

Universidade Estadual Paulista
Faculdade Medicina de Botucatu

**Estudo da maturação de células dendríticas em indivíduos
portadores de hanseníase**

André Flores Braga

Botucatu – SP

2014

André Flores Braga

**Estudo da maturação de células dendríticas em indivíduos
portadores de hanseníase**

Dissertação apresentada ao
programa de Pós-graduação em
Doenças Tropicais da Faculdade de
Medicina de Botucatu, da UNESP,
para obtenção do título de mestre
em doenças tropicais.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vânia Nieto Brito de Souza

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Carla Pereira Latini

Botucatu – SP

2014

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia do Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, São Paulo, com o apoio financeiro CAPES e FAPESP (Processo N° 2009/01436-1).

AGRADECIMENTOS

A Profª Dra. Vânia Nieto Brito de Souza, minha eterna gratidão e amizade, por ter me acolhido e possibilitado a realização deste trabalho. Obrigada pela confiança, força e incentivo. Você é um exemplo de competência e generosidade.

Aos meus pais, Aida e José Marcelo que por uma vida de dedicação, amor e trabalho sempre me apoiaram e possibilitaram a oportunidade de realizar sonhos e conquistas.

Ao meu sobrinho Leonardo, que me faz feliz.

A minha irmã Marcela, por estar ao meu lado.

A toda a minha família e amigos.

As minhas amigas Patrícia Gigliotti, Mariela Peruchi e Bruna Gimenez por toda a ajuda na parte experimental e outras coisas do trabalho. Vocês foram imprescindíveis.

Ao Instituto de Lauro de Souza Lima, que abriu as portas desta respeitável instituição permitindo a realização deste trabalho.

A todos os pesquisadores que acabei aprendendo um pouco com cada um.

Aos funcionários do ILSL, que fizeram parte da minha passagem pelo instituto, em especial ao pessoal do CPD.

Aos pacientes hansenianos que aceitaram participar desta pesquisa, assim como aos indivíduos controle.

A todos que direta ou indiretamente estiveram presentes em minha vida colaborando para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

A hanseníase, causada pelo *Mycobacterium leprae*, apresenta diferentes quadros clínicos que refletem o perfil de resposta imunológica do hospedeiro. As células dendríticas (DCs) possuem um papel crucial na imunidade por induzirem o desenvolvimento da resposta imune adaptativa, porém a interação do *M. leprae* com estas células ainda é pouco entendida. Neste estudo buscamos contribuir para o entendimento da geração da resposta imune específica na hanseníase tendo como foco o papel das DCs frente ao *M. leprae*. DCs foram diferenciadas *in vitro* a partir de monócitos de pacientes tuberculóides e virchowianos, estimuladas com antígeno sonicado do *M. leprae* e analisadas quanto à expressão de marcadores de diferenciação e maturação. A expressão de genes de citocinas e receptores foi avaliada por qPCR. Paralelamente, monócitos de indivíduos saudáveis foram pré-incubados com o antígeno sonicado do bacilo e submetidos à diferenciação em DCs e à avaliação dos marcadores de superfície. A diferenciação de monócitos em DCs foi similar entre pacientes e controles saudáveis. A estimulação com o antígeno sonicado do *M. leprae* levou ao aumento na expressão de CD40, CD80, CD86 e HLA-DR tanto nos pacientes hansenianos como em indivíduos saudáveis. Entretanto, este estímulo parece ser insuficiente para a completa ativação das DCs uma vez que não resultou em aumento significativo nos níveis de CD83. A análise da expressão gênica também demonstrou estimulação parcial das DCs pelo *M. leprae*. A pré-incubação de monócitos com o antígeno sonicado do bacilo comprometeu o processo de diferenciação em DCs e a maturação destas. Em conjunto, nossos resultados sugerem que o antígeno sonicado do *M. leprae* prejudicou a diferenciação de monócitos em DCs e desencadeou uma ativação incompleta das DCs tanto em pacientes quanto em controles saudáveis o que pode contribuir para os mecanismos de escape do bacilo.

ABSTRACT

Leprosy is caused by *Mycobacterium leprae* and characterized by distinct clinical manifestations that reflect the immune response of the host. Dendritic cells (DCs) play a crucial role in immunity inducing the development of adaptive immune response, however the interaction of DCs with *M. leprae* is poorly understood. This study aims to contribute to the understanding of the generation of specific immune response in leprosy patients focusing on the role of DCs against the *M. leprae*. DCs were differentiated *in vitro* from monocytes of lepromatous and tuberculoid patients, stimulated with sonicated antigen of *M. leprae* and analyzed for the expression of differentiation and maturation markers. The expression of mRNA to cytokines and receptors was assessed by qPCR. In parallel, monocytes from healthy controls were preincubated with the sonicated antigen of *M. leprae*, differentiated into DCs and evaluated in respect to the expression of surface markers. Differentiation of monocytes into DCs was similar between patients and healthy controls. After stimulation with sonicated antigen of *M. leprae* DCs from leprosy patients and healthy controls showed increased expression of CD40, CD80, CD86 and HLA-DR but this stimulation seems to be insufficient for complete activation of DCs since it was not observed an increase in the level of CD83. The analysis of gene expression also showed partial stimulation of DCs by *M. leprae*. The pre-incubation of monocytes with sonicated antigen of *M. leprae* resulted in impairment in the differentiation into DCs and maturation. Altogether our results suggest that the sonicated antigen of *M. leprae* impaired differentiation of monocytes into DCs and triggered an incomplete activation of DCs both in patients and healthy controls that may contribute among the mechanisms of escape used by *M. leprae*.

LISTA DE ABREVIACÕES

°C	Graus Celsius
µg	Miligrama
a.C.	Antes de Cristo
ACD	Ácido Cítrico, Citrato de Sódio e Dextrose
APC	<i>Antigen-presenting cell</i> (Célula apresentadora de antígeno)
B2M	<i>Beta-2 microglobulin</i> (Beta-2 microglobulina)
BB	<i>Borderline Borderline</i> (Borderline Borderline)
BD	Becton, Dickinson and Company
BL	<i>Borderline lepromatous</i> (Borderline virchowiano)
BT	<i>Borderline tuberculoid</i> (Borderline tuberculóide)
CC	Cultura controle
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (Grupamento de diferenciação)
CDPs	<i>Monocytes and committed DC progenitors</i> (progenitor comum de DCs)
CO ₂	Dióxido de carbono
CQM	Coquetel de maturação
CR3	<i>Complement receptor 3</i> (Receptor de complemento 3)
Ct	<i>Threshold cycle</i>
DCs	<i>Dendritics cells</i> (Células dendríticas)
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
dNTP	<i>Deoxynucleotide</i> (Desoxinucleotídeo)
DTT	<i>Dithiothreitol</i> (Ditiotreitol)
ENL	<i>Erythema nodosum leprosum</i> (Eritema nodoso hansênico)
EUA	Estados Unidos da América
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> (Isotiocianato de fluoresceína)
FLT3L	<i>Flt3 ligand</i> (Ligante do Flt3)
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase)

GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> (Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos)
GMPs	<i>Granulocyte-macrophage progenitors</i> (progenitores de granulócitos-macrófagos)
HLA	<i>Human leukocyte antigens</i> (Antígenos leucocitários humanos)
ICAM-1	<i>Inter-Cellular Adhesion Molecule-1</i> (Molécula de adesão intracelular-1)
IFN-γ	Interferon-gama
IL-1β	Interleucina-1 beta
IL-3	Interleucina-3
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-12p70	Interleucina-12 heterodímero ativado
IMDM	<i>Iscoe's Modified Dulbecco's Media</i> (Meio de Dulbecco modificado por Iscoe)
MFI	<i>Median fluorescence intensity</i> (Intensidade média de fluorescência)
LILRA2	<i>Leukocyte Ig-like receptor A2</i> (Receptor leucocitário tipo domínio de imunoglobulina A2)
LL	<i>Lepromatous Lepromatous</i> (Virchowiano virchowiano)
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
Man-LAM	<i>Mannosylated LAMs</i> (lipoarabinomanana contendo manose)
MDP	<i>Monocyte and dendritic cell progenitor</i> (precursor de macrófagos, monócitos e DCs)
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Complexo principal de histocompatibilidade)
ML	Antígeno sonicado do <i>Mycobacterium leprae</i>
ml	Mililitro
MLPs	<i>Multi-lymphoid progenitor</i> (Progenitores multi-linfóides)
MLR	<i>Mixed leukocyte reaction</i> (reação mista de linfócitos)
MMP-II	<i>Major membrane protein II</i> (Proteína principal de membrana II)
mRNA	<i>Messenger RNA</i> (RNA mensageiro)

ng	Nanograma
NK	<i>Natural killer cell</i> (Célula exterminadora natural)
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> (Padrões moleculares associados aos patógenos)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Solução salina tamponada com fosfato)
PE	<i>Phycoerythrin</i> (Ficoeritrina)
PerCP	<i>Peridinin-chlorophyll-protein complex</i> (Proteína clorofílica de piridina)
PGE2	<i>Prostaglandin E2</i> (Prostaglandina E2)
PGL-I	<i>Phenolic glycolipid-I</i> (Glicolípídeo fenólico-I)
PPAR-γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma</i> (Receptor dos ativadores da proliferação dos peroxissomos)
PRRs	<i>Pattern recognition receptor</i> (Receptores de reconhecimento padrão)
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia de polimerase quantitativa)
rGM-CSF	<i>Recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> (Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos recombinante)
rIL-4	<i>Recombinant interleukin-4</i> (Interleucina-4 recombinante)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
RR	Reação reversa
SBF	Soro bovino fetal
SCF	<i>Stem cell factor</i> (Fator de célula-tronco)
TGF-β	<i>Transforming growth factor-β</i> (Fator de crescimento e transformação-beta)
Th	<i>T helper cells</i> (linfócitos T CD4 ⁺ auxiliares)
Th0	<i>T helper cells naïve</i> (linfócitos T CD4 ⁺ auxiliares virgens)
Th1	<i>T helper cells signal 1</i> (linfócitos T CD4 ⁺ auxiliares tipo 1)
Th2	<i>T helper cells signal 2</i> (linfócitos T CD4 ⁺ auxiliares tipo 2)
Th9	<i>T helper cells signal 9</i> (linfócitos T CD4 ⁺ auxiliares tipo 9)
Th17	<i>T helper cells signal 17</i> (linfócitos T CD4 ⁺ auxiliares tipo 17)
Th22	<i>T helper cells signal 22</i> (linfócitos T CD4 ⁺ auxiliares tipo 22)
TLRs	<i>Toll-like receptors</i> (Receptores do tipo Toll)
TNF	<i>Tumor necrosis fator</i> (Fator de necrose tumoral)
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i> (Fator de necrose tumoral-alfa)

TNFR	<i>Tumor necrosis factor receptor</i> (Receptor do fator de necrose tumoral)
TT	<i>Tuberculoid Tuberculoid</i> (Tuberculóide tuberculóide)
U	Unidade
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Análise por citometria de fluxo da expressão de DC-SIGN, CD11c, ICAM-1 em intensidade media de fluorescência (MFI) e CD1a em porcentagem de células positivas (%)	27
Figura 2	Análise por citometria de fluxo da expressão de CD40, CD80, CD86, HLA-DR e CD83 em intensidade média de fluorescência (MFI).	29
Figura 3	Análise por PCR tempo real da expressão dos genes TLR1, TLR2 e TLR9.	31
Figura 4	Análise por PCR tempo real da expressão dos genes CLEC7A e CD209.	32
Figura 5	Análise por PCR tempo real da expressão dos genes IL15, IL15RA e TGFB1.	34
Figura 6	Análise por PCR tempo real da expressão dos genes IL10, IL12B e TNF.	36
Figura 7	Expressão de CD11c, DC-SIGN e ICAM-1 em porcentagem de células positivas (%) e intensidade média de fluorescência.	38
Figura 8	Expressão de CD80, CD83, HLA-DR e CD40 em porcentagem de células positivas (%) e intensidade média de fluorescência.	39

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1. Hanseníase	1
1.2. A resposta imunológica	6
1.3. Células Dendríticas (DCs)	9
1.4. Moléculas envolvidas no reconhecimento de patógenos e ativação de linfócitos por DCs	11
1.5. Resposta Imune na Hanseníase	17
1.6. DCs e hanseníase	18
2. Objetivos	20
3. Metodologia	21
3.1. Casuística	21
3.2. Diferenciação de DCs a partir de monócitos	21
3.3. Maturação das DCs	22
3.4. Análise das DCs derivadas de monócitos	23
3.4.1. Citometria de fluxo	23
3.4.2. Expressão de citocinas e receptores	24
3.5. Análise da incubação prévia de monócitos com o antígeno sonicado do <i>M. leprae</i> na diferenciação e maturação de DCs	25
3.6. Análises dos Dados	25
4. Resultados	26
4.1. Citometria de fluxo	26
4.2. Análise da expressão de citocinas e receptores por mRNA	30
4.3. Análise da incubação prévia de monócitos com o antígeno sonicado do <i>M. leprae</i> na diferenciação e maturação de DCs	37

5. Discussão	40
6. Conclusões	48
7. Referências bibliográficas	49

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hanseníase

Acredita-se que os primeiros documentos escritos sobre a hanseníase datam de 600 A.C. na Índia, no entanto, outros relatos de 1.400 A.C. parecem fazer referências a doença, mas ainda sem confirmação. Posteriormente, há citações chinesas de cerca de 500 A.C. mencionando características clássicas da hanseníase. É provável que a doença tenha se espalhado para o Oriente Médio e locais próximos à Grécia por comerciantes e exércitos. Tropas de Alexandre, o Grande durante a campanha na Índia entre 327-325 A.C. podem ter contribuído para sua disseminação. Sabe-se que a expansão da hanseníase ocorreu durante as conquistas romanas, atingindo principalmente as áreas da bacia do Mediterrâneo e o ocidente da Europa, sendo intensificada posteriormente pelas cruzadas. Não se sabe ao certo como ocorreu o declínio da doença durante a Idade Média; algumas hipóteses foram levantadas, como o aumento da qualidade de vida ou a grande devastação causada pela peste negra que eliminou grande parte da população na época ou ainda o aumento de números de casos de tuberculose, que pode ter acarretado uma resposta imunológica cruzada. Com o avanço da colonização europeia e a venda de escravos a doença se disseminou para vários locais, incluindo a África ocidental e todo o hemisfério ocidental, entre outros (1,2).

A hanseníase é causada pelo *Mycobacterium leprae* e afeta principalmente os nervos periféricos e a pele. A doença quando não tratada pode levar a complicações do quadro clínico trazendo problemas não somente físicos, mas também no vínculo familiar e social (3–5).

O *M. leprae* pertence ao gênero *Mycobacterium* do filo das Actinobactérias, do qual também fazem parte o *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium avium*, entre outras. O bacilo não é virulento e possui uma baixa taxa de multiplicação,

aproximadamente uma divisão a cada 13 dias (1,5). Trata-se de um patógeno intracelular obrigatório que possui tropismo por células de Schwann, pertencentes ao sistema nervoso periférico, o que acarreta o comprometimento de nervos distais no curso da doença e desmielinização. Estudos demonstram que a ligação molecular entre o *M. leprae* e as células de Schwann é específica, uma vez que envolve componentes da parede celular encontrados exclusivamente nesse bacilo (3).

Apesar de inúmeros testes terem sido realizados, não foi possível a cultura do *M. leprae in vitro*, o que dificulta a obtenção de grandes quantidades deste para o estudo da doença. Dezenas de modelos animais foram avaliados na busca de alternativas para o cultivo do bacilo, mas somente em 1960, Shepard demonstrou a multiplicação bacilar em coxim plantar de camundongos, o que abriu novas portas para o avanço no entendimento da doença (4). O *M. leprae* foi encontrado em tatus nos Estados Unidos e em três espécies de primatas, porém esses achados não são significantes quando levada em consideração a disseminação da doença em humanos (1).

