



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Bruna Beatriz Gimenez Carra

**Avaliação da polarização de macrófagos em coculturas
com células de Schwann infectadas pelo
Mycobacterium leprae.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Mestra
em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Niéto Brito de Souza

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Renata Sales Nogueira

Botucatu

2018

Bruna Beatriz Gimenez Carra

**Avaliação da polarização de macrófagos em
coculturas com células de Schwann infectadas pelo
Mycobacterium leprae.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestra em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Niéto Brito de Souza

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Renata Sales Nogueira

Botucatu

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Carra, Bruna Beatriz Gimenez.

Avaliação da polarização de macrófagos em coculturas com células de Schwann infectadas pelo *Mycobacterium leprae*. / Bruna Beatriz Gimenez Carra. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Vânia Nieto Brito de Souza

Coorientador: Maria Renata Sales Nogueira

Capes: 20100000

1. Células de Schwann. 2. Macrófagos. 3. *Mycobacterium leprae*. 4. Hanseníase.

Palavras-chave: Células de Schwann; Macrófagos; *Mycobacterium leprae*; Polarização de macrófagos.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus por ter me dado força neste caminho, por me dar sabedoria frente as dificuldades e por ter me guiado nos momentos mais difíceis.

Dedico este trabalho aos meus pais, Wagner e Silvia Gimenez, e ao meu irmão Júnior, por todo apoio e incentivo. Dedico ao meu marido César Carra por acreditar em mim durante todos esses anos, pelo imensurável amor e cuidado. Tudo o que eu alcancei hoje é graças a vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me guiar, iluminar, me dar tranquilidade e esperança para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

A minha orientadora Vânia, pela grande oportunidade, pelo apoio imensurável, competência e eficiência com que conduziu a orientação deste trabalho. Agradeço por ter confiado em mim e por todo ensinamento, paciência e carinho.

A minha coorientadora Maria Renata, sou grata pela oportunidade, suporte e confiança.

Aos colaboradores deste trabalho, Mariane, Giovanna, Adriana, Bárbara, James, Patrícia e Daniele, obrigada por toda contribuição e amizade.

Aos meus amigos do Lauro, Adriana Sierra, André Flores, Amanda Finardi, Beatriz Sartori, Élderson Valois, Eloise Brasil, Erick, Graziela Gonçalves, Giovanna Germano, Izilda Andrade, Keren Valezi, Mariane Bertolucci, Patrícia Gigliotti, Priscila Balalai, Rodrigo Mendes e Ulisses que compartilharam comigo todos os momentos durante o percurso acadêmico. Muito obrigada por todo carinho e amizade.

A toda Equipe Técnica de Biologia Celular, Equipe Técnica de Microbiologia, Equipe Técnica de Patologia, Equipe Técnica de Imunologia, Setor de Biotério e Setor de Biblioteca que contribuíram para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Universidade Estadual Paulista UNESP/Botucatu.

A Seção Técnica de Pós-Graduação, especialmente a secretária Bruna Jorgetto pela gentileza e atenção de sempre com os alunos.

Ao Instituto Lauro de Souza Lima por todo suporte.

A Fundação Paulista contra a Hanseníase pelo auxílio financeiro.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudo (Nº 2016/16073-5).

RESUMO

A infecção pelo *Mycobacterium leprae* (ML) estimula um processo de desdiferenciação e proliferação das células de Schwann (SCs) que pode contribuir para a disseminação do bacilo. Os macrófagos (MOs) são células efetoras da resposta imune que promovem a eliminação de patógenos, entretanto, na hanseníase são colonizados pelo ML. Sabe-se que os MOs podem apresentar uma polarização funcional na qual os MOs M1 apresentam características pró-inflamatórias e microbicidas enquanto os MOs M2 atuam na reparação tecidual e possuem perfil anti-inflamatório. SCs infectadas pelo ML produzem mediadores capazes de interferir com a função dos MOs aumentando sua sobrevivência e promovendo sua migração. Embora diferentes programas funcionais tenham sido observados em MOs de pacientes com formas polares da hanseníase a influência de SCs nesse processo não é sabida. Neste estudo avaliamos se SCs infectadas pelo ML podem interferir na polarização de MOs murinos derivados de medula óssea. Para tanto, culturas primárias de SCs murinas foram infectadas experimentalmente com bacilos viáveis e cocultivadas com MOs. Nossos resultados indicam que a produção de óxido nítrico foi baixa nas culturas de MOs após a infecção com o bacilo, mas mostrou-se aumentada nas coculturas de MOs e SCs infectadas pelo ML. A infecção com ML não induziu produção significativa das citocinas IL-6, IL-10 e TNF em culturas de MOs e SCs, entretanto, a interação entre MOs e SCs infectadas com o bacilo resultou em aumento na produção de citocinas, especialmente IL-10, o que levou a uma diminuição na razão TNF/IL-10. Aliado a isso, verificamos diminuição na expressão de marcadores M1 (CD86 e iNOS) e aumento na expressão do marcador CD206 característico de MOs com perfil M2. Em conclusão, a infecção de SCs pelo ML é capaz de interferir com a polarização funcional de MOs levando a diferenciação de um perfil M2-like por induzir a ocorrência de um ambiente anti-inflamatório.

Palavras-chave: *Mycobacterium leprae*, Células de Schwann, macrófagos, polarização de MOs

ABSTRACT

Mycobacterium leprae (ML) infection stimulates dedifferentiation and proliferation of Schwann cells (SCs) that may contribute to the spread of the bacillus. Macrophages (MOs) are effector cells of the immune response that promote the elimination of pathogens, however, in leprosy they are colonized by ML. It is known that MOs can present a functional polarization in which M1 MOs show pro-inflammatory and microbicidal activities while M2 MOs act in tissue repair presenting an anti-inflammatory profile. SCs infected by ML produce mediators able to interfere with MOs function, increasing their survival and promoting their migration. Although different functional programs have been observed in MOs from patients with polar forms of leprosy, the influence of SCs in this process is not known. In this study we evaluated whether SCs infected with ML could interfere in the polarization of murine MOs derived from bone marrow. For this purpose, primary cultures of murine SCs were experimentally infected with viable bacilli and co-cultivated with MOs. Our results indicate that nitric oxide production was low in cultures of MOs after infection with the bacillus, but it was increased in the co-cultures of MOs and ML-infected SCs. The infection with ML did not induce significant production of IL-10, TNF and IL-6 in cultures of MOs and SCs, however, the interaction between MOs and ML infected-SCs resulted in increased production of cytokines, mainly IL-10, inducing a decrease in the TNF/IL-10 ratio. In addition, we observed a decrease in the expression of M1 markers (CD86 and iNOS) and an increase in the expression of the CD206, a marker of M2 MOs. In conclusion, ML infection of SCs is able to interfere with polarization of MOs resulting in a M2-like profile by inducing the occurrence of an anti-inflammatory environment.

Key words: *Mycobacterium leprae*, Schwann Cells, macrophages, macrophage polarization

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ARG - Arginase 1

BAAR - Bacilo álcool-ácido resistente

BSA - *Bovine serum albumin* (Albumina sérica bovina)

BB - *Borderline-borderline*

BL – *Borderline-lepromatous (Borderline-lepromatosa)*

BT – *Borderline-tuberculoid (Borderline-tuberculoide)*

CEUA-ILSL - Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Lauro de Souza Lima

DD - Hanseníase dimorfa-dimorfa

DT - Hanseníase dimorfa-tuberculóide

DV - Hanseníase dimorfa-virchowiana

DCs - *Dendritic cells* (células dendríticas)

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ensaio de imunoabsorção enzimática)

ENH – Eritema Nodoso Hansênico

GM-CSF - *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos)

IB - Índice baciloscópico

IFN- γ - Interferon-gama

IL-1 β - Interleucina-1 beta

IL-2 - Interleucina-2

IL-4 - Interleucina-4

IL-5 - Interleucina-5

IL-6 - Interleucina-6

IL-10 - Interleucina-10

IL-12 - Interleucina-12

IL-17 - Interleucina-17

IL-23 - Interleucina-23

iNOS – *Inducible nitric oxide synthase* (óxido nítrico sintase induzível)

LPS – Lipopolissacarídeo

LL – *Lepromatous lepromatous*

MB – Multibacilar

mg – Miligrama

MHC - *Major histocompatibility complex* (Complexo principal de histocompatibilidade)

ML- *Mycobacterium leprae*

mL – Mililitro

MOs - Macrófagos

M1 - Macrófagos M1 (classicamente ativados)

M2 - Macrófagos M2 (alternativamente ativados)

ng - Nanograma

NLRs - *NOD-like receptors* (receptores do tipo NOD)

NO – *Nitric Oxide* (Óxido Nítrico)

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAMPs - *Pathogen associated molecular patterns* (padrões moleculares associados à patógenos)

PBS - *Phosphate Buffered Saline* (Solução salina tamponada com fosfato)

PB – Paucibacilar

PGL-1 – Antígeno Glicolipídeo Fenólico-1

PQT- Poliquimioterapia

PRRs - *Pattern Recognition Receptors* (receptores de reconhecimento padrão)

RR – Reação Reversa

SBCAL - Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

SCs - *Schwann cells* (Células de Schwann)

SFB - Soro fetal bovino

SNC - Sistema nervoso central

SNP - Sistema nervoso periférico

TGF- *Transforming growth factor* (Fator de transformação do crescimento)

Th - Linfócitos *T helper* (linfócitos T auxiliares)

TLRs - *Toll-like receptors* (receptores do tipo Toll)

TNF- *Tumor necrosis factor* (Fator de necrose tumoral)

Tregs – *Regulatory T cells* (Células T regulatórias)

TT - Hanseníase tuberculóide-tuberculóide

VV - Hanseníase virchowiana-virchowiana

µg - Micrograma

µl - Microlitro

µm - Micrometro

µM – Micromolar

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
1.1. Hanseníase: perspectiva histórica e atual.....	14
1.2. Manifestações clínicas da hanseníase.....	16
1.3. Resposta imune na hanseníase.....	17
1.4. Macrófagos e seu papel na hanseníase.....	21
1.5. Estrutura do sistema nervoso periférico e dano neural na hanseníase.....	24
1.6. Envolvimento das células de Schwann na hanseníase.....	26
2.OBJETIVOS.....	27
2.1. Objetivo geral.....	27
2.2. Objetivos específicos.....	27
3. MANUSCRITO.....	28
3.1. Introdução.....	29
3.2. Material e Métodos.....	31
3.2.1. Delineamento experimental.....	31
3.2.2. Animais.....	31
3.2.3 Manutenção de ML e preparação de inóculo.....	31
3.2.4. Cultura de SCs.....	32
3.2.5. Infecção de SCs com ML.....	33
3.2.6. Cultura de MOs.....	33
3.2.7. Cocultura SCs + MOs.....	34
3.2.8. Imunofluorescência.....	34
3.2.9. Produção de Óxido Nítrico (NO).....	35
3.2.10. Dosagem de citocinas.....	35
3.2.11. Análise Estatística.....	35
3.3. Resultados.....	35
3.3.1. ML induz fraca produção de NO por MOs e SCs, mas coculturas de SCs + MOs infectadas por ML produzem NO.....	35
3.3.2. ML é um fraco ativador de MOs e SCs, no entanto, a interação entre MOs e SCs infectadas por ML induz um aumento na produção de citocinas, principalmente IL-10.....	36

3.3.3. A infecção por ML leva à diminuição da expressão de marcadores M1 (CD86 e iNOS) em coculturas de MOs e SCs infectados por ML.....	37
3.3.4. SCs infectadas por ML mostraram aumento da expressão de CD206 e ARG na fase inicial da infecção, enquanto coculturas de MOs e SCs infectadas por ML mostraram aumento da expressão de CD206.....	37
3.4. Discussão.....	38
3.5. Referências.....	40
Legendas das Figuras.....	44
Figuras.....	49
4. CONCLUSÃO.....	60
5. REFERÊNCIAS.....	60

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Hanseníase: perspectiva histórica e atual

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* (ML), parasita intracelular obrigatório, que possui predileção pela pele e nervos periféricos. Se manifesta principalmente por lesões cutâneas causando diminuição de sensibilidade térmica e tátil, podendo levar a atrofia e paralisia musculares que, se não diagnosticadas e tratadas adequadamente, podem evoluir para incapacidades físicas permanentes, perpetuando impactos negativos na vida cotidiana de seus portadores (1). A doença é conhecida desde os tempos bíblicos, onde era vinculada a castigos e punições divinas, acarretando aos seus portadores exclusão social e estigma, o qual é encontrado até os tempos atuais (2,3). Devido à falta de conhecimento sobre a fisiopatologia da doença, a hanseníase era confundida com outras dermatoses, por apresentar similaridades entre os sinais clínicos (4). Por existirem registros que descrevem as características clínicas da hanseníase como numerosas lesões de pele e dormência, acredita-se que esta seja originária da Ásia (5), sendo que outros autores também citam a África como berço da doença (6). Conhecida aproximadamente há quatro mil anos antes de Cristo (aC), também há relatos da doença na Índia, China, Japão (2), e com base em papiros da época de Ramsés II, a doença foi descrita no Egito (7).

Os primeiros casos da doença no Brasil foram reportados na cidade do Rio de Janeiro, por volta de 1600 da era cristã (2). Na década de 1930, como o contágio e o tratamento da hanseníase eram desconhecidos, a tentativa de contenção da doença era feita por meio do isolamento dos indivíduos doentes, dando origem aos leprosários, também conhecidos como asilos-colônia que, com o tempo, mostraram-se ineficientes quanto ao seu propósito e, por volta da década de 1950, deixaram de ser uma medida recomendada (8).

Identificado em 1873, por Gerhard Hansen (9), o ML é uma micobacteria patogênica de baixa virulência, a qual se apresenta na forma de bacilo reto ou levemente curvado, medindo 1-8 µm de comprimento por 0,3 µm de diâmetro (10). Pertence a ordem *Actinomycetales* e família *Mycobacteriaceae* e apresenta comportamento fortemente álcool-ácido resistente quando submetido à coloração de Ziehl-Neelsen, devido à alta concentração de lipídeos, especialmente ácidos micólicos em sua parede celular. Este bacilo apresenta replicação lenta, em torno de 13 dias, e pode se manter viável por até 24

horas em secreções fora do organismo humano. Se desenvolve idealmente em temperaturas inferiores a 37°C e por ser um parasita intracelular obrigatório, tem como principal alvo de infecção macrófagos (MOs) dermais e células de Schwann (SCs) (11). Embora o ML não seja cultivável *in vitro*, Shepard (1960) padronizou uma metodologia para obtenção de bacilos viáveis a partir da inoculação do bacilo em coxim plantar de camundongo. Esse protocolo conhecido como Técnica de Shepard possibilitou a obtenção de amostras bacilares em quantidade para estudo das propriedades metabólicas, antigênicas e de patogenicidade (11).

A transmissão exata da hanseníase é desconhecida. Acredita-se que o bacilo seja disseminado pelas vias respiratórias, através da secreção nasal de doentes multibacilares (MB) sem tratamento, para indivíduos susceptíveis que convivem com esses doentes (12). Existem ainda estudos que consideram a possibilidade de fontes de transmissão não humanas (13), como a transmissão zoonótica por tatus (*Dasypus novemcinctus.*) (14) e esquilos vermelhos (*Sciurus vulgaris*) (15) infectados pelo ML, cujo significado epidemiológico permanece obscuro.

Quando a doença não é tratada ou se há atraso no diagnóstico, pode ocorrer comprometimento dos nervos periféricos resultando em deformidades físicas e incapacidades permanentes (15). Com a finalidade de interromper a cadeia de transmissão e evitar a ocorrência de tais deformidades, responsáveis pelo estigma e elevada morbidade, as principais estratégias para combate da hanseníase na atualidade são o diagnóstico precoce e intervenções imediatas (16,17).

A fim de eliminar a hanseníase como um problema de saúde pública, desde 1980, a Organização Mundial da Saúde (OMS) instituiu o uso da poliquimioterapia (PQT), uma medida efetiva para controle da doença, que consiste na combinação de rifampicina, clofazemina e dapsona (18). A rifampicina tem efeito bactericida impedindo a síntese de RNA, enquanto a dapsona atua como droga bacteriostática por inibir a síntese de DNA e proteínas (19). A clofazimina possui ação bacteriostática e anti-inflamatória, embora seu mecanismo exato de atuação seja ainda desconhecido. Os medicamentos são distribuídos pelo Ministério da Saúde e fornecidos em cartelas individuais, que contêm a dose mensal supervisionada e as doses diárias autoadministradas (20). Embora o número de pacientes tenha decaído nas últimas décadas, principalmente pela adoção do tratamento poliquimioterápico, a detecção de novos casos permanece elevada (21). O Brasil ocupa o segundo lugar em números de casos da doença, ficando atrás apenas da Índia. Em 2017,

foram registrados mais de 210.000 mil casos no mundo, dos quais 26.875 ocorreram no Brasil, caracterizando a doença como um importante problema de saúde pública nacional (17).

1.2 Manifestações clínicas da hanseníase

Após contato com o ML, a resposta imune aliada ao *background* genético do hospedeiro são determinantes para a cura ou evolução da infecção para uma das formas clínicas sintomáticas (22), que podem ser localizadas ou disseminadas (23). Levando em consideração critérios clínicos, baciloscópicos e imunológicos, Ridley e Jopling (1966), propuseram uma classificação para as múltiplas manifestações da hanseníase. A doença foi dividida em 5 grupos, constituídos por duas formas polares, tuberculóide-tuberculóide (TT) ou *tuberculoid-tuberculoid* e virchowiana virchowiana (VV) ou *lepromatous lepromatous* (LL), e três formas instáveis da doença, dimorfa-tuberculóide (DT) ou *borderline-tuberculoid* (BT), hanseníase dimorfa-dimorfa (DD) ou *borderline-borderline* (BB) e dimorfa-virchowiana (DV) ou *borderline-lepromatous* (BL) (24).

A fase inicial é considerada como indeterminada e caracterizada por máculas hipocrômicas ou eritêmato-hipocrômicas com distúrbios de sensibilidade, podendo ocorrer queda de pelos no local. As lesões são pequenas, apresentando de 1 a 2 cm, e se localizam predominantemente na face, troncos e nádegas. Nesta fase da doença, não há comprometimento de troncos e nervos. O índice baciloscópico (IB) é negativo e a reação de Mitsuda (teste intradérmico que avalia a resposta granulomatosa do hospedeiro frente ao ML), pode ser positiva ou negativa. Dependendo das características imunológicas do paciente, as lesões podem desaparecer espontaneamente ou evoluir para outras formas da doença (25).

Na hanseníase TT, a resistência dos indivíduos resulta em poucas lesões dermatológicas, localizadas e bem delimitadas, não ultrapassando 10 cm de diâmetro. As lesões apresentam coloração castanha, com alterações sensitivas, anidrose e perda de pelos. Histologicamente, a reação imune dos pacientes tuberculóides apresenta-se sob a forma de granulomas de células epitelióides contornadas por linfócitos. O índice baciloscópico (IB) é sempre negativo e a reação de Mitsuda fortemente positiva (25,26).

Na forma VV, as infiltrações se tornam muito mais acentuadas podendo formar pápulas, nódulos, tubérculos e placas que são chamadas de hansenomas. O acometimento

dos nervos é intenso e a histopatologia das lesões revela a presença de MOs dermais que contém em seu meio intracelular grande quantidade de bacilos e micro colônias chamadas globias (27). Devido ao baixo grau de imunidade celular do paciente frente à micobactéria, a reação de Mitsuda é negativa e o IB altamente positivo nesses pacientes (25).

