

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
Faculdade de Medicina**

**Avaliação da função macrofágica na hanseníase  
virchowiana: marcadores de superfície, receptores  
TLR e NLR e mediadores inflamatórios.**

**Patrícia Gigliotti**

**Botucatu - SP**

**2014**

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**

**Faculdade de Medicina**

**Patrícia Gigliotti**

**Avaliação da função macrofágica na hanseníase  
virchowiana: marcadores de superfície, receptores  
TLR e NLR e mediadores inflamatórios.**

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Doenças  
Tropicais da Faculdade de Medicina de  
Botucatu, para obtenção do título de  
Mestre.

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vânia Nieto Brito de Souza**

**Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alessandra Pontillo**

**Botucatu - SP**

**2014**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Gigliotti, Patrícia.

Avaliação da função macrofágica na hanseníase virchowiana : marcadores de superfície, receptores TLR e NLR e mediadores inflamatórios / Patrícia Gigliotti.  
- Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Vânia Nieto Brito de Souza

Coorientador: Alessandra Pontilo

Capes: 21102007

1. Hanseníase. 2. Macrófagos. 3. Mycobacterium leprae. 4. Receptores Toll-like. 5. Infilamassomos. 6. Citocinas. 7. Sistema imune.

Palavras-chave: Hanseníase; Infilamassomas; Macrófagos; TLR.

*O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia do Instituto Lauro de Souza Lima – ILSL, Bauru, São Paulo, com o apoio financeiro da Fundação Paulista Contra a Hanseníase sob o número 142.*

*“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei sobre  
os ombros de gigantes.”*

*Isaac Newton*  
ISAAC NEWTON

# *Dedicatória*

---

## **A Deus**

Por estar sempre em minha vida;  
Por me amparar nos momentos de dúvidas;  
Por me fortalecer na minha caminhada;  
Pelas pequenas manifestações no meu dia a dia.

## *Com carinho especial*

---

Aos meus pais, **Luís e Márcia**, pelo amor incondicional, pelo apoio em minhas decisões, e por ser a base de todas as minhas realizações.

Às minhas irmãs, **Mônica e Alessandra**, pelo amor imensurável, união absoluta e maior manifestação do amor entre irmãs.

Às famílias **Gigliotti e Felix** pela torcida, incentivo e apoio constante.

A minha querida amiga, **Érika Mozer**, pelos valiosos conselhos que sempre me apoiaram e fortaleceram minhas decisões.

# *Agradecimentos*

---

À minha orientadora **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vânia Nieto Brito de Souza**, pela paciência, carinho, confiança depositados em mim. Por todos os conhecimentos transmitidos e com um papel fundamental para a minha formação profissional. Pela amizade, ótimo convívio e conselhos. Fico imensamente grata.

À minha co-orientadora **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alessandra Pontilo**, pelo auxílio e orientação. Fico grata pelo seu carinho e pela amizade.

À pesquisadora **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Carla Pereira Latini** e o **Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> James Venturini**, pelas valiosas sugestões dadas durante o exame de qualificação deste trabalho.

À pesquisadora **Dr.<sup>a</sup> Fátima Regina Vilani Moreno**, pela colaboração como chefe do laboratório de Biologia, local que foi desenvolvido este trabalho.



# *Agradecimentos*

---

Ao **Instituto Lauro de Souza Lima**, que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do Instituto Lauro de Souza Lima que voluntariamente participaram deste trabalho.

Aos pacientes do Instituto Lauro de Souza Lima, fico grata pela confiança e colaboração.

Aos funcionários dos Laboratórios de Imunologia, expresse meus sinceros agradecimentos pela ajuda no desenvolver do meu trabalho.

Aos amigos, **André, Mariela e Bruna** agradeço pela amizade, e companheirismo vividos durante no ILSL.

# *Agradecimentos*

---

Aos amigos, **Weber, Francisco, Beatriz, Letícia, Michelle e Priscila** pela amizade.

A todos os pesquisadores deste Instituto, agradeço pela amizade.

A **Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Campanelli**, da Faculdade de Odontologia de Bauru, agradeço pela paciência em me orientar durante as análises das minhas amostras no citômetro de fluxo.

A PqC. **Dr.<sup>a</sup> Fátima Regina Vilani Moreno** e a **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alexandrina Sartori**, por aceitarem o convite para composição da banca examinadora.

Às funcionárias do SAME do Instituto Lauro de Souza Lima pela ajuda no levantamento dos prontuários dos pacientes que participaram deste trabalho.

# *Agradecimentos*

---

As companheiras e amigas do laboratório de Biologia, **Letícia**, **Nádia** e **Adriana**, pelas conversas, risos e pela amizade.

A todos os médicos, residentes, enfermeiras e auxiliares de enfermagem, do Instituto Lauro de Souza Lima, pelo auxílio durante o período de seleção dos pacientes que participaram deste trabalho.

Às funcionárias da Pós-Graduação e do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, **Solange S. Cagliari** e **Bruna Quirino Jorgetto**, pelo auxílio e atenção em todos os momentos que precisei.

À coordenadoria e ao programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos.

# *Agradecimentos*

---

À **CAPES** pela bolsa de estudos, que me auxiliou na execução deste trabalho.

À **Fundação Paulista Contra a Hanseníase** pelo auxílio financeiro, que viabilizou a execução deste trabalho.

A todos aqueles que contribuíram para que este trabalho se realizasse, minha gratidão.

## Resumo

---

Os macrófagos desempenham um papel importante na eliminação do *M. Leprae* (ML). Estas células participam do reconhecimento de patógenos e ativação do sistema imune, no entanto na hanseníase virchowiana elas se tornam alvos, servindo de habitat para o bacilo, que ali se protege da ação do sistema imune. Assim, este estudo teve por objetivo avaliar a função macrofágica de pacientes com hanseníase virchowiana (LLP) em termos de expressão de marcadores de superfície e produção de mediadores inflamatórios. Além disso, considerando o possível envolvimento dos inflamassomas na resposta dos macrófagos ao ML, foi avaliada a expressão de genes do complexo do inflamassoma. Para tanto, macrófagos diferenciados a partir de monócitos sanguíneos de LLP e indivíduos saudáveis (HC) foram cultivados com ML. A expressão dos marcadores de ativação CD40 e ICAM, e dos receptores do tipo Toll envolvidos no reconhecimento do ML, TLR1 e TLR2, foi avaliada por citometria de fluxo. A produção de citocinas pró (TNF e IL-1 $\beta$ ) e anti-inflamatórias (IL-10 e IL-1RA) foi determinada por ELISA e a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi avaliada por ensaio colorimétrico. A expressão relativa dos genes *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *CASP1*, *IL1B* e *IL18* foi avaliada por PCR em tempo real. ML induziu expressão semelhante de CD40 e ICAM em HC e LLP, assim como dos TLR1 e TLR2. TNF e IL-1 $\beta$  mostraram comportamento diferente, sendo que o ML estimulou uma produção significativa de TNF em HC e LLP, mas não induziu a secreção de IL-1 $\beta$ . H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não foi significativamente induzida pelo ML em LLP. Nenhuma diferença foi encontrada para as citocinas anti-inflamatórias entre HC e LLP. A análise da expressão de genes relacionados aos inflamassomas mostrou que ML é capaz de induzir o gene da IL-1 $\beta$ , mas não dos receptores analisados. Os dados aqui reportados mostrando deficiência na secreção de IL-1 $\beta$  em macrófagos estimulados com ML e a baixa quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzida em LLP, junto com a up-regulação do gene *IL1B*, sugerem que apesar do reconhecimento do ML e a consequente ativação dos macrófagos ser normal, o ML é capaz de inibir a sinalização

## *Resumo*

---

que leva a secreção da IL-1 $\beta$  e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, talvez inibindo, com um mecanismo ainda não conhecido, os inflamassomas.

**Palavras-chave:** Macrófagos, hanseníase, *Mycobacterium leprae*, TLR e inflamassomas.

# Abstract

---

Macrophages play a major role in the elimination of *M. leprae* (ML). These cells participate in pathogen recognition and activation of the immune system. However in the lepromatous leprosy macrophages become targets, serving as habitat for the bacillus that protects itself from the action of the immune system. This study aimed to evaluate the macrophage function in lepromatous leprosy patients (LLP) in term of surface molecules expression and cytokine and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. Moreover, considering the possible involvement of inflammasome complex in macrophage response against ML, inflammasome genes expression was evaluated. ML induced surface expression of activation markers CD40 and ICAM in healthy controls (HC) and LLP macrophages in a similar way, as well as TLRs involved in ML recognition (TLR1 and TLR2). Pro-inflammatory cytokines TNF and IL-1 $\beta$  showed a different behavior. ML was able to induce TNF in HC and LLP, but not IL-1 $\beta$ . Similarly, ML induced significant production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in HC but not in LLP macrophages. No difference was found in the production of anti-inflammatory molecules IL-10 and IL1RA in HC and LLP macrophages stimulated with ML. When inflammasome genes expression was analyzed an up-regulation of *IL1B* gene was observed in both HC and LLP macrophages stimulated with ML. Together, our data indicate that the deficiency in the production of IL-1 $\beta$  and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in lepromatous leprosy patients combined with *IL1B* gene expression induction by *M. leprae* suggested that even if surface recognition of ML and general activation of macrophages are apparently normal, the bacteria is able to inhibits the pathways leading to I IL-1 $\beta$  and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, possibly affecting inflammasome activation.

**Key-words:** Macrophages, leprosy, *Mycobacterium leprae*, TLR and inflammasome.

## *Lista de abreviaturas*

---

TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (fator de necrose tumoral)
PGL-I	Glicolípido fenólico I
TCR	<i>T cell receptor</i> (receptor de células T)
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (Grupamento de diferenciação)
OMS	Organização Mundial da Saúde
BAAR	Bactérias álcool-ácido resistentes
T ou TT	Tuberculóide
V ou VV	Tuberculóide
V ou VV	Virchowiano
D	Dimorfo
I	Indeterminado
B	<i>Borderline</i>
BT	<i>Borderline-tuberculóide</i>
BL ou BV	<i>Borderline-lepromatoso</i> ou virchowiano
BB	<i>Borderline- borderline</i>
PQT	Poliquimioterapia
PB	Paucibacilares
MB	Multibacilares
DCs	<i>Dendritic cells</i> (células dendríticas)
Th	Linfócitos T <i>helper</i>
IL-2	Interleucina-2
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL-12	Interleucina-12
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IL-1	Interleucinas-1
TLR	<i>Toll-like receptors</i> (receptores do tipo Toll)
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (espécies reativas do oxigênio)
RNI	<i>Reactive Nitrogen Intermediate</i> (reativos intermediários do



## *Lista de abreviaturas*

---

	nitrogênio)
IL-18	Interleucina-18
NFκB	<i>Fator nuclear kappa B</i> (fator de transcrição nuclear kappa B)
ATP	Adenosina trifosfato
PAMPs	<i>Pathogen associated molecular patterns</i> (padrões moleculares associados à patógenos)
DAMPs	<i>Danger associated molecular patterns</i> (padrões moleculares associados à perigo)
PRRs	<i>Pattern Recognition Receptors</i> (receptores de reconhecimento padrão)
NLRs	<i>NOD-like receptors</i> (receptores do tipo NOD)
LRR	<i>Leucine rich repeat</i> (repetições ricas em leucina)
IL-1RA	Antagonista do receptor de IL-1
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (células mononucleares do sangue periférico)

# Sumário

---

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. A história da hanseníase .....	2
1.2. Situação atual da hanseníase no mundo .....	3
1.3. <i>Mycobacterium leprae</i> .....	3
1.4. Transmissão da hanseníase .....	5
1.5. Diagnóstico da hanseníase .....	6
1.6. Manifestações clínicas da hanseníase.....	7
1.7. Imunologia da hanseníase.....	10
1.8. Macrófagos e ativação do sistema imune.....	12
1.9. TLRs.....	14
1.10. NLRs e os inflamassomas .....	16
1.11. Citocinas envolvidas na resposta frente ao <i>M. leprae</i> independentes dos inflamassomas .....	20
1.12. Interação de receptores TLR e NLR com <i>M. leprae</i> ...	21
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
2.1. Objetivo geral .....	24
2.2. Objetivos específicos .....	24
<b>4. MANUSCRITO .....</b>	<b>25</b>
Summary .....	27

# *Sumário*

---

Introduction.....	28
Methods.....	29
Results.....	32
Discussion .....	35
References.....	37
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>49</b>
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>51</b>
<b>6. APÊNDICE .....</b>	<b>58</b>
<b>7. ANEXO.....</b>	<b>60</b>

## *Introdução*

---

# *Introdução*

---

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. História da hanseníase**

A hanseníase é uma das doenças infecto-contagiosas mais antigas da humanidade e persiste como problema de saúde pública até os dias atuais <sup>(1)</sup>. Na antiguidade, era conhecida como lepra, uma doença mutilante que causava inicialmente a perda da sensibilidade e procedia de manchas vermelhas que inchavam e depois ulceravam, ocorrendo em seguida, queda das sobrancelhas, cegueira, deformidade nos lábios, desabamento do nariz e deslocamento das articulações <sup>(2), (3)</sup>.

A origem da doença é ainda discutida. Descrições de 4.000 a.C. encontradas no Egito levam a considerar a África como o foco original da doença <sup>(4)</sup>. Nas Américas, a hanseníase parece ter chegado entre os séculos XVI e XVII com os colonizadores, uma vez que não há evidências da doença entre as tribos indígenas <sup>(5), (6)</sup>. No Brasil, o primeiro caso foi notificado em 1600, na cidade do Rio de Janeiro, e em seguida foram registrados outros casos na Bahia e no Pará <sup>(6)</sup>. Na tentativa de conter a disseminação da doença, o sanitarista Dr. Emílio Ribas em 1912 destacou a importância da notificação compulsória, bem como o isolamento humanitário em hospitais-colônias. Em 1920, foi criada a Inspetoria de Lepra e Doenças Venéreas (ILDV), primeiro órgão federal destinado à campanha contra a hanseníase. Este sensibilizou o país quanto ao problema da doença, no entanto foi extinto em 1934, ano que foi feita a reforma dos serviços de saúde pública e fundados inúmeros hospitais-colônias para conter a endemia da hanseníase <sup>(7)</sup>.

A construção de hospitais se atentava à questão da profilaxia, bem como ao tratamento com o óleo de chaulmoogra, o qual foi utilizado por muito tempo. Entretanto, devido aos efeitos colaterais, tempo prolongado de uso e inexistência de consenso sobre a possibilidade da cura, muito problemas surgiram para o uso deste fitoterápico. Assim, no início da década

# Introdução

---

de 40, o óleo de chaulmoogra foi substituído pelas sulfonas, o que permitiu uma transformação política, uma vez que os doentes passaram a ser tratados ambulatorialmente. Em 7 de Maio de 1962, foi decretado o fim do isolamento obrigatório dos doentes no Brasil <sup>(8), (9), (10), (11)</sup>.

## 1.2. Situação atual da hanseníase no mundo

Dados do início de 2.013 revelaram uma prevalência de 189.018 casos no mundo e 232.857 casos novos detectados durante o ano 2.012. No Brasil, foram notificados 33.033 casos em 2.012, dos quais 20.990 apresentaram a forma multibacilar. Embora o número de pacientes tenha diminuído nas últimas décadas, o que mostra que as campanhas de controle da hanseníase têm melhorado nas áreas endêmicas, a detecção de casos novos permanece elevada o que gera novos desafios para os programas de controle da hanseníase <sup>(12)</sup>.