O mecanismo exato de transmissão da doença ainda não é conhecido. Pressupõe-se que o contágio se dê pelas vias aéreas, uma vez que aproximadamente cerca de 10 milhões de bacilos íntegros podem ser ali encontrados na forma virchowiana da doença. Além disso, o bacilo é capaz de sobreviver até 24 horas fora do organismo em gotículas da secreção nasal, o que evidencia esta hipótese de transmissão (1). É sabido que somente o convívio prolongado com pacientes contendo grandes cargas bacilares pode acarretar o desenvolvimento da doença e aproximadamente 95% das pessoas possuem resistência natural após exposição ao bacilo, evidenciando o componente genético da susceptibilidade à doença (1,5).

Fatores genéticos já eram citados antes mesmo da descoberta do agente causador da doença e vêm sendo analisados ao longo do tempo em diferentes estudos. Entretanto,

devido à complexidade da interação patógeno-hospedeiro, conformação poligênica, amplo espectro de manifestações clínicas e ocorrência da hanseníase em diferentes partes do mundo, uma resposta certa e definitiva no que se diz respeito à suscetibilidade genética ainda não é possível (6).

O padrão ouro no diagnóstico da hanseníase é a biópsia da lesão de pele que requer um patologista experiente para o diagnóstico diferencial de tuberculose cutânea, sarcoidose, granuloma anular e outras micobacterioses (4).

Segundo a Organização Mundial de Saúde o número de casos de hanseníase vem caindo ao longo do tempo, mas muitos indivíduos continuam sendo infectados anualmente. Em 2012, foram registrados 232.857 casos novos no mundo. No Brasil, 33.303 casos novos foram notificados neste ano, o que coloca o país em segundo lugar em número de doentes, ficando atrás apenas da Índia que registrou um total de 134.752 casos novos no mesmo período (7). A queda no número de casos alcançada no século passado deve-se principalmente à melhoria no tratamento da doença.

O tratamento da hanseníase foi feito inicialmente com óleo de chaulmoogra, retirado de uma planta nativa da Índia, *Hydnocarpus wightiana*. O uso do óleo manteve-se unânime até 1941, quando no Leprosário Nacional em Carville EUA, Guy Faget usou a dapsona em pacientes hansenianos. O uso deste medicamento trouxe muitas mudanças e simplificou o tratamento da hanseníase. A partir de 1960 começaram a surgir casos de resistência à droga e a monoterapia com dapsona foi considerada não mais eficaz contra a doença (8).

Em meados dos anos 1960 e 1970, foram descobertas várias drogas para o tratamento da hanseníase, entre elas a clofazimina e a rifampicina, e em 1981 a Organização Mundial de Saúde, adotou um regime de multidrogas em substituição à monoterapia com dapsona, o qual persiste até os dias atuais. As drogas que compõem o

tratamento variam de acordo com a forma clínica: pacientes multibacilares recebem rifampicina, clofazimina e dapsona enquanto os paucibacilares somente rifampicina e dapsona. Com base nos bons resultados obtidos com o uso da poliquimioterapia, em 1991, a Assembleia Mundial de Saúde propôs uma resolução para a eliminação da hanseníase como problema de saúde pública até o ano de 2000, cujo conceito entende-se por prevalência de menos de um caso por 10.000 habitantes (1,8,9).

A hanseníase possui um amplo espectro de manifestações clínicas que refletem padrões distintos de resposta imunológica do hospedeiro ao bacilo. Ridley e Jopling (10), propuseram um modelo de classificação para a doença que consiste em 5 grupos, levando em consideração a resposta imunológica frente à doença, o qual é bastante utilizado até os dias atuais. Lesões muito recentes com poucos bacilos e inclassificáveis são chamadas indeterminadas enquanto as demais formas clínicas são classificadas em 2 pólos estáveis e 3 formas intermediárias.

No polo tuberculóide identificam-se poucas lesões, bem demarcadas e a biópsia apresenta-se como uma inflamação granulomatosa bem desenvolvida com resposta imune muito acentuada, os bacilos são raros e o comprometimento dos nervos é frequente devido à intensa resposta imune celular (4,11). O desfecho da doença neste polo pode ser a cura espontânea, já que o hospedeiro responde imunologicamente de maneira efetiva contra o bacilo, porém é comum o encontro de sequelas mais precoces nesses pacientes, como a chamada “mão em garra”, que ocorre devido à destruição dos nervos pela resposta imune do indivíduo contra o bacilo (12).

Antagonicamente, o polo virchowiano é caracterizado por um grande número de infiltrados bacilíferos no hospedeiro e resposta imune predominantemente humoral, a qual não é efetiva contra o *M. leprae* devido ao seu caráter intracelular. Notam-se neste

polo da doença numerosas lesões nodulares sem delimitação clara e a biópsia revela um grande número de bacilos e formação de microcolônias.

A forma clínica intermediária é conhecida como dimorfa e caracterizada por instabilidade imunológica e episódios reacionais. Manifestações clínicas de outras formas da doença podem ser observadas nestes pacientes que apresentam alta carga bacilar, lesões na pele e nervos e títulos elevados de anticorpos. Usualmente são encontradas muitas manchas ou mesmo placas eritematosas; o comprometimento neural é frequente e precoce e pode resultar em incapacidades físicas (13,14). A histologia difere de outras formas pelo fato do bacilo ser encontrado na derme e também nos nervos, existe ainda uma zona de Grenz bem definida e os granulomas são na maioria compostos por células epitelióides com alguns linfócitos e sem células gigantes (12). Há ainda os subgrupos borderline tuberculóide (BT) e borderline virchowiano (BL), cuja distinção se baseia no aumento do número de bacilos nos granulomas e ramos nervosos, indiferenciação progressiva dos macrófagos e diminuição do número de linfócitos presentes nas lesões. O grupo borderline borderline (BB) apresenta lesões com tamanho e número intermediários na forma de placas eritematosas irregulares com bordas exteriores indefinidas e centro ovalado e hipopigmentado com anestesia moderada. A baciloscopia resulta normalmente em 3+ ou 4+ (10,15).

Além do espectro clínico da hanseníase, compõe ainda a doença, em muitos casos, os estados reacionais que podem ocorrer em qualquer fase da doença até mesmo após sua cura baciloscópica. Os estados reacionais incluem duas categorias: as reações tipo 1 ou reações reversas (RR) e as reações tipo 2, mais conhecidas como eritema nodoso hansênico (ENL). A reação tipo 1 acomete principalmente pacientes paucibacilares (TT, BT), mas pode afetar também multibacilares (BB e BL) e se deve, possivelmente, a resposta imune celular exacerbada frente aos antígenos do *M. leprae*,

podendo indicar intensa liberação de antígenos no organismo. Esse tipo de reação dura algumas semanas e pode acarretar danos neurológicos, ocorrendo neuropatia sensitiva e motora. A reação tipo 2 ocorre em pacientes multibacilares (BB, BL, LL) e é caracterizada pelo aparecimento rápido e abrupto de lesões eritematosas que podem surgir mesmo sem a preexistência de lesões. Também característico dessa reação é a inflamação sistêmica, pode ainda haver o comprometimento de outros órgãos além de pele e nervos, como por exemplo, linfonodos, fígado, baço, testículos, olhos, articulações entre outros (15).

1.2. A resposta imunológica

O sistema imune é responsável pela proteção do organismo, combatendo possíveis agentes agressores e buscando sempre o equilíbrio. Compondo a primeira linha de defesa, encontra-se a imunidade inata, da qual fazem parte as barreiras físicas, químicas, biológicas, células especializadas e moléculas solúveis (16,17).

Quando um agente infeccioso rompe as barreiras físicas de proteção, faz-se necessária a ativação de mecanismos que desencadeiam os processos imunológicos. O reconhecimento de diferentes patógenos ocorre por meio de moléculas presentes na superfície destes, as quais constituem os chamados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs); este reconhecimento apresenta baixa especificidade, uma vez que os PAMPs estão presentes em diversos patógenos. Alguns exemplos de PAMPs são: lipopolissacarídeos, manose e ácido teicóico (16).

Os PAMPs são reconhecidos por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) presentes nas células do hospedeiro, dos quais fazem parte diversos receptores, entre eles, os receptores do tipo Toll (TLRs), presentes principalmente em macrófagos, células dendríticas (DCs) e neutrófilos. As funções dos PRRs incluem: opsonização,

fagocitose, ativação de sinais pró-inflamatórios e indução de apoptose, entre outras. Esses receptores são codificados pelo DNA germinativo o que resulta num repertório limitado em comparação com os receptores específicos dos linfócitos T e B, componentes da imunidade adaptativa que empregam rearranjo somático de genes para gerar uma grande diversidade de receptores (18,19).

A imunidade adaptativa opera em conjunto com a imunidade inata para a destruição de patógenos e se desenvolve pela repetição de estímulos por diversos antígenos, sendo subdividida em duas linhas principais: a imunidade humoral, cuja principal célula atuante é o linfócito B, responsável pela produção de anticorpos característicos deste tipo de resposta; e a imunidade mediada por células que combate microrganismos intracelulares e possui um papel importante na ativação de fagócitos; sendo o linfócito T a célula mais atuante neste tipo de resposta (17).

A interação dos linfócitos T com outras células se faz necessária para a ativação da resposta imune, e é iniciada pela apresentação de antígenos ligados a proteínas especializadas chamadas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Este complexo é dividido em três classes segundo seu locus gênico no cromossomo 6p21: os genes de classe I incluem HLA A, B e C; os genes da classe II abrangem o HLA-DR, DP e DQ; e a classe III compreende genes codificantes de proteínas do sistema complemento, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) entre outros. As moléculas de MHC de classe I, encontradas em todas as células nucleadas, apresentam antígenos próprios para os linfócitos T CD8⁺, que promovem a destruição destas células após o reconhecimento antigênico. Por outro lado, as moléculas de MHC de classe II são expressas em DCs, macrófagos e linfócitos B, e estão envolvidas na apresentação de antígenos aos linfócitos T CD4⁺ auxiliares que estimulam o desenvolvimento de respostas imunes específicas cujos mecanismos efetores incluem

ativação de macrófagos, para destruição de patógenos fagocitados, e de linfócitos B para produção de anticorpos contra microrganismos extracelulares. É sabido que a região gênica do HLA é a mais polimórfica do genoma, por isso existem inúmeros estudos de associação genética dessa região em diversas patologias (16,20–22).

Os linfócitos T $CD4^+$ auxiliares (Th) são responsáveis por direcionar os diversos tipos de resposta imune e orquestrar a destruição de diferentes patógenos por outras células; são subdivididos de acordo com sua função e pelo tipo de resposta que desencadeiam. Quando ocorre a apresentação de antígenos por uma célula apresentadora de antígeno (APC) a um linfócito virgem ou naíve este é chamado de linfócito T auxiliar tipo 0 (Th0), pois ainda não sofreu diferenciação. Após esta apresentação ele pode se diferenciar para os perfis padrão tipo 1 (Th1) e padrão tipo 2 (Th2) ou outro dos subtipos identificados mais recentemente como Th17, Th9 e Th22; esses subtipos de linfócitos T $CD4^+$ são morfologicamente indistinguíveis, porém apresentam padrões distintos de produção de citocinas e, conseqüentemente, diferentes respostas efetoras (23).

Linfócitos Th1 produzem a interleucina 2 (IL-2), responsável pela indução da proliferação de linfócitos T em geral e estimulação da citotoxicidade por linfócitos T $CD8^+$. Outra citocina característica desta subpopulação é o interferon gamma ($IFN-\gamma$) que induz a ativação de macrófagos para a destruição de patógenos intracelulares, como micobactérias, fungos e protozoários e também é capaz de promover a ativação das células matadoras naturais ou natural killers (NK). A interleucina 12 (IL-12) produzida por DCs, assim como macrófagos estimulados por $IFN-\gamma$, age diretamente na indução da resposta Th1 além de estimular a produção do próprio $IFN-\gamma$ pelos linfócitos T. A resposta do tipo Th1 é essencial para o controle da replicação e destruição dos

patógenos, entretanto pode contribuir para doenças autoimunes como artrite reumatoide e esclerose múltipla (23–25).

Linfócitos Th2 estão envolvidos nas respostas imunes humorais, e produzem varias citocinas, entre elas a interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 10 (IL-10), as quais favorecem a produção de anticorpos pelos linfócitos B e participam das respostas alérgicas e imunidade em infecções por helmintos, além de suprimirem respostas do tipo Th1 (24).

1.3. Células Dendríticas (DCs)

As DCs foram citadas pela primeira vez em 1868 por Paul Langerhans; sendo nesta época denominadas células de Langerhans e classificadas como células nervosas cutâneas. Somente em 1973, Steinman e Cohn (26), observando células no baço de camundongos criaram a terminologia “Células Dendríticas” devido a sua morfologia característica desta população de células (27).

A partir da década de 90, o estudo das DCs sofreu um grande avanço e várias combinações de citocinas foram avaliadas para diferenciação *in vitro* destas células, entre elas: fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF), TNF- α , IL-4, fator de célula-tronco (SCF), fator de crescimento e transformação beta (TGF- β), interleucina 3 (IL-3) e ligante do Flt3 (Flt3L) (28). Atualmente o modelo mais amplamente utilizado para a diferenciação *in vitro* das DCs é baseado na combinação de GM-CSF e IL-4 (29).

As DCs estão espalhadas estrategicamente em locais mais vulneráveis à invasão por patógenos, uma vez que são as mais especializadas APCs, capturando estes e promovendo a apresentação de seus antígenos, fazendo assim a ligação entre a imunidade inata e adaptativa (30). A classificação das DCs pode ser feita de várias

maneiras considerando-se origem, localização, função, bem como marcadores de superfície, o que demonstra a complexidade e dificuldade em categorizá-las.

Quanto à origem das DCs, é sabido que células-tronco hematopoéticas diferenciam-se em 2 populações: os progenitores de granulócitos-macrófagos (GMPs) e os progenitores multi-linfóides (MLPs). Os GMPs originam monócitos, macrófagos, megacariócitos, granulócitos e eritrócitos enquanto os MLPs originam linfócitos B, linfócitos T e células NK (31). O chamado precursor de macrófagos, monócitos e DCs (MDP) é derivado dos progenitores de granulócitos-macrófagos; acredita-se que este precursor gere posteriormente um progenitor exclusivo de DCs chamado de progenitor comum de DCs (CDP). Doulatov et al. (32), entretanto, demonstraram que os MLPs humanos além de originarem células de origem linfóide, podem originar também células mielóides, como, DCs e macrófagos; foi visto ainda neste estudo que a ativação pelo LPS via TLR4 promove a diferenciação dos progenitores multi-linfóides em DCs.

Há ainda a classificação das DCs como convencionais e não convencionais. Fazem parte das convencionais: (i) DCs migratórias, que se localizam em diferentes tecidos e órgão e capturam antígenos migrando para os órgãos linfóides próximos para a apresentação antigênica e (ii) DCs linfóides, que por sua vez, se localizam nos órgãos linfóides como baço e timo e linfonodos e não possuem a capacidade migratória. No grupo das DCs não convencionais estão as DCs plasmocitóides, que produzem altos níveis de IFN do tipo 1 em resposta a infecções virais e as DCs derivadas de monócitos *in vitro* (33).

