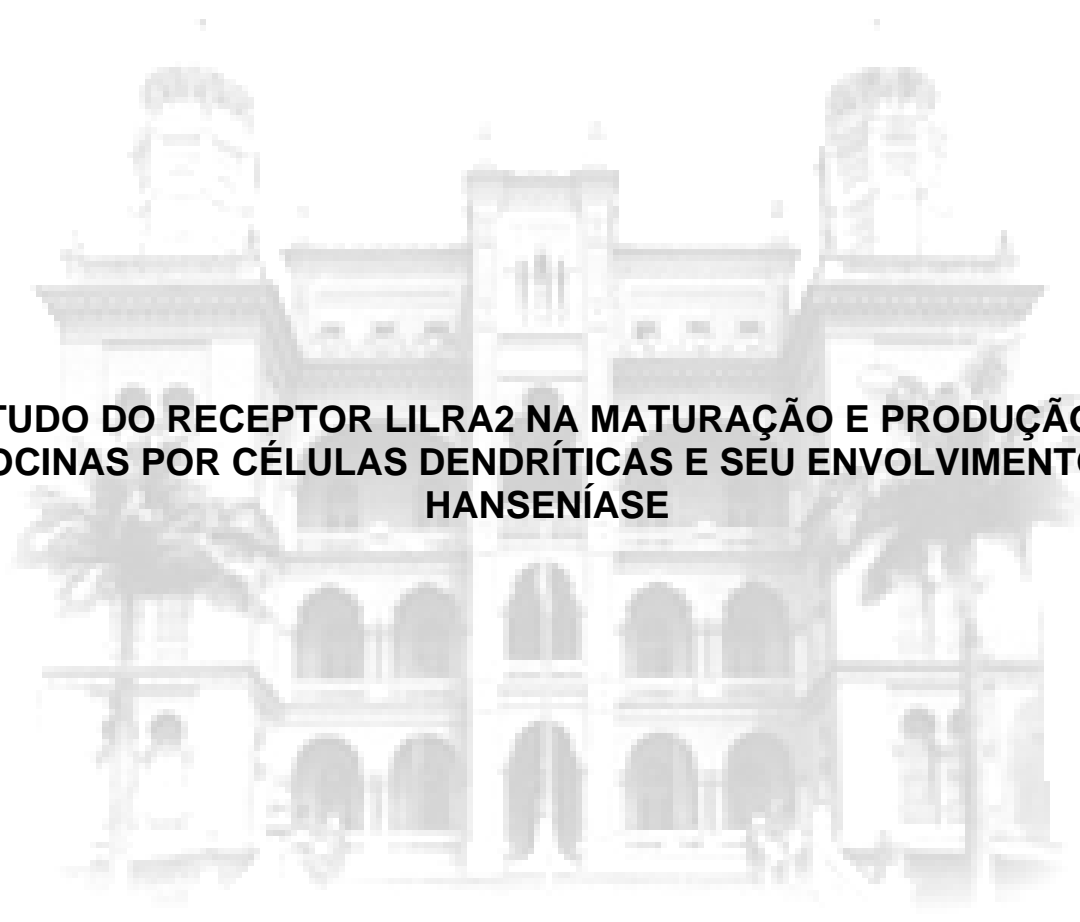


**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Doutorado em Biologia Celular e Molecular**



**ESTUDO DO RECEPTOR LILRA2 NA MATURAÇÃO E PRODUÇÃO DE  
CITOCINAS POR CÉLULAS DENDRÍTICAS E SEU ENVOLVIMENTO NA  
HANSENÍASE**

**MARISTELA OLIVEIRA HERNANDEZ**

Rio de Janeiro  
2007

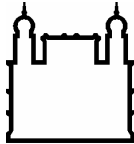
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Celular e Molecular

ESTUDO DO RECEPTOR LILRA2 NA MATURAÇÃO E  
PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR CÉLULAS DENDRÍTICAS  
E SEU ENVOLVIMENTO NA HANSENÍASE

MARISTELA OLIVEIRA HERNANDEZ

Rio de Janeiro  
2007



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

MARISTELA OLIVEIRA HERNANDEZ

ESTUDO DO RECEPTOR LILRA2 NA MATURAÇÃO E PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR CÉLULAS DENDRÍTICAS E SEU ENVOLVIMENTO NA HANSENÍASE.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de hanseníase da FIOCRUZ e no laboratório do Dr Marco Colonna na Washington University in St. Louis.

**Orientadora:** Prof. Dr. Elizabeth Pereira Sampaio

**RIO DE JANEIRO**

2007

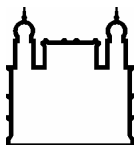
Hernandez, Maristela Oliveira

Estudo do receptor LILRA2 na maturação e produção de citocinas por células dendríticas e seu envolvimento na hanseníase./ Maristela Oliveira Hernandez. – Rio de Janeiro: 2007.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular, 2007.

