

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Danielle Fonseca de Moura

**Participação do CD163 na Via
Anti-inflamatória do Polo Lepromatoso da
Hanseníase**

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

Orientadora: Prof. Dra. Euzenir Nunes Sarno

RIO DE JANEIRO

2011

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

M929

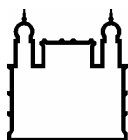
Moura, Danielle Fonseca de.

Participação do CD163 na via anti-inflamatória do Polo Lepromatoso da Hanseníase. / Danielle Fonseca de Moura. – Rio de Janeiro, 2011. xii, 138 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2011.
Bibliografia: f. 78-97

1. CD163. 2. Hanseníase. 3. Macrófagos. 4. IDO. I. Título.

CDD 616.998



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Danielle Fonseca de Moura

**Participação do CD163 na Via
Anti-inflamatória do Polo Lepromatoso da
Hanseníase**

Orientadora: Prof. Dra. Euzenir Nunes Sarno

Aprovada em: 31/08/2011

EXAMINADORES:

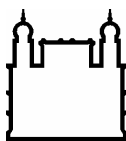
Prof. Dra. Suzana Corte-Real Faria - Membro/Presidente

Prof. Dra. Danuza de Almeida Esquenazi - Membro/Revisora

Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira - Membro Externo

Prof. Dr. Flávio Alves Lara - Suplente

Prof. Dr. Célio Geraldo Freire de Lima – Suplente Externo



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

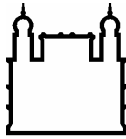
Participação do CD163 na Via Anti-inflamatória do Polo Lepromatoso da Hanseníase

TESE DE DOUTORADO

Danielle Fonseca de Moura

Resumo

Estudos anteriores demonstraram que macrófagos de pacientes lepromatosos possuem um fenótipo regulador que contribui para a imunossupressão observada na hanseníase. IDO, CD86 e HLA-DR são moléculas altamente expressas por macrófagos de pacientes lepromatosos, como também o receptor “scavenger” CD163, regulado pela IL-10. Este trabalho foi realizado com o intuito de analisar a expressão de CD163 nas lesões cutâneas de pacientes polares da hanseníase e em monócitos infectados pelo *Mycobacterium leprae* (ML). Observamos um aumento de macrófagos CD163⁺IDO⁺ nas lesões e nas células isoladas do infiltrado inflamatório de pacientes LL. Ademais, durante o período de cultura de 6 dias dos macrófagos isolados das lesões lepromatosas, houve uma gradativa redução da expressão gênica de CD163, IDO e IL-10, assim como dos receptores de superfície CD163, CD209, HLA-DR, CD86 e CD14 observada por citometria de fluxo, fato que ocorreu concomitantemente com a saída de ML destas células. A expressão de células CD163⁺IDO⁺CD209⁺ aumentou em monócitos de indivíduos saudáveis, estimulados com ML irradiado obtido de extratos de lesão. Adição de citocalasina B na cultura de monócitos reduziu a expressão de CD163 nessas células, e, na presença de anti-CD163, a entrada de bactérias nos monócitos também foi reduzida. A adição da anti-IL-10 em cultura de monócitos de indivíduos sadios reduziu a expressão de CD163 até mesmo na presença do ML. Além disso, os níveis séricos de sCD163, IL-10 e heme estavam aumentados nos pacientes lepromatosos, em comparação com pacientes tuberculóides e indivíduos sadios, assim como os depósitos intracelulares de ferro. Estes resultados sugerem que o perfil de expressão de CD163 é importante na endocitose e sobrevivência do ML no polo lepromatoso da hanseníase.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Participação do CD163 na Via Anti-inflamatória do Polo Lepromatoso da Hanseníase

TESE DE DOUTORADO

Danielle Fonseca de Moura

Abstract

According to prior studies, macrophages from lepromatous patients present a regulatory phenotype that contributes to the immunosuppression observed in the disease. IDO, CD86, and HLA-DR molecules are highly expressed by macrophages from lepromatous patients, as well the scavenger receptor CD163, regulated by IL-10. The purpose of this study was to analyze CD163 expression on polar leprosy skin lesions and monocytes infected by *Mycobacterium leprae*. We observed an increased number of CD163⁺IDO⁺ in the lesions and cells isolated from the inflammatory infiltrate of LL patients. Moreover, during the 6-day culture of macrophages isolated from lepromatous lesions, the gene expression of CD163, IDO and IL-10 and the surface receptors CD163, CD209, HLA-DR, CD86, CD14 presented a gradual decrease, as shown by flow cytometry, simultaneously with the output of ML from these cells. The expression of IDO+CD163+CD209+ cells was augmented in monocytes from healthy individuals, stimulated with irradiated ML, obtained from extracts of lesion. The addition of cytochalasin B to monocyte culture reduced the expression of CD163 in these cells, and, in presence of anti-CD163, the bacterial input into monocytes was also reduced. The addition of anti-IL-10 in monocyte culture from healthy individuals led to a decrease at the expression of CD163, even in presence of ML. Besides, serum levels of sCD163, IL-10 and heme were increased in lepromatous patients, when compared to tuberculoid patients and healthy controls, while intracellular iron deposits were also augmented. These results suggest the relevance of CD163 expression profile for endocytosis and also for the survival of ML itself in lepromatous patients.

Agradecimentos

- À Deus, por sempre estar ao meu lado;
- Aos meus pais, que sempre me mostraram a importância do estudo e me deram todo amor e incentivo do mundo: SEMPRE! Obrigada por tudo!
- Ao meu marido Claudio, por me apoiar, ter paciência e compreensão nos meus períodos de estudos e experimentos;
- À Dra. Euzenir Sarno, minha orientadora querida. Agradeço o incentivo, a disponibilidade e carinho com que sempre me tratou, ajudando em minha formação intelectual (mestrado e doutorado);
- À Dra. Roberta Olmo, por ser tão especial! Pelo carinho, disponibilidade em me auxiliar em todos os momentos deste trabalho, pela dedicação e conversas que me ajudaram a ver a ciência como PAIXÃO!
- À Dra. Katherine Mattos, pela dedicação, carinho e por tanto ter me ajudado no desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada!
- À Dra. Thaís Amadeu, por sempre estar ao meu lado! Pela amizade, carinho e ajuda neste trabalho;
- À Dra. Elizabeth Sampaio, por ter me aceito no laboratório, pela oportunidade do desenvolvimento do mestrado e por ter me apresentado à Dra. Euzenir;
- A todos os funcionários do Ambulatório Souza Araújo, em especial ao Dr. José Augusto, pela disponibilidade e ajuda com os pacientes;
- Aos pacientes que muito gentilmente participaram deste estudo: meu carinho a vocês!
- Ao Dr. Flávio Lara, pela ajuda com o estudo do heme e hemoglobina. Obrigada pela disponibilidade!
- À Dra. Jorgenilce Sales e Me. Ariane Oliveira, pela amizade sem fim, pelas risadas e por todo carinho. Muito obrigada pela ajuda neste trabalho, minhas amigas!
- À Dra. Danuza Esquenazi, pela revisão desta dissertação;
- À Me. Priscila Andrade, por sua plena disponibilidade, empenho e ajuda neste trabalho;
- À Helen Ferreira, pelo carinho e ajuda;
- À Dra. Verônica Schmitz, por sua disponibilidade e ajuda;
- Aos meus queridos amigos do laboratório, por toda amizade e carinho: Andressa, Bruno, Daniel Pedrosa, Daniel Serra, Eliane, Luciana, Mayara, Tatiana Fulco, Tamires, Rafael Petito, Rhana e Vinícius Menezes;
- A todos os amigos do departamento, obrigada pela amizade;

- Aos amigos que não estão mais no laboratório;
- À Solange e ao Paulo por toda ajuda em preparar o material utilizado para o estudo com tanta dedicação e carinho;
- Ao Augusto Silva e Cristiane Domingues por toda ajuda sempre que precisei;
- À minha querida tia Marilda e prima Andréia, pelo carinho e pelo eterno incentivo;
- Aos meus novos amigos Carlos Eduardo, Elizete, Alessandra, Anderson e Sinara, obrigada por tudo;
- À coordenação da Pós-Graduação, como a todos os funcionários, em especial à Luciane Wandermurem;
- Ao apoio financeiro da FAPERJ.

Lista de Siglas e Acrônimos

1MT - 1 metil triptofano
APC - Célula Apresentadora de Antígeno
BAAR – Bacilo Álcool-Ácido Resistente
BB – Borderline Borderline
BCG - Bacilo Calmette-Guérin
BL – Borderline Lepromatosa
BT – Borderline Tuberculoide
cDNA – Ácido Desoxirribonucléico complementar
CXCL-10 – ligante 10 da quimiocina CXC
CXCL-11 – ligante 11 da quimiocina CXC
DCs – Células dendríticas
DTT – Ditioneitol
EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA – Ensaio Imunoenzimático
ENL – Eritema Nodoso Leproso
ERK - Quinase regulada por sinal extracelular
FITC – Isotiocianato de Fluoresceína
GC – Glicocorticóide
GM-CSF- Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
GPCR - Receptores Duplos da Proteína G
Hb – Hemoglobina
HLA-DR – Antígeno Leucocitário Humano de classe II, alelo DR
Hp - Haptoglobina
HPA - Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
IB – Índice Bacilar (ou Bacteriológico)
IDO - Indoleamina 2, 3 dioxigenase
IFN γ - Interferon-gama
IgG – Imunoglobulina G
iNOS – Óxido Nítrico Sintase induzível

IP-10 – Proteína Induzida 10
LAM – Lipoarabinomanana
LL – Lepra Lepromatosa
LPS – Lipopolissacarídeo
MAPK – Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MB - Multibacilar
M-CSF - Fator Estimulador de Colônia de Macrófago
MDT – multidrogaterapia
MR – Receptor de Manose
mRNA – Ácido Ribonucléico mensageiro
NAD - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NAD-Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NF- κ B – Fator Nuclear kappa B
NK – “Natural Killer”
NO – Óxido Nítrico
OMS – Organização Mundial da Saúde
PA - Paraformaldeído
PB – Paucibacilar
PBMC – Células Mononucleares de Sangue Periférico
PBS – Salina Tampão Fosfato
PCR – Reação da Polimerase em Cadeia
PGE2 – Prostaglandina E2
PGL-I – Glicolípido Fenólico-I
PI3K – Fosfatidil Inositol 3 Quinase
PMN - Polimorfonuclear
PQT – poliquimioterapia
RF – livre de RNase
RR – Reação Reversa
sCD163 – CD163 solúvel
SFB – Soro Fetal Bovino
STAT4 – Sinal Transdutor e Ativador de Transcrição 4
TGF- β - Fator de Crescimento Transformador-beta
THP-1 – Linhagem celular humana aguda de leucemia monocítica-1

TLR – receptores do tipo Toll TNF – Fator de Necrose Tumoral

TT – Tuberculoide Tuberculoide

TCR – Receptor de Célula T

Índice

Conteúdo	Pág.
Resumo -----	iv
Abstract -----	v
Agradecimentos -----	vi
Lista de Siglas e Acrônimos-----	viii
1 – Introdução -----	13
1.1 – A Hanseníase -----	13
1.2 – A Biologia do <i>Mycobacterium leprae</i> -----	15
1.3 – Mecanismos da Imunoregulação na Hanseníase -----	17
1.4 – A Importância da Indoleamina 2,3 – Dioxygenase na Hanseníase -----	20
1.5 – Interação <i>M. leprae</i> –macrófago -----	21
1.6 – Características Gerais dos Macrófagos -----	24
1.7 - As Populações de Macrófagos -----	24
1.8 – As Famílias de Receptores “Scavenger” -----	32
1.9 – CD163 Solúvel (sCD163) -----	38
2 – Justificativa -----	41
3 – Objetivos -----	42
4 – Material e Métodos -----	43
4.1 - Biossegurança e Permissão Ética -----	43
4.2 – Imuno-histoquímica -----	43
4.3 – Imunofluorescência <i>in vivo</i> -----	43
4.4 – Detecção de CD163 por “Western Blot” -----	44
4.5 – RT-PCR em Tempo Real -----	45
4.6 – Isolamento de Macrófagos de Lesão de Pele de Pacientes Lepromatosos -----	46
4.7 – Aquisição de <i>M. leprae</i> Proveniente de Lesão Lepromatosa -----	47
4.8 – Marcação de <i>M. leprae</i> com Fluoresceína -----	47
4.9 – Imunofluorescência <i>in vitro</i> -----	47
4.10 – Coleta e Processamento de Sangue -----	48
4.11 – Cultura de Monócito por Aderência -----	48
4.12 – Bloqueio de IL-10 em Monócito -----	49
4.13 – Bloqueio de CD163 em Monócitos de Cultura -----	49
4.14 – Citometria de Fluxo -----	49
4.15 – Dosagem de Heme pelo Método de Derivado de Piridina -----	50
4.16 – Coloração de Perls-Azul da Prússia -----	50

4.17 – ELISA	51
4.18 – Análise Estatística	51
5 - Resultados	52
5.1- Expressão de marcadores em lesões de pele de pacientes com hanseníase	52
5.2 - Expressão gênica de CD163, IDO e IL-10 em lesões cutâneas da hanseníase	56
5.3 - Macrófagos isolados da lesão de pele são CD68 ⁺ e CD163 ⁺ /IDO ⁺	57
5.4 - Macrófagos de lesão cutânea de pacientes lepromatosos têm expressão reduzida de marcadores	58
5.5 - Macrófagos de pele em cultura liberam <i>M. leprae</i>	59
5.6 - Análise da expressão gênica de CD163, IDO e IL-10 em macrófagos isolados da pele	60
5.7 - Expressão de CD163 em monócitos estimulados com <i>M. leprae</i> e outras bactérias	61
5.8 - Análise da expressão de CD163, IDO e CD209 em monócitos estimulados com <i>M. leprae</i> em diferentes MOI	62
5.9 - A análise da expressão de CD163 no bloqueio da fagocitose do <i>M. leprae</i>	63
5.10 - O efeito do bloqueio do CD163 e a influência da hemoglobina na associação monócito- <i>M. leprae</i>	64
5.11 - O papel modulador da IL-10 em relação ao CD163 em monócitos e à secreção de sCD163 e heme no soro	66
5.12 - A expressão de ferro na lesão cutânea da hanseníase lepromatosa.....	68
6 – Discussão	69
7- Esquema	75
8 – Conclusões	76
9 - Referências Bibliográficas	78
10 - Anexo 1: Artigo Submetido	98

1- INTRODUÇÃO

1.1 – A HANSENÍASE

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica que afeta principalmente a pele e os nervos periféricos (1), sendo causada pelo *Mycobacterium leprae*, um patógeno intracelular obrigatório. A rota de transmissão da hanseníase ainda não está bem definida, mas acredita-se que seja através das vias respiratórias, embora não seja descartada a possibilidade de infecção via lesões de pele (2). Os tecidos primeiramente infectados pelo *M. leprae* são sítios superficiais da pele e nervo, devido à sua preferência por baixas temperaturas. A doença apresenta um longo período de incubação, e as primeiras manifestações clínicas podem ocorrer entre dois e dez anos após a infecção (3).

O *M. leprae* tem alta infectividade e baixa patogenicidade, isto é, pode infectar muitos indivíduos, embora somente alguns adoeçam; sendo assim, a infecção pela bactéria é determinada pela resposta imune do hospedeiro. Após o diagnóstico da doença, é de fundamental importância classificá-la de maneira correta, a fim de realizar o tratamento adequado. A falha no diagnóstico (classificação correta da infecção) da doença torna mais fácil a sua disseminação (4). O sistema de classificação da hanseníase mais utilizado é o de Ridley e Jopling (1966) (5), que leva em consideração parâmetros imunológicos, histopatológicos e microbiológicos. De acordo com essa classificação, os pacientes com hanseníase são divididos em cinco grupos: TT – Tuberculoide Tuberculoide, BT – “Borderline” Tuberculoide, BB – “Borderline Borderline”, BL – “Borderline” Lepromatoso e LL – Lepromatoso Lepromatoso (Figura 1.1.1). Na forma tuberculoide existe uma alta imunidade mediada por célula, e os pacientes apresentam pouca ou nenhuma carga bacilar, enquanto que, na forma lepromatosa ocorre uma alta imunidade humoral, com elevada carga bacilar.

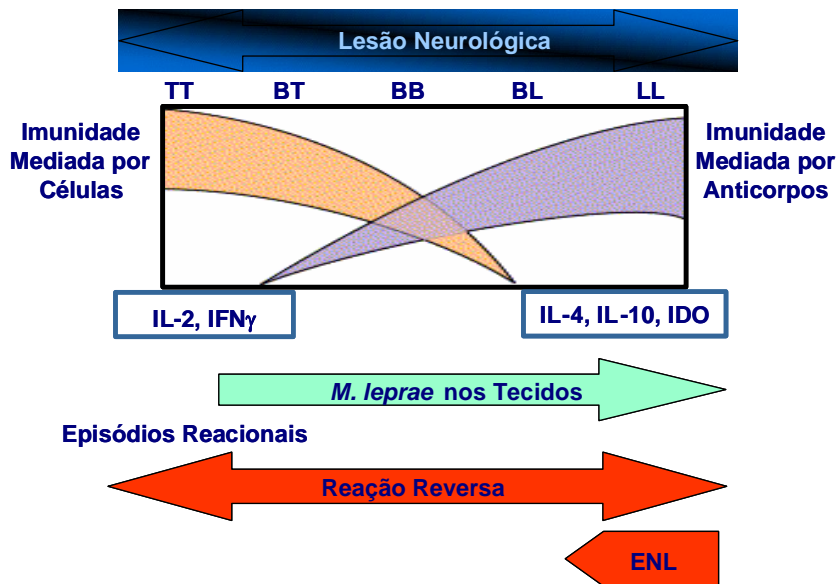


Figura 1.1.1 - Classificação da hanseníase. Relação entre as formas clínicas da hanseníase, resposta imune, carga bacteriana, lesões de pele e episódios reacionais. [Adaptado de Walter e Lockwood, 2006 (2)].

Devido à dificuldade na realização dos exames histopatológicos e, visando à descentralização do acompanhamento médico dos pacientes, a Organização Mundial da Saúde (OMS) sugeriu aos países endêmicos que adotassem uma simplificação do critério diagnóstico de acordo com o índice baciloscópico (IB), obtido a partir de esfregaços de linfa. De um modo geral, pacientes tuberculoides (BT e TT) são paucibacilares, com IB=0, e pacientes lepromatosos são multibacilares, com IB>0 podendo variar até +6 (6).

O tratamento quimioterápico é feito por meio da administração da poliquimioterapia (PQT), que consiste em: dapsona, rifampicina e clofazimina. Para os pacientes multibacilares, são utilizadas rifampicina (600 mg, uma dose por mês), clofazimina (300 mg, uma dose por mês e 50 mg por dia) e dapsona (100 mg por dia). O tratamento de pacientes multibacilares tem duração de um ano. Para pacientes paucibacilares, somente rifampicina (600 mg, uma dose por mês) e dapsona (100 mg diária) são empregadas por um período de 6 meses (7).

Ao longo do curso crônico da doença ou, ainda, durante o seu tratamento, podem surgir as reações, episódios de resposta inflamatória aguda associados a alterações da resposta imunológica dos pacientes (8).

As reações são classificadas conforme suas características clínicas e imunológicas das em tipo 1 ou reação reversa (RR), e tipo 2 ou Eritema Nodoso

Leproso [ENL (9)]. A RR parece estar associada ao súbito aumento da imunidade celular direcionada a antígenos de *M. leprae*. Clinicamente, se manifesta por um aumento do processo inflamatório nas lesões de pele preexistentes, bem como pelo aparecimento de novas lesões e, geralmente não está associada a sintomas sistêmicos (10). Há um aumento do número de receptores de IL-2 nas células imunocompetentes, assim como dos níveis de mRNA de IL-1 β , TNF α , IL-2 e IFN γ . Entretanto, há um decréscimo dos níveis de outras citocinas, tais como a IL-4, IL-5 e IL-10, corroborando a hipótese de aumento de resposta imune celular (11). O ENL ocorre quase exclusivamente em pacientes lepromatosos (BL e LL), e as lesões de pele que acometem os pacientes são geralmente eritematosas e nodulares (12). Observam-se sintomas sistêmicos, tais como febre, mal estar e edema, comprometendo inúmeros órgãos (13).

A ocorrência dos episódios reacionais é considerada uma emergência clínica, e o tratamento anti-inflamatório precisa ser prontamente iniciado. Pacientes com RR são tratados com esteroides (prednisona 1 mg/kg), enquanto que pacientes com ENL são tratados preferencialmente com talidomida (300 mg/dia) ou pentoxifilina, associada ou não a esteroides (14).

1.2– A BIOLOGIA DO *Mycobacterium leprae*

O *M. leprae* é um patógeno intracelular obrigatório que infecta predominantemente macrófagos e células de Schwann (15). Possui a forma de um bastonete reto ou ligeiramente encurvado, de 1,5 a 8 micra de comprimento por 0,2 a 0,5 micron de largura. Cora-se em vermelho pela fucsina e não se descora pela lavagem com álcool-ácido, sendo, portanto, um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR; Rees, 1984).

Compartilha com outras micobactérias algumas características, tais como a abundância de lipídios na forma de ácidos micólicos (ácidos graxos de elevado peso molecular) e lipoarabinomanana (LAM) em seu envelope celular. Além disso, mais externamente, estão localizados glicolipídeos, como o PGL-I (glicolipídeo fenólico-I), encontrado exclusivamente no *M. leprae*. Sua estrutura é composta de um trissacarídeo, fenol, fitiocerol e de ácido micoseossídico [Figura 1.2.1; (16)]. Estudos anteriores já mostraram que o PGL-I pode ser encontrado em tecidos, no sangue circulante e na urina de pacientes multibacilares. Além disso, ele também foi

detectado em tatus infectados com o *M. leprae* (17). Este componente não apresenta reação cruzada com *M. tuberculosis* ou outras micobactérias, e estimula uma resposta humoral acentuada, proporcional à carga bacteriana encontrada nos pacientes (18).

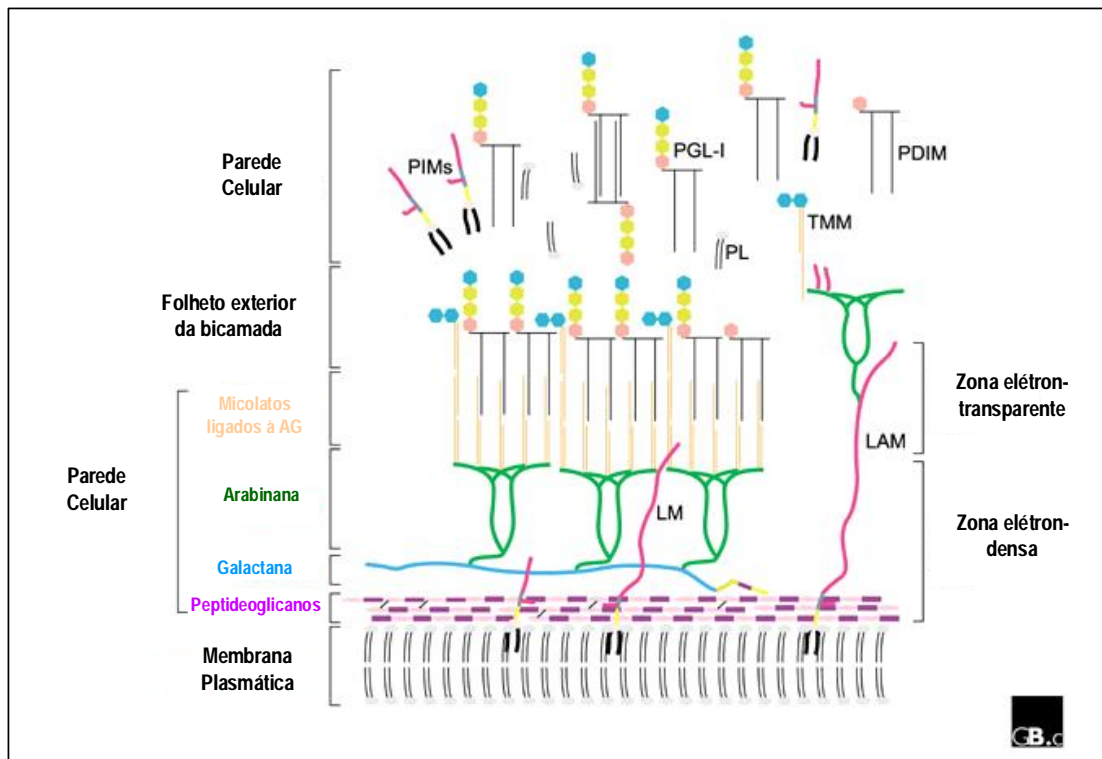


Figura 1.2.1 - Modelo esquemático da parede celular do *M. leprae* [Adaptado de Vissa e Brennan, 2001 (19)].

Desde a descoberta do *M. leprae* em 1874 por Armauer Hansen, todas as tentativas de cultivar este micro-organismo falharam (20). Entretanto, em 1962, foi demonstrado por Shepard que o coxim plantar de camundongos infectados com 10^3 a 10^4 bacilos promovia uma lesão localizada durante 9 a 12 meses (21). Outra fonte de *M. leprae* utilizada para estudos é o tatu nove bandas (*Dasypus novencinctus*, Linn.). Ele permite o crescimento do bacilo de forma disseminada de 18 a 24 meses, comprometendo pele, nervos periféricos, medula óssea, fígado, baço, linfonodos, pulmões, meninges e olhos. Após a purificação, os bacilos podem ser usados vivos por até uma semana, ou letalmente irradiados (22).

O sequenciamento do genoma do *M. leprae*, realizado pela primeira vez em 2001, gerou uma grande expectativa em torno da aquisição de dados sobre a sua

funcionalidade na patogenia da hanseníase. Apenas 49,5% do genoma do *M. leprae* (1605 genes) contêm genes que codificam proteínas, sendo o restante constituído por pseudogenes ou genes degenerados (23). Quando comparado ao *M. tuberculosis*, percebe-se uma perda maciça de genes pelo *M. leprae*, o que poderia explicar o seu longo tempo de geração e sua incapacidade de multiplicação *in vitro* (19).

1.3 – MECANISMOS DE IMUNORREGULAÇÃO NA HANSENÍASE

A anergia antígeno-específica observada em pacientes com o polo lepromatoso da doença ainda não foi completamente elucidada, mas sabe-se que esses pacientes são capazes de responder a outros antígenos que não o *M. leprae* (24).

A tolerância é um estado celular onde a célula encontra-se viva, mas não apresenta atividade funcional quando estimulada pelos receptores TCR/CD28 (25). Os linfócitos T anérgicos apresentam uma produção de IL-2 ou expressão de IL-2R α reduzida, ou ambos os eventos (26). O promotor da IL-2 é ativado por meio da cascata de sinalização iniciada pela ativação do receptor de célula T (TCR) e do CD28 (26). Os clones de linfócitos T anérgicos apresentam múltiplas alterações na sinalização associada ao TCR (27) e, *in vivo*, apresentam defeito na ativação do promotor de IL-2 (28). Esses trabalhos sugerem que a anergia nos linfócitos T pode ocorrer devido a alterações nos eventos de sinalização envolvendo a produção de IL-2, o que gera uma perturbação do ciclo celular.

Nos pacientes lepromatosos, a baixa produção de IL-2 é responsável pela perda da função dos linfócitos T. Alguns experimentos mostraram que os pacientes lepromatosos podem passar a responder ao *M. leprae* após a adição de IL-2 à cultura celular (29, 30), e também apontaram que antígenos do *M. leprae* reduzem a fosforilação de Erk1/2 e p38 MAPK, diminuindo, assim, a ativação do promotor de IL-2 e a transcrição desse gene, reduzindo a expressão dos marcadores CD25 e CD69. Além disso, as frações do *M. leprae* inibem significativamente a secreção de IL-2 e a blastogênese de células T em indivíduos saudáveis. Isto sugere que o *M. leprae* interfere na sinalização de TCR/CD28, levando à redução na produção de IL-2 e à inibição da proliferação dos linfócitos T. Estudos também já observaram que o LAM e PGL-I, presentes na superfície do *M. leprae* suprimem a resposta de células T, por

inibirem a produção de IFN- γ , e ainda, modulam a produção *in vitro* de TNF α por monócitos (31, 32).

Alguns trabalhos também evidenciaram que a injeção intradérmica com PPD leva ao acúmulo local de linfócitos T auxiliares e monócitos na derme (29). Estes mesmos autores, em 1990, observaram um aumento do número de células T CD4⁺ nas lesões de pacientes lepromatosos após injeção intradérmica de rIFN- γ e rIL-2, separadamente. A presença de linfócitos T reativos ao *M. leprae* também foi observada durante o desenvolvimento de episódios reacionais de pacientes lepromatosos (33, 34), indicando o surgimento da resposta imune ao patógeno.