Quanto à interação entre linfócitos T e DCs, duas possibilidades têm sido propostas: (i) a existência de uma subpopulação de DCs regulatórias especializadas na indução de tolerância - existem evidências para tal, mas sem um consenso, e (ii) o

estágio de maturação ou ativação das DCs determina a capacidade desta em ativar o sistema imune ou induzir tolerância (34).

Além da apresentação de antígenos, as APCs possuem outras funções importantes na ativação de linfócitos T que correspondem a co-estimulação e a produção de diferentes citocinas. Neste contexto, o primeiro sinal durante a interação das DCs com os linfócitos T é o reconhecimento do peptídeo antigênico ligado ao MHC pelo receptor de célula T; paralelamente ocorre a co-estimulação dada pela ligação de moléculas de superfície presentes nas DCs a receptores específicos encontrados nos linfócitos T, o que é fundamental para ativação destes. Ocorre então a produção de citocinas a qual é necessária para a resposta completa; a produção ou a falta de produção da IL-12, por exemplo, é o sinal final para a diferenciação dos linfócitos T em Th1 ou Th2, respectivamente (28,35,36).

1.4. Moléculas envolvidas no reconhecimento de patógenos e ativação de linfócitos por DCs

Devido à expressão diferencial de moléculas, que podem participar do reconhecimento de patógenos e ativação de linfócitos, ao longo dos estágios de vida das DCs, o estudo destas moléculas permite analisar características importantes como nível de diferenciação, maturação, eficiência na apresentação de antígenos, capacidade de ativação de linfócitos T, entre outras (37).

A molécula CD1a é um marcador das DCs e atua na apresentação de antígenos aos linfócitos T. Enquanto a apresentação de peptídeos é feita pelas moléculas do MHC de classe II, CD1a é responsável pela apresentação de lipídeos aos linfócitos T. De acordo com Manolova et al. (45), após a produção e montagem de CD1a no retículo endoplasmático ocorre a migração desta para a membrana plasmática associada a

ligantes lipídicos, chaperones ou vazia. Na membrana plasmática a molécula está pronta para a troca dos lipídios por outros presentes no meio extracelular, dependendo da afinidade e concentração, os quais podem ser do próprio organismo, presentes normalmente na linfa, ou oriundos de fontes exógenas, como microrganismos. A ligação de lipídeos exógenos à molécula CD1a promove sua estabilização e prolonga sua permanência na membrana plasmática. Na ausência de ligantes a molécula pode ser internalizada e degradada. Algumas funções da molécula CD1a foram propostas em conjunto com os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR- γ). DCs imaturas CD1a-PPAR- γ ⁺ possuem maior capacidade de internalização em comparação com as CD1a-PPAR- γ ⁻ e também produzem níveis mais altos de IL-10. A população de CD1a-PPAR- γ ⁻, por outro lado, possui perfis de produção de citocinas e quimiocinas diferentes, como maior produção de IL-12p70 (46).

Importantes moléculas para adesão celular são as moléculas conhecidas como CD11/CD18. Estas consistem em quatro β 2 integrinas presentes na superfície celular: CD11a, CD11b, CD11c e CD11d, as quais são expressas somente nos leucócitos. A molécula CD11c/CD18 é encontrada em células mielóides, DCs, células NK e populações de linfócitos T e B ativados e aparentemente é importante na mediação de alguns tipos de interações com os monócitos. Nas células de origem mielóide a molécula CD11c apresenta importantes funções, entre elas, ligação ao iC3b, quimiotaxia, distribuição e migração, adesão ao endotélio e citotoxicidade celular dependente de anticorpo (38–40). O aumento da expressão de CD11c/CD18 em leucócitos circulantes ocorre em várias reações inflamatórias associadas à ativação de neutrófilos, como em pacientes com queimaduras, sepse, hemodiálise, lúpus eritematoso sistêmico e *diabetes mellitus*. *In vivo*, a expressão de CD11c pode ser usada para a distinção de DCs imaturas de DCs maduras, células imaturas CD11c negativas são

precursores derivados da medula óssea que posteriormente se transformarão em DCs teciduais como, por exemplo, as células de Langerhans e DCs CD11 positivas são derivadas dos tecidos já ativadas que se dirigem aos linfonodos para estimulação de linfócitos T (41).

Algumas moléculas expressas pelas DCs participam do reconhecimento de patógenos, como L-SIGN, DC-SIGN e Dectina-1, as quais são lectinas do tipo C. A molécula DC-SIGN atua como o principal receptor para o bacilo *M. tuberculosis* em humanos e é exclusivamente expressa em DCs maduras e imaturas, não sendo encontrada em monócitos, linfócitos T, linfócitos B, timócitos, e células da medula óssea CD34⁺. Estudos demonstram que DC-SIGN atua como um receptor de reconhecimento padrão e receptor de adesão das DCs, e é importante para a migração, resposta inflamatória, ativação de linfócitos T, iniciação da resposta imune, bem como para o escape de patógenos e tumores (47).

A molécula L-SIGN é homologa a DC-SIGN e se liga a glicanas contendo manose. Apesar da grande semelhança entre estas duas moléculas, algumas diferenças são encontradas: L-SIGN, ao contrário de DC-SIGN, não se liga ao antígeno de Lewis^x, devido à variação de um único aminoácido e é expressa em células endoteliais do fígado e linfonodos. Inicialmente foi pensado que esta molécula não era expressa por DCs *in vivo* ou em DCs derivadas de monócitos em cultura, porém já existem relatos de expressão em DCs diferenciadas a partir de monócitos e o reconhecimento de componentes micobacterianos por L-SIGN também já foi descrito (48,49). A ativação do L-SIGN pode induzir respostas imunossupressoras e contribuir para uma possível tolerogenicidade (50).

A molécula Dectina-1 reconhece β -glucanas encontradas em grande quantidade na parede de *Candida albicans*, por exemplo. Outros fungos também são reconhecidos

pela Dectina-1, entre eles, *Aspergillus fumigatus*, *Pneumocystis carinii*, *Coccidioides posadasii*, *Microsporum audouinii*, e *Trycophyton rubrum*. Estudos de mRNA revelaram que tanto a Dectina-1 quanto a Dectina-2 são expressas em altos níveis por DCs da linhagem XS e por DCs derivadas da medula óssea (51). Um estudo relatou que camundongos nocautes para este gene se mostraram altamente susceptíveis a *C. albicans* e os macrófagos destes animais apresentaram um comprometimento no reconhecimento de β -Glucana e decréscimo na produção de TNF- α , porém mantiveram normais as respostas dependentes de TLRs (52). Outro estudo, entretanto, demonstrou que DCs com deficiência na expressão de Dectina-1 tiveram comprometimento na indução da expressão de citocinas por β -Glucana, mas responderam normalmente ao zimosan; foi visto ainda que os macrófagos deficientes para Dectina-1 não apresentaram nenhum prejuízo no reconhecimento de *C. albicans* viva, nem demonstraram susceptibilidade aumentada a este fungo (53). Em relação às micobacterias, já foi demonstrado que o *M. tuberculosis* interage com a Dectina-1 presente nas DCs e essa ligação promove a produção de IL-1, IL-6, interleucina 23 (IL-23) e TNF- α . Além disso, tal ligação resulta na ativação das DCs para indução do perfil Th17 com alto potencial inflamatório (54,55).

A molécula CD83 é uma glicoproteína de 45-kD membro da superfamília das imunoglobulinas, expressa predominantemente na superfície de DCs, incluindo as células de Langerhans e células reticulares interdigitantes, presentes nas zonas dos linfócitos T nos órgãos linfóides. Embora a função do CD83 ainda seja discutida, sua estrutura similar a outros membros da superfamília das imunoglobulinas aliada a seu padrão de expressão que apresenta aumento em conjunto com moléculas co-estimulatórias, como CD80 e CD86, sugere um importante papel do CD83 na apresentação de antígenos e na interação celular. Foi visto que células CD83⁺

expressam níveis maiores de moléculas de MHC de classe II, além disso, demonstram maior capacidade estimulatória comparadas a células mononucleares totais, linfócitos B e T, células NK e monócitos em reações mistas de linfócitos (MLR) alogênicas (42). Aerts-Toegaert *et al.* (43), relataram que a inibição de CD83 reduz a capacidade de estimulação de linfócitos T alogênicos e as DCs com baixa expressão de CD83 tem menor capacidade de induzir os linfócitos T a produzirem IFN- γ antígeno-específico. De acordo com Lechmann *et al.* (44), a interferência na translocação do mRNA que codifica a CD83 e a inibição da síntese da proteína em si, diminuem a capacidade estimulatória das DCs frente aos linfócitos. Atualmente, a molécula CD83 é considerada o melhor marcador de ativação e maturação das DCs (45).

As moléculas co-estimulatórias expressas pelas DCs são divididas em duas famílias: a família B7/CD28, que inclui CD80 e CD86, e as proteínas da família do receptor do fator de necrose tumoral (TNFR). O CD40, membro da família TNFR, é encontrado em APCs e outros tipos celulares e induz a manutenção de níveis altos de MHC nas DCs assim como aumento de moléculas co-estimulatórias, como o CD80 e CD86, além de estimular a diferenciação morfológica das DCs e a produção da IL-12p70 (46).

Os receptores CD80/CD86, induzidos nas DCs e outras APCs após estímulo, possuem dois ligantes diferentes nos linfócitos T CD4⁺: o CD28 e o CTLA-4, sendo que a ligação ao CD28 é considerada como o sinal co-estimulatório mais forte para as APCs. A ligação dos receptores CD80/CD86 induz a produção de IL-6 e TNF- α pelas DCs, assim como a ativação, proliferação e diferenciação de linfócitos B, além disso, essa ligação é essencial para evitar a apoptose dos linfócitos T (47,48).

Os receptores Toll (TLRs) fazem parte da imunidade inata e são de extrema importância frente aos agentes infecciosos, constituindo uma família com capacidade

de reconhecer os PAMPs (49). Os TLRs possuem 11 diferentes conformações, e são numerados de TLR1 até TLR11; normalmente são encontrados na membrana plasmática, porém os receptores TLR3, TLR7, TLR8 e o TLR9, reconhecem seus ligantes em compartimentos intracelulares (50). Entre os TLRs encontrados em humanos TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6 e o TLR9 estão envolvidos no reconhecimento de componentes bacterianos (51), em particular o TLR2 está envolvido na resposta imune inata a componentes da parede celular do *M. leprae* (52).

A interleucina 15 (IL-15) possui funções semelhantes a IL-2, que incluem estimulação de células NK e linfócitos T, proliferação de linfócitos B, secreção de citocinas, produção de anticorpos, estimulação de fagócitos, manutenção de mastócitos, regulação da migração de linfócitos T ativados ou de memória, entre outras. Foi descrito que DCs estimuladas com antígenos bacterianos, IFN- γ ou o ligante do CD40 produzem IL-15 e este efeito foi correlacionado com a habilidade estimulatória das DCs. Também foi demonstrado que DCs incubadas com IL-15 expressam altos níveis de proteínas da família Bcl-2 e apresentam aumento na resistência à apoptose (53,54). Foi observado ainda que a interação da IL15 com o seu receptor em DCs é importante para a maturação funcional destas a qual leva à produção de IL-12 (55).

Uma citocina de grande importância para a interação de DCs com linfócitos é o fator de necrose tumoral (TNF), uma citocina presente nas respostas do tipo Th1, responsável por respostas inflamatórias e que pode promover a proliferação de células da medula óssea e sua diferenciação em DCs. Além disso, a produção de TNF pelas DCs leva à ativação e proliferação dos linfócitos T (56).

Outra citocina importante junto às DCs é o TGF- β 1, pertencente à família TGF- β e que possui três isoformas: TGF- β 1, 2 e 3. As três isoformas sinalizam pelo mesmo receptor de superfície e possuem alvos celulares semelhantes. Seus efeitos recaem sobre

várias células do sistema imune, entre elas os linfócitos, macrófagos e DCs, e sua ação nessas células depende não somente do tipo celular e do seu estado de diferenciação, mas também das citocinas encontradas no meio, sugerindo, portanto, que perturbações no balanço de citocinas afetam a ação do TGF- β contribuindo para a instalação de doenças. O TGF- β é conhecido pelo seu papel no crescimento e diferenciação em células epiteliais, e no processo de carcinogênese, e é, possivelmente, uma das citocinas mais pleiotrópicas sendo produzida por uma ampla variedade de células e com um amplo campo de ação englobando os mais variados tipos celulares e atuando no crescimento e diferenciação celular, assim como na atividade gênica. A importância do TGF- β no desenvolvimento das DCs foi enfatizada em estudos demonstrando que ele melhora a viabilidade celular. Em camundongos nocautes para TGF- β foi observada a completa falta de células de Langerhans, além de ativação generalizada de diversas populações celulares envolvidas na resposta imune, bem como o desenvolvimento de inflamação tecidual (57).

1.5. Resposta Imune na Hanseníase

Nos pacientes do polo tuberculóide, linfócitos T CD4⁺ produzem citocinas do perfil Th1, incluindo o IFN- γ , responsável por estimular a ativação de macrófagos levando a produção de agentes microbicidas derivados de oxigênio e nitrogênio e aumento na expressão das moléculas HLA-DR. O IFN- γ também estimula a expressão da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), que promove a interação célula-célula e da IL-2, responsável pela expansão clonal de linfócitos T antígenos-específicos. A interleucina-12 (IL-12), produzida por macrófagos e DCs, estimula a diferenciação de subpopulações de linfócitos Th1 (11), especializados na destruição de patógenos intracelulares como o *M. leprae* através da resposta imunológica mediada por células.

Por outro lado, pacientes virchowianos apresentam predominantemente linfócitos T auxiliares que produzem citocinas do perfil Th2, entre elas a IL-4, responsável pela produção de anticorpos, ativação de linfócitos B, inibição da ativação de macrófagos, aumento de anticorpos contra glicolipídios do bacilo e proliferação de linfócitos do perfil Th2. Outra citocina característica deste pólo é a IL-10, que possui um papel supressivo, por inibir a proliferação de linfócitos T de perfil Th1 e a liberação de citocinas que induzem respostas antimicrobianas (10,11).

A forma BT da hanseníase apresenta raros bacilos e imunidade relativamente alta com presença de células gigantes tipo Langhans, enquanto a forma BL apresenta granuloma com macrófagos indiferenciados, grande taxa de infiltração bacilar, e se difere da forma polar LL pela presença de infiltrados linfocitários em algumas áreas. A histologia demonstra presença de células epitelióides difusas no granuloma, linfócitos podem estar ou não presentes, e se presentes eles estão difusos.

1.6. DCs e hanseníase

Poucos estudos na literatura tem avaliado a interação das DCs com o *M. leprae*. A especificidade de DC-SIGN frente ao *M. leprae* foi demonstrada (58). Um estudo demonstrou que DC-SIGN é um importante receptor para as micobactérias que expressam lipoarabinomanana contendo manose (Man-LAM) como o *M. tuberculosis* e *Mycobacterium bovis*. Essas micobactérias se ligam ao DC-SIGN via Man-LAM bloqueando a maturação das células infectadas e induzindo a produção de IL-10, que possui atividade imunossupressora, sugerindo que as micobactérias podem usar o DC-SIGN como um mecanismo de escape imunológico e de supressão celular o que pode contribuir para a instalação da doença e sobrevivência do patógeno (59).

Em relação à expressão do TLR2, foi demonstrado que níveis similares deste receptor foram encontrados em monócitos de sangue periférico de todas as formas clínicas da hanseníase. Em contrapartida, *in situ* tal expressão foi mais alta em monócitos e DCs de lesões tuberculóides, que constituem a forma de resistência da doença, o mesmo padrão de expressão foi observado em relação ao TLR1. Foi visto ainda que citocinas características da resposta Th1: IFN- γ , GM-CSF, IL-12 e IL-18 aumentaram a ativação do TLR1 e TLR2, enquanto citocinas da resposta Th2: IL-4 e IL-10 inibiram a ativação destes (60).