1. Hanseníase. 2. Células Dendríticas. 3. LILRA2.  
4.DC-SIGN I.Título

CDD:



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***AUTOR: Maristela de Oliveira Hernandez***

**ESTUDO DO RECEPTOR LILRA2 NA MATURAÇÃO E PRODUÇÃO DE  
CITOCINAS POR CÉLULAS DENDRÍTICAS E SEU ENVOLVIMENTO NA  
HANSENÍASE**

**ORIENTADORA : Profa. Dra. Elizabeth Pereira Sampaio**

**Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr.**      Nome - **Presidente**

**Prof. Dr.**      Nome

**Prof. Dr.**      Nome

Rio de Janeiro,    de            de 2007

## *Agradecimentos*

*A Elizabeth Sampaio pela orientação (mesmo à distância), confiança e incentivo sempre!*

*A Euzenir Sarno pela disponibilidade em todas as horas!*

*Ao Marco Colonna pela oportunidade de desenvolver este trabalho, além da ajuda durante os experimentos durante a semana, fim de semana, feriado ..... Sem falar dos conselhos a respeito da carreira científica, entremeados por bate-papos sobre todos os jogadores brasileiros de futebol na Europa!*

*A Marina Cella pela ajuda nos experimentos de biologia celular e IP, pelas aulas a respeito de células dendríticas e dicas de como lidar com cada linhagem celular.*

*Aos amigos Colonna Lab por toda ajuda durante os experimentos e pelas muitas dicas a respeito da vida nos EUA. Anja, Gaëlle, Tim Wilson, Winfred, Izumi, Amanda, Isaiah, Jorge, Susan, Carey, Ilaria, Julia, Rachel, Kent e Leonid.*

*Aos amigos Laura, Luigi, Elisa pela ótima companhia, sem falar dos jantares italianos!*

*Às melhores amigas brasileiras: Blima, Cibele e Emi para as horas de aperto e as de lazer na terra do tio Sam.*

*Aos amigos do laboratório de hanseníase por toda ajuda, além da ótima companhia!! Ana Caroline, Andressa, Aninha, Ariane, Daniel, Danielle, Eliane, João, Rafael, Roberta, Rosaninha, Rose, Tati Fulco, Tati Silva. Vocês fazem do laboratório um lugar muito especial !!*

*A Helen Ferreira pelos experimentos de imunohistoquímica.*

*Ao Bernardo Pascarelli pelas análises e dicas em microscopia confocal.*

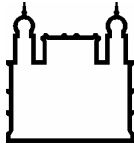
*A Monica Lima e Simone pela ajuda com os experimentos de CBA.*

*Ao Milton Moraes pelo eterno incentivo e ajuda com a (muitas) perguntas a respeito da introdução, resumo, sumário, PGBCM.....*

*Aos amigos do laboratório de hanseníase: Harrison (meu queridíssimo amigo), Luis, Adalberto, Mara, Edina, Augusto, Julio, Marcinha e Mariana Hacker por toda ajuda.*

*Ao Fabian por todo amor e compreensão.*

*À minha mãe, a maior incentivadora de tudo isso!*



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

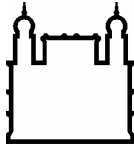
### ESTUDO DO RECEPTOR LILRA2 NA MATURAÇÃO E PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR CÉLULAS DENDRÍTICAS E SEU ENVOLVIMENTO NA HANSENÍASE

#### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO

**Maristela Oliveira Hernandez**

Os receptores da família LILR (Leukocyte Immunoglobulin- like Receptor) pertencem à superfamília das imunoglobulinas e são expressos em células de origem mielóide e linfóide. Os receptores inibidores (LILRB) apresentam longos domínios citoplasmáticos contendo de 2 a 4 domínios ITIM e são capazes de inibir ativação celular recrutando proteínas tirosinas fosfatases SHP-1. Já os receptores ativadores (LILRA) apresentam curto domínio citoplasmático mas após associação com a cadeia gama do receptor Fc, que apresenta domínio ITAM, são capazes de transduzir sinais estimulatórios às células. Já foi demonstrado que LILRB1 e LILRB2 podem inibir a citotoxicidade de células NK e aumentar o limite de ativação de linfócitos T. Pouco se sabe a respeito da função dos receptores ativadores. No entanto, foi observado que LILRA2 estava com a expressão gênica aumentada nas lesões dos pacientes de hanseníase do polo lepromatoso. A função deste receptor foi investigada e os possíveis efeitos do *Mycobacterium leprae* sobre a ativação induzida por LILRA2 avaliados. Foram realizados experimentos de “cross-linking” em células dendríticas derivadas de monócitos (MDDC). Inicialmente, foi observado que após a estimulação através de LILRA2 ocorria aumento no conteúdo de proteínas tirosina fosforiladas, sugerindo haver transdução de sinal. Também foi observado que as MDDC estimuladas via LILRA2 apresentavam marcadores de ativação celular, como a expressão de CD83, aumento na expressão de moléculas co-estimulatórias e do MHC. Foi observado ainda que a ativação de LILRA2 não induz a secreção de níveis significativos das citocinas. No entanto, um forte efeito sinérgico na secreção de TNF e IL-10 pode ser observado quando as células eram estimuladas via LILRA2 e TLR4 ou CD40. Foi observado ainda que após o “cross-linking”, as MDDC apresentam forte capacidade aloestimulatória. A presença de células LILRA2+ CD68+ nas lesões dos pacientes lepromatosos foi detectada utilizando microscopia confocal. Nos experimentos subsequentes foi avaliado se o *M. leprae* ativaria as MDDC e modularia a ativação induzida por LILRA2. Inicialmente observamos que as MDDC estimuladas com *M. tuberculosis*, mas não com *M. leprae*, secretam TNF. Baixas concentrações de IL-10 foram encontradas nas culturas estimuladas com *M. leprae* quando comparadas às culturas estimuladas com *M. tuberculosis*. E ainda, o *M. tuberculosis*, mas não o *M. leprae*, teve efeito sinérgico com LILRA2 na produção de TNF. Na tentativa de encontrar o ligante deste receptor, foi gerado um tetrâmero e sua ligação a diversos tipos celulares foi testada. Interação do tetrâmero com monócitos estimulados com IL-4 e também MDDC foi detectada. Embora experimentos de imunoprecipitação tenham sido realizados, o ligante não foi encontrado. Até o momento, já observamos que a LILRA2 pode favorecer a maturação de MDDC, pelo menos *in vitro*, e contribuir para aumentada produção de citocinas. O *M. leprae* não parece ser um potente ativador das células dendríticas e ainda pode limitar a ativação induzida por outros receptores. A elevada expressão de moléculas co-estimulatórias, a presença de IL-10 e ausência de IL-12 nas MDDC estimuladas com *M. leprae* ou via LILRA2 sugere que estes podem estar envolvidos na indução de tolerância observada nos pacientes lepromatosos.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **ESTUDO DO RECEPTOR LILRA2 NA MATURAÇÃO E PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR CÉLULAS DENDRÍTICAS E SEU ENVOLVIMENTO NA HANSENÍASE.**

#### **ABSTRACT**

#### **TESE DE DOUTORADO**

#### **Maristela Oliveira Hernandez**

LILR (Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor) are a family of receptors from the immunoglobulin superfamily expressed on myeloid and lymphoid cells. LILR are characterized by either 2 or 4 homologous Immunoglobulin-like domains. One subset of receptors, LILRB, displays long cytoplasmatic tails containing immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIM). These receptors inhibit cell activation by recruiting protein tyrosine phosphatase SHP-1. Another subset of receptors, LILRA, contains short cytoplasmatic domain that lack recognizable docking motifs for signalling mediators. These receptors associate with the gamma chain of the Fc receptor, which transduces stimulatory signals by recruiting protein tyrosine kinases through a cytoplasmatic immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). A third subset of receptors has no transmembrane domain and is secreted as a soluble receptor. Some of these receptors, LILRB1 and LILRB2, are specific receptors for MHC class I molecules. LILRBs have been shown to inhibit cell activation in several experimental systems. Little is know about the activating receptors. LILRA2 was found to be up-regulated in lesions of lepromatous leprosy patients. In order to clarify whether this receptor might influence the immune response in leprosy, the function of this receptor was investigated. Cross-linking of LILRA2 on dendritic cell (DC) caused an up-regulation on protein tyrosine phosphorylation, suggesting LILRA2 stimulates intracellular signaling. Upon cross-linking, DC express high levels of MHC I and II and co-stimulatory molecules, but cytokines were not detected on culture supernatant. However, a strong synergistic effect on TNF and IL-10 production was observed when cells were simultaneously stimulated by LILRA2 and TLR4 or CD40. LILRA2 activated DC also induced allogeneic T lymphocytes proliferation. By double immunofluorescence labeling, it was identified that LILRA2 is expressed on macrophage-like CD68+cells in lepromatous leprosy skin lesions. The capacity of *M. leprae* to induce DC activation and/or to modulate LILRA2-induced activation was further investigated. In functional experiments it was observed that *M. tuberculosis* but not *M. leprae* stimulated cells induce TNF secretion. IL-10 was detected on *M. leprae*-stimulated cultures, albeit at lower level than that of *M. tuberculosis*-stimulated cells. *M. leprae* had no synergistic effect on LILRA2 activated cells. To identify LILRA2 ligand, a tetramer was generated and it's binding to different cell types was tested. The tetramer interacted with IL-4 stimulated monocytes and DC. Although Immunoprecipitation experiments were preformed, the ligand was not successfully identified. The data obtained so far indicates that LILRA2 activation enhances DC maturation markers expression and cytokine secretion by activated DC. *M. leprae* is not a potent DC activator. The high surface levels of co-stimulatory molecules, the presence of IL-10 and absence of IL-12 suggest that DC stimulated by *M. leprae* or LILRA2 are only partially activated and they might contribute to lepromatous leprosy tolerance.



