

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 26/10/2020.



**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 microbidas 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 Glicolípídeo 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.

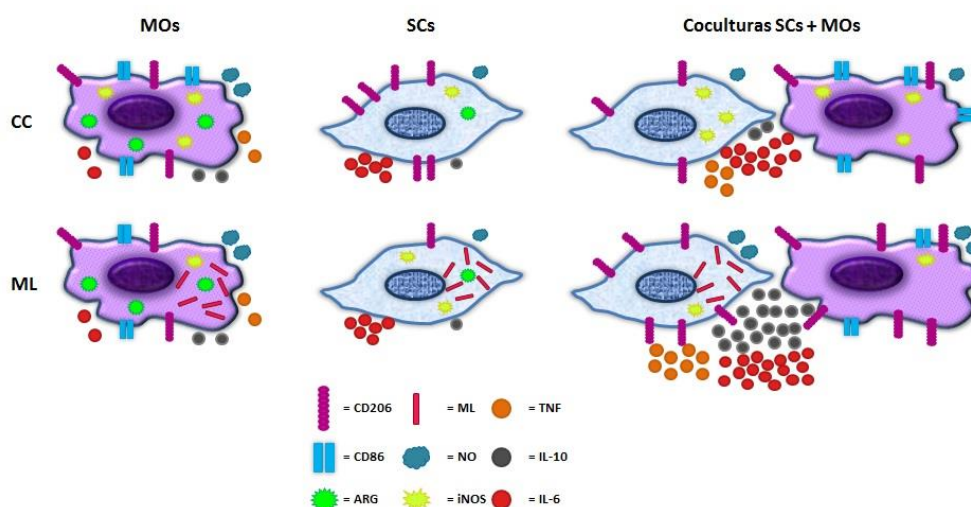
Quando a doença não é tratada ou se há atraso no diagnóstico, pode ocorrer comprometimento dos nervos periféricos resultando em deformidades físicas e incapacidades permanentes (15). Com a finalidade de interromper a cadeia de transmissão e evitar a ocorrência de tais deformidades, responsáveis pelo 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).

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, Tieko 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 Negl Trop 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-B1 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, Dejana 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, Storchlic 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, Riolo-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.