Jullien et al. (61) estudaram lesões de pacientes acometidos pela hanseníase e observaram que a expressão de mRNA para IL-15 foi detectada em ambas as formas polares da doença, porém níveis maiores foram encontrados em lesões tuberculóides e o *M. leprae* induziu a secreção de IL-15 pelos monócitos.

O papel das DCs contra o *M. leprae* não foi totalmente esclarecido. Alguns resultados sugerem que o *M. leprae* não é eficientemente apresentado pelas DCs para desencadeamento da resposta imune (62). Um estudo concluiu que o *M. leprae* inibe ou age como fator neutro na ativação e na maturação das DCs e APCs (63). Por outro lado, um estudo feito com a proteína MMP-II, componente da membrana do *M. leprae*, demonstra estimulação e maturação das DCs e do sistema imune inato em geral, produção de TNF- α e uma forma bioativa da IL-12 por parte das DCs e também produção de TNF- α e IL-10 por parte dos macrófagos (64).

Diante da importância das DCs na ativação da resposta imune e da escassez de dados sobre ao papel destas células na polarização da resposta imune vista na hanseníase, este estudo buscou avaliar a interação entre DCs e o antígenos do *M. leprae* em indivíduos saudáveis e pacientes acometidos pelas formas polares da hanseníase.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O presente estudo buscou gerar novos conhecimentos sobre a ativação da resposta imune em pacientes com hanseníase tendo como foco o papel das DCs frente a antígenos do *M. leprae*.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar *in vitro* a expressão de marcadores de superfície de diferenciação e maturação em DCs derivadas de monócitos de pacientes com as formas polares da hanseníase, estimuladas com o antígeno sonicado do *M. leprae*.

Avaliar *in vitro* a expressão de mRNA de genes de citocinas e receptores em DCs derivadas de monócitos de pacientes com as formas polares da hanseníase, estimuladas com o antígeno sonicado do *M. leprae*.

Avaliar *in vitro* o efeito da incubação prévia de monócitos de indivíduos saudáveis com o antígeno sonicado do *M. leprae* sobre a diferenciação em DCs, por meio da expressão de marcadores de superfície de diferenciação e maturação.

3. METODOLOGIA

3.1. Casuística

Foram incluídos neste estudo 16 controles saudáveis (7 mulheres e 9 homens) escolhidos entre os colaboradores do Instituto Lauro de Souza Lima, 14 pacientes pertencentes ao polo tuberculóide da doença (7 mulheres e 7 homens; 6 TT e 8 BT) e outros 12 do polo virchowiano (1 mulher e 11 homens; 8 LL e 4 BL) antes do início ou até 3 meses de tratamento poliquimioterápico. Os pacientes eram oriundos do ambulatório do Instituto Lauro de Souza Lima com diagnóstico de hanseníase confirmado por achados histopatológicos e baciloscópicos e classificação clínica baseada nos critérios preconizados por Ridley & Jopling (10).

Todos os procedimentos realizados receberam anuência do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Lauro de Souza Lima (Protocolo 171/09). Consentimento informado, livre e esclarecido foi obtido de todos os participantes desta pesquisa.

3.2. Diferenciação de DCs a partir de monócitos

De cada participante foram coletados 40 mL de sangue total em tubo contendo anticoagulante heparina ou ACD (Ácido Cítrico, Citrato de Sódio e Dextrose), por meio de punção venosa em sistema fechado de coleta múltipla, por profissional habilitado.

As células mononucleares (linfócitos e monócitos) foram isoladas em gradiente de densidade utilizando Histopaque (Sigma, St Louis, MO, USA) e, em seguida, os monócitos foram isolados em gradiente de Percoll (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). O número de células foi estimado por contagem em câmara de Neubauer e a viabilidade avaliada por exclusão empregando-se Azul de Trypan. A pureza dos monócitos foi

averiguada por citometria de fluxo empregando-se o marcador CD14 e esteve sempre em torno de 95%.

Os monócitos foram cultivados por 6 dias em placas de 24 wells numa concentração de $5 \cdot 10^5$ células por poço em 1 ml de meio Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) (Gibco, Grand Island, NY, USA) acrescido de 10% de soro bovino fetal (SBF) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e antibióticos: penicilina-estreptomicina (100U/ml, 100µg/ml) (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canadá), anfotericina (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canadá) e gentamicina (400µg/ml) (Schering-Plough, Rio de Janeiro, RJ) em estufa incubadora em atmosfera úmida à 37°C com 5% de CO₂. Como estímulos para a diferenciação foram empregados rGM-CSF (500U/ml) e rIL-4 (250U/ml) (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA); no 3º dia foram removidos 500 µl do meio de cultura e adicionados de 500µl de meio fresco contendo 500U de rGM-CSF e 250U de rIL-4. A diferenciação em DCs imaturas foi averiguada pela perda de CD14 e expressão de CD1a, CD11c e DC-SIGN no sexto dia de cultura.

3.3. Maturação das DCs

Para a indução da maturação foram empregados os seguintes estímulos: (i) coquetel padrão de maturação (CQM) composto por interleucina-1 beta (IL-1β) (25ng/ml) (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA), IL-6 (1000U/ml) (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA), TNF (50ng/ml) (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) e prostaglandina E2 (PGE2) (10^{-6} M) (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA); (ii) lipopolissacarideo (LPS) (250ng/ml); e (iii) antígeno sonificado completo do *M. leprae* (10µg/ml), gentilmente doado pelo Dr. Patrick Brennan da Universidade do Colorado. Poços sem adição de estímulos foram mantidos como culturas controles. Os estímulos foram adicionados no 6º dia de cultura e o processo de maturação sob diferentes estímulos foi averiguado após

2 dias (8º dia de cultura) pela expressão de marcadores de superfície. Para tanto, as células foram retiradas da placa de cultura por meio de homogeneização do conteúdo e centrifugadas por 10 minutos a 1500rpm a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido e as DCs ressuspensas no volume residual, sendo parte submetida à avaliação por citometria de fluxo e o restante destinado a análise da expressão gênica por qPCR..

3.4. Análise das DCs derivadas de monócitos

3.4.1. Citometria de fluxo

Para a marcação das DCs foram empregados os seguintes anticorpos monoclonais: CD1a, CD11c e DC-SIGN como marcadores da diferenciação; CD83, CD80, CD86, CD40 e HLA-DR, como marcadores de maturação e ICAM-1 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Para o bloqueio de ligações inespecíficas foram empregados soro de camundongo e soro normal humano AB (30µl de cada/amostra) durante 1 hora a temperatura ambiente. Para o controle da especificidade das reações foram empregados anticorpos não relacionados de mesmo isotipo e conjugados com os mesmos fluorocromos (IgG1 FITC, IgG2b PE, IgG1 PE Cy5, IgG1 APC) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Após a marcação, a suspensão celular foi lavada em solução salina tamponada com fosfato (PBS) com 5% de soro bovino fetal por 2 vezes, e ressuspensa em solução fixadora de paraformaldeído 1% em PBS. A coleta de dados foi feita em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences) localizado na Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP) e incluiu um mínimo de 10.000 eventos. Para a análise dos dados foi utilizado o programa FCS Express Version 3 (2006).

3.4.2. Expressão de citocinas e receptores

Para análise da expressão gênica por mRNA as DCs foram ressuspensas em reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). O mRNA total foi extraído com clorofórmio (J.T. Baker, Xalostoc, Estado do México, México), precipitado em álcool isopropílico (MERCK, Darmstadt, Alemanha) + glicogênio (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e quantificado no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Foi transcrito 1µg de RNA total empregando 250ng de Oligo(dT)12-18 Primer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 200U da enzima SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA), 10mM de cada dNTP e DTT, conforme instruções do fabricante. A expressão dos genes alvos *CLEC4M*, *IL12A*, *CD209*, *CLEC7A*, *IL10*, *IL12B*, *IL15*, *IL15RA*, *TGFB1*, *TLR1*, *TLR2*, *TLR9* e *TNF* foi avaliada por meio de PCR em tempo real pelo sistema Taqman (Applied Biosystems Inc.), sendo utilizados os genes *GAPDH* e *B2M* como controles endógenos. A expressão gênica foi estimada por meio de quantificação relativa, empregando-se uma curva padrão relativa composta por 5 diluições seriadas de um pool de mRNA de DCs, uma vez que os genes alvos estudados e os controles endógenos apresentaram diferentes eficiências de reação. As concentrações relativas de cada amostra foram calculadas comparando-se os valores de Ct (Threshold cycle) da amostra com aqueles obtidos na curva padrão e normalizadas individualmente pela média geométrica das concentrações relativas obtidas para os controles endógenos na mesma amostra, conforme padronizado por Vandesompele et al. (65).

3.5. Análise da incubação prévia de monócitos com o antígeno sonificado do *M. leprae* na diferenciação e maturação de DCs

Monócitos isolados como descrito anteriormente foram submetidos à pré-incubação com o antígeno sonificado do *M. leprae* (10µg/ml) em estufa incubadora com 5% de CO₂ em atmosfera úmida à 37°C por 2 horas. Após este período o antígeno foi removido e as células foram lavadas por 2 vezes em meio RPMI. A seguir, os monócitos foram submetidas à diferenciação em DCs e estimuladas com antígenos padrão e específico, como já descritos anteriormente (itens 3.2 e 3.3).

3.6. Análises dos Dados

A comparação de dados entre diferentes grupos foi feita por análise de variância não-paramétrica de Kruskal-Wallis seguida pelo pós-teste de Dunn para amostras independentes com nível de significância de 5%. Para a comparação de amostras dependentes (diferentes estímulos em um mesmo grupo) foi utilizada a análise de variância não-paramétrica de Friedman seguida pelo pós-teste de Dunn com nível de significância de 5%. Todas as análises foram realizadas pelo programa estatístico GraphPad InStat versão 3.0 (1997). Os dados finais foram representados utilizando o programa GraphPad Prism 5.

4. RESULTADOS

4.1. Citometria de fluxo

A Figura 1 representa a expressão em intensidade media de fluorescência (MFI) das moléculas DC-SIGN, CD11c e ICAM-1 e a porcentagem de células positivas para CD1a. Os níveis de expressão de DC-SIGN, que corresponde a um marcador de diferenciação das DCs, apresentaram diminuição frente ao antígeno do *M. leprae* em relação a todos os outros estímulos, em todos os grupos estudados, os quais apresentaram níveis similares de expressão.

A molécula CD11c não apresentou diferenças de expressão frente aos diferentes estímulos empregados neste estudo. Embora uma maior expressão tenha sido observada nos pacientes virchowianos, esta não apresentou significância estatística.

Níveis menores de expressão do CD1a, uma molécula característica das DCs, frente ao estímulo CQM em relação aos outros estímulos foram observados nos grupos de pacientes virchowianos e tuberculóides. Um aumento na expressão no grupo de pacientes tuberculóides em relação aos outros grupos pode ser visto, todavia sem significância estatística.

A expressão da molécula ICAM-1 foi maior frente ao estímulo com o CQM em todos os grupos e no grupo de pacientes tuberculóides foi maior expressão frente ao estímulo com *M. leprae* quando comparado à cultura controle.

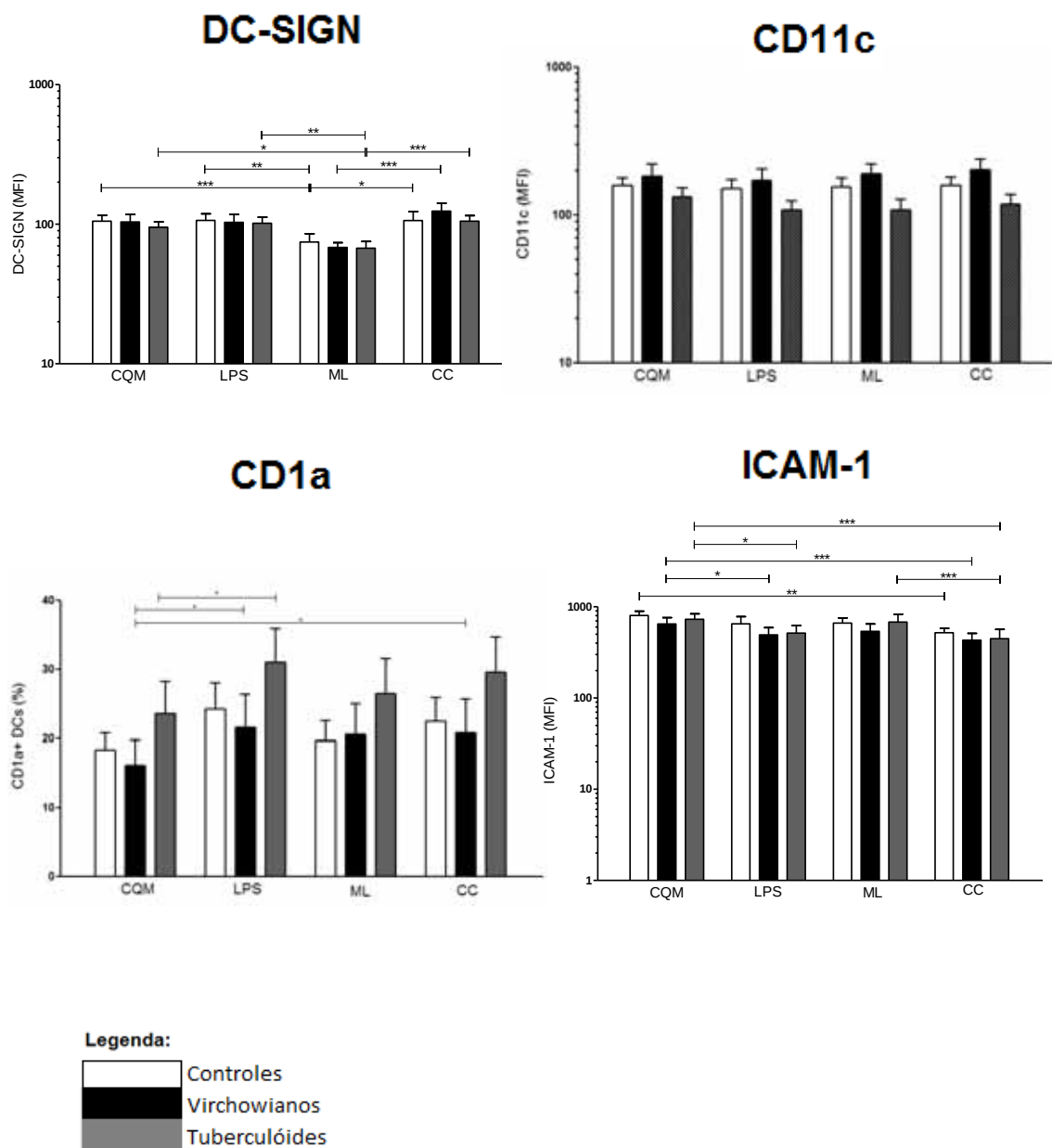


Figura 1: Análise por citometria de fluxo da expressão de DC-SIGN, CD11c, ICAM-1 em intensidade média de fluorescência (MFI) e CD1a em porcentagem de células positivas (%). DCs derivadas de monócitos foram obtidas a partir de indivíduos saudáveis (n= 16), pacientes tuberculóides (n= 14) e pacientes virchowianos (n= 12) e estimuladas por 48 horas com coquetel de maturação (CQM: IL-1 β (25ng/ml), IL-6 (1000U/ml), TNF (50ng/ml) e PGE2 (10-6M)); lipopolissacarídeo (LPS: 250 ng/ml); antígeno sonicado de *M. leprae* (ML: 10 μ g/ml) ou não estimuladas (CC). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 conforme análise de variância não paramétrica de Friedman e teste de comparações múltiplas de Dunn.