A hanseníase dimorfa, foi subdividida para classificar aqueles casos semelhantes ao polo tuberculóide, mas não tuberculóides, intermediários, e aqueles com características parecidas com os pacientes virchowianos, mas que se diferenciavam destes por critérios histopatológicos e imunológicos. Nos casos DD, as lesões apresentam contornos irregulares, placas cheias, com tonalidades ferruginosas, bem delimitadas, com a periferia bem infiltrada. O IB nesse grupo é sempre positivo e a reação de Mitsuda pode ser negativa ou fracamente positiva. Os pacientes com a forma DT se aproximam dos TT, porém, neles as lesões são maiores, em maior número, podendo haver abscessos de nervo (24). Os bacilos podem ser detectados em pequeno número e a reação de Mitsuda é positiva, mas menos intensa do que nos tuberculóides. Os DV se assemelham aos virchowianos, com grande quantidade de lesões com tendência à simetria e tonalidade mais castanha, com IB intensamente positivo e a reação de Mitsuda negativa (24).

Devido a necessidade de expansão da campanha de eliminação da hanseníase, foi proposta uma classificação simplificada e operacional baseada na contagem do número de lesões da pele, permitindo agrupar os pacientes em dois grupos: paucibacilares (PB): pacientes com baciloscopia negativa, até 5 lesões cutâneas e sem acometimento de nervos periféricos e, multibacilares (MB), pacientes com IB positivo, mais de 5 lesões ou acometimento de pelo menos um tronco nervoso (25). Os nervos mais frequentemente comprometidos na hanseníase MB são ulnar, mediano, fibular e tibial posterior (26).

1.3 Resposta imune na hanseníase

A grande maioria dos indivíduos são naturalmente resistentes à hanseníase, por apresentarem imunidade inata efetiva contra o ML. Porém, em uma pequena parte da população, considerada suscetível, a infecção pode evoluir para uma das formas clínicas sintomáticas (28).

Por apresentar mecanismos ativos de manipulação do sistema imune e por sua característica intracelular, o ML consegue se proteger de diversos artifícios

antimicrobianos do sistema imune como anticorpos e sistema complemento (27). A atuação do sistema imunológico tem sido dividida em resposta imune inata e resposta imune adaptativa que engloba as respostas celular e humoral. A resposta imune humoral, baseada na produção de anticorpos, é pouco eficiente na eliminação do bacilo, enquanto a resposta imune celular é capaz de controlar a proliferação do ML (29).

A imunidade inata atua imediatamente após o contato com o patógeno, impedindo que o microrganismo se dissemine. Essa primeira linha de defesa é composta por barreiras físicas e químicas, bem como células que possuem receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Dentre os PRRs estão os receptores do tipo Toll (TLRs), receptores do tipo NOD (NLRs) e receptores do tipo lectina C como o DC-SIGN e Dectina 1 (30). O TLR-2 é ativado por lipoproteínas do ML e a capacidade de iniciar a resposta protetora está diretamente relacionada com a secreção da interleucina 12 (IL-12) e a diferenciação de MOs e células dendríticas (DCs). Através do DC-SIGN, as DCs e os MOs podem reconhecer e internalizar o ML (31).

Por serem as principais células apresentadoras de antígenos, as DCs constituem um elo entre a imunidade inata e a adaptativa. Após a fagocitose dos antígenos, as DCs migram para os linfonodos e apresentam os antígenos ligados ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Durante a migração sofrem processo de maturação e nos linfonodos ativam linfócitos TCD4+, desencadeando a resposta imune específica, onde os linfócitos ativados produzem citocinas, que levam à expansão de clones antígeno-específicos e promovem a diferenciação de linfócitos T efetores e de memória. Linfócitos TCD4⁺ conhecidos como T *helper* (Th), antígeno-específicos, coordenam a resposta imune, ativando células efectoras como MOs e linfócitos T citotóxicos, o que resulta em respostas imunes celulares, bem como linfócitos B que produzem anticorpos e originam respostas imunes humorais (32). De acordo com a expressão de moléculas co-estimulatórias e produção de citocinas pelas DCs diferentes perfis de resposta imune podem ser ativados (33).

A citocina IL-12 produzida por DCs desencadeia a diferenciação de resposta imune do tipo Th1, com subsequente produção de IL-2 e IFN- γ , resultando na ativação de MOs. A ausência de IL-12, ou presença de IL-4, propicia o desenvolvimento de linfócitos do tipo Th2, que levam a produção de IL-10, estimulando a produção de anticorpos e inibindo a função macrófaga. Tanto a resposta Th1 como a resposta Th2 são importantes

na defesa do hospedeiro contra as infecções. A resposta Th1 está relacionada com a defesa contra protozoários, bactérias intracelulares e vírus, enquanto a resposta Th2 é mais efetiva contra os helmintos e bactérias extracelulares (34).

A resposta imune celular do tipo Th1 é a eficaz na eliminação do bacilo da hanseníase (31). Em pacientes TT, a resposta imune celular com padrão de citocinas Th1 é intensa; o ML é fagocitado por MOs que após o processamento antigênico apresentam peptídeos do bacilo aos linfócitos, e estes por sua vez ativam mecanismos microbicidas dos MOs (25,35,36). Devido a eficácia da imunidade celular e a produção de citocinas como IL-2, fator de necrose tumoral (TNF, anteriormente conhecido como TNF-alfa (37)) e interferon-gama (IFN- γ) a proliferação bacilar é controlada, podendo haver inclusive a eliminação do total do bacilo (38,39).

Na hanseníase VV as lesões traduzem-se por um infiltrado histiocitário rico em bacilos e pequena quantidade de linfócitos, ocorrendo predomínio de citocinas do perfil Th2, incluindo IL-4, IL-5 e IL-10. Devido à ausência de uma resposta imune celular eficiente contra o ML, ocorre multiplicação e disseminação dos bacilos, pois, os MOs não conseguem processá-los de maneira eficiente (25,26). Assim, o ML se propaga para os ramos nervosos, endotélio vascular, parede muscular de vasos sanguíneos e células epiteliais.

Em pacientes com a forma DT o perfil de citocinas é predominantemente do tipo Th1 (40,41). A expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), responsável pela produção das espécies reativas de nitrogênio, e a produção de IFN- γ são maiores em comparação com os pacientes DV (41), nos quais o perfil de citocinas, assim como observado nos pacientes VV, tende ao padrão Th2 (40,41).

No decorrer da hanseníase, antes, durante ou após o tratamento, os pacientes podem apresentar reações imunológicas exacerbadas, denominadas reações hansênicas, que estão diretamente ligadas à resposta imune do indivíduo (27,42,43). Tais estados reacionais são classificados como, Reação Tipo 1, também conhecida como Reação Reversa (RR) e Reação do Tipo 2, também denominada de Eritema Nodoso Hansênico (ENH) (25). Na RR, mais frequentemente observada em pacientes TT, BT e BB, existe um aumento abrupto da resposta imune celular com o reaparecimento de lesões antigas e surgimento de novas lesões e hipersensibilidade aos antígenos do ML. Ocorre uma elevação na resposta linfocitária frente aos antígenos bacilares, bem como um aumento

de linfócitos TCD4+ nas lesões, em quantidade absoluta e relativa. Observa-se também uma elevação de citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-2, IL-12, IFN- γ e TNF e redução nas citocinas do perfil Th2 como IL-4, IL-5 e IL-10 (31).

Em pacientes com as formas DV e VV que apresentam fraca imunidade celular, presença de grande quantidade de anticorpos e elevada carga bacilar, ocorre com maior frequência o ENH, caracterizado pela deposição de imunocomplexos e ativação do sistema complemento que resulta em reação inflamatória sistêmica, com presença de pápulas ou nódulos eritematosos, febre, dores nas articulações, edema das mãos, pés e face, proteinúria, podendo ocorrer vasculite com edema intersticial e comprometimento de outros órgãos como por exemplo, fígado, baço, testículos, olhos entre outros. Essa reação acomete cerca de 50% dos indivíduos VV e 5-10% dos pacientes DV. Observa-se ainda uma elevação das citocinas IFN- γ , TNF e IL-12, assim como maior expressão de IL-6 nas lesões (31,44).

Apesar da dicotomia Th1/Th2 estar bem descrita na hanseníase (45), este paradigma bipolar tem sido reformulado em função do reconhecimento de novos subtipos de linfócitos T, entre eles os linfócitos Th17, Th22, Th9 e T regulatórios (Treg).

As DCs podem favorecer a diferenciação dos linfócitos Th17 produzindo citocinas como fator de transformação do crescimento β 1 (TGF- β 1), IL-6, IL-1 β (46). Esta subpopulação que possui atividade pró-inflamatória tem como fator de transcrição ROR γ t (47,48) e exerce papel protetor contra o ML uma vez que a principal citocina secretada por estas células é a IL-17A, potente indutora da inflamação em MOs e células endoteliais, induzindo à infiltração celular e produção de outras citocinas como IL-6 e IL-8. Essa citocina é mais expressa em culturas de PBMCs estimuladas com antígenos do ML e em amostras de pele de pessoas saudáveis contactantes de pacientes hansenianos e pacientes com a forma TT da doença em comparação com pacientes virchowianos (49). A menor expressão de IL-17 em amostras derivadas de pacientes MB foi confirmada por Almeida-Neto et al. (2015) (50) e Santos et al. (2017)(51); por outro lado durante o episódio de ENH os pacientes MB apresentam níveis elevados desta citocina (52), corroborando um possível papel da IL-17 na resposta contra o ML. Apesar do possível papel protetor, a IL-17 tem sido associada com o dano neural na hanseníase (53).

Por outro lado, quando DCs são tratadas com vitamina D, a produção de TNF, IL-6 e IL-23 aumenta, contribuindo para a polarização de linfócitos com perfil Th22 (54).

Linfócitos Th22 secretam citocinas como IL-22, TNF, IL-13 e IL-26, porém não produzem IL-17, IFN- γ ou IL-4 (55). Em presença de citocinas pró-inflamatórias como TNF e IL-6, essas células se diferenciam e atuam nas barreiras epiteliais contribuindo para cicatrização e ativando a resposta imune inata (56). Embora a IL-22 também possa ser produzida por outras subpopulações de linfócitos, na hanseníase essa citocina tem papel importante na participação nos mecanismos de maturação do fagolisossomo, sendo mais abundante em lesões de pele em pacientes com a forma VV da doença (49).

Th9 é outra subpopulação de linfócitos descrita recentemente cuja diferenciação depende de IL-4 e TGF- β 1. Linfócitos Th9 produzem grandes quantidades de IL-9 e IL-21 e estimulam respostas imunes humorais. Na hanseníase foi visto que a IL-9 foi mais expressa em lesões de pacientes TT em comparação com lesões de pacientes VV. Os linfócitos Th9 podem estar envolvidos na resposta ao ML, regulando positivamente ou negativamente a atividade microbicida no local da lesão a depender do meio de citocinas presente (57).

Os linfócitos Treg podem se diferenciar na periferia a partir de linfócitos T CD4⁺ e são conhecidos por controlar a ativação da resposta inflamatória por meio da secreção de citocinas inibitórias como o TGF- β 1 e IL-10 (58). O TGF- β 1, tem importante papel em doenças causadas por microorganismos intracelulares, como *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Lacazia loboi*, e micobactérias, uma vez que suprime a ativação de MOs (59). IL-10 exerce papel imunorregulatório sobre o perfil de resposta Th1, inibindo as citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF, IL-1 β e IL-6, produzidas por MOs e monócitos ativados, estimulando a produção endógena de citocinas anti-inflamatórias (60). Na hanseníase, a produção de TGF- β 1 e IL-10 tem um importante papel na homeostasia tecidual e controle da resposta imune, porém contribui com a sobrevivência do bacilo nas lesões (61). Os linfócitos Treg parecem estar associadas com a forma VV da doença (62–64).

1.4 Macrófagos e seu papel na hanseníase

Os MOs se originam a partir de monócitos e se diferenciam nos tecidos periféricos. Estão entre os poucos tipos celulares capazes de apresentar antígenos através do MHC de classe II a células TCD4⁺. São as principais células fagocíticas do sistema imune

englobando partículas e microrganismos em fagossomos, os quais sofrem maturação e fusão com lisossomos para lise dos patógenos. Dentre suas funções, os MOs também atuam na resolução de processos inflamatórios e remodelamento tecidual, representando uma população celular altamente heterogênea, o que se reflete tanto em seus aspectos morfológicos e fenotípicos, como metabólicos e funcionais (65).

No decorrer das respostas imunes os MOs exercem importante atividade microbicida, sendo essenciais para o controle de infecções. Sua ativação ocorre após o reconhecimento de componentes microbianos, chamados de PAMPs, como o lipopolissacarídeo (LPS), por meio de receptores específicos; ou pela ação de citocinas, como IFN- γ e IL-6. Quando ativadas, essas células aumentam sua capacidade de fagocitose e a produção de mediadores inflamatórios, o que culmina no aumento da capacidade microbicida contra patógenos (66).

Na hanseníase, o ML é rapidamente fagocitado por MOs, possivelmente por meio de receptores do tipo lectina-C como CD209 e receptor de manose, bem como, receptores do sistema complemento (67). Entretanto, o bacilo é capaz de impedir a fusão entre fagossomos e lisossomos (68,69) e pode se evadir dos fagossomos (70,71) o que possibilita sua sobrevivência no interior desta célula, protegido de mecanismos microbicidas como anticorpos e sistema complemento. Afora isso, o ML induz um desbalanço na produção de citocinas com elevados níveis de citocinas inibitórias como CCL-2 e baixos níveis de citocinas pró-inflamatórias, aliado a supressão da produção de IL-6 em monócitos de indivíduos (72).

Os MOs possuem mecanismos microbicidas que são empregados para a eliminação do bacilo, dentre eles produzem reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio que são eficazes para a eliminação de patógenos em um procedimento denominado de *burst oxidativo*. Todavia, a fagocitose do ML não acarreta um intenso *burst oxidativo* (73), o que provavelmente se deve a neutralização de ânions superóxido pelo glicolipídio fenólico I (PGL-I) presente na parede do bacilo (74), ou em função da atuação da enzima superóxido dismutase, cujo gene foi descrito no bacilo (75). A produção de NO aparenta ser eficaz para a inibição do metabolismo do bacilo em MOs murinos (76).

Os MOs dos pacientes TT sofrem transformação completa em células epitelióides, sendo capazes de eliminar o ML. O mesmo não ocorre com os pacientes VV (77,78), nos

quais os MOs comportam um grande número de bacilos viáveis ou mortos, sugerindo que seus mecanismos de eliminação são menos eficientes (79). Montoya *et al.* (80) relataram um modelo de ativação macrofágica no qual a presença de IL-10 acarreta a diferenciação de MOs com maior capacidade fagocítica e expressão de receptores do tipo *scavenger* e CD209, resultando em maior fagocitose de micobactérias e lipídeos endógenos. De outro modo, a IL-15 implica na ativação da via antimicrobiana dependente da vitamina D com produção de catalepsina e maior poder microbicida, a despeito de uma menor capacidade de fagocitose. Esses padrões foram identificados nas lesões de pacientes hansenianos, sendo o programa fagocítico verificado na hanseníase virchowiana e a via microbicida dependente de vitamina D encontrada nas lesões de pacientes tuberculóides, sugerindo que as citocinas produzidas na fase inata da imunidade determinam o padrão de resposta macrofágico que influencia na patogênese da hanseníase (77).

Dependendo da interação do microambiente e dos microrganismos, os MOs podem se diferenciar em várias subpopulações. Apesar das dificuldades existentes para a definição e categorização desses subtipos de MOs, a sua importância para o funcionamento do sistema imune é absolutamente reconhecida (81). Atualmente sabe-se que existem ao menos duas populações de MOs classificados como M1 (classicamente ativados), com perfil microbicidas e pró-inflamatórias e MOs M2 (alternativamente ativados), com perfil anti-inflamatório e de reparação tecidual (82–84).

Em infecções nas quais predominam PAMPs que ativam resposta Th1, e na presença de citocinas inflamatórias como o IFN- γ , os MOs se diferenciam em M1, com alta capacidade microbicida e inflamatória. Essas células expressam níveis elevados de CD80, CD86, iNOS, e produzem grandes quantidades de IL-12, IL-1 β e TNF (85,86). A ativação dos MOs leva a uma expressão aumentada da enzima iNOS, que resulta na produção de óxido nítrico (NO), o qual possui alta atividade microbicida contra patógenos intracelulares (87). Nesse sentido, na hanseníase foi visto que os pacientes tuberculóides expressaram maiores níveis de iNOS do que os virchowianos o que sugere sua efetividade no controle da multiplicação bacilar (88).

Após a eliminação do patógeno, MOs com perfil M2 são determinantes para a resolução do processo inflamatório e remodelação tecidual. Por outro lado, quando esse perfil se desenvolve durante um processo infeccioso onde a resposta Th1 é fraca ou em um microambiente onde predominam PAMPs que ativam respostas Th2 e em presença

de IL-4 e IL-13, esses MOs apresentam fraco poder microbicida e contribuem para a persistência do patógeno. MOs M2 expressam altos níveis de IL-10, TGF- β 1, CD206 (85,86) e da enzima arginase 1 (ARG). ARG metaboliza a arginina em ornitina e ureia, limitando a disponibilidade de arginina para a síntese de NO enquanto a ornitina é precursora das poliaminas necessárias para a proliferação celular e formação de colágeno para a construção da matriz extracelular (89,90), tendo importante papel no processo de reparo tecidual.

O programa de polarização M1 está associado a doenças infecciosas agudas, infecções gastrointestinais e tuberculose ativa, exercendo importante função no controle de várias infecções bacterianas (91), enquanto M2 pode ser desencadeado por alguns patógenos com mecanismo de escape, principalmente em infecções causadas por parasitas, como vermes (92), e em tumores malignos (93). De acordo com Mantovani e colaboradores os MOs da subpopulação M2 podem assumir três perfis funcionais distintos dependendo do microambiente, podendo ser classificados como M2a, M2b e M2c. MOs M2a são induzidos pelas citocinas IL-4 e IL-13 e atuam no controle de infecções helmínticas. Na presença de agonistas de TLR ou IL-1R se diferenciam em M2b, produzindo alto níveis de IL-10 podendo preservar a capacidade de secretar NO e ativar células T naïve sem a secreção de IL-12. MOs M2a-b exercem funções imunorreguladoras, enquanto os MOs M2c (induzidos por IL-10 e hormônios glicocorticoides) estão relacionados à supressão da resposta imune e remodelação tecidual (94).

1.5 Estrutura do sistema nervoso periférico e dano neural na hanseníase

O tecido nervoso encontra-se distribuído pelo organismo, mas está interligado, resultando no sistema nervoso. Além de processar as informações e elaborar respostas que podem resultar em ações, o tecido nervoso forma órgãos como o encéfalo e a medula espinal, que compõem o sistema nervoso central (SNC). O sistema nervoso periférico (SNP) é constituído por gânglios e nervos, com a função de conectar o SNC às demais partes do corpo humano (95). Os gânglios nervosos são formados por aglomerados de corpos celulares de neurônios sensitivos que podem aparecer como pequenas dilatações em alguns nervos. Os nervos são constituídos por feixes de fibras nervosas envoltas por uma capa de tecido conjuntivo, dispostos paralelamente, que podem ser considerados

como: sensitivos quando conduzem impulsos dos órgãos sensitivos para o SNC (fibras aferentes); motores quando levam impulsos produzidos do SNC até os músculos ou glândulas (fibras eferentes); e mistos quando contêm tanto fibras sensitivas quanto motoras, sendo que na maioria dos nervos periféricos adultos, as fibras podem ser mielinizadas ou não mielinizadas (96,97).