A alta carga bacilar presente nos pacientes lepromatosos pode ter um papel na indução da tolerância imune *in vivo*. Os componentes da micobactéria, como o PGL-I e outras moléculas, parecem exercer influência sobre a inibição da função dos macrófagos e das células T. Monócitos infectados de pacientes lepromatosos, mas não de pacientes tuberculoides, liberam fatores, como IL-10 e prostaglandina E₂ (PGE₂), que inibem a proliferação induzida por *M. leprae* em indivíduos sabidamente responsivos à bactéria. O PGE₂ inibe a produção de IL-2 e IFN γ , assim como de citocinas importantes para gerar uma resposta imune específica, que, em geral, se manifesta em pacientes lepromatosos com uma intensidade baixa (35). Desta forma, o *M. leprae* parece modular a resposta imune por meio de componentes de sua parede celular e da secreção de substâncias com atividade supressora sobre os macrófagos. Além disso, os monócitos infectados podem contribuir para a fraca ativação dos linfócitos T nos indivíduos lepromatosos, devido à liberação de fatores que suprimem a ativação destas células.

Em outros estudos, foi sugerido que a falta de resposta no polo lepromatoso pode ser atribuída à baixa expressão de moléculas na superfície celular, tais como o CD80 (B7-1) e o CD28 (importantes para a apresentação de antígenos e ativação dos linfócitos T) em leucócitos sanguíneos e em lesões de pacientes lepromatosos. Em pacientes tuberculoides, a resposta proliferativa dos linfócitos induzida por *M. leprae* foi inibida com a presença de anticorpo anti-CD80 nas culturas (36), evidenciando a importância da expressão de CD80 na ativação dos linfócitos T. Além disso, os antígenos do *M. leprae* podem induzir a inativação de clones T reativos, levando ao crescimento do bacilo dentro dos macrófagos. Santos e cols. [2007 (37)] observaram, uma significativa expressão de CD80 nas PBMCs isoladas de pacientes com ENL e RR, quando comparadas com as de pacientes multibacilares não-reacionais, por meio de citometria de fluxo e imuno-histoquímica.

Também observaram que a expressão de CD80, baixa na fase anterior ao ENL, apresentou um aumento durante o episódio reacional, sugerindo que o CD80 possa servir como um marcador da resposta imune celular nos episódios reacionais da hanseníase.

As citocinas IL-10 e IL-4 são conhecidas como antagonistas da resposta imune celular. Foi observado um predomínio de mRNA de IL-4 e IL-10 nas lesões de pacientes lepromatosos, quando comparadas com as de pacientes tuberculoides (38). A IL-10 está aumentada nos pacientes lepromatosos, sugerindo que esta citocina participe da imunossupressão na hanseníase (39, 40). Sieling e cols. [1993 (40)] evidenciaram ainda, que a principal fonte de IL-10 são macrófagos recrutados pelo *M. leprae*. Paradoxalmente, a presença da IL-4 aumenta a proliferação *in vitro* de linfócitos T CD8⁺ nos pacientes lepromatosos, e foi descrito que essas células inibem a resposta de células T CD4⁺ (41). Nesse mesmo estudo, foi observado que a IL-4 inibe a secreção de IL-10 e aumenta TNF α e GM-CSF, sugerindo que o balanço entre IL-10 e IL-4 contribua para a imunossupressão observada na hanseníase.

Uma outra citocina aumentada nas lesões de pacientes lepromatosos, quando comparadas às de pacientes tuberculoides, é o fator de crescimento transformador-beta [TGF- β (42)]. O TGF- β participa no controle da proliferação e diferenciação celular, bem como no reparo tecidual. Também regula negativamente as funções dos monócitos e das células T, além de inibir a produção de IFN- γ e favorecer a secreção de IL-10 (43). Vários estudos indicam a participação da IL-12 na resposta imune celular ao *M. leprae*. A adição de rIL-12 em cultura de PBMCs de pacientes lepromatosos mostrou que 50% dos pacientes foram capazes de responder ao *M. leprae*. Esta indução foi significativa quando o efeito da IL-10 foi bloqueado, com o uso de um anticorpo anti-IL10 (44, 45). A ativação de IL-12 é induzida por meio do seu receptor (IL-12R), composto pelos heterodímeros, IL-12R β 1/IL-12R β 2, e a ativação da cadeia IL-12R β 2 envolve a sinalização da via STAT4. Foi também observado que a expressão de IL-12R β 1 é similar nas lesões de pacientes tuberculoides e pacientes lepromatosos (46). Já a expressão do receptor IL-12R β 2 apresentou um aumento nas lesões tuberculoides, quando comparadas às lepromatosas. Além disso, a expressão desse receptor se mostrou mais elevada em resposta ao *M. leprae* nas células T de pacientes paucibacilares, mas não sofreu modificação nas células T de pacientes lepromatosos. A IL-12 induz a fosforilação de STAT4 nos linfócitos T ativados com *M. leprae* de pacientes tuberculoides, embora o mesmo não tenha ocorrido nas células de pacientes lepromatosos (46).

Curiosamente, em pacientes lepromatosos, a expressão de IL-12R β 2 aumentou após estímulo com *M. tuberculosis*, mostrando que a falta de ativação desse receptor é específica ao *M. leprae* (47).

O *M. leprae* induz fortemente MCP-1 e IL-1Ra (antagonista do receptor de IL-1). Esta indução envolve a sinalização de PI3K. A supressão da IL-6 é dependente da sinalização de PI3K, já que, na presença de inibidor dessa via, o *M. leprae* é capaz de induzir a secreção desta citocina. Embora o *M. leprae* induza fatores negativos, células pré-tratadas com *M. leprae* são capazes de aumentar a produção de TNF α e IL-10 em resposta a um segundo antígeno (48). Recentemente, nosso grupo demonstrou a participação do NF- κ B na indução de TNF α pelo *M. leprae*. Nesse estudo, mostramos que o *M. leprae* induz a translocação de NF- κ B em leucócitos sanguíneos de indivíduos saudáveis, e ainda, que a talidomida, droga utilizada nos pacientes durante o ENL, foi capaz de reduzir os níveis de TNF α , bem como a translocação de NF- κ B (dados não publicados).

1.4 – A IMPORTÂNCIA DA INDOLEAMINA 2,3 – DIOXIGENASE NA HANSENÍASE

A indoleamina 2, 3 dioxigenase (IDO) é uma proteína monomérica que possui um grupo prostético heme, cuja principal função é a degradação do aminoácido essencial, triptofano (trp), por meio da clivagem oxidativa do anel pirrólico do triptofano, no tecido extra-hepático (49). A IDO pode ser induzida por IFN- γ em muitos tipos celulares, tais como: macrófagos, células dendríticas (DCs), microglia, astrócitos, fibroblastos, eosinófilos, células epiteliais e em células tumorais (49, 50, 51). Outras citocinas (IFN α , IFN β , TNF α e IL-10) ou lipopolissacarídeos também são capazes de induzir IDO, embora com menos eficiência que o IFN- γ (52). A ativação de IDO inibe a proliferação de linfócitos pela depleção de triptofano e pela ação direta dos próprios metabólitos produzidos na degradação desse aminoácido, causando a imunotolerância (53).

Estudos recentes de Sales e colaboradores [2011 (54)] mostraram, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, que IDO é mais expresso em pacientes lepromatosos. Corroborando estes dados, monócitos de indivíduos sadios e de pacientes lepromatosos estimulados com *M. leprae* produziram IDO. A atividade de IDO também foi avaliada pela razão da quinurenina sobre o triptofano, mostrando que pacientes lepromatosos, contrariamente ao que ocorre com os tuberculoides e em reação reversa, apresentam maior atividade de IDO. Além disso, os níveis de TNF

no soro dos pacientes lepromatosos foram maiores em relação aos tuberculoides, embora a secreção IFN γ tenha sido inversa em relação à produção de TNF. Apesar da baixa produção de IFN γ nos lepromatosos, sua função na indução de IDO não poderia ser descartada. Além disso, os baixos níveis desta citocina também poderiam ser relacionados à persistência do crescimento bacteriano.

O perfil imunossupressor da IDO vem sendo bastante estudado. Com o intuito de reverter o efeito desta molécula, diversos análogos sintéticos do triptofano com função inibidora da IDO estão sendo testados (55). Isto se dá provavelmente por meio da ligação ao sítio ativo da enzima que aceita o anel indole do substrato e de análogos deste (56). Por exemplo, o 1-metil-triptofano (1MT) é um inibidor de IDO reversível, usado normalmente como inibidor-padrão em ensaios para avaliar a atividade de IDO (57).

O óxido nítrico (NO) também pode ser considerado um inibidor da atividade de IDO, pela ligação irreversível ao grupo catalítico heme (58). Dados anteriores do nosso laboratório demonstraram que o NO predomina nas lesões tuberculoides, enquanto Moura e colaboradores [2007 (59)] mostraram que macrófagos isolados de lesão de pacientes lepromatosos, adquiriam a capacidade de produzir maiores quantidades de NO, ao longo do período da cultura.

1.5 – INTERAÇÃO *M. leprae* – MACRÓFAGO

A patogênese da hanseníase decorre principalmente da relação *M. leprae*-macrófago. Um indivíduo infectado por esta micobactéria pode ter diferentes tecidos e tipos celulares afetados, embora a doença só se manifeste na pele e nos nervos periféricos. Os macrófagos de pacientes lepromatosos internalizam e armazenam centenas de bacilos (60), o que resulta na produção de citocinas participantes da resposta imune à infecção. Além disso, os macrófagos atuam como células apresentadoras de antígeno, proporcionando um elo de ligação entre a imunidade inata e a adquirida.

Muitos estudos vêm mostrando o envolvimento de receptores como, por exemplo, os de lectinas do tipo C (61) ou do complemento (62) na superfície dos macrófagos, com a endocitose do *M. leprae*, ou ainda do *M. tuberculosis*. Os receptores de lectina do tipo C reconhecem estruturas de carboidratos como os

encontrados na parede celular de patógenos, incluindo os que estão presentes no envelope micobacteriano. O CD209, conhecido também como DC-SIGN, assim como o receptor de manose, se ligam a lipoarabinomanan (AraLAM) da parede da micobactéria (61). O CD209 foi inicialmente descrito como receptor de ICAM-3, com função de reconhecimento de glicoproteínas contendo altas concentrações de manose. A ligação do vírus HIV (63) ou do vírus da hepatite C (64) com o DC-SIGN pode ocasionar a infecção de células T. Muitos patógenos interagem como o CD209, podendo ser citados o *M. tuberculosis* (65), *S. mansoni* (66) e o *M. leprae* (67). O CD209, que atua como porta de entrada para o *M. leprae* (67), é expresso em pacientes lepromatosos e tuberculoides (68), embora diferentes programas funcionais dos macrófagos contribuam para a patogênese da hanseníase. A IL-10 e a IL-15 regulam positivamente a expressão de CD209 em monócitos, mas a IL-10 induz um perfil fagocítico da célula e a IL-15 induz um perfil antimicrobiano mediado pela vitamina D (69). Na linhagem ST88-14 e em células de Schwann (SC) primárias também se observa a expressão de CD209, que pode ser aumentada após o estímulo com a IL-4. As SC CD209⁺ possuem maior percentual de ligação ao *M. leprae*, porém, o mesmo não ocorre nas CD209⁻. Quando o receptor é bloqueado, observa-se a redução da infecção pelo *M. leprae* (70).

O receptor de manose (MR) ou o também conhecido CD206 é um receptor constitutivo, que atua tanto na resposta imune inata quanto na homeostasia, tendo grande importância no reconhecimento e internalização de agentes infecciosos (71, 72). Baetas-da-Cruz e colaboradores [2009^a (73)] demonstraram que SC primárias isoladas de camundongos ligadas a proteínas monossiladas, expressavam MR. A aquisição dessas proteínas foi reduzida na presença de IFN γ , o que poderia relacionar a função das CS na apresentação dos antígenos aos linfócitos T. Porém, na presença de dexametasona, houve um aumento na aquisição de proteínas monossiladas, sugerindo que a expressão de MR seja regulada de forma análoga em SC, assim como na microglia. Dados do mesmo grupo [2009b (74)] ainda mostraram que células ST-8814 expressam receptores de manose, o que reforça a importância destas células como modelo para a defesa do hospedeiro em doenças infecciosas, assim como outros distúrbios degenerativos.

Outros receptores ainda parecem ter relevância na hanseníase. De Souza Sales e colaboradores [2011 (54)] mostraram que, no infiltrado da lesão cutânea de pacientes lepromatosos, há um grande número de células positivas para CD11c, CD86, HLA-DR e CD68. Esses dados sugerem que, nessas lesões haja uma mistura

de macrófagos e células dendríticas em potencial. Nas lesões dos pacientes tuberculoídes, as células CD86 e CD11c positivas estão localizadas no centro do granuloma, correspondendo aos macrófagos epitelioides. Cerca de 75% dessas células são CD68⁺/IDO⁺, 50% das células são CD86⁺/IDO⁺, indicando que, em sua maioria, células IDO positivas são originadas a partir dos macrófagos. Poucas células deste infiltrado possuem CD86 na membrana plasmática e IDO no citoplasma.

A TACO, uma molécula bastante expressa em lesões de pele de pacientes lepromatosos, é recrutada da membrana plasmática para a membrana do fagossoma, inibindo a formação do fago-lisossoma e atuando na sobrevivência dos bacilos no macrófago (75).

Os macrófagos, além de fagocitarem patógenos, ainda possuem uma função “scavenger”, realizando, por exemplo, a fagocitose de lipoproteínas oxidadas [oxLDL (76)], o que leva à formação de células “espumosas”.

Na hanseníase, de acordo com a forma clínica do paciente, diferenças no conteúdo lipídico dos macrófagos são observadas. Nos pacientes tuberculoídes, os macrófagos estão ativados, originando as chamadas células epitelioides. Nos pacientes lepromatosos, os macrófagos, além de conterem uma grande quantidade de bacilos, possuem uma aparência “espumosa”, descrita inicialmente por Rudolf Virchow em 1863 (77). A partir deste fato, os macrófagos foram chamados de células de Virchow ou células espumosas, pela grande quantidade de lipídios, incluindo fosfolipídios e ácidos graxos de origem micobacteriana (78).

Montoya e colaboradores [2009 (79)] observaram uma divergência entre os programas antimicrobianos e os fagocíticos, que correspondem à resposta do hospedeiro ao *M. leprae* nos macrófagos. Contrariamente ao que ocorre com a IL-15, a presença de IL-10 em cultura de monócitos gerou um aumento na fagocitose, que se assemelha àqueles macrófagos encontrados na lesão do polo lepromatoso. Na presença de IL-15, foi observado um aumento na resposta antimicrobiana, de forma análoga aos macrófagos encontrados nos pacientes do polo tuberculoíde da hanseníase. Moura e colaboradores [2007 (59)] mostraram ainda que os macrófagos isolados de lesão de pacientes lepromatosos, mesmo após 20 dias de cultura, ainda possuíam o perfil fagocítico característico dos pacientes com essa forma clínica.

1.6 – CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS MACRÓFAGOS

Desde a descoberta dos fagócitos por Metchnikoff [1884 (80)], foi a eles associada à ideia de que estas células eram capazes de endocitar patógenos e destruí-los, relacionando-os com o sistema imune. Estas células fagocitam aproximadamente 2×10^{11} de eritrócitos por dia, o que equivaleria a quase três quilos de ferro e hemoglobina reciclada por ano (81). Este processo de remoção é vital, pois sem ele o hospedeiro poderia não sobreviver. Os fagócitos também estão envolvidos na remoção de fragmentos celulares que são gerados normalmente durante o remodelamento tecidual e que, de forma rápida e eficiente, eliminam as células que entraram em apoptose (82). Os receptores que medeiam este processo de remoção homeostática incluem os receptores “scavenger”, a fosfatidilserina, integrinas e fatores complemento (83).

Os macrófagos estão presentes em todos os tecidos e, de acordo com o ambiente, as células desempenharão funções específicas. Porém, o sinal do ambiente nem sempre induz mudanças que aumentem a função imune do macrófago. De certa maneira, tanto a imunidade inata quanto a adquirida podem levar o macrófago a ser mais suscetível a infecções patogênicas e menos preparado para produzir citocinas que modulem positivamente a resposta imune (84). Eles se diferenciam a partir de PBMCs, que migram para os tecidos em estágio estacionário ou em resposta à inflamação (85). Estas PBMCs se desenvolvem a partir de uma mesma origem mieloide, precursora de diferentes tipos celulares, dentre os quais os neutrófilos, eosinófilos, basófilos, macrófagos, células dendríticas e mastócitos. Ao deixarem o sangue, os monócitos já possuem uma função definida.

Embora a heterogeneidade dos macrófagos não seja compreendida em toda a sua extensão, há uma teoria segundo a qual os monócitos continuam a se desenvolver e a maturar no sangue, sendo, em seguida, recrutados pelo tecido, região onde continuam a se diferenciar (86). Os monócitos migram do sangue para o tecido para reabastecer os macrófagos teciduais ósseos, alveolares, do sistema nervoso central (células microgliais), histiócitos, células de Kupffer do fígado, baço e peritônio (85).

1.7 – AS POPULAÇÕES DE MACRÓFAGOS

Os macrófagos podem responder a sinais endógenos que são rapidamente gerados a partir de uma lesão ou infecção. Estes sinais são tipicamente produzidos por células da imunidade inata, ou ainda, por células envolvidas nas respostas

antígeno-específicas. Estes sinais são mais focados e prolongados que a resposta imune e, geralmente, levam a alterações nos macrófagos (87). Além de todas essas fontes de estímulo, os macrófagos podem produzir diversos fatores capazes de influenciar na sua própria fisiologia.

Mosmann e colaboradores [1986 (88)] demonstraram em modelo murino que linfócitos T são divididos em dois grupos: os Th1 e os Th2. Esta classificação foi baseada na produção de citocinas, IFN γ e IL-4, respectivamente.

Inicialmente, Gordon e colaboradores [2003 (89)] mostraram que a exposição de macrófagos a IL-4 ou IL-13 levava à ativação alternativa de macrófago com fenótipo distinto dos ativados classicamente, que depende da resposta Th1 e de células NK, produtoras de IFN γ .

Mosser [2003 (90)] mostrou que a ligação do receptor Fc γ em macrófagos estimulados com IFN γ levava ao bloqueio da síntese de IL-12 e a uma grande indução de IL-10, evento denominado “ativação do tipo II”. Estas classificações revelam importantes diferenças na resposta a moduladores como IL-4, IL-13, IL-10, glicocorticoides e TGF β , e, por esta razão, foi proposta uma classificação na qual a polarização M1 incluía a ativação clássica, obtida pelo estímulo com IFN γ , enquanto a polarização do tipo M2 estaria associada a programas antiparasitários e de reparo tecidual. A polarização M2 foi subdividida em M2a ou M2b, correspondente à ativação de macrófagos tipo II e a M2c, que inclui estímulos heterogêneos (91).

O termo “ativação clássica” tem sido usado para designar os macrófagos efetores (M1) que são produzidos durante a resposta imune mediada por células. Na classificação original de macrófagos ativados, as combinações de dois sinais provenientes do IFN γ e do TNF, resultam numa população de macrófagos com maior capacidade microbicida ou tumoricida, e que secreta altos níveis de mediadores pró-inflamatórios (92, 93). O LPS também possui a capacidade de induzir a diferenciação do macrófago (91).

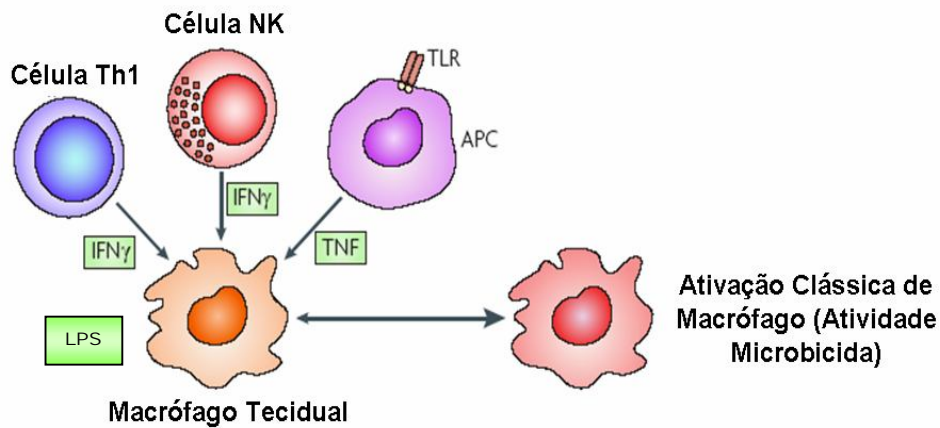


Figura 1.7.1 – Representação da ativação clássica de macrófagos. O $\text{IFN}\gamma$ é produzido por células NK e células Th1 na imunidade inata, juntamente com o TNF produzido por células apresentadoras de antígeno. Este conjunto de estímulos induz a ativação do macrófago tecidual. Adaptado de Mosser e Edwards, 2008 (84).

As células NK (*Natural Killer*) são importantes na imunidade inata, atuando, ainda, como fonte inicial de $\text{IFN}\gamma$, em resposta ao ao estresse e infecções, induzindo macrófagos a secretarem citocinas pró-inflamatórias, assim como produzir quantidades aumentadas de ânions superóxidos e radicais de oxigênio e nitrogênio (94). A produção de $\text{IFN}\gamma$ pelas células NK é geralmente de curta duração e, por isso, não consegue manter por muito tempo a população de macrófagos ativada. Os linfócitos Th1 amplificam a produção de $\text{IFN}\gamma$ e mantêm a ativação do macrófago, possibilitando, assim, a contínua defesa do organismo contra muitos organismos intracelulares (84).

A presença de TNF também é importante na manutenção da ativação clássica dos macrófagos. Uma das maneiras de estimular a expressão de TNF é a ativação de receptores do tipo Toll (TLR) via MyD88. O TNF coopera com o $\text{IFN}\gamma$ de maneira autócrina, mantendo a ativação dos macrófagos. Além de MyD88, alguns ligantes de TLR também podem ativar o domínio TIR que contém a proteína adaptadora indutora de $\text{IFN}\beta$ (TRIF), e cujo sinal, por meio do fator regulador $\text{IFN}\beta$ (IRF3), pode levar à produção de $\text{IFN}\beta$ (95). O $\text{IFN}\beta$, de maneira endógena, pode substituir o $\text{IFN}\gamma$ razão pela qual poderia ativar os macrófagos de forma clássica. Portanto, os dois sinais necessários à ativação dos macrófagos podem ser substituídos por certos agonistas de TLR, que induzem tanto TNF quanto $\text{IFN}\beta$ (84).

O LPS é o principal componente da membrana de bactérias gram-negativas. Ele é reconhecido por meio do complexo CD14-TLR4 e da proteína acessória MD2 (96). A ativação do macrófago ocorre pelo reconhecimento de padrões de patógenos

(PAMPs), como o LPS pelos receptores de modelos de reconhecimento (PRR), como os TLR (97) e receptores NOD (domínio nucleotídeo de oligomerização) (98).

Embora a presença de estímulos pró-inflamatórios seja fundamental à ativação clássica dos macrófagos, eles podem causar extenso dano ao hospedeiro. A IL-6, IL-1 β e IL-23, por exemplo, ativam macrófagos classicamente, e ainda têm sido relacionadas com a expansão de linfócitos Th17 (99). Estas células produzem IL-17, uma citocina que está associada a altos níveis de recrutamento tecidual de polimorfonucleares (PMN), e que desencadeiam respostas inflamatórias autoimunes (100). Estas células em apoptose são fagocitadas por macrófagos ativados, o que leva a inibição a resposta inflamatória, e sendo responsáveis, em parte, pela produção do fator transformador do crescimento [TGF- β (101)].

O papel da ativação clássica dos macrófagos na defesa do organismo contra organismos intracelulares tem sido bastante estudado (102). Como os macrófagos ativados classicamente possuem perfil altamente endocítico e também eliminam facilmente patógenos intracelulares, este processo pode ser mediado por diferentes mecanismos como, por exemplo, a restrição de ferro e outros nutrientes, a acidificação do fagossoma, a síntese de reativos de oxigênio (103) e a liberação de óxido nítrico (NO) através da L-arginina pela atividade de iNOS [NO sintase induzível (104)]. Sendo assim, podemos concluir que a ativação clássica de macrófagos é um componente importante na defesa do organismo quando bem controlada, pois as citocinas e mediadores produzidos podem levar ao dano tecidual do hospedeiro. Macrófagos ativados classicamente são mediadores-chave na imunopatologia de algumas doenças autoimunes como, por exemplo, a artrite reumatoide e a doença inflamatória do intestino (105, 106).

A ativação alternativa de macrófagos foi originalmente descrita como sendo uma consequência da produção de altos níveis de IL-4. Em oposição aos macrófagos ativados classicamente, são denominados M2, e, mais recentemente, algumas variantes foram descritas, variando conforme os estímulos utilizados para gerá-los. As células M2 são subdivididas em: M2a ou também chamado de macrófagos ativados alternativamente, induzidos a partir de IL-4 ou IL-13; M2b, correspondente aos macrófagos tipo 2 ativados por meio da ligação com o receptor Fc γ na presença de estímulos de TLR; e M2c, os macrófagos do programa de desativação na presença de IL-10, glicocorticoides, TGF β , expressando o receptor CD163 [Figura 1.7.2 (91)].

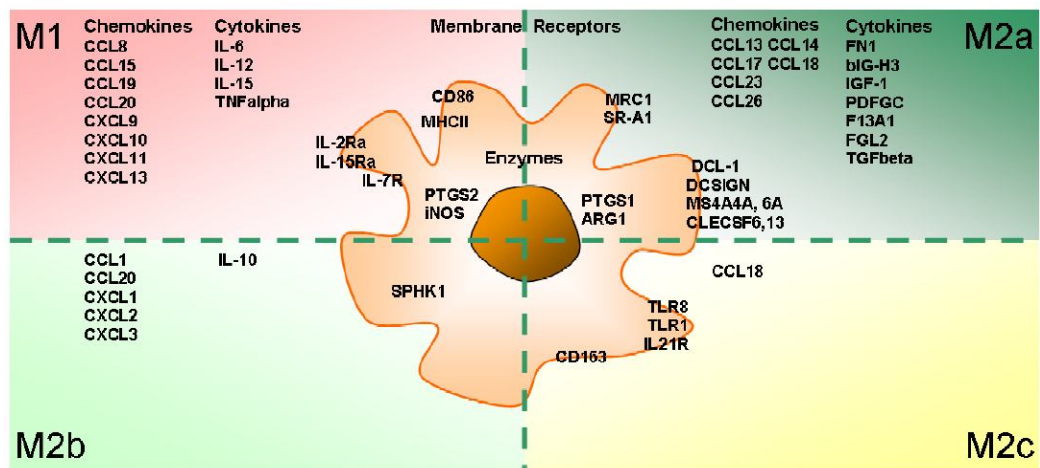


Figura 1.7.2 – A polarização de macrófago está associada a assinaturas gênicas distintas. Esquema demonstrativo dos tipos de macrófagos, citocinas e receptores (Martinez e cols., 2008).

A ativação de macrófagos M2a é obtida pelo estímulo de IL-4 ou IL-13, que são fortemente produzidas por células Th2, mastócitos e basófilos (107). Um dos primeiros sinais inatos liberados durante o dano tecidual é a IL-4 (91), produzida inicialmente por basófilos e mastócitos, embora outros granulócitos também possam estar envolvidos neste processo. Esta produção de IL-4 converte inicialmente macrófagos em uma população de células que está programada para promover o reparo tecidual, e também estimula a atividade de arginase em macrófagos (Figura 1.7.3). Neste sistema, há uma conversão da arginase em ornitina, um precursor das poliaminas e colágeno, o que leva à produção de matriz extracelular (108).

A resposta imune adaptativa também pode levar à produção de IL-4, e acredita-se que este seja o primeiro caminho para o desenvolvimento e a manutenção dos macrófagos de reparo tecidual. As células envolvidas nas respostas Th2, e cuja expressão de IL-4 e IL-13 é marcante, são induzidas primeiramente em resposta a um distúrbio na superfície da mucosa (109), mostrando-se indispensáveis nos pulmões e intestinos. Estas respostas também podem ocorrer em tecidos desprovidos de mucosa, especialmente em infecções por helmintos (110).

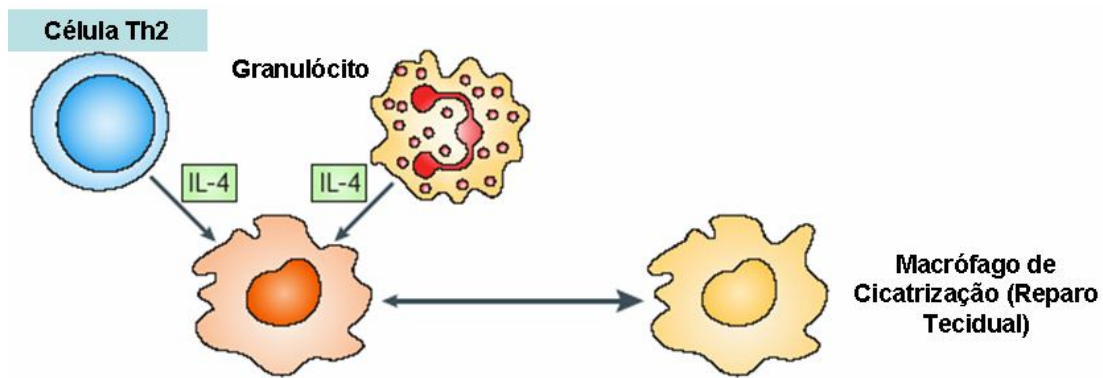


Figura 1.7.3 - Formação do Macrófago de Cicatrização (M2a). A presença de IL-4 no tecido pode levar à formação do macrófago de reparo tecidual. Adaptado de Mosser e Edwards, 2008 (84).