## Sumário

1 – Introdução	
1.1 – Os receptores LILR (Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor).....	1
1.2 – Distribuição Celular dos LILR .....	6
1.3 – Os receptores inibitórios – LILRB.....	6
1.4 – Os receptores ativatórios – LILRA .....	9
1.5 – Os receptores PIR .....	11
1.6 – Células Dendríticas (DC).....	12
1.7 – Hanseníase	
1.7.1 – Características Gerais .....	14
1.7.2 – Epidemiologia .....	15
1.7.3 – Patogênese .....	16
1.7.4 – Genética .....	17
1.7.5 – Imunologia .....	17
1.7.6 –Episódios Reacionais .....	22
1.8 – Justificativa .....	25
2 – Objetivos .....	26
3 – Material e Métodos	
3.1 – Produção de anticorpos anti-LILRA2 .....	27
3.1.1 Imunização .....	27
3.1.2 Fusão.....	28
3.1.3 Seleção dos hibridomas por citometria de fluxo .....	28
3.2 – Isolamento de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC).....	28
3.3 – Purificação de Monócitos, Linfócitos, DC plasmacitóides e Células NK .....	28
3.4 – Cultura de Células	
3.4.1 Células Dendríticas Derivadas de Monócitos .....	29
3.4.2 Linfócitos, NK, DC plasmacitóides .....	29
3.4.3 Linhagens celulares .....	29
3.5 – Estímulos .....	29
3.6 – Experimentos de “cross-linking” .....	30
3.7 – Citometria de fluxo para marcadores de superfície .....	30
3.8 – “Citometric Bead Array” (CBA) .....	31
3.9 – Ensaios de “Mixed Leukocyte Reaction” (MLR) .....	31
3.10 – Fragmentos F(ab’) <sub>2</sub> .....	31
3.11 – Detecção de células LILRA2 nas lesões de pacientes lepromatosos .....	32
3.12 – Western Blot .....	33
3.13 – A busca pelo Ligante	
3.13.1 PCR .....	34
3.13.2 Purificação .....	34
3.13.3 Digestão do produto de PCR .....	34
3.13.4 Digestão do vetor .....	35
3.13.5 Ligação .....	35
3.13.6 Transformação .....	35
3.13.7 Miniprep .....	36
3.13.8 Sequenciamento .....	36
3.13.9 MaxiPrep .....	37
3.13.10 Transfecção e Cultura de Células CHO DHFR- .....	37
3.13.11 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) .....	38
3.13.12 Citometria de Fluxo .....	38
3.13.13 – Imunoprecipitação e Espectrometria de Massa .....	39
3.14 – Análise estatística .....	39

4 – Resultados	
4.1 – Anticorpos anti LILRA2 .....	40
4.2 – “Cross –linking” .....	41
4.3 - Expressão de LILRA2 nos tecidos .....	51
4.4 - Efeito das Micobactérias sobre as DC .....	53
4.5 - A busca pelo ligante .....	56
5 – Discussão.....	66
6 – Conclusões.....	81
7 – Referências Bibliográficas .....	82
Apêndice .....	96