Cada fibra nervosa é composta por axônios, que são envoltos pelas células de Schwann (SCs) e pelo endoneuro, uma delicada camada composta por tecido conjuntivo frouxo, além de outros tipos celulares, como fibroblastos e pericitos, podendo ainda ser encontrados mastócitos e MOs. Os feixes ou fascículos são agrupamentos de fibras nervosas que são contornados pelo perineuro, um invólucro mecanicamente resistente, constituído por várias camadas de fibroblastos modificados. Entre as células há fibrilas colágenas e elásticas esparsas. Ligam-se por junções de oclusão, o que protege os axônios de agentes nocivos e de mudanças bruscas na composição iônica. Mais externamente, revestindo grupos de feixes nervosos, encontra-se o epineuro, composto por tecido conjuntivo denso não modelado, tecido adiposo e vasos sanguíneos, podendo incluir células adiposas e a artéria muscular principal, que irriga o tronco nervoso (98). A integridade das fibras nervosas no SNP é mantida pela adesão ou ligação da lâmina basal às SCs (99). A agressão, pelo ML, na matriz extracelular, provoca um rompimento entre a lâmina basal e a SCs, provocando alterações nas funções fisiológicas e neuronais (100).

O comprometimento dos nervos periféricos na hanseníase está presente em todas as formas clínicas e o aparecimento das manifestações neuropáticas pode ocorrer muito tempo após a infecção, sendo que este período pré-clínico (período de incubação) é de aproximadamente cinco anos, mas pode ultrapassar 10 anos (101). A lesão neural nos indivíduos afetados é relevante, visto que, as incapacidades irreversíveis e deficiências apresentadas por portadores da doença, geram grande impacto social e psicológico que reduz a qualidade de vida dos pacientes (102). Tais lesões estão relacionadas com a resposta imune do indivíduo, e podem afetar as fibras do sistema nervoso periférico sensitivo, motor e autônomo (100).

Na hanseníase existe um padrão de neuropatia característico da doença. Uma vez que há o comprometimento de terminações nervosas da derme nos estágios iniciais da infecção, posteriormente, troncos nervosos situados em topografias mais superficiais e regiões mais frias são afetados (101). A forma clínica TT, devido à intensa imunidade

celular, pode apresentar lesões intensas e mais precoces, no entanto, o número de troncos nervosos acometidos é menor. Na forma VV devido à imunidade celular diminuída, há extensa disseminação dos bacilos e as lesões de troncos nervosos são numerosas, porém, o dano neural é lento e progressivo (103).

1.6 Envolvimento das células de Schwann na hanseníase

Embora as células da glia, entre elas as SCs, tenham sido consideradas historicamente meros suportes do sistema nervoso hoje se sabe que desempenham importante papel na atividade neural e na defesa contra patógenos, em conjunto com neurônios do sistema nervoso central e periférico. Todos os neurônios do sistema nervoso periférico estão intimamente ligados às SCs que desempenham outras funções além da mielinização. As SCs também interagem com outras células fora do sistema nervoso como células do sistema imune através da expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) I e II. Em situações de lesão neural as SCs tem um papel importante produzindo fatores neurotróficos, citocinas, matriz extracelular e moléculas de adesão que contribuem para a regeneração. Assim, as SCs interagem com o sistema imune contribuindo para o início e término das respostas imunes no sistema nervoso periférico (104).

O ML, apresenta tropismo pelo sistema nervoso periférico, infectando as SCs e, eventualmente, células endoteliais (105), o que resulta em lesões cutâneas polimórficas, compostas por infiltrado granulomatoso variável de acordo com a forma clínica da doença (106). Embora pouco virulento, o ML é dotado de mecanismos de sobrevivência peculiares, como a habilidade de induzir desdiferenciação e aumento na capacidade proliferativa das SCs, que passam a exibir propriedades similares às células progenitoras. Este efeito é favorável à sobrevivência de ambos, parasita e célula hospedeira, porém desfavorável à preservação axonal e à produção e manutenção da bainha de mielina, elemento funcional indispensável aos nervos periféricos (107).

A desmielinização e a degeneração neural resultam não só da interação entre o ML e as SCs, mas também da resposta imune do hospedeiro. As SCs expressam DC-SIGN (CD209), um receptor capaz de reconhecer o ML e promover a fagocitose do bacilo (108) e podem apresentar antígenos do bacilo via moléculas de MHC de classe II ativando

a proliferação de linfócitos T *in vitro* (109,110). Além disso, podem sofrer lise mediada por linfócitos T citotóxicos (110,111).

O contato com o ML leva as SCs adultas murinas à expressão de vários genes ligados à resposta imune (112,113). São produzidas várias quimiocinas, em especial MCP-1 (CCL2), CXCL10, CXCL1, SDF-1 (CXCL12) e MIP-2 (CXCL2), e citocinas como IL-6, TNF e IFN- γ , além de fatores de crescimento como o M-CSF (115). Esses mediadores atraem os MOs em ensaios de migração, diminuem sua taxa de apoptose e aumentam seu tempo de vida. Além disso, após infecção por ML as SCs sofrem reprogramação e alterações epigenéticas que as tornam células altamente imunomoduladoras, podendo contribuir com a disseminação do bacilo por meio da diferenciação direta dos tecidos mesenquimais, incluindo músculos esqueléticos e lisos, e formação de estruturas similares a granuloma onde as SCs são capazes de transferir ML para os MOs, que subsequente são liberados no organismo carregados de bacilos (107).

Considerando-se que ocorre interação entre MOs e SCs infectadas pelo ML (107) e estas produzem mediadores capazes de atuar sobre os MOs, neste estudo avaliamos *in vitro* o perfil de MOs cocultivados com SCs infectadas experimentalmente com o ML.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a influência de SCs infectadas com ML na polarização de MOs na subpopulações M1 e M2.

2.2. Objetivos Específicos

Avaliar a expressão de marcadores característicos da subpopulações M1 (CD86 e iNOS) e M2 (CD206 e ARG) em MOs murinos cultivados com SCs infectadas experimentalmente com ML.

Avaliar a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias em coculturas de MOs murinos com SCs infectadas experimentalmente com ML.

3. MANUSCRITO

CÉLULAS DE SCHWANN INFECTADAS POR *MYCOBACTERIUM LEPRAE* INDUZEM A POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS PARA UM PERFIL M2-LIKE

BRUNA BEATRIZ GIMENEZ CARRA^{a,b}, MARIANE BERTOLUCCI CASALENOVO^{a,b}, GIOVANNA VALLE GERMANO^{a,b}, ADRIANA SIERRA ASSENCIO ALMEIDA BARBOSA^b, BÁRBARA CASELLA AMORIM^a, JAMES VENTURINI^{a,c}, DANIELE BERTOLUCI^{a,b}, PATRÍCIA SAMMARCO ROSA^b, MARIA RENATA SALES NOGUEIRA^{a,b}, VÂNIA NIETO BRITO DE SOUZA^{a,b}

^aFaculdade de Medicina de Botucatu, FMB, UNESP-Botucatu, São Paulo, Brasil; ^b Instituto Lauro de Souza Lima, ILSL-Bauru, São Paulo, Brasil; ^c Faculdade de Medicina, FAMED, UFMS – Mato Grosso do Sul, Brasil

RESUMO

A infecção de células de Schwann (SCs) com *Mycobacterium leprae* (ML) leva a alterações funcionais que podem contribuir para a persistência do bacilo. Coculturas de SCs infectadas com ML e macrófagos (MOs) apresentaram aumento na produção de NO e citocinas, especialmente IL-10. Aliado a isso, verificamos diminuição na expressão de marcadores M1 (CD86 e iNOS) e aumento na expressão do marcador CD206 característico de MOs com perfil M2. Em conclusão, a infecção de SCs pelo ML é capaz de interferir com a polarização funcional de MOs induzindo a ocorrência de um ambiente anti-inflamatório.

Palavras-chave: *Mycobacterium leprae*, células de Schwann, Macrófagos, polarização de macrófagos

3.1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* (ML) que infecta células de Schwann (SCs) e macrófagos (MOs) (SCOLLARD et al., 2015) na pele e nervos periféricos, o que pode resultar em incapacidades físicas permanentes (REIBEL et al., 2015). Apesar da prevalência da doença ter sido reduzida após estabelecimento da poliquimioterapia (PQT), em 2017 foram diagnosticados mais de 210 mil casos novos no mundo (WHO, 2018).

As manifestações clínicas variam de acordo com a resposta imune do hospedeiro (RIDLEY e JOPLING, 1966). Pacientes tuberculóides-tuberculoides (TT) apresentam poucas lesões com uma baixa carga bacilar resultante da resposta predominantemente celular com produção de interleucina (IL)-2 e interferon-gama (IFN- γ) (MONTROYA e MODLIN, 2010; SIELING PA, 1994). Já os pacientes virchowianos-virchowianos (VV) apresentam numerosas lesões carregadas de bacilos com padrão de resposta de perfil Th2 caracterizado pela produção de interleucina 10 (IL-10) e interleucina 4 (IL-4) (ARNOLDI et al., 1990; MOURA et al., 2007; SIELING, 1994). Entre as duas formas polares da hanseníase (TT e VV) existem as formas intermediárias chamadas de dimorfas, caracterizadas pela instabilidade imunológica (RIDLEY e JOPLING, 1966).

MOs são as principais células fagocíticas do sistema imune e exercem importante atividade microbicida, sendo essenciais para o controle da infecção. Entretanto, em pacientes virchowianos estas células falham em eliminar o patógeno tornando-se um reservatório para a proliferação do bacilo (SCOLLARD et al., 2006). MOs podem se diferenciar em dois tipos distintos, dependendo, primordialmente, do microambiente e da interação com patógenos. MOs classicamente ativados (M1), com perfil microbicida e pró-inflamatório, exibem elevada expressão de moléculas como CD80, CD86, óxido nítrico sintase induzível (iNOS), e produzem IL-12, interleucina 1 beta (IL-1 β) e fator de necrose tumoral (TNF) (GORDON e MARTINEZ, 2010; LOPES, 2013) apresentando uma resposta eficaz contra patógenos intracelulares (MURRAY, 2012). MOs alternativamente ativados (M2), são determinantes para a resolução do processo inflamatório e remodelação tecidual (MONTROYA e MODLIN, 2010). Esse perfil se desenvolve em um microambiente com o perfil Th2 predominante, contendo IL-4 e interleucina 13 (IL-13), possuem fraco poder microbicida, contribuindo para a persistência de patógenos. Além disso, MOs M2 produzem altos níveis de IL-10, fator de transformação do crescimento beta 1 (TGF- β 1), CD206 (GORDON e MARTINEZ, 2010; LOPES, 2013) e de arginase 1 (ARG) que metaboliza a arginina em ornitina e ureia, limitando a disponibilidade de arginina para a síntese de óxido nítrico (NO) (MILLS et al., 2014).

O ML possui mecanismos peculiares de sobrevivência no hospedeiro podendo causar desdiferenciação e aumento na proliferação das SCs o que contribui para a desmielinização e degeneração neural. (MASAKI et al., 2013, 2014). SCs infectadas por ML produzem várias quimiocinas, em especial MCP-1 (CCL2), CXCL10, CXCL1, SDF-1 (CXCL12) e MIP-2 (CXCL2), e citocinas como IL-6, TNF e IFN- γ , além de fatores de crescimento como o M-CSF responsáveis por atrair MOs e aumentar sua sobrevivência (MASAKI et al., 2013). Além disso, as SCs também tem a capacidade de transferir bacilos para os MOs tanto *in vivo* quanto *in vitro*, o que contribui para sua disseminação (MASAKI et al., 2013).

Embora diferentes programas funcionais tenham sido observados em MOs de pacientes com hanseníase (SCOLLARD et al., 2006; KIM et al., 2018), a influência de SCs no processo de diferenciação desses subtipos de MOs não é sabida. Assim, neste estudo avaliamos se SCs infectadas pelo ML podem interferir na polarização de MOs.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Delineamento experimental

Para uma melhor compreensão da influência de SCs infectados por ML na polarização de MOs para subpopulações M1 e M2, MOs murinos foram diferenciados dos precursores da medula óssea e cultivados por 48 horas com SCs previamente infectados com ML (MOI 100:1) após 2 (T2) ou 9 (T9) dias de infecção (Figura 1).

3.2.2. Animais

Os camundongos utilizados nesse estudo foram mantidos em microisoladores (5 animais/microisolador) em racks ventiladas com condições specific pathogen free (SPF), em ambiente com temperatura de 20 a 24°C e fotoperíodo (ciclos 12hs claro/12hs escuro) controlados e água e ração *ad libitum*. Camundongos *nude* atímicos (NU-*Foxn1^{mu}*) foram utilizados para a obtenção de bacilos viáveis. Para o estudo da interação entre MOs e SCs *in vitro* foram empregados camundongos da linhagem *BALB/c*: nervos ciáticos foram coletados para a obtenção de SCs e a partir do fêmur e da tíbia foram obtidas células precursoras da medula óssea para diferenciação em MOs. Todos os animais empregados no estudo foram provenientes do Biotério do Instituto Lauro de Souza Lima/SES, Bauru/SP. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais do Instituto Lauro de Souza Lima (Protocolo nº 002/16) e todos os procedimentos realizados seguiram os Princípios Éticos em Experimentação Animal, recomendados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.2.3. Manutenção de ML e preparação de inóculo

Os bacilos utilizados neste estudo foram obtidos a partir de passagens séricas de ML (cepa Thai-53, gentilmente cedida pelo Dr. Yuji Yamamoto, NIH, Japão) em coxins plantares de camundongos atímicos *nude*, de acordo com o protocolo descrito previamente (TROMBONE et al., 2014). Resumidamente, camundongos foram inoculados com 3×10^6 bacilos/30 µl de solução salina em cada pata traseira. Após

aproximadamente 4 a 5 meses, os camundongos foram eutanasiados e a suspensão bacilar foi preparada seguindo um protocolo para dissecação, isolamento tecidual e digestão, seguido de purificação e avaliação da viabilidade do ML (TROMBONE et al., 2014).

3.2.4. Cultura de SCs

SCs foram obtidas conforme previamente descrito (PÄIVÄLÄINEN et al., 2008; TAO, 2013). Brevemente, nervos ciáticos foram coletados de camundongos BALB/c com 7 a 8 semanas, destacados do epineuro e fragmentados. Os nervos então foram submetidos a uma pré-digestão com 0.125% de tripsina e 0.05% de colagenase A, a 37°C. Depois de 30 minutos, a solução foi centrifugada, o sobrenadante descartado e o sedimento resuspenso em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM-High glucose, Gibco®; Waltham, EUA) com 10% de soro fetal bovino (SFB, Sigma-Aldrich; St. Louis, EUA).

Os fragmentos foram mantidos em DMEM-Hg/SFB 10% contendo mitógenos (heregulina $\beta 1$ 10ng/mL; forskolina 2 μ M (Sigma-Aldrich; St. Louis, EUA) e antibióticos (penicilina/estreptomicina 1% (Gibco®; Waltham, EUA)), por sete dias, em incubadora de CO₂, a 37°C. Os explantes foram então centrifugados, ressuspenso em solução para digestão contendo DMEM-Hg, penicilina/estreptomicina 1%, colagenase tipo I 0.5 mg/mL e dispase II 2.5 mg/mL (Gibco®; Waltham, EUA) e mantidos em incubadora de CO₂ por 24 horas. Ao final do período, o tecido digerido foi homogeneizado empregando-se agulhas graduadas (21G e 23G). O número de células foi estimado por contagem em câmara de Neubauer empregando-se Azul de Trypan. SCs foram cultivadas em meio completo (DMEM-Hg/SFB 10%, penicilina/estreptomicina 1%, L-glutamina (Sigma-Aldrich; St. Louis, EUA), heregulina $\beta 1$, forskolina e FgF β (*fibroblast growth factor*)), sobre lamínulas redondas estéreis (13 mm) pré-tratadas com laminina 20 μ g/mL (Sigma-Aldrich; St. Louis, EUA) em placas de 24 poços. SCs foram empregadas em duas situações distintas: em cultura de SCs (5 x 10⁴ SCs/poço) e em cocultura de SCs e MOs (SCs + MOs) (2,5 x 10⁴ SCs/poço).

3.2.5. Infecção de SCs com ML

Baseado nos estudos de Hagge et al. (HAGGE et al., 2002), SCs foram expostas ao ML na multiplicidade de infecção (MOI) de 100 bacilos/célula (MOI= 100:1) por um período de 2 dias, após o qual as SCs foram consideradas infectadas e lavadas para remoção de bacilos não internalizados. As SCs foram avaliadas neste período (T2) e 9 dias após a infecção (T9). Como controle positivo SCs foram estimuladas com LPS (1 ug/ml) e como controle negativo foram mantidas sem qualquer estímulo pelo mesmo tempo. O sobrenadante foi coletado para dosagem de NO e avaliação de citocinas. Células aderidas em lamínulas foram fixadas com paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich; St. Louis, EUA), por 30 minutos em temperatura ambiente e lavadas em PBS.

3.2.6. Cultura de MOs

MOs foram obtidos a partir de precursores de medula óssea e diferenciados usando meio condicionado derivado de cultura celular da linhagem de fibroblastos murinos L929. Em resumo, o fêmur e a tíbia de camundongos Balb/c foram coletados, seccionados e centrifugados. O conteúdo da medula óssea foi coletado e a concentração celular ajustada para $2,5 \times 10^7$ células/frasco de 75 cm². A cultura foi mantida em meio RPMI suplementado com 20% do meio condicionado por cinco dias, em incubadora de CO₂, a 37°C, para diferenciação em MOs. O meio foi removido e as células foram tripsinizadas, centrifugadas, ressuspensas em meio DMEM-Hg/FBS 10% e contadas utilizando Vermelho Neutro. A diferenciação foi confirmada pela expressão de F4/80 e MOs foram plaqueados em duas situações distintas: cultura de MOs e cocultura de SCs + MOs.

Para cultura de MOs, 5×10^4 células foram semeadas em lamínulas redondas estéreis (13 mm) e incubadas por 30 minutos em incubadora de CO₂ a 5%. Em seguida, os MOs foram infectados por ML na multiplicidade de infecção de 20 bacilos/MOs (MOI=20:1) ou estimulados com LPS (1 ug/ml). Após 48 horas em cultura, o sobrenadante foi coletado para avaliação do NO e citocinas. As células aderidas foram fixadas com paraformaldeído 4%.

3.2.7. Cocultura SCs + MOs

Para avaliar os efeitos da interação de SCs e MOs infectados por ML, as SCs isoladas de nervos ciáticos murinos foram infectadas com ML a uma MOI de 100:1 (bacilos:SCs) enquanto, em paralelo, os MOs foram diferenciados a partir de precursores de medula óssea conforme sumarizado na Figura 1. A proporção de MOs e SCs na cocultura foi estabelecida em 1:1 ($2,5 \times 10^4$ MOs: $2,5 \times 10^4$ SCs). Quatro diferentes condições experimentais de SCs foram utilizadas: (i) SCs 2 dias pós-infecção por ML (SC + ML (T2) + MOs); (ii) SCs não infectadas cultivadas pelo mesmo período (SC (T2) + MOs); (iii) SCs 9 dias pós-infecção por ML (SC + ML (T9) + MOs); e (iv) não infectadas (SC (T9) + MOs). As coculturas foram mantidas em incubadora de CO₂, a 37°C, por 48 horas.

3.2.8. Imunofluorescência

A expressão dos marcadores CD86, iNOS, CD206 e ARG foi avaliada em MOs e SCs isolados e coculturas de SCs + MOs. As células foram permeabilizadas com PBS/Triton X-100 0,25%, por 10 minutos e lavadas em PBS. O bloqueio de ligações não específicas com 1% de albumina sérica bovina (BSA), 10% de soro normal de cabra e 22,52 mg/mL de glicina durante 40 minutos foi então realizado.