Em experimentos *in vitro*, os macrófagos tratados na presença de IL-4 e/ou IL-13 falham em apresentar antígenos às células T, produzem quantidades mínimas de citocinas pró-inflamatórias e são menos eficientes, quando comparados com os macrófagos de ativação clássica, que produzem altos níveis de radicais de oxigênio e nitrogênio, eliminando patógenos intracelulares (111). Curiosamente, na fibrose tecidual induzida na esquistossomose crônica, há uma ativação descontrolada de macrófagos de cicatrização. Quando os macrófagos perdem a expressão do receptor da IL-4 (IL-4R), eles falham em induzir esta patologia. Além disso, tratamento com anti-IL-4 causa a redução da fibrose e um discreto acúmulo de macrófagos de cicatrização (112). Essas evidências mostram que os macrófagos tratados com IL-4 e IL-13 são mais susceptíveis em algumas infecções intracelulares (113, 114).

Os macrófagos M2b são gerados por estímulos com LPS ou IL-1 β , pelo TLR4 ou pelo receptor de IL-1 β (IL-1 β R), e, ainda, por complexos imunes reconhecidos por receptores da porção Fc da IgG (Fc γ R). As células M2b têm um perfil inverso ao das células M1, pois são caracterizadas pela produção baixa de IL-12, e elevada de IL-10 (91).

Os macrófagos reguladores (Figura 1.7.4) são similares aos de ativação clássica e de cicatrização, no sentido de originar uma resposta imune inata ou adaptativa. Apesar da resposta ao estresse não ser tipicamente considerada como parte da imunidade inata, o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) pode exercer um efeito marcante sobre os macrófagos. Os glicocorticoides são liberados pelas células adrenais em resposta ao estresse e podem inibir a defesa do hospedeiro

mediada pelos macrófagos, além das funções inflamatórias, pela inibição da transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias, reduzindo assim, a estabilidade do RNA mensageiro (84). A produção de citocinas reguladoras pelos macrófagos, como o TGF β , seguida da fagocitose de células apoptóticas na presença de um estímulo pró-inflamatório, também pode contribuir para a função imunorreguladora destas células (101).

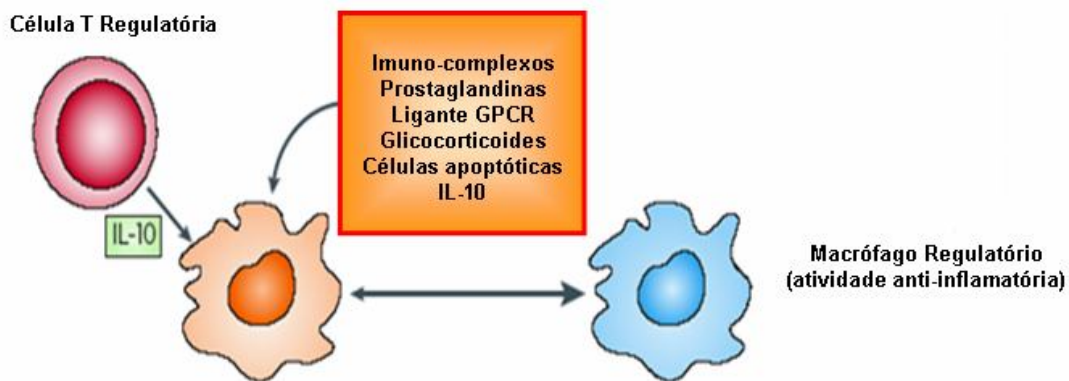


Figura 1.7.4 – Representação de Macrófago Regulador (M2b). Por meio do estímulo pela IL-10, pode ocorrer a diferenciação de macrófagos com atividade anti-inflamatória. Adaptado de Mosser e Edwards, 2008 (84).

Este tipo de macrófago também pode surgir em estágios tardios da resposta imune adaptativa, e o seu primeiro papel parece ser a modulação da resposta imune e a limitação da inflamação (115). Existem várias maneiras de gerar um macrófago regulador, e, embora a MAPK (ERK) tenha surgido como uma potencial candidata (116), o mecanismo molecular envolvido nesta alteração fenotípica ainda precisa ser identificado. Gerber e Mosser [2001 (117)] foram os primeiros a identificar os macrófagos reguladores através da estimulação *in vitro* com o agonista de TLR na presença de imunocomplexos IgG. Esta combinação de estímulos permitiu o desenvolvimento de uma população de macrófagos que produziam altos níveis de IL-10. Além dos imunocomplexos, outros fatores podem gerar um sinal de diferenciação reguladora destas células, incluindo as prostaglandinas (118), células apoptóticas (119) e a IL-10 (91).

Ao contrário dos macrófagos de reparo tecidual, estes macrófagos reguladores não contribuem para a produção de matriz extracelular, e muitas destas células expressam altos níveis de moléculas coestimulatórias (CD80 e CD86) e, portanto, podem apresentar antígenos às células T (111). Patógenos como, por exemplo, protozoários, vírus e bactérias podem se desenvolver em macrófagos reguladores. Em muitos casos, estes patógenos mimetizam alguns estímulos como, por exemplo, o estágio amastigota da *Leishmania spp.*, que se liga à IgG do hospedeiro e se utiliza do Fc γ R para entrar no macrófago. Esta ligação e a ativação negativa de vias de sinalização induzem o desenvolvimento de macrófagos reguladores, que podem permitir o crescimento de patógenos intracelulares (120). Outro exemplo está ligado ao caso da infecção causada pelo vírus da dengue que tem sido relacionado com o desenvolvimento deste tipo de macrófagos. No aparecimento da infecção, há uma regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias e altos níveis de IL-10 (121). Em relação à infecção bacteriana, temos como exemplo a toxina do *Bacillus anthracis*, cujo ligante nas células é a GPCR (receptor duplo da proteína G). A ativação deste sistema resulta no desenvolvimento de macrófagos reguladores e no aumento da dispersão bacteriana (122). Além disso, esta toxina letal pode inibir a ativação de MAPK nos macrófagos, interferindo na produção de citocinas pró-inflamatórias (123). Portanto, existe uma grande variedade de patógenos que podem interferir na ativação ou simplesmente induzir o desenvolvimento de um determinado perfil dos macrófagos; em todos os casos, o resultado é o mesmo: a eliminação deficiente do patógeno e o aumento da proliferação destes micro-organismos.

Os macrófagos M2c fazem parte de uma categoria de macrófagos que incluem as células estimuladas com IL-10, TGF β ou glicocorticoides. Estas células são consideradas desativadas, e possuem menor expressão de citocinas pró-inflamatórias, grande atividade *scavenger* e carregam um programa funcional de pró-reparo. A IL-10 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-6 e IL-12, e é produzida por macrófagos, linfócitos T, B e uma variedade de outros tipos celulares, incluindo mastócitos e queratinócitos como parte de uma resposta homeostática à infecção ou inflamação (91). Esta citocina desempenha a função de limitar a duração e intensidade das respostas imunes e inflamatórias. O TGF β é uma citocina pleiotrópica que medeia uma grande quantidade de efeitos na diferenciação, ativação e proliferação celular. Em monócitos e macrófagos regula a ativação e a produção de citocinas, assim como a quimiotaxia e a defesa do hospedeiro. Além

disso, esta citocina regula negativamente a expressão de CD163 (receptor “scavenger”) em macrófagos e inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-1 α e IL-18 (124).

Os glicocorticoides (GC) são liberados em resposta a uma variedade estímulos de estresse (“starvation”, dor, trauma e infecção), e são essenciais para a manutenção de funções homeostáticas. O reconhecimento destes estímulos ocorre no núcleo, por meio dos receptores de glicocorticoides que reprimem fortemente citocinas pró-inflamatórias tais como TNF α , IL-4, IL-5, IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12, assim como mediadores pró-inflamatórios como iNOS e ciclooxigenase-2 [COX-2 (125)]. Os GCs também inibem a resposta inflamatória graças ao aumento da expressão de IL-10 e outras moléculas com funções anti-inflamatórias, como CD163 e IL-1RII. Além destas características, o GC também modula negativamente uma grande variedade de genes que são regulados pelo IFN γ , assim como os complexos CXCL-10/Ip-10, CXCL-11/I-TAC, CCL5/RANTES, CCL24/eotaxina-2 (126).

1.8 – AS FAMÍLIAS DE RECEPTORES “SCAVENGER”

Os receptores *scavenger* foram observados pela primeira vez em estudos para compreender a forma como o colesterol de lipoproteínas de baixa densidade (“low density lipoproteins” - LDL) se acumulava em placas ateroscleróticas, em pacientes com caso familiar de perda de receptores LDL (127). Desde o início dos estudos, a família de moléculas classificadas como receptores “scavenger” tem se expandido significativamente e, com base na estrutura de seus multidomínios, este grupo tem sido dividido em oito diferentes classes (A, B, C, D, E, F, G e H), de acordo com a classificação proposta por Krieger e colaboradores em 1997 [(128) Figura 1.8.1].

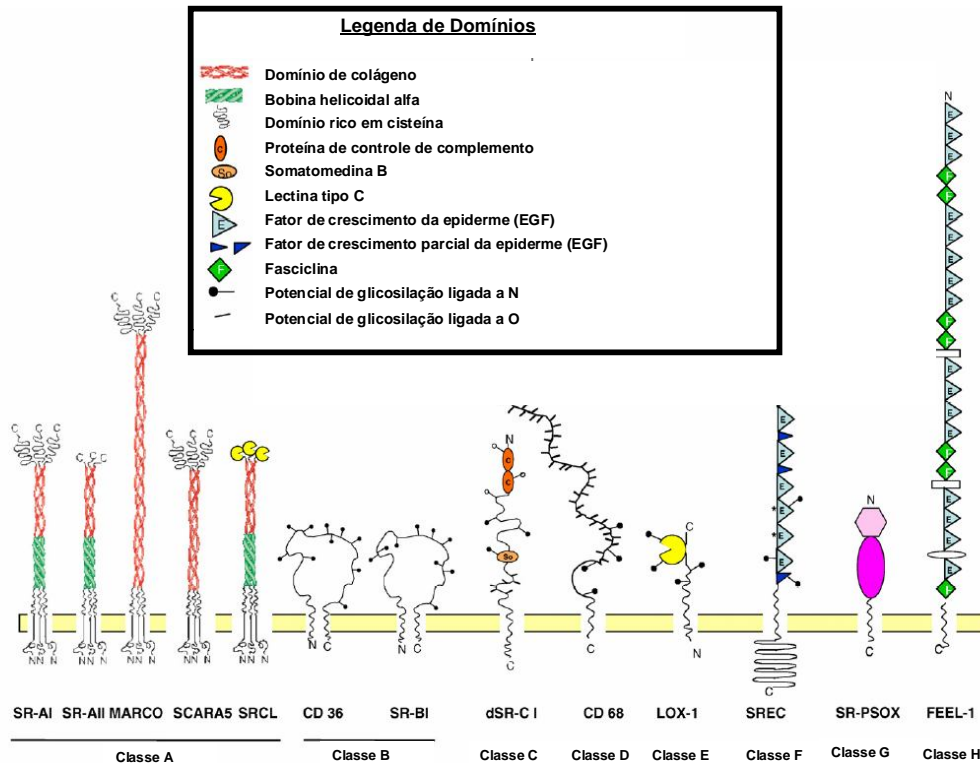


Figura 1.8.1 – Representação esquemática dos membros do SRCR. Os receptores são agrupados em classes de acordo com o tipo da estrutura. Os domínios dos representantes “scavenger” são representados na legenda da figura. Esquema adaptado de Plüdemann e cols., 2007 (129).

Apesar do grande número de classes de receptores “scavenger” e, conseqüentemente, de uma série de ligantes, o CD163 é um dos receptores que se destacam, pois participa da homeostase e da imunidade inata em macrófagos fazendo parte do subgrupo relacionado aos receptores *scavenger* ricos em cisteína [“scavenger receptors cystein-rich”– SRCR (128)]. O SRCR é considerado uma superfamília, relacionada estruturalmente às glicoproteínas transmembrânicas que participam na defesa imune inata, atuando como modelo de reconhecimento de moléculas, e, algumas vezes, com ampla especificidade. Outras medeiam seletivamente interações proteína-proteína (130).

O grupo B SRCR inclui CD5, CD6, SP α , gp-340, M160, CD163, dentre outros (131, 132, 133). Dentro da classe B de receptores “scavenger”, CD163 e M160 são os únicos membros expressos exclusivamente em monócitos ou macrófagos (132, 134). Os demais são expressos em outras células imunes ou em células não-hematopoiéticas como, por exemplo, o CD5 e CD6, expressos predominantemente em linfócitos B e T (135), sendo o gp-340 secretado expresso por células da mucosa epitelial. Pouco se sabe sobre a função dos membros do grupo B da família

SRCR, porém a grande variedade de receptores desta família está associada à diversidade de ligantes (Fabriek e cols., 2005).

O CD163 (Figura 1.8.2), também conhecido como RM3/1, receptor *scavenger* de hemoglobina, M130 ou p155, é o membro da família SRCR classe B expressa em monócitos e em subpopulações de macrófagos teciduais (130).

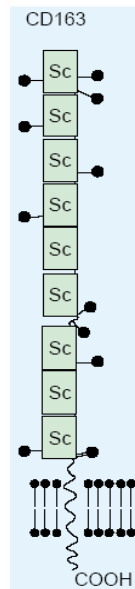


Figura 1.8.2 – Representação esquemática do CD163. Domínios “scavenger” – Sc (verde) e regiões de glicosilação (preto —●) - Gordon, 2001 (136).

O CD163 foi descrito em humanos, mas também há homólogos em marmotas, porcos e roedores. Em humanos, este receptor é uma glicoproteína de 130-kDa, que contém um único elemento transmembrânico (tipo I), uma calda citoplasmática curta, com 49 resíduos de aminoácidos e grande região extracelular contendo nove domínios SRCR – “scavenger receptor cystein-rich” [receptores “scavenger” ricos em cisteína (137)]. Este receptor é reconhecido por uma série de anticorpos monoclonais, como Ber-Mac3 (138), Ki-M8 (139), GHI/61 e SM4 (140) e RM3/1 (141). Além disso, possui predominantemente duas isoformas citoplasmáticas (ambas resultantes de “splicing” alternativo) contendo longos domínios intracelulares compostos por 84 ou 89 resíduos de aminoácidos, sendo assim chamados de isoforma A e B respectivamente (142, 143). Essas diferenças poderiam indicar a existência de diferentes sinais de transdução das variantes do CD163.

A expressão de CD163 tem sido estudada em células humanas (134) e em ratos (144), e sua expressão é restrita às células da linhagem monocítica. Os macrófagos teciduais expressam altos níveis de CD163, o que pode estar relacionado, em alguns casos, ao papel importante na resolução da inflamação. Este receptor também está envolvido na diferenciação dos macrófagos, assim como de monócitos do sangue periférico, células Kupffer (no fígado) no baço, macrófagos corticais do timo, macrófagos maduros residentes da medula óssea, no tecido nervoso central (o que não inclui a microglia), como demonstrado por van den Heuvel e cols. [1999 (134)]. Cabe salientar que altos níveis de CD163 foram detectados em monócitos durante a fase de resolução da resposta imune sistêmica em cirurgias de ponte de safena (145).

A regulação da expressão de CD163 pode ser observada *in vitro* por fatores que induzem diferenciação de monócitos em macrófagos, levando ao aumento considerável da expressão de RNAm e de proteínas de CD163 secretadas em culturas destas células. Além disso, o tratamento de monócitos com glicocorticóides e IL-10 aumenta a expressão deste receptor (146, 147). Por outro lado, quando mediadores pró-inflamatórios como LPS, IFN γ e TNF são utilizados como estímulo, há uma supressão da expressão gênica, assim como do receptor CD163. A supressão deste receptor também é verificada quando monócitos são diferenciados em células dendríticas pela adição de GM-CSF e IL-4 na cultura das células (147). Quando monócitos são estimulados para o fenótipo “clássico” ou “alternativo”, IFN γ e LPS ou IL-4 e IL-13, respectivamente, há um aumento da expressão de CD163 no perfil “alternativo” de macrófagos, que desempenham um papel importante na resposta inflamatória, como, por exemplo, na captura de componentes de resíduos celulares (89).

A função homeostática melhor caracterizada e mais extensivamente estudada do CD163 é a relacionada com a ligação deste receptor a complexos Hemoglobina:Haptoglobina (Hb:Hp) (148). A hemólise intravascular gera uma liberação de hemoglobina livre tóxica e oxidativa (originada de eritrócitos malformados ou senescentes), que pode ser complexada à haptoglobina por meio dos macrófagos teciduais do fígado, baço ou da medula óssea (136). Neste processo, macrófagos residentes que expressam o CD163 atuam, internalizando o complexo Hb:Hp, o que leva à proteção do tecido contra um dano oxidativo causado pela hemoglobina livre (148). O CD163 tem alta afinidade pela Hb:Hp (2:2), ou seja, uma forma multimérica da haptoglobina que se liga à hemoglobina, e que é

preferencialmente endocitada por macrófagos. A região de reconhecimento deste complexo pelo CD163 é a região do domínio “scavenger” 3, que também pode ser bloqueada, acarretando a inativação deste receptor (149).

Apesar do papel protetor na remoção da Hb do plasma, a endocitose de Hb:Hp mediada pelo CD163 também é importante na captação de ferro nos macrófagos teciduais, o que pode refletir um bom método de reciclagem de ferro no organismo (130). Sendo assim, o que foi endocitado é entregue ao endossoma primário, e o CD163 é reciclado para a membrana plasmática, a fim de realizar uma nova endocitose (150). Uma vez liberada, a subunidade heme da Hb é degradada pela enzima heme oxigenase-1 (HO-1), convertendo-a em biliverdina, ferro livre e monóxido de carbono [(151) Figura 1.8.3].

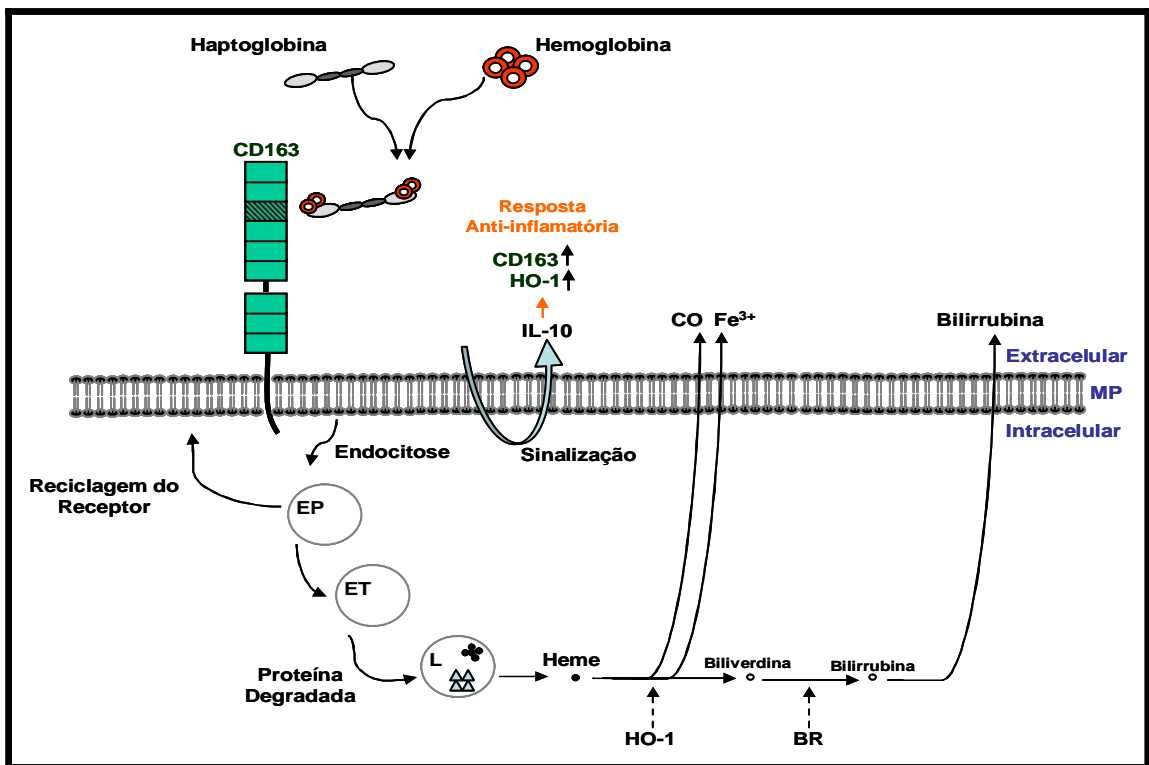


Figura 1.8.3 – Representação esquemática da função scavenger do CD163 para Hb:Hp. Após a formação do complexo Hb:Hp, é exposto um novo epítipo, que interage com o terceiro domínio SRCR do CD163, resultando na sinalização de eventos e na endocitose do complexo receptor-ligante. Hb:Hp induz a expressão de IL-10 que regula positivamente HO-1 e CD163. EP=Endossoma primário; ET=Endossoma tardio; BR=Bilirrubina redutase. Este esquema foi adaptado de Van Gorp e cols., 2010 (152).

Heme ou ferro-protoporfirina IX (PP-IX) está envolvida em vários processos catalíticos em procariotos e eucariotos. Além de atuar como uma molécula reguladora, ela também controla processos celulares, como a transcrição do DNA e a diferenciação celular (153, 154). Heme também é considerada uma fonte de ferro para a nutrição de bactérias. Em bactérias patogênicas ao homem, cerca de 95% do ferro adquirido está presente na forma de heme, primariamente como hemoglobina, hemopexina e heme-lipoproteínas (155, 156). Apesar de uma ampla descrição do processo de entrada de heme em bactérias gram-negativas e positivas, pouco é sabido sobre a sua atuação na célula hospedeira. Em eucariotos, as heme-oxigenases (HOs) catalisam a clivagem oxidativa do heme em biliverdina, ferro e monóxido de carbono (157). Em procariotos, como a *Pseudomonas aeruginosa*, que possui enzimas homólogas à HO, há evidências de que a clivagem oxidativa do heme seja um mecanismo por meio do qual as bactérias adquirem ferro. Além disso, o heme do hospedeiro pode ser incorporada a bactérias (158, 159). A utilização de heme exógeno, em vez do ferro, é vantajosa para a bactéria, pois grande parte do ferro é direcionada à síntese do heme endógeno (160). Ademais, a injeção de ferro exógeno em animais infectados incrementa a multiplicação bacteriana e à virulência de certos patógenos, como *Vibrio cholerae* e *M. tuberculosis*; o bacilo adquire ferro do hospedeiro a partir da transferrina (161, 162).

Estudos recentes de Jones e Niederweis [2011 (163)] mostraram que a aquisição do ferro ocorre graças ao heme do hospedeiro, embora o mecanismo de aquisição ainda não tenha sido descrito. Já o *M. leprae* utiliza um sideróforo exoquelina para capturar ferro do hospedeiro (164). Além disso, Pessolani e colaboradores [1994 (165)] observaram que o *M. leprae* possui bacterioferritina, dotada da função de armazenar ferro, indicando que ela possa estar envolvida na sobrevivência da bactéria no hospedeiro. Lara e colaboradores [2003 (166)] mostraram que, em *Boophilus microplus* (carrapato), o heme é armazenado em organelas especializadas chamadas hemossomas. Em protozoários, heme também é importante para a proliferação de *Trypanosoma cruzi* (167). Após a endocitose de Hb:Hp, a presença de HO-1 é fundamental para a proteção contra o dano oxidativo e pode levar a efeitos anti-inflamatórios, devido à produção de biliverdina, bilirrubina, monóxido de carbono (CO) ou ferritina (168).

O monóxido de carbono possui um potente efeito anti-inflamatório. Otterbein e colaboradores [2000 (169)] demonstraram em estudo *in vivo* e *in vitro*, que as baixas concentrações de CO inibem a expressão de TNF e IL-1 β induzida por LPS, porém

aumenta a expressão de IL-10, característica esta atribuída à ativação seletiva de p38, uma proteína quinase ativada por mitógeno [MAPK (170)]. Embora o CO atue muitas vezes da mesma maneira que o NO, a função desta molécula ainda engloba a participação em vias de transdução de sinal.

A relação entre a síntese de HO-1 em macrófagos e a ligação de Hb:Hp pelo CD163 pode permitir que os macrófagos coordenem a reciclagem de hemoglobina e, ao mesmo tempo, desenvolvam uma atividade anti-inflamatória.

1.9 – CD163 SOLÚVEL (sCD163)

Além de estar presente na membrana de monócitos e macrófagos, o CD163 também pode ser encontrado solubilizado no plasma (171). O sCD163 é resultado da clivagem do CD163 da membrana plasmática pela ação de vários fatores, tais como as metaloproteinases de matriz, cujo mecanismo pode ser avaliado *in vivo*, e que, por meio do inibidor de metaloproteinases tecidual, o TIMP – especialmente o TIMP-3 - pode-se impedir esta clivagem da membrana plasmática de monócitos e de macrófagos (172).

Em estudos *in vitro*, o PMA (“phorbol 12-myristate 13-acetate”) também participa do processo de clivagem do CD163, com um mecanismo dependente de PKC (proteína quinase – C). Além disso, endotoxinas, como o LPS, são potentes indutores da clivagem do CD163 de membrana, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sendo tal indução realizada pela ativação de TLR4 (173). A clivagem do CD163 também decorre da ativação de imunocomplexos ligados ao receptor Fc γ (174). Os mediadores do estresse oxidativo, frequentemente presentes em condições inflamatórias, também são estímulos à clivagem do CD163 de membrana (175) (Figura 1.9.1).

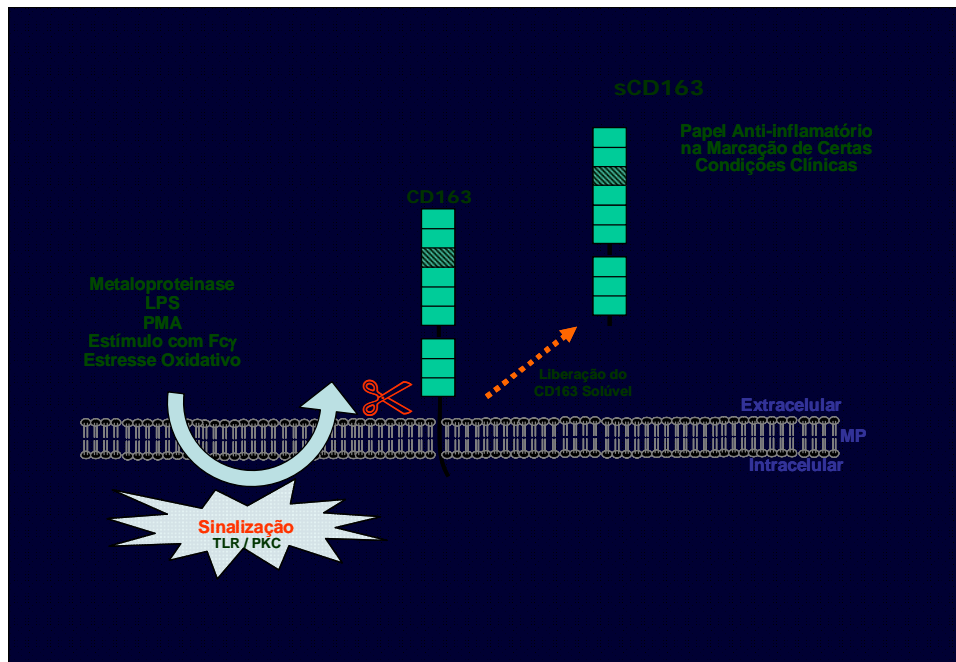


Figura 1.9.1 – Regulação da clivagem do CD163 da membrana plasmática. A presença de vários sinais podem levar à clivagem proteolítica do receptor e este ser liberado para o plasma, liberando o sCD163. O sCD163 tem propriedades anti-inflamatórias, e pode ser utilizado como marcador para certas condições patológicas. Este esquema foi adaptado de Van Gorp e cols., 2010 (152).

Embora o LPS e o receptor Fc γ induzam a clivagem do CD163 de membrana, eles não são idênticos. O receptor Fc γ pode ser inibido pela genisteína, o que mostra que este receptor necessita da atividade de PTK para induzir a clivagem do CD163. Da mesma maneira, a genisteína inibe a clivagem pelo bloqueio da atividade de Src kinase, que é responsável pela fosforilação de ITAM encontrado nos receptores Fc γ (176).