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.1</b> – Representação esquemática da organização genômica do LRC .....	3
<b>Figura 1.2</b> – Diagrama esquemático da família LILR. ....	5
<b>Figura 3.1</b> – Esquema do vetor LILRA2-FD1D2-Ig- $\alpha$ TP. ....	35
<b>Figura 4.1</b> – Triagem dos hibridomas. ....	40
<b>Figura 4.2</b> – Análise da expressão de LILRA2 em PBMC por citometria de fluxo. ....	41
<b>Figura 4.3</b> – Detecção de proteínas tirosina fosforiladas nas MDDC. ....	42
<b>Figura 4.4</b> – LILRA2 induz a expressão de moléculas co-estimulatórias nas MDDC. ....	43
<b>Figura 4.5</b> – LILRA2 aumenta a produção de TNF $\alpha$ e IL-10 em resposta ao LPS. ....	45
<b>Figura 4.6</b> – LILRA2 aumenta a produção de TNF e IL-10, mas não a de IL-12, em resposta ao CD40L. ....	47
<b>Figura 4.7</b> – LILRA2 aumenta a produção de TNF e IL-1 $\beta$ em monócitos. ....	48
<b>Figura 4.8</b> – LILRA2 aumenta a produção de IL-10 em resposta a diferentes concentrações de LPS. ....	49
<b>Figura 4.9</b> – MDDC estimuladas através de LILRA2 estimulam a proliferação dos linfócitos T CD4. ....	50
<b>Figura 4.10</b> – Expressão de LILRA2 em linfonodos (a and b), pele (c) e amígdalas (d). ....	51
<b>Figura 4.11</b> – Expressão de LILRA2 em lesões de pacientes com hanseníase. ....	52
<b>Figura 4.12</b> – <i>M. tuberculosis</i> , mas não o <i>M. leprae</i> induz a secreção de TNF de forma dose dependente. ....	53
<b>Figura 4.13</b> – <i>M. tuberculosis</i> e <i>M. leprae</i> induzem a secreção de IL-10. ....	54
<b>Figura 4.14</b> – <i>M. leprae</i> induz a expressão de moléculas co-estimulatórias nas MDDC. ....	55
<b>Figura 4.15</b> – <i>M. leprae</i> não tem efeito sinérgico a LILRA2 na produção de TNF. ....	56
<b>Figura 4.16</b> – Amplificação da região extracelular de vários domínios de LILRA2 por PCR. ....	57
<b>Figura 4.17</b> – Fracionamento por FPLC do sobrenadante das culturas de células CHO produtoras do tetrâmero. ....	58
<b>Figura 4.18</b> – Tetrâmero não se liga a linhagens celulares. ....	60
<b>Figura 4.19</b> – Tetrâmero se liga a células dendríticas e monócitos estimulados com IL-4. ....	61
<b>Figura 4.20</b> - DCN35 inibe a ligação da LILRA2 a células dendríticas. ....	62
<b>Figura 4.21</b> – Tetrâmero e DCN35 se ligam a células dendríticas de forma tempo dependente. ....	63
<b>Figura 4.22</b> – Imunoprecipitação feita em células dendríticas utilizando DCN35.....	64
<b>Figura 4.23</b> – Manana inibe a ligação da LILRA2 a células DC-SIGN+. ....	65
<b>Figura 5.1</b> – Esquema mostrando envolvimento do TLR, DC-SIGN e LILRA2 na hanseníase. ....	78

## Lista de Abreviações

- $\alpha$ TP** – “Alpha Tail Piece”
- BCR** – Receptor de células B
- CBA** – “Cytometric Bead array”
- CD** – “cluster of differentiation”
- CHO** – célula de ovário de hamster chinês
- DC** – Célula Dendrítica
- DC-SIGN** – “DC-specific intercellular-adhesion-molecule-3 grabbing nonintegrin”
- DHFR** – Dihidrofolato redutase
- ERK** – Quinase regulada por sinal extracelular
- FcR** – Receptor Fc
- FPLC** – Cromatografia líquida rápida para proteínas
- HLA** – antígeno de leucócito humano
- IFN** - Interferon
- Ig** - Imunoglobulina
- IL** - Interleucina
- ITAM** – “Immunoreceptor tyrosine-based activation motif”
- ITIM** – “Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif”
- KIR** – “killer immunoglobulin-like receptor”
- LAM** – Lipoarabinomanan
- LILR** – “Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor”
- LL** – Lepromatose lepromatosa
- LPS** - Lipopolissacarídeo
- MDDC** – Células dendríticas derivadas de monócitos
- MHC** – complexo de histocompatibilidade principal
- MLR** – Mixed leukocyte reaction
- NK** – Células matadoras naturais
- PBMC** – células mononucleares do sangue periférico
- pDC** – Células dendríticas plasmacitoides
- PLC $\gamma$ 2** – fosfolipase C  $\gamma$ 2
- PMA** – Forbol 12-Miristato 13-Acetato
- RT-PCR** – Transcrição reversa - reação da polimerase em cadeia
- SFB** – Soro fetal bovino
- TCR** – Receptor de célula T
- TLR** – receptores “toll-like”
- TNF** – Fator de Necrose Tumoral

## 1 – Introdução

### 1.1 – Os receptores LILR (Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor)

Em resposta a infecções, o sistema imune utiliza uma complexa rede de sinais provenientes de diversos receptores para direcionar uma resposta imune apropriada. Os membros da superfamília das imunoglobulinas têm papel fundamental neste processo como receptores de antígenos, moléculas co-estimulatórias, moléculas de adesão, entre outros. Uma família de receptores, os LILRs, começou a ser descrita há duas décadas. Ainda hoje, muito pouco se sabe sobre eles.