## 1.3. *Mycobacterium leprae*

O agente etiológico da hanseníase foi descoberto em 1873 por Gerhard Henrick Armauer Hansen, médico norueguês, que ao analisar lesões cutâneas de seus pacientes identificou o *Mycobacterium leprae* <sup>(4), (13)</sup>.

O *M. leprae* é um bacilo gram-positivo, fortemente álcool-ácido resistente quando submetido à coloração de Ziehl-Neelsen que pertence à ordem Actinomycetales e a família Mycobacteriaceae. Apresenta-se sob a forma de bacilo reto ou levemente encurvado e mede aproximadamente de 1 a 8 µm de comprimento e 0,3 µm de diâmetro. É um parasita intracelular obrigatório, não cultivável em meios artificiais, o que dificulta os estudos laboratoriais. Entretanto, em 1960, Shepard obteve multiplicação bacilar no coxim plantar de camundongos a partir da inoculação de uma suspensão rica em bacilos o que aumentou a disponibilidade de bacilos para o estudo das propriedades metabólicas, antigênicas e de patogenicidade <sup>(13), (14), (15)</sup>.

Em 2001, Cole *et al.* <sup>(16)</sup> publicaram o genoma completo do *M. leprae*, o qual continha 3.268.203 pares de bases (bp), com teor médio de 57,8% de

# Introdução

---

G + C, valores muito inferiores àqueles encontrados para o *Mycobacterium tuberculosis*. O genoma do *M. leprae* apresenta 1.116 pseudogenes, o equivalente a 27% do seu genoma total. A comparação detalhada entre essas duas micobactérias revela uma perda maciça de genes pelo *M. leprae*, demonstrando que este sofreu uma evolução reducional, o que pode explicar a multiplicação lenta e a dependência do meio intracelular para sua proliferação.

O *M. leprae* possui predileção por algumas regiões anatômicas, tais como a pele, mucosa nasal e nervos periféricos, sugerindo a preferência por temperaturas inferiores a 37°C. No meio externo ao hospedeiro, em fragmentos de biópsias, o bacilo pode manter-se viável por até 10 dias sob temperatura de 4°C <sup>(13), (15)</sup>. Em decorrência de seus alvos celulares, macrófagos e células de Schwann, o bacilo acomete terminações nervosas livres e troncos nervosos, o que leva a perda de sensibilidade, atrofias, paresias e paralisias musculares, que, se não tratadas, podem evoluir para incapacidades físicas permanentes <sup>(17)</sup>.

A parede celular do *M. leprae* é espessa e apresenta estrutura química semelhante à de outras micobactérias, constituída de peptidoglicanos e polissacarídeos, que servem de suporte para os ácidos micólicos. Um importante componente da parede celular do bacilo é a lipoarabinomanana (LAM), a qual reprime a ativação de células T e induz a síntese do fator de necrose tumoral (TNF) <sup>(13)</sup>. Os lipopolissacarídeos encontrados nas micobactérias podem atuar na sua sobrevivência no interior de células do hospedeiro e na patogênese da hanseníase. Além desses componentes, estudos demonstraram uma proteína de 21 kDa capaz de se ligar à laminina-2 das células de Schwann denominada proteína de ligação à laminina do *M. leprae* (ML-LBP<sub>21</sub>), cuja ligação pode comprometer suas funções fisiológicas e neuronais de modo irreversível. <sup>(18)</sup>.

Além da parede celular, o bacilo apresenta uma cápsula, estrutura externa rica em componentes lipídicos, sendo os mais importantes o ftiocerol dimicocerosato (PIM) e o glicolípido fenólico I (PGL-I). O PGL-I é específico

# Introdução

---

do *M. leprae* e é capaz de proteger o bacilo dos efeitos tóxicos de enzimas lisossomais e metabólicos oxidativos produzidos pelos macrófagos durante a infecção <sup>(13)</sup>. Estudos recentes descreveram que o LAM junto ao PGL-I é capaz de interferir na ativação celular dos linfócitos, inibindo a sinalização TCR/CD28, o que leva a uma redução da produção de IL-2 e blastogênese de células T <sup>(19)</sup>. Além disso, a presença de anticorpos anti-PGL-I no soro tem sido avaliada como auxílio para o diagnóstico da hanseníase <sup>(20)</sup>.

Graças ao avanço da biologia molecular, espera-se que novas técnicas permitam a descoberta de mais informações sobre a natureza do bacilo, as quais poderão auxiliar em estudos epidemiológicos e no entendimento do caráter intracelular do *M. leprae* <sup>(21)</sup>.

## 1.4. Transmissão da hanseníase

O contágio da doença ocorre pelo contato íntimo e prolongado de pessoas susceptíveis com doentes bacilíferos não tratados, os quais possuem carga bacilar suficiente para a transmissão. Diversos estudos relatam que os bacilos são eliminados através do trato respiratório superior em meio a secreções nasais ou gotículas de saliva no momento da tosse ou espirro <sup>(21), (22), (23)</sup>.

O *M. leprae* tem a capacidade de infectar grande número de indivíduos, no entanto, poucos adoecem. Evidências de tal fato são: (i) presença de anticorpos contra o bacilo em indivíduos saudáveis de áreas endêmicas; (ii) existência de linfócitos capazes de reconhecer o *M. leprae* em contactantes de pacientes; (iii) presença do bacilo na superfície dérmica de contactantes saudáveis; e (iv) cura espontânea de lesões em pacientes com hanseníase. Esses achados não decorrem apenas das características intrínsecas do bacilo, mas dependem, sobretudo, de sua relação com o hospedeiro e do grau de endemicidade do meio. Fatores genéticos do hospedeiro e bacilo e fatores ambientais, como desnutrição, más condições sanitárias e baixo nível sócio-econômico também estão associados à transmissão da doença <sup>(23), (24)</sup>.



# *Introdução*

---

## **1.5. Diagnóstico da hanseníase**

O diagnóstico clínico é feito pela anamnese e exame físico cuidadoso, onde são avaliados os sinais e sintomas, duração e história epidemiológica do paciente, bem como, presença de manchas, nódulos, infiltrações, placas e ulcerações. Além disso, deve ser feita a pesquisa da sensibilidade térmica, dolorosa e tátil que são de grande importância, uma vez que a hanseníase acomete os nervos periféricos. Diversos estudos visam encontrar um teste laboratorial padrão ouro para o diagnóstico da hanseníase, entretanto, até o momento existem apenas ferramentas auxiliares para o diagnóstico <sup>(25)</sup>.

Dentre os exames disponíveis, a biópsia das lesões, que consiste na retirada de um fragmento do tecido a fim de auxiliar no diagnóstico clínico, revela o quadro histopatológico do paciente <sup>(26)</sup>. A baciloscopia é um procedimento de fácil execução e baixo custo realizado por profissionais da saúde devidamente treinados que visa contribuir no diagnóstico e permite a identificação de pacientes pauci e multibacilares, segundo a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) adotada pelo Ministério da Saúde do Brasil. O exame é feito por meio de um raspado intradérmico realizado consecutivamente nos lóbulos auriculares, joelhos, cotovelos e lesões visíveis, o qual é fixado em lâminas. O esfregaço é corado pelo método de Ziehl-Nielsen, que permite visualizar bactérias álcool-ácido resistentes (BAAR). O resultado é liberado de acordo com o Índice Baciloscópico, proposto por Ridley e Jopling em 1962, o qual se baseia em uma escala logarítmica com variação entre 0 a 6, de acordo com o número de bacilos encontrado nos campos examinados. No caso de resultado negativo o diagnóstico da doença não é excluído, sendo utilizadas outras ferramentas para o diagnóstico <sup>(27)</sup>.

A detecção de anticorpos anti-PGL-I, predominantemente da classe IgM, tem sido utilizada para avaliação da resposta imune humoral e como auxílio no diagnóstico da hanseníase <sup>(28)</sup>. O teste apresenta-se quase universalmente positivo em pacientes com altas cargas bacilares, mas não pode ser utilizado como um teste diagnóstico padrão ouro para todo o

# Introdução

---

espectro da doença, uma vez que pacientes no início da doença ou com baciloscopia negativa não são detectados pelo teste. Proteínas recombinantes, derivadas do *M. leprae* têm sido testadas na tentativa de facilitar o diagnóstico sorológico dos pacientes paucibacilares, entretanto, a resposta humoral frente a estes antígenos é negativa em grande parte destes pacientes, limitando seu uso na prática <sup>(29), (30)</sup>.

O antígeno de Mitsuda, um preparado bruto, não purificado, obtido a partir de hansenomas de pacientes bacilíferos foi um dos primeiros antígenos a ser utilizado na investigação laboratorial da hanseníase. Embora não tenha valor para o diagnóstico da doença tem sido utilizado para o prognóstico e classificação clínica. Este antígeno tem sido empregado para avaliar o grau de resposta imune celular do indivíduo frente ao bacilo através de inóculo intradérmico que provoca uma reação tardia. A reação de Mitsuda positiva reflete a capacidade do organismo em reagir contra o bacilo com a formação de um granuloma capaz de conter a multiplicação bacilar, enquanto sua negatividade é indicativa da resposta imune ineficaz frente ao *M. leprae* <sup>(31)</sup>.

## 1.6. Manifestações clínicas da hanseníase

A hanseníase caracteriza-se por apresentar formas clínicas, patológicas e imunológicas contrastantes, as quais dependem da interação do bacilo com o hospedeiro <sup>(10)</sup>. Devido ao modo de vida intracelular do *M. leprae*, as manifestações clínicas são dependentes da resposta imune do hospedeiro frente ao bacilo, a qual determina a posição deste no espectro clínico da doença <sup>(9)</sup>.

Diversas formas de classificação da hanseníase foram propostas, e atualmente, as mais utilizadas são as de Madri <sup>(32)</sup>, Ridley & Jopling <sup>(33)</sup> e aquela proposta pela OMS <sup>(34)</sup>. A classificação de Madri (1953) considera dois tipos polares na hanseníase: tuberculóide (T) e virchowiano (V) ou lepromatoso (L), e dois grupos instáveis: indeterminado (I) e dimorfo (D) ou *borderline* (B). São adotados quatro critérios para classificação: (i) o clínico,

# Introdução

---

que leva em consideração aspecto, número, simetria e bordas das lesões, bem como acometimento dos nervos periféricos; (ii) o bacteriológico, baseado na detecção de BAAR em lâminas de baciloscopia; (iii) o imunológico, considerando-se intradermorreação frente ao antígeno de Mitsuda; e (iv) o critério histológico que avalia a presença de granulomas definidos e infiltrado linfo-histiocitário difuso <sup>(9), (32), (35)</sup>.

Os indivíduos que desenvolvem a hanseníase tuberculóide possuem poucas lesões dermatológicas, localizadas, limitadas e assimetricamente distribuídas pela superfície corpórea. Além da pele, pode ocorrer o envolvimento de troncos nervosos sendo que alguns indivíduos apresentam somente o comprometimento neural, sem lesões cutâneas, o qual recebe a denominação de hanseníase neural pura. Histologicamente, a reação imune apresenta-se sob a forma de granulomas contendo células epitelióides contornadas por linfócitos <sup>(35)</sup>. A baciloscopia é negativa ou fracamente positiva com raros bacilos e a reação de Mitsuda é positiva nesses pacientes.

A hanseníase virchowiana expressa a forma de susceptibilidade ao *M. leprae* e caracteriza-se clinicamente por lesões dermatológicas mal definidas, discretamente hipocrômicas ou eritematosas e simetricamente distribuídas sobre a superfície corpórea. A progressão da doença resulta no comprometimento da face, sendo que alguns pacientes apresentam face leonina caracterizada pela ausência de pelos e desabamento nasal. Múltiplos troncos nervosos são comprometidos simetricamente tornando-se firmes e espessados e a baciloscopia é positiva com numerosos bacilos íntegros. Progressivamente ocorre a perda sensitiva e motora, com perda da função, atrofia muscular, paralisias e deformidades. São formados granulomas compostos por macrófagos volumosos, multivacuoladas, denominados células de Virchow, abarrotados de bacilos que proliferam e se disseminam e raros linfócitos <sup>(35)</sup>. A reação de Mitsuda é negativa, refletindo o baixo grau de imunidade celular do paciente frente à micobactéria.

# Introdução

---

Entre estes dois polos estáveis, existe o grupo dimorfo ou *borderline*, que pela classificação de Madri corresponde àqueles casos que não podem ser colocados em nenhum dos tipos polares devido à instabilidade imunológica que resulta em trânsito entre os polos tuberculóide e virchowiano <sup>(31), (34), (35)</sup>. Na hanseníase dimorfa notam-se aspectos clínicodermatológicos intermediários aos extremos da doença. As lesões são claras a hipocrômicas em pele escura e eritematosas em pele clara na forma de pápulas, nódulos ou placas. À proximidade ao polo tuberculóide observam-se lesões mais delimitadas, anestésicas e de superfície seca com bacilos raros ou ausentes. Por outro lado, alguns indivíduos apresentam características semelhantes ao polo virchowiano com lesões numerosas, mal delimitadas, cuja perda de sensibilidade não é tão intensa e a baciloscopia revela grande número de bacilos <sup>(34), (35)</sup>.

A hanseníase indeterminada é considerada a fase inicial da doença, caracterizada por lesões pequenas que se localizam predominantemente na face, tronco e nas nádegas. Há máculas hipocrômicas ou eritemato-hipocrômicas com distúrbios de sensibilidade. A baciloscopia de rotina nesses casos é negativa e o teste de Mitsuda pode ser positivo ou negativo. Se não for tratada pode evoluir para as formas da doença ou curar-se espontaneamente <sup>(34), (35)</sup>.

Em 1966, Ridley & Jopling sugeriram uma classificação baseada em critérios clínicos e bacteriológicos com ênfase nos aspectos imunológicos e histopatológicos onde o grupo dimorfo foi subdividido para classificar aqueles casos junto ao extremo tuberculóide, mas não tuberculóides, intermediários, e aqueles muito próximos aos virchowianos, mas que se diferenciavam destes por critérios histopatológicos e imunológicos. Deste modo, os tuberculóides foram denominados TT, os virchowianos (lepromatosos) LL e os dimorfos (*borderline*) foram divididos em BT (*borderline*-tuberculóide), BB (*borderline*-*borderline*) e BL ou BV (*borderline*-lepromatoso ou *borderline*-virchowiana). Clinicamente, observam-se nos *borderline*-tuberculóides (BT) lesões neurais significativas, frequentemente

# Introdução

---

graves, as quais podem acometer mais de um tronco nervoso com padrão assimétrico. Os *borderline-borderline* (BB) são extremamente instáveis dentro do espectro, com lesões dermatológicas que tendem à distribuição simétrica, de diversos tipos e dimensões. Na forma *borderline-virchowiana* (BV) as máculas se disseminam progressivamente pela pele, o que pode resultar em infiltração difusa. São observados pápulas e nódulos poucos definidos que tendem à distribuição menos simétrica quando comparada com o pólo virchowiano <sup>(32), (34), (35), (36)</sup>.

Em 1998, a Organização Mundial da Saúde (OMS) passou a recomendar a poliquimioterapia (PQT), como esquema terapêutico apropriado para a doença. Para tanto, os pacientes são submetidos à classificação simplificada e operacional baseada em critérios clínicos e bacteriológicos que agrupa os pacientes em dois grupos: paucibacilares (PB); pacientes com baciloscopia negativa, 1-5 lesões cutâneas e acometimento de apenas um nervo periférico e multibacilares (MB), os pacientes com baciloscopia positiva, mais de 5 lesões e mais de um tronco nervoso afetado <sup>(37)</sup>.