A concentração de sCD163 no soro ou plasma de indivíduos saudáveis é relativamente alta, e sua detecção é realizada pelo método de ELISA (177). Porém, em condições patológicas, estes níveis são ainda maiores, podendo tal substância ser utilizada como marcador de monitoramento de um grande número de doenças (Tabela 1.9.1).

TABELA 1.9.1 – NÍVEIS AUMENTADOS DE sCD163 EM ALGUMAS CONDIÇÕES CLÍNICAS

CONDIÇÕES CLÍNICAS	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA
Arteriosclerose	(178)
Artrite Reumatoide	(172)
Disordens Autoimunes	(179)
Doenças Gastrointestinais	(180)
Leucemia Mieloide Aguda	(181)
Melanoma	(182)
Pneumonia/Sepse	(183)
Rejeição de Transplantes	(184)
Síndrome Hemofagocítica	(185)
Tuberculose	(186)

Existem muitas abordagens funcionais em relação ao sCD163, porém pouco se sabe sobre a sua função biológica. A ligação do sCD163 com complexos Hp:Hb, sugere a redução da captação de ferro celular, limitando o acesso à hemoglobina livre, e inibindo, assim, o crescimento de patógenos intracelulares (187). Porém, estudos recentes mostraram que os complexos Hp:Hb se ligam preferencialmente ao CD163 membranar, e que o sCD163 normalmente não se liga a estes complexos no plasma (188). O potencial anti-inflamatório do sCD163 leva a inibição da ativação e da proliferação de linfócitos T, porém, este fenômeno não é observado no CD163 membranar (189).

2 - Justificativa

Os mecanismos envolvidos no aparecimento das formas lepromatosas da hanseníase ainda são objeto de grande interesse científico. A interação do *M. leprae* com as células hospedeiras humanas, tais como macrófagos e células de Schwann, parecem resultar em uma complexa adaptação celular a este bacilo. Disto resultam diferentes padrões clínico-imunológicos que envolvem não apenas o sistema imune, como também o eixo neuro-endócrino, o metabolismo lipídico e o sistema de metabolismo do ferro, dentre outros.

Estudos anteriores têm mostrado que a ausência de resposta específica ao *M. leprae* em pacientes com as formas lepromatosas da hanseníase pode ser revertida, sugerindo que fatores inibidores liberados durante a infecção sejam capazes de modular negativamente a resposta imune adaptativa. Neste contexto, a interação do *M. leprae* com diferentes subtipos de macrófagos tem sido considerada um elemento-chave para o desfecho da resposta imune.

Estudo anterior do nosso grupo apontou que a enzimaIDO, responsável pela degradação do triptofano, participa da resposta imune ao *M. leprae*, por meio de sua ação supressora, influenciando na perda progressiva da resposta antígeno-específica observada nas formas multibacilares.

Neste estudo, pretendemos explorar o papel do receptor “scavenger” CD163 identificado como encarregado da homeostasia relacionada à síntese e à degradação da hemoglobina na infecção pelo *M. leprae*, hipotetizando que este agente, por modular a expressão deste receptor, possa utilizá-lo para sua internalização e sobrevivência na célula hospedeira.

3 - Objetivos

Objetivo Geral:

Analisar a expressão de CD163 nas lesões cutâneas de pacientes com as formas polares da hanseníase e seu papel na modulação da infecção pelo *M. leprae*.

Objetivos Específicos:

- 1- Analisar a expressão de CD163 nas lesões cutâneas de pacientes com as formas polares da hanseníase, e correlacioná-la com a expressão de outros marcadores de macrófagos;
- 2- Correlacionar a expressão de CD163 e IDO nas lesões e em macrófagos isolados de lesão cutânea de pacientes lepromatosos;
- 3- Avaliar, em cultura, a cinética de expressão de CD163 e outros marcadores de macrófagos isolados de lesão cutânea de pacientes lepromatosos;
- 4- Correlacionar a expressão gênica de CD163, IDO e IL-10 nos macrófagos isolados das lesões cutâneas de pacientes lepromatosos;
- 5- Avaliar a expressão de CD163 em monócitos de indivíduos sadios na presença de *M. leprae* e de outros patógenos;
- 6- Verificar a expressão de CD163, IDO e CD209 em monócitos de indivíduos sadios, na presença de *M. leprae* irradiado e obtido de extratos de lesão;
- 7- Avaliar o papel da IL-10 na modulação do CD163 pelo *M. leprae*;
- 8- Analisar o papel do CD163 na internalização do *M. leprae*;
- 9- Correlacionar os níveis de heme, sCD163 e IL-10 no soro de indivíduos sadios e pacientes com as formas polares da hanseníase;
- 10- Correlacionar a presença de ferro e a de *M. leprae* nas lesões cutâneas de pacientes lepromatosos.

4 - Material e Métodos

4.1 - Biossegurança e Permissão Ética

As amostras biológicas (fragmentos das lesões de pele) dos pacientes com hanseníase (13 pacientes lepromatosos e 10 pacientes tuberculoides) foram coletadas no Ambulatório Souza Araújo (FIOCRUZ, Rio de Janeiro). Todas as amostras foram manipuladas de acordo com as normas preconizadas para a manipulação de material biológico.

A participação de cada indivíduo no estudo foi condicionada à assinatura de um termo de consentimento previamente aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da FIOCRUZ (Protocolo nº 509/09). Para a proteção e o bem estar dos indivíduos incluídos neste projeto, não foi divulgado o nome de qualquer dos participantes.

4.2 – Imuno-histoquímica

A identificação da expressão de alguns marcadores de macrófagos e células dendríticas nas lesões de pele dos pacientes com hanseníase (BT, n=6 e LL, n=10) foi determinada por meio da técnica de imunoperoxidase utilizando anticorpo policlonal anti-IDO humana (Santa Cruz Biotechnology, inc., Santa Cruz, CA, USA) e anticorpo monoclonal anti-CD163, anti-CD68, anti-HLA-DR, anti-CD206, anti-CD209 e anti-CD86 humana (R&D Systems, Minneapolis, USA). Os criocortes foram fixados em acetona, permeabilizados e bloqueados antes da incubação com o anticorpo monoclonal, numa diluição de 1:50 ou 1:25. Em seguida, as secções foram incubadas com anticorpo secundário biotilado. Os anticorpos foram visualizados com o sistema ABC (Vector Labs, Burlingame, CA, USA), que usa o conjugado avidina e biotina-biotina-peroxidase para a amplificação do sinal.

4.3 – Imunofluorescência in vivo

A identificação de células IDO⁺CD163⁺ foi realizada nas lesões de pele dos pacientes lepromatosos (LL, n=4) por meio de anticorpos monoclonais anti-IDO e anti-CD163 (Santa Cruz; R&D Systems). Os cortes congelados foram fixados em acetona, permeabilizados e bloqueados antes da incubação com o anticorpo monoclonal, numa diluição de 1:50. Em seguida, as secções foram incubadas com

anticorpo secundário Alexa Fluor 488[®] ou Alexa Fluor 568[®] (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). As marcações foram visualizadas através do Microscópio Confocal Zeiss LSM 510 e do microscópio de fluorescência Colibri Zeiss (Heidelberg, DEU, Alemanha).

4.4 - Detecção de CD163 por “Western Blotting”

Para verificar a expressão de CD163 em lesão de pele de pacientes, 30 cortes de 15 µm foram colocados em tampão de lise (Tris-HCl a 50 mM, pH 7,5, EDTA a 5 mM, EGTA a 10 mM, NaF a 50 mM, β-glicerofosfato a 20 mM, NaCl a 250 mM, Triton X-100 a 0,1 % e coquetel de inibidores protease (Calbiochem, Alemanha) e incubados por 30 minutos (min), a 4 °C. Ao término da incubação, os lisados celulares foram centrifugados a 18.300 xg, por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi recolhido para posterior dosagem de proteínas pelo método de Bradford (217).

As proteínas presentes nos lisados celulares foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE), como descrito por Laemmli (1970). Para isso, 30µg de proteína foram acrescentados ao tampão de amostra (Tris-HCl a 50mM em pH 8, DTT a 100mM, SDS a 2%, azul de bromofenol a 0,01% e glicerol a 10%) e desnaturados a 100°C, por 5 min. Após uma corrida eletroforética a 100V, em tampão contendo Tris a 25mM e glicina a 250mM, foi realizada a transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose (Amershan, NJ, USA), por corrente elétrica, em tampão específico (Tris a 25mM, glicina a 190mM e metanol a 20%), a 100 V por 1 hora (h).

Após a transferência, as interações inespecíficas foram bloqueadas com solução de Tris a 20mM, pH7,4, NaCl a 137mM e Tween a 0,1% (TBS-Tween) acrescido de BSA a 5%, por 1h. Para verificar a presença de CD163 e da tubulina, a membrana foi incubada com anticorpo monoclonal murino anti-CD163 humano, clone EDHu-1 (AbD Serotec, EUA) na diluição de 1:100, e anticorpo monoclonal murino anti-tubulina humana (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) na diluição de 1:10000, ambos em solução de TBS-Tween com 1% de BSA por 1h, a temperatura ambiente. Ao término da incubação, a membrana foi lavada três vezes com TBS-Tween, por 5min, e, então, incubada, por 1hora, com anticorpo secundário murino anti-IgG conjugado a peroxidase na diluição de 1:2000 (Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca) em TBS-Tween contendo 1% de leite desnatado. Finalmente, foram

realizadas 4 lavagens de 5 min com TBS-Tween. A visualização do resultado foi feita por quimioluminescência (ECL – Santa Cruz Biotechnology, EUA) e a densitometria das bandas resultantes foi realizada pelo programa Adobe Photoshop 7.0.1 (Adobe Systems Incorporated, USA).

4.5 - RT-PCR em tempo real

Para a realização do PCR, foi adicionado 1mL de Trizol às culturas de PBMC e o RNA extraído foi purificado utilizando clorofórmio e álcool isoamílico. O RNA foi precipitado por, pelo menos, 30 min a -70 °C em isopropanol onde, em seguida, foi lavado em etanol 70% e ressuspensão em água livre de RNase (água milliQ tratada com diethylpirocarbonato a 0,1%).

A síntese do cDNA foi realizada em microtubos contendo cerca de 1µg de RNA, aos quais foi adicionado 1µL de oligo dT (invitrogen, MN, USA), e o volume final da reação foi elevado para 10µL, com H₂O livre de RNase. O tubo foi, então, incubado por 10min a 65°C. Em seguida, foram adicionados 1µL de RNAzin (40 U/µL) (Applied Biosystems, CA, USA), 1 µL de dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 0,2mM cada; Applied Biosystems), 4µL do tampão de transcrição 5X (Tris HCl 250mM, KCl 375mM, MgCl₂ 15mM), 2µL de ditioneitol (DTT 0,1M), e 1µL Super Script II RNase H- (200U/µL). A reação foi realizada a uma temperatura de 42°C por 1h, e em seguida, o tubo foi aquecido a 90°C por 10min. O volume das amostras foi elevado para 80µL com água estéril e os tubos mantidos a -20°C até uso posterior. Foi utilizado o sistema Taqman de RT-PCR em tempo real com o ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems), para o monitoramento contínuo da fluorescência.

Para a reação de PCR, as amostras de cDNA foram utilizadas na quantidade de 50ng por reação, em um volume final de 25µL (já contendo o cDNA). Foram adicionados a cada poço (ABI Prism optical plates, Applied Biosystems) 12,5µL de 2X TaqMan Universal Master Mix (1X) [contendo AmpliTaq Gold 250U, AmpErase UNG, 10X Taqman Buffer A e dNTPs] e 1µL 20x ensaio TaqMan contendo iniciadores e sondas específicas para as moléculas de interesse (IDO, TNF α , IFN γ , IL-10 e GAPDH). O material foi, então, amplificado, em um total de quatro etapas: 1 ciclo a 50°C por 2 min, para a ativação da enzima AmpErase UNG, 1 ciclo a 95°C por 10min para a ativação da AmpliTaqGold DNA polimerase e 45 ciclos contendo

etapas de desnaturação a 95°C por 15 segundos, seguidos pelas etapas de, anelamento e a extensão a 60°C por 1 min.

A variação nos níveis de expressão dos genes de interesse foi calculada a partir da variação entre os valores de Ct deste gene e do GAPDH (gene endógeno) (ΔCt). Os valores de ΔCt foram calculados segundo a fórmula abaixo, de modo a gerar resultados que reflitam a expressão dos genes em relação à expressão do GAPDH: $\Delta Ct: (Ct \text{ gene de interesse} - Ct \text{ GAPDH}) =$ de posse dos valores de ΔCt , foram calculados os valores de $2^{-\Delta Ct}$, a fim de captar a noção exata de quantas vezes mais um transcrito está presente em relação ao outro. Os valores foram utilizados como expoente para a base 2, devido ao crescimento exponencial nas reações de PCR.

4.6 - Isolamento de Macrófagos de Lesão de Pele de Pacientes Lepromatosos

Após o diagnóstico do paciente com a forma lepromatosa da hanseníase, uma amostra da pele do mesmo foi biopsiada e, em seguida, o fragmento de pele foi colocado em RPMI 1640 (Gibco® - Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), em gelo úmido. Após um breve período, a derme e a epiderme foram separadas mecanicamente, com o auxílio de um bisturi, e a derme fragmentada em porções menores para facilitar a ação das enzimas na presença de uma solução de Dispase a 4mg/mL e Colagenase a 0,5mg/mL (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) e soro fetal bovino 10% (Hyclone, UT, USA) em RPMI 1640 (método adaptado de Moura e cols., 2007 – [59]). Em seguida, a solução com os fragmentos da derme foi colocada em uma cubeta de teflon, e mantida em estufa a 37°C com 5% de atmosfera de CO₂ “overnight”. Após este período, as células foram lavadas com RPMI 1640 por três vezes utilizando-se a centrifugação por 1500rpm (500 xg) durante 10 min, sob refrigeração, e todos os sobrenadante estocados para posterior obtenção de *M. leprae* (item 2.5). As células foram lavadas, ressuspensas em meio completo contendo SFB (10%), Penicilina e Estreptomicina (1%) em RPMI 1640, e foram contadas por exclusão em azul de tripan. Em seguida, foram distribuídas 5×10^5 células em 1 mL de meio completo em placas contendo 24 poços. As células foram mantidas em cultura pelo menos durante seis dias.

4.7 - Aquisição de *M. leprae* proveniente da lesão cutânea de pacientes lepromatosos

A partir dos sobrenadantes obtidos da suspensão de células da lesão de pele, os mesmos foram centrifugados a 14000 rpm (18300 xg) durante 15 min e lavados com PBS (Gibco® - Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) por duas vezes. Após este procedimento, o pellet de bactérias foi ressuspenso em 100µL de RPMI 1640 puro. Para contar o número de bactérias presentes, foram feitas três diluições seriadas (1:10, 1:100 e 1:1000). O número de bactérias foi determinado a partir da contagem de 20 campos no microscópio óptico, as bactérias foram fixadas em formol-leite e coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen (coloração estabelecida pelo azul – para “debris” celulares – azul de metileno, e pelo vermelho – para as bactérias álcool-ácido resistentes – dada pela fucsina). O número final de bactérias é calculado pelo número de bactérias multiplicado pelo fator de diluição e pela correção da objetiva. Após verificar a quantidade de bactérias, avaliamos a viabilidade destas pelo kit LIVE/DEAD® “BacLight™ Bacterial Viability Kits da Invitrogen (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), seguindo a metodologia sugerida pelo fabricante. As células vivas foram marcadas em verde e as mortas foram coradas em vermelho. Ao longo das dissociações, verificamos uma viabilidade média de 80% das bactérias originadas da pele dos pacientes com hanseníase.

4.8 - Marcação do *M. leprae* com fluoresceína

Para a marcação do *M. leprae*, foi utilizado o kit – PKH-26 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), e um fluorocromo vermelho dotado de uma excitação em 551nm e emissão em 567nm, características compatíveis com o sistema de detecção rodamina ou ficoeritrina.

4.9 - Imunofluorescência in vitro

Os macrófagos isolados da lesão foram aderidos às lamínulas (12mm) e fixados em PA 4% durante 10 min a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS/Triton-x100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, U.S.A.) a 0,01% e bloqueadas com uma solução de SFB 10% / BSA 1% por 40 min a temperatura ambiente. Após esse período, as células foram incubadas com o anticorpo primário de

interesse (anti-CD163, anti-LAM, anti-bactéria, anti-IDO) durante 2 h, a temperatura ambiente.

Em seguida, as células foram lavadas com a solução PBS / Triton-x 100 e, posteriormente, bloqueadas mais uma vez para realização da marcação do anticorpo secundário, seguindo o mesmo protocolo indicado inicialmente com o anticorpo primário. Juntamente com a marcação do anticorpo secundário, foi adicionado o DAPI numa diluição de 1:5000. Em seguida, foram lavadas com as soluções de PBS/Triton-x100, seguida de PBS e, por fim, água destilada. Após essas lavagens sequenciais, as lâminas foram montadas para visualização no microscópio Confocal de varredura a laser LSM 510 META (Zeiss).

4.10 - Coleta e Processamento de Sangue

Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram obtidas de capas leucoplaquetárias resultantes de processamento de bolsas de sangue ("Buffy coat"), cedidas pelo Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (UFRJ) ou de voluntários sadios. O sangue periférico coletado em tubos heparinizados foi diluído 1:1 em PBS (Gibco® - Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) para separação das células por gradiente de densidade em Ficoll Hypaque. Após centrifugação a 2000 rpm (900 xg), por 30 min, a temperatura ambiente, as células mononucleares foram lavadas duas vezes com PBS (1500 rpm ou 500 xg, por 10 min, a 4°C) e ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, L-glutamina a 2mM, penicilina a 100U/mL e estreptomicina a 100µg/mL (Gibco® - Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA). Uma alíquota desta suspensão celular foi diluída em azul de Tripán (1:10) e avaliada em câmara de Neubauer, para a estimativa da concentração de células viáveis.

4.11 - Cultura de Monócitos por Aderência

Após a determinação do número de células em cultura, elas foram distribuídas em placa de cultura de 24 poços na concentração de 2×10^6 /mL em meio completo. Após duas horas, o sobrenadante foi desprezado, juntamente com algumas células não-aderentes, e os poços que continham células foram lavados com PBS a 37°C. Em seguida, foi adicionado a cada poço 1mL de meio completo a temperatura de 37°C, e a cada um dos poços foram adicionados ou não estímulos,

como citocalasina B (1 μ M; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), bactérias (*M. leprae* originado de lesão cutânea do paciente lepromatoso ou gentilmente cedido pela Dra. Cristina Pessolani do Laboratório de Microbiologia Celular; *E. coli* e BCG, também cedidos pela Dra. Cristina Pessolani), anti-IL-10 (α -IL-10) e isotipo (BD PharMingen, San Diego, CA), hemoglobina (Hb) (1:100), gentilmente cedida pelo Dr. Flávio Lara e anti-CD163 (α -CD163) e isotipo (Santa Cruz Biotechnology, inc., Santa Cruz, CA, USA). Após 24h, as células foram soltas da placa com uma solução de PBS/EDTA 0,05mM para a realização da citometria de fluxo.

4.12 – Bloqueio da IL-10 em monócitos

O bloqueio da IL-10 em monócitos foi realizado a partir de 1 μ g/mL do anticorpo anti- IL-10 humana feito em rato (BD PharMingen, San Diego, USA), 30 minutos antes do estímulo com *M. leprae*. Para controle da técnica, utilizou-se o isotipo IgG1 de rato.

4.13 – Bloqueio de CD163 em monócitos de cultura

Para realizar o bloqueio de CD163 em monócitos, foram utilizados 20 μ g/mL do anticorpo RM3/1 CD163 (20 μ g/mL), assim como o isotipo controle IgG1 (Santa Cruz Biotechnology, inc., Santa Cruz, CA, USA). Para a realização deste ensaio, as células foram colocadas inicialmente em contato com o anticorpo, 30 minutos antes da infecção pelo *M. leprae*.

4.14 - Citometria de Fluxo

Para a análise fenotípica dos macrófagos e monócitos em cultura, foi feita a análise por citometria de fluxo do percentual de células positivas para CD14, HLA-DR, CD86, CD163, CD209 e CD206 (R&D Systems®, Mineapolis, MN, EUA). A análise foi realizada no citômetro Cyan (Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca) utilizando o programa Summit v4.3 (Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca).

As células foram ressuspensas dos poços com uma solução de PBS-EDTA (500 μ M) e transferidas para uma placa de 96 poços fundo “U” (Becton & Dickinson, Lincoln Park, NJ, EUA) no volume de 100 μ L. Em seguida, a placa foi centrifugada (15 xg - por 10 min, 4°C) e o sobrenadante foi desprezado. As células ressuspensas em

49 μ L de tampão para FACS (PBS, soro bovino fetal 1%, azida sódica 0,1%). Posteriormente, as células foram bloqueadas com solução de bloqueio (de soro fetal bovino 2%, soro normal de cabra em PBS 3%).

Para a marcação das células foram utilizados anticorpos de superfície, através da adição de 1 μ L/amostra de anticorpos monoclonais (CD86 – anti-IgG2b, CD14 – anti-IgG2a, CD163 – anti-IgG1, CD209 – anti-IgG2b e CD206 - anti-IgG1) diretamente marcados com um fluorocromo FITC, APC e PE. As células foram incubadas a 4 $^{\circ}$ C, durante 20 a 30 min e, após este período, as células foram lavadas uma vez, em solução tampão para citometria e, em seguida, fixadas com 100 μ L de PA a 4%. Após estes procedimentos, as células foram transferidas para tubos específicos e analisadas no aparelho Cyan mediante a utilização do programa Summit v4.3 (Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca).

4.15 – Dosagem de Heme pelo Método de Derivado Alcalino de Piridina

A dosagem de heme foi realizada a partir de concentrações conhecidas de heme padrão (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, EUA) ou dos soros de pacientes e indivíduos saudáveis, que foram solubilizadas em piridina alcalina - Piridina 24% em NaOH 0,1N – (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) realizada em capela. A cada 400 μ L da solução de piridina, foram adicionados 100 μ L de amostra. Em seguida, o heme foi lido como hemicromo de piridina no espectrofotômetro 920 (GBC Scientific Equipment, Hampshire IL, EUA). O espectro de absorção de heme possui 4 picos, a banda de solet (400-410 nm), alfa (540 nm), beta (580 nm) e gama (660 nm). Essas bandas são medidas com a solução inicial (oxidada) e, após a leitura na mesma cubeta, adicionamos 100 μ g de ditionito de sódio (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), como agente redutor. Por meio da redução do heme, evidenciamos seus picos. Foi realizada, então, uma dedução do espectro de absorção oxidado, usando como referência o espectro reduzido (190). Estimamos a concentração de heme comparando a intensidade de absorção de luz da banda alfa das amostras e da curva-padrão.

4.16 – Coloração Perls-Azul da Prússia

Para evidenciar as deposições de ferro nas lesões de pele de pacientes com hanseníase, a coloração Perls-Azul da Prússia foi realizada. Os cortes dos

fragmentos de pele dos pacientes com hanseníase que foram processados para inclusão em parafina foram desparafinizados, com dois banhos de 5 min em Xilol P.A. Os cortes (5 μ m) foram, então, hidratados, passando por banhos sequenciais de 2 min, em concentrações decrescentes de etanol (um banho em etanol 100% até 50%), seguidos de um banho em água destilada.

Ao término da hidratação, os cortes foram imersos em uma solução de ferrocianeto de potássio por 30 min a 60°C e, em seguida, lavados com água destilada. Posteriormente, receberam banho de safranina O a 2% em ácido acético 1% durante 2 min.

Após a contracoloração, os cortes foram lavados em ácido acético 1%, desidratados em banhos rápidos com álcool 95% e 100%. Os cortes foram clarificados com três banhos de 3 min em Xilol P.A. e montados entre lâmina e lamínula com Entelan[®] (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha).

4.17 – ELISA

Com o objetivo de avaliar a secreção dos níveis de CD163 solúvel (sCD163) no soro de controles saudáveis, de pacientes do polo lepromatoso e tuberculoide da hanseníase, e de TNF, TGF β , IL-10 e IL12p70 no sobrenadante de cultura de monócitos de controles saudáveis estimulados com *M. leprae*, foi realizada a técnica de ELISA (R&D Systems ou Cayman Chemical, Michigan, EUA), de acordo com as instruções dos fabricantes.

4.18 - Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média \pm erro- padrão (SEM). As diferenças significativas entre os grupos foram determinadas com base nos testes Mann-Whitney ou Kruskal Wallis. Os valores com $p \leq 0,05$ foram considerados significativos. A análise foi feita usando GraphPad Prism versão 3.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

5 - Resultados

5.1- Expressão de marcadores em lesões de pele de pacientes com hanseníase

Para investigar o fenótipo das células presentes na lesão de pele dos pacientes com hanseníase, alguns marcadores de superfície celular (CD68, CD86, HLA-DR, CD206, CD209), bem como a expressão de CD163 e IDO intracelular, foram estudados, em pacientes tuberculoides (BT, n=6) e lepromatosos (LL, n=10), por meio das técnicas de imunoperoxidase e imunofluorescência.

Nos fragmentos de pele da lesão de pacientes BT, foi observada a presença de um granuloma bem característico, constituído de células epitelioides, com linfócitos ao redor do granuloma. As lesões dos pacientes LL apresentavam um infiltrado de macrófagos e linfócitos dispersos separados da epiderme pela zona clara (dados não mostrados). No intuito de caracterizar o fenótipo das células presentes nestas lesões, foram realizadas marcações para CD68, CD86, HLA-DR, CD209 e CD206 (Figura 5.1.1). Nas lesões de pacientes BT, foram observadas menos de 50% de células expressando CD68⁺, CD86⁺, CD209⁺ e CD206⁺ distribuídas principalmente no centro do granuloma, rodeadas por um manto de linfócitos (Figura 5.1.1A, C, E, G e I, respectivamente). No entanto, quase todas as células (>70%) do infiltrado inflamatório dérmico presente nas lesões dos pacientes LL que foram CD68⁺ (Figura 1B) também se mostraram positivas para CD86, HLA-DR, CD209 e CD206 (Figura 5.1.1D, F, H e J, respectivamente).

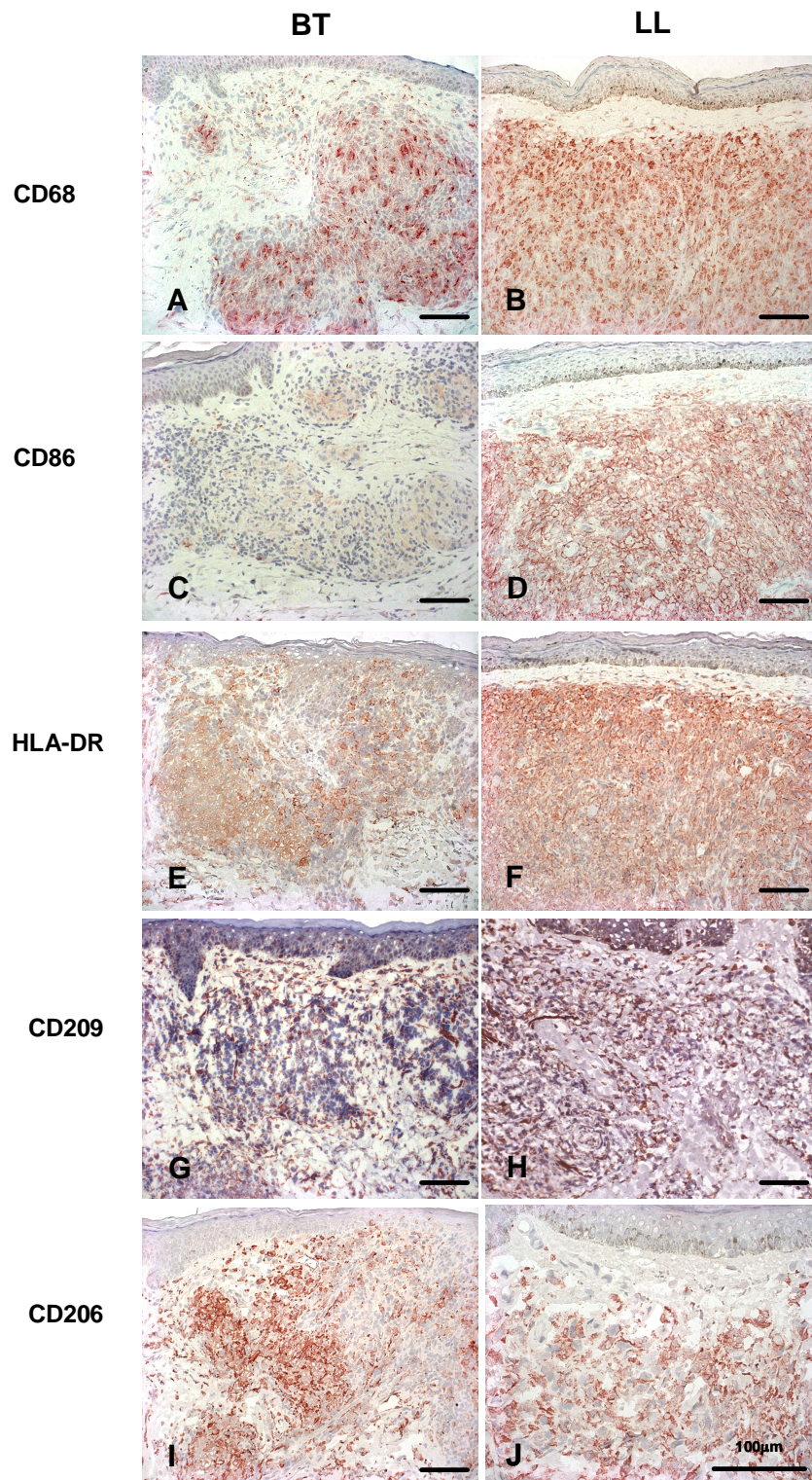


Figura 5.1.1 - Expressão de marcadores celulares nas lesões de pele de pacientes com hanseníase. As imagens da primeira coluna representam a distribuição dos marcadores CD68 (A), CD86 (C), HLADR (E), CD209 (G) e CD206 (I) nas lesões de pele de pacientes tuberculoides (BT), enquanto que as da segunda coluna representam a distribuição dos marcadores CD68 (B), CD86 (D), HLADR (F), CD209 (H) e CD206 (J) nas lesões de pele de pacientes lepromatosos (LL). Na lesão dos pacientes BT, foram observadas muitas células CD68⁺, CD86⁺, CD209⁺ e CD206⁺ distribuídas principalmente no centro do granuloma, rodeadas por um manto de linfócitos. Quase todas as células presentes no infiltrado inflamatório dérmico dos pacientes LL que foram CD68⁺ também se mostraram positivas para CD86, HLA-DR, CD209 e CD206. Fotomicrografias representativas de 6 pacientes BT e 10 pacientes LL. Método de imunoperoxidase e contraste com hematoxilina (barras = 100µm).