Alguns membros da família foram inicialmente denominados ILT (immunoglobulin Like Transcript) (Samaridis e Colonna, 1997), LIR (Leukocytes Immunoglobulin-like Receptor) (Cosman e cols, 1997), MIR (Myeloid Inhibitory Receptor) (Wagtmann e cols, 1997) e CD85 (Banham e cols, 1999). Desde então, já foram descritos onze destes receptores. Mais recentemente, para padronizar a nomenclatura os receptores passaram a ser chamados de LILR. Na tabela 1.1 estão listados os receptores até agora identificados, bem como a nomenclatura anterior de cada um deles.

Esta família de genes se localiza no braço longo do cromossomo 19 (19q13.2-q13.4) numa região denominada LRC (leukocyte receptor cluster) (Wende e cols, 1999). Nesta região são encontrados 29 genes que codificam receptores da família das imunoglobulinas, incluindo LILR, KIR, LAIR, Fc $\alpha$ R, NKp46. Wende e colaboradores (2000) descreveram que a relação estrutural e funcional entre os genes presentes no LRC sugere que eles descendem de um ancestral comum. A existência dos dois agrupamentos LILR, com orientação transcripcional opostas, flanqueados pelos receptores LAIR, é um indicador da ocorrência de uma duplicação e inversão do ancestral LILR/LAIR (Figura 1.1).

Os receptores LILR apresentam 2 ou 4 domínios “imunoglobulina-like” (Colonna e cols, 2000) e são classificados por suas diferentes regiões transmembranas e citoplasmáticas. Nesta família são encontrados receptores ativadores (LILRA), receptores inibidores (LILRB) e também receptores que não apresentam domínio citoplasmático e devem ser secretados como receptores solúveis (Colonna e cols, 1999) (Figura 1.2).

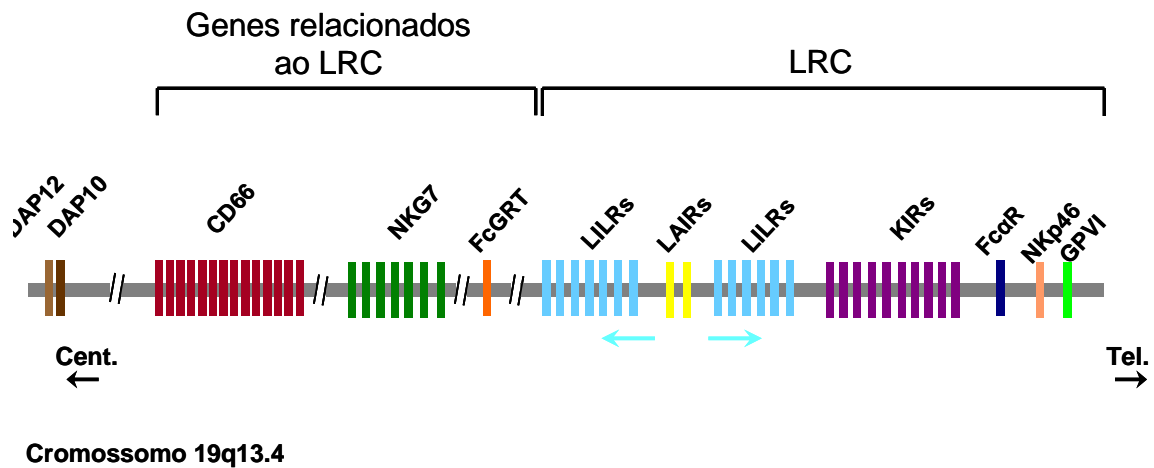
**Tabela 1.1 – Nomenclatura oficial dos receptores da família LILR.**

<b>Nomenclatura Atual</b>	<b>Nomenclaturas Anteriores</b>	<b>Número de Acesso*</b>
<a href="#">LILRA1</a>	LIR-6, CD85i, LIR6	<a href="#">AF025530</a>
<a href="#">LILRA2</a>	LIR-7, ILT1, CD85h, LIR7	<a href="#">U82275</a>
<a href="#">LILRA3</a>	LIR-4, HM43, ILT6, HM31, LIR4, CD85e	<a href="#">U91926</a>
<a href="#">LILRA4</a>	ILT7, CD85g	<a href="#">AF041261</a>
<a href="#">LILRA5</a>	ILT11, LIR9, CD85, CD85f	<a href="#">AF212842</a>
<a href="#">LILRA6</a>	ILT8, CD85b	<a href="#">AF041262</a>
<a href="#">LILRB1</a>	LIR-1, ILT2, MIR-7, CD85, LIR1, CD85j	<a href="#">AF009220</a>
<a href="#">LILRB2</a>	LIR-2, ILT4, MIR-10, LIR2, CD85d, MIR10	<a href="#">AF000574</a>
<a href="#">LILRB3</a>	LIR-3, HL9, ILT5, LIR3, CD85a	<a href="#">U91928</a>
<a href="#">LILRB4</a>	LIR-5, ILT3, HM18, LIR5, CD85k	<a href="#">U82979</a>
<a href="#">LILRB5</a>	LIR-8, LIR8, CD85c	<a href="#">AF025534</a>
<a href="#">LILRP1</a>	ILT9, CD85l, LILRA6P	<a href="#">AF072102</a>
<a href="#">LILRP2</a>	ILT10, CD85m	<a href="#">AF072100</a>

Todos os receptores da família descritos até agora estão listados juntamente com os nomes previamente atribuídos a cada um deles. LILRA- Receptores ativadores da família LILR. LILRB – Receptores inibidores da família LILR. LILRP – Pseudogenes da família LILR.