Pacientes paucibacilares recebem a poliquimioterapia paucibacilar (PQT-PB) que combina rifampicina e dapsona, drogas bactericida e bacteriostática, respectivamente, e tem uma duração mínima de 6 meses. Os multibacilares são tratados com a poliquimioterapia multibacilar (PQT-MB) composta por rifampicina, dapsona e clofazemina, sendo a última uma droga bacteriostática, por 12 ou 24 meses <sup>(37), (38)</sup>.

## 1.7. Imunologia da hanseníase

Devido à baixa variabilidade do bacilo e importante papel do sistema imune na determinação do fenótipo clínico, a hanseníase é um modelo atraente para investigação da regulação da resposta imune frente a infecções e há anos tem contribuído para a compreensão dos eventos que ocorrem após o reconhecimento de patógenos <sup>(16)</sup>. As células da imunidade inata desempenham um papel chave na modulação da resposta imune ao *M.*

# Introdução

---

*leprae*. Entre o amplo número de tipos celulares capazes de detectar a presença do bacilo, estão os macrófagos e células dendríticas (DCs), que através de sua capacidade fagocíticas englobam o *M. leprae*. Através da fagocitose, os macrófagos processam o bacilo e apresentam peptídeos antigênicos aos linfócitos T *helper* (Th), os quais juntamente com estímulos complementares são capazes de auxiliar no desenvolvimento efetivo da resposta imune adaptativa <sup>(39)</sup>.

Nos pacientes tuberculóides o *M. leprae* é fagocitado pelos macrófagos que após o processamento antigênico apresentam peptídeos antigênicos do bacilo aos linfócitos. Estes linfócitos devidamente estimulados promovem a destruição dos bacilos pelos macrófagos. A resposta imune celular eficiente é caracterizada pelo predomínio de citocinas de perfil Th1: interleucina-2 (IL-2), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-12 (IL-12) e impede a proliferação e disseminação bacilar. O IFN- $\gamma$  ativa os macrófagos aumentando a fagocitose, liberação de metabólitos bactericidas e mediadores imunológicos <sup>(38), (39)</sup>.

Por outro lado, nos pacientes virchowianos os macrófagos fagocitam os bacilos, mas não conseguem processá-los de maneira eficiente, nem são capazes de estimular o desenvolvimento de uma resposta imune celular eficaz. Assim, os bacilos se propagam para os ramos nervosos, endotélio vascular, parede muscular de vasos sanguíneos e células epiteliais. Nesses pacientes há o predomínio de citocinas do perfil Th2: interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-10 (IL-10) e uma intensa imunidade humoral com alta produção de anticorpos contra o PGL-I do *M. leprae*, sem efeitos protetores frente ao bacilo <sup>(34), (35)</sup>. A IL-4 produzida pelos linfócitos Th2 inibe a resposta imune celular bloqueando a ativação dos macrófagos, diminuindo a produção de IL-1 e TNF e reduzindo a geração de óxido nítrico, o que, em conjunto, facilita a proliferação bacilar <sup>(39)</sup>.

Assim, o destino da infecção pelo *M. leprae* em um hospedeiro depende do balanço de citocinas durante a infecção <sup>(38), (39)</sup>.

# *Introdução*

---

## **1.8. Macrófagos e ativação do sistema imune**

A imunidade inata constitui a primeira linha de defesa capaz de discriminar o próprio do não próprio <sup>(40)</sup>. Os macrófagos, descritos inicialmente por Elie Metchnikoff, no final do século XIX, foram classificadas como células fagocíticas e desempenham um papel importante na ligação entre a imunidade inata e adaptativa <sup>(41)</sup>. Inicialmente acreditavam-se que estas células eram originadas na medula óssea, circulavam no sangue periférico como monócitos, e então quando migravam para os tecidos se diferenciavam em macrófagos <sup>(39)</sup>. No entanto, evidências recentes mostram que os monócitos podem não contribuir para a maioria das populações de macrófagos teciduais e ainda apresentam papéis distintos na homeostase tecidual e na imunologia. Por outro lado, estudos sugerem que os macrófagos podem ser formados a partir de precursores embrionários capazes de se manter estáveis por auto-renovação <sup>(42)</sup>.

Os macrófagos fazem o processamento e apresentação de peptídeos antigênicos aos linfócitos T o que reforça a idéia desta célula ser uma das responsáveis pela ativação da resposta imune celular <sup>(40)</sup>. Em resposta a microrganismos os macrófagos apresentam uma polarização funcional. Macrófagos M1 possuem alta capacidade microbicida e inflamatória e são ativados por dois sinais clássicos: citocinas inflamatórias e componentes antigênicos. Macrófagos M2, por outro lado, são imunomoduladores e incompetentes para eliminação de patógenos, sendo subdivididos em: M2a induzidos pelas citocinas IL-4 e/ou IL -13; M2b induzidos por complexos imunes e agonistas de TLR ou receptores IL-1; e M2c induzidos por IL-10 e glicocorticóides. O programa de polarização M1 está associado a doenças infecciosas agudas, infecções gastrointestinais e tuberculose ativa enquanto os M2 são observados em algumas infecções micobacterianas, doença de Whipple e infecções crônicas localizadas. Embora a hanseníase virchowiana seja considerada um paradigma da resposta Th2, o status dos macrófagos desses doentes não consiste com um perfil de M2 <sup>(43)</sup>.

# Introdução

---

Mosser e Edwards <sup>(44)</sup>, por sua vez, descreveram a notável plasticidade dos macrófagos que lhes permite responder de forma diferente e eficiente aos sinais presentes no microambiente, propondo uma classificação baseada em suas funções e na manutenção da homeostase definindo: macrófagos envolvidos na defesa do hospedeiro; no processo de cicatrização; e, por último, no processo da regulação imune.

Os macrófagos ativados destroem microrganismos fagocitados mediante a ação de moléculas microbidas produzidas nos fagolisossomos. Os receptores do tipo Toll (TLR) cooperam com a produção de enzimas proteolíticas, produção de reativos intermediários do oxigênio (ROS) e do nitrogênio (RNI) e produção de citocinas e quimiocinas que formam uma ponte entre a imunidade inata e adaptativa <sup>(45)</sup>. Dentre os mediadores produzidos pelos macrófagos destacam-se a interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) e interleucina-18 (IL-18). A IL-1 $\beta$  é uma potente mediadora da resposta inflamatória cuja transcrição é induzida pela ativação do fator de transcrição nuclear kappa-B (NF $\kappa$ B), enquanto a interleucina-18 (IL-18) é expressa constitutivamente e tem sua produção aumentada após a ativação celular. Estudos relatam que na hanseníase, a presença da IL-1 $\beta$  reflete a ativação de uma resposta imune mediada por células ao *M. leprae* <sup>(45), (46)</sup>.

Netea *et al.* <sup>(47)</sup> revelaram produção e secreção ligeiramente maior de IL-1 $\beta$  em monócitos cultivados com LPS, PAM3Cys (ligante do TLR2) ou *S. epidermidis* mortos pelo calor quando comparadas com macrófagos. Os macrófagos são incapazes de produzir e liberar altos níveis de IL-1 $\beta$  frente a um único estímulo e necessitam de um segundo sinal como adenosina trifosfato (ATP) para tanto. Esse comportamento diferencial se deve ao fato dos monócitos, mas não os macrófagos, possuírem ATP endógeno que colabora com a secreção de IL-1 $\beta$ . O fato dos monócitos precisarem de um único estímulo (ativação via TLR) enquanto os macrófagos precisam de uma dupla estimulação (TLR/ATP) sugere uma adaptação de cada tipo de célula para o seu respectivo microambiente. Quando circulantes, os monócitos tem como função vigiar e manter o ambiente livre de patógenos, de modo que



# *Introdução*

---

são capazes de responder a qualquer sinal de perigo, reconhecendo padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) e/ou padrões moleculares associados à perigo (DAMPs) <sup>(19)</sup>.

Na hanseníase, receptores de reconhecimento padrão (PRRs) do hospedeiro detectam a presença da micobactéria <sup>(48)</sup>. Esses receptores são expressos em uma ampla variedade de tipos celulares, mas principalmente em monócitos/macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e células epiteliais; estão presentes na superfície celular, em vesículas endossômicas e no citoplasma, prontos para reconhecer microrganismos em qualquer uma dessas localizações. Essas moléculas de reconhecimento detectam estruturas microbianas altamente conservadas, PAMPs, as quais são essenciais para a sobrevivência dos microrganismos. Os PRRs estão intimamente ligados às vias de transdução de sinal intracelular que ativam genes responsáveis pela resposta imunológica, em especial no desencadeamento da resposta inflamatória pela secreção de citocinas, indução da expressão de moléculas de adesão e co-estimulatórias e recrutamento de células envolvidas no desenvolvimento da resposta imune adaptativa <sup>(48)</sup>.

Os PRRs pertencem a diferentes classes de receptores, tais como os TLRs, receptores do tipo NOD (NLRs), receptores do tipo RIG-I (RLRs), e os receptores do tipo lectina C (CLRs) <sup>(49)</sup>. Os TLRs e NLRs têm sido bastante estudados devido à importância destes no desenvolvimento das respostas imunes e à fascinante interação que exibem entre si.

## **1.9. TLRs**

Os TLRs são receptores de sinalização de membrana que possuem papel essencial na defesa contra microrganismos. Existem 11 genes expressos em humanos, todos os quais são glicoproteínas transmembrânicas que contêm repetições ricas em leucina (LRR) flanqueadas por motivos ricos em cisteínas no domínio extracelular e um domínio intracitoplasmático de sinalização, homólogo ao receptor de

# Introdução

---

interleucina-1 (*Toll/interleukin receptor* – TIR), que é necessário para interação com moléculas adaptadoras e para a sinalização intracelular <sup>(40)</sup>.  
<sup>(45)</sup>. Os TLRs foram originalmente identificados na mosca-da-fruta, *Drosophila melanogaster*, devido ao seu papel na determinação do padrão dorso-ventral durante a embriogênese. Mais tarde, descobriu-se que esses receptores participavam também da sinalização em resposta às infecções em moscas adultas. Um homólogo desse receptor foi identificado em mamíferos, e proteínas semelhantes são usadas por plantas na defesa contra vírus <sup>(40)</sup>.

Os TLRs ativam uma ampla variedade de mecanismos capazes de colaborar com o desencadeamento da resposta imune, incluindo a remoção de microrganismos no meio extracelular e a destruição deste no citosol celular. Além da fagocitose, a via Toll leva à ativação de um fator de transcrição chamado NFκB, o qual é requerido para a expressão de muitos genes relacionados com a imunidade inata e com a inflamação, por meio do domínio citoplasmático TIR. O reconhecimento do ligante pela porção extracelular do TLR induz a ligação do domínio TIR à proteína adaptadora MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene (88)*), promovendo a ativação desta. Em seguida, a proteína MyD88 ativada interage com serina-treonina quinases da imunidade inata (SIK) conhecidas como IRAK, o que inicia a cascata de ativação das quinases IκKa e IκKb que formam um dímero (IκK) que fosforila uma proteína inibidora conhecida como IκB. Essa proteína encontra-se complexada ao fator de transcrição NFκB no citosol inibindo sua ação e retendo-o naquele local. Quando o IκB é fosforilado, ele se dissocia do complexo e é rapidamente degradado por proteossomas, permitindo que o NFκB entre no núcleo e se ligue a vários promotores, ativando genes que contribuem para a imunidade adaptativa e para a secreção de citocinas pró-inflamatórias <sup>(40)</sup>.

Localizados em várias células dos mamíferos, mas principalmente nas células do sistema imune inato, como monócitos/macrófagos e células

# Introdução

---

dendríticas, os TLRs têm como papel central o reconhecimento de patógenos e desencadeamento da resposta inflamatória, fagocitose e a liberação de citocinas e mediadores que atuam no sistema imune. A maioria das citocinas age em células endoteliais e leucócitos para estimular reações inflamatórias iniciais e algumas desempenham funções críticas para a defesa do hospedeiro contra patógenos e fazem a ligação entre a imunidade inata e adaptativa <sup>(40), (45)</sup>.

O TLR2 está envolvido na resposta imune a antígenos da parede do *M. leprae*, ativando macrófagos e induzindo a produção de IL-12 e o estabelecimento de respostas do tipo Th1 <sup>(21)</sup>. Este receptor necessita do TLR1 ou TLR6 como co-receptores para que haja especificidade para o ligante. Assim, o heterodímero TLR1/TLR2 ativa a resposta imune frente aos antígenos micobacterianos <sup>(50), (51)</sup>. Krutzik *et al.* <sup>(52)</sup> observaram que TLR1 e TLR2 são fortemente expressos em lesões de pacientes com a forma tuberculóide da hanseníase quando comparados com a forma virchowiana, sugerindo que a regulação da expressão e atividade dos TLRs contribui para a defesa do indivíduo contra o *M. leprae*.

## 1.10. NLRs e os inflamassomas

Os NACHT-LRR (NLRs) são uma família de receptores citoplasmáticos, capazes de detectar a presença de PAMPs e padrões moleculares associados a perigo (DAMPs – *danger-associated molecular patterns*). São caracterizados estruturalmente por uma região C-terminal que contém uma série de LRRs e um domínio central de ligação a nucleotídeos e oligomerização, denominado NACHT ou NOD. O domínio LRR atua como sensor intracelular de PAMPs/DAMPs enquanto o domínio NATCH medeia a oligomerização dependente de ATP do receptor com outras moléculas NLRs ou proteínas adaptadoras. Membros de subfamílias distintas de NLRs são caracterizados pelo domínio N-terminal o qual medeia sinais intracelulares que ativam respostas inflamatórias e pode ser pirínico (PYD, receptores

# Introdução

---

NLRPs); domínio de recrutamento de caspase (CARD, receptores NLRs); ou domínio inibidor baculoviral (BIR, receptores NAIP) <sup>(49), (51)</sup>.

Entre os NLRs, os receptores NLRP1, NLRP3 e NLRC4 foram descritos como capazes de ativar a formação de um complexo proteico de alto peso molecular conhecido como “inflamassoma”, o qual leva a ativação da caspase-1 que culmina no processamento e ativação da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  e de outras citocinas da mesma família, tais como IL-18 e interleucinas-33 (IL-33) <sup>(49)</sup>.

A caspase-1 é uma enzima da família de cisteína-aspartato proteases (*Cysteiny-ASPartate proteASES*) envolvida no processo inflamatório. Sintetizada com 45 kD (p45), é denominada inicialmente procaspase-1, e quando ativada pelo inflamassoma é clivada em proteínas de 20 kD (p20) e 10 kD (p10) que formam um complexo heterotetramérico que expressa uma potente atividade enzimática e tem como principais substratos a pró-IL-1 $\beta$  e a pró-IL-18. Além disso, a caspase-1 também é capaz de executar um programa de morte celular rápida, denominado piroptose, que é exercido pelos macrófagos, em resposta às bactérias intracelulares <sup>(53)</sup>.

A IL-1 $\beta$  é produzida na forma inativa (pró-IL-1 $\beta$ ) e a forma biologicamente ativa (IL-1 $\beta$ ) é o produto da clivagem pela caspase-1 (17 kD). A caspase-1 promove ainda a clivagem da pró-IL-18, que na sua forma biologicamente ativa induz a imunidade mediada por células. Em resposta à IL-18, há uma intensa produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T helper, os quais ativam macrófagos e outras células do sistema imune desenvolvendo um elo entre a imunidade inata e adaptativa <sup>(45)</sup>.