Investigamos também a expressão de CD163 e IDO por imunoperoxidase em lesões de pele de pacientes BT e LL (Figura 5.1.2). O número de células CD163⁺ e IDO⁺ foi maior nas lesões de pacientes LL (>50%), em comparação àquele encontrado em cortes de pele de pacientes BT (<5%; Figura 5.1.2), onde foram identificadas poucas células CD163⁺ e IDO⁺ no granuloma dérmico (Figura 5.1.2). Nos pacientes LL, a maioria das células presentes no infiltrado celular eram CD163⁺IDO⁺ (Figura 5.1.2).

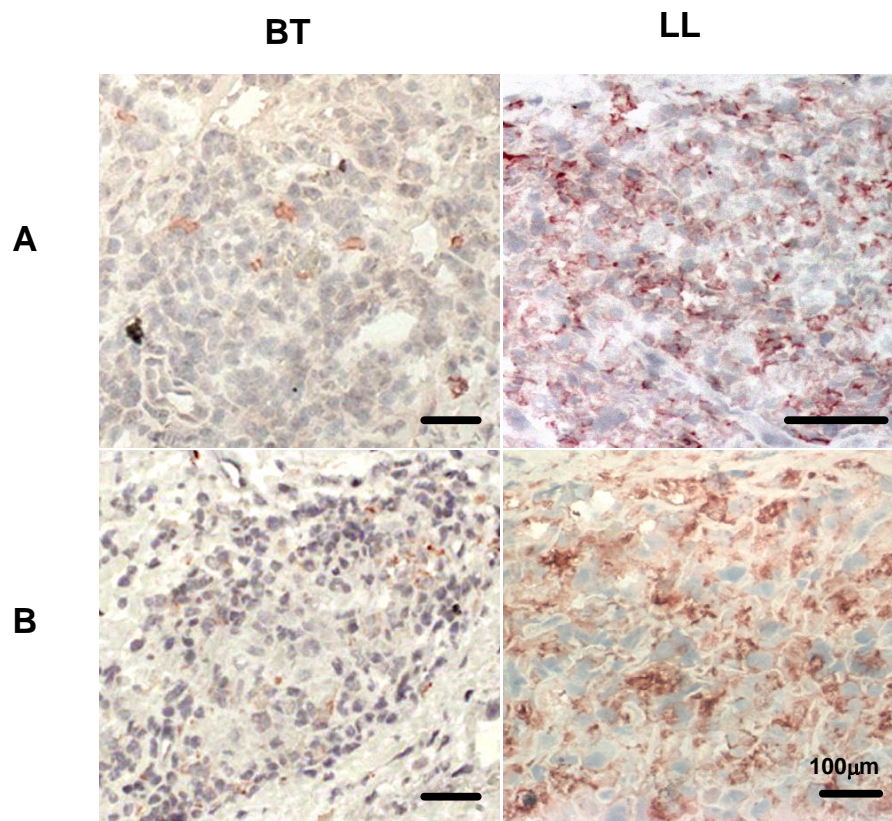


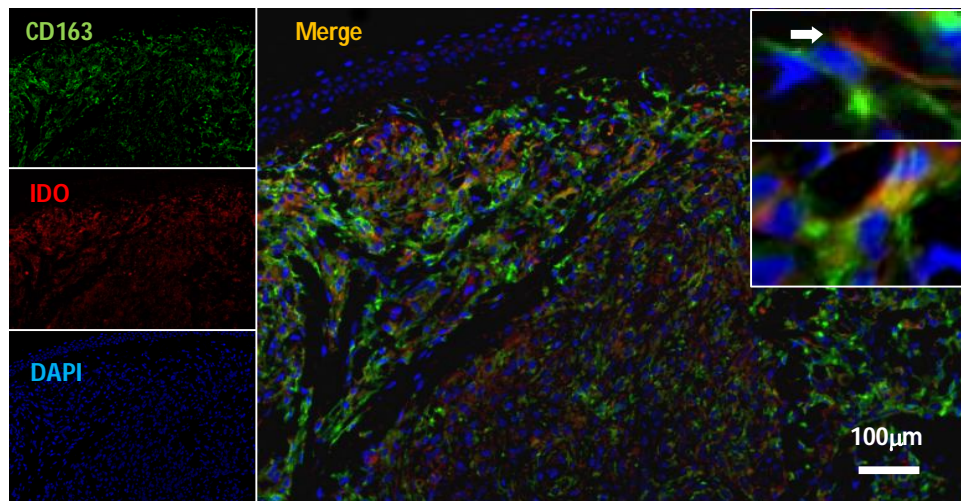
Figura 5.1.2 – Expressão de CD163 e IDO nas lesões de pele de pacientes com hanseníase. Cortes congelados de lesões de pele de pacientes tuberculoides (BT) e lepromatosos (LL), marcados para CD163 (A) e IDO (B) pelo método de imunoperoxidase contrastada com hematoxilina. Nas lesões dos pacientes BT, observamos uma menor quantidade de células CD163⁺ e IDO⁺, localizadas principalmente no centro dos granulomas, quando comparadas com as lesões de pele de pacientes LL, nos quais verificamos uma grande concentração de células positivas para CD163 e IDO em todo infiltrado inflamatório dérmico. As fotomicrografias são representativas de 6 pacientes BT e 10 pacientes LL. Barras = 100 µm.

Pela técnica de imunofluorescência confirmamos a colocalização de CD163 e IDO nas lesões de pele dos pacientes lepromatosos, local onde observamos uma maior concentração dessas células. Os resultados mostraram que cerca de 40% das

células presentes no infiltrado inflamatório dérmico são CD163⁺IDO⁺ (Figura 5.1.3A). Vale ressaltar que a expressão de CD163 e IDO pode ser evidenciada no citoplasma, mas nem sempre aparece colocalizada no interior da célula (detalhes da Figura 5.1.3A).

Dados recentes do nosso laboratório mostraram que a expressão proteica de IDO estava aumentada em lesões de pacientes LL (54). Com o intuito de avaliar se o perfil da expressão de CD163 era similar à expressão de IDO, realizamos a técnica de Western Blot para CD163, e confirmamos também a alta expressão desse marcador na pele de pacientes lepromatosos, em comparação com as lesões de pacientes tuberculoides (Figura 5.1.3B).

A



B

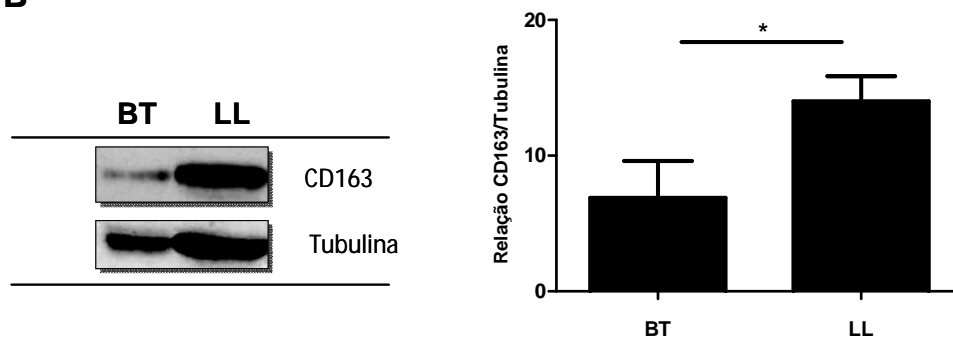


Figura 5.1.3 – Expressão de CD163 e IDO na pele de pacientes lepromatosos. Em A, por imunofluorescência, evidenciamos a expressão de CD163 e IDO nas lesões de pacientes lepromatosos, mostrando que existem células CD163⁺IDO⁺, embora nem sempre tenhamos verificado a presença de ambos os marcadores na mesma região (detalhe em A indicado pela seta branca). As imagens foram observadas e obtidas por microscópio de fluorescência Colibri (Zeiss). A imagem mostrada representa 4 pacientes lepromatosos. Marcação de IDO em vermelho (Alexa Fluor 568) e marcação de CD163 em verde (Alexa Fluor 488). Os núcleos foram marcados com DAPI (em azul). Escala da barra: 100µm. Em B, por Western Blotting, foi avaliada a expressão proteica de CD163, e verificamos o aumento da expressão de CD163 em pacientes lepromatosos em comparação com os pacientes tuberculoides. Foram avaliados extratos de lesão cutânea de 4 pacientes LL e 4 pacientes BT, e as bandas representativas foram apresentadas. A análise densitométrica das bandas foi feita, e mostra a relação CD163/Tubulina. A análise estatística foi feita, utilizando-se o teste Mann Whitney (*) para o valor $p < 0,05$.

5.2 - Expressão gênica de CD163, IDO e IL-10 em lesões cutâneas da hanseníase

Após ter sido observado um grande número de células positivas para CD163 e IDO nas lesões dos pacientes lepromatosos, fomos investigar se a expressão gênica de CD163, IDO, assim como de IL-10, estaria sendo regulada positivamente nos pacientes lepromatosos (n=5), em comparação com os pacientes tuberculoides (n=5). Para proceder à análise da expressão gênica das lesões, foi realizado o PCR em tempo real.

Na figura 5.2.1, a expressão de CD163 e IL-10 está significativamente aumentada ($p < 0,05$) em biópsias de pacientes lepromatosos, em comparação com os tuberculoides. Em relação à expressão de IDO, observamos um aumento similar àquele verificado na expressão de IL-10, embora os dados não tenham sido estatisticamente significativos.

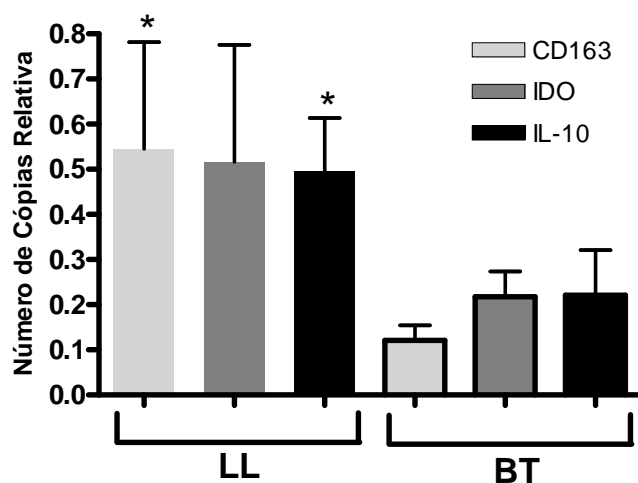


Figura 5.2.1 – Expressão gênica de CD163, IDO e IL-10 nas lesões cutâneas de pacientes com hanseníase. A expressão de RNAm foi obtida por PCR em tempo real. Na análise, foram estudados pacientes LL (n=5) e BT (n= 5). A análise estatística foi feita com o uso de Kruskal-Wallis e do pós-teste Dunn (*) para o valor $p < 0,05$.

5.3 - Macrófagos isolados da lesão de pele são $CD68^+$ e $CD163^+/IDO^+$

Os pacientes tuberculoides, por possuírem um pequeno granuloma contendo células epitelioides circundadas por linfócitos, tornam o processo de isolamento de macrófagos mais difícil. Porém, no perfil da lesão lepromatosa, o denso infiltrado inflamatório constituído, em sua maioria, por macrófagos “espumosos” facilita o isolamento das células da lesão. A partir do perfil fenotípico determinado pela imunoperoxidase em lesões de pacientes lepromatosos, fomos avaliar as características das células isoladas do infiltrado inflamatório (*ex vivo*). Observamos que as células obtidas da lesão de pacientes lepromatosos eram $CD68^+$ no 6º dia de cultura pela técnica da imunofluorescência celular (Figura 5.3.1).

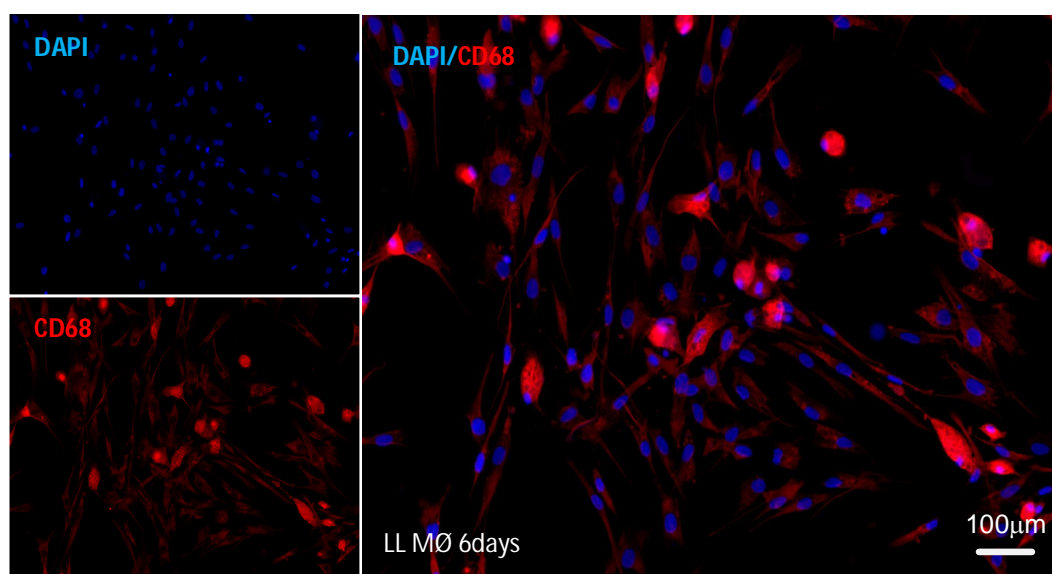


Figura 5.3.1 – Macrófagos $CD68^+$ no 6º dia em cultura. No 6º dia de cultura, os macrófagos foram marcados utilizando-se Alexa Fluor 633® (vermelho) e o núcleo corado com DAPI (azul). Imagem representando um único experimento. As imagens foram observadas e obtidas por microscópio de fluorescência Colibri (Zeiss). Escala da barra: 100µm.

Ainda no 6º dia de cultura de macrófagos isolados da pele de pacientes lepromatosos, fomos avaliar, a partir da imunofluorescência, a expressão de CD163 e IDO (Figura 5.3.2). Verificamos que cerca de 40% das células IDO^+ expressavam CD163. No inserto da Figura 6, verificamos que a expressão de CD163 e IDO está localizada no citoplasma, porém observamos que elas nem sempre se colocalizam.

Estes dados corroboram os achados da imunofluorescência da lesão cutânea de pacientes lepromatosos, onde as células eram positivas para ambos os marcadores, em um grande número de células.

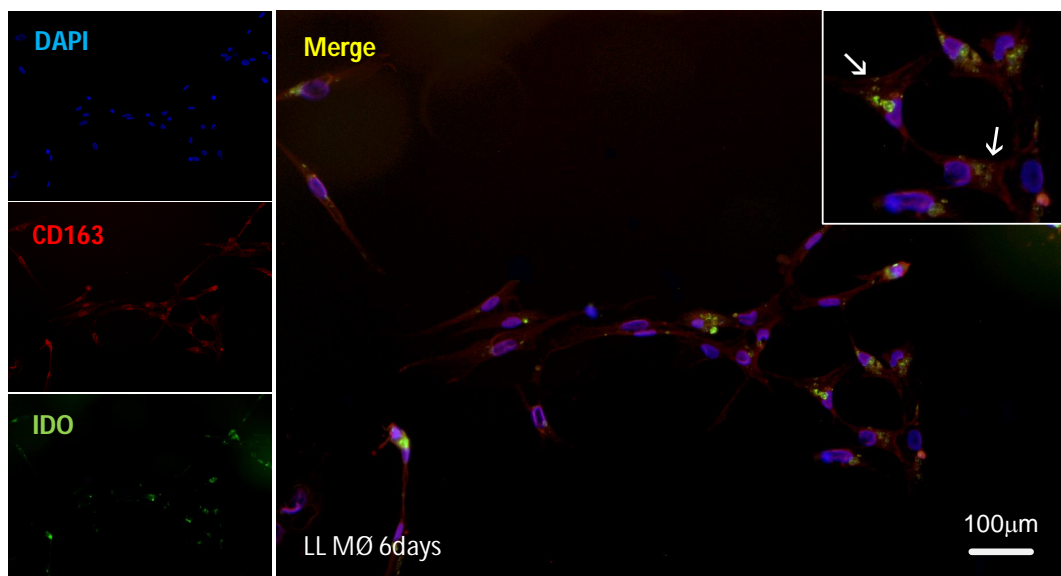


Figura 5.3.2 – Coexpressão de CD163 e IDO em macrófagos da lesão de pele de pacientes lepromatosos. No 6º dia de cultura, os macrófagos foram marcados utilizando-se Alexa Fluor 633® (vermelho) para CD163, Alexa Fluor 532® (verde) para IDO e o núcleo com DAPI (azul). Alguns macrófagos coexpressam CD163 e IDO no citoplasma (setas brancas). Imagem representativa de 3 experimentos. As imagens foram observadas e obtidas por microscópio de fluorescência Colibri (Zeiss). Escala da barra: 100µm.

5.4 - Macrófagos de lesão cutânea de pacientes lepromatosos têm expressão reduzida de marcadores

A partir dos dados obtidos pela imunofluorescência, fomos investigar a forma como a célula se comportava em cultura, por meio da avaliação de alguns marcadores de superfície dos macrófagos. Para investigar a expressão desses marcadores de superfície nas células isoladas da lesão cutânea dos pacientes lepromatosos, foi realizada a técnica citometria de fluxo.

Verificamos que, durante o período de cultura, houve uma redução da expressão dos marcadores CD86 ($22,12 \pm 0,33$ no 1º dia de cultura e no 6º dia $10,29 \pm 1,04$), HLA-DR ($32,05 \pm 0,94$ no 1º em relação ao 6º, $5,3 \pm 0,85$), CD14 ($63,35 \pm 0,44$ no 1º dia e no 6º, $8,88 \pm 0,36$), CD163 ($20,01 \pm 0,17$ no 1º em relação ao 6º, $4,80 \pm 0,66$) e CD209 ($50,22 \pm 0,66$ no 1º dia e no 6º, $2,13 \pm 0,93$; Figura 5.4.1A, B,

C, E e F, respectivamente), sem diferenças estatísticas. Observamos ainda, pouca alteração em relação à expressão de CD206 ($2,66 \pm 0,17$ no 1º dia e no 6º, $2,88 \pm 0,51$; Figura 5.4.1D), sem diferença estatística.

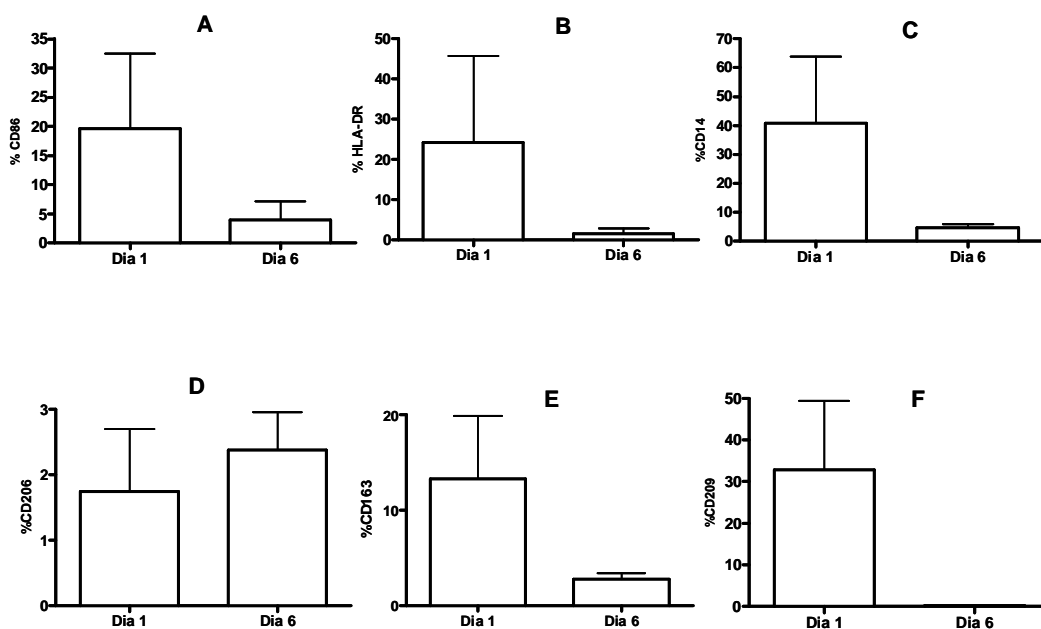


Figura 5.4.1 – Expressão de marcadores de superfície em macrófagos isolados da lesão de pele de pacientes lepromatosos. Por citometria de fluxo, foi detectado o percentual de células positivas durante o período de cultura (1º ao 6º dia). Em A, CD86 (Dia 1 – n=5 - Dia 6 – n=3); B, HLA-DR (Dia 1 – n=5 - Dia 6 – n=3); C, CD14 (Dia 1 – n=6 - Dia 6 – n=3); D, CD206 (Dia 1 – n=6 - Dia 6 – n=3); E, CD163 (Dia 1 – n=6 - Dia 6 – n=3) e F, CD209 (Dia 1 – n=4 - Dia 6 – n=3).

5.5 - Macrófagos de pele em cultura liberam *M. leprae*

Conforme observado anteriormente, a expressão de marcadores de superfície nos macrófagos isolados da pele foi reduzida ao longo do período de cultura. Esse perfil de redução de expressão de marcadores pode estar relacionado à fixação das células à cultura. A partir do sobrenadante das culturas, pela contagem de bacilos pelo método AFB, observou-se o aumento (do 1º para o 3º dia de cultura) de *M. leprae* (bactéria/mL) nos sobrenadantes das culturas de macrófagos (Figura 5.5.1).

Apesar da liberação de bactérias no sobrenadante das culturas, o percentual de morte celular do 1º para o 3º dia de cultura foi de, aproximadamente, 4% (dados não mostrados). Esses dados sugerem que a perda do *M. leprae* não parece estar

relacionada à morte celular, mas sim à alteração do perfil imunológico dessas células em cultura.

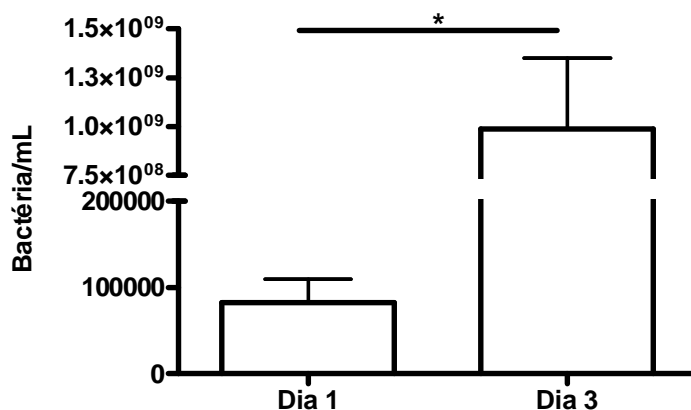


Figura 5.5.1 – Contagem de *M. leprae* no sobrenadante de cultura de macrófagos isolados de lesões de pele de pacientes lepromatosos. Pelo método AFB, foi obtida a contagem de bactérias álcool-ácido resistentes. No dia 1, n=4 e no dia 3, n=4. A análise estatística foi feita utilizando-se o teste Mann Whitney (*) para o valor $p < 0,05$.

5.6 - Análise da expressão gênica de CD163, IDO e IL-10 em macrófagos isolados da pele

Para investigar a expressão gênica de CD163, IL-10 e IDO em macrófagos isolados da lesão cutânea de pacientes lepromatosos, foi realizado o PCR em tempo real. Observamos uma redução da expressão de CD163 do 1º dia de cultura (média do número de cópias relativas: $0,13 \pm 0,014$), quando comparada com ao 6º dia, $0,04 \pm 0,005$; Figura 5.6.1A). Dados da literatura mostram que pacientes lepromatosos expressam altos níveis de moléculas anti-inflamatórias, como a IL-10, por exemplo. A partir destes dados, fomos avaliar a expressão gênica desta citocina. Houve uma redução dos níveis de IL-10 no 1º dia, ($0,113 \pm 0,035$), em comparação ao 6º ($0,04 \pm 0,007$; $p < 0,05$; Figura 5.6.1B). Além da detecção de IDO nas culturas de macrófago, também foi avaliado se o inibidor de IDO, o 1MT, produziria algum efeito sobre os macrófagos em cultura. No 1º dia de cultura, observamos altos níveis de IDO nestas células ($0,41 \pm 0,001$); porém, com o acréscimo do 1MT, estes níveis foram reduzidos ($0,058 \pm 0,002$; $p < 0,05$). No 3º dia de cultura, os níveis deste gene estavam mais reduzidos ($0,01 \pm 0,004$) em relação àqueles encontrados no 1º dia ($p < 0,001$; Figura 5.6.1C).

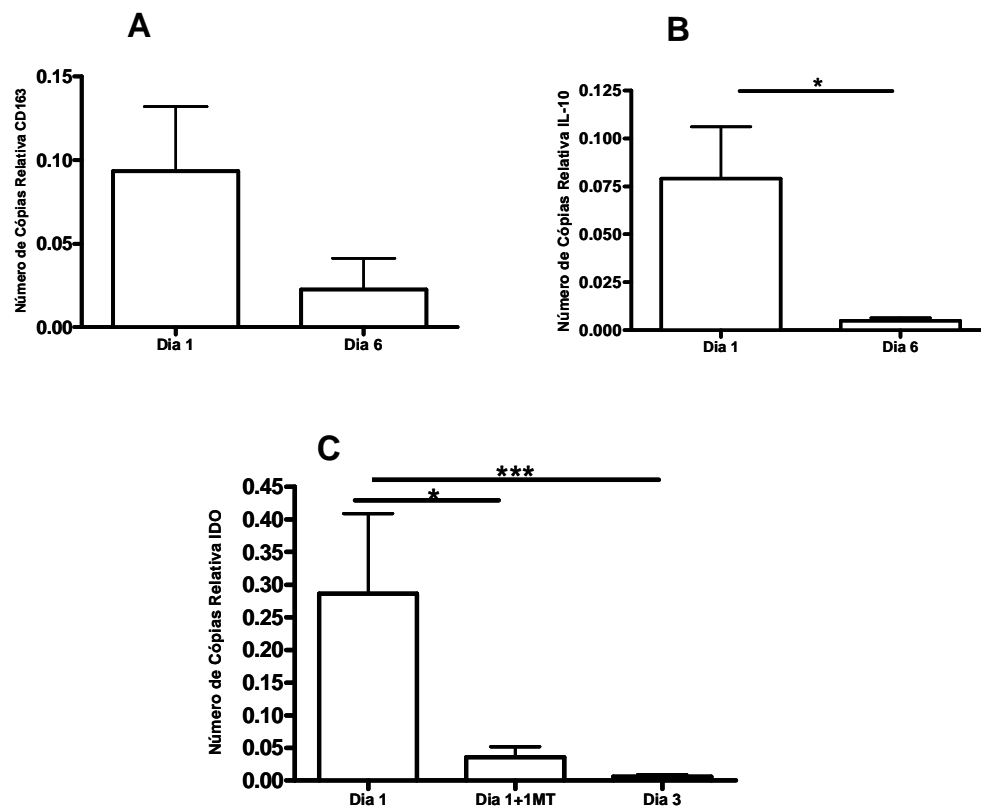


Figura 5.6.1 – Expressão gênica de CD163, IL-10 e IDO de macrófagos isolados de pele durante o período de cultura. Por PCR em tempo real, foi verificada a expressão gênica de CD163 – dia 1, n=7 e dia 6, n=5 (A). IL-10 – dia 1, n=8; dia 6, n=5 - (B) e IDO – dia1, n=7; dia 1+1MT, n=6; dia3, n=5 (C). Foram realizados o teste Mann-Whitney e Kruskal Wallis, juntamente com o pós-teste de Dunn * ($p < 0,05$), *** ($p < 0,001$).