A Figura 2 representa a expressão, em intensidade média de fluorescência (MFI) das moléculas CD40, CD80, CD86, CD83 e HLA-DR, características de maturação de DCs e que atuam em importantes funções, englobando a apresentação antigênica (HLA-DR) e co-estimulação (CD40, CD80, CD86). Os dados obtidos neste estudo indicam aumento na expressão dessas moléculas frente ao estímulo com o antígeno sonificado do *M. leprae* de modo semelhante ao observado quando empregado o coquetel padrão de maturação em todos os grupos estudados. Foi verificada uma menor expressão de CD40 e CD80 nos pacientes virchowianos, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa. Com relação à molécula CD86, um menor nível de expressão foi visto nos pacientes tuberculóides, entretanto não houve significância estatística.

A expressão da molécula CD83, que é o representante mais importante da maturação das DCs, mostrou-se aumentada em todos os grupos após o estímulo com CQM. O grupo de pacientes tuberculóides apresentou uma pequena diminuição na expressão de CD83 em relação aos outros grupos, porém sem significância estatística. Não houve aumento da expressão de CD83 frente ao estímulo com o antígeno sonificado do *M. leprae* em nenhum dos grupos estudados.

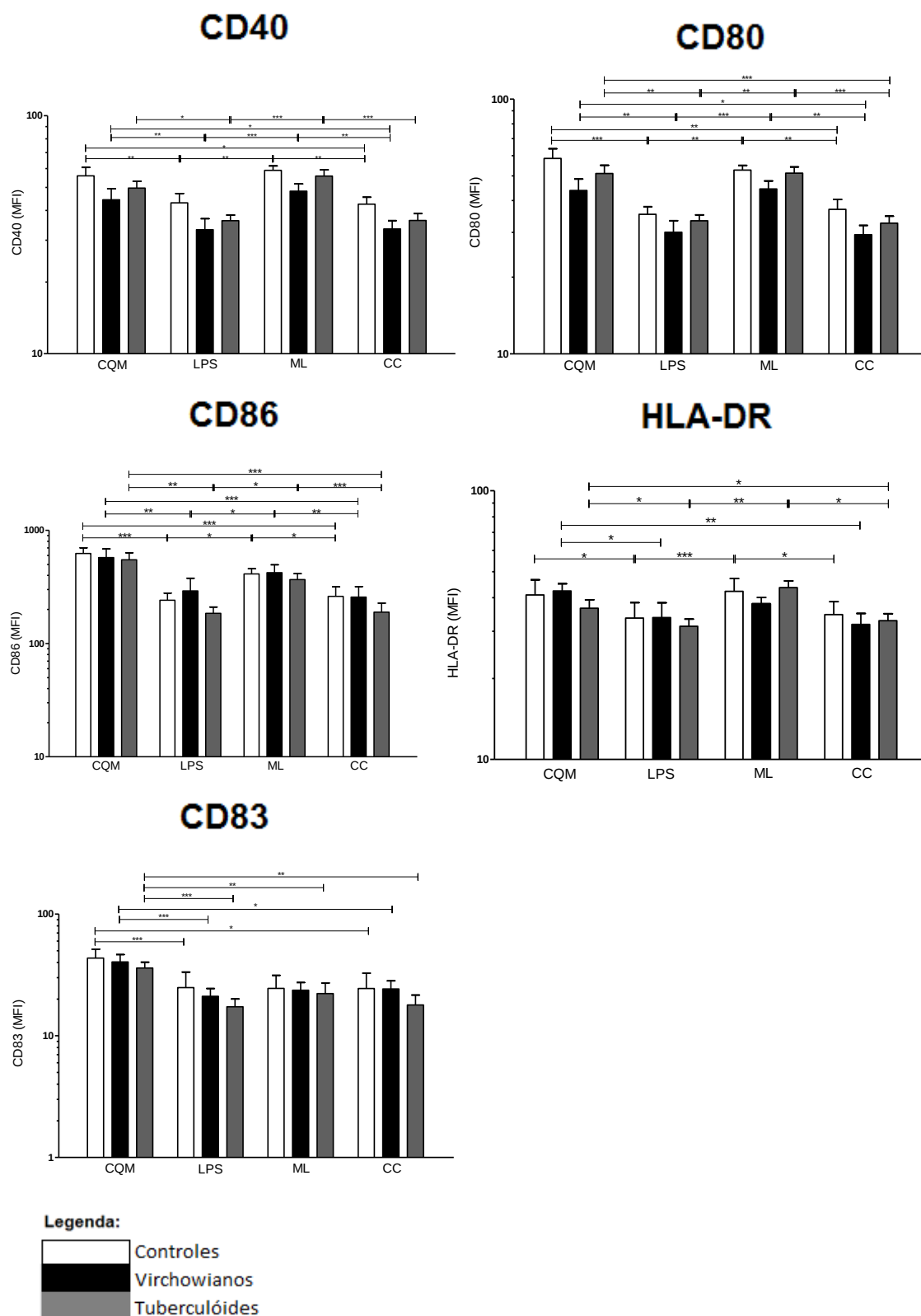


Figura 2: Análise por citometria de fluxo da expressão de CD40, CD80, CD86, HLA-DR e CD83 em intensidade média de fluorescência (MFI). DCs derivadas de monócitos foram obtidas a partir de indivíduos saudáveis (n= 16), pacientes tuberculóides (n= 14) e pacientes virchowianos (n= 12) e estimuladas por 48 horas com coquetel de maturação (CQM: IL-1 β (25ng/ml), IL-6 (1000U/ml), TNF (50ng/ml) e PGE2 (10-6M)); lipopolissacarídeo (LPS: 250 ng/ml); antígeno sonicado de *M. leprae* (ML: 10 μ g/ml) ou não estimuladas (CC). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 conforme análise de variância não paramétrica de Friedman e teste de comparações múltiplas de Dunn.

4.2. Análise da expressão de citocinas e receptores por mRNA

Em relação aos genes *TLR1*, *TLR2*, (Figura 3) verificamos níveis menores de expressão nas culturas estimuladas com CQM e antígeno sonicado do *M. leprae* em relação à cultura controle em todos os grupos empregados.

O gene *TLR9* apresentou níveis de expressão semelhantes frente a todos os estímulos; uma menor expressão nos pacientes tuberculóides em relação aos pacientes virchowianos foi vista frente ao estímulo com antígeno sonicado do *M. leprae*.

Em relação aos genes *CLEC7A* e *CD209* (Figura 4) verificamos níveis menores de expressão nas culturas estimuladas com CQM e antígeno sonicado do *M. leprae* em relação à cultura controle em todos os grupos empregados.

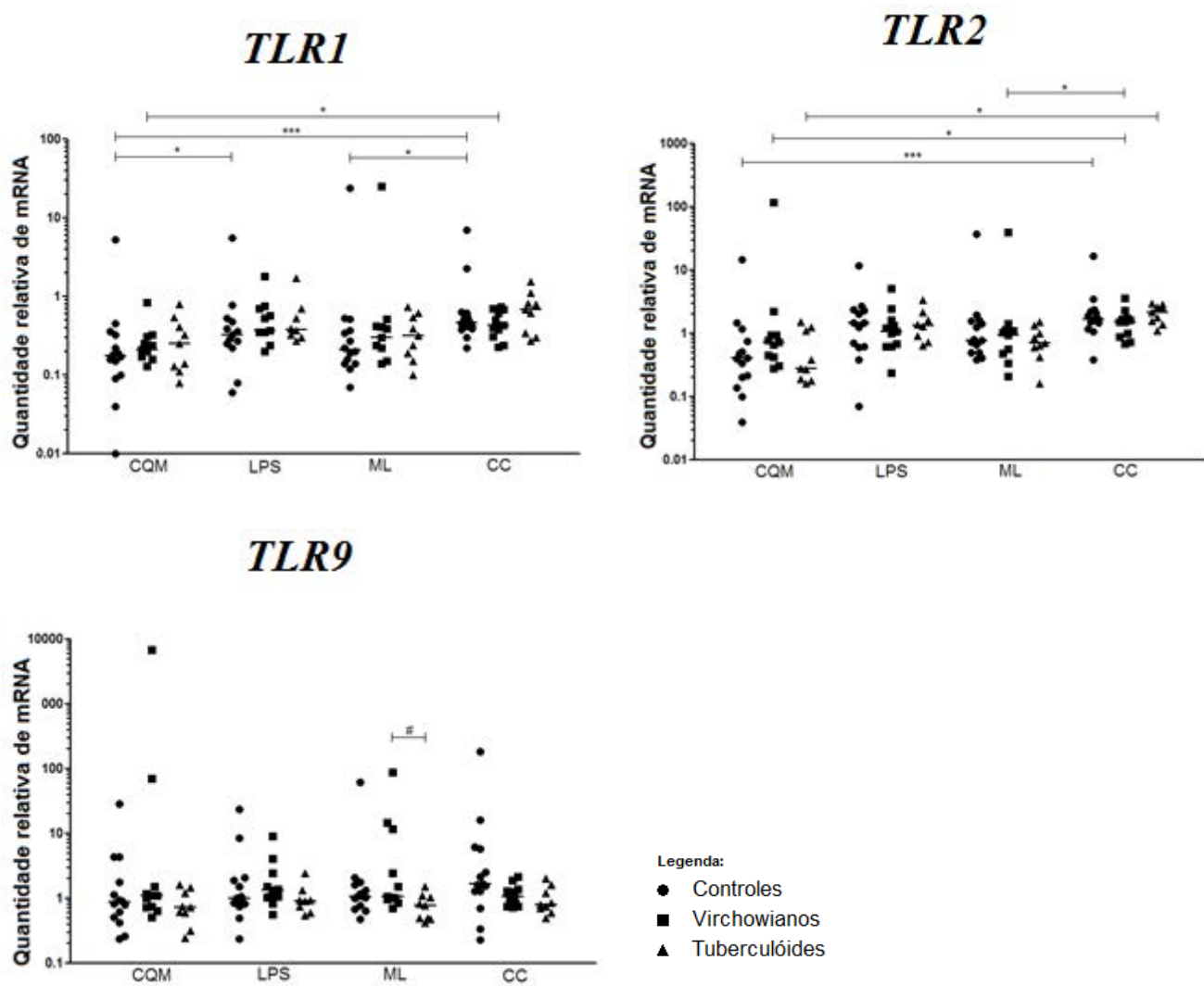


Figura 3: Análise por PCR tempo real da expressão dos genes *TLR1*, *TLR2* e *TLR9*. DCs derivadas de monócitos foram obtidas a partir de indivíduos saudáveis (n= 14), pacientes tuberculóides (n= 9) e pacientes virchowianos (n= 11) e estimuladas por 48 horas com coquetel de maturação (CQM: IL-1 β (25ng/ml), IL-6 (1000U/ml), TNF (50ng/ml) e PGE2 (10-6M)); lipopolissacarídeo (LPS: 250 ng/ml); antígeno sonicado de *M. leprae* (ML: 10 μ g/ml) ou não estimuladas (CC). *p<0,05, ***p<0,001 conforme análise de variância não paramétrica de Friedman; #p<0,05, análise de variância não-paramétrica de Kruskal-Wallis e teste de comparações múltiplas de Dunn.

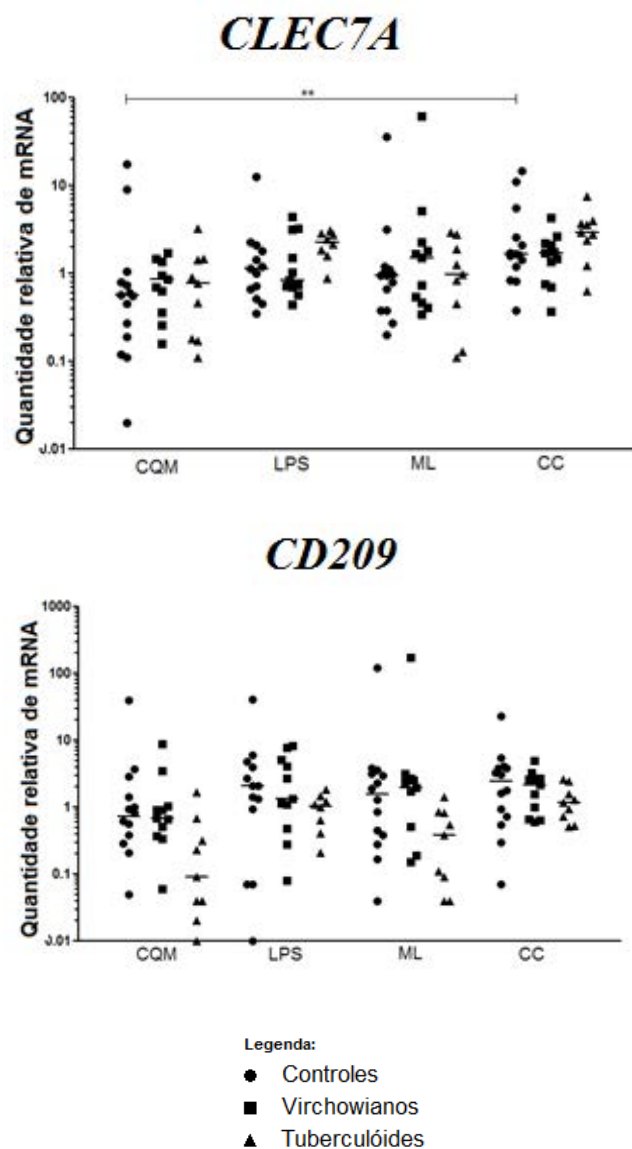


Figura 4: Análise por PCR tempo real da expressão dos genes *CLEC7A* e *CD209*. DCs derivadas de monócitos foram obtidas a partir de indivíduos saudáveis (n= 14), pacientes tuberculóides (n= 9) e pacientes virchowianos (n= 11) e estimuladas por 48 horas com coquetel de maturação (CQM: IL-1 β (25ng/ml), IL-6 (1000U/ml), TNF (50ng/ml) e PGE2 (10-6M)); lipopolissacarídeo (LPS: 250 ng/ml); antígeno sonicado de *M. leprae* (ML: 10 μ g/ml) ou não estimuladas (CC). **p<0,01; conforme análise de variância não paramétrica de Friedman e teste de comparações múltiplas de Dunn.

Como pode ser visto na Figura 5, o gene *IL15* apresentou maior expressão após estímulo com o CQM. Uma tendência a aumento na expressão também foi verificada frente ao estímulo com o antígeno sonificado do *M. leprae*.

Níveis maiores de expressão do gene *IL-15RA* foram notados após estímulo com CQM em relação à cultura controle em todos os grupos estudados. É possível também notar uma tendência a aumento na expressão desse gene nas culturas estimuladas com o *M. leprae* em todos os grupos, porém sem significância estatística.

O gene *TGFB1* apresentou diminuição na expressão frente ao estímulo com CQM, com significância estatística nos grupos virchowiano e tuberculóide e tendência à diminuição na expressão, sem significância estatística, após estímulo com o antígeno sonificado do *M. leprae*.

