromatous macrophages. *Eur J Immunol.* 2012;42:2925-2936.
- Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:762-774.
- Mbongue JC, Nicholas DA, Torrez TW, Kim NS, Firek AF, Langridge WH. The role of Indoleamine 2, 3-dioxygenase in immune suppression and autoimmunity. *Vaccine.* 2015;3:703-729.
- Heitger A. Regulation of expression and function of IDO in human dendritic cells. *Curr Med Chem.* 2011;18:2222-2233.
- Harden JL, Elgimez NK. Indoleamine 2,3 dioxygenase and dendritic cell tolerogenicity. *Immunol Invest.* 2012;41:738-764.
- Schmidt SV, Schultze JL. New insights into IDO biology in bacterial and viral infections. *Front Immunol.* 2014;5:1-12.
- De Souza Sales J, Lara FA, Amadeu TP, et al. The role of Indoleamine 2, 3-dioxygenase in lepromatous leprosy immunosuppression. *Clin Exp Immunol.* 2011;165:251-263.
- De Mattos Barbosa MG, da Silva Prata RB, Andrade PR, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase and iron are required for *Mycobacterium leprae* survival. *Microbe Infect.* 2017;19:505-514.
- Andrade PR, Pinheiro RO, Sales AM, et al. Type 1 reaction in leprosy: a model for a better understanding of tissue immunity under an immunopathological condition. *Exp Rev Clin Immunol.* 2015;11:391-407.
- Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med.* 2003;9:525-532.
- Krutzik SR, Tan B, Li H, et al. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nature.* 2005;11:653-660.
- Maneglier B, Rogez-Kreuz C, Cordonnier P, et al. Simultaneous measurement of kynurenine and tryptophan in human plasma and supernatants of cultured human cells by HPLC with coulometric detection. *Clin Chem.* 2004;50:2166-2168.
- Robinson CM, Shirey KA, Carlin JM. Synergistic Transcriptional Activation of IDO by IFN- γ and TNG- α . *J Interferon Cytokine Res.* 2006;23:413-421.
- Modlin R. The innate immune response in leprosy. *Curr Opin Immunol.* 2010;22(1):48-54.
- Pinheiro RO, Schmitz V, Silva BJA, et al. Innate immune responses in leprosy. *Front Immunol.* 2018;9:518.
- Blumenthal A, Nagalingam G, Huch JH, et al. M. tuberculosis induces potent activation of IDO-1, but this is not essential for the immunological control of infection. *PLoS ONE.* 2012;7:37314.
- Ye Z, Yue L, Shi J, Shao M, Wu T. Role of IDO and TDO in cancers and related diseases and the therapeutic implications. *J Cancer.* 2019;10:2771-2782.
- Fujigaki S, Saito K, Sekikawa K, et al. Lipopolysaccharide induction of Indoleamine 2,3-dioxygenase is mediated dominantly by an IFN-gamma-independent mechanism. *Eur J Immunol.* 2001;31:2313-2318.
- Liu YN, Peng YL, Lei-Liu TY, et al. TNF α mediates stress-induced depression by upregulating Indoleamine 2,3-dioxygenase in a mouse model of unpredictable chronic mild stress. *Eur Cytokine Netw.* 2015;26:15-25.
- Chu W. Tumor necrosis factor. *Cancer Lett.* 2013;328:222-225.
- Montoya D, Modlin RL. Learning from leprosy. Insight into the human innate immune response. *Adv Immunol.* 2010;105:1-24.
- Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:14459-14463.
- Gehring AJ, Rojas RE, Canaday DH, Lakey DL, Harding CV, Boom WH. The *Mycobacterium tuberculosis* 19-kilodalton lipoprotein inhibits gamma interferon-regulated HLA-DR and Fc γ R1 on human macrophages through Toll-like receptor 2. *Infect Immun.* 2003;71:4487-4497.
- Liu H, Komai-Koma M, Xu D, Liew FY. Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4 +CD25+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:7048-7053.
- Garg A, Barnes PF, Roy S, et al. Prostaglandin E2-dependent expansion of regulatory T cells in human *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur J Immunol.* 2008;38:459-469.
- Tounsi N, Meghari S, Moser M, Djerdjouri B. lysophosphatidylcholine exacerbates *Leishmania* major-dendritic cell infection through interleukin-10 and a burst in arginase1 and Indoleamine 2,3-dioxygenase activities. *Int Immunopharmacol.* 2015;25:1-9.
- Alameddine J, Godefroy E, Papargyris L, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* skews human dC to prime IL10-producing T cells through TLR2/6/JNK signaling and IL-10, IL-27, CD39, and IDO-1 induction. *Front Immunol.* 2019;10:1-11.

29. Polycarpou A, Holland MJ, Karageorgiou I, et al. *Mycobacterium leprae* activates Toll-like receptor-4 signaling and expression on macrophages depending on previous Bacillus Calmette-Guerin vaccination. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016;6:72.
30. Shon WJ, Lee YK, Shin JH, Choi EY, Shin DM. Severity of DSS-induced colitis is reduced in Ido1-deficient mice with down-regulation of TLR-MyD88-NF- κ B transcriptional networks. *Sci Rep.* 2015;5:1-12.
31. Mellor AL, Lemos H, Huang L. Indoleamine 2,3 dioxygenase and tolerance: where are we now? *Front Immunol.* 2017;8:1360.
32. Ilic N, Gruden-Movsesijan A, Cvetkovic J, et al. *Trichinella spiralis* excretory-secretory products induce tolerogenic properties in human dendritic cells via Toll-like receptors 2 and 4. *Front Immunol.* 2018;9:11.
33. Jurado-Manzano BB, Zavala-Reyes D, Turrubiarres-Martínez EA, Portales-Pérez DP, González-Amaro R, Layseca-Espinosa E. FICZ generates human tDCs that induce CD4⁺ CD25^{high} Foxp3⁺ Treg-like cell differentiation. *Immunol Lett.* 2017;190:84-92.
34. Palermo ML, Pagliari C, Trindade MAB, et al. Increased expression of regulatory T cells and down-regulatory molecules in lepromatous leprosy. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;86:878-883.

SUPPORTING INFORMATION

Additional information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Oliveira JAP, Gandini M, Sales JS, et al. *Mycobacterium leprae* induces a tolerogenic profile in monocyte-derived dendritic cells via TLR2 induction of IDO 2,3-dioxygenase. *J Leukoc Biol.* 2021;110:167-176. <https://doi.org/10.1002/JLB.4A0320-188R>