5.7 - Expressão de CD163 em monócitos estimulados com *M. leprae* e outras bactérias

Dados da literatura já mostraram que CD163 pode ser induzido por *E. coli* e *S. mutans* (200). Quando os monócitos foram estimulados com *M. leprae*, houve um aumento na expressão de CD163, quando comparado com as outras bactérias, *E. coli* e BCG (Figura 5.7.1).

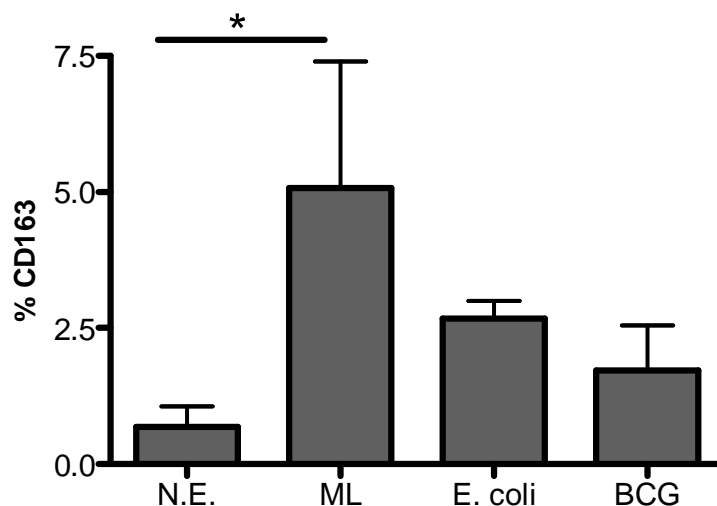


Figura 5.7.1 – *M. leprae* induz mais CD163 quando comparado às outras bactérias. Monócitos de indivíduos saudáveis foram colocados em cultura durante 24h, na presença do ML (n=4), *E. coli* (n=4) ou BCG (n=4), vivos, ou ainda sem estímulo. O MOI utilizado foi de 5:1. O teste estatístico utilizado foi Kruskal-Wallis, e o pós-teste de Dunn. (*) tem o valor $p < 0,05$.

5.8 - Análise da expressão de CD163, IDO e CD209 em monócitos estimulados com *M. leprae* em diferentes MOI

Com o objetivo de investigar a expressão de CD163, IDO e CD209 em monócitos de indivíduos sadios, as células isoladas foram infectadas com *M. leprae* vivo (MLV) e também foram estimuladas com *M. leprae* morto (MLM) durante 24h. A infecção foi realizada utilizando-se diferentes multiplicidades de infecção (MOI), como 2,5; 5 e 10 bactérias por célula (Figura 5.8.1).

Os resultados mostraram que não houve diferença estatística na infecção pelo ML morto ou vivo, apesar dos diferentes MOIs, embora concentrações maiores de bactérias tenham promovido uma expressão mais alta de CD163, IDO e CD209 nestes monócitos (Figura 5.8.1A e 5.8.1B). Embora o ML, tanto morto quanto vivo, induza CD163, o percentual de células positivas para CD163/ML vivo foi maior quando comparado com ML morto (figura 5.8.1C). Os monócitos em cultura, estimulados com ML morto, secretaram mais TNF, TGF- β e IL-10 quando comparados às células não-estimuladas (N.E.). Em relação à secreção de IL-12p70, não houve alteração nos dois grupos de indivíduos (N.E. e células estimuladas pelo ML; Figura 5.8.1D).

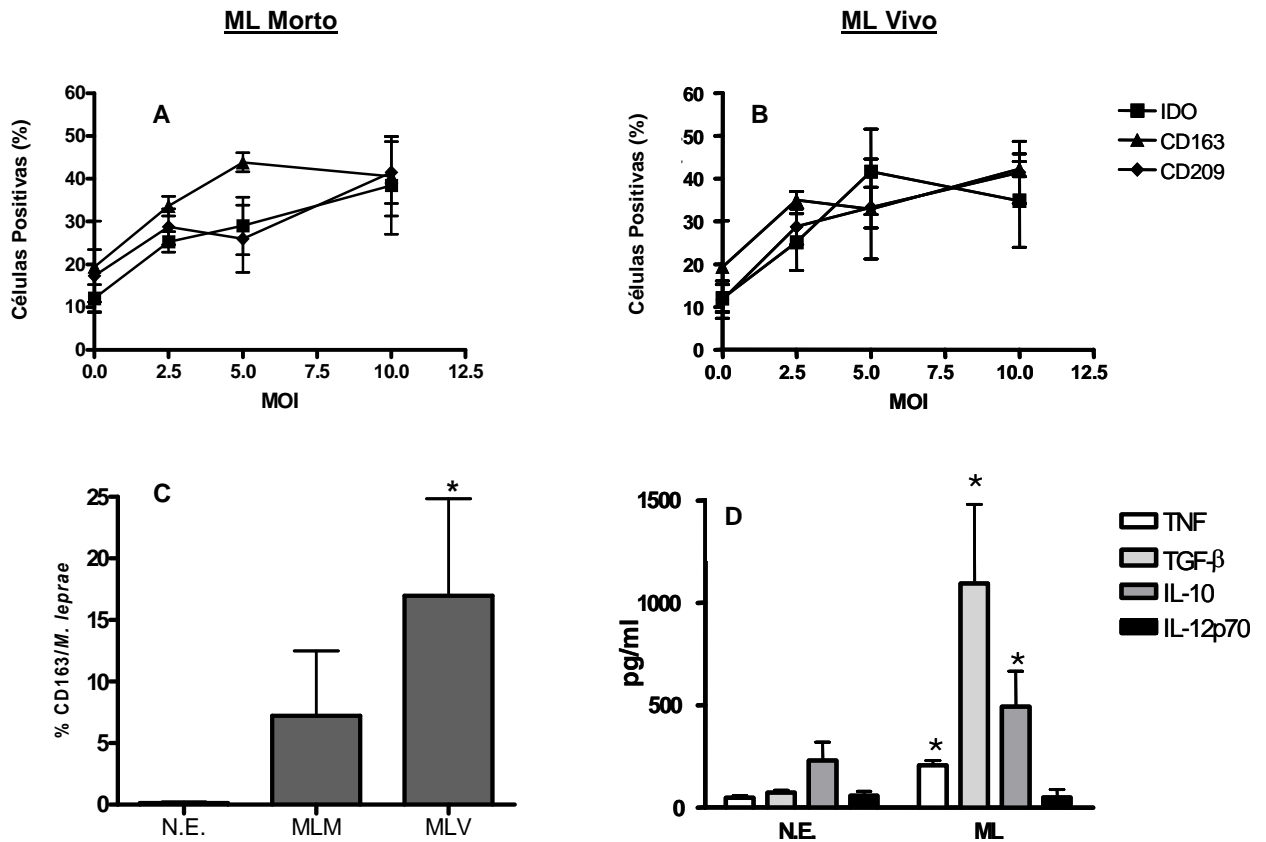


Figura 5.8.1 - ML induz a expressão e a secreção de moléculas. Após 24h de cultura de monócitos de indivíduos controle, as células foram infectadas com diferentes MOI (2,5; 5 e 10) de *M. leprae* por célula. O percentual de células positivas para a infecção com ML morto (A), ou ML vivo (B), foi demonstrado como média \pm SEM (n=5). Em C, foram mostrados os percentuais de células CD163/*M. leprae* positivas (N.E. – n=3, MLM – n=3 e MLV – n=3) e, em D, a secreção de citocinas cultura de células infectadas com ML morto (MOI- 10). Os resultados foram expressos como média \pm SEM de 5 experimentos em duplicata. Os testes estatísticos utilizados foram Kruskal Wallis e o pós-teste de Dunn. (*) para o valor $p < 0,05$.

5.9 - A análise da expressão de CD163 no bloqueio da fagocitose do *M. leprae*

Para avaliar a expressão de CD163 em monócitos de indivíduos-sadios tratados com citocalasina B (Cit-B), após 30 minutos as células foram infectadas com *M. leprae* durante 24h. Os monócitos foram retirados dos poços e a expressão de CD163 foi avaliada por citometria de fluxo. O percentual de células CD163 positivas foi significativamente reduzido em monócitos tratados com Cit-B infectados com *M. leprae*, em relação às células apenas infectadas com *M. leprae*. A partir destes dados, observa-se que a expressão de CD163 também é dependente da fagocitose do *M. leprae* (Figura 5.9.1).

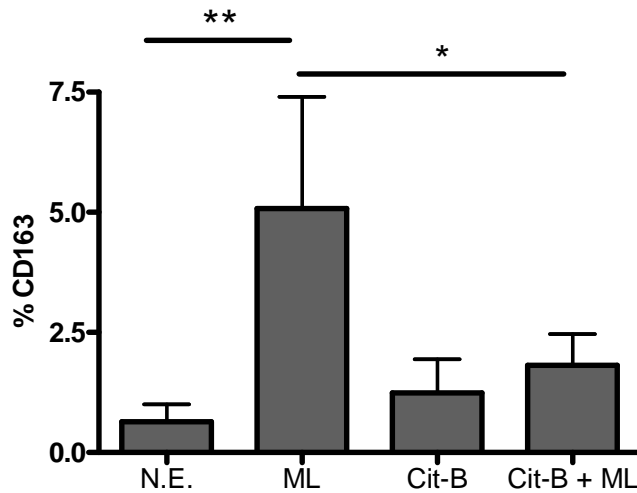


Figura 5.9.1 – O bloqueio da fagocitose reduz a expressão de CD163. Monócitos de indivíduos-saudáveis foram infectados com ML (5:1) e/ou na presença de citocalasina B (Cit-B) (N.E. – n=8, ML – n=4, Cit-B – n=3 e Cit-B+ML – n=3). Os dados foram obtidos a partir da citometria de fluxo. Para este experimento foram realizados o teste estatístico Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn. (**) para o valor de $p < 0,01$ e (*) para o valor de $p < 0,05$.

5.10 - O efeito do bloqueio do CD163 e a influência da hemoglobina sobre a associação monócito-*M. leprae*

Considerando que, por meio do bloqueio da fagocitose, a expressão de CD163 é reduzida, fomos investigar se bloqueio do CD163 poderia influenciar na captura do *M. leprae* pelos monócitos de indivíduos saudáveis. Pela presença do anticorpo anti-CD163 (α -CD163), 30 minutos antes da infecção, os monócitos de indivíduos-sadios foram estimulados com *M. leprae*. Após 24h de cultura, os monócitos foram retirados da cultura e, em seguida, foi realizada uma citometria de fluxo. O percentual de associação do *M. leprae* com o monócito foi significativamente reduzido ($p < 0,05$), quando da adição de α -CD163 à cultura (Figura 5.10.1A). Porém, nas células estimuladas com *M. leprae*, assim como em presença do isotipo controle (IgG1), a expressão de CD163 estava aumentada.

Como o CD163 parece ser uma das vias de entrada do *M. leprae* no monócito e considerando-se que, além disso, é atribuída a este receptor a captação de hemoglobina (Hb) circulante, fomos investigar se a presença de Hb na cultura de monócitos aderidos poderia alterar a fagocitose do *M. leprae*. Para investigar a relação Hb e *M. leprae*, monócitos humanos foram colocados em cultura na presença ou ausência de Hb. Após 30 minutos, adicionamos à cultura *M. leprae* (5:1) vivo (MLV) ou morto (MLM). Depois de 24h avaliamos a internalização do *M.*

leprae nestas células. Na presença de Hb houve menor internalização do *M. leprae* quando comparado à ausência de Hb (Figura 5.10.1B, C e D).

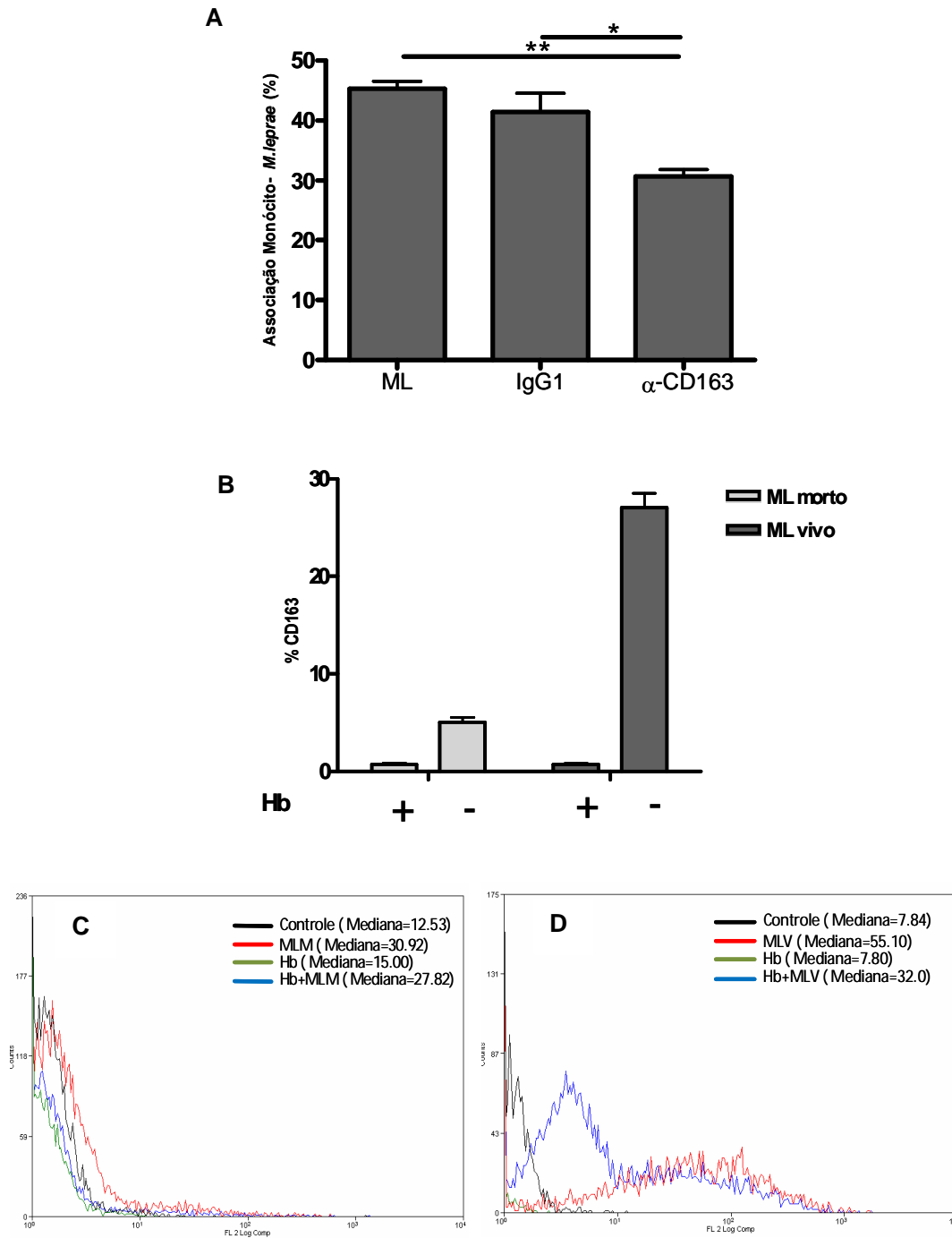


Figura 5.10.1 – O bloqueio do CD163 e a presença de Hb na cultura reduzem a associação célula-bactéria.

Em A, monócitos de indivíduos-saudáveis infectados com ML (5:1) e/ou na presença do isotipo (IgG1) e do α -CD163. Os dados foram obtidos a partir da citometria de fluxo, por meio de duas triplicatas. Em B, na presença de MLM ou MLV, foi adicionada hemoglobina (Hb), e a expressão de CD163 foi avaliada por citometria de fluxo. Em C e D, “overlay” dos valores de mediana, do MLM e MLV, respectivamente, mostrando que a presença da Hb reduz a associação do *M. leprae* ao monócito. Foram realizados os testes estatísticos Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn. (**) para o valor de $p < 0,01$ e (*) para o valor de $p < 0,05$.

5.11 - O papel modulador da IL-10 em relação ao CD163 em monócitos e à secreção de sCD163 e heme no soro

Para avaliar o papel da IL-10 na modulação do CD163, monócitos foram colocados em contato com o anticorpo anti-IL-10 (α -IL-10), assim como o isotipo-controle (IgG1) e após 30 minutos, as células foram estimuladas com *M. leprae* (5:1). Após 24h de cultura, as mesmas foram retiradas dos poços e, por citometria de fluxo, foi estimado o percentual de células CD163 positivas. Os dados mostram que a expressão de CD163 foi reduzida quando adicionamos a α -IL-10 juntamente com o *M. leprae* ($p < 0,05$) à cultura de células (Figura 5.11.1).

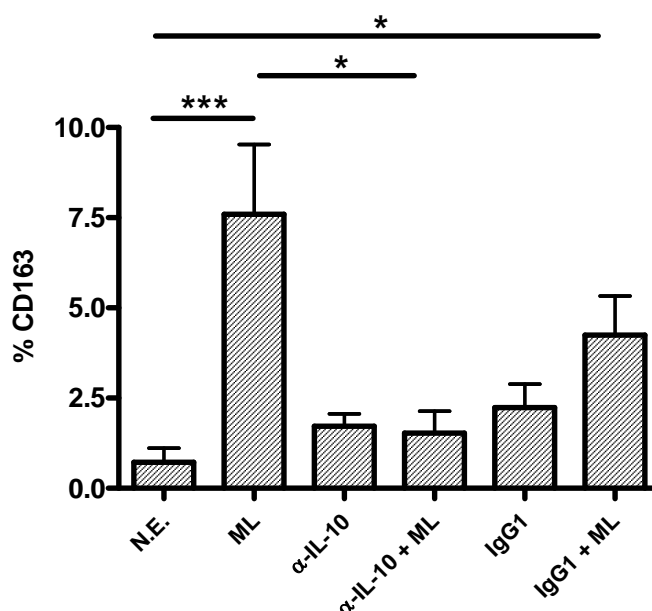


Figura 5.11.1 – O bloqueio de IL-10 reduz a expressão de CD163. Monócitos de indivíduos- controle foram infectados com ML (5:1) e/ou colocados em contato com α -IL-10 e seu isotipo controle (IgG1). Os dados foram obtidos a partir da citometria de fluxo (N.E. – n=8, ML - n=4, α -IL10 – n=4, α -IL-10+ML – n=5, IgG1 – n=4 e IgG1+ML – n=4). Para este experimento, foram realizados os testes estatísticos Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn. (***) para o valor de $p < 0,001$ e (*) para o valor de $p < 0,05$.

O perfil anti-inflamatório induzido pela IL-10 é fundamental para a expressão de CD163. Apesar desse perfil, pode haver uma clivagem do CD163 de membrana, tornando-o solúvel no soro. Além disso, a presença de heme pode ser utilizada como fonte de ferro para a bactéria ou, ainda, funcionar como um fator pró-inflamatório, induzindo a secreção de TNF pelos macrófagos.

Com o objetivo de avaliar a secreção IL-10, CD163 solúvel (sCD163) e heme no soro de indivíduos saudáveis, de pacientes lepromatosos e tuberculoides, realizamos a técnica de ELISA e o método derivado alcalino de pirimidina, respectivamente. Os níveis de IL-10 no soro estavam aumentados nos pacientes lepromatosos, quando comparados aos dos pacientes tuberculoides e dos indivíduos saudáveis ($p < 0,01$; Figura 5.11.2A). Os níveis de sCD163 foram maiores em pacientes lepromatosos, quando comparados com os dos indivíduos-saudáveis ($p < 0,001$) e pacientes tuberculoides (Figura 5.11.2A). Um perfil similar foi observado em relação à presença de heme no soro de pacientes lepromatosos em comparação aos indivíduos-sadios ($p < 0,001$) e aos pacientes tuberculoides ($p < 0,01$; Figura 5.11.2B).

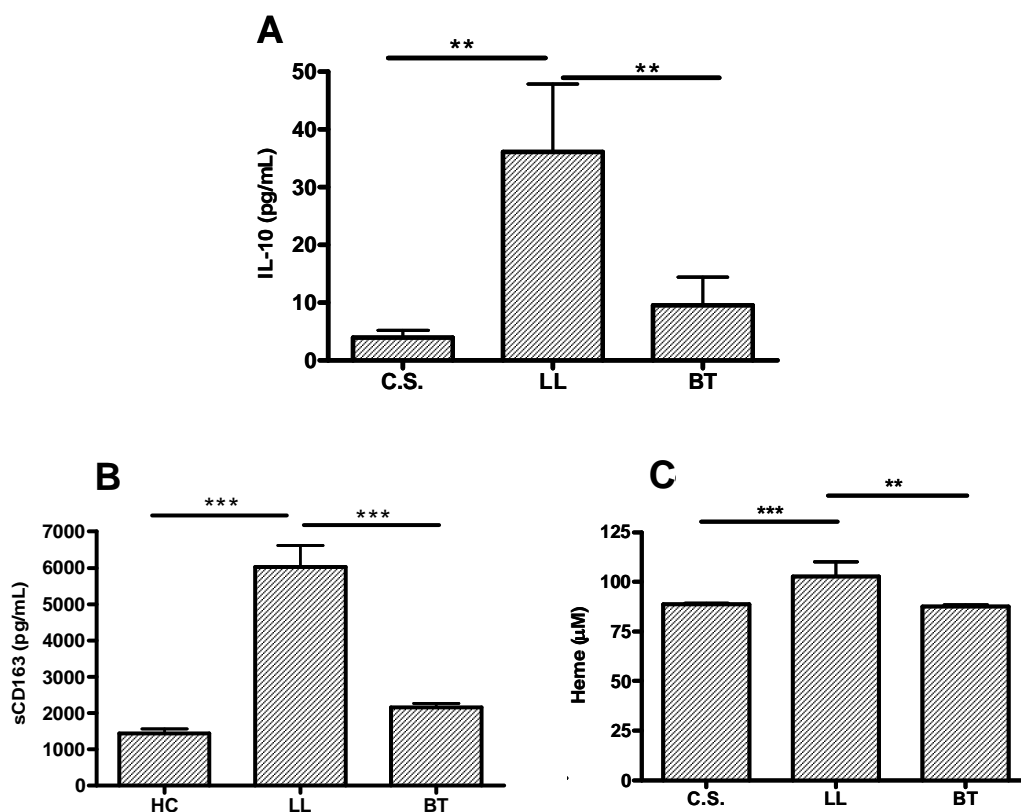


Figura 5.11.2 – Níveis séricos de sCD163 e heme no soro. Em A, os níveis de IL-10 estavam aumentados em pacientes lepromatosos (LL, $n=22$), quando comparados aos pacientes tuberculóides (BT, $n=22$) e controles saudáveis ($n=14$). Em B, sCD163 estão aumentados nos pacientes LL ($n=4$), contrariamente ao observado nos controles saudáveis (C.S. – $n=4$) e BT ($n=4$). Em C, um perfil similar foi observado em relação à secreção de heme. Pacientes LL possuem níveis elevados de heme em comparação ao outros grupos de indivíduos. Os dados são resultado de duplicatas ou triplicatas de cada amostra dos grupos. Para este experimento, foram realizados os testes estatísticos Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn. (***) para o valor de $p < 0,001$ e (**) $p < 0,01$.

5.12 - A expressão de ferro na lesão cutânea de pacientes lepromatosos

Para investigar os níveis de ferro nas lesões dos pacientes lepromatosos e tuberculoides, realizamos a técnica de coloração Perls - Azul da Prússia. A reação ocorre com o tratamento dos cortes histológicos em soluções ácidas de ferrocianeto. Qualquer íon férrico no tecido combina-se com o ferrocianeto e resulta na formação de um pigmento azul brilhante chamado “azul da Prússia” ou ferrocianeto férrico. O depósito de ferro foi correlacionado à presença dos bacilos nas lesões, identificados pela coloração de Wade em pacientes lepromatosos (Figura 5.12.1A). Muitos depósitos de ferro foram detectados nas lesões dos pacientes LL, tendo sido localizados principalmente nos macrófagos vacuolados (Figura 5.12.1B), onde também observamos uma grande quantidade de bacilos. Contrariamente aos pacientes lepromatosos, as lesões dos pacientes tuberculoides apresentaram raros depósitos de ferro ou a ausência destes (Figura 16C), o que podemos associar ao pequeno número de células infectadas pelo *M. leprae* (dados não mostrados).

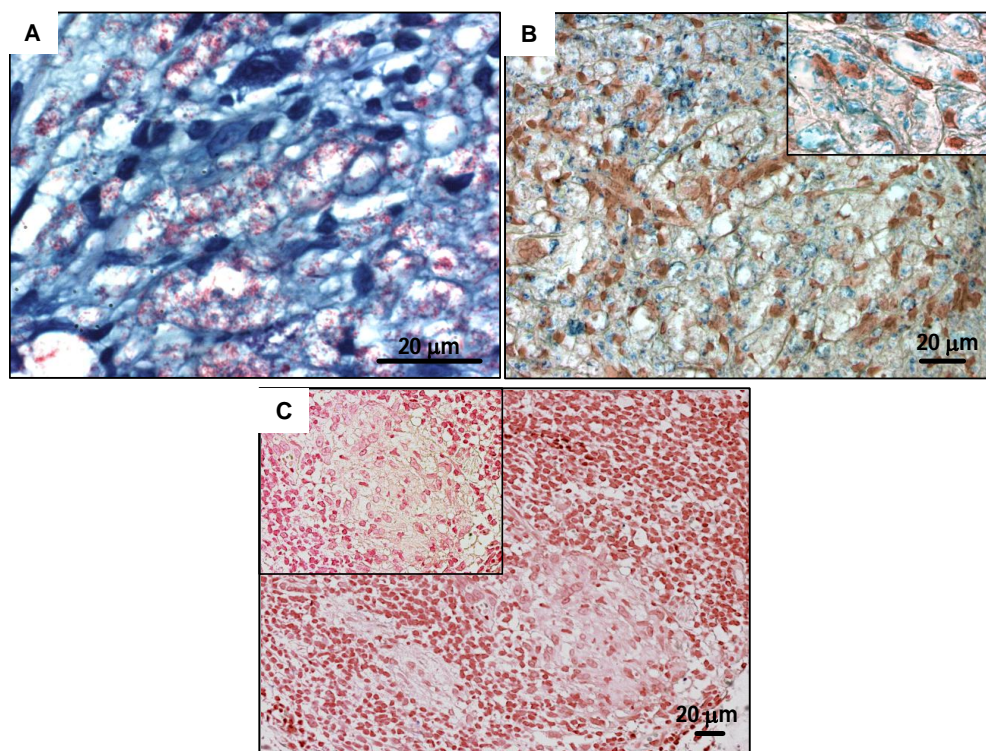


Figura 5.12.1 – Níveis de ferro nas lesões de pacientes com hanseníase. Em A, há uma grande quantidade de bacilos (coloração rósea), visualizados pela coloração de Wade. Em B, pela coloração Perls-Azul da Prússia, evidenciamos os depósitos de ferro (coloração azul brilhante) na lesão de pele de paciente lepromatoso. Os depósitos de ferro se localizam preferencialmente nos macrófagos vacuolados (detalhe da figura B – 100x). Em C, no granuloma do paciente tuberculóide não foi observada qualquer deposição de ferro nas células epitelioides. As imagens são representativas de 9 pacientes lepromatosos e de 6 pacientes tuberculoides. Escala das barras: 20µm.

6 – *Discussão*

Com descoberta dos macrófagos por Metschnikoff, foi a eles associada a ideia de que estas células eram capazes de endocitar patógenos e destruí-los. Os macrófagos estão presentes em todos os tecidos e, de acordo com o ambiente, as células terão funções específicas. De certa maneira, tanto a imunidade inata como a adquirida podem levar o macrófago a ser mais suscetível a infecções patogênicas e menos preparado para produzir citocinas que aumentem a resposta imune (84). Neste estudo, confirmamos antigas descrições sobre o predomínio de macrófagos espumosos nas lesões lepromatosas.