Os receptores que levam a ativação dos inflamassomas podem ser ativados por diferentes PAMPs e/ou DAMPs através mecanismos específicos ainda não totalmente esclarecidos. Atualmente, sabe-se que NLRP1 e NLRC4 são ativados especialmente por toxina tetânica e bactérias flageladas, respectivamente. O NLRP3 responde a uma grande variedade de moléculas de origem microbiana, tais como genoma viral ou bacteriano, toxinas e componentes da superfície microbiana além de moléculas

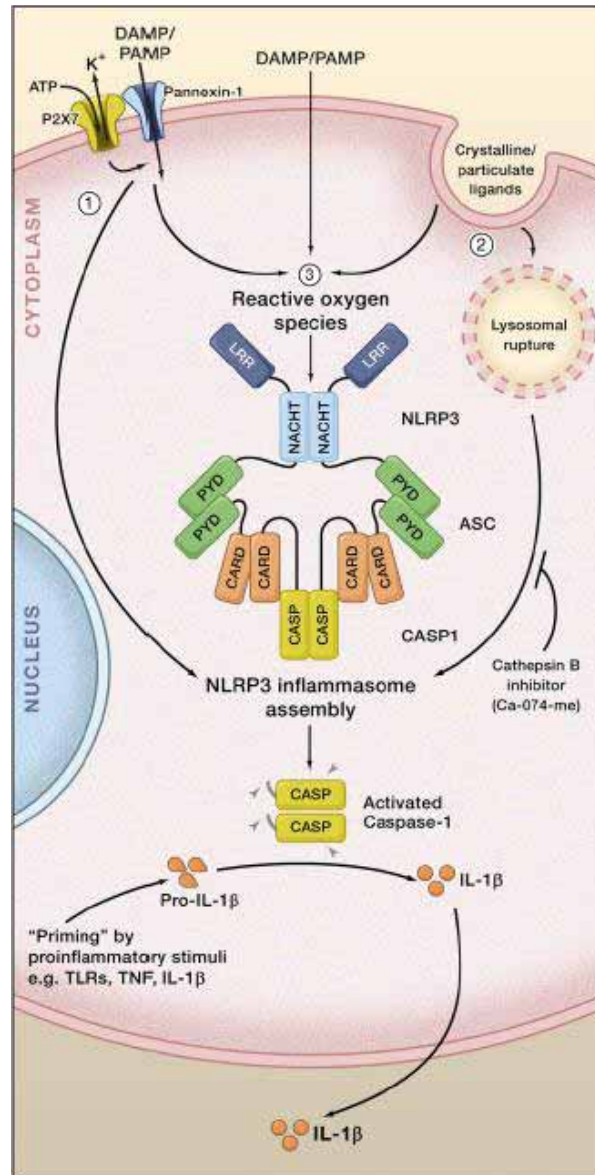
## *Introdução*

---

irritantes, como os cristais de ácido úrico ou de colesterol, sílica, asbesto e alumínio sugerindo que sua ativação pode acontecer por um mecanismo indireto, possivelmente mediado por mecanismos de resposta comuns da imunidade inata à injúria tais como produção de radicais de oxigênio e liberação de catepsina que denota desestabilização lisossomal <sup>(45), (49), (51), (54)</sup>.

A Figura a seguir demonstra os 3 modelos de ativação do inflamassoma NLRP3 atualmente aceitos: (i) reconhecimento do PAMP/DAMP através do LRR que leva o receptor a interagir com os outros componentes do inflamassoma; (ii) desestabilização lisossomal e (iii) presença de um sinalizador secundário, como o ROS. Dependendo do tecido e do tipo celular, um primeiro sinal é necessário para a produção de um ou mais componentes do inflamassoma. Geralmente este sinal é mediado por outros receptores da imunidade inata, tais como os TLRs.

# Introdução



**Figura:** Modelos de ativação do NLRP3. (1) Reconhecimento de agentes patogênicos (PAMPs) ou sinalização de DAMPs, previamente mediado pelos TLRs. Além disso, a formação de poros na membrana produzidos por toxinas bacterianas é capaz de causar um desequilíbrio iônico o que leva a ativação deste receptor intracitoplasmático. (2) Estruturas particuladas, como sílica, amianto e partículas de agonistas fagocitados que levados para digestão podem causar ruptura lisossomal. (3) Produção de ROS, em respostas a infecções e injúria celular. Fonte: Schroder *et al.* <sup>(49)</sup>.

# Introdução

---

## 1.11. Citocinas envolvidas na resposta frente ao *M. leprae* independentes dos inflamassomas

Algumas citocinas produzidas em resposta aos microrganismos configuram um grupo de moléculas estruturalmente diversas que não necessitam do complexo inflamassoma para se tornar biologicamente ativas, mas estão diretamente ligadas à resposta imune frente ao *M. leprae*, estas incluem o TNF, IL-10 e o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RA).

O TNF tem como principais fontes os macrófagos, monócitos e células T e é o principal mediador das respostas inflamatórias agudas tendo como função fisiológica primordial estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção ativando essas células para erradicação de microrganismos <sup>(45)</sup>. Na hanseníase, estudos sugerem que a presença do TNF esta relacionada com a defesa e resistência à instalação do processo infeccioso <sup>(55)</sup>.

A IL-10 é produzida principalmente por macrófagos e células T reguladoras e têm como principal função inibir a função dos macrófagos. Em processos infecciosos por micobactérias o predomínio de IL-10 reflete a incapacidade do hospedeiro em produzir uma resposta imune efetiva contra o bacilo <sup>(45)</sup>. O'Leary *et al.* <sup>(56)</sup> demonstraram que a adição de IL-10 em culturas de macrófagos humanos de doadores saudáveis estimulados com *M. tuberculosis* resultava em persistência e multiplicação do bacilo, além de inibir a maturação do fagossoma, sustentando a hipótese de que o predomínio de IL-10 favorece o desenvolvimento de infecções micobacterianas.

A IL-1RA é um antagonista natural do receptor da IL-1 produzido pelos fagócitos mononucleares. Estruturalmente homólogo à citocina, se liga aos mesmos receptores e atua como um inibidor competitivo <sup>(45)</sup>. Morris *et al.* <sup>(57)</sup> analisaram a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias no sobrenadante de culturas de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes hansenianos, paucibacilares e multibacilares, e indivíduos saudáveis estimuladas com fitohemaglutinina (PHA), bem como

# Introdução

---

os níveis de IL-1 $\beta$ , IL-1ra e TNF- $\alpha$  nos soros de pacientes com hanseníase. Para o TNF foi verificado um discreto aumento nos níveis no grupo paucibacilar quando comparados com o grupo controle e níveis mais altos nos multibacilares. A IL-1RA apresentou níveis altamente elevados no grupo multibacilar em comparação com grupo controle, sugerindo assim a importância deste antagonista na doença.

## 1.12. Interação de receptores TLR e NLR com *M. leprae*

Pouco se sabe sobre o papel dos inflamassomas na hanseníase. Kang *et al.* <sup>(58)</sup> avaliaram a ativação da caspase-1 e secreção de IL-1 $\beta$  em macrófagos de camundongos das linhagens C57BL/6, que possui atividade normal do inflamassoma NAIP5 e A/J, que possui uma variante defectiva deste inflamassoma. Após estímulo com o *M. leprae* houve redução na ativação da caspase-1 e na secreção de IL-1 $\beta$  em macrófagos da linhagem A/J, o que sugere grande importância deste NLR dentre os mecanismos murinos inatos da defesa contra *M. leprae*.

A produção de IL-1 $\beta$  e IL-18, que podem refletir a ativação dos inflamassomas, têm sido estudadas em pacientes hansenianos. Costa *et al.* <sup>(59)</sup> verificaram altos níveis de IL-1 $\beta$  em pacientes com hanseníase independente da forma clínica em comparação com indivíduos saudáveis, sugerindo a ativação da resposta imune celular. A produção de IL-1 $\beta$  na hanseníase virchowiana apresenta controvérsias na literatura. Enquanto Watson *et al.* <sup>(46)</sup> descrevem que os PBMCs de pacientes virchowianos são incapazes de produzir IL-1 $\beta$  após estimulação com LPS, Choi *et al.* <sup>(60)</sup> relatam produção similar à encontrada em pacientes tuberculóides, além de níveis séricos maiores do que os observados nos pacientes tuberculóides. Corroborando com este, outros estudos verificaram altos níveis de IL-1 $\beta$  nos soros de pacientes virchowianos em comparação com os pacientes que apresentavam as demais formas de hanseníase e indivíduos saudáveis <sup>(60)</sup>, <sup>(61)</sup>, <sup>(62)</sup>, <sup>(63)</sup>.



# Introdução

---

Garcia *et al.* <sup>(64)</sup> analisaram os níveis de IL-18 em lesões de pacientes tuberculóides e virchowianos e verificaram alta expressão de mRNA para IL-18 nas lesões tuberculóides quando comparadas às virchowianas e pele normal de indivíduos saudáveis. PBMCs cultivadas com antígeno sonicado do *M. leprae* demonstraram aumento na produção de mRNA da IL-18, em especial no grupo tuberculóide. Além disso, a adição de IL-18 recombinante induziu produção de IFN- $\gamma$ , mas não de IL-4, nas culturas dos pacientes tuberculóides. Estes dados indicam o papel da IL-18 na promoção de um habitat com predominância de citocinas Th1, o qual favorece a resposta imune mediada por células capaz de controlar a proliferação bacilar.

Embora os dados sobre a produção de IL-1 $\beta$  e IL-18 sugiram a ativação dos inflamassomas na hanseníase, não existem estudos demonstrando o papel destes importantes receptores, a respeito do caráter intracelular do bacilo. Assim, diante da inabilidade dos pacientes virchowianos em responder de modo eficaz ao *M. leprae*, o objetivo deste trabalho foi avaliar a função dos macrófagos destes pacientes, enfatizando o papel de receptores TLR e NLR. Para tanto, foram avaliadas a expressão de receptores de superfície ligados ao reconhecimento do *M. leprae*, a expressão gênica de receptores intracitoplasmáticos (inflamassomas), bem como a produção de citocina e mediadores inflamatórios, a fim de colaborar para melhor compreensão da participação destas células na susceptibilidade à hanseníase.

## *Objetivos*

---

# Objetivos

---

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar as características funcionais de macrófagos de pacientes com hanseníase virchowiana, bem como de controles saudáveis, na resposta imune a antígenos do *M. leprae*.

### 2.2. Objetivos específicos

1. Avaliar o perfil fenotípico de macrófagos de LPP e HC, através de avaliação da expressão dos marcadores de ativação CD40 e ICAM-1 e dos receptores TLR1 e TLR2 após estímulo com o antígeno do *M. leprae*.

2. Avaliar a produção de citocinas pró (TNF e IL-1 $\beta$ ) e anti-inflamatórias (IL-10 e IL-1RA) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em macrófagos de LPP e HC estimulados com o antígeno do *M. leprae*.

3. Avaliar a expressão gênica dos receptores *NLRP1*, *NLRP3* e *NLRC4*, de *CASP1*, e citocinas *IL1B* e *IL18* em macrófagos de LPP e HC estimulados com o antígeno do *M. leprae*.

*Manuscrito*



# *Manuscrito*

---

Running title: ***Mycobacterium leprae* and macrophage's functions.**

Title: ***Mycobacterium leprae* affects H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and IL-1 $\beta$  production in macrophages from healthy individuals and lepromatous leprosy patients.**

Patrícia Gigliotti<sup>1</sup>, André Flores Braga<sup>1</sup>, Mariela Peruchi<sup>1</sup>, Bruna Beatriz Gimenez<sup>1</sup>, Fátima Regina Vilani Moreno<sup>1</sup>, Ana Paula Campanelli<sup>2</sup>, Ana Carla Pereira Latini<sup>1</sup>, Alessandra Pontillo<sup>3</sup>, Vânia Nieto Brito de Souza<sup>1§</sup>.

<sup>1</sup>Instituto Lauro de Souza Lima, Secretaria de Estado da Saúde, Bauru, São Paulo, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, São Paulo, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil.

§Corresponding author:

Vânia Nieto Brito de Souza

Instituto Lauro de Souza Lima

Rod. Comte. João Ribeiro de Barros Km 226

Bauru – SP, Brasil                      CEP: 17034-971

Phone: (14) 31035943                  Fax: (14) 31035907

e-mail: [vanianbrito@gmail.com](mailto:vanianbrito@gmail.com)

## SUMMARY

Macrophages play a major role in the elimination of *M. leprae*. These cells participate in pathogen recognition and activation of the immune system. However in the lepromatous leprosy patients (LLP) macrophages become targets, serving as habitat for the bacillus that protects itself from the action of the immune system. This study aimed to evaluate the macrophage function in LLP term of surface molecules expression and cytokines and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. Moreover, considering the possible involvement of inflammasome complex in macrophage response against *M. leprae*, inflammasome genes expression was evaluated. *M. leprae* sonicated antigen (ML) induced surface expression of activation markers CD40 and ICAM in healthy controls (HC) and LLP macrophages in a similar way, as well as TLRs involved in *M. leprae* recognition (TLR1 and TLR2). Pro-inflammatory cytokines TNF and IL-1 $\beta$  showed a different behavior. ML was able to induce TNF in HC and LLP, but not IL-1 $\beta$ . Similarly, ML induced significant production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in HC but not in LLP macrophages. No difference was found in the production of anti-inflammatory molecules IL-10 and IL-1RA in HC and LLP macrophages stimulated with ML. When inflammasome genes expression was analyzed an up-regulation of *IL1B* was observed in both HC and LLP macrophages stimulated with ML. Together, our data indicate that the deficiency in the production of IL-1 $\beta$  and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in lepromatous leprosy patients combined with *IL1B* gene expression induction by *M. leprae* suggested that even if surface recognition of ML and general activation of macrophages are apparently normal, the bacteria is able to inhibits the pathways leading to IL-1 $\beta$  and ROI production possibly affecting inflammasome activation.

**KEY-WORDS:** Macrophages, leprosy, *M. leprae*, TLR, inflammasomes.

**GRANT:** Fundação Paulista contra a Hanseníase (Grant. 142).

## INTRODUCTION

Macrophages perform an important role in the attempt to eliminate pathogens. These cells use many pattern recognition receptors (PRR) to recognize, phagocyte, and trigger the mechanisms of defense against invading microorganisms (1), (2). Mycobacterial infection, for instance, induces quickly activation of receptors that contribute to elimination of bacilli via secretion of cytokines and production of anti-microbial molecules such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3), (4). Activation of Toll-like receptors (TLR), previously associated with leprosy (5), (6), (7), (8), (9) trigger production of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , TNF and IL-6, as well as, the expression of costimulatory molecules that can influence the nature of the adaptive T and B cell response (10).

Leprosy is a chronic mycobacterial infection caused by *Mycobacterium leprae* that grows strictly in the intracellular environment. The control of *M. leprae* depends on the effective interaction between cells from the innate and acquired immune response (11). Host response varies among leprosy patients from a strong Th1 response which is responsible for the resistant form of leprosy (tuberculoid leprosy, TT) to a predominant Th2 profile which is not protective against the bacillus (lepromatous leprosy, LL) (11), (12). Leprosy divergent clinical forms resulted from a multifactorial trait of host genetics background and immunologic characteristics.

Even if several studies reported data about the interaction between *M. leprae* and macrophages, a deep characterization of LL macrophages is still missing. For this reason we investigated the response of macrophages isolated from LL patients (LLP) against *M. leprae* and compared it with healthy control (HC) macrophages.