As amostras foram incubadas durante a noite com anticorpos. O anticorpo anti-S100 β (Sigma; Clone SHB1. Missouri, EUA) foi usado para identificação de SCs e anti-F4/80 (Biolegend; Clone BMG. California, EUA) gentilmente cedida pela Dr. A. P. Campanelli, (FOB-USP) para marcação de MOs. A fim de avaliar a polarização funcional dos MOs anticorpos anti-CD86 (Abcam; Clone Bu63. Cambridge, Inglaterra), anti-CD206 (Abcam; Policlonal, Cambridge, Inglaterra), anti-iNOS (ThermoFisher; Clone 4E5. Waltham, EUA) e anti-ARG (ThermoFisher; Policlonal. Waltham, EUA) foram utilizados. A omissão de anticorpos primários foi adotada como controle negativo para cada marcador. Após o período de incubação, as amostras foram lavadas em PBS e incubadas com anticorpos secundários conjugados aos fluorocromos AlexaFluor® 488 e 594 (Molecular Probes®; Eugene, EUA), diluídos em BSA a 1%, por 60 minutos à temperatura ambiente e protegidos de luz. Os núcleos celulares foram corados com DAPI (4',6-diamidino-2 fenilindole, dihidroclorídrico. Sigma-Aldrich). As imagens foram capturadas em microscópio confocal de varredura a laser TCS SPE (Leica, Germany). A

densidade de fluorescência para cada marcador foi calculada pelo software Image-J (versão 1.8) e os valores foram normalizados pelo número de células DAPI positivas em cada campo microscópico.

3.2.9. Produção de Óxido Nítrico (NO)

A produção de NO foi avaliada indiretamente através da concentração total de nitrito + nitrato pelo método colorimétrico de Griess (DUSSE e VIEIRA, 2003). Os resultados foram expressos em micromol (μmol) de NO liberado com base em uma curva padrão estabelecida em cada ensaio.

3.2.10. Dosagem de citocinas

Os níveis de interleucina-6 (IL-6), TNF- α e IL-10 foram avaliados em sobrenadantes de culturas por ELISA utilizando Kits comerciais (R&D Systems; Minneapolis, EUA) de acordo com as indicações do fabricante.

3.2.11. Análise Estatística

Cada experimento foi repetido por três vezes com triplicatas para cada grupo, obtendo-se boa concordância entre os resultados de experimentos individuais. Os resultados foram expressos como mediana e valores mínimos e máximos. A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann-Whitney ou pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn utilizando o software GraphPad Prism 5® (GraphPad Inc. USA). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. ML induz fraca produção de NO por MOs e SCs, mas coculturas de SCs + MOs infectadas por ML produzem NO.

O NO é um dos mais importantes mediadores citotóxicos de células imunes efetoras ativadas (CERQUEIRA, 2002; FLESCH et al., 1994), portanto analisamos a

produção desse mediador por MOs e SCs. O ML não induziu um aumento significativo na produção de NO nas culturas de MOs e SCs (Figura 2). Após a estimulação com LPS, tanto MOs quanto as SCs mostraram uma tendência a aumentar a produção de NO. Quando as SCs foram infectadas por ML durante 9 dias e cultivadas com MOs, foi observada uma maior produção de NO em comparação com coculturas envolvendo SCs não infectadas.

3.3.2. ML é um fraco ativador de MOs e SCs, no entanto, a interação entre MOs e SCs infectadas por ML induz aumento na produção de citocinas, principalmente IL-10

A produção de IL-6, IL-10 e TNF foi avaliada em culturas de MOs e SCs e em coculturas de SCs + MOs (Figura 3). A infecção de MOs com ML não induziu aumento na produção de IL-6, IL-10 ou TNF, diferente do que ocorreu quando as culturas foram estimuladas com LPS.

Em SCs infectadas por ML, observamos uma diminuição na produção de IL-6 após 2 dias (T2) em comparação com SCs não infectadas. Após 9 dias de infecção, a produção de IL-6 foi semelhante à observada em SCs não infectadas. A produção de IL-10 por SCs foi baixa independente do estímulo, enquanto a produção de TNF não foi detectada.

Nas coculturas de SCs + MOs encontramos níveis de citocinas mais elevados do que aqueles produzidos em culturas de SCs ou MOs. A produção de todas as citocinas foi aumentada quando as SCs haviam sido infectadas com ML durante 9 dias (T9) em comparação com coculturas nas quais as SCs não estavam infectadas. De especial interesse, em coculturas de SCs + MOs a produção de IL-10 foi maior mesmo quando as SCs foram infectadas por 2 dias (T2) e quando SCs foram infectadas por 9 dias os níveis desta citocina aumentaram 8 vezes em comparação com MOs infectados por ML e mais de 20 vezes se comparado com SCs infectadas por ML. Assim, embora a produção de todas as citocinas tenha aumentado nas coculturas de MOs com SCs infectadas por ML, observamos uma mudança no perfil de citocinas nessa condição, com diminuição na relação TNF/IL-10 sugerindo o desenvolvimento de um microambiente anti-inflamatório, como demonstrado na Figura 4.

3.3.3 A infecção por ML leva à diminuição da expressão de marcadores M1 (CD86 e iNOS) em coculturas de MOs e SCs infectados por ML.

A expressão dos marcadores M1 foi avaliada em MOs infectados por ML. Nossos resultados demonstram que houve uma diminuição na expressão de iNOS e redução na expressão de CD86, como mostrado na Figura 5.

Esses marcadores também foram avaliados em culturas de SCs. Na fase inicial da infecção por ML (T2), houve aumento na expressão de iNOS (Figura 6), que também foi verificada quando o LPS foi utilizado. Na fase tardia, quando as células foram avaliadas após 9 dias de infecção (T9), observamos uma diminuição da expressão do marcador. A expressão de CD86 não foi detectada em SCs sob qualquer condição experimental.

A expressão de iNOS e CD86 também foi avaliada em coculturas de MOs e SCs infectadas ou não por ML. Observamos uma diminuição na porcentagem de MOs CD86+ e na densidade de fluorescência desse marcador quando MOs foram cocultivados com SCs infectadas com ML por 2 dias (T2) (Figura 7). Com relação à expressão de iNOS (Figura 8), observamos que a porcentagem de MOs F4/80+ permaneceu constante, independentemente do status da infecção nas SCs. No entanto, a densidade de fluorescência diminuiu quando os MOs foram cocultivados com SCs infectadas por ML durante 9 dias (T9).

3.3.4. SCs infectadas por ML mostraram aumento da expressão de CD206 e ARG na fase inicial da infecção, enquanto coculturas de MOs e SCs infectadas por ML apresentaram aumento da expressão de CD206.

Nas culturas de MOs, não houve alteração significativa na expressão dos marcadores ARG e CD206 após infecção por ML (Figura 9). Por outro lado, nas culturas de SCs, a expressão de CD206 diminuiu na fase tardia da infecção por ML (T9) (Figura 10), enquanto não foram observadas alterações significativas na expressão de ARG (Figura 11).

Em coculturas de SCs + MOs (Figura 12), a porcentagem de MOs CD206+ permaneceu constante quando SCs foram infectadas por ML durante 2 dias (T2) e diminuiu quando o tempo de infecção das SCs foi de 9 dias (T9). Por outro lado, a densidade de fluorescência deste marcador mostrou aumento em coculturas feitas com SCs infectadas por 9 dias.

A porcentagem de MOs positivos para ARG (Figura 13), aumentou ligeiramente quando os MOs foram cocultivados com SCs infectadas por ML por 2 dias (T2), enquanto coculturas de SCs infectadas por ML + MOs (T9) não mostraram nenhuma diferença na porcentagem de MOs ARG+. A densidade de fluorescência de ARG diminuiu nas coculturas de SCs infectadas por ML (T2) + MOs; quando as SCs foram cultivadas por 9 dias, independentemente da infecção por ML, a expressão de ARG diminuiu nas coculturas de SCs + MOs.

3.4. DISCUSSÃO

ML tem tropismo pela pele e nervos periféricos, infectando as SCs e MOs (SCOLLARD, 2008). O bacilo é capaz de interferir na função de SCs inibindo a maturação dos fagossomas, o que favorece sua persistência no ambiente intracelular (ALVES et al., 2004) e estimula a sobrevivência e proliferação de SCs (RODRIGUES et al., 2010; TAPINOS, 2005). Além disso, mais recentemente, foi descrito que o ML é capaz de induzir desdiferenciação de SCs tornando-as semelhantes a células-tronco (MASAKI et al., 2013).

Em estudo anterior, verificamos que a infecção por ML promove mudanças na expressão de mediadores envolvidos na maturação de SCs com diminuição da expressão de KROX-20 e SOX-10 e aumento na expressão de p75NTR em SCs, o que sugere que ML favorece a manutenção de um fenótipo não mielinizante (CASALENOVO et al., 2017). Apesar de vários relatos sobre alterações funcionais em SCs infectadas por ML e sua influência na função de MOs, promovendo migração e sobrevivência (MASAKI et al., 2013), não há estudos sobre o possível papel de SCs infectadas por ML na polarização de MOs nos subtipos M1 e M2.

Consistente com relatos anteriores, observamos que o ML é um fraco ativador de MOs e SCs, levando à baixa produção de IL-6, IL-10 e TNF. Segundo Singh et al. (1997), a infecção de MOs por ML resulta em diminuição da produção de IL-1 β e TNF. Da mesma forma, Sinsimer et al. (2010), relataram que monócitos humanos infectados por ML produziam baixos níveis de IL-6. Em culturas de SCs infectadas com ML, a produção de TNF não foi demonstrada (OLIVEIRA et al., 2005) enquanto em culturas da linhagem celular de SCs humanas ST8814 estimuladas com ML irradiado a produção de IL-6 e IL-8 também foram baixas (ANDRADE et al., 2016). Em conjunto, esses dados sugerem

que o ML é um pobre indutor da imunidade inata o que pode favorecer sua persistência no hospedeiro.

A produção de NO em culturas de MOs e SCs infectadas com ML também foi baixa. O NO tem importância fundamental na resposta imune devido ao seu potencial microbicida, além de atuar em uma série de funções biológicas, incluindo relaxamento vascular, agregação plaquetária, neurotransmissão e imunoregulação (BOGDAN e RÖLLINGHOFF, 2000; MONCADA, 1993; NIEDBALA e CAI, 2006). Na hanseníase, o NO parece desempenhar um papel efetivo na atividade microbicida dos MOs murinos (ADAMS et al., 1991) mas sua produção por MOs depende da ativação por IFN- γ (HAGGE et al., 2007).

A expressão de iNOS e produção de NO foram previamente descritas em nervos periféricos de pacientes com hanseníase virchowiana e o NO parece ter um papel importante na lesão nervosa (SCHÖN et al., 2004; SCHÖN et al., 2001), o que foi recentemente demonstrado também num modelo empregando zebrafish (MADIGAN e CAMERON, 2017). O NO pode ainda ter um papel direto na desmielinização de SCs (LEE et al., 2007). Em coculturas de MOs com SCs previamente infectadas com ML, observamos aumento na produção de NO, principalmente quando as SCs foram infectadas por 9 dias. Embora o NO tenha um papel muito importante na eliminação de patógenos (TAPINOS, 2005; SINSIMER et al., 2010), esse mediador pode levar a supressão da resposta imune (UEHARA et al., 2015; WEI et al., 1995). Dados recentes demonstram que o NO suprime a polarização de MOs M1 como uma forma de controlar a resposta imune inata (LU et al., 2015) e pode induzir a diferenciação de MOs com o perfil M2 (LEE et al., 2015). Assim, a alta produção de NO observada neste estudo poderia contribuir para a diferenciação de MOs M2-like observadas em nosso modelo.

De fato, quando MOs foram cocultivados com SCs infectadas com ML por 9 dias, verificamos aumento significativo na produção de IL-10, que possui um papel anti-inflamatório e imunossupressor (JUN-MING et al., 2007). A relação TNF/IL-10 mostrou-se diminuída, sugerindo o estabelecimento de um ambiente anti-inflamatório, que pode modular a polarização dos MOs e promover a persistência do ML.

Nossos resultados sobre a expressão de marcadores de MOs corroboram com a hipótese de um ambiente anti-inflamatório, uma vez que quando cocultivamos MOs com SCs infectadas com ML, os MOs apresentaram uma diminuição na expressão de CD86 e iNOS e um aumento na expressão de CD206 após 9 dias de infecção (T9), em comparação

com coculturas de MOs com SCs não infectadas. A infecção de MOs com ML também promoveu diminuição na expressão do CD86 e da iNOS, reforçando a ideia de baixa ativação de MOs contra o ML. Palermo et al. (2012) mostraram que monócitos de pacientes virchowianos apresentam baixa expressão de CD86 após estímulo com antígeno da parede celular do ML, o que provavelmente contribui para a hiporresponsividade desses pacientes ao bacilo. Baixa expressão de CD86 também foi observada em culturas de células dendríticas estimuladas com antígenos do ML (BRAGA et al., 2015) e ML viável (MURRAY et al., 2007). Em conjunto, esses resultados sugerem a baixa ativação de células mielóides por ML que poderia funcionar como um mecanismo de evasão

Por outro lado, nas culturas de SCs, a infecção por ML inicialmente levou a uma expressão aumentada de iNOS e CD206. A expressão de iNOS e NO já foi demonstrada em nervos periféricos e parece estar relacionada à ocorrência de dano neural em lesões de pacientes e modelos experimentais (MADIGAN et al., 2017; SCHÖN et al., 2004; SCHÖN et al., 2001). SCs constitutivamente expressam o receptor de manose (CD206), o que sugere um papel dessas células no reconhecimento e apresentação de antígenos (BAETAS-DA-CRUZ, 2009). No contexto da hanseníase, Acosta et al. (2018) demonstraram que o ML pode modular o fenótipo das SCs após o reconhecimento do glicolípido fenólico- I (PGL-I), aumentando a expressão de CD206 que facilita sua entrada e sobrevivência nas SCs.

Em síntese, os resultados aqui apresentados mostram que SCs infectadas por ML induzem a diferenciação de MOs para um perfil M2-like com expressão diminuída de marcadores M1 (iNOS e CD86) e aumento na produção de IL-10 e expressão do marcador M2 (CD206). Em modelo experimental de regeneração de dano do nervo periférico empregando células da crista neural, YUE et al. (2017) relataram a diferenciação de MOs para um perfil M2, sugerindo que tal especialização funcional poderia contribuir para um microambiente neuroprotetor. É possível que um fenômeno similar ocorra na hanseníase que apresenta uma longa evolução e ocorrência tardia de dano neural.

3.5. REFERÊNCIAS

ACOSTA, C. C. D. et al. PGL I expression in live bacteria allows activation of a CD206/PPAR γ cross-talk that may contribute to successful Mycobacterium leprae colonization of peripheral nerves. **Plos pathogens**, p. 1–33, 2018.

ADAMS, L. B. et al. L-arginine-dependent macrophage effector functions inhibit metabolic activity of *Mycobacterium leprae*. **J Immunol**, v. 147, n. 5, p. 1642–6, 1991.

ALVES, L. et al. *Mycobacterium leprae* infection of human Schwann cells depends on selective host kinases and pathogen-modulated endocytic pathways. **FEMS Microbiol Lett**, v. 238, n. 2, p. 429–37, 2004.

ANDRADE, P. R. et al. Inflammatory Cytokines Are Involved in Focal Demyelination in Leprosy Neuritis. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 75, n. 3, p. 272–83, 2016.

ARNOLDI, J. et al. Immunohistologic assessment of cytokine production of infiltrating cells in various forms of leprosy. **Am J of Pathology**, v. 137, n. 4, p. 749–753, 1990.

BAETAS-DA-CRUZ, W. et al. Schwann cell express the macrophage mannose receptor and MHC class II. Do they have a role in antigen presentation? **J Peripher Nerv Syst**, v. 14, p. 84–92, 2009.

BOGDAN, C; RÖLLINGHOFF, M. D. A. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunol Rev**, v. 173, p. 17–26, 2000.

BRAGA, A. F. 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**, v. 110, n. 5, p. 655–61, 2015.

CASALENOVO, M. B. et al. Avaliação de Marcadores de Diferenciação em Células de Schwann Murinas Submetidas à Infecção por *Mycobacterium leprae*. **Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais) - Faculdade de Medicina. UNESP, Botucatu-SP**, p. 81, 2017.

CERQUEIRA, N. F. Nitric oxide: review. **Acta Cir. Bras**, v. 17, n. 6, p. 417–423, 2002.

DUSSE, L. M. S; VIEIRA, L. M. C. M. Revisão sobre óxido nítrico. **J. Bras. Patol. Med. Lab**, v. 39(4), p. 343–350., 2003.

FLESCHE, I. E. A.; HESS, J. H.; KAUFMANN, S. H. E. NADPH diaphorase staining suggests a transient and localized contribution of nitric oxide to host defence against an intracellular pathogen in situ. **Int Immunol**, v. 6, n. 11, p. 1751–1757, 1994.

GORDON, S; MARTINEZ, F. O. Alternative Activation of Macrophages : Mechanism and Functions. **Immunity**, v. 32, n. 5, p. 593–604, 2010.

HAGGE, D. A. et al. A new model for studying the effects of *Mycobacterium leprae* on Schwann cell and neuron interactions. **J Infect Dis**, v. 186, n. 9, p. 1283–96, dez. 2002.

HAGGE, D. A. et al. Emergence of an effective adaptive cell mediated immune response to *Mycobacterium leprae* is not impaired in reactive oxygen intermediate-deficient mice. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 51, n. 1, p. 92–101, 2007.

JUN-MING ZHANG, M. S. C; JIANXIONG, A. N; MSC, M. Cytokines, Inflammation and Pain. **Int Anesthesiol Clin**, v. 45, n. 2, p. 27–37, 2007.

KIM, E. W; TELES, R. M. B; HAILE, S; LIU, P. T. Vitamin D status contributes to the antimicrobial activity of macrophages against *Mycobacterium leprae*. **PLoS Negl Trop**

Dis, v. 12, n. 7, 2018.

LEE, H. et al. Double-stranded RNA induces iNOS gene expression in Schwann cells, sensory neuronal death, and peripheral nerve demyelination. **Glia**, v. 55, n. 7, p. 712–22, 2007.

LEE, W. J. et al. M2 Macrophage Polarization Mediates Anti-inflammatory Effects of Endothelial Nitric Oxide Signaling. **Diabetes**, v. 64, n. 8, p. 2836–46, 2015.

LOPES, R. L. Efeito da HSP70 extracelular de *Mycobacterium tuberculosis* na polarização de macrófagos murinos. **Trabalho de conclusão de graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, n. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/102533>>. Acesso em: 10 de janeiro de 2018, 2013.

LU, G. et al. Myeloid cell-derived inducible nitric oxide synthase suppresses M1 macrophage polarization. **Send to Nat Commun**, v. 27, n. 6, p. 6676, 2015.

MADIGAN, C. A. et al. Macrophage Response to *Mycobacterium leprae* Phenolic Glycolipid Initiates Nerve Damage in Leprosy. **Cell**, v. 170, n. 5, p. 973–985, 2017.

MADIGAN, C. A.; CAMERON, J. R. L. A Zebrafish Model of *Mycobacterium leprae* Granulomatous Infection. **J Infect Dis**, v. 216, n. 6, p. 776–779, 2017.

MASAKI, T. et al. Reprogramming adult Schwann cells to stem cell-like cells by leprosy bacilli promotes dissemination of infection. **Cell**, v. 152, n. 1–2, p. 51–67, jan. 2013.