A hanseníase é uma doença especialmente interessante para investigar as polarizações dos macrófagos, vez que se manifesta como um espectro de diferentes formas clínicas, partindo de uma forma na qual o paciente apresenta a imunidade celular contra o *M. leprae*, até a forma onde os pacientes apresentam anergia antígeno-específica. Recentemente, foi descrito que IL-15 e IL-10 são capazes de induzir diferentes fenótipos em células de pacientes com hanseníase. IL-15 está associada com a resposta antimicrobiana pela indução da vitamina D, enquanto IL-10 está associada ao aumento da expressão de receptores “scavenger”, lipídeos oxidados e alta fagocitose (79). Estes fenótipos descritos *in vitro* também são observados nas lesões de pacientes com hanseníase, além da expressão de receptores “scavenger”, incluindo o CD163 nas lesões lepromatosas (79, 191).

Os lipídios constituem uma importante fonte nutricional para a persistência bacteriana no hospedeiro (192), sendo comum a acumulação de corpúsculos lipídicos nas lesões lepromatosas, como descrito por Mattos e colaboradores [2010 (193)]. A formação destes corpúsculos independe da viabilidade do *M. leprae*, o que sugere que a bactéria desenvolva um papel passivo na sua formação, sistema onde as células hospedeiras deveriam ser a o fator ativo (193). Nossos dados mostraram que as células da lesão lepromatosa possuem um fenótipo de ativação alternativa, com alta expressão SRA-I (dados não mostrados). Nas lesões cutâneas destes pacientes, há uma maior expressão de CD86, CD209, CD206, HLA-DR, CD163, assim como de IDO. Estes dados corroboram a literatura que mostra, da mesma forma, um aumento na expressão de CD86 e HLA-DR (54). Apesar de Krutzik e colaboradores [2005 (68)], mostrarem expressão similar de CD209 no espectro clínico da hanseníase, Soilleux e colaboradores [2006 (67)] mostraram que pacientes lepromatosos possuíam a expressão elevada deste marcador, o que se

coaduna com os dados obtidos em nosso trabalho. O aumento da expressão de CD163 na lesão de pele de pacientes lepromatosos também foi evidenciado por Montoya e colaboradores [2009 (79)], em comparação às lesões de pacientes tuberculoides.

O CD163 também vem sendo identificado como uma proteína solúvel no sobrenadante de células e no plasma humano (177, 181). O CD163 solúvel (sCD163) é liberado a partir de monócitos em resposta à sinalização de TLR, uma resposta aguda do sistema imune inato a infecções por patógenos extracelulares (187). Além disso, estudos anteriores descreveram que os níveis de CD163 no plasma se correlacionam inversamente com a expressão de CD163 em monócitos do sangue, sugerindo que, em condições fisiopatológicas, os monócitos sejam a maior fonte de sCD163 (194). No contexto da inflamação, o sCD163 pode ser considerado como um marcador circulante substituto do TNF, eliminado pelos macrófagos.

Elevados níveis de sCD163 têm sido descrito na sepse, pneumonia e leishmaniose (183, 185). Os níveis de CD163 no sangue total de pacientes lepromatosos e tuberculoides são similares (dados não mostrados), porém, no soro de pacientes lepromatosos, os níveis de sCD163 são elevados em comparação aos pacientes tuberculoides e indivíduos saudáveis, sugerindo que o sCD163 não seja necessariamente proveniente dos monócitos. Não podemos excluir a possibilidade de macrófagos tissulares resistentes serem a fonte de sCD163; porém, é possível que os pacientes lepromatosos liberem antígenos por meio de danos celulares, e que a ruptura no tecido possa levar ao fluxo sanguíneo e estimule o TLR da superfície, acarretando um aumento da clivagem do CD163 no monócito do sangue de pacientes lepromatosos. Alguns trabalhos mostraram que os ligantes de TLR induzem a clivagem do CD163 de membrana (173). Segundo Etzerodt e colaboradores [2010 (195)], ADAM17 induz a secreção de sCD163 e TNF em macrófagos; sendo assim, outra possibilidade consiste no aumento da atividade de TACE/ADAM17 nos lepromatosos. O aumento de sCD163 no soro dos lepromatosos se correlaciona com os níveis de IL-10, TNF e a atividade de IDO (54; dados não mostrados). Dados anteriores descreveram que a IL-10 é capaz de induzir CD163 (174); porém, nosso trabalho é o primeiro a mostrar a correlação positiva entre IDO e CD163 numa resposta anti-inflamatória.

Recentemente, nosso grupo comprovou que a expressão de IDO estava aumentada nas lesões lepromatosas, em comparação às lesões tuberculoides (54).

A IDO é uma enzima intracelular expressa por células apresentadoras de antígeno que são reguladas a partir de um complexo de sinais imunológicos, e sua função principal é promover a degradação do aminoácido essencial, o ácido triptofano em quinurenina. Consequentemente, isto resulta na supressão da atividade das linfócitos T por “starvation”, assim como no decréscimo na concentração do triptofano no microambiente (196, 197, 198). Neste trabalho, mostramos que macrófagos isolados da pele dos pacientes lepromatosos são, em sua maioria, CD68⁺ após 6 dias de cultura e, além disso, são positivos para CD163 e IDO. Estas células têm a capacidade de se replicar *in vitro* (dados não mostrados), o que sugere que a inflamação tecidual na hanseníase ocorra pelo mecanismo dependente da proliferação de macrófagos residentes, como descrito em infecções por helmintos (199).

A análise da expressão gênica de CD163, assim como de IDO e IL-10, está aumentada nos pacientes LL, quando comparada aos pacientes BT. Sulahian e colaboradores [2004 (174)] demonstraram que IL-10 aumenta diretamente a expressão gênica de CD163. O papel da IL-10 também foi descrita na patogênese do polo lepromatoso (79); sendo assim, podemos sugerir que esta citocina seja responsável pela manutenção de níveis aumentados nas células dos pacientes lepromatosos. A expressão proteica de CD163 também foi avaliada na pele dos pacientes LL e BT e por “Western Blotting”, tendo sido mostrado que pacientes LL possuíam níveis elevados de CD163, em comparação com os pacientes BT. Além disso, dados recentes do nosso laboratório mostraram que a expressão de IDO na pele está aumentada nos pacientes LL (54).

A expressão e atividade de IDO estão aumentadas em monócitos humanos estimulados pelo *M. leprae* (54). Neste trabalho, descrevemos que a expressão do CD163 é induzida pelo *M. leprae* em monócitos humanos, e que esta molécula contribui para a entrada do *M. leprae* nas células hospedeiras. O aumento da expressão do CD163 induzido pelo *M. leprae* correlaciona-se positivamente com a expressão de IDO e CD209. Além disso, a expressão de IDO, CD163 e CD209 aumentou em altas concentrações bacterianas.

O papel do CD163 como um receptor bacteriano foi primeiramente descrito por Fabrick e colaboradores [2009 (201)], que consideraram o reconhecimento bacteriano e celular uma das funções primordiais do domínio “scavenger”. O bloqueio do CD163, assim como o tratamento com a citocalasina B como inibidor da polimerização da actina, inibiram parcialmente a captura do *M. leprae* pelos

monócitos. Estes dados sugerem que a expressão de CD163 seja ativamente regulada pela maquinaria fagocítica celular.

Recentemente, nosso grupo demonstrou a participação do NF- κ B na indução de TNF α em resposta ao *M. leprae* (dados não mostrados). Nesse estudo, mostramos que o *M. leprae* induz a translocação do NF- κ B em PBMCs e monócitos de indivíduos saudáveis. Além disso, em nosso trabalho foi observado que o *M. leprae* foi capaz de associar a citocinas pró-inflamatórias (TNF) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF β) em monócitos de indivíduos saudáveis, após 24h em cultura. Outros autores demonstraram que a clivagem do CD163 da membrana aumenta a quantidade de citocinas pró-inflamatórias (173, 175), mas que o *M. leprae* não foi capaz de induzir significativamente o aumento da clivagem do CD163. Apesar disso, o *M. leprae* parece induzir certa variedade de citocinas pró- e anti-inflamatórias em monócitos humanos.

A ligação entre a expressão de CD163 eIDO em células lepromatosas ainda não foi completamente elucidada. O IFN γ , que induz IDO, aumenta a atividade do glicogênio quinase sintase – 3 (GSK-3), que se correlaciona com a inibição de AP-1, um importante fator que envolve a indução do gene de IL-10 (201). Foi mostrado também que IFN γ suprime a expressão de CD163, provavelmente mediado pelo TNF (202, 147). A expressão aumentada de IDO e sua atividade em macrófagos lepromatosos parecem exercer um papel duplo. Enquanto os membros da família da quinurenina aumentam a diferenciação e expansão de células Treg, contribuindo para a imunossupressão, isto também pode favorecer a morte da micobactéria, que reduz a disponibilidade do triptofano para o micro-organismo, como mostrado em outros modelos animais (203, 204). A morte da micobactéria induzida por IDO deve aumentar o espalhamento antigênico que contribui para a clivagem do CD163 de membrana em monócitos lepromatosos. Por outro lado, o aumento da expressão de CD163 pode elevar a expressão de IDO, pois dados da literatura demonstraram que a hemoglobina, reconhecida pelo CD163, induz a expressão gênica e proteica de IDO em macrófagos e células dendríticas (150, 205).

O heme é uma excelente fonte de ferro, sendo mais facilmente absorvida em comparação com o ferro inorgânico (206). Juntamente com o heme, a homeostase do ferro é essencial à sobrevivência e ao crescimento das micobactérias nos hospedeiros (207), o que pode explicar os níveis elevados de heme no soro de pacientes lepromatosos, contrariamente ao que ocorre em indivíduos saudáveis e pacientes tuberculoides. A homeostase do ferro é essencial para manter a

sobrevivência e o crescimento das micobactérias nos hospedeiros (207). Tanto o *M. tuberculosis* quanto o *M. leprae* produzem bacterioferritina (165, 208), que pode estar envolvida no controle da homeostase de ferro nesses patógenos. Recentemente, foi descrito o estoque da proteína de ferro-ferroxidase fora das proteínas das superfamílias ferritina, assim como o papel protetor desta proteína bacteriana do dano do DNA (209).

A aquisição de ferro e a prevenção da geração de ROS ferro-dependente são eventos essenciais para a multiplicação e a sobrevivência dos patógenos no hospedeiro (210, 211). É proposto que as micobactinas, além do ferro capturado na membrana micobacteriana, possam servir também como um sideróforo extracelular dentro de macrófagos, por meio da associação com vesículas lipídicas. Luo e colaboradores [2005 (212)] propuseram que as micobactinas se difundiriam do fagossoma dentro dos macrófagos, e se associariam ao ferro intracelular, ou tráfegariam até a membrana plasmática para quelar o ferro. Essas micobactinas carregadas de ferro se acumulam dentro de estoques lipídicos. A observação do acúmulo de corpúsculos lipídicos nas lesões de pacientes LL, (193), uma possibilidade é que o *M. leprae* se associe às vesículas lipídicas como um mecanismo de transferência de ferro do hospedeiro para o fagossoma repleto de bacilo.

Como o CD163 está relacionado à captura da hemoglobina, podemos especular que, em células parasitadas, a alta expressão de CD163 deve funcionar como um modo de suprimento de ferro, o que poderia refletir algumas diferenças entre os mecanismos de sobrevivência utilizados por diversas micobactérias, desde que Hb humanas não sejam usadas como fonte de ferro para o *M. tuberculosis*, mas sim pelo *M. haemophilum* (213). Já foi demonstrado que níveis elevados de ferro no corpo humano podem levar ao aumento de infecções, aumentando a mortalidade ou reduzindo a sobrevivência após a infecção pela *Chlamydomphila pneumoniae*, *M. tuberculosis* e HIV (214, 215). Estudos anteriores demonstraram que glicocorticoides polarizam monócitos em um perfil M2 ativado alternativamente, expressando CD163, e aumentando a captura de hemoglobina por detoxificação (216).

Neste trabalho, verificamos um aumento de estoques de ferro em lesões cutâneas de pacientes lepromatosos quando comparadas às lesões tuberculoides. Isto sugere que o CD163 contribua de forma diferente para a patogênese da doença no polo lepromatoso. O dano celular causado pela infecção pode levar ao espalhamento de antígenos no sangue, o que pode acarretar a indução de CD163

em monócitos circulantes. Os altos níveis antigênicos podem gerar o aumento da clivagem do CD163 membranar, tornando-o solúvel, configurando um mecanismo de que dispõe o sistema imune do hospedeiro para regular a disponibilidade de hemoglobina passível de ser utilizada pelos patógenos. Para corroborar nossa hipótese, observamos, por microscopia confocal, que, durante a captura de *M. leprae* pelos monócitos, havia um aumento da internalização do CD163 nestas células (dados não mostrados).

Os dados obtidos com esse trabalho sugerem que o CD163 seja uma molécula-chave em macrófagos de pacientes lepromatosos. Além disso, este receptor “scavenger” participa do fenótipo anti-inflamatório, por meio do aumento da captura do *M. leprae* e do estoque de ferro em vacúolos fagossomais, que contribuem para a viabilidade e a sobrevivência da micobactéria.

8 – Conclusões

- 1) Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que macrófagos de pacientes lepromatosos fazem parte de uma subpopulação de células, associada a vários mecanismos anti-inflamatórios desencadeados, em parte, pelo *M. leprae*;
- 2) Nas lesões lepromatosas características, predominavam macrófagos expressando CD163, IDO, HLA-DR e CD86 quando comparados a lesões tuberculoideas;
- 3) Células isoladas de pacientes LL apresentaram perfil fenotípico de marcação semelhante ao que foi descrito na lesão, e a expressão gênica e proteica de CD163 nas lesões cutâneas lepromatosas estavam aumentadas, quando comparadas às lesões tuberculoideas;
- 4) Durante o período de cultura de 6 dias dos macrófagos isolados das lesões lepromatosas, houve uma redução gradativa da expressão gênica de CD163, IDO e IL-10 e dos receptores de superfície CD163, CD209, HLA-DR, CD86, CD14, concomitante com a saída de *M. leprae* destas células;
- 5) Ao contrário do BCG e da *E. coli*, o *M. leprae* foi capaz de induzir uma maior expressão de CD163, IDO e CD209 em monócitos humanos;
- 6) O bloqueio da fagocitose nos monócitos ocorreu concomitantemente com a redução da expressão de CD163, fato comprovado pela diminuída associação dessas células com o *M. leprae*;
- 7) O bloqueio da produção de IL-10 por monócitos de indivíduos sadios infectados ou não por *M. leprae*, reduziu a expressão de CD163;
- 8) O aumento dos níveis séricos de sCD163, IL-10 e heme nos pacientes lepromatosos está associado à presença do *M. leprae* nos tecidos, podendo contribuir para o aumento dos depósitos intracelulares de ferro nas células desses pacientes;

- 9) Tomados em conjunto, nossos resultados sugerem que o *M. leprae* modula o fenótipo dos macrófagos hospedeiros, criando um ambiente que favoreça sua entrada e permanência no organismo, em processo mediado pelo CD163.

9 – Referências Bibliográficas

- 1) Lockwood D. Leprosy. Clin Evid. 2004 Dez;(12):1103-1114.
- 2) Walker SL, Lockwood DNJ. The clinical and immunological features of leprosy. Br. Med. Bull. 2006;77-78:103-121.
- 3) Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. Clin. Microbiol. Rev. 2006 Abr;19(2):338-381.
- 4) Parkash O. Classification of leprosy into multibacillary and paucibacillary groups: an analysis. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2009 Jan;55(1):1-5.
- 5) Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis. 1966 Set;34(3):255-273.
- 6) Gallo, M. E. N., Sampaio, E. P., Nery, J. A. C., Moraes, M. O., Antunes, S. L. G., Pessolani, M. C. V., & Sarno, E. N. 2005. Hanseníase: Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Imunológicos. Coura, J.R. (ed.) *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*: 1383-1394. Guanabara Koogan.
- 7) Prasad HK, Mishra RS, Nath I. Phenolic glycolipid-I of Mycobacterium leprae induces general suppression of in vitro concanavalin A responses unrelated to leprosy type. J. Exp. Med. 1987 Jan 1;165(1):239-244.
- 8) Sarno EN, Sampaio EP. The role of inflammatory cytokines in the tissue injury of leprosy. Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis. 1996 Dez;64(4 Suppl):S69-73; discussion S73-74.
- 9) Naafs B, Kolk AH, Chin A Lien RA, Faber WR, Van Dijk G, Kuijper S, et al. Anti-Mycobacterium leprae monoclonal antibodies cross-react with human skin: an alternative explanation for the immune responses in leprosy. J. Invest. Dermatol. 1990 Maio;94(5):685-688.
- 10) Jih MH, Kimyai-Asadi A, Levis WR. Reversal reaction to Hansen's disease. J Drugs Dermatol. 2002 Jul;1(1):70-71.
- 11) Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, et al. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. Science. 1991 Oct 11;254(5029):277-279.
- 12) Husser JA, Daumerie D, Grossetête G, Nebout M. [Necrotic course of erythema nodosum leprosum]. Acta Leprol. 1986 Jun;4(2):239-250.
- 13) Sarno EN, Grau GE, Vieira LM, Nery JA. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosy reactional states. Clin. Exp. Immunol. 1991 Abr;84(1):103-108.

- 14) Ustianowski AP, Lockwood DNJ. Leprosy: current diagnostic and treatment approaches. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2003 Out;16(5):421-427.
- 15) Bloom BR. [Learning from leprosy: a look at immunology and the Third World]. *Riv Infirm.* 1986 Dez;5(4):248-253.
- 16) Hunter SW, Brennan PJ. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. *J. Bacteriol.* 1981 Set;147(3):728-735.
- 17) Hunter SW, Stewart C, Brennan PJ. Purification of phenolic glycolipid I from armadillo and human sources. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 1985 Set;53(3):484-486.
- 18) Cho SN, Yanagihara DL, Hunter SW, Gelber RH, Brennan PJ. Serological specificity of phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. *Infect. Immun.* 1983 Set;41(3):1077-1083.
- 19) Vissa VD, Brennan PJ. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. *Genome Biol.* 2001;2(8):REVIEWS1023.
- 20) Hansen GHA (1874). "Undersøgelser Angående Spedalskhedens Årsager (Investigations concerning the etiology of leprosy)" (in Norwegian). *Norsk Mag. Laegervidenskaben* 4: 1–88.
- 21) Shepard CC. The nasal excretion of *Mycobacterium leprae* in leprosy. *Int J Lepr.* 1962 Mar;30:10-18.
- 22) Kirchheimer WF, Storrs EE. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 1971 Set;39(3):693-702.
- 23) Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature.* 2001 Fev 22;409(6823):1007-1011.
- 24) Sarno EN, Alvarenga FDB, Vieira LM, de Souza PR. [Characterization of macrophages present in skin lesions of Hansen's disease: study by monoclonal antibodies]. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 1988 Fev;30(1):45-50.
- 25) Crabtree GR. Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science.* 1989 Jan 20;243(4889):355-361.
- 26) Schwartz RH. Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *J. Exp. Med.* 1996 Jul 1;184(1):1-8.
- 27) Gajewski TF, Qian D, Fields P, Fitch FW. Anergic T-lymphocyte clones have altered inositol phosphate, calcium, and tyrosine kinase signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994 Jan 4;91(1):38-42.

- 28) Sundstedt A, Sigvardsson M, Leanderson T, Hedlund G, Kalland T, Dohlsten M. In vivo anergized CD4+ T cells express perturbed AP-1 and NF-kappa B transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996 Feb 6;93(3):979-984.
- 29) Kaplan G, Cohn ZA. Cellular immunity in lepromatous and tuberculoid leprosy. *Immunol Lett.* 1985;11(3-4):205-9.
- 30) Dagur PK, Sharma B, Kumar G, Khan NA, Katoch VM, Sengupta U, et al. Mycobacterial antigen(s) induce anergy by altering TCR- and TCR/CD28-induced signalling events: insights into T-cell unresponsiveness in leprosy. *Mol. Immunol.* 2010 Feb;47(5):943-952.
- 31) Mehra V, Brennan PJ, Rada E, Convit J, Bloom BR. Lymphocyte suppression in leprosy induced by unique M. leprae glycolipid. *Nature.* 1984 Mar 8;308(5955):194-196.
- 32) Prasad PVS, Kaviarasan PK. Leprosy therapy, past and present: can we hope to eliminate it? *Indian J Dermatol.* 2010 Oct;55(4):316-324.
- 33) Laal S, Bhutani LK, Nath I. Natural emergence of antigen-reactive T cells in lepromatous leprosy patients during erythema nodosum leprosum. *Infect. Immun.* 1985 Dec;50(3):887-892.
- 34) Laal S, Mishra RS, Nath I. Type 1 reactions in leprosy--heterogeneity in T-cell functions related to the background leprosy type. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 1987 Sep;55(3):481-493.
- 35) Misra N, Selvakumar M, Singh S, Bharadwaj M, Ramesh V, Misra RS, et al. Monocyte derived IL 10 and PGE2 are associated with the absence of Th 1 cells and in vitro T cell suppression in lepromatous leprosy. *Immunol. Lett.* 1995 Dec;48(2):123-128.
- 36) Agrewala JN, Kumar B, Vohra H. Potential role of B7-1 and CD28 molecules in immunosuppression in leprosy. *Clin. Exp. Immunol.* 1998 Jan;111(1):56-63.
- 37) Santos DO, Castro HC, Bourguignon SC, Bastos OM, Rodrigues CR, Van Heuverswyn H, et al. Expression of B7-1 costimulatory molecules in patients with multibacillary leprosy and reactional states. *Clin. Exp. Dermatol.* 2007 Jan;32(1):75-80.
- 38) Barnes PF, Abrams JS, Lu S, Sieling PA, Rea TH, Modlin RL. Patterns of cytokine production by mycobacterium-reactive human T-cell clones. *Infect Immun* 1993; 61: 197- 203.
- 39) Lima CS, Ribeiro ML, Souza LA, Sardella AB, Wolf VM, Pessolani MC. Intracellular signals triggered during association of Mycobacterium leprae and Mycobacterium bovis BCG with human monocytes. *Microb. Pathog.* 2001

Jul;31(1):37-45.

- 40) Sieling PA, Abrams JS, Yamamura M, Salgame P, Bloom BR, Rea TH, et al. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. In vitro modulation of T cell responses in leprosy. *J. Immunol.* 1993 Jun 15;150(12):5501-5510.
- 41) Goulart IMB, Penna GO, Cunha G. [Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*]. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2002 Ago;35(4):365-375.
- 42) Kiszewski CA, Becerril E, Baquera J, Aguilar LD, Hernández-Pando R. Expression of transforming growth factor-beta isoforms and their receptors in lepromatous and tuberculoid leprosy. *Scand. J. Immunol.* 2003 Mar;57(3):279-285.
- 43) Lúdvíksson BR, Seegers D, Resnick AS, Strober W. The effect of TGF-beta1 on immune responses of naïve versus memory CD4+ Th1/Th2 T cells. *Eur J Immunol.* 2000 Jul;30(7):2101-11.
- 44) Libraty DH, Airan LE, Uyemura K, Jullien D, Spellberg B, Rea TH, et al. Interferon-gamma differentially regulates interleukin-12 and interleukin-10 production in leprosy. *J. Clin. Invest.* 1997 Jan 15;99(2):336-341.
- 45) de Jong R, Janson AA, Faber WR, Naafs B, Ottenhoff TH. IL-2 and IL-12 act in synergy to overcome antigen-specific T cell unresponsiveness in mycobacterial disease. *J. Immunol.* 1997 Jul 15;159(2):786-793.
- 46) Casanova JL, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu. Rev. Immunology.* 2002; 20: 581-620.
- 47) Kim J, Uyemura K, Van Dyke MK, Legaspi AJ, Rea TH, Shuai K, et al. A role for IL-12 receptor expression and signal transduction in host defense in leprosy. *J. Immunol.* 2001 Jul 15;167(2):779-786.
- 48) Sinsimer D, Fallows D, Peixoto B, Krahenbuhl J, Kaplan G, Manca C. *Mycobacterium leprae* actively modulates the cytokine response in naive human monocytes. *Infect. Immun.* 2010 Jan;78(1):293-300.
- 49) Mellor AL, Munn DH. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? *Immunol. Today.* 1999 Oct;20(10):469-473.
- 50) Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat. Med.* 2003 Oct;9(10):1269-1274.
- 51) Popov A, Schultze JL. IDO-expressing regulatory dendritic cells in cancer and chronic infection. *J. Mol. Med.* 2008 Feb;86(2):145-160.

- 52) Schröcksnadel K, Wirleitner B, Winkler C, Fuchs D. Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation. *Clin. Chim. Acta.* 2006 Feb;364(1-2):82-90.
- 53) MacKenzie CR, Heseler K, Müller A, Däubener W. Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in antimicrobial defence and immuno-regulation: tryptophan depletion versus production of toxic kynurenines. *Curr. Drug Metab.* 2007 Abr;8(3):237-244.
- 54) de Souza Sales J, Lara FA, Amadeu TP, de Oliveira Fulco T, da Costa Nery JA, Sampaio EP, et al. The role of indoleamine 2, 3-dioxygenase in lepromatous leprosy immunosuppression. *Clin. Exp. Immunol.* 2011 ago;165(2):251-263.
- 55) Vottero E, Balgi A, Woods K, Tugendreich S, Melese T, Andersen RJ, et al. Inhibitors of human indoleamine 2,3-dioxygenase identified with a target-based screen in yeast. *Biotechnol J.* 2006 Mar;1(3):282-288.
- 56) Sugimoto H, Oda S, Otsuki T, Hino T, Yoshida T, Shiro Y. Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: catalytic mechanism of O₂ incorporation by a heme-containing dioxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006 Feb 21;103(8):2611-2616.
- 57) Cady SG, Sono M. 1-Methyl-DL-tryptophan, beta-(3-benzofuranyl)-DL-alanine (the oxygen analog of tryptophan), and beta-[3-benzo(b)thienyl]-DL-alanine (the sulfur analog of tryptophan) are competitive inhibitors for indoleamine 2,3-dioxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 1991 Dez;291(2):326-333.
- 58) Thomas SR, Mohr D, Stocker R. Nitric oxide inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase activity in interferon-gamma primed mononuclear phagocytes. *J. Biol. Chem.* 1994 Maio 20;269(20):14457-14464.
- 59) Moura DF, Teles RMB, Ribeiro-Carvalho MM, Teles RB, Santos IMCF, Ferreira H, et al. Long-term culture of multibacillary leprosy macrophages isolated from skin lesions: a new model to study *Mycobacterium leprae*-human cell interaction. *Br. J. Dermatol.* 2007 Ago;157(2):273-283.
- 60) Drutz DJ, Chen TS, Lu WH. The continuous bacteremia of lepromatous leprosy. *N. Engl. J. Med.* 1972 jul 27;287(4):159-164.
- 61) Maeda N, Nigou J, Herrmann J-L, Jackson M, Amara A, Lagrange PH, et al. The cell surface receptor DC-SIGN discriminates between *Mycobacterium* species through selective recognition of the mannose caps on lipoarabinomannan. *J. Biol. Chem.* 2003 fev 21;278(8):5513-5516.
- 62) Kang BK, Schlesinger LS. Characterization of mannose receptor-dependent

- phagocytosis mediated by *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan. *Infect. Immun.* 1998 jun;66(6):2769-2777.
- 63) Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell.* 2000 mar 3;100(5):587-597.
- 64) Lozach P-Y, Burleigh L, Staropoli I, Amara A. The C type lectins DC-SIGN and L-SIGN: receptors for viral glycoproteins. *Methods Mol. Biol.* 2007;379:51-68.
- 65) Tailleux L, Gicquel B, Neyrolles O. [DC-SIGN, a key receptor of *Mycobacterium tuberculosis*?]. *Med Sci (Paris).* 2003 jul;19(6-7):658-660.
- 66) van Die I, van Vliet SJ, Nyame AK, Cummings RD, Bank CMC, Appelmelk B, et al. The dendritic cell-specific C-type lectin DC-SIGN is a receptor for *Schistosoma mansoni* egg antigens and recognizes the glycan antigen Lewis x. *Glycobiology.* 2003 jun;13(6):471-478.
- 67) Soilleux EJ, Sarno EN, Hernandez MO, Moseley E, Horsley J, Lopes UG, et al. DC-SIGN association with the Th2 environment of lepromatous lesions: cause or effect? *J. Pathol.* 2006 jun;209(2):182-189.
- 68) Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE, et al. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat. Med.* 2005 jun;11(6):653-660.
- 69) Modlin RL. The innate immune response in leprosy. *Curr. Opin. Immunol.* 2010 fev;22(1):48-54.
- 70) Teles RMB, Krutzik SR, Ochoa MT, Oliveira RB, Sarno EN, Modlin RL. Interleukin-4 regulates the expression of CD209 and subsequent uptake of *Mycobacterium leprae* by Schwann cells in human leprosy. *Infect. Immun.* 2010 nov;78(11):4634-4643.
- 71) Linehan SA, Martínez-Pomares L, da Silva RP, Gordon S. Endogenous ligands of carbohydrate recognition domains of the mannose receptor in murine macrophages, endothelial cells and secretory cells; potential relevance to inflammation and immunity. *Eur. J. Immunol.* 2001 jun;31(6):1857-1866.
- 72) Allavena P, Chieppa M, Monti P, Piemonti L. From pattern recognition receptor to regulator of homeostasis: the double-faced macrophage mannose receptor. *Crit.*

Rev. Immunol. 2004;24(3):179-192.