Taking in account previous studies, we analyzed (1) phenotypic characteristics of macrophages through activation markers CD40 and ICAM-1, as well as the expression of TLR1 and TLR2 receptors, as preferred PRRs

for *M. leprae* response (2); (2) inflammatory cytokines known to be involved in immunity against the bacillus (2); (3) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production (13). Finally the involvement of inflammasomes in macrophage response against *M. leprae* was evaluated due to its central role in the innate immunity against microorganisms. Inflammasome is responsible for pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18 production, and for driving Th1 against Th2 response (14). Moreover inflammasome activation is induced by TLRs and also by ROI (15), suggesting a possible role also in *M. leprae* pathogenesis.

## **SUBJECTS AND METHODS**

### **Patients and controls**

Eleven patients (LLP; 9 males/2 females; age range: 22-56 years) diagnosed with lepromatous leprosy evaluated at the “Lauro de Souza Lima Institute”, classified according to the criteria of Ridley and Jopling (16) (5 with borderline lepromatous leprosy and 6 with lepromatous leprosy) were included in this study. The same number of healthy controls (HC; 9 males/2 females; age range: 23-54 years) were selected among the staff of Lauro de Souza Lima Institute. This study was approved by the Ethical Committee of Lauro de Souza Lima Institute (Protocol n<sup>o</sup>. 221/11). Written informed consent was obtained from all individuals and after the formal permission, the peripheral blood was collected in heparinized tubes by specialized professionals.

### **Cell cultures and stimulation**

Monocytes were isolated by two density gradient centrifugations (Histopaque and Percoll) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden, respectively) and cultured at 5 x 10<sup>5</sup> cells/mL in medium RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, USA) supplemented



with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Gibco) and 1% antibiotic-antimycotic (Gibco, Grand Island, USA) for 7 days for generation of macrophages *in vitro*. Cells were stimulated for 2 or 24 h with *M. leprae* sonicated antigen (kindly provided by Dr. Patrick Brennan, Colorado State University) (10µg/mL), LPS (lipopolysaccharide; 0.5 µg/mL or 1 µ/mL; Sigma-Aldrich) with or without ATP (Sigma).

### **Cells phenotypic profile**

After 24 hours of stimulation, cells were harvested and surface expression of CD40, ICAM-1, TLR1 and TLR2 was analyzed by flow cytometry in FACSCalibur equipment (BD Biosciences, San Jose, USA). Monoclonal antibodies from BD Biosciences were used (San Diego, CA, USA). Data collection included at least 10.000 events. The analysis was performed using the FCS Express software version 3.0 (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA).

### **Cytokine measurement**

After 24 hours of stimulation cells supernatants were collected for measurement of IL-1β, IL-1RA, TNF and IL-10 cytokines. DuoSet ELISA development system kits (R&D Systems®, Minneapolis, MN, USA) were used according to the manufacturer's directions.

### **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detection**

After 24 hours of stimulation, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was measured using by Pick and Misel (1981) method. Briefly, cells were incubated with phenol red, horseradish peroxidase and phorbol myristate acetate for 1 hour at 37°C. The reaction was stopped by adding NaOH and the absorbance was measured at 620 nm. Levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were expressed as nmol/10<sup>5</sup> macrophages based on a standard curve.

## **Macrophage RNA isolation, reverse transcription and Real-time PCR (RT-PCR)**

After 2 hours of stimulation, cells were harvested and preserved in 1 mL of monophasic solution of phenol and guanidine thiocyanate (TRIzol, Invitrogen); total RNA was extracted as recommended by the supplier. RNA (1µg) was retro-transcribed using SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The genes *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *CASP1*, *IL1B* and *IL18* were amplified with Taqman Gene Expression assays (Applied Biosystems, Life Technologies, USA) using a StepOnePlus™ Real-Time PCR System equipment (Applied Biosystems) according to the manufacturer instructions. Beta-2-microglobulin (B2M, Hs00984230\_m1) (Applied Biosystems) housekeeping genes were used to normalize the results. Relative quantitative expression between two groups was calculated as Fold Change (FC) =  $2^{\text{exp}-\Delta\Delta\text{Ct}}$  according to Livak *et al.* (17).

## **Statistical analysis**

To compare LLP and HC it was used the nonparametric Mann-Whitney test. Comparison of stimulated versus resting macrophages was made by nonparametric Wilcoxon matched pairs test when one stimulus is present and nonparametric Friedman test with post-test Dunn when two different stimulus were used. All analyzes were performed by the statistical program InStat GraphPad 3.0 (La Jolla, CA, USA; 1997). Graphical representations were made in GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, CA, USA; 2007).

## RESULTS

### **The expression of TLR1/TLR2, CD40 and ICAM-1 is not affected in macrophages from LLP**

We first wondered whether macrophages from LLP individuals activate similarly to HC macrophages after stimulation with ML. For this purpose we evaluated surface expression of common activation markers CD40 and ICAM. LPS was used as positive control of macrophages activation. As expected LPS was able to induce CD40 and ICAM in HC and also in LLP macrophages (data showed in Supplementary Data 1), suggesting that cells were able to normally respond against common bacterial compounds. CD40 expression appeared to be induced by ML in HC (MFI=47.40  $\pm$ 2.80 versus MFI=44.11  $\pm$ 2.95;  $p=0.002$ ) and LLP macrophages (MFI=36.52  $\pm$ 2.75 versus MFI=32.78  $\pm$ 2.40;  $p=0.002$ ). Basal expression of CD40 did not significantly vary between HC and LLP ( $p>0.05$ ) (Figure 1.a). ML was able to augment ICAM expression in LLP (MFI=593.50  $\pm$ 73.35 versus MFI=445.10  $\pm$ 58.26;  $p=0.032$ ) and also in HC macrophages (MFI=518.60  $\pm$ 112.70 versus MFI=338.90  $\pm$ 85.29;  $p=0.001$ ). Basal expression of ICAM resulted higher in LLP than in HC macrophages however this difference did not reach significant threshold (MFI=445.10  $\pm$ 85.29 versus MFI=388.90  $\pm$ 58.26;  $p=0.065$ ) (Figure 1.b).

Then, hypothesizing that LLP may down-regulated the surface expression of Toll-like receptors involved in *M leprae* detection (18), TLR1 and TLR2 were evaluated after ML stimulation in macrophages from HC and from LLP individuals. ML was able to enhance the expression of TLR1 and TLR2 in HC (TLR1: MFI=19.46 versus MFI=18.60,  $p=0.0078$ ; TLR2: MFI=45.73 versus MFI=44.71,  $p=0.0024$ ) as well as in LLP (TLR1: MFI=13.82  $\pm$ 1.71 versus and MFI=13.16  $\pm$ 1.71,  $p=0.0059$ ; TLR2: MFI=35.87 versus MFI=31.62,  $p=0.0010$ ). Basal expression of this receptor resulted similar in HC and in LLP ( $p>0.05$ ). (Figure 1.c and d).

## ***Cytokines and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production.***

TNF, IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-1RA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was analyzed after ML stimulation in macrophages from HC to evaluate whether ML affect itself cytokines production (mimic acute infection), and in macrophages from LLP to test the response in chronic infection. LPS was used as positive control of cytokine and ROI production. As expected LPS was able to induce cytokines and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in HC and also in LLP macrophages (data showed in Supplementary Data 2) emphasize once more than LLP macrophages are able to respond to bacterial components. ML significantly stimulated TNF production in HC (102.90 pg/mL  $\pm$ 191.00 versus 22.90 pg/mL  $\pm$ 31.67;  $p=0.005$ ) as well in LLP macrophages (120.60 pg/mL  $\pm$ 42.05 versus 21.10 pg/mL  $\pm$ 4.88;  $p=0.0005$ ) (Figure 2.a), whereas it was not able to induce IL-1 $\beta$  production in HC (1.50 pg/mL  $\pm$ 0.82 versus 2.1 pg/mL  $\pm$ 0.7743;  $p>0.05$ ) nor in LLP cells (1.00 pg/mL  $\pm$ 0.33 versus 0.95 pg/mL  $\pm$ 0.21;  $p>0.05$ ) (Figure 2.b). Secretion of TNF and IL-1 $\beta$  did not significantly varied between HC and LLP resting macrophages as well as between activated ones (Figure 2.a and b). In our experiments IL-18 was below the limit of detection and we cannot deduced nothing about this cytokine

For what concern anti-inflammatory cytokines, ML induced significant IL-10 secretion in HC (248.80 pg/mL  $\pm$ 55.58 versus 34.60 pg/mL  $\pm$ 30.11;  $p=0.002$ ) as well as in LLP macrophages (230.80 pg/mL  $\pm$ 44.65 versus 33.30 pg/mL  $\pm$ 7.46;  $p=0.001$ ) (Figure 2.c). In a similar way, ML significantly induced IL-1RA in HC (3419.00 pg/mL  $\pm$ 1223.00 versus 702.20 pg/mL  $\pm$ 316.00;  $p=0.001$ ) and in LLP macrophages (3667.00 pg/mL  $\pm$ 995.40 versus 575.80 pg/mL  $\pm$ 224.50;  $p=0.001$ ) (Figure 2.d). Secretion of IL-10 and IL-1RA did not significantly varied between HC and LLP resting macrophages (34.60 pg/mL  $\pm$ 30.11 versus 33.30 pg/mL  $\pm$ 7.46;  $p>0,05$ ) as well as between activated ones (702.20 pg/mL  $\pm$ 316.00 versus 575.80 pg/mL  $\pm$ 224.50;  $p>0.05$ ) (Figure 2.c and d).

Taking in account anti-bacterial respiratory burst, ML induced significant production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in HC (1.28 nmol/10<sup>5</sup> cells ±0.17 versus 0.99 nmol/10<sup>5</sup> cells ±0.13; p<0.01) but not in LLP macrophages (0.55 nmol/10<sup>5</sup> cells ±0.15 versus 0.44 nmol/10<sup>5</sup> cells ±0.11; p>0.05). This seems to be an effect due to ML itself because LPS was able to induce significant amount of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in LLP cells (0.94 nmol/10<sup>5</sup> cells ±0.20 versus 0.44 nmol/10<sup>5</sup> cells ±0.11; p<0.01) (Figure 3). Basal production of the ROI appeared to be lower in LLP than in HC resting and stimulated macrophages however this difference did not reach significant threshold (0.99 nmol/10<sup>5</sup> cells ±0.13 versus 0.44 nmol/10<sup>5</sup> cells ±0.11; p>0,05) (Figure 3).

### **Macrophages from lepromatous leprosy patients have down-regulation *IL1B* and *NLRP3* genes in comparison to macrophages from healthy controls after nonspecific stimulus.**

To investigate whether the failure in IL-1β induction by ML may be related with an impaired transcription of inflammasome, we analyzed the expression of main inflammasome genes *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *CASP1*, *IL1B* and *IL18* in macrophages from HC and LLP after stimulation with ML. Also in this case LPS was implied as positive control for gene expression (data reported in Supplementary Data 3). Inflammasome receptors genes *NLRP1* and *NLRP3* were poorly induced by ML in HC macrophages (1.16-fold and 1.01-fold, respectively) and a little more in LLP ones (1.66 fold and 1.37 fold, respectively). On the other hand, *NLRC4* was induced by ML in HC macrophages (2.96-fold) and down-regulated in LLP cells (-4.76-fold). *CASP1* was little modulated by ML both in HC and LLP macrophages (-1.02-fold and 1.33-fold, respectively). *IL1B* was significantly more induced by ML in LLP than in HC cells (12.57-fold and 2.56-fold, respectively; p=0.036) (Figure 4.a).

When basal expression was compared in LLP versus HC macrophages, we noted that LLP cells showed increased expression of

*NLRP1* (2.78-fold) and *NLRC4* (11.50-fold), however *NLRP3* resulted down-regulated (-1.60-fold). *CASP1* seemed to have the same expression level in HC and LLP macrophages (1.09-fold). *IL1B* and *IL18* appeared to be little more expressed in LLP than in HC macrophages (1.32-fold) however *IL18* was less expressed in LLP than in HC macrophages (-1.26-fold) (Figure 4.b).

## **DISCUSSION**

Leprosy is a chronic multifactorial infectious disease. The immune response against *M. leprae* is complex and results in a wide spectrum of clinical manifestations depending on the host-parasite interaction. Thus, the disease has been an attractive model for investigating the mechanisms of recognition and activation of the immune response in infectious diseases. Although LLP are unable to contain bacterial multiplication, resulting in the spread of disease, they do not show an increased susceptibility to other infectious diseases caused by intracellular pathogens or to tumoral processes which suggest that the mechanisms of cell mediated immunity operate fully in these individuals. In this study we investigated phenotypic and functional characteristics of macrophages from LLP hypothesizing that some mechanism of innate immune response could be impaired in these individuals.

Our results indicated that macrophages from leprosy patients expressed co-stimulatory molecules (CD40 and ICAM-1) and TLRs involved in ML response (TLR-1 and TLR-2) in similar levels compared to healthy controls when activated with *M. leprae*, indicating that, out of the immunosuppressive habitat found in lesions, macrophages from LLP are able to respond in a similar way to that seen in HC at least for what concern recognition and “general” activation of these cells. However, when we looked

at cytokines and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production we observed that whether TNF and anti-inflammatory cytokines are normally induced by ML in LLP and HC macrophages, IL-1 $\beta$  and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were affected by mycobacteria.

It is likely that there is a defect in LLP in the recognition of the bacillus that affects the triggering of macrophage microbicidal mechanisms. Our data supported previously studies on impairment of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in activated leprosy macrophages (19), (20).

Considering that a diminished production of IL-1 $\beta$  and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> may be due to a failure of inflammasome activation (15), we investigated the expression profile of some of its major components. While ML was not able

to induce up-regulation of *NLRP3*, which is the receptor more commonly activated by microorganisms, nor of *NLRP1*. *NLRC4* was up-regulated in HC and down-regulated in LLP, indicating a possible involvement of this receptor in response against ML. Interesting when we evaluated the basal profile of LLP macrophages compared to HC, we observed that *NLRP3* was lower expressed in LLP than in HC resting macrophages suggesting a down-regulation of NLRP3 inflammasome by ML infection in these patients, as it was described for *M. tuberculosis* (21). As the NLRP3 inflammasome was activated also by ROI, the lower production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> may be a consequence of failure of NLRP3 inflammasome activation or a cause for a minor induction of this complex. Moreover *NLRP1* and *NLRC4* appeared to be more expressed in LLP than in HC, indicating that these two receptors may play a still unknown role within ML infection or alternatively that it was a compensatory mechanism due to the down-regulation of NLRP3 inflammasome. It is interesting to notice that single nucleotide polymorphisms in *NLRP1* were recently associated to leprosy in a Brazilian multi-centric study by our group (22) emphasizing the involvement of this receptor in ML infection. Deeper investigations are needed to elucidate the role of inflammasome within ML infection.

## **Acknowledgments**

We would like to thank the staff and patients from “Lauro de Souza Lima Institute” that accepted contribute to thiLs study. This work was supported by Fundação Paulista Contra a Hanseníase (Grant. 142).