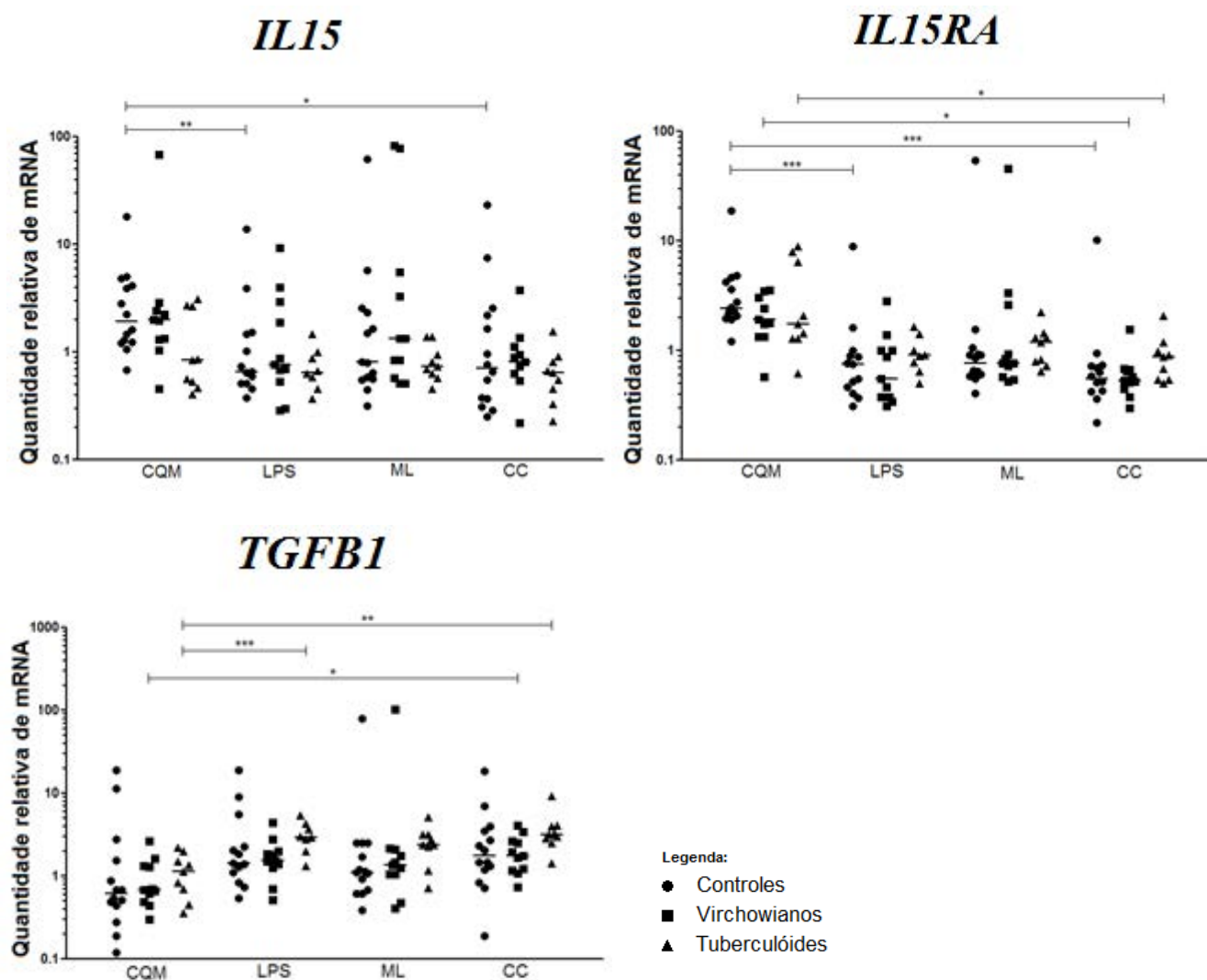


Figura 5: Análise por PCR tempo real da expressão dos genes *IL15*, *IL15RA* e *TGFB1*. DCs derivadas de monócitos foram obtidas a partir de indivíduos saudáveis (n= 14), pacientes tuberculóides (n= 9) e pacientes virchowianos (n= 11) e estimuladas por 48 horas com coquetel de maturação (CQM: IL-1 β (25ng/ml), IL-6 (1000U/ml), TNF (50ng/ml) e PGE2 (10-6M)); lipopolissacarídeo (LPS: 250 ng/ml); antígeno sonicado de *M. leprae* (ML: 10 μ g/ml) ou não estimuladas (CC). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; conforme análise de variância não paramétrica de Friedman e teste de comparações múltiplas de Dunn.

Com relação ao gene *IL10*, verificamos aumento na expressão após estímulo com CQM nos controles saudáveis (Figura 6). Houve uma tendência à diminuição na expressão deste gene mediante estímulo com o antígeno sonicado do *M. leprae*, a qual foi estatisticamente significativa no grupo de pacientes tuberculóides.

O gene *IL12B* apresentou maior expressão após estímulo com o CQM (Figura 6). Uma tendência a aumento na expressão também foi verificada frente ao estímulo com o antígeno sonicado do *M. leprae*.

No tocante ao gene *TNF* foi vista menor expressão após estímulo com o CQM nos grupos controle e de pacientes tuberculóides com significância estatística (Figura 6). Além disso, o grupo de pacientes tuberculóides apresentou diminuição na expressão em relação aos outros grupos frente a todos os estímulos com significância estatística.

Não foi possível a quantificação dos níveis da expressão dos genes *CLEC4M* e *IL12A* com a metodologia empregada.

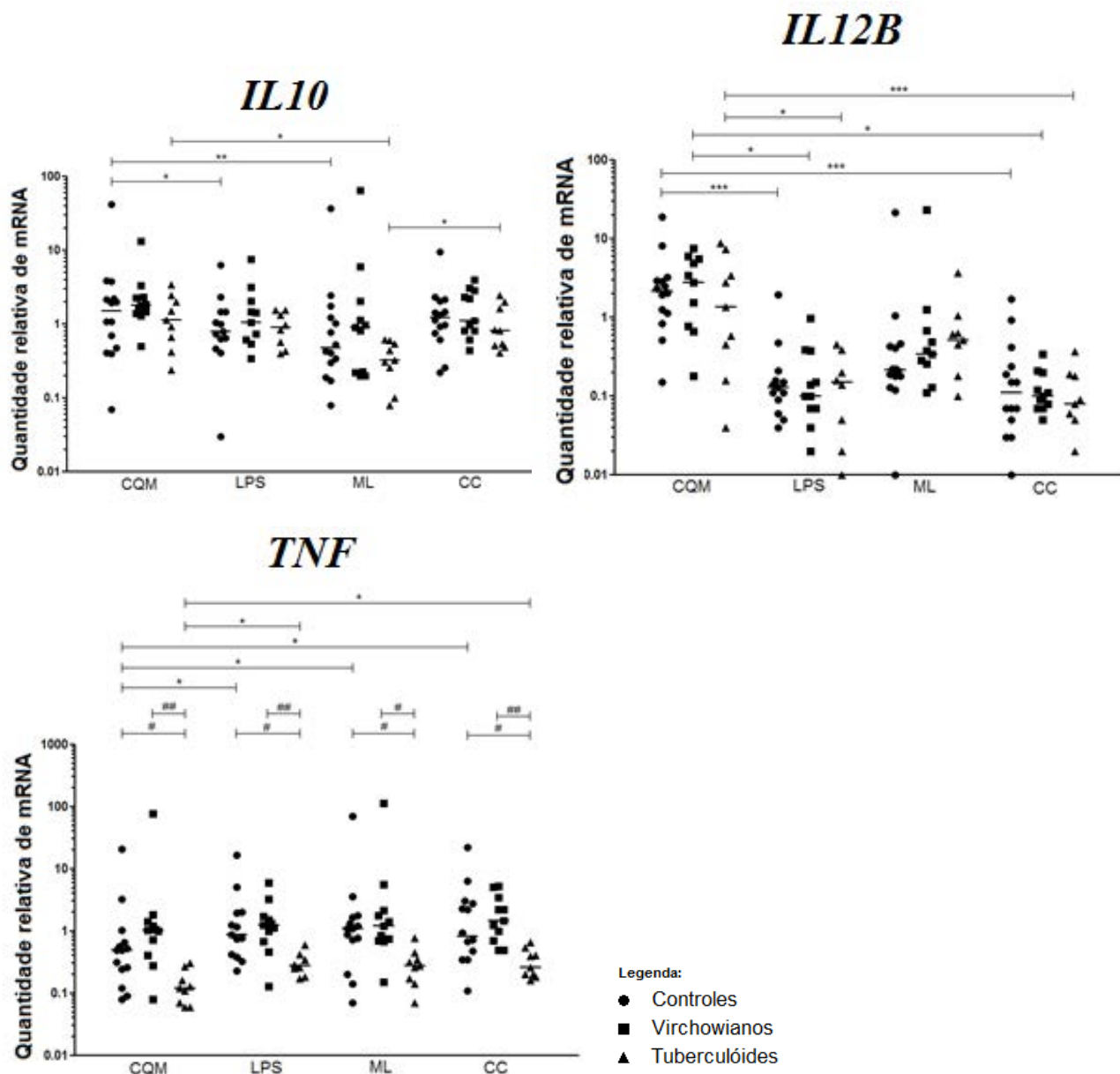


Figura 6: Análise por PCR tempo real da expressão dos genes *IL10*, *IL12B* e *TNF*. DCs derivadas de monócitos foram obtidas a partir de indivíduos saudáveis (n= 14), pacientes tuberculóides (n= 9) e pacientes virchowianos (n= 11) e estimuladas por 48 horas com coquetel de maturação (CQM: IL-1 β (25ng/ml), IL-6 (1000U/ml), TNF (50ng/ml) e PGE2 (10-6M)); lipopolissacarídeo (LPS: 250 ng/ml); antígeno sonicado de *M. leprae* (ML: 10 μ g/ml) ou não estimuladas (CC). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, conforme análise de variância não paramétrica de Friedman; #p<0,05, ##p<0,01 análise de variância não-paramétrica de Kruskal-Wallis e teste de comparações múltiplas de Dunn.

4.3. Análise da incubação prévia de monócitos com o antígeno sonificado do *M. leprae* na diferenciação e maturação de DCs

Os resultados apresentados são representativos de três experimentos realizados com monócitos provenientes de controles saudáveis. Quanto às moléculas CD11c e ICAM-1, embora a porcentagem de DCs positivas tenha sido similar, houve uma diminuição grande da intensidade média de fluorescência destas células (Figura 7). Com relação à molécula DC-SIGN foi observada uma diminuição tanto na porcentagem de células positivas quanto na intensidade média de fluorescência destas células (Figura 7).

Pode ser observado na Figura 8 que as DCs derivadas de monócitos incubados com o antígeno sonificado do *M. leprae* apresentam menor expressão em porcentagem e intensidade média de fluorescência dos receptores CD80, CD83, HLA-DR e CD40 em comparação com aquelas DCs diferenciadas normalmente, independente do estímulo empregado, com exceção do grupo controle na molécula CD40.

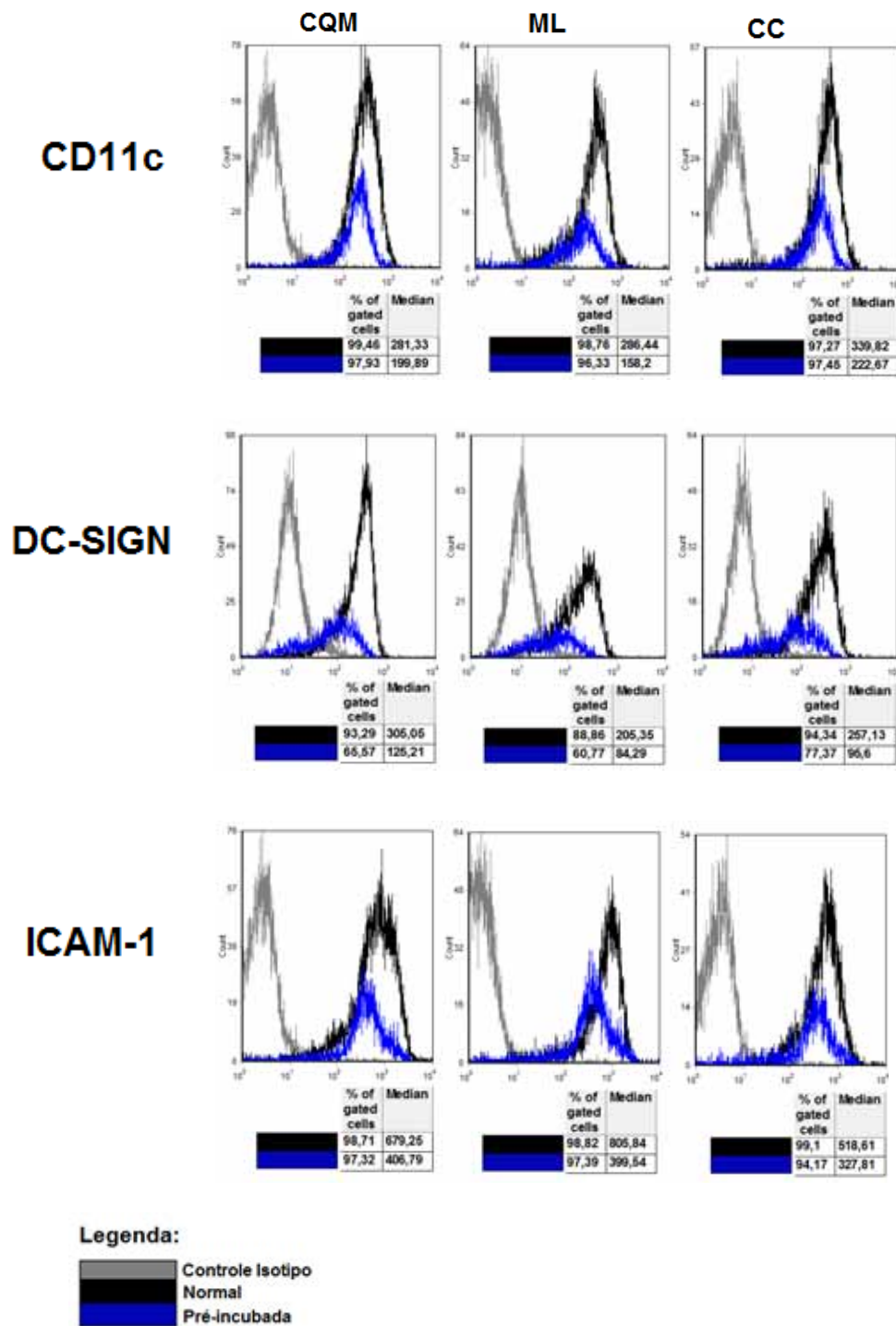


Figura 7: Expressão de CD11c, DC-SIGN e ICAM-1 em porcentagem de células positivas (%) e intensidade média de fluorescência. DCs derivadas de monócitos foram obtidas a partir de indivíduos saudáveis e estimuladas por 48 horas com coquetel de maturação (CQM: IL-1 β (25ng/ml), IL-6 (1000U/ml), TNF (50ng/ml) e PGE2 (10-6M)); antígeno sonificado de *M. leprae* (ML: 10 μ g/ml) ou não estimuladas (CC). Dados representativos de 3 experimentos independentes.