- 73) Baetas-da-Cruz W, Alves L, Pessolani MCV, Barbosa HS, Régnier-Vigouroux A, Corte-Real S, et al. Schwann cells express the macrophage mannose receptor and MHC class II. Do they have a role in antigen presentation? *J. Peripher. Nerv. Syst.* 2009 jun;14(2):84-92.
- 74) Baetas-da-Cruz W, Alves L, Guimarães EV, Santos-Silva A, Pessolani MCV, Barbosa HS, et al. Efficient uptake of mannosylated proteins by a human Schwann cell line. *Histol. Histopathol.* 2009 ago;24(8):1029-1034.
- 75) Suzuki K, Takeshita F, Nakata N, Ishii N, Makino M. Localization of CORO1A in the macrophages containing *Mycobacterium leprae*. *Acta Histochem Cytochem.* 2006 ago 30;39(4):107-112.
- 76) Greaves DR, Gordon S. The macrophage scavenger receptor at 30 years of age: current knowledge and future challenges. *J. Lipid Res.* 2009 abr;50 Suppl:S282-286.
- 77) Virchow R. Angiome. In: Virchow R, editor. *Die Krankheiten Geschwülste*. Berlin: August Hirschwald; 1863. pp 306–425.
- 78) Sakurai I, Skinsnes OK. Lipids in leprosy. 2. Histochemistry of lipids in human leprosy. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 1970 dez;38(4):389-403.
- 79) Montoya D, Cruz D, Teles RMB, Lee DJ, Ochoa MT, Krutzik SR, et al. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. *Cell Host Microbe.* 2009 Out 22;6(4):343-353.
- 80) Metschnikoff, E. Ueber eine Sprosspilzkrankheit der Daphnien. Beitrag zur Lehre über den Kampf der Phagozyten gegen Krankheitserreger. *Archiv f. pathologische Anatomie und Physiologie und f. klinische Medicin.* 1884; 96, 177–195.
- 81) Metschnikoff, E. 1905. *Immunity in Infectious Diseases*. The University Press, Cambridge.
- 82) Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat. Rev. Immunol.* 2008 Abr;8(4):279-289.
- 83) Erwig L, Henson PM. Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ.* 2008 Fev;15(2):243-250.
- 84) Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 2008 Dez;8(12):958-969.

- 85) Sica A, Rubino L, Mancino A, Larghi P, Porta C, Rimoldi M, et al. Targeting tumour-associated macrophages. *Expert Opin. Ther. Targets.* 2007 Set;11(9):1219-1229.
- 86) Sunderkötter C, Nikolic T, Dillon MJ, Van Rooijen N, Stehling M, Drevets DA, et al. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J. Immunol.* 2004 Abr 1;172(7):4410-4417.
- 87) Gordon S. The macrophage: past, present and future. *Eur. J. Immunol.* 2007 Nov;37 Suppl 1:S9-17.
- 88) Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 1986 abr 1;136(7):2348-2357.
- 89) Gordon S. Do macrophage innate immune receptors enhance atherogenesis? *Dev. Cell.* 2003 Nov;5(5):666-668.
- 90) Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* 2003 fev;73(2):209-212.
- 91) Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci.* 2008;13:453-461.
- 92) Mackaness GB. Cellular immunity and the parasite. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1977;93:65-73.
- 93) O'Shea JJ, Murray PJ. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity.* 2008 abr;28(4):477-487.
- 94) Dale DC, Boxer L, Liles WC. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood.* 2008 Ago 15;112(4):935-945.
- 95) Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science.* 2003 Ago 1;301(5633):640-643.
- 96) Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell. Signal.* 2001 fev;13(2):85-94.
- 97) Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 2002;20:197-216.
- 98) Mukhopadhyay S, Gordon S. The role of scavenger receptors in pathogen recognition and innate immunity. *Immunobiology.* 2004;209(1-2):39-49.

- 99) Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006 Maio 11;441(7090):235-238.
- 100) Filipe-Santos O, Bustamante J, Chapgier A, Vogt G, de Beaucoudrey L, Feinberg J, et al. Inborn errors of IL-12/23- and IFN-gamma-mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features. *Semin. Immunol.* 2006 Dez;18(6):347-361.
- 101) Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J. Clin. Invest.* 1998 Fev 15;101(4):890-898.
- 102) Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 2005 dez;5(12):953-964.
- 103) Gruenheid S, Gros P. Genetic susceptibility to intracellular infections: Nramp1, macrophage function and divalent cations transport. *Curr. Opin. Microbiol.* 2000 Fev;3(1):43-48.
- 104) MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 1997;15:323-350.
- 105) Szekanecz Z, Koch AE. Macrophages and their products in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2007 Maio;19(3):289-295.
- 106) Zhang X, Mosser DM. Macrophage activation by endogenous danger signals. *J. Pathol.* 2008 Jan;214(2):161-178.
- 107) Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med.* 1992 Jul 1;176(1):287-92.
- 108) Kreider T, Anthony RM, Urban JF Jr, Gause WC. Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Curr. Opin. Immunol.* 2007 ago;19(4):448-453.
- 109) Reese TA, Liang H, Tager AM, Luster AD, Van Rooijen N, Voehringer D, et al. Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. *Nature*. 2007 Maio 3;447(7140):92-96.
- 110) Wilson, M S, Mentink-Kane, M M, Pesce, JT, Ramalingam, TR, Thompson, R, Wynn, TA. Immunopathology of schistosomiasis. *Immunol. Cell Biol.* 85, 148–154 (2007).

- 111) Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J. Leukoc. Biol.* 2006 dez;80(6):1298-1307.
- 112) Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, Schito M, Fuentes JM, Cheever AW, et al. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J. Immunol.* 2001 Dez 1;167(11):6533-6544.
- 113) Harris J, De Haro SA, Master SS, Keane J, Roberts EA, Delgado M, et al. T helper 2 cytokines inhibit autophagic control of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunity.* 2007 Set;27(3):505-517.
- 114) Kropf P, Fuentes JM, Fähnrich E, Arpa L, Herath S, Weber V, et al. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. *FASEB J.* 2005 Jun;19(8):1000-1002.
- 115) Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* 2003 Fev;73(2):209-212.
- 116) Lucas M, Zhang X, Prasanna V, Mosser DM. ERK activation following macrophage Fc γ R ligation leads to chromatin modifications at the IL-10 locus. *J. Immunol.* 2005 Jul 1;175(1):469-477.
- 117) Gerber JS, Mosser DM. Stimulatory and inhibitory signals originating from the macrophage Fc γ receptors. *Microbes Infect.* 2001 Fev;3(2):131-139.
- 118) Strassmann G, Patil-Koota V, Finkelman F, Fong M, Kambayashi T. Evidence for the involvement of interleukin 10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E₂. *J. Exp. Med.* 1994 Dez 1;180(6):2365-2370.
- 119) Erwig L, Henson PM. Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ.* 2008 Fev;15(2):243-250.
- 120) Miles SA, Conrad SM, Alves RG, Jeronimo SMB, Mosser DM. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J. Exp. Med.* 2005 Mar 7;201(5):747-754.
- 121) Mahalingam S, Lidbury BA. Suppression of lipopolysaccharide-induced antiviral transcription factor (STAT-1 and NF- κ B) complexes by antibody-dependent enhancement of macrophage infection by Ross River virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002 Out 15;99(21):13819-13824.
- 122) Kim Y, Hechler B, Klutz AM, Gachet C, Jacobson KA. Toward multivalent signaling across G protein-coupled receptors from poly(amidoamine) dendrimers.

- Bioconjug Chem. 2008 Feb;19(2):406-11.
- 123) Agrawal A, Pulendran B. Anthrax lethal toxin: a weapon of multisystem destruction. *Cell. Mol. Life Sci.* 2004 Nov;61(22):2859-2865.
- 124) Bogdan C, Paik J, Vodovotz Y, Nathan C. Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *J. Biol. Chem.* 1992 Nov 15;267(32):23301-23308.
- 125) Valledor AF, Ricote M. Nuclear receptor signaling in macrophages. *Biochem. Pharmacol.* 2004 Jan 15;67(2):201-212.
- 126) Ehrchen J, Steinmüller L, Barczyk K, Tenbrock K, Nacken W, Eisenacher M, et al. Glucocorticoids induce differentiation of a specifically activated, anti-inflammatory subtype of human monocytes. *Blood.* 2007 Feb 1;109(3):1265-1274.
- 127) Goldstein JL, Helgeson JA, Brown MS. Inhibition of cholesterol synthesis with compactin renders growth of cultured cells dependent on the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* 1979 Jun 25;254(12):5403-5409.
- 128) Krieger M. The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense. *Curr. Opin. Lipidol.* 1997 Out;8(5):275-280.
- 129) Plüddemann, A, Neyen, C, Gordon, S Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands. *Methods.* 2007; 43(3):207-17 ()
- 130) Fabrick BO, Dijkstra CD, van den Berg TK. The macrophage scavenger receptor CD163. *Immunobiology.* 2005;210(2-4):153-160.
- 131) Aruffo A, Bowen MA, Patel DD, Haynes BF, Starling GC, Gebe JA, et al. CD6-ligand interactions: a paradigm for SRCR domain function? *Immunol. Today.* 1997 Out;18(10):498-504.
- 132) Gronlund J, Vitved L, Lausen M, Skjodt K, Holmskov U. Cloning of a novel scavenger receptor cysteine-rich type I transmembrane molecule (M160) expressed by human macrophages. *J. Immunol.* 2000 dez 1;165(11):6406-6415.
- 133) Holmskov U, Mollenhauer J, Madsen J, Vitved L, Gronlund J, Tornøe I, et al. Cloning of gp-340, a putative opsonin receptor for lung surfactant protein D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999 set 14;96(19):10794-10799.
- 134) Van den Heuvel MM, Tensen CP, van As JH, Van den Berg TK, Fluitsma DM, Dijkstra CD, et al. Regulation of CD 163 on human macrophages: cross-linking of CD163 induces signaling and activation. *J. Leukoc. Biol.* 1999 Nov;66(5):858-866.
- 135) Resnik KS, Kantor GR, Telang GH, Howe NR. Ichthyosis. Basal cell carcinoma. Granuloma annulare. Self-assessment examination of the American Academy of Dermatology. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1994 Jan;30(1):153-156; quiz

149-152.

- 136) Gordon S. Homeostasis: a scavenger receptor for haemoglobin. *Curr. Biol.* 2001 Maio 15;11(10):R399-401.
- 137) Högger P, Dreier J, Droste A, Buck F, Sorg C. Identification of the integral membrane protein RM3/1 on human monocytes as a glucocorticoid-inducible member of the scavenger receptor cysteine-rich family (CD163). *J. Immunol.* 1998 ago 15;161(4):1883-1890.
- 138) Sarrias MR, Gronlund J, Padilla O, et al. The scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) domain: an ancient and highly conserved protein module of the innate immune system. *Crit Rev Immunol* 2004;24(1):1-37.
- 139) Radzun HJ, Kreipe H, Bödewadt S, Hansmann ML, Barth J, Parwaresch MR. Ki-M8 monoclonal antibody reactive with an intracytoplasmic antigen of monocyte/macrophage lineage. *Blood.* 1987 Maio;69(5):1320-1327.
- 140) Pulford K, Micklem K, McCarthy S, Cordell J, Jones M, Mason DY. A monocyte/macrophage antigen recognized by the four antibodies GHI/61, Ber-MAC3, Ki-M8 and SM4. *Immunology.* 1992 Abr;75(4):588-595.
- 141) Zwadlo G, Brügggen J, Gerhards G, Schlegel R, Sorg C. Two calcium-binding proteins associated with specific stages of myeloid cell differentiation are expressed by subsets of macrophages in inflammatory tissues. *Clin. Exp. Immunol.* 1988 Jun;72(3):510-515.
- 142) Law CL, Torres RM, Sundberg HA, Parkhouse RM, Brannan CI, Copeland NG, et al. Organization of the murine Cd22 locus. Mapping to chromosome 7 and characterization of two alleles. *J. Immunol.* 1993 Jul 1;151(1):175-187.
- 143) Ritter M, Buechler C, Langmann T, Schmitz G. Genomic organization and chromosomal localization of the human CD163 (M130) gene: a member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999 Jul 5;260(2):466-474.
- 144) Dijkstra J, van Galen M, Scherphof G. Effects of (dihydro)cytochalasin B, colchicine, monensin and trifluoperazine on uptake and processing of liposomes by Kupffer cells in culture. *Biochim. Biophys. Acta.* 1985 Abr 22;845(1):34-42.
- 145) Philippidis P, Mason JC, Evans BJ, Nadra I, Taylor KM, Haskard DO, et al. Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circ. Res.* 2004 Jan 9;94(1):119-126.

- 146) Wenzel I, Roth J, Sorg C. Identification of a novel surface molecule, RM3/1, that contributes to the adhesion of glucocorticoid-induced human monocytes to endothelial cells. *Eur. J. Immunol.* 1996 nov;26(11):2758-2763.
- 147) Buechler C, Ritter M, Orsó E, Langmann T, Klucken J, Schmitz G. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J. Leukoc. Biol.* 2000 jan;67(1):97-103.
- 148) Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature.* 2001 Jan 11;409(6817):198-201.
- 149) Madsen M, Møller HJ, Nielsen MJ, Jacobsen C, Graversen JH, van den Berg T, et al. Molecular characterization of the haptoglobin.hemoglobin receptor CD163. Ligand binding properties of the scavenger receptor cysteine-rich domain region. *J. Biol. Chem.* 2004 Dez 3;279(49):51561-51567.
- 150) Schaer DJ, Schaer CA, Buehler PW, Boykins RA, Schoedon G, Alayash AI, et al. CD163 is the macrophage scavenger receptor for native and chemically modified hemoglobins in the absence of haptoglobin. *Blood.* 2006 jan 1;107(1):373-380.
- 151) Nielsen MJ, Møller HJ, Moestrup SK. Hemoglobin and heme scavenger receptors. *Antioxid Redox Signal.* 2010 Feb;12(2):261-73.
- 152) Van Gorp H, Delputte PL, Nauwynck HJ. Scavenger receptor CD163, a Jack-of-all-trades and potential target for cell-directed therapy. *Mol. Immunol.* 2010 abr;47(7-8):1650-1660.
- 153) Frankenberg N, Moser J, Jahn D. Bacterial heme biosynthesis and its biotechnological application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003 dez;63(2):115-127.
- 154) Furuyama K, Kaneko K, Vargas PD. Heme as a magnificent molecule with multiple missions: heme determines its own fate and governs cellular homeostasis. *Tohoku J. Exp. Med.* 2007 set;213(1):1-16.
- 155) Stojiljkovic I, Perkins-Balding D. Processing of heme and heme-containing proteins by bacteria. *DNA Cell Biol.* 2002 Apr;21(4):281-95.
- 156) Otto BR, Verweij-van Vught AM, MacLaren DM. Transferrins and heme-

- compounds as iron sources for pathogenic bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 1992;18(3):217-233.
- 157) Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M. Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005 dez 9;338(1):558-567.
- 158) Wilks, A. and Burkhard, K. A. Heme and virulence: How bacterial pathogens regulate, transport and utilize heme. *Nat. Prod. Reports.* 2007; 24, 511-522.
- 159) Reniere ML, Skaar EP. Staphylococcus aureus haem oxygenases are differentially regulated by iron and haem. *Mol. Microbiol.* 2008 set;69(5):1304-1315.
- 160) Tiburzi F, Imperi F, Visca P. Is the host heme incorporated in microbial heme-proteins? *IUBMB Life.* 2009 jan;61(1):80-83.
- 161) Payne, S. M., and K. M. Lawlor. Molecular studies on iron-acquisition by non-Escherichia coli species, p. 225–248. In B. H. Iglewski and V. L. Clark(ed.), *The bacteria*, vol. 11. 1990. Academic Press, New York, N.Y.
- 162) Olakanmi O, Schlesinger LS, Ahmed A, Britigan BE. Intraphagosomal Mycobacterium tuberculosis acquires iron from both extracellular transferrin and intracellular iron pools. Impact of interferon-gamma and hemochromatosis. *J. Biol. Chem.* 2002 dez 20;277(51):49727-49734.
- 163) Jones CM, Niederweis M. Mycobacterium tuberculosis can utilize heme as an iron source. *J. Bacteriol.* 2011 abr;193(7):1767-1770.
- 164) Hall RM, Ratledge C. Exochelin-mediated iron acquisition by the leprosy bacillus, Mycobacterium leprae. *J. Gen. Microbiol.* 1987 jan;133(1):193-199.
- 165) Pessolani MC, Smith DR, Rivoire B, McCormick J, Hefta SA, Cole ST, et al. Purification, characterization, gene sequence, and significance of a bacterioferritin from Mycobacterium leprae. *J. Exp. Med.* 1994 jul 1;180(1):319-327.
- 166) Lara FA, Lins U, Paiva-Silva G, Almeida IC, Braga CM, Miguens FC, et al. A new intracellular pathway of haem detoxification in the midgut of the cattle tick Boophilus microplus: aggregation inside a specialized organelle, the hemosome. *J. Exp. Biol.* 2003 maio;206(Pt 10):1707-1715.

- 167) Lara FA, Sant'anna C, Lemos D, Laranja GAT, Coelho MGP, Reis Salles I, et al. Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007 mar 30;355(1):16-22.
- 168) Alcaraz MJ, Fernández P, Guillén MI. Anti-inflammatory actions of the heme oxygenase-1 pathway. *Curr. Pharm. Des.* 2003;9(30):2541-2551.
- 169) Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, et al. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat. Med.* 2000 Abr;6(4):422-428.
- 170) Dulak J, Józkwicz A. Carbon monoxide - a "new" gaseous modulator of gene expression. *Acta Biochim. Pol.* 2003;50(1):31-47.
- 171) Droste A, Sorg C, Högger P. Shedding of CD163, a novel regulatory mechanism for a member of the scavenger receptor cysteine-rich family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999 mar 5;256(1):110-113.
- 172) Matsushita N, Kashiwagi M, Wait R, Nagayoshi R, Nakamura M, Matsuda T, et al. Elevated levels of soluble CD163 in sera and fluids from rheumatoid arthritis patients and inhibition of the shedding of CD163 by TIMP-3. *Clin. Exp. Immunol.* 2002 Out;130(1):156-161.
- 173) Weaver LK, Pioli PA, Wardwell K, Vogel SN, Guyre PM. Up-regulation of human monocyte CD163 upon activation of cell-surface Toll-like receptors. *J. Leukoc. Biol.* 2007 mar;81(3):663-671.
- 174) Sulahian TH, Pioli PA, Wardwell K, Guyre PM. Cross-linking of Fcγ₂R triggers shedding of the hemoglobin-haptoglobin scavenger receptor CD163. *J. Leukoc. Biol.* 2004 Jul;76(1):271-277.
- 175) Timmermann M, Högger P. Oxidative stress and 8-iso-prostaglandin F₂(α) induce ectodomain shedding of CD163 and release of tumor necrosis factor-α from human monocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 2005 Jul 1;39(1):98-107.
- 176) L Zheng, P H Nibbering, T P Zomerdiik, and R van Furth. Protein tyrosine kinase activity is essential for Fc γ₂ receptor-mediated intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by human monocytes. *Infect Immun.* 1994 October; 62(10): 4296-4303.
- 177) Sulahian TH, Hintz KA, Wardwell K, Guyre PM. Development of an ELISA to measure soluble CD163 in biological fluids. *J. Immunol. Methods.* 2001 Jun 1;252(1-2):25-31.

- 178) Aristoteli LP, Møller HJ, Bailey B, Moestrup SK, Kritharides L. The monocytic lineage specific soluble CD163 is a plasma marker of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2006 Feb;184(2):342-7. Epub 2005 Jun 23.
- 179) Hiraoka A, Horiike N, Akbar SM, Michitaka K, Matsuyama T, Onji M. Soluble CD163 in patients with liver diseases: very high levels of soluble CD163 in patients with fulminant hepatic failure. *J Gastroenterol*. 2005 Jan;40(1):52-6.
- 180) Demetter P, De Vos M, Van Huysse JA, Baeten D, Ferdinande L, Peeters H, Mielants H, Veys EM, De Keyser F, Cuvelier CA. Colon mucosa of patients both with spondyloarthritis and Crohn's disease is enriched with macrophages expressing the scavenger receptor CD163. *Ann Rheum Dis*. 2005; 64: 321–324.
- 181) Møller HJ, Aerts H, Grønbaek H, Peterslund NA, Hyltoft Petersen P, Hornung N, et al. Soluble CD163: a marker molecule for monocyte/macrophage activity in disease. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl*. 2002;237:29-33.
- 182) Woodward J, Sisley K, Reeves G, Nichols C, Parsons MA, Mudhar H, Rennie I. Evidence of macrophage and lymphocyte, but not dendritic cell, infiltration in Posterior uveal melanomas, whilst cultured uveal melanomas demonstrate pluripotency by expressing CD68 and CD163. *Int J Exp Pathol*. 2004; 85: 35–43.
- 183) Møller HJ, Peterslund NA, Graversen JH, Moestrup SK. Identification of the hemoglobin scavenger receptor/CD163 as a natural soluble protein in plasma. *Blood*. 2002 Jan 1;99(1):378-380.
- 184) Funding M, Vorum H, Nexø E, Moestrup SK, Ehlers N, Møller HJ. Soluble CD163 and interleukin-6 are increased in aqueous humour from patients with endothelial rejection of corneal grafts. *Acta Ophthalmol Scand*. 2005; 83: 234–239.
- 185) Schaer DJ, Schleiffenbaum B, Kurrer M, Imhof A, Bächli E, Fehr J, et al. Soluble hemoglobin-haptoglobin scavenger receptor CD163 as a lineage-specific marker in the reactive hemophagocytic syndrome. *Eur. J. Haematol*. 2005 Jan;74(1):6-10.
- 186) Knudsen TB, Gustafson P, Kronborg G, Kristiansen TB, Moestrup SK, Nielsen JO, Gomes V, Aaby P, Lisse I, Møller HJ, Eugen-Olsen J. Predictive value of soluble haemoglobin scavenger receptor CD163 serum levels for survival in verified tuberculosis patients. *Clin Microbiol Infect*. 2005; 11: 730–735.

- 187) Weaver LK, Hintz-Goldstein KA, Pioli PA, Wardwell K, Qureshi N, Vogel SN, et al. Pivotal advance: activation of cell surface Toll-like receptors causes shedding of the hemoglobin scavenger receptor CD163. *J. Leukoc. Biol.* 2006 Jul;80(1):26-35.
- 188) Møller HJ, Nielsen MJ, Maniecki MB, Madsen M, Moestrup SK. Soluble macrophage-derived CD163: a homogenous ectodomain protein with a dissociable haptoglobin-hemoglobin binding. *Immunobiology.* 2010 maio;215(5):406-412.
- 189) Frings W, Dreier J, Sorg C. Only the soluble form of the scavenger receptor CD163 acts inhibitory on phorbol ester-activated T-lymphocytes, whereas membrane-bound protein has no effect. *FEBS Lett.* 2002 Ago 28;526(1-3):93-96.
- 190) Falk, J.E. Porphyrins and Metalloporphyrins. Their general, physical and coordination chemistry, and laboratory methods, vol.2. 1964. BBA-library/ Elsevier, Amsterdam.
- 191) Montoya D, Modlin RL. Learning from leprosy: insight into the human innate immune response. *Adv. Immunol.* 2010;105:1-24.
- 192) Pandey AK, Sasseti CM. Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. *PNAS.* March 18, 2008; 105: 4376 – 4380.
- 193) Mattos KA, D'Avila H, Rodrigues LS, Oliveira VGC, Sarno EN, Atella GC, et al. Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *J. Leukoc. Biol.* 2010 mar;87(3):371-384.
- 194) Davis BH, Zarev PV. Human monocyte CD163 expression inversely correlates with soluble CD163 plasma levels. *Cytometry B Clin Cytom.* 2005 jan;63(1):16-22.
- 195) Etzerodt A, Maniecki MB, Møller K, Møller HJ, Moestrup SK. Tumor necrosis factor α -converting enzyme (TACE/ADAM17) mediates ectodomain shedding of the scavenger receptor CD163. *J. Leukoc. Biol.* 2010 dez;88(6):1201-1205.
- 196) de la Maza LM, Peterson EM. Dependence of the in vitro antiproliferative activity of recombinant human gamma-interferon on the concentration of tryptophan in culture media. *Cancer Res.* 1988 jan 15;48(2):346-350.

- 197) Terness P, Bauer TM, Röse L, Dufter C, Watzlik A, Simon H, et al. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J. Exp. Med.* 2002 ago 19;196(4):447-457.
- 198) Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat. Rev. Immunol.* 2004 out;4(10):762-774.
- 199) Jenkins SJ, Ruckerl D, Cook PC, Jones LH, Finkelman FD, van Rooijen N, MacDonald AS, Allen JE. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science.* 2011 Jun 10;332(6035):1284-8.
- 200) Fabrick BO, van Bruggen R, Deng DM, Ligtenberg AJM, Nazmi K, Schornagel K, et al. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood.* 2009 jan 22;113(4):887-892.
- 201) Hu X, Paik PK, Chen J, Yamilina A, Kockeritz L, Lu TT, Woodgett JR, Ivashkiv LB. IFN-gamma suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins. *Immunity.* 2006 May;24(5):563-74.
- 202) Sulahian TH, Högger P, Wahner AE, Wardwell K, Goulding NJ, Sorg C, et al. Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155. *Cytokine.* 2000 set;12(9):1312-1321.
- 203) Byrne GI, Lehmann LK, Landry GJ. Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular *Chlamydia psittaci* replication in T24 cells. *Infect. Immun.* 1986 ago;53(2):347-351.
- 204) Knubel CP, Martínez FF, Fretes RE, Díaz Lujan C, Theumer MG, Cervi L, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is critical for host resistance against *Trypanosoma cruzi*. *FASEB J.* 2010 ago;24(8):2689-2701.
- 205) Ogasawara N, Oguro T, Sakabe T, Matsushima M, Takikawa O, Isobe K, Nagase F. Hemoglobin induces the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells through the activation of PI3K, PKC, and NF-kappaB and the generation of reactive oxygen species. *J Cell Biochem.* 2009 Oct 15;108(3):716-25.

- 206) Bridges, K.R.; Seligman, P.A. Disorders of iron metabolism. In: HANDIN, R.I.; LUX, S.E.; STOSSEL, T.P. *Blood: principles and practice of hematology*, Philadelphia, J.B. Lippincott Co, p.1433-72, 1995.
- 207) Barry CE 3rd, Boshoff H. Getting the iron out. *Nat. Chem. Biol.* 2005 ago;1(3):127-128.
- 208) Gupta V, Gupta RK, Khare G, Salunke DM, Tyagi AK. Crystal structure of Bfr A from *Mycobacterium tuberculosis*: incorporation of selenomethionine results in cleavage and demetallation of haem. *PLoS ONE.* 2009;4(11):e8028.
- 209) Takatsuka M, Osada-Oka M, Satoh EF, Kitadokoro K, Nishiuchi Y, et al. 2011 A Histone-Like Protein of *Mycobacteria* Possesses Ferritin Superfamily Protein-Like Activity and Protects against DNA Damage by FentonReaction. *PLoS ONE* 6(6): e20985.doi:10.1371/journal.pone.0020985
- 210) Boelaert JR, Vandecasteele SJ, Appelberg R, Gordeuk VR. The effect of the host's iron status on tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 2007 jun 15;195(12):1745-1753.
- 211) Gobin J, Horwitz MA. Exochelins of *Mycobacterium tuberculosis* remove iron from human iron-binding proteins and donate iron to mycobactins in the *M. tuberculosis* cell wall. *J Exp Med.* 1996 Apr 1;183(4):1527-32.
- 212) Luo M, Fadeev EA, Groves JT. Mycobactin-mediated iron acquisition within macrophages. *Nat. Chem. Biol.* 2005 ago;1(3):149-153.
- 213) Quadri, LEN, Ratledge, C. Iron methabolism in the tubercle bacillus and other mycobacteria, p. 341-357. In: ST, Cole, KD, Eisenach, DN McMurray, WR, Jacobs Jr (ed.), *Tuberculosis and the tubercle bacillus*. ASM Press, Washington, DC.
- 214) Weiss G. Iron and immunity: a double-edged sword. *Eur. J. Clin. Invest.* 2002 mar;32 Suppl 1:70-78.
- 215) Alpert PT. New and emerging theories of cardiovascular disease: infection and elevated iron. *Biol Res Nurs.* 2004 jul;6(1):3-10.
- 216) Vallelian F, Schaer CA, Kaempfer T, Gehrig P, Duerst E, Schoedon G, et al. Glucocorticoid treatment skews human monocyte differentiation into a hemoglobin-clearance phenotype with enhanced heme-iron recycling and

antioxidant capacity. *Blood*. 2010 dez 9;116(24):5347-5356.

- 217) Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54.

Anexo I:

Artigo Submetido