\* Número de acesso no GeneBank.

<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/lilr.php>



**Figura 1.1 – Representação esquemática da organização genômica do LRC** (Leukocyte Receptor Cluster). Cent. – centrômero; tel – telômero. As setas azuis indicam o sentido de transcrição dos 2 grupamentos LILR/LAIR. (Figura adaptada de Brown e cols, 2004)

O grupo de receptores ativadores, LILRA, contém um curto domínio citoplasmático que não parece induzir transdução de sinal. No entanto, estes receptores contêm uma arginina carregada positivamente na região transmembrana que possibilita a associação destes receptores com FcR $\gamma$  (a cadeia gama dos receptores Fc, responsável pela transdução de sinal) (Nakajima e cols, 1999) e esta por sua vez é capaz de recrutar proteínas tirosina quinase através do domínio ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif).

O domínio ITAM foi inicialmente descrito como uma seqüência na parte citoplasmática das cadeias sinalizadoras associadas a receptores antigênicos TCR, BCR e FcR (Reth, 1989). Atualmente, já foi identificado que o motivo YxxL/Ix6-8YxxL/I (onde x representa qualquer aminoácido) também é encontrado em alguns receptores como Dectin-1 (Brown GD e cols, 2003) e nas moléculas adaptadoras FcR $\gamma$  e também DAP12, sendo crítico para ativar a transdução de sinal (Humphrey e cols, 2005).

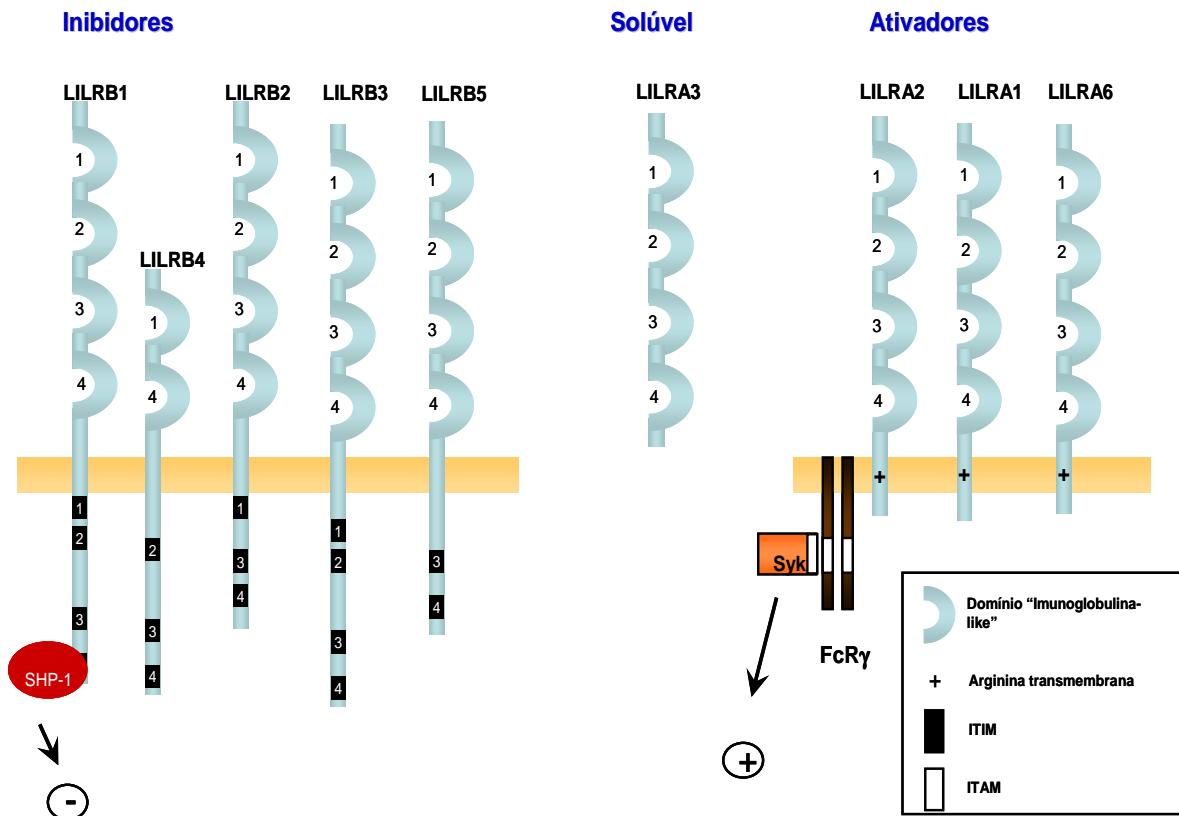
Após a estimulação, os resíduos de tirosina dos ITAM são fosforilados por quinases da família Src, permitindo o ancoramento de proteínas contendo o domínio SH2 (Src homology 2), como Syk ou então ZAP-70. A transdução de sinal leva então a ativação da fosfolipase C $\gamma$ , proteína quinase c, MAPK (mitogen-activated protein kinase), NF- $\kappa$ B, entre outros. Estas proteínas adaptadoras estão presente em diversos tipos celulares envolvidos na resposta imune inata, adaptativa e também em células não imunes (Fodor e cols, 2006).