## **REFERENCES**

1. Creagh EM, O’Neill L a J. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol* [Internet]. 2006 Aug [cited 2013 Nov 8];27(8):352–7.
2. Modlin RL. The innate immune response in leprosy. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2010 Feb [cited 2013 Nov 12];22(1):48–54.
3. Babior BM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts). *N Engl J Med* [Internet]. 1978 Mar 23 [cited 2013 Dec 19];298(12):659–68.
4. Hu Y, Mao K, Zeng Y, Chen S, Tao Z, Yang C, et al. Tripartite-motif protein 30 negatively regulates NLRP3 inflammasome activation by modulating reactive oxygen species production. *J Immunol* [Internet]. 2010 Dec 15 [cited 2014 Jun 2];185(12):7699–705.
5. Johnson CM, Lyle EA, Omueti KO, Stepensky VA, Yegin O, Alpsoy E, et al. A Common Polymorphism Impairs Cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. *J Immunol*. 2012;178:7521–4.
6. Omueti KO, Mazur DJ, Thompson KS, Lyle E a, Tapping RI. The polymorphism P315L of human toll-like receptor 1 impairs innate immune sensing of microbial cell wall components. *J Immunol* [Internet]. 2007 May 15;178(10):6387–94.
7. Misch E a, Macdonald M, Ranjit C, Sapkota BR, Wells RD, Siddiqui MR, et al. Human TLR1 deficiency is associated with impaired mycobacterial signaling and protection from leprosy reversal reaction. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2008 Jan [cited 2013 Nov 22];2(5):e231.
8. Schuring RP, Hamann L, Faber WR, Pahan D, Richardus JH, Schumann RR, et al. Polymorphism N248S in the human Toll-like



- receptor 1 gene is related to leprosy and leprosy reactions. *J Infect Dis* [Internet]. 2009 Jun 15 [cited 2013 Dec 13];199(12):1816–9.
9. Marques CDS, Brito-de-Souza VN, Guerreiro LTA, Martins JH, Amaral EP, Cardoso CC, et al. Toll-like receptor 1 N248S single-nucleotide polymorphism is associated with leprosy risk and regulates immune activation during mycobacterial infection. *J Infect Dis* [Internet]. 2013 Jul [cited 2013 Dec 13];208(1):120–9.
  10. Xu W, Banchereau J. The Antigen Presenting Cells Instruct Plasma Cell Differentiation. *Front Immunol* [Internet]. 2014 Jan 6 [cited 2014 May 30];4(January):504.
  11. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The Continuing Challenges of Leprosy. 2006;19(2):338–81.
  12. Madan NK, Agarwal K, Chander R. Serum cytokine profile in leprosy and its correlation with clinico-histopathological profile. *Lepr Rev*. 2011;82:371–82.
  13. Marolia J, Mahadevan PR. Mycobacterium leprae mediated stimulation of macrophages from leprosy patients and hydrogen peroxide production. *J Biosci* [Internet]. 1988 Sep;13(3):295–303.
  14. Dinarello C a. Interleukin 1 and interleukin 18 as mediators of inflammation and the aging process. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2006 Feb;83(2):447S–455S.
  15. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* [Internet]. 2010 Mar 19 [cited 2013 Oct 31];140(6):821–32.
  16. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. *Intern J Lepr*. 1966;34(3):255–73.
  1. Creagh EM, O'Neill L a J. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol* [Internet]. 2006 Aug [cited 2013 Nov 8];27(8):352–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16807108>
  2. Modlin RL. The innate immune response in leprosy. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2010 Feb [cited 2013 Nov 12];22(1):48–54. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2882026&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

3. Babior BM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts). *N Engl J Med* [Internet]. 1978 Mar 23 [cited 2013 Dec 19];298(12):659–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24176>
4. Hu Y, Mao K, Zeng Y, Chen S, Tao Z, Yang C, et al. Tripartite-motif protein 30 negatively regulates NLRP3 inflammasome activation by modulating reactive oxygen species production. *J Immunol* [Internet]. 2010 Dec 15 [cited 2014 Jun 2];185(12):7699–705. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21048113>
5. Johnson CM, Lyle EA, Omuetti KO, Stepensky VA, Yegin O, Alpsoy E, et al. A Common Polymorphism Impairs Cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. *J Immunol*. 2012;178:7521–4.
6. Omuetti KO, Mazur DJ, Thompson KS, Lyle E a, Tapping RI. The polymorphism P315L of human toll-like receptor 1 impairs innate immune sensing of microbial cell wall components. *J Immunol* [Internet]. 2007 May 15;178(10):6387–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17475868>
7. Misch E a, Macdonald M, Ranjit C, Sapkota BR, Wells RD, Siddiqui MR, et al. Human TLR1 deficiency is associated with impaired mycobacterial signaling and protection from leprosy reversal reaction. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2008 Jan [cited 2013 Nov 22];2(5):e231. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2330092&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
8. Schuring RP, Hamann L, Faber WR, Pahan D, Richardus JH, Schumann RR, et al. Polymorphism N248S in the human Toll-like receptor 1 gene is related to leprosy and leprosy reactions. *J Infect Dis* [Internet]. 2009 Jun 15 [cited 2013 Dec 13];199(12):1816–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19456232>
9. Marques CDS, Brito-de-Souza VN, Guerreiro LTA, Martins JH, Amaral EP, Cardoso CC, et al. Toll-like receptor 1 N248S single-nucleotide polymorphism is associated with leprosy risk and regulates immune activation during mycobacterial infection. *J Infect Dis* [Internet]. 2013 Jul [cited 2013 Dec 13];208(1):120–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23547143>
10. Xu W, Banchereau J. The Antigen Presenting Cells Instruct Plasma Cell Differentiation. *Front Immunol* [Internet]. 2014 Jan 6 [cited 2014

May 30];4(January):504. Available from:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3880943&to=ol=pmcentrez&rendertype=abstract>

11. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The Continuing Challenges of Leprosy. 2006;19(2):338–81.
12. Madan NK, Agarwal K, Chander R. Serum cytokine profile in leprosy and its correlation with clinico-histopathological profile. *Lepr Rev*. 2011;82:371–82.
13. Marolia J, Mahadevan PR. Mycobacterium leprae mediated stimulation of macrophages from leprosy patients and hydrogen peroxide production. *J Biosci* [Internet]. 1988 Sep;13(3):295–303. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF02712154>
14. Dinarello C a. Interleukin 1 and interleukin 18 as mediators of inflammation and the aging process. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2006 Feb;83(2):447S–455S. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16470011>
15. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* [Internet]. 2010 Mar 19 [cited 2013 Oct 31];140(6):821–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303873>
16. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. *Intern J Lepr*. 1966;34(3):255–73.
17. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* [Internet]. 2001 Dec [cited 2014 May 23];25(4):402–8.
18. 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* [Internet]. 2003 May [cited 2013 Nov 5];9(5):525–32.
19. Laochumroonvorapong P, Paul S, Manca C, Freedman VH, Kaplan G. Mycobacterial growth and sensitivity to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> killing in human monocytes in vitro. *Infect Immun* [Internet]. 1997 Nov;65(11):4850–7.
20. Marolia J, Mahadevan PR. Mycobacterium leprae mediated stimulation of macrophages from leprosy patients and hydrogen peroxide production. *J Biosci* [Internet]. 1988 Sep;13(3):295–303.

21. Master SS, Rampini SK, Davis AS, Keller C, Ehlers S, Springer B, et al. Mycobacterium tuberculosis prevents inflammasome activation. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2008 Apr 17 [cited 2013 Dec 10];3(4):224–32.
22. Pontillo A, Laurentino W, Crovella S, Pereira AC. NLRP1 haplotypes associated with leprosy in Brazilian patients. *Infect Genet Evol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2013 Oct [cited 2014 Jun 26];19:274–9.

**FIGURES**

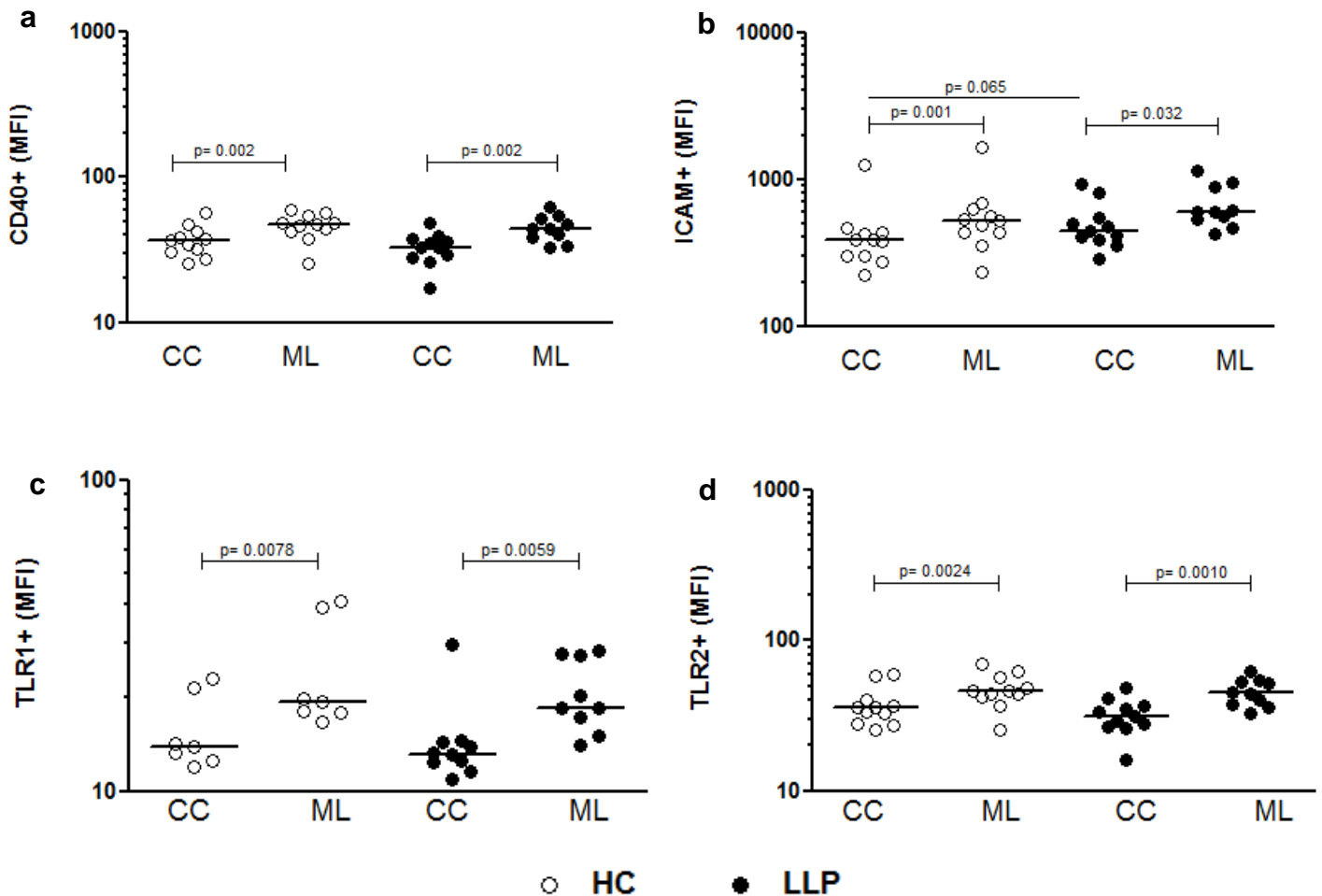


Figure 1: Expression of CD40, ICAM-1, TLR1 and TLR2 in macrophages stimulated with *M. leprae* sonicated antigen. At the 7<sup>th</sup> day of culture macrophages were stimulated in the presence of *M. leprae* sonicated antigen (ML, 10µg/mL) for 24 hours. The analysis of surface markers: (a) CD40, (b) ICAM-1, (c) TLR1 and (d) TLR2 were done by flow cytometry and the results were expressed as mean fluorescence intensity (MFI), median values were indicated by a line. Wilcoxon matched pairs test was used to compare CC versus ML while comparison between HC and LLP was done by Mann Whitney test. CC: control culture (resting); HC: healthy controls; LLP: lepromatous leprosy patients.

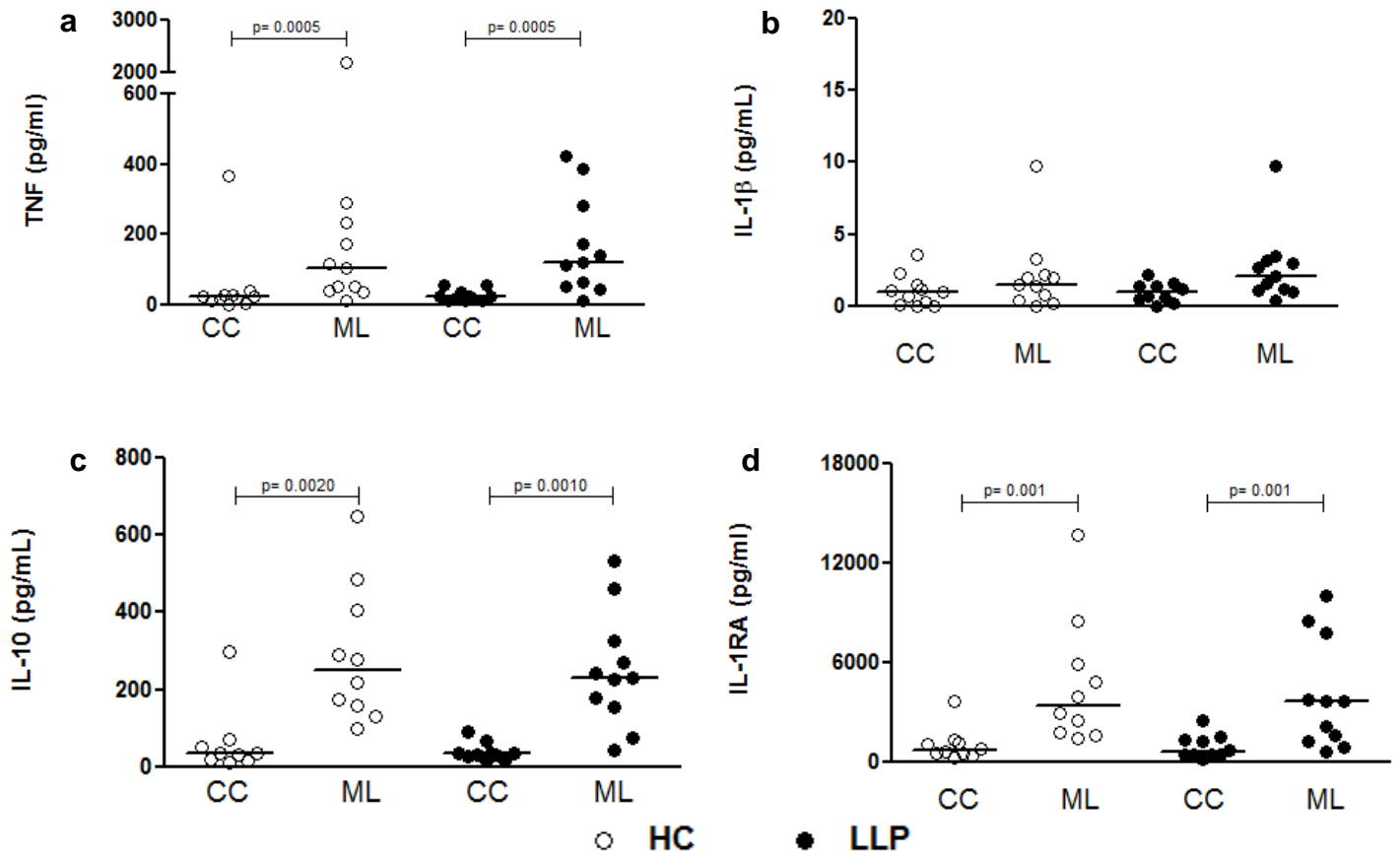


Figure 2: Levels of cytokines in supernatant of human macrophages cultures. Macrophages were stimulated during 24 hours with *M. leprae* sonicated antigen (ML, 10 $\mu$ g/mL) and cytokines were measured by ELISA (a) TNF, (b) IL-1 $\beta$ , (c) IL-10 and (d) IL-1RA. Results were expressed as pg/ml, median values were indicated by a line. Wilcoxon matched pairs test was used to compare CC versus ML while comparison between HC and LLP was done by Mann Whitney test. CC: control culture (resting); HC: healthy controls; LLP: lepromatous leprosy patients.