MASAKI, T. et al. Innate immune response precedes *Mycobacterium leprae*-induced reprogramming of adult Schwann cells. **Cell reprogram**, v. 16, n. 1, p. 9–17, fev. 2014.

MILLS, C. D. Macrophage arginine metabolism to ornithine/urea or nitric oxide/citrulline: a life or death issue. **Crit Rev Immunol.**, v. 21(5), p. 399–425, [s.d.].

MONCADA, S. H. A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N Engl J Med**, v. 329, p. 2002–2012, 1993.

MONTOYA, D; MODLIN, R. L. Insight into the human innate immune response. **Adv Immunol**, v. 105, p. 1–24, 2010.

MOURA, D. F. et al. Long-term culture of multibacillary leprosy macrophages isolated from skin lesions: a new model to study *Mycobacterium leprae*-human cell interaction. **Br J Dermatol**, v. 157, n. 2, p. 273–83, 2007.

MURRAY, P. J; TA, W. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 11, p. 723–737, 2012.

MURRAY, R. A; SIDDIQU, I. M. R; MENDILLO, M; KRAHENBUHL, J. K. G. *Mycobacterium leprae* inhibits dendritic cell activation and maturation. **J Immunol**, n. 178, p. 338–344, 2007.

NIEDEBALA, W; CAI, B. L. F. Role of nitric oxide in the regulation of T cell functions. **Ann Rheum Dis**, v. 65, n. 3, p. 37–40, 2006.

OLIVEIRA, R. B. et al. Cytokines and *Mycobacterium leprae* induce apoptosis in human Schwann cells. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 64, n. 10, p. 882–90, 2005.

PÄIVÄLÄINEN, S. et al. Myelination in mouse dorsal root ganglion/Schwann cell cocultures. **Mol Cell Neurosci**, v. 37, n. 3, p. 568–78, 2008.

PALERMO, M. DE L; TRINDADE, M. Â; DUARTE, A. J; CACERE, C. B. G. Differential expression of the costimulatory molecules CD86, CD28, CD152 and PD-1 correlates with the host-parasite outcome in leprosy. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 107, n. 1, p. 167–73, 2012.

REIBEL, F; CAMBAU, E.; AUBRY, A. Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy. **Med Mal Infect**, v. 45, n. 9, p. 383–393, 2015.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 34, n. 3, p. 255–73, 1966.

RODRIGUES, L. S. et al. Mycobacterium leprae induces insulin-like growth factor and promotes survival of Schwann cells upon serum withdrawal. **Cell Microbiol.**, v. 12, n. 1, p. 42–54, 2010.

SALINA, A. C. G; DIAS, F. N; DEJANI, N; NIÑO, V. E. CBS33. Polarização de macrófagos M1/M2 pela fagocitose de células apoptóticas. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 35, p. 206, 2014.

SCHÖN, T. et al. Nitrotyrosine localization to dermal nerves in borderline leprosy. **Br J Dermatol**, v. 150, n. 3, p. 570–4, 2004.

SCHÖN, T. et al. HERNANDEZ-PANDO RH, NEGESSE Y, LEEKASSA R, SUNDQVIST T, B. S. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in borderline leprosy lesions. **Br J Dermatol.**, v. 145, n. 5, p. 809–15, 2001.

SCOLLARD, D. M. The biology of nerve injury in leprosy. **Lepr Rev**, v. 79, n. 3, p. 242–53, set. 2008.

SCOLLARD, D. M; ADAMS, L. B; GILLIS, T. P; KRAHENBUHL, J. L; TRUMAN, R. W. The continuing challenges of leprosy. **Clin Microbiol Rev**, v. 19, n. 2, p. 338–81, 2006.

SCOLLARD, D. M; DACSO, M. M. M. Tuberculosis and Leprosy: Classical Granulomatous Diseases in the Twenty-First Century. **Dermatol Clin**, v. 33, n. 3, p. 541–62, 2015.

SIELING, P. A. M. R. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. Immunobiology. **Immunobiology**, v. 191, n. 4–5, p. 378–87, 1994.

SINGH, N. et al. Nerve growth factor production and expression of p75 by Schwann cells and neurofibroblasts in response to M. leprae infection and macrophage secretory products. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 23, p. 59–67, 1997.

SINSIMER, D. et al. Mycobacterium leprae actively modulates the cytokine response in naive human monocytes. **Infect Immun**, v. 78, n. 1, p. 293–300, 2010.

TAPINOS, N, R. A. Insights into regulation of human Schwann cell proliferation by Erk1/2 via a MEK-independent and p56Lck-dependent pathway from leprosy bacilli.

Proc Natl Acad Sci U S A, v. 102, n. 26, p. 9188–93, 2005.

TROMBONE, A. P. F. et al. Optimized protocols for Mycobacterium leprae strain management: frozen stock preservation and maintenance in athymic nude mice. **J Vis Exp**, v. 23, n. 85, p. 1–7, jan. 2014.

UEHARA, E. U; SHIDA, B. DE S. Role of nitric oxide in immune responses against viruses: beyond microbicidal activity. **Inflamm Res**, v. 64, n. 11, p. 845–52, 2015.

WEI, X. Q. et al. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Nature**, v. 375, p. 408–11, 1995.

WHO. Leprosy: weekly epidemiological record. **World Heal Organ Wkly Epidemiol Rec [Internet]**., v. 93, n. 35, p. 445–456, 2018.

Y, Tao. Isolation and culture of Schwann cells. **Methods Mol Biol**, v. 1018, p. 93–104, 2013.

YUE, L. I. et al. The Effects of Epidermal Neural Crest Stem Cells on Local Inflammation Microenvironment in the Defected Sciatic Nerve of Rats. **Front Mol Neurosci**, v. 10, n. 133, 2017.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1: Resumo do desenho experimental. SCs: células de Schwann; ML: *M. leprae*; MOs: macrófagos; NO: óxido nítrico

Figura 2: Produção de óxido nítrico por MOs, SCs e coculturas de SCs + MOs. **A.** Macrófagos (MOs) foram diferenciados a partir de precursores de medula óssea e cultivados por 48 horas sem estímulo, estimulados com *M. leprae* (ML) na multiplicidade de infecção (MOI) de 20 bacilos para 1 macrófago (MOs + ML) ou com lipopolissacarídeo (LPS, 1 ug/ml) (MOs + LPS). **B.** Células de Schwann (SCs) foram isoladas, cultivadas e avaliadas 2 dias após a infecção com ML (SC + ML (T2)) e 9 dias após a infecção com ML (SC + ML (T9)). Foi empregado no estudo MOI de 100:1 (bacilos:SCs), como controles negativo e positivo SCs foram cultivadas sem estímulo (SCs) e estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS, 1 ug/ml, SCs + LPS) pelos mesmos períodos. **C.** MOs foram cocultivados por 48 horas com SCs não infectadas ou SCs infectadas com ML (SCs + ML) por 2 dias (T2) ou por 9 dias (T9). Os gráficos representam a mediana e os valores mínimo e máximo. * $p < 0,05$ (teste de Mann Whitney). Os dados apresentados são representativos de dois experimentos independentes.

Figura 3: Produção de citocinas por MOs, SCs e coculturas de SCs + MOs. Macrófagos (MOs) foram diferenciados a partir de precursores de medula óssea e cultivados por 48 horas sem estímulo, estimulados com *M. leprae* (ML) na multiplicidade de infecção (MOI) de 20 bacilos para 1 macrófago (MOs + ML) ou com lipopolissacarídeo (LPS, 1 ug/ml) (M + LPS). Células de Schwann (SCs) foram isoladas, cultivadas e avaliadas 2 dias após a infecção com ML (SC + ML (T2)) e 9 dias após a infecção com ML (SCs + ML (T9)). Foi empregado no estudo MOI de 100:1 (bacilos:SCs), como controles negativo e positivo SCs foram cultivadas sem estímulo (SCs) e estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS, 1 ug/ml, SCs + LPS) pelos mesmos períodos. MOs foram cocultivados por 48 horas com SCs não infectadas ou SCs infectadas com ML (SCs + ML) por 2 dias (T2) ou por 9 dias (T9). Os gráficos representam a mediana e os valores mínimo e máximo. * $p < 0,05$ (teste de Mann Whitney). Os dados apresentados são representativos de dois experimentos independentes.

Figura 4: Razão entre os níveis de TNF e IL-10 produzidos por MOs e coculturas de SCs + MOs. **A.** Macrófagos (MOs) foram diferenciados a partir de precursores de medula óssea e cultivados por 48 horas sem estímulo, estimulados com *M. leprae* (ML) na multiplicidade de infecção (MOI) de 20 bacilos para 1 macrófago (MOs + ML) ou com lipopolissacarídeo (LPS, 1 ug/ml) (M + LPS). **B.** MOs foram cocultivados por 48 horas com SCs não infectadas ou SCs infectadas com ML (SCs + ML) por 2 dias (T2) ou por 9 dias (T9). Os gráficos representam a mediana e os valores mínimo e máximo. * $p < 0,05$ (teste de Mann Whitney). Os dados apresentados são representativos de dois experimentos independentes.

Figura 5: Detecção de CD86 e iNOS em culturas de MOs. Macrófagos (MOs) foram diferenciados a partir de precursores de medula óssea e cultivados por 48 horas sem estímulo, infectados com *M. leprae* (ML) na multiplicidade de infecção (MOI) de 20 bacilos para 1 macrófago (MOs + ML) ou estimulados com lipopolissacarídeo (LPS, 1 ug/ml) (MOs + LPS). A imunodeteção foi realizada por microscopia confocal e a densidade de fluorescência foi analisada no software Image-J (versão 1.8). Gráficos

ilustram a densidade de fluorescência de CD86 e iNOS. Os valores foram expressos como mediana e valores mínimo e máximo. Aumento: 400x

Figura 6: Detecção de iNOS em culturas de SCs. Células de Schwann (SCs) foram isoladas, cultivadas e avaliadas 2 dias após a infecção com *M. leprae* (ML) (SCs + ML (T2)) e 9 dias após a infecção com ML (SCs + ML (T9)). Foi empregado no estudo MOI de 100:1 (bacilos:SCs), como controles negativo e positivo SCs foram cultivadas sem estímulo (SCs) ou estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS, 1 ug/ml, SCs + LPS) pelos mesmos períodos. A imunodeteção foi realizada por microscopia confocal e a densidade de fluorescência foi analisada no software Image-J (versão 1.8). O gráfico ilustra a densidade de fluorescência de iNOS. Os valores foram expressos como mediana e valores mínimo e máximo da densidade de fluorescência. Aumento: 400x

Figura 7: Detecção de CD86 em coculturas de MOs (F4/80+) e SCs. Macrófagos (MOs) foram diferenciados a partir de precursores de medula óssea e foram cocultivados por 48 horas com SCs não estimuladas ou SCs infectadas com *M. leprae* (ML) (SCs + ML) por 2 dias (T2) ou por 9 dias (T9). A imunodeteção foi realizada por microscopia confocal e a densidade de fluorescência foi analisada no software Image-J (versão 1.8). Os gráficos ilustram a porcentagem de MOs CD86+ e a densidade de fluorescência para este marcador. Os valores foram expressos como mediana e valores mínimo e máximo. Aumento: 400x. Os dados apresentados são representativos de dois experimentos independentes.

Figura 8: Detecção de iNOS em coculturas de MOs (F4/80+) e SCs. Macrófagos (MOs) foram diferenciados a partir de precursores de medula óssea e foram cocultivados por 48 horas com SCs não estimuladas ou SCs infectadas com *M. leprae* (ML) (SCs + ML) por período de 2 dias (T2) ou por 9 dias (T9). A imunodeteção foi realizada por microscopia confocal e a densidade de fluorescência foi analisada no software Image-J (versão 1.8). Os gráficos ilustram a porcentagem de MOs iNOS+ e a densidade de fluorescência para este marcador. Os valores foram expressos como mediana e valores mínimo e máximo. Aumento: 400x. Os dados apresentados são representativos de dois experimentos independentes.

Figura 9: Detecção de CD206 e Arginase 1 (ARG) em culturas de MOs. Macrófagos (MOs) foram diferenciados a partir de precursores de medula óssea e cultivados por 48 horas sem estímulo, infectados com *M. leprae* (ML) na multiplicidade de infecção (MOI) de 20 bacilos para 1 MOs (MOs + ML) ou estimulados com lipopolissacarídeo (LPS, 1 ug/ml) (MOs + LPS). A imunodeteção foi realizada por microscopia confocal e a densidade de fluorescência foi analisada no software Image-J (versão 1.8). Gráficos ilustram a densidade de fluorescência de CD206 e ARG. Os valores foram expressos como mediana e valores mínimo e máximo. * $p < 0,05$ (análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis seguida pelo pós-teste de Dunn). Aumento: 400x

Figura 10: Detecção de CD206 culturas de SCs. Células de Schwann (SCs) foram isoladas, cultivadas e avaliadas 2 dias após a infecção com *M. leprae* (ML) (SCs + ML (T2)) e 9 dias após a infecção com ML (SCs + ML (T9)). Foi empregado no estudo MOI de 100:1 (bacilos:SCs), como controles negativo e positivo SCs foram cultivadas sem estímulo (SCs) ou estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS, 1 ug/ml, SCs + LPS) pelos mesmos períodos. A imunodeteção foi realizada por microscopia confocal e a densidade de fluorescência foi analisada no software Image-J (versão 1.8). O gráfico ilustra a densidade de fluorescência de CD206. Os valores foram expressos como mediana e valores mínimo e máximo. Aumento: 400x

Figura 11: Detecção de Arginase 1 (ARG) em culturas de SCs. Células de Schwann (SCs) foram isoladas, cultivadas e avaliadas 2 dias após a infecção com *M. leprae* (ML) (SCs + ML (T2)) e 9 dias após a infecção com ML (SCs + ML (T9)). Foi empregado no estudo MOI de 100:1 (bacilos:SCs), como controles negativo e positivo SCs foram cultivadas sem estímulo (SCs) ou estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS, 1 ug/ml, SCs + LPS) pelos mesmos períodos. A imunodeteção foi realizada por microscopia confocal e a densidade de fluorescência foi analisada no software Image-J (versão 1.8). O gráfico ilustra a densidade de fluorescência de ARG. Os valores foram expressos como mediana e valores mínimo e máximo. Aumento: 400x

Figura 12: Detecção de CD206 em coculturas de MOs (S100 β -) e SCs. Macrófagos (MOs) foram diferenciados a partir de precursores de medula óssea e foram cocultivados por 48 horas com SCs não estimuladas ou SCs infectadas com *M. leprae* (ML) (SCs + ML) por 2 dias (T2) ou por 9 dias (T9). A imunodeteção foi realizada por microscopia confocal e a densidade de fluorescência foi analisada no software Image-J (versão 1.8). Os gráficos ilustram a porcentagem de MOs (S100-) CD206+ e a densidade de fluorescência para este marcador. Os valores foram expressos como mediana e valores mínimo e máximo. Aumento: 400x. Os dados apresentados são representativos de dois experimentos independentes.

Figura 13: Detecção de Arginase 1 (ARG) em cocultura de MOs (S100 β -) e SCs. Macrófagos (MOs) foram diferenciados a partir de precursores de medula óssea e foram cocultivados por 48 horas com SCs não estimuladas ou SCs infectadas com *M. leprae* (ML) (SCs + ML) por 2 dias (T2) ou por 9 dias (T9). A imunodeteção foi realizada por microscopia confocal e a densidade de fluorescência foi analisada no software Image-J (versão 1.8). Os gráficos ilustram a porcentagem de MOs (S100-) ARG+ e a densidade de fluorescência para este marcador. Os valores foram expressos como mediana e valores mínimo e máximo. Aumento: 400x. Os dados apresentados são representativos de dois experimentos independentes.