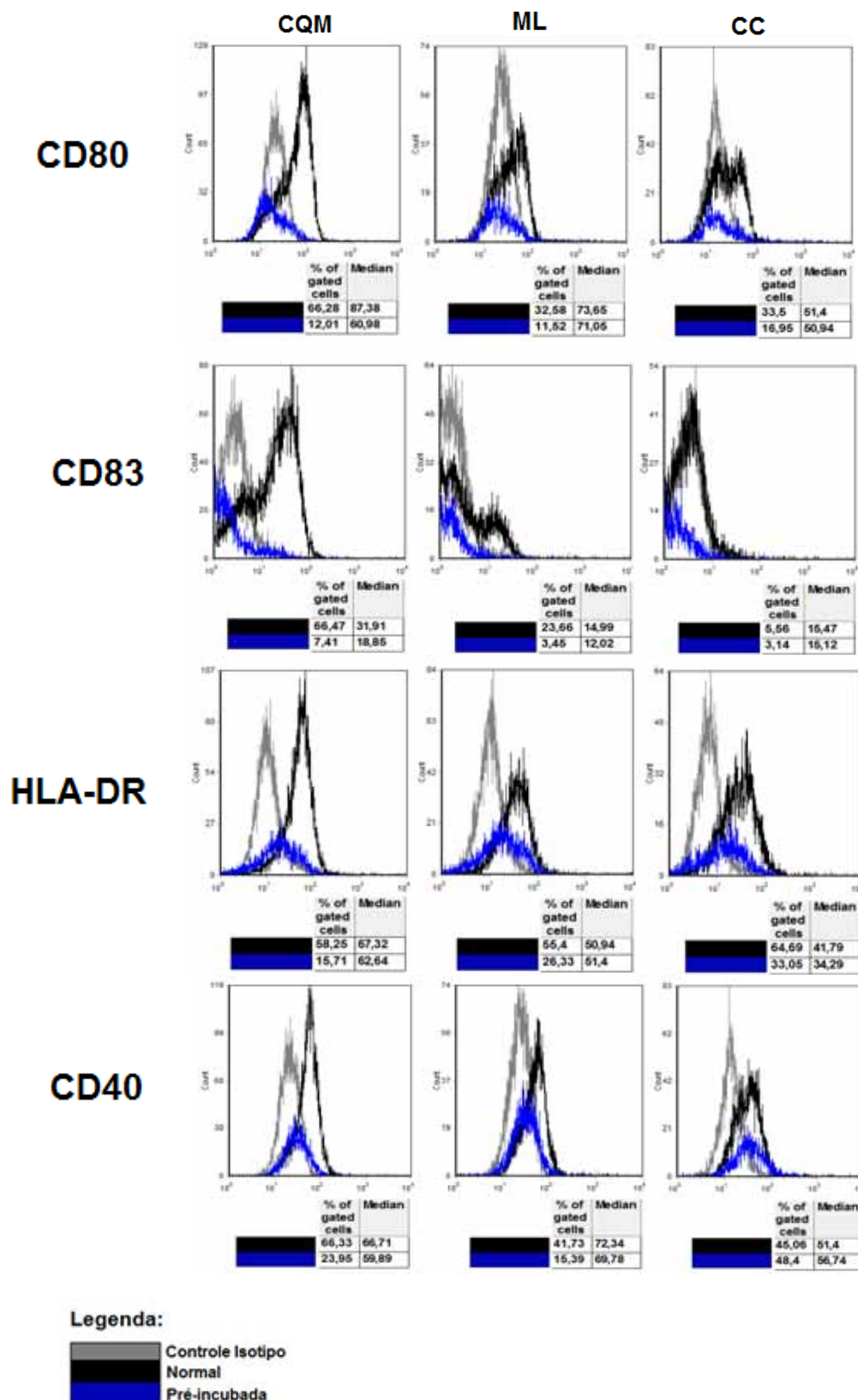


Figura 8: Expressão de CD80, CD83, HLA-DR e CD40 em porcentagem de células positivas (%) e intensidade média de fluorescência. DCs derivadas de monócitos foram obtidas a partir de indivíduos saudáveis e estimuladas por 48 horas com coquetel de maturação (CQM: IL-1 β (25ng/ml), IL-6 (1000U/ml), TNF (50ng/ml) e PGE2 (10-6M)); antígeno sonificado de *M. leprae* (ML: 10 μ g/ml) ou não estimuladas (CC). Dados representativos de 3 experimentos independentes.

5. DISCUSSÃO

A resposta imunológica na hanseníase vem sendo avaliada, discutida e revista em vários trabalhos, porém devido à complexidade da doença, são necessários mais estudos para o melhor entendimento da interação parasita-hospedeiro. Diferentes perfis de citocinas como Th1 e Th2 são encontrados no espectro clínico da doença (11), além disso, diversos fatores genéticos do hospedeiro e do bacilo podem estar envolvidos (6). As DCs são importantes no desencadeamento da resposta imune adaptativa (27), sendo assim, possuem um papel chave nos processos infecciosos. Entretanto, estudos sobre o papel destas células na ativação da imunidade específica no curso da hanseníase, os quais poderiam auxiliar no entendimento da polarização observada nas diferentes formas clínicas da doença, são bastante escassos.

Analisando o comportamento *in vitro* de DCs, Mittal et al. (66) observaram que as DCs tanto de pacientes tuberculóides quanto de virchowianos são hábeis em estimular a ativação de linfócitos T. Contudo, parte dos pacientes virchowianos não apresentou resposta proliferativa em culturas mistas de linfócitos e DCs sugerindo possíveis falhas na capacidade estimulatória destas células.

In situ, Sieling et al. (67) relatam um maior número de DCs CD1⁺ em lesões de pacientes com a forma tuberculóide da doença em comparação à forma virchowiana. De modo semelhante, em nosso estudo notamos uma maior expressão de CD1a em pacientes tuberculóides, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 1). Esses resultados sugerem que pode existir alguma deficiência na migração e/ou diferenciação dos monócitos em DCs nos pacientes virchowianos, alternativamente a alta carga bacilar presente nestes pacientes pode comprometer a diferenciação de monócitos em DCs o que condiz com os resultados encontrados no presente trabalho onde a diferenciação de monócitos em DCs foi comprometida pelo pré-tratamento com

antígenos do *M. leprae* (Figuras 7 e 8). No estudo de Sieling et al. (67) as células CD1⁺ das lesões tuberculóides expressavam o marcador CD83, caracterizando assim a maturação das DCs nos pacientes tuberculóides, em contrapartida no presente trabalho a expressão de CD83 foi semelhante entre pacientes e controles e não sofreu aumento frente ao estímulo com o antígeno sonicado do *M. leprae*. Esses dados indicam que outros fatores, como a presença de linfócitos T, são necessários para a completa maturação das DCs e expressão de CD83, a qual foi vista em ambos os grupos de pacientes quando as culturas foram estimuladas com o coquetel padrão de maturação.

Lee et al. (68), constataram que o receptor LILRA2 é expresso em cerca de 50 a 80% de lesões virchowianas e raramente é visto em lesões tuberculóides. As células expressando LILRA2, em sua maioria macrófagos, parecem influenciar a maturação das DCs, além de prejudicar a apresentação de antígenos das DCs para os linfócitos T prevenindo o aumento da expressão de CD1b, HLA-DR, CD40, CD86 e CD206. Esta pode ser uma das vias de ação do *M. leprae in vivo* para inibir a ativação do sistema imune nos pacientes virchowianos.

Investigando o papel do bacilo na ativação de DCs, Murray et al. (63) relataram uma ação nula ou supressora do *M. leprae* irradiado e morto sobre DCs diferenciadas a partir de monócitos de doadores de sangue, a qual resultou em baixa expressão de CD40, CD80, CD86, CD83, HLA-DR, em comparação com *M. tuberculosis* e *M. bovis*. Níveis maiores de citocinas do perfil Th2 foram observados após estímulo com o *M. leprae* enquanto a expressão de genes que codificam moléculas do MHC de classe II, moléculas co-estimulatórias como o CD80 e genes responsáveis pela produção de IL-12 e TNF foram induzidos nas DCs estimuladas com *M. tuberculosis* e *M. bovis*, mas não frente ao *M. leprae*, demonstrando assim evidências de que o *M. leprae* se comporta de maneira diferente de outras micobactérias apresentando uma ação evasiva frente às

DCs. Nesse mesmo sentido, Hashimoto et al. (62), empregando *M. leprae* morto por calor, em DCs diferenciadas *in vitro* a partir de controles saudáveis observaram diminuição na expressão das moléculas HLA-ABC e HLA-DR, bem como aumento na expressão de CD86 em comparação com o BCG, enquanto a expressão de CD83 só ocorreu mediante uma alta dose do bacilo. A capacidade de apresentação de antígenos das DCs para linfócitos T só foi observada quando empregadas altas doses do antígeno.

Em nosso modelo de estudo, diferentemente dos citados anteriormente foi observado que o *M. leprae* induziu a expressão de moléculas co-estimulatórias (CD40, CD80, CD86) e HLA-DR tanto nos pacientes quanto em controles (Figura 2). Entretanto, a expressão de CD83 que é o marcador mais importante de maturação das DCs (45), não foi induzida pelo *M. leprae*, o que pode indicar uma maturação parcial das DCs, incapaz de promover a ativação eficiente dos linfócitos T. Vale ainda destacar que o presente trabalho investigou o perfil de DCs oriundas de pacientes acometidos com a doença, diferentemente dos trabalhos citados que envolviam apenas indivíduos saudáveis.

Estudos com componentes antigênicos provenientes do citosol ou da membrana celular do *M. leprae*, também tem sido realizados buscando novas evidências sobre sua capacidade estimulatória e possíveis consequências nas DCs. Maeda et al. (69), examinaram a capacidade antigênica de várias partes do bacilo frente às DCs e verificaram que a membrana celular foi mais eficiente para estimulação em comparação com a fração antigênica do citosol e o bacilo viável. Estudando mais a fundo a composição da membrana celular do *M. leprae*, o grupo apontou a MMP-II como responsável pela capacidade antigênica da membrana do *M. leprae* frente às DCs, estimulando a produção de TNF- α e IL12p70 e induzindo a maturação destas, atestada pelo aumento na expressão de HLA-DR, CD83 e CD86, possivelmente via TLR2.

Tabouret et al. (70), empregando uma cepa de *M. bovis* (BCG) expressando PGL-I recombinante observaram que o PGL-I promove a entrada do mesmo em macrófagos e DCs via receptor complemento 3 (CR3) e é um dos responsáveis pela supressão da maturação de DCs infectadas pelo bacilo e assim, pode contribuir para as respostas celulares ineficientes dos pacientes virchowianos, sugerindo que o *M. leprae* produz o PGL-I como estratégia de escape imunológico.

Em conjunto esses estudos demonstram que vários componentes bacilares agem sobre as DCs estimulando ou modulando a atividade destas, o que demonstra a complexidade da resposta imune frente ao *M. leprae*. Estudos sobre componentes bacilares isolados podem ser úteis para o desenvolvimento de terapias e vacinas, entre outros, entretanto, a interação bacilo-célula como ocorre *in vivo* é complexa e envolve muitos componentes antigênicos. Assim para melhor simulação e entendimento dessa interação, que foi o foco deste estudo, faz-se necessário o uso de todos os antígenos bacilares, daí a o emprego do antígeno sonicado em nosso modelo de estudo o qual, por ser um antígeno integral, contém todos os antígenos bacilares.

Com relação à expressão gênica, verificamos que genes envolvidos na ativação das DCs (*IL15*, *IL15RA*, *IL12B*) (Figuras 3 e 5) foram estimulados pelo *M. leprae*. Concordando com os dados de citometria de fluxo esses resultados sugerem que o antígeno sonicado foi capaz de induzir ativação, ainda que limitada, das DCs.

O gene *TNF* foi menos expresso nos pacientes tuberculóides em comparação com os outros grupos, diferentemente com relatos da literatura (71) que demonstram que células mononucleares de pacientes tuberculóides produzem os maiores níveis desta citocina. Resultados obtidos pelo nosso grupo de estudos indicam que a produção de *TNF* pelas DCs nos pacientes tuberculóides foi menor que nos outros grupos frente à maioria dos estímulos, inclusive frente ao estímulo pelo *M. leprae*, porém sem

significância estatística (72) Tais divergências podem ser decorrentes de particularidades da resposta de DCs aos antígenos do *M. leprae* ou diferenças nos protocolos experimentais.

A análise por citometria de fluxo revelou níveis menores de expressão de DC-SIGN frente ao antígeno sonicado do *M. leprae* tanto em pacientes quanto em controles saudáveis. Uma possível causa poderia ser a internalização do receptor, após o reconhecimento do antígeno Man-LAM pelas DCs de forma semelhante ao que ocorre frente ao *M. tuberculosis* (59), já que o receptor DC-SIGN reconhece também o *M. leprae* e não se restringe apenas a outras micobacterias, como era pensado até então (58). A expressão de mRNA para DC-SIGN pelas DCs apresentou níveis elevados após estímulo com o antígeno sonicado do *M. leprae*, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa, esse fato sugere que a interação com antígenos do bacilo estimula a síntese deste receptor, o que reforça a ideia de participação do DC-SIGN entre os mecanismos de reconhecimento do bacilo.

A infecção pelo *M. leprae* se mantém latente no hospedeiro por muitos anos, indicando que mecanismos de escape imunológico e sobrevivência no hospedeiro são bem desenvolvidos neste patógeno. Considerando-se que a ativação da DC-SIGN leva a produção de IL-10 (59), a qual possui função imunossupressora do perfil Th1 que confere resistência ao *M. leprae* e estimuladora do perfil Th2 que resulta em persistência bacilar, o reconhecimento do *M. leprae* por este receptor poderia favorecer o escape da resposta imunológica. Contudo, dados do nosso grupo demonstram que embora alguns indivíduos produzam IL-10 em resposta ao antígeno sonicado do *M. leprae*, tal produção não é significativamente diferente daquela observada nas culturas controles não estimuladas, nem variou entre pacientes e controles (72,73). Por outro lado, pacientes tuberculóides apresentaram diminuição na expressão do gene *IL10* após

estímulo com o antígeno sonicado do *M. leprae*, o que pode contribuir para o desenvolvimento do perfil Th1 predominantemente observado nesses pacientes.

Makino et al. (74) demonstraram ainda que após a infecção por micobactérias, *M. leprae* e BCG, ocorre a produção de IL-1 β com efeitos inibitórios frente às DCs e que o pré-tratamento de monócitos com esta citocina compromete a maturação das DCs afetando a expressão de CD86 e CD83, embora não tenha um efeito aparente nos monócitos e DCs imaturas. Subsequentemente, este pré-tratamento afeta a ativação dos linfócitos T devido à baixa produção de IL-12p70 pelas DCs maduras. Em contraste, resultados obtidos pelo nosso grupo de estudos indicam que não há produção significativa de IL-1 β frente ao estímulo com *M. leprae* (dados não demonstrados). A produção desta citocina só é significativa frente ao estímulo com CQM e, neste caso, é consideravelmente maior nos controles do que nos pacientes tuberculóides e virchowianos, o que sugere que a produção da IL-1 β por DCs poderia estar ligada a resistência da doença.

Resultados prévios encontrados em nosso laboratório indicaram menor produção de IL12p70 pelas DCs nos pacientes virchowianos frente a todos os estímulos empregados (72,73), porém a produção desta citocina foi baixa em todas as culturas, possivelmente devido a falta do estímulo por CD40L necessário para produção desta citocina (75). Frente a esses resultados, estamos empregando células transfectadas expressando o CD40L buscando aumentar a produção desta citocina.

Foi visto ainda em nosso estudo que no grupo de pacientes tuberculóides a expressão de ICAM-1 apresentou um aumento frente ao estímulo com o antígeno sonicado do *M. leprae*. De modo semelhante, López Ramírez et al. (76) relataram que células de linhagem monocítica aumentam a expressão de ICAM-1 em resposta ao *M. tuberculosis*. É possível que o aumento na expressão de ICAM-1 favoreça a interação

celular, contribuindo para apresentação de antígenos e consequente geração e manutenção da resposta imune, o que poderia colaborar para o melhor prognóstico observado nestes pacientes.