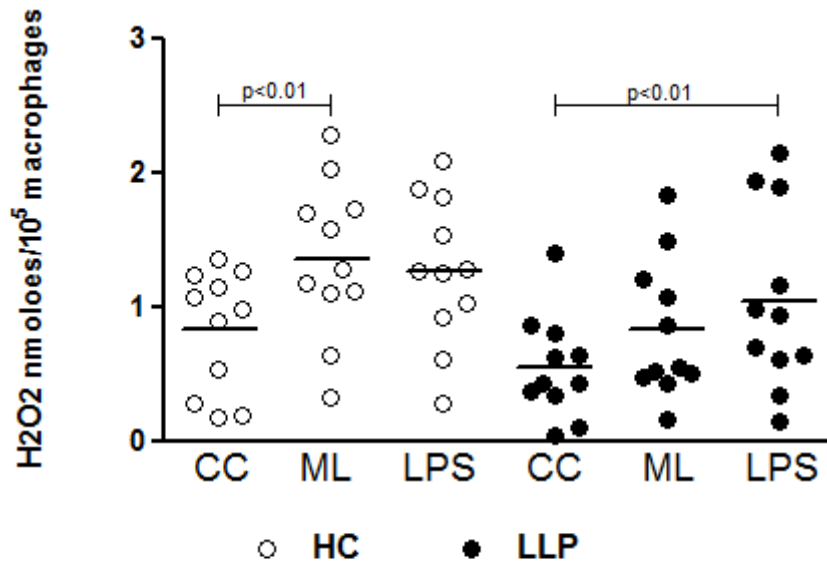
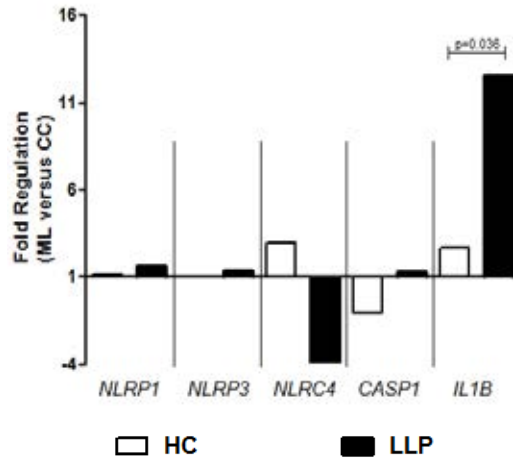


Figure 3: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release by macrophages from LLP and HC on exposure to *M. leprae* antigen. Macrophages were stimulated during 24 hours with *M. leprae* sonicated antigen (ML, 10µg/mL) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release was measured by colorimetric assay. Results were expressed as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nmol/10<sup>5</sup> cells. Median values were reported as a line. Friedman test with post-test Dunn was used to compare CC versus ML or LPS in each individual as well as to compare CC and ML and LPS between HC and LLP. CC: control culture (resting); HC: healthy controls; LLP: lepromatous leprosy patients.

**a**



**b**

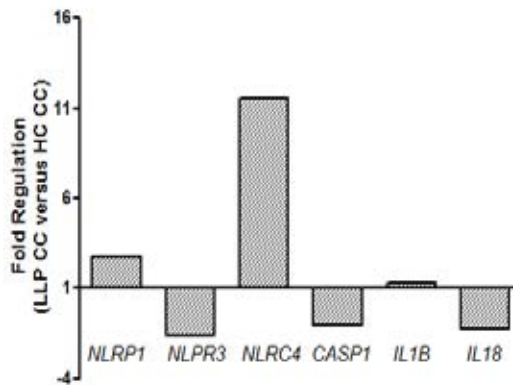
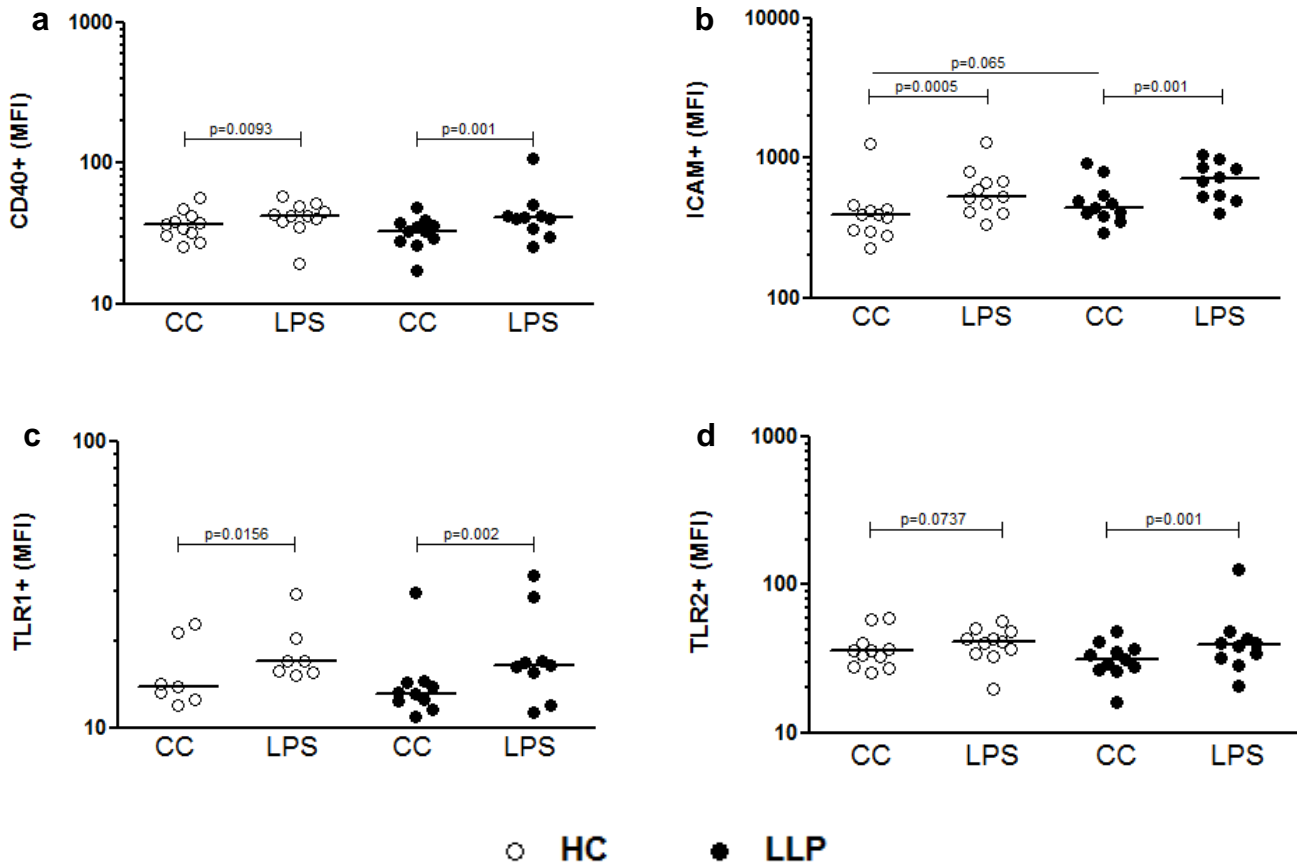


Figure 4: Gene expression in macrophages cultured with *M. leprae* sonicated antigen. At the 7<sup>th</sup> day of culture macrophages were stimulated in the presence of *M. leprae* sonicated antigen (ML, 10µg/mL) for 2 hours and the genes expression evaluated by Real-Time PCR. Gene expression comparison was made according to Livak *et al* (17). FR>1: gene up-regulation; FR=1: no difference; FR<1: gene down-regulation. (a) Fold regulation of ML-stimulated macrophages (ML) versus resting cells (CC) for *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *CASP1* and *IL1B* genes. (b) Fold regulation of CC from LLP versus CC from HC. Results were represents as mean Fold Regulation value. Mann Whitney was used to compare FR. HC: healthy controls; LLP: lepromatous leprosy patients

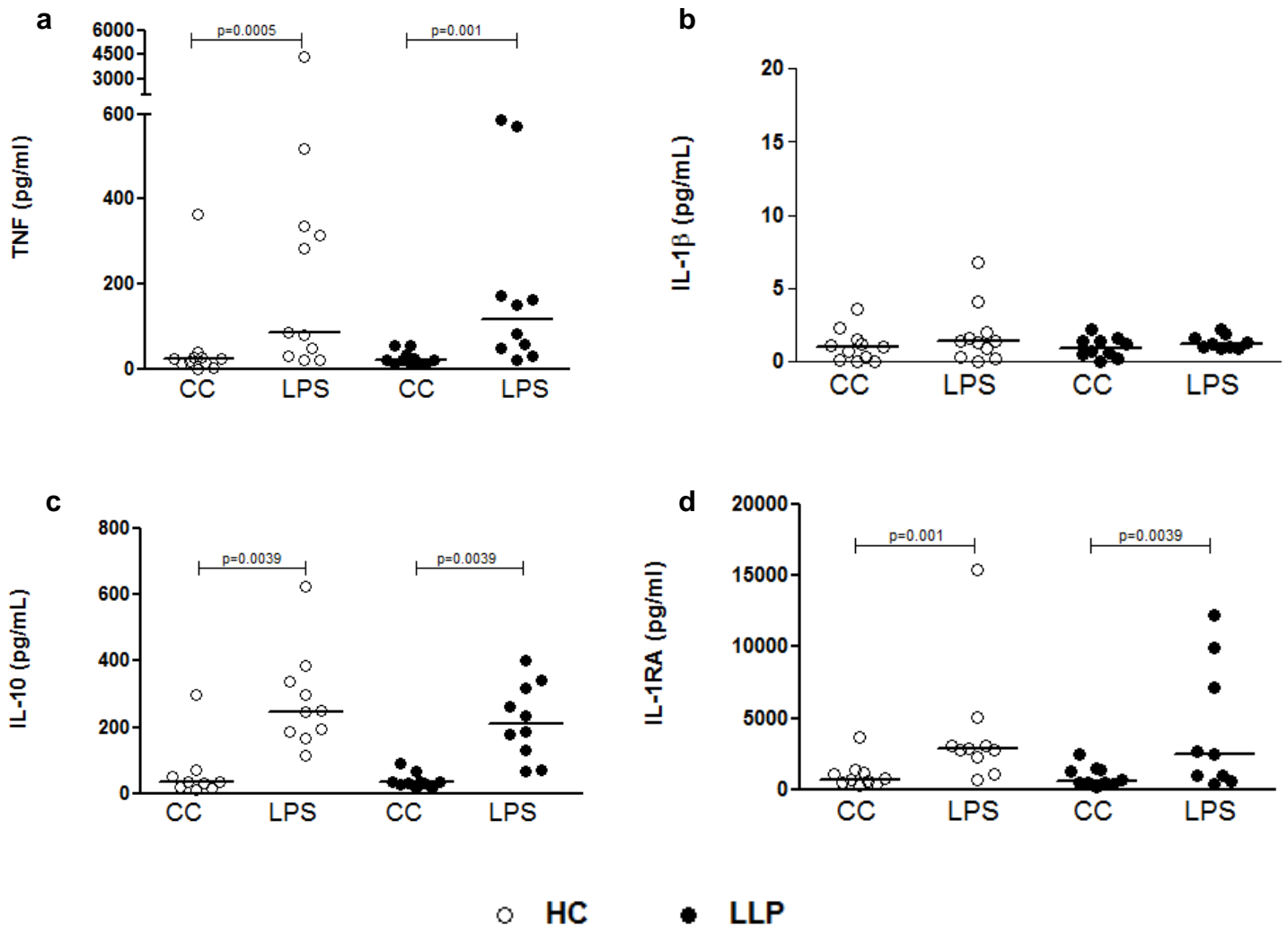


**SUPPLEMENTARY DATA 1**



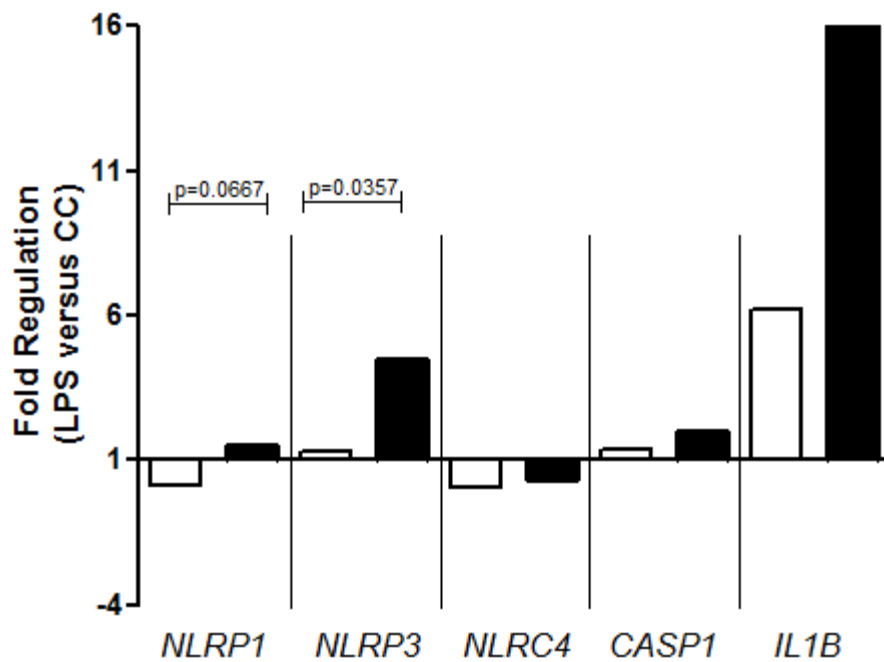
Expression of CD40, ICAM-1, TLR1 and TLR2 in macrophages stimulated with LPS. At the 7<sup>th</sup> day of culture macrophages were stimulated in the presence of LPS (500ng/mL) for 24 hours. The analysis of surface markers: (a) CD40, (b) ICAM-1, (c) TLR1 and (d) TLR2 were done by flow cytometry and the results were expressed as mean fluorescence intensity (MFI), median values were indicated by a line. Wilcoxon matched pairs test was used to compare CC versus ML while comparison between HC and LLP was done by Mann Whitney test. CC: control culture (resting); HC: healthy controls; LLP: lepromatous leprosy patients.

**SUPPLEMENTARY DATA 2**



Levels of cytokines in supernatant of human macrophages cultures. Macrophages were stimulated during 24 hours with LPS (500 $\mu$ g/mL) and cytokines were measured by ELISA (a) TNF, (b) IL-1 $\beta$ , (c) IL-10 and (d) IL-1RA. Results were expressed as pg/ml, median values were indicated by a line. Wilcoxon matched pairs test was used to compare CC versus ML while comparison between HC and LLP was done by Mann Whitney test. CC: control culture (resting); HC: healthy controls; LLP: lepromatous leprosy patients.