FIGURAS

Figura 1

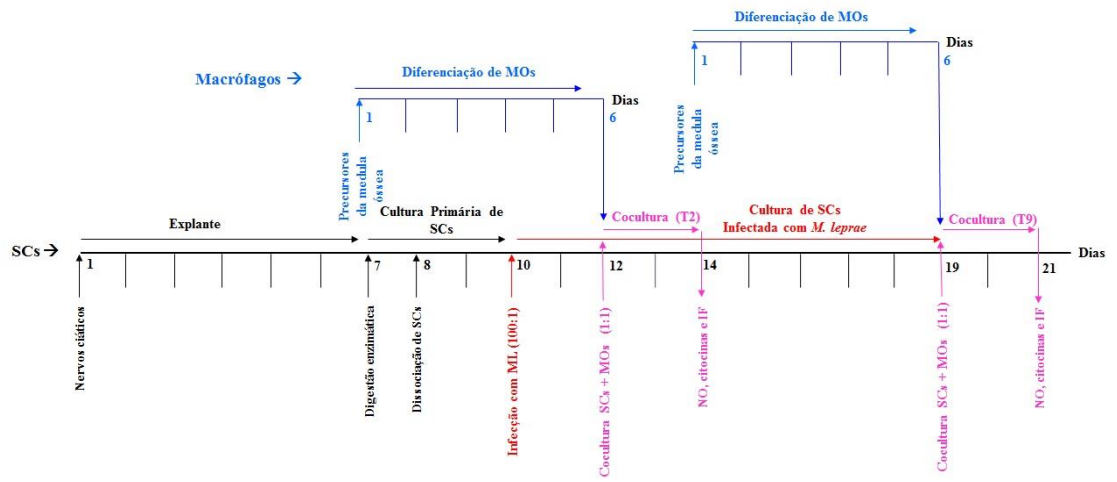


Figura 2

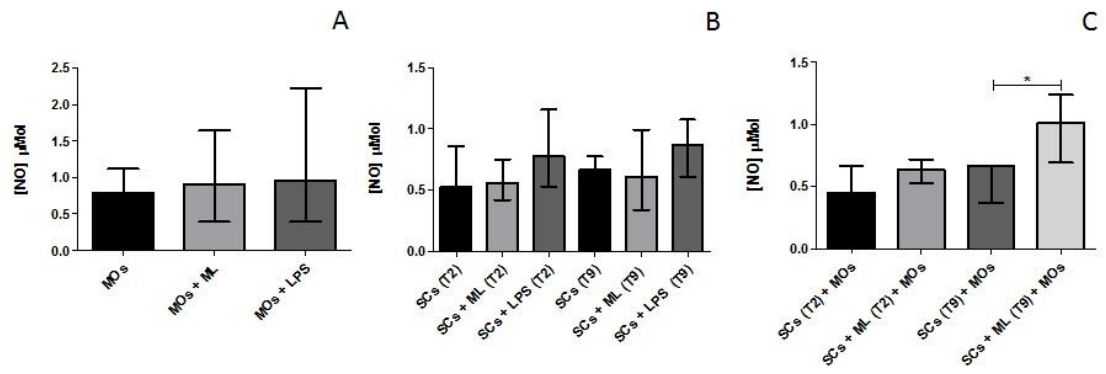


Figura 3

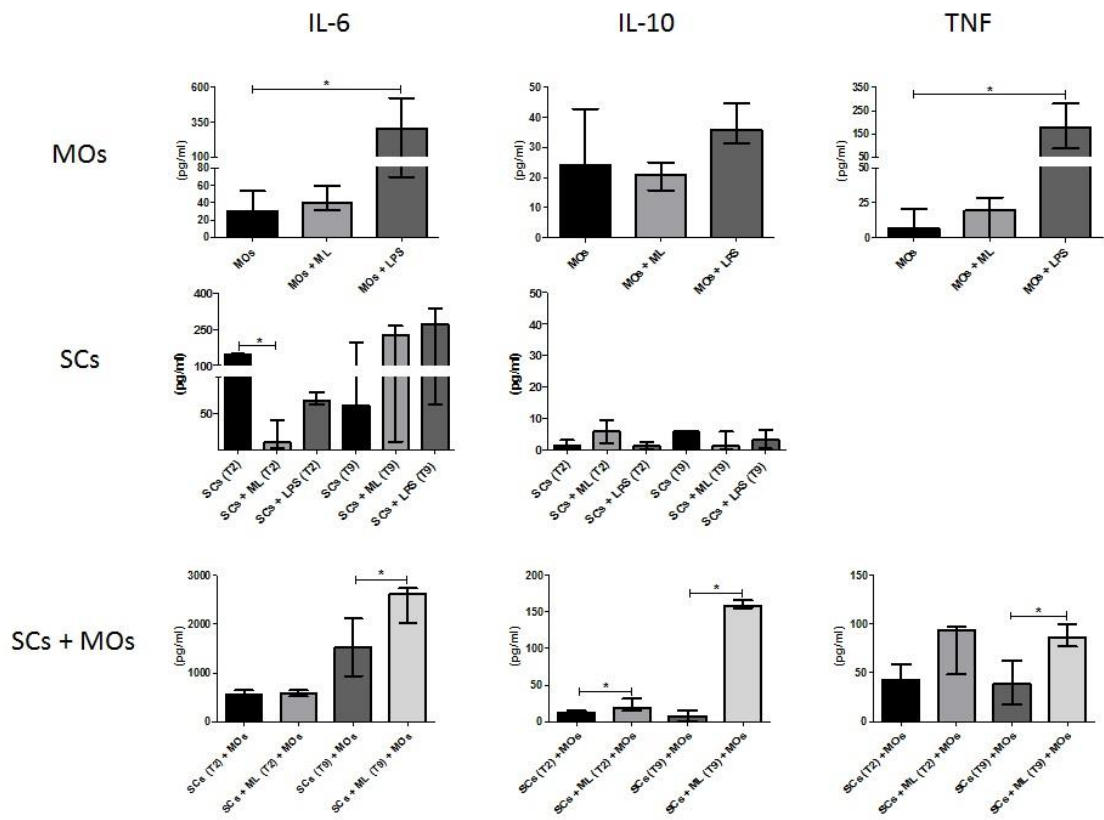


Figura 4

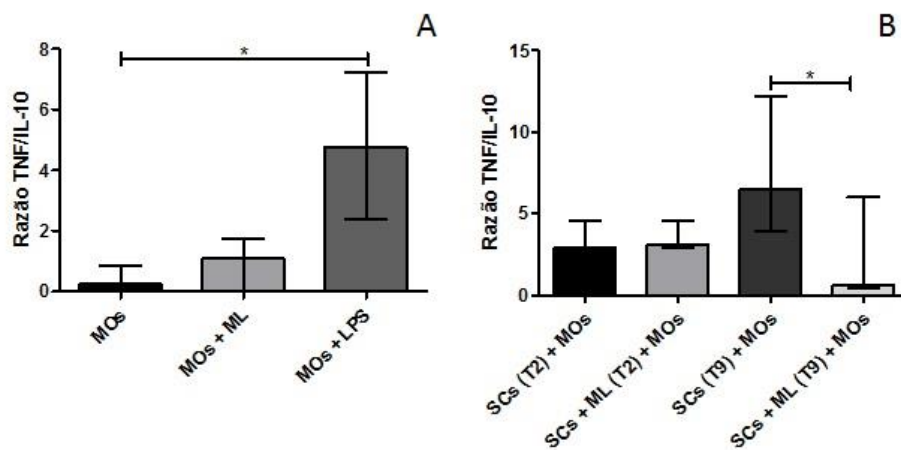


Figura 5

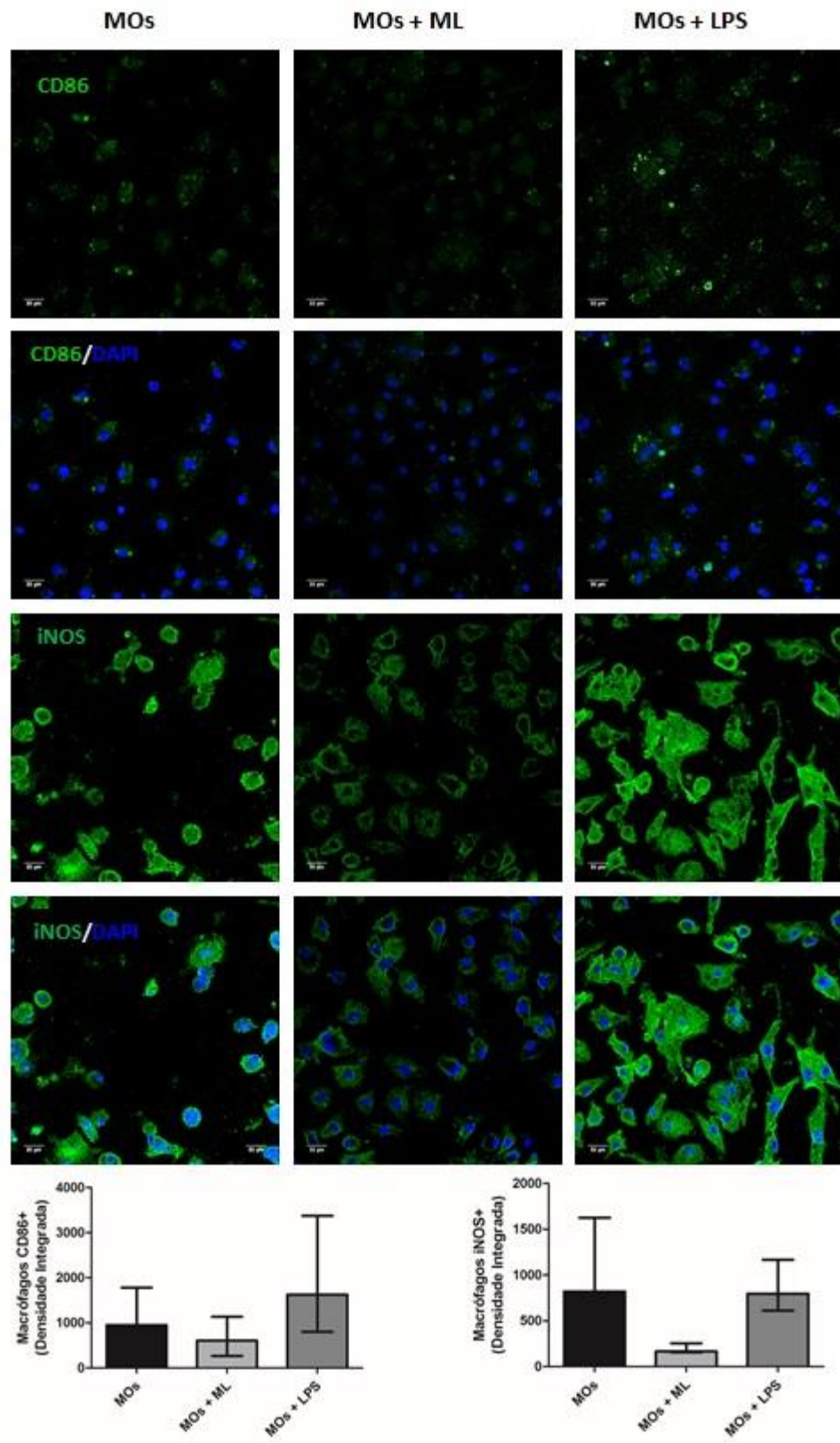


Figura 6

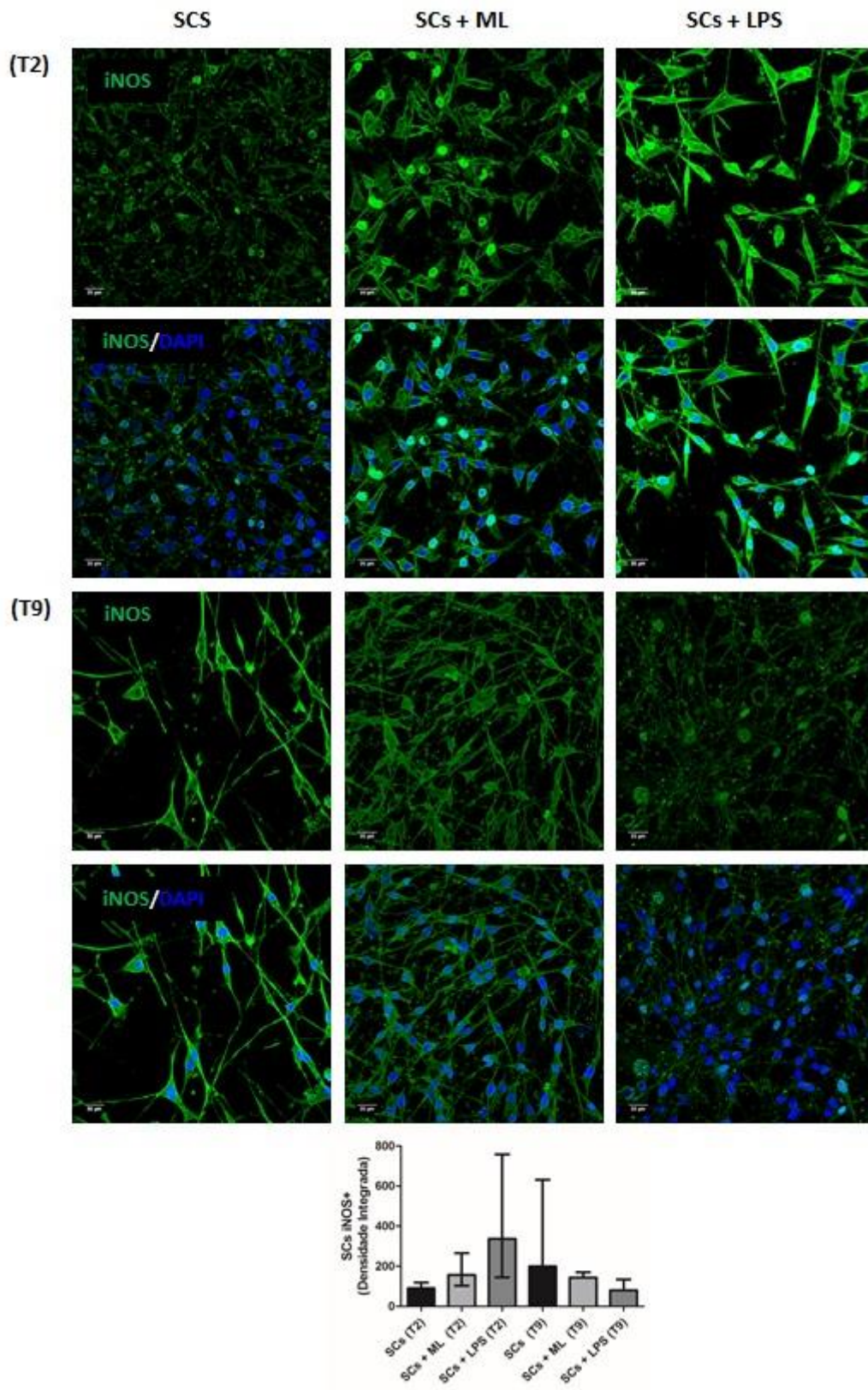


Figura 7

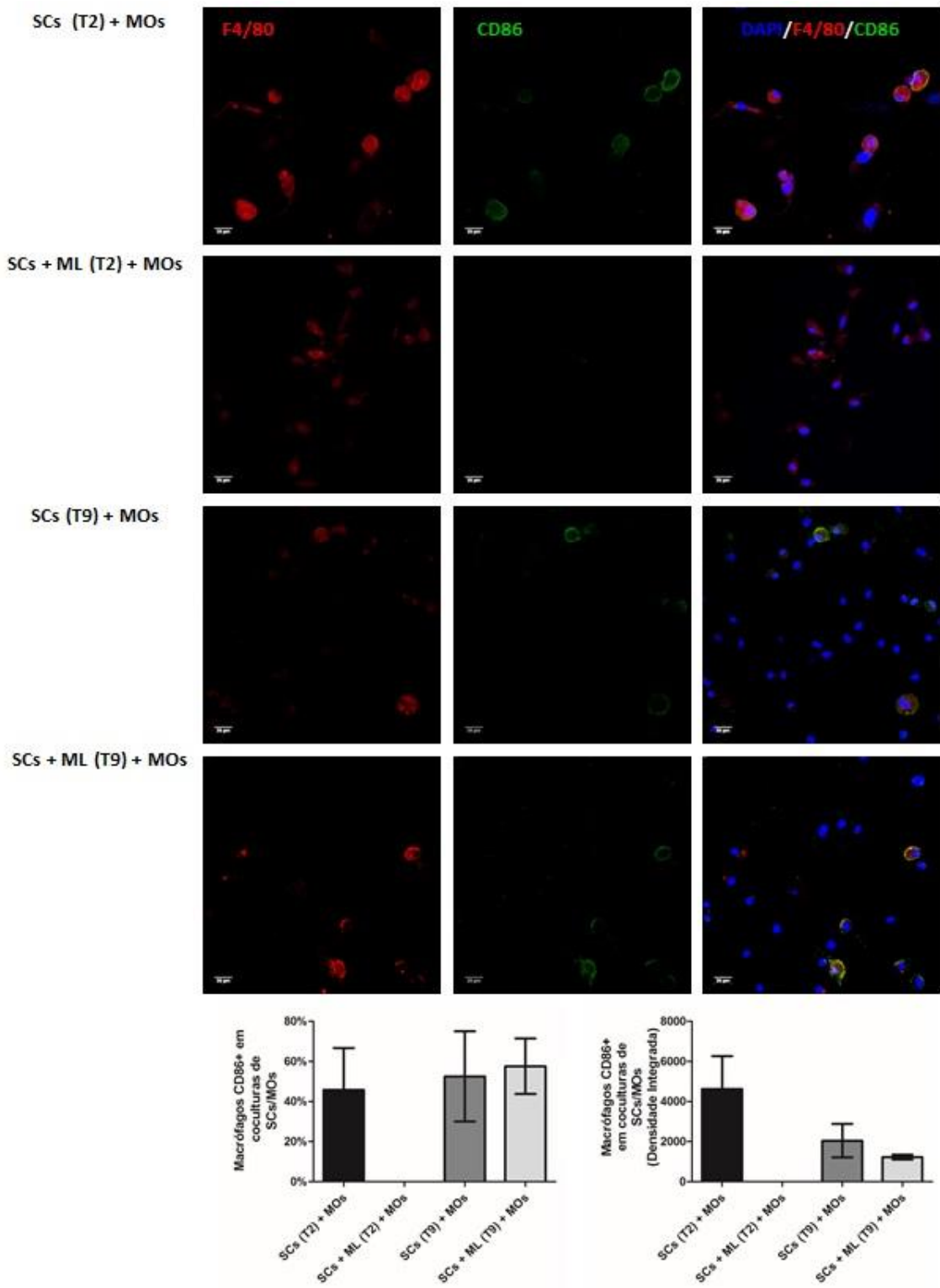


Figura 8

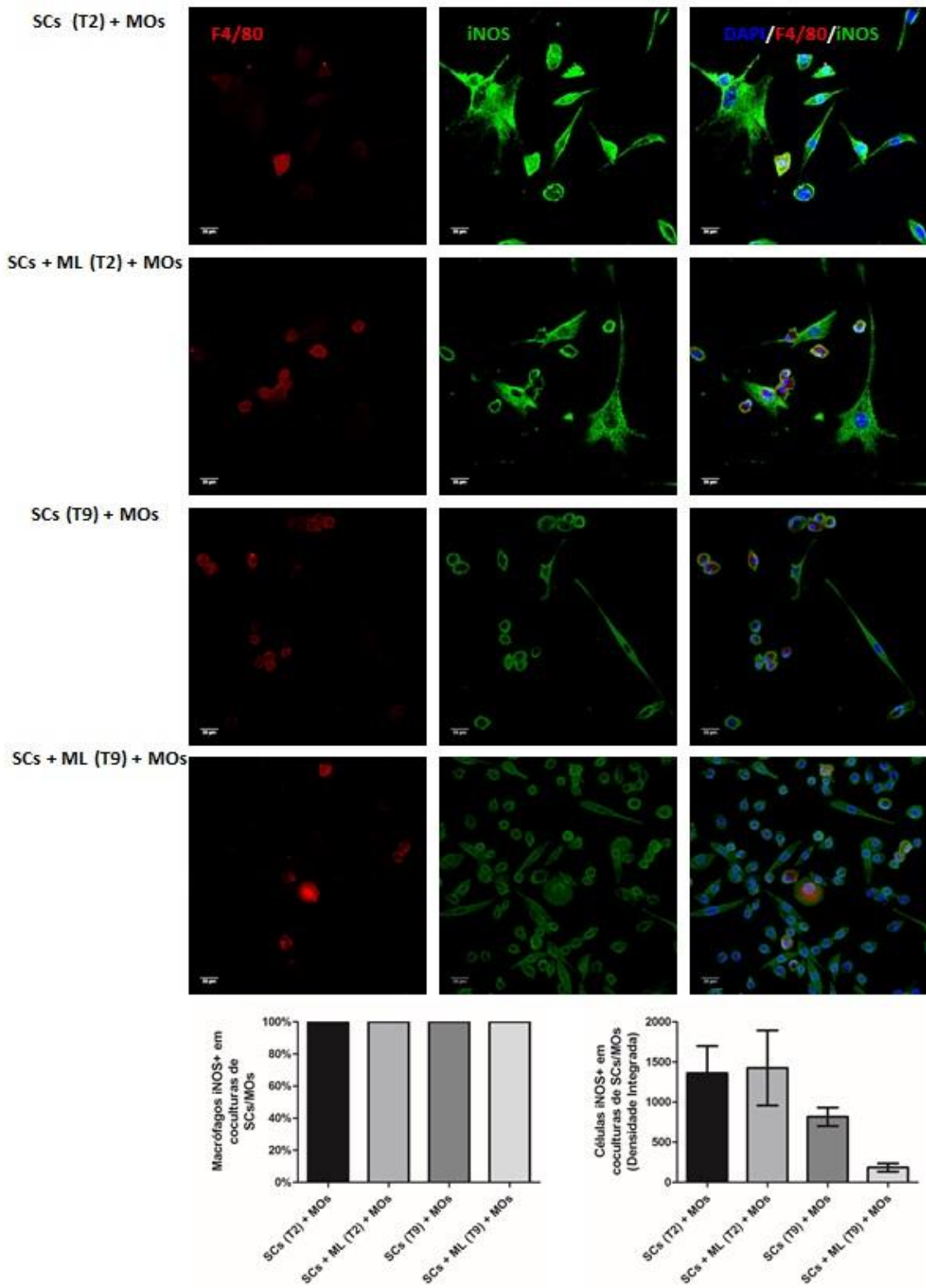


Figura 9

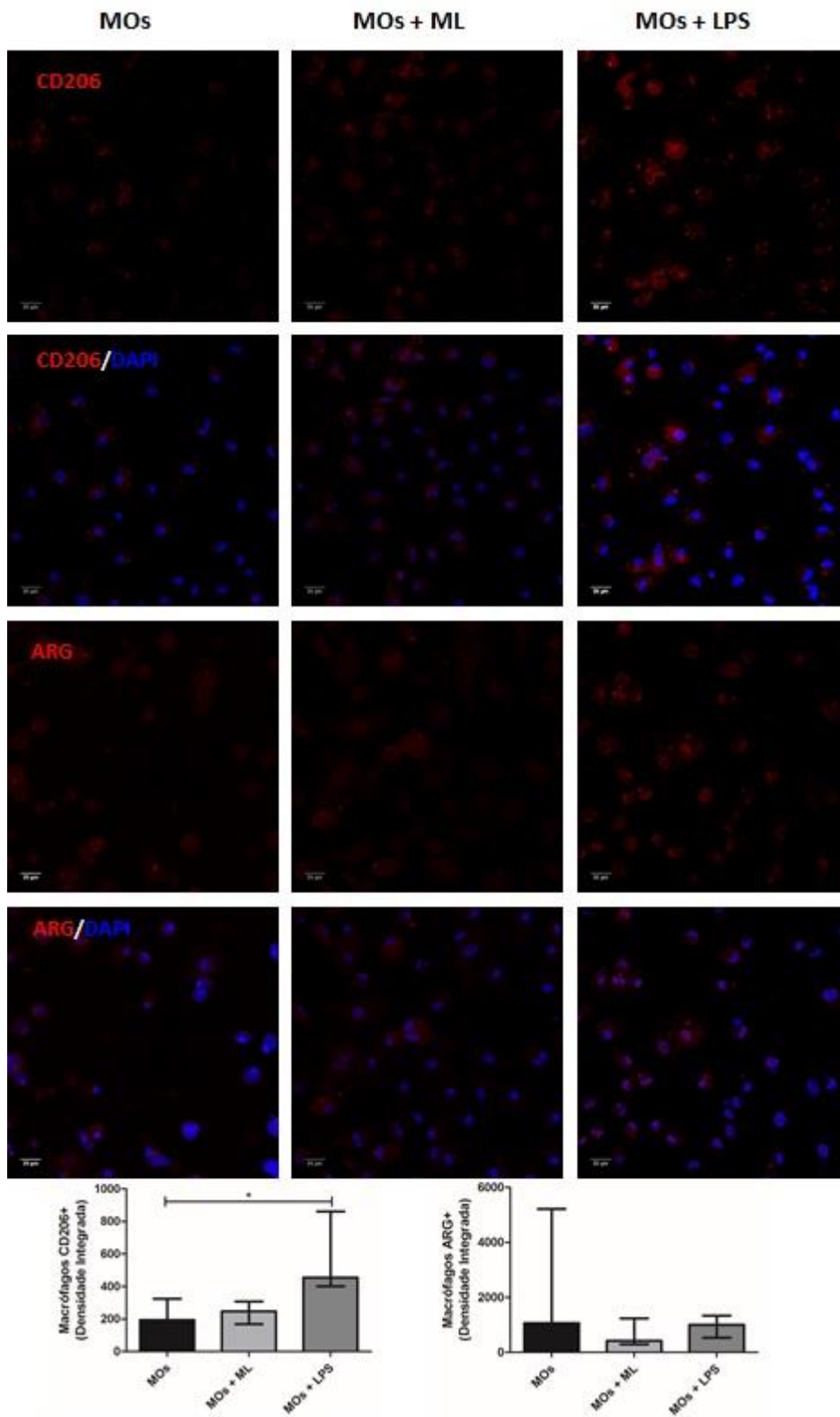


Figura 10

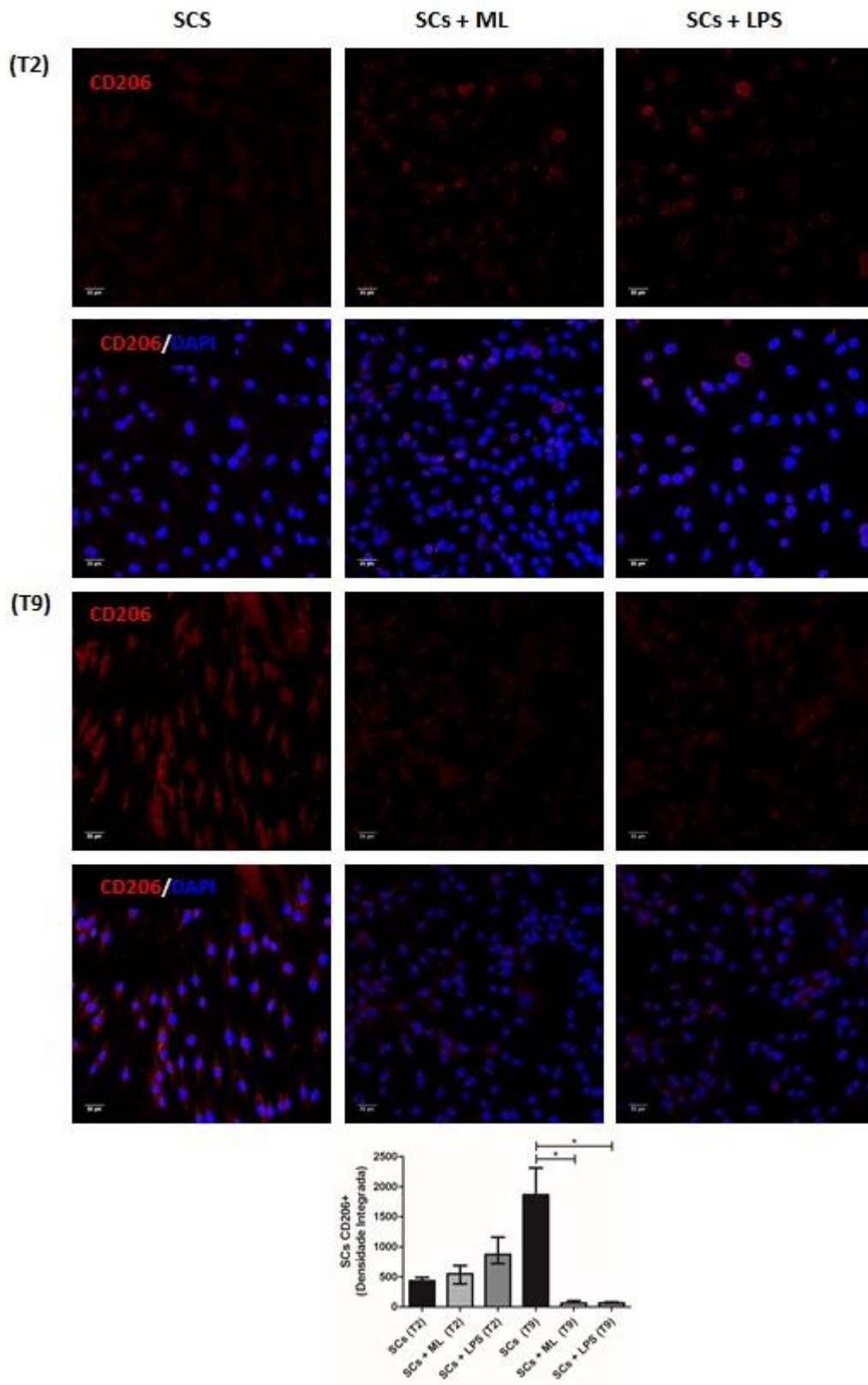


Figura 11

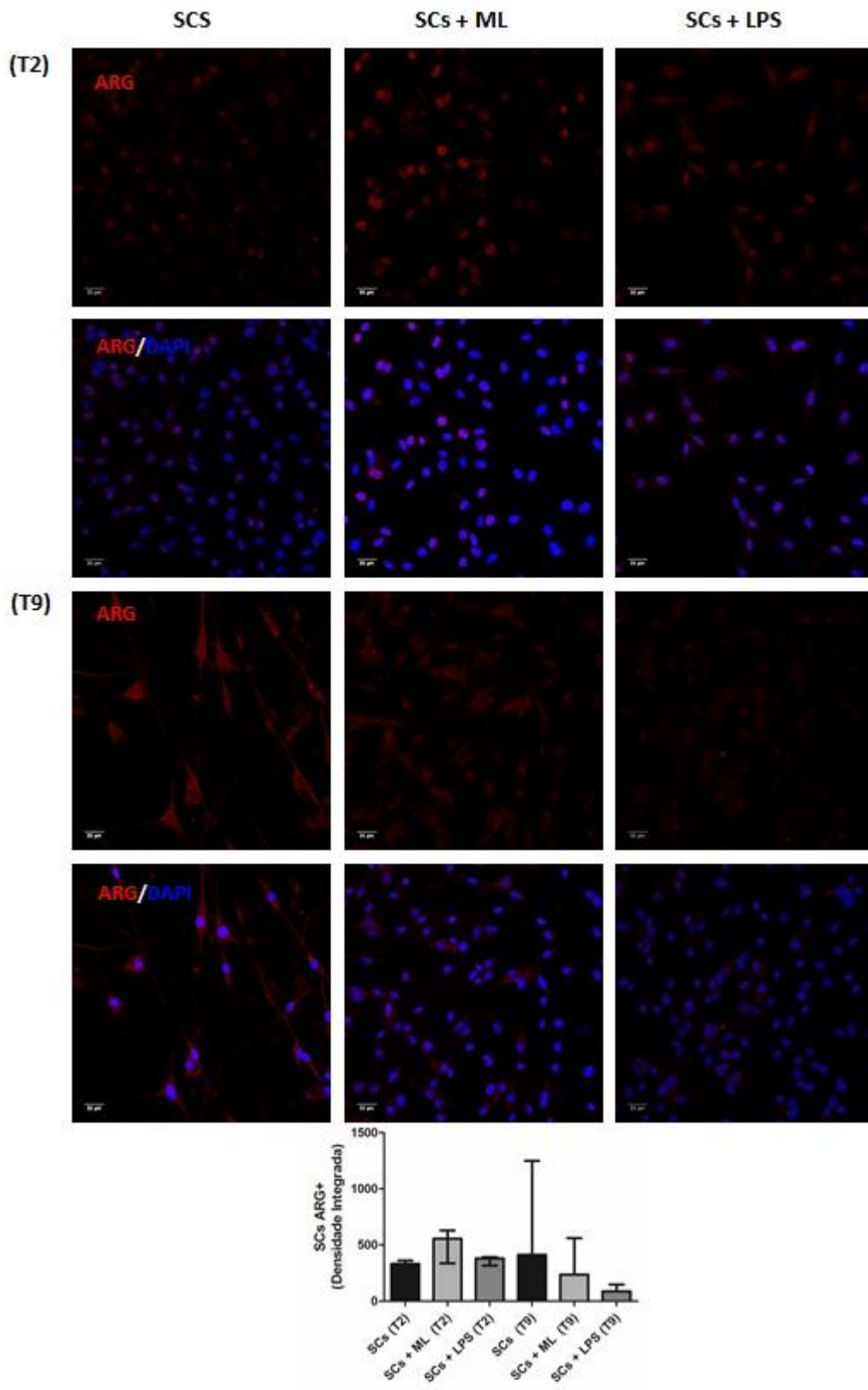


Figura 12