No caso da tuberculose, um dos mecanismos empregados pelo *M. tuberculosis* para escape imunológico é a inibição da expressão de moléculas de MHC classe II, que possuem um papel chave na apresentação de antígenos pelas DCs aos linfócitos T (77). Mihret et al. (78) verificaram que DCs derivadas de monócitos de controle saudáveis quando expostas ao *M. tuberculosis* sofriam maturação e ativação, com aumento da expressão de CD40, CD80, CD86, CD54 e HLA-DR e aumento da capacidade estimulatória frente aos linfócitos T. Em contrapartida, Hava et al. (79) infectaram DCs de controles saudáveis com o *M. tuberculosis* e observaram alta expressão de HLA-DR, CD80, CD86 e CD83, indicando a maturação das DCs frente ao *M. tuberculosis*, porém essa rápida maturação comprometeu o processamento do antígeno e sua apresentação através do MHC, demonstrando assim um possível mecanismo de evasão imunológica por parte do bacilo. Hanekom et al. (80) observaram uma maturação limitada das DCs de controles saudáveis na infecção *in vitro* com *M. tuberculosis*, o que prejudicou a função de APC das DCs, concordando com os achados deste estudo em relação ao *M. leprae*. Em conjunto, os dados apresentados sobre a interação do *M. tuberculosis* com DCs apresentam resultados controversos assim como aqueles vistos frente ao *M. leprae*, demonstrando a complexidade da relação parasita hospedeiro na ativação da resposta imune nas micobacterioses e apontando a necessidade de mais investigações.

O *M. leprae* tem sido alvo de diversos estudos e pouco se sabe a respeito dos exatos mecanismos de ação desse bacilo frente às DCs e em relação à resposta imune em geral. Certamente o campo de ação do *M. leprae* é amplo e envolve vários antígenos provenientes de diferentes partes do bacilo para desencadear toda a resposta resultante.

Através deste estudo foi possível deduzir que uma ação estimulatória do *M. leprae* nas DCs ocorre, porém não a maturação completa destas como sugerido pela baixa expressão de CD83 (Figura 2). Também foi possível notar que o bacilo influencia na diferenciação de monócitos para DCs, sugerindo uma interferência ativa do bacilo em outro estágio do desenvolvimento celular.

Por fim, o *M. leprae* é de grande importância para a saúde pública, devido ao grande número de casos que ainda existem no mundo e especialmente no Brasil e estudos para o entendimento da resposta imune frente ao bacilo se justificam, portanto, pois possibilitam avanços no entendimento da doença e novas descobertas decorrentes de tais pesquisas contribuem para a melhoria na qualidade de vida dos pacientes, o que é o verdadeiro objetivo da ciência.

6. CONCLUSÕES

- A capacidade de diferenciação de DCs a partir de monócitos foi semelhante entre pacientes com formas polares da hanseníase e controles saudáveis.
- A estimulação de DCs com o antígeno sonicado do *M. leprae* levou ao aumento na expressão de CD40, CD80, CD86 e HLA-DR, porém este estímulo parece ser insuficiente para a completa ativação das DCs uma vez que não levou ao aumento nos níveis de CD83.
- A análise da expressão de genes de receptores e citocinas sugere uma estimulação parcial das DCs.
- A pré-incubação de monócitos com o antígeno sonicado do *M. leprae* levou a um comprometimento no processo de diferenciação e maturação de DCs.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bennett BH, Parker DL, Robson M. Leprosy: steps along the journey of eradication. *Public Health Rep.* 2008;123(2):198–205.
2. Trautman JR. A brief history of Hansen's disease. *Bull N Y Acad Med.* 1984;60(7):689–95.
3. Chacha JJ, Sotto MN, Peters L, Lourenço S, Rivitti EA, Melnikov P. Peripheral nervous system and grounds for the neural insult in leprosy. *An Bras Dermatol.* 2009;84(5):495–500.
4. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(2):338–81.
5. Concha R M, Cossio T ML, Salazar S I, Fich S F, Pérez C C, González B S. [Hansen's disease: case report and review of literature]. *Rev Chilena Infectol.* 2008;25(1):64–9.
6. Souza VNB, Pereira AC. Genética humana na susceptibilidade à hanseníase. *Hansenol Int.* 2007;32(1):81–93.
7. Global leprosy: update on the 2012 situation. *Wkly Epidemiol Rec.* 2013;88(35):365–79.
8. Gautam VP. Treatment of leprosy in India. *J Postgrad Med.* 2009;55(3):220–4.
9. Rodrigues LC, Lockwood DN. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. *Lancet Infect Dis.* 2011;11(6):464–70.
10. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1966;34(3):255–73.
11. Modlin RL. The innate immune response in leprosy. *Curr Opin Immunol.* 2010;22(1):48–54.
12. Worobec SM. Treatment of leprosy/Hansen's disease in the early 21st century. *Dermatol Ther.* 2009;22(6):518–37.
13. Araújo MG. [Leprosy in Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;36(3):373–82.
14. Britton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. *Lancet.* 2004;363(9416):1209–19.
15. Goulart IMB, Penna GO, Cunha G. Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002;35(4):365–75.

16. Abbas AK, Andrew HL, Shiv P. Cellular and Molecular Immunology. 6th ed. Philadelphia: Saunders Elviesier; 2010.
17. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000;343(1):37–49.
18. Cruvinel W de M, Mesquita D, Araújo JAP, Catelan TTT, de Souza AWS, da Silva NP, et al. Immune system - part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *Rev Bras Reumatol*. 2010;50(4):434–61.
19. Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197–216.
20. Frazier WJ, Hall MW. Immunoparalysis and adverse outcomes from critical illness. *Pediatr Clin North Am*. 2008;55(3):647–68, xi.
21. Jacobson EM, Huber A, Tomer Y. The HLA gene complex in thyroid autoimmunity: from epidemiology to etiology. *J Autoimmun*. 2008;30(1-2):58–62.
22. Holling TM, Schooten E, van Den Elsen PJ. Function and regulation of MHC class II molecules in T-lymphocytes: of mice and men. *Hum Immunol*. 2004;65(4):282–90.
23. Mesquita Júnior D, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWS de, Cruvinel W de M, Andrade LEC, et al. Immune system - part II: basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. *Rev Bras Reumatol*. 2010;50(5):552–80.
24. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet*. 2001;357(9270):1777–89.
25. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(2):133–46.
26. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*. 1973;137(5):1142–62.
27. Rossi M, Young JW. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol*. 2005;175(3):1373–81.
28. Lipscomb MF, Masten BJ. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev*. 2002;82(1):97–130.
29. Zou GM, Tam YK. Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances. *Eur Cytokine Netw*. 2002;13(2):186–99.

30. Palucka K, Banchereau J. Dendritic cells: a link between innate and adaptive immunity. *J Clin Immunol*. 1999;19(1):12–25.
31. Collin M, Bigley V, Haniffa M, Hambleton S. Human dendritic cell deficiency: the missing ID? *Nat Rev Immunol*. 2011;11(9):575–83.
32. Doulatov S, Notta F, Eppert K, Nguyen LT, Ohashi PS, Dick JE. Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nat Immunol*. 2010;11(7):585–93.
33. Kushwah R, Hu J. Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system. *Immunology*. 2011;133(4):409–19.
34. Shortman K, Liu Y-J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(3):151–61.
35. Goronzy JJ, Weyand CM. T-cell co-stimulatory pathways in autoimmunity. *Arthritis Res Ther*. 2008;10 Suppl 1:S3.
36. Cutler CW, Jotwani R, Pulendran B. Dendritic cells: immune saviors or Achilles' heel? *Infect Immun*. 2001;69(8):4703–8.
37. Prazma CM, Tedder TF. Dendritic cell CD83: a therapeutic target or innocent bystander? *Immunol Lett*. 2008;115(1):1–8.
38. Mazzone A, Ricevuti G. Leukocyte CD11/CD18 integrins: biological and clinical relevance. *Haematologica*. 1995;80(2):161–75.
39. Arnaout MA. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood*. 1990;75(5):1037–50.
40. Tan S-M. The leucocyte $\beta 2$ (CD18) integrins: the structure, functional regulation and signalling properties. *Biosci Rep*. 2012;32(3):241–69.
41. O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, Swiggard WJ, Betjes M, Bhardwaj N, et al. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology*. 1994;82(3):487–93.
42. Zhou LJ, Tedder TF. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol*. 1995;154(8):3821–35.
43. Aerts-Toegaert C, Heirman C, Tuyaearts S, Corthals J, Aerts JL, Bonehill A, et al. CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses. *Eur J Immunol*. 2007;37(3):686–95.
44. Lechmann M, Krooshoop DJ, Dudziak D, Kremmer E, Kuhnt C, Figdor CG, et al. The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell-mediated T cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells. *J Exp Med*. 2001;194(12):1813–21.

45. Lechmann M, Berchtold S, Hauber J, Steinkasserer A. CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation. *Trends Immunol.* 2002;23(6):273–5.
46. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, et al. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med.* 1994;180(4):1263–72.
47. Khan N, Gowthaman U, Pahari S, Agrewala JN. Manipulation of costimulatory molecules by intracellular pathogens: veni, vidi, vici!! *PLoS Pathog.* 2012;8(6):e1002676.
48. Capece D, Verzella D, Fischietti M, Zazzeroni F, Alesse E. Targeting costimulatory molecules to improve antitumor immunity. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:926321.
49. Lahiri A, Lahiri A, Das P, Vani J, Shaila MS, Chakravorty D. TLR 9 activation in dendritic cells enhances salmonella killing and antigen presentation via involvement of the reactive oxygen species. *PLoS One* . 2010;5(10):e13772.
50. Meylan E, Tschopp J. Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses. *Mol Cell.* 2006;22(5):561–9.
51. Ma X, Liu Y, Gowen BB, Graviss EA, Clark AG, Musser JM. Full-exon resequencing reveals toll-like receptor variants contribute to human susceptibility to tuberculosis disease. *PLoS One.* 2007;2(12):e1318.
52. Alcaïs A, Mira M, Casanova J-L, Schurr E, Abel L. Genetic dissection of immunity in leprosy. *Curr Opin Immunol.* 2005;17(1):44–8.
53. Bannwart CF, Nakaira ET, Sartori A, Peraçoli MTS. Interleukin-15: its role in microbial infections. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* CEVAP; 2007;13(3):562–75.
54. Tourkova IL, Yurkovetsky ZR, Gambotto A, Makarenkova VP, Perez L, Balkir L, et al. Increased function and survival of IL-15-transduced human dendritic cells are mediated by up-regulation of IL-15Ralpha and Bcl-2. *J Leukoc Biol.* 2002;72(5):1037–45.
55. Ohteki T, Suzue K, Maki C, Ota T, Koyasu S. Critical role of IL-15-IL-15R for antigen-presenting cell functions in the innate immune response. *Nat Immunol.* 2001;2(12):1138–43.
56. Summers deLuca L, Gommerman JL. Fine-tuning of dendritic cell biology by the TNF superfamily. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(5):339–51.
57. Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:137–61.
58. Barreiro LB, Quach H, Krahenbuhl J, Khaliq S, Mohyuddin A, Mehdi SQ, et al. DC-SIGN interacts with *Mycobacterium leprae* but sequence variation in this

- lectin is not associated with leprosy in the Pakistani population. *Hum Immunol.* 2006;67(1-2):102–7.
59. Geijtenbeek TBH, Van Vliet SJ, Koppel EA, Sanchez-Hernandez M, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Appelmelk B, et al. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med.* 2003;197(1):7–17.
 60. Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med.* 2003;9(5):525–32.
 61. Jullien D, Sieling PA, Uyemura K, Mar ND, Rea TH, Modlin RL. IL-15, an immunomodulator of T cell responses in intracellular infection. *J Immunol.* 1997;158(2):800–6.
 62. Hashimoto K, Maeda Y, Kimura H, Suzuki K, Masuda A, Matsuoka M, et al. Mycobacterium leprae infection in monocyte-derived dendritic cells and its influence on antigen-presenting function. *Infect Immun.* 2002 Sep;70(9):5167–76.
 63. Murray RA, Siddiqui MR, Mendillo M, Krahenbuhl J, Kaplan G. Mycobacterium leprae inhibits dendritic cell activation and maturation. *J Immunol.* 2007;178(1):338–44.
 64. Maeda Y, Mukai T, Spencer J, Makino M. Identification of an Immunomodulating Agent from Mycobacterium leprae. *Infect Immun.* 2005;73(5):2744–50.
 65. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;3(7):RESEARCH0034.
 66. Mittal A, Mishra RS, Nath I. Accessory cell heterogeneity in lepromatous leprosy; dendritic cells and not monocytes support T cell responses. *Clin Exp Immunol.* 1989;76(2):233–9.
 67. Sieling PA, Jullien D, Dahlem M, Tedder TF, Rea TH, Modlin RL, et al. CD1 expression by dendritic cells in human leprosy lesions: correlation with effective host immunity. *J Immunol.* 1999;162(3):1851–8.
 68. Lee DJ, Sieling PA, Ochoa MT, Krutzik SR, Guo B, Hernandez M, et al. LILRA2 activation inhibits dendritic cell differentiation and antigen presentation to T cells. *J Immunol.* 2007;179(12):8128–36.
 69. Maeda Y, Gidoh M, Ishii N, Mukai C, Makino M. Assessment of cell mediated immunogenicity of Mycobacterium leprae-derived antigens. *Cell Immunol.* 2003;222(1):69–77.

70. Tabouret G, Astarie-Dequeker C, Demangel C, Malaga W, Constant P, Ray A, et al. Mycobacterium leprae phenolglycolipid-1 expressed by engineered M. bovis BCG modulates early interaction with human phagocytes. PLoS Pathog. 2010;6(10):e1001159.
71. Foss NT. Aspectos imunológicos da hanseníase. Med (Ribeirao Preto Online). 1997;30(3):335.
72. Moretto DF. Avaliação da produção de citocinas por células dendríticas derivadas de pacientes dos pólos tuberculóide e virchowiano da hanseníase [Tese mestrado]. São Paulo: Universidade de Santo Amaro. Pós-graduação em análise clínicas, 2012.
73. Souza VNB, Moretto DF, Gigliotti P, Peruchi M, Braga AF, Iyer A, Das PK. Negligible IL-12p70 production by the DCs from lepromatous patients. 18th International Leprosy Congress; 2013 Sep 16-19; Brussels, Belgium; 2013.
74. Makino M, Maeda Y, Mukai T, Kaufmann SHE. Impaired maturation and function of dendritic cells by mycobacteria through IL-1beta. Eur J Immunol. 2006;36(6):1443–52.
75. Schulz O, Edwards AD, Schito M, Aliberti J, Manickasingham S, Sher A, et al. CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. Immunity. 2000;13(4):453–62.
76. López Ramírez GM, Rom WN, Ciotoli C, Talbot A, Martiniuk F, Cronstein B, et al. Mycobacterium tuberculosis alters expression of adhesion molecules on monocytic cells. Infect Immun. 1994;62(6):2515–20.
77. Harding C V, Boom WH. Regulation of antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis: a role for Toll-like receptors. Nat Rev Microbiol. 2010;8(4):296–307.
78. Mihret A, Mamo G, Tafesse M, Hailu A, Parida S. Dendritic Cells Activate and Mature after Infection with Mycobacterium tuberculosis. BMC Res Notes. 2011;4:247.
79. Hava DL, van der Wel N, Cohen N, Dascher CC, Houben D, León L, et al. Evasion of peptide, but not lipid antigen presentation, through pathogen-induced dendritic cell maturation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(32):11281–6.
80. Hanekom WA, Mendillo M, Manca C, Haslett PAJ, Siddiqui MR, Barry C, et al. Mycobacterium tuberculosis inhibits maturation of human monocyte-derived dendritic cells in vitro. J Infect Dis. 2003;188(2):257–66.