SUPPLEMENTARY DATA 3



Gene expression in macrophages cultured with LPS. At the 7<sup>th</sup> day of culture macrophages were stimulated in the presence of LPS (500ng/mL) for 2 hours and the genes expression evaluated by Real-Time PCR. Gene expression comparison was made according to Livak *et al.* (17) FR>1: gene up-regulation; FR=1: no difference; FR<1: gene down-regulation. Fold regulation of LPS-stimulated macrophages (LPS) versus resting cells (CC) for *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *CASP1* and *IL1B* genes. HC: healthy controls; LLP: lepromatous leprosy patients

## *Conclusão*



# Conclusão

---

## 6. Conclusão

A análise dos resultados obtidos neste trabalho permitiu concluir que:

- Os macrófagos de LLP e HC estimulados com antígenos do ML apresentaram aumento na expressão dos receptores TLR1, TLR2, CD40 e ICAM, bem como produção de TNF e a expressão do gene *IL1B*, indicando que as vias de reconhecimento e ativação dos macrófagos funcionam normalmente.
- Frente ao estímulo com o antígeno sonicado do *M. leprae* houve a produção e secreção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e IL-1RA), tanto em LLP quanto em HC.
- Os macrófagos de LLP estimulados com ML não produziram níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> maiores do que os observados nas culturas controles não estimuladas.
- O antígeno sonicado do *M. leprae* parece não ser um bom ativador dos inflamassomas avaliados, uma vez que não houve a produção de níveis significantes de IL-1β.
- Considerando-se que a ativação dos macrófagos acontece de forma aparentemente normal, a baixa produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e IL-1β pode ser consequência de uma inibição (não em nível de regulação da transcrição) do complexo do inflamassoma.

## *Referências*

---

# Referências

---

## 3. REFERÊNCIAS

1. Melão S, Blanco LF de O, Mounzer N, Veronezi CCD, Simões PWT de A. Perfil epidemiológico dos pacientes com hanseníase no extremo sul de Santa Catarina , no período de 2001 a 2007. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011;44(1):79–84.
2. Gregório VR do N. Estudo da hanseníase em uma unidade de saúde do Recife. 1999.
3. Opromolla DVA. História. In: Opromolla DVA, editor. *Noções de Hansenologia.* Bauru: Instituto Lauro de Souza Lima; 2000. p. 1–5.
4. Agricola E. A Lepra no Brasil. In: Diniz O, editor. *Manual de Leprologia.* Rio de Janeiro; 1960. p. 11–29.
5. Albuquerque M de FPM de, Morais HMM de, Ximenes R. A expansão da hanseníase no Nordeste Brasileiro. *Rev Saúde públ [Internet].* 1989;23(2):107–16.
6. Yamanouchi AA, Caron CR, Shiwaku DT, Soares FB, Nicolodelli MA, Adur RCA, et al. Hanseníase e Sociedade: um problema sempre atual. *An bras dermatol.* 1993;68(6):396–404.
7. Maurano F. História da lepra em São Paulo. *Rev dos Trib.* 1939;
8. Marques F. Artigo apresenta enfoque histórico sobre o tratamento da hanseníase e uso de planta. [Internet]. *Saúde em Movimento.* 2008 [cited 2013 Oct 1].
9. Lockwood DNJ, Suneetha S. Hanseníase: uma doença muito complexa para um paradigma simples de eliminação. *Bol da Organ Mund da Saúde.* 2005;3(230):1–10.
10. Talhari S, Neves RG. *Dermatologia tropical - Hansenologia.* Manaus: Calderato Ltda; 1984.
11. Santos LA de C, Faria L, Menezes RF de. Contrapontos da história da hanseníase no Brasil : cenários de estigma e confinamento. *R bras Est Pop.* 2008;25(1):167–90.
12. World Health Organization. *Weekly epidemiological record [Internet].* Genebra; 2013 p. 365–80.

## Referências

---

13. Madeira S. Aspectos microbiológicos do *Mycobacterium leprae*. In: Opromolla DVA, editor. *Noções de Hansenologia*. Bauru; 2000. p. 13–8.
14. Petito RB. Estudos dos efeitos do *Mycobacterium leprae*, seus componentes lipídicos e do TGF-B1 nas alterações da matriz extracelular neural. Instituto Oswaldo Cruz; 2008.
15. Shepard CC. Multiplication of *Mycobacterium leprae* in foot-pad of the mouse. *Int J Lepr*. 1962;3:291–306.
16. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature [Internet]*. 2001 Mar 22 [cited 2013 Oct 31];409(6823):1007–11.
17. Chacha JJ, Sotto MN, Lourenço S, Melnikov P. Sistema nervoso periférico e pressupostos da agressão neural na hanseníase. *An Bras dermat*. 2009;84(5):495–500.
18. Shimoji Y, Ng V, Matsumura K, Fischetti V, Rambukkana A. A 21-kDa surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]*. 1999 Aug 17;96(17):9857–62.
19. Dagur PK, Sharma B, Upadhyay R, Dua B, Rizvi A, Khan NA, et al. Phenolic-glycolipid-1 and lipoarabinomannan preferentially modulate TCR- and CD28-triggered proximal biochemical events, leading to T-cell unresponsiveness in mycobacterial diseases. *Lipids Health Dis [Internet]*. *Lipids in Health and Disease*; 2012 Jan [cited 2014 Jan 10];11(1):119.
20. Bühner-Sékula S. Sorologia PGL-I na hanseníase. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41(Suplemento II):3–5.
21. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The Continuing Challenges of Leprosy. 2006;19(2):338–81.
22. Naafs B. Current views on reactions in Leprosy. *Indian J Lepr*. 2000;72(1):97–122.
23. Portal da Saúde - SUS. Hanseníase [Internet]. [cited 2013 Dec 8].



## Referências

---

24. Martelli CMT, Stefani MM de A, Penna GO, Andrade ALSS. Endemias e epidemias brasileiras, desafios e perspectivas de investigação científica: hanseníase. *Rev Bras Epidemiol*. 2005;5(3):273–85.
25. Santos AS dos, Castro DS de, Falqueto A. Fatores de risco para transmissão da hanseníase. *Rev Bras Enferm* [Internet]. 2008;61(esp):738–43.
26. Opromolla DVA. Diagnóstico da hanseníase. In: Opromolla DVA, editor. *Noções de Hansenologia*. Bauru; 2000. p. 59–61.
27. Portal da Saúde. Guia de procedimentos técnicos - Baciloscopia em Hanseníase [Internet]. Ministério da saúde. 2010 [cited 2013 Oct 8].
28. Brett SJ, Draper P, Payne SN, Rees RJ. Serological activity of a characteristic phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* in sera from patients with leprosy and tuberculosis. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 1983 May;52(2):271–9.
29. Duthie MS, Goto W, Ireton GC, Reece ST, Cardoso LP V, Martelli CMT, et al. Use of Protein Antigens for Early Serological Diagnosis of Leprosy. *Clin Vaccine Immunol* [Internet]. 2007 Nov [cited 2013 Nov 5];14(11):1400–8.
30. Spencer JS, Kim HJ, Wheat WH, Chatterjee D, Balagon M V, Cellona R V, et al. Analysis of antibody responses to *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I, lipoarabinomannan, and recombinant proteins to define disease subtype-specific antigenic profiles in leprosy. *Clin Vaccine Immunol* [Internet]. 2011 Feb [cited 2013 Nov 5];18(2):260–7.
31. Beiguelman B, Qualiato R. Sobre a reação de Mitsuda. *Rev Bras Leprol* [Internet]. 1964;39–46.
32. Quagliato R. Classificação de lepra - Madrid, 1953: critério clínico. *Rev Bras Leprol*. 1959;27(1):17–32.
33. RIDLEY DS, JOPLING WH. A classification of leprosy for research purposes. *Lepr Rev* [Internet]. 1962 Apr [cited 2013 Dec 25];33:119–28.
34. Chemotherapy of leprosy for control programmes. *World Health Organ Tech Rep Ser* [Internet]. 1982 Jan [cited 2013 Dec 25];675:1–33.

## Referências

---

35. Opromolla DVA. Manifestações clínicas e reações. In: Opromolla DVA, editor. *Noções de Hansenologia*. Bauru; 2000. p. 51–8.
36. Souza CS. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. *Medicina (B Aires)*. 1997;30:325–34.
37. World Health Organization. *WHO Model Prescribing Information Drugs Used in Leprosy*. Geneva; 1998. p. 5–6.
38. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. *Intern J Lepr*. 1966;34(3):255–73.
39. Nogueira MES, Moreno FRV, Silva EA, Arruda MSP de. Imunologia. In: Opromolla DVA, editor. *Noções de Hansenologia*. Bauru; 2000. p. 27–42.
40. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchick M. Respostas do sistema imune inato. In: Artmed, editor. *Imunobiologia - O sistema imune na saúde e na doença*. 5 edição. Porto Alegre; 2002. p. 85–9.
41. Nathan C. Metchnikoff's Legacy in 2008. *Nat Immunol*. 2008;9(7):695–8.
42. Ginhoux F, Jung S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2014 May 23 [cited 2014 May 23];14(6):392–404.
43. Benoit M, Desnues B, Mege J-L. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol* [Internet]. 2008 Sep 15;181(6):3733–9.
44. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(12):958–69.
45. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Imunidade Natural. In: Elsevier Editora Ltda, editor. *Imunologia Celular e Molecular*. 6 edição. Rio de Janeiro; 2008. p. 22–46.
46. Watson S, Bullock W, Nelson K, Schauf V, Gelber R, Jacobson R. Interleukin 1 production by peripheral blood mononuclear cells from leprosy patients. *Infect Immun* [Internet]. 1984 Sep;45(3):787–9.
47. Netea MG, Nold-Petry C a, Nold MF, Joosten L a B, Opitz B, van der Meer JHM, et al. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes

# Referências

---

- and macrophages. *Blood* [Internet]. 2009 Mar 5 [cited 2013 Nov 5];113(10):2324–35.
48. Gattorno M, Tassi S, Carta S, Delfino L, Ferlito F, Pelagatti MA, et al. Pattern of interleukin-1beta secretion in response to lipopolysaccharide and ATP before and after interleukin-1 blockade in patients with CIAS1 mutations. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2007 Sep [cited 2013 Nov 5];56(9):3138–48.
  49. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* [Internet]. 2010 Mar 19 [cited 2013 Oct 31];140(6):821–32.
  50. Johnson CM, Lyle EA, Omuetti KO, Stepensky VA, Yegin O, Alpsoy E, et al. A Common Polymorphism Impairs Cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. *J Immunol*. 2012;178:7521–4.
  51. Baccala R, Gonzalez-Quintial R, Lawson BR, Stern ME, Kono DH, Betler B, et al. Sensors of the innate immune system: their mode of action. *Nat Rev Rheumatol*. 2009;5(8):448–56.
  52. 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* [Internet]. 2003 May [cited 2013 Nov 5];9(5):525–32.
  53. Denes A, Lopez-Castejon G, Brough D. Caspase-1: is IL-1 just the tip of the ICEberg? *Cell Death Dis* [Internet]. 2012 Jan [cited 2013 Dec 19];3:e338.
  54. Zhong Y, Kinio A, Saleh M. Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases. *Front Immunol* [Internet]. 2013 Jan [cited 2013 Nov 6];4(333):1–18.
  55. Foss NT. Aspectos imunológicos da hanseníase. *Medicina (B Aires)*. 1997;30:335–9.
  56. O’Leary S, O’Sullivan MP, Keane J. IL-10 blocks phagosome maturation in mycobacterium tuberculosis-infected human macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* [Internet]. 2011 Jul [cited 2013 Nov 5];45(1):172–80.
  57. Morris MF, Vargas CMG, Fierro SN, Ortiz RM, Borunda JA. Serum IL-1ra is elevated in lepromatous leprosy patients. *Intern J Lepr* [Internet]. 1998;67(3):287–91.

# Referências

---

58. Kang TJ, Lee GS, Kim SK, Jin SH, Chae GT. Comparison of two mice strains, A/J and C57BL/6, in caspase-1 activity and IL-1beta secretion of macrophage to Mycobacterium leprae infection. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2010 Jan [cited 2013 Nov 5];2010:708713.
59. Costa RD, Mendonça VA, Lyon S, Penido RA, Maria A, Dias D, et al. Evaluation of the expression of interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) and interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) in leprosy patients. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41(Suplemento II):99–103.
60. Choi IH, Shin JS, Park SK, Cho SN, Kim JD, Kim SJ. Interleukin-1 beta production by monocytes from leprosy patients. *Yonsei Med J* [Internet]. 1990 Dec [cited 2013 Dec 10];31(4):301–7.
61. Madan NK, Agarwal K, Chander R. Serum cytokine profile in leprosy and its correlation with clinico-histopathological profile. *Lepr Rev*. 2011;82:371–82.
62. Moubasher a D, Kamel N a, Zedan H, Raheem DD. Cytokines in leprosy, I. Serum cytokine profile in leprosy. *Int J Dermatol* [Internet]. 1998 Oct;37(10):733–40.
63. Parida SK, Grau GE, Zaheer S a, Mukherjee R. Serum tumor necrosis factor and interleukin 1 in leprosy and during lepra reactions. *Clin Immunol Immunopathol* [Internet]. 1992 Apr;63(1):23–7.
64. Garcia VE, Uyemura K, Sieling P a, Ochoa MT, Morita CT, Okamura H, et al. IL-18 promotes type 1 cytokine production from NK cells and T cells in human intracellular infection. *J Immunol* [Internet]. 1999 May 15;162:6114–21.

## *Apêndice*



## 6. APÊNDICE



### Comitê de Ética em Pesquisa

Instituto Lauro de Souza Lima  
Caixa Postal 3021 – CEP: 17034-971 – Bauru/ SP/ Brasil  
Fone: 55 14 3103-5921  
Fax: 55 14 3103-5914

Bauru, 24 de Junho de 2014

A  
Profa. Dra. Vânia Nieto Brito de Souza

Prezada Senhora,

Informamos que a solicitação de 03 de Abril de 2014 para alteração do título do projeto “Avaliação da interação dos receptores NALP3 e TLR1/TLR2 na resposta imune ao *Mycobacterium leprae*” aprovado sob nº 221/11 para “Avaliação da função macrófaga na hanseníase virchoviana: marcadores de superfície, receptores TLR e NLR e mediadores inflamatórios” foi acatado por este Comitê, com registro de aprovação 221-A/14.

Atenciosamente,

Dra. Ida Maria Foschiani Dias Baptista  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

*Anexo*



## 7. ANEXO

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu \_\_\_\_\_ recebi, da pesquisadora responsável, esclarecimentos quanto ao Projeto de Pesquisa “**Avaliação da interação dos receptores NLRs e TLR1/TLR2 na resposta imune inata ao *Mycobacterium leprae***”, que se fará sob a coordenação da pesquisadora Vânia Nieto Brito de Souza.

Fui informado que o projeto pretende estudar a presença destes receptores nas células brancas do meu sangue e a produção de substâncias que participam da resposta imunológica quando estas células entram em contato com a bactéria causadora da hanseníase. Para esta participação, me submeterei a uma simples coleta de sangue de cerca 40 ml, que será feita por profissional habilitado utilizando material descartável, do qual serão separadas as células brancas que serão utilizadas estudo.

Compreendi que posso livremente interromper minha participação a qualquer momento, sem necessidade de justificar minha decisão e que isso não trará qualquer consequência ao meu atendimento e tratamento. Compreendi, também, que será preservado o sigilo de minha identidade, bem como, que não terei despesas e não receberei qualquer benefício material por participar do estudo.

Fui informado ainda que posso receber explicações adicionais do pesquisador assim que queira solicitar, bem como, terei acesso aos resultados se assim o desejar.

Devidamente informado e esclarecido, **manifesto aqui meu consentimento em participar do estudo.**

Declaro, adicionalmente, que não tenho qualquer restrição ao armazenamento do material coletado, uma vez que serei convidado a consentir novamente caso seja objeto de nova pesquisa.

Bauru, ...../...../.....

Assinatura do participante (ou responsável legal): \_\_\_\_\_

Telefone do participante para contato: \_\_\_\_\_

Protocolo n°

TCLE n°

**Recebi uma via do presente termo para arquivo pessoal**