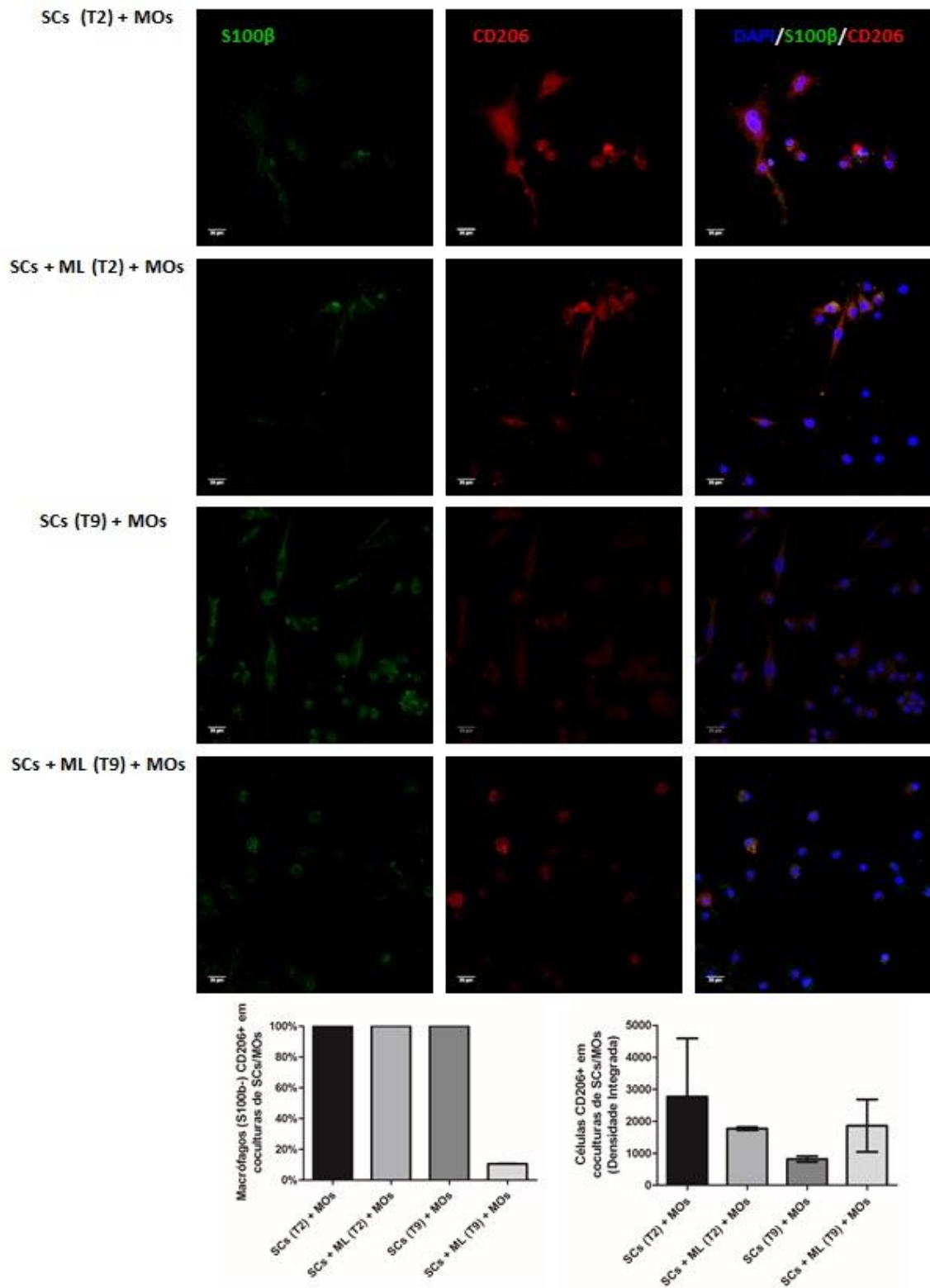
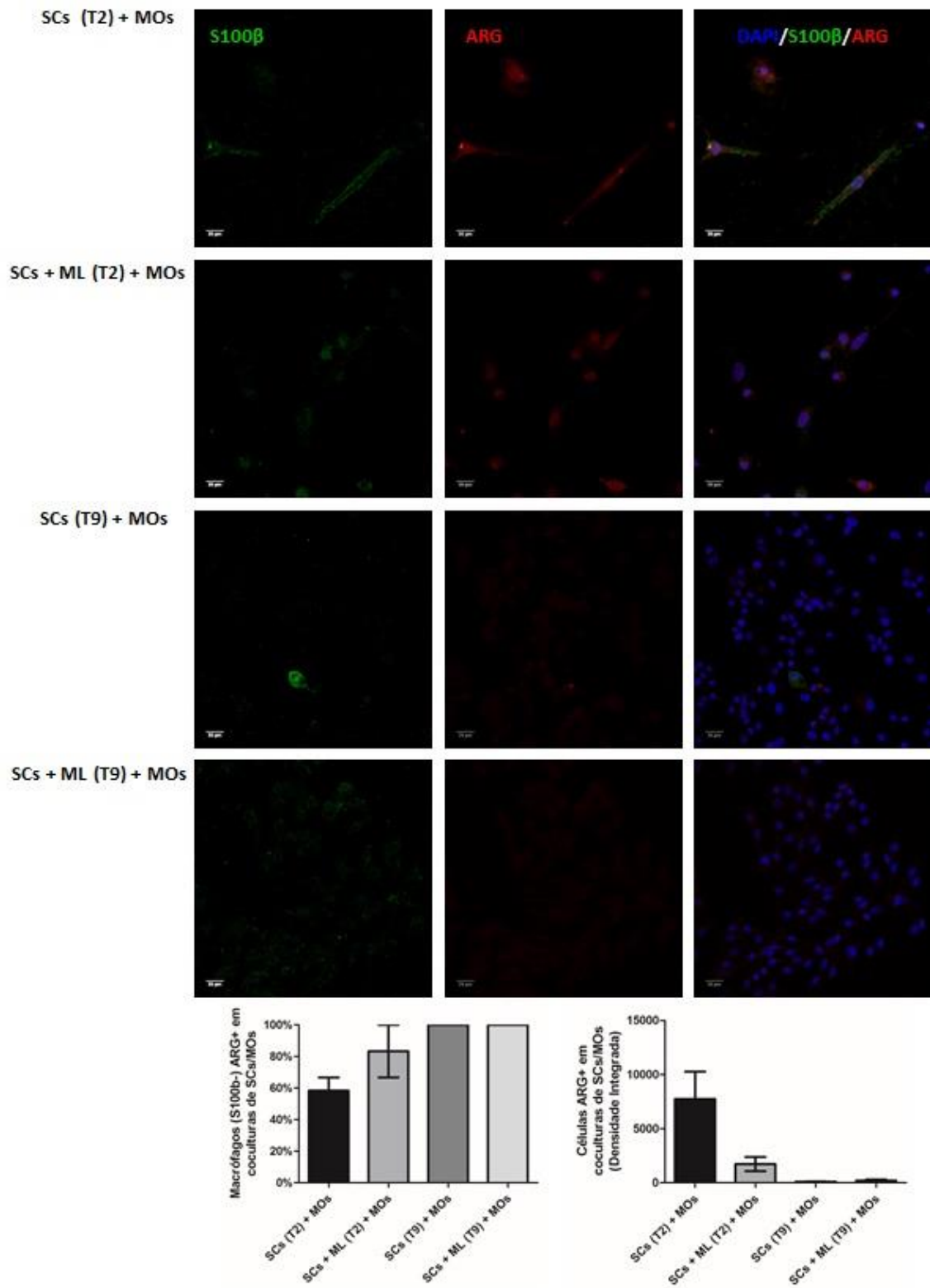
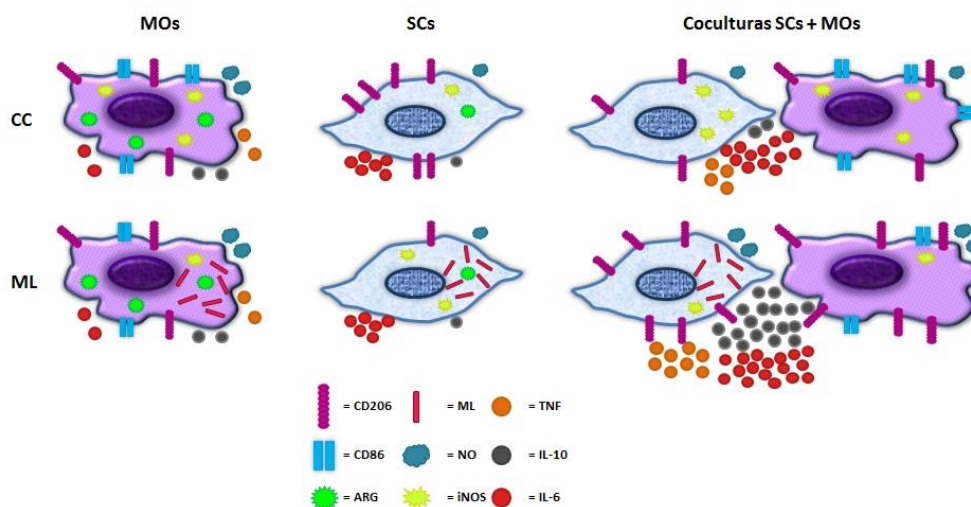


Figura 13



4. CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados mostram que SCs infectadas por ML induzem a diferenciação de MOs para um perfil M2-like com baixa expressão de marcadores M1 (iNOS e CD86) e aumento na produção de IL-10 e expressão do marcador M2 (CD206) conforme demonstrado no resumo esquemático abaixo. Em conjunto, nossos dados indicam que a infecção de SCs pelo bacilo é capaz de interferir com a polarização funcional de MOs por induzir a ocorrência de um ambiente anti-inflamatório.



Resumo esquemático dos resultados. SCs: células de Schwann; MOs: macrófagos; CC: Cultura Controle; ML: *M. leprae*; NO: óxido nítrico.

5. REFERÊNCIAS

1. Reibel F, Cambau E, Aubry A. Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy. *Med Mal Infect.* 2015 Sep;45(9):383–93.
2. Eidt LM. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. *Saúde e Soc.* 2004 Ago;13(2):76–88.
3. Monteiro Y. Da maldição divina à exclusão social: um estudo da hanseníase em São Paulo. Tese Doutorado em História Soc São Paulo FFLCH da Univ São Paulo.

- 1995.
4. Santos FA et al. A história da hanseníase: o impacto biológico e social. *Bioeticapr.* 2011;2:31–41.
 5. Jopling WH, Mcdougall AC. Manual de hanseníase. Livraria Atheneu Ed Rio Janeiro. 1991;4.
 6. Brasil; Ministério da Saúde. Controle da hanseníase: uma proposta de integração ensino-serviço. Rio Janeiro DNDS/NUTES. 1989.
 7. Serviço Nacional de Lepra. Manual de leprologia. Rio Janeiro Dep Nac Saú-. 1960.
 8. Marzliak MLC et al. Breve histórico sobre os rumos do controle da hanseníase no Brasil e no estado de São Paulo. *Hansen Int.* 2008;2(33):39–44.
 9. Antonio L, Santos DC, Armauer H. Contrapontos da história da hanseníase no Brasil : cenários de estigma e confinamento. *R bras Est Pop, São Paulo.* 2008 Jan;25(1):167–90.
 10. Singh P, Cole S. Genetic Diversity. *Futur Med.* 2011 Jan;57–71.
 11. Madeira S. Noções de hansenologia: aspectos microbiológicos do *Mycobacterium leprae*. Opromolla DVA, Ed Noções Hansen Bauru Cent Estud Dr Reynaldo Quagliato Inst Lauro Souza Lima. 2000;13–8.
 12. Lastória J, Abreu M. Hanseníase: diagnóstico e tratamento. *Diagn Trat.* 2012;17(4):173–9.
 13. Truman R, Fine PEM. “ Environmental ” sources of *Mycobacterium leprae* : Issues and evidence. *Lepr Rev.* 2010 Jun;(81):89–95.
 14. Sharma R et al. Zoonotic Leprosy in the Southeastern United States. *Emerg Infect Dis.* 2015 Dez;21(12):2127–34.
 15. Martins BDL, Torres FN, Oliveira MLW. Impact on the quality of life of patients with Hansen’s disease: correlation between Dermatology Life Quality Index and disease status. *An Bras Dermatol.* 2008 Jan-Fev;83(1):39–43.
 16. Monteiro LD et al. Limited activity and social participation after hospital discharge

- from leprosy treatment in a hyperendemic area in north Brazil. *Rev Bras Epidemiol*. 2014 Jan-Mar;17(1):91–104.
17. WHO. Leprosy: weekly epidemiological record. *World Heal Organ Wkly Epidemiol Rec*. 2018 Ago;93(35):445-456.
 18. Bennett BH, Parker DL, Robson M. Leprosy: Steps Along the Journey of Eradication. *Public Health Rep*. 2008 Mar-Abr;123(2):198–205.
 19. Lyon S, Grossi MAF. Diagnóstico e Tratamento da hanseníase. BVS SES-SP. *Hansen Rio Janeiro Medb*. 2013; 141-169.
 20. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria n 3125. 2010;7 de outub.
 21. Melão S et al. Epidemiological profile of leprosy patients in the extreme south of Santa Catarina between 2001 and 2007. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011 Jan-Feb;44(1):79–84.
 22. Souza V, Pereira A. Genética humana na susceptibilidade à hanseníase. *Hansen Int*. 2007;32(1):81–93.
 23. Lázaro FP et al. A major gene controls leprosy susceptibility in a hyperendemic isolated population from north of Brazil. *J Infect Dis*. 2010 May;201:1598–605.
 24. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1966 Jul-Sep;34(3):255–73.
 25. World Health Organization. Chemotherapy of leprosy for control programmes: report of a WHO study group. Geneva: WHO, 1982.
 26. Fleury R. Noções de hansenologia. Bauru: Centro de estudos Dr Reynaldo Quagliato. Instituto Lauro de Souza Lima. *Patol e Manifestações clínicas Opromolla DVA*, Ed. 2000;63–71.
 27. Scollard DM et al. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev*. 2006 Apr;19(2):338–381.
 28. Araujo S et al. Major Article Risk-benefit assessment of Bacillus Calmette-Guérin vaccination, anti-phenolic glycolipid I serology, and Mitsuda test response: 10-year follow-up of household contacts of leprosy patients. *Rev Soc Bras Med Trop*.

- 2015 Nov-Dec;48(6):739–45.
29. Brightbill HD et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*. 1999 Jul;285:732–6.
 30. Kawai TAS. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol*. 2009 Apr;21(19):317–37.
 31. Mendonça VA et al. Imunologia da hanseníase. *An Bras Dermatol*. 2008 Ago;83(4):343–50.
 32. Mesquita J, Araújo P, Tiekko T, Catelan T. Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Rev Bras Reum*. 2010 Out;55(11):552–80.
 33. 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.
 34. Carvalho L, Araújo MIAS, Carvalho EM. Immune response mechanisms to infections. *An Bras Dermatol*. 2004 Nov;79(6):647–64.
 35. Reibel F, Cambau E, Aubry A. Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy. *Med Mal Infect*. 2015 Sep;45(9):383–393
 36. Souza VNB. Hanseníase avanços e desafios. *Imunologia da Hanseníase*. 2014. 105-130 p.
 37. Øystein Grimstad M. Tumor Necrosis Factor and the Tenacious α . *AMA Dermatol*. 2016;152(5):557.
 38. Arnoldi J, Gerdes J FH. Immunohistologic assessment of cytokine production of infiltrating cells in various forms of leprosy. *Am J Pathol*. 1990 Oct;137(4):749–53.
 39. Sieling PAMR. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. *Immunobiology*. 1994 Oct;191(4–5):378–87.
 40. Misra N et al. Cytokine profile of circulating T cells of leprosy patients reflects both indiscriminate and polarized T-helper subsets: T-helper phenotype is stable

- and uninfluenced by related antigens of *Mycobacterium leprae*. *Immunology*. 1995 Sep;86(1):97–103.
41. Venturini J et al. In vitro and skin lesion cytokine profile in Brazilian patients with borderline tuberculoid and borderline lepromatous leprosy. *Lepr Rev*. 2011 Mar;82(1):25–35.
 42. Voorend CGN, Post EB. A Systematic Review on the Epidemiological Data of Erythema Nodosum Leprosum , a Type 2 Leprosy Reaction. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013 Oct;7(10):e2440.
 43. Walker S L, Lockwood DNJ. The clinical and immunological features of leprosy. *Br Med Bull*. 2006 Nov;77–78(1):103–21.
 44. Polycarpou A, Walker SL, Lockwood DNJ. A Systematic Review of immunological Studies of erythema Nodosum Leprosum. *Front Immunol*. 2017 Mar;13(8):233.
 45. Modlin RL. Th1-Th2 Paradigm : Insights from Leprosy. *J Invest Dermatol*. 1994 Jun;102(6):828–32.
 46. Huang G, Wang Y, Chi H. Regulation of TH17 cell differentiation by innate immune signals. *Cell Mol Immunol*. 2012 Jul;9(4):287–95.
 47. Volpe E et al. 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.
 48. Terhune J, Berk E, Czerniecki B. Dendritic Cell-Induced Th1 and Th17 Cell Differentiation for Cancer Therapy. *Vaccines*. 2013 Nov;1(4):527–49.
 49. Saini C, Ramesh V, Nath I. CD4 + Th17 Cells Discriminate Clinical Types and Constitute a Third Subset of Non Th1 , Non Th2 T Cells in Human Leprosy. *PLoS NegleTro Dis*. 2013 Jul;9(7):e2338.
 50. de Almeida-Neto FB et al. 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.

51. Santos DMB 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;86(1):40–9.
52. Martiniuk F et al. Lessons of leprosy: the emergence of TH17 cytokines during type II reactions (ENL) is teaching us about T-cell plasticity. *J Drugs Dermatol.* 2012 May;11(5):626–30.
53. Aarão TLR, Sousa JR, Botelho BS, Fuzii HT QJ. Correlation between nerve growth factor and tissue expression of IL-17 in leprosy. *Microb Pathog.* 2016 Jan;90(64–8).
54. Sommer A, Fabri M. Vitamin D Regulates Cytokine Patterns Secreted by Dendritic Cells to Promote Differentiation of IL-22-Producing T Cells. Waisman A, editor. *PLoS One.* 2015 Jun;10(6):e0130395.
55. Rodrigues J et al. Response of iNOS and its relationship with IL-22 and STAT3 in macrophage activity in the polar forms of leprosy. *Acta Trop.* 2017 Jul; 171:74-79.
56. Azizi G, Pouyani MR, Navabi S, Yazdani R, Kiaee F. The Newly Identified T Helper 22 Cells Lodge in. *IJHOSCR.* 2015;9(3):144–54.
57. Carneiro FRO, Dias LB. Th9 cytokines response and its possible implications in the immunopathogenesis of leprosy. *J Clin Pathol.* 2017 Jun;70(6):521–527.
58. Shu Y. et al. Epigenetic Variability of CD4+CD25+ Tregs Contributes to the Pathogenesis of Autoimmune Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2017 Apr;52(2):260–72.
59. Rosa N et al. Microbial Pathogenesis Relationship between growth factors and its implication in the pathogenesis of leprosy. *Microb Pathog.* 2014 Dec;77:66–72.
60. Marcio C, Oliveira B De, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR. Citocinas e Dor. *Rev Bras Anesthesiol.* 2011 Mar;61(2):260–5.
61. Saini C, Ramesh V NI. Increase in TGF- β 1 Secreting CD4+CD25+ FOXP3+ T Regulatory Cells in Anergic Lepromatous Leprosy Patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 Jan;8(1):23.

62. Quaresma JAS et al. Apoptotic activity and Treg cells in tissue lesions of patients with leprosy. *Microb Pathog*. 2014 Nov;76:84–8.
63. Bobosha K et al. T-Cell Regulation in Lepromatous Leprosy. 2014 Abr;8(4):2–10.
64. Palermo ML 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.
65. Montoya D, Modlin RL. Learning from leprosy: insight into the human innate immune response. *Adv Immunol*. 2010;105:1–24.
66. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol*. 2003 Feb;73(2):209–12.
67. Schlesinger LS. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J Immunol*. 1993 Apr;150(7):2920–30.
68. Frehel C, Rastogi N. *Mycobacterium leprae* surface components intervene in the early phagosome-lysosome fusion inhibition event. *Infect Immun*. 1987 Dec;55(12):2916–21.
69. Sibley LD, Franzblau SG, Krahenbuhl JL. Intracellular fate of *Mycobacterium leprae* in normal and activated mouse macrophages. *Infect Immun*. 1987 Mar;55(3):680–5.
70. Levy L, Ng H, Evans MJ, Krahenbuhl JL. Susceptibility of thymectomized and irradiated mice to challenge with several organisms and the effect of dapsone on infection with *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun*. 1975 May;11(5):1122–32.
71. Van der Wel N et al. *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell*. 2007 Jun;129(7):1287–98.
72. Sinsimer D, Fallows D, Peixoto B, Krahenbuhl J, Kaplan G MC. *Mycobacterium leprae* actively modulates the cytokine response in naive human monocytes. *Infect Immun*. 2010 Jan;78(1):293–300.
73. Holzer TJ, Nelson KE, Crispen RG AB. *Mycobacterium leprae* fails to stimulate phagocytic cell superoxide anion generation. *Infect Immun*. 1986 Feb;51(2):514–

- 20.
74. Chan J, Fujiwara T, Brennan P, Mcneil M, Turco SJ SJ. Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc Natl Sci USA*. 1989 Apr;86(7):2453–7.
75. Thangaraj HS, Lamb FI, Davis EO, Jenner PJ, Jeyakumar LH CM. Identification, sequencing, and expression of *Mycobacterium leprae* superoxide dismutase, a major antigen. *Infect Immun*. 1990 Dec;58(6):1937–42.
76. Adams LB, Franzblau SG, Vavrin Z, Hibbs JB KJ. l-arginine-dependent macrophage effector functions inhibit metabolic activity of *Mycobacterium leprae*. *J Immunol*. 1991 Sep;147(5):1642–6.
77. Loockwood DN, Suneetha L, Sagili KD, Chaduvula MV, Mohammed I van BW. Cytokine and protein markers of leprosy reactions in skin and nerves: baseline results for the North Indian INFIR cohort. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Dec;5(12):1327.
78. Convit J, Avila JL, Goihman M PM. A test for the determination of competency in clearing bacilli in leprosy patients. *Bull World Heal Organ*. 1972; 46(6):821–826.
79. Kaplan G CZ. Regulation of cell-mediated immunity in lepromatous leprosy. *Lepr Rev*. 1986;57(2):199–202.
80. Montoya D, Cruz D, Teles RM, Lee DJ, Ochoa MT, Krutzik SR et al. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. *Cell Host Microbe*. 2009 Oct;6(4):343–53.
81. Geissmann F; Gordon S HDA. Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2010 Jun;10(6):453–60.
82. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol*. 2009 Apr;27:451–83.
83. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Publ Gr Immunol*. 2005 Dec;5(12):953–64.

84. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol*. 2013 Jan;229:176–85.
85. Gordon S, Martinez FO. Alternative Activation of Macrophages : Mechanism and Functions. *Immunity*. 2010 May;32(5):593–604.
86. Lopes RL. Efeito da HSP70 extracelular de *Mycobacterium tuberculosis* na polarização de macrófagos murinos. *Trab conclusão Grad da Univ Fed do Rio Gd do Sul*; 2013.
87. Murray PJ, TA W. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. 2012 Oct;11(11):723–37.
98. Lockwood DNJ et al. Cytokine and Protein Markers of Leprosy Reactions in Skin and Nerves : Baseline Results for the North Indian INFIR Cohort. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Dec;5(12):e1327.
89. Mills CD. Macrophage arginine metabolism to ornithine/urea or nitric oxide/citrulline: a life or death issue. *Crit Rev Immunol*. 2001;21(5):399–425.
90. Salina ACG, Dias FN, Dejadi N, Niño VE MA. CBS33. Polarização de macrófagos M1/M2 pela fagocitose de células apoptóticas. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2014;35:206.
91. Benoit M, Desnues B, Mege J-L. Macrophage Polarization in Bacterial Infections. *J Immunol*. 2008 Sep;181(6):3733–9.
92. Zhu J et al. Parasitic antigens alter macrophage polarization during *Schistosoma japonicum* infection in mice. *Parasit Vectors*. 2014 Mar;7(1):1–9.
93. Xiao Q, Yang X, Yuexin W. Inhibition of macrophage polarization prohibits growth of human osteosarcoma. *Tumor Biol*. 2014 Aug;35(8):7611–6.
94. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004 Dec;25(12):677-86.
95. Grant GA, Goodkin R KM. Evaluation and surgical management of peripheral nerve problems. *Neurosurgery*. 1999 Apr;44(4):825–39.

96. Chang RB, Strohlic DE, Williams EK, Umans BD LS. Vagal Sensory Neuron Subtypes that Differentially Control Breathing. *Cell*. 2015 Apr;161(3):622–33.
97. Ordovas-Montanes J, Rakoff-Nahoum S, Huang S, Riol-Blanco L, Barreiro O von A, UH. The Regulation of Immunological Processes by Peripheral Neurons in Homeostasis and Disease. *Trends Immunol*. 2015 Oct;36(10):578–604.
98. Ziskind-Conhaim L. Physiological and morphological changes in developing peripheral nerves of rat embryos. *Brain Res*. 1988 Jul;470 (1):15–28.
99. Jessen KR, Mirsky R LA. Schwann Cells: Development and Role in Nerve Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015 May;8(7):204–87.
100. Chacha JJ, Lourenço S, Rivitti E, Sotto M, Melnikov P PL. Peripheral nervous system and grounds for the neural insult in leprosy. *An Bras Dermatol*. 2009 Sep;84(5):495–500.
101. Garbino JA, Heise CO MWJ. Assessing nerves in leprosy. *Clin Dermatol*. Apr-Jun2016;34(1):51–8.
102. Boku N et al. Impacts of the diagnosis of leprosy and of visible impairments amongst people affected by leprosy in Cebu, the Philippines. *Lepr Rev*. 2010 Jun;81(2):111–20.
103. Mendonça VA, Costa RD, Brito-Melo GE, Antunes CM T AL. Immunology of leprosy. *An Bras Dermatol*. 2008;83(4):343–50.
104. Armati P. *The Biology of Schwann Cells: Development, Differentiation and Immunomodulation*. Cambridge University Press; 2007.
105. Scollard DM. The biology of nerve injury in leprosy. *Lepr Rev*. 2008 Sep;79(3):242–53.
106. Pardillo FEF, Fajardo TT, Abalos RM, Scollard D, Gelber RH. Methods for the classification of leprosy for treatment purposes. *Clin Infect Dis*. 2007 Apr;44(8):1096–9.
107. Masaki T, Qu J, Cholewa-Waclaw J, Burr K, Raaum R, Rambukkana A. Reprogramming adult Schwann cells to stem cell-like cells by leprosy bacilli

- promotes dissemination of infection. *Cell*. 2013 Jan;152(1–2):51–67.
108. Teles RMB, Krutzik SR, Ochoa MT, Oliveira RB, Sarno EN, Modlin RL. Interleukin-4 regulates the expression of CD209 and subsequent uptake of *Mycobacterium leprae* by Schwann cells in human leprosy. *Infect Immun*. 2010 Nov;78(11):4634–43.
 109. Ford AL, Britton WJ, Armati PJ. Schwann cells are able to present exogenous mycobacterial hsp70 to antigen-specific T lymphocytes. *J Neuroimmunol*. 1993 Mar;43(1–2):151–9.
 110. Spierings E, De Boer T, Zulianello L, Ottenhoff TH. Novel mechanisms in the immunopathogenesis of leprosy nerve damage: the role of Schwann cells, T cells and *Mycobacterium leprae*. *Immunol Cell Biol*. 2000 Aug;78(4):349–55.
 111. Steinhoff U, Kaufmann SH. Specific lysis by CD8+ T cells of Schwann cells expressing *Mycobacterium leprae* antigens. *Eur J Immunol*. 1988 Jun;18(6):969–72.
 112. Masaki T, McGlinchey A, Cholewa-Waclaw J, Qu J, Tomlinson SR, Rambukkana A. Innate immune response precedes *Mycobacterium leprae*-induced reprogramming of adult Schwann cells. *Cell Reprogram*. 2014 Feb;16(1):9–17.
 113. Masaki T, Qu J, Cholewa-Waclaw J, Burr K, Raaum R, Rambukkana A. Reprogramming adult Schwann cells to stem cell-like cells by leprosy bacilli promotes dissemination of infection. *Cell*. 2013 Jan;152(1–2):51–67.