Os receptores inibidores, LILRB, apresentam longos domínios citoplasmáticos contendo motivos ITIM e inibem a ativação celular recrutando proteínas tirosina fosfatase.

Os domínios ITIM (Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) são definidos por uma seqüência (I/V/L/S)xYxx(L/V) e ligam proteínas tirosinas fosfatases SHP-1, SHP-2 ou SHIP (Vely e Vivier, 1997) (Ravetch e Lanier, 2000). Estas fosfatases defosforilam proteínas ou lipídios, reduzindo a ativação celular. O balanço entre os sinais ativadores e inibidores pode determinar o nível de resposta do sistema imune.

É importante ressaltar que mais recentemente, foi demonstrado que receptores contendo domínios ITAM também podem transduzir sinais inibidores. Hamerman e cols (2005) observaram que o adaptador DAP12 inibia a resposta de macrófagos em resposta a TLR. Os camundongos DAP12<sup>-/-</sup> produziram maiores quantidades de citocinas pro-inflamatórias em resposta a uma variedade de estímulos patogênicos. Isto sugere que nos macrófagos selvagens o sinal proveniente de DAP12 é importante para limitar a produção de citocinas induzidas pelos TLR. De forma semelhante, Pasquier e cols (2005) descreveram que Fc $\alpha$ RI (a cadeia responsável pela sinalização dos receptores para IgA) inibiu fagocitose mediada por IgG em macrófagos e a degranulação de mastócitos mediada pela IgE. Nos dois estudos, a atividade inibitória dos receptores foi mediada pelos resíduos de tirosina nos ITAM.





**Figura 1.2 – Diagrama esquemático da família LILR.** Os membros desta família contêm 2 ou 4 domínios "Ig-like" e são classificados de acordo com sua região transmembrana e citoplasmática. Os receptores inibidores apresentam longos domínios citoplasmáticos contendo de 2 a 4 domínios ITIM. Estes são capazes de inibir ativação celular recrutando proteínas tirosinas fosfatases SHP-1. Já os receptores ativadores apresentam curto domínio citoplasmático sem nenhum sítio de ligação de moléculas envolvidas na transdução de sinal. No entanto, a presença de um resíduo arginina na região transmembrana possibilita a associação com a cadeia gamma do receptor Fc que apresenta domínios ITAM, capazes de transduzir sinais estimulatórios as células. Um terceiro subgrupo não apresenta domínio transmembrana e os receptores devem ser encontrados como receptores solúveis. (Figura adaptada de Borges e Cosman, 2000)

## 1.2 – Distribuição Celular dos LILR

Os receptores desta família são expressos em células de origem mielóide e linfóide. O padrão de expressão dos LILR foi determinado usando anticorpos monoclonais ou RT-PCR (Colonna e cols, 2000). Todos os receptores LILR são expressos pelos monócitos, macrófagos e células dendríticas derivadas de monócitos. LILRA2 e LILRB3 são expressos por granulócitos e alguns grupos de células T e NK. LILRB1 é o único destes receptores expresso por linfócitos B.

Cella e cols (1999) descreveram que com base na expressão de LILRA2 e LILRB4 era possível distinguir duas subpopulações celulares, as células Lin-/LILRA2+/LILRB4+ correspondem a precursores das células dendríticas mielóides enquanto as Lin-/LILRA2-/LILRB4+ correspondem a precursores das células dendríticas plasmacitóides. A partir desta distinção foi possível demonstrar que estas células produzem altas quantidades de IFN tipo I durante as infecções virais. Mais recentemente, foi descrito que LILRA4 é expresso exclusivamente por células dendríticas plasmacitóides (Ju e cols, 2004; Rissoan e cols, 2002).

## 1.3 – Os receptores inibidores – LILRB

Alguns estudos evidenciaram que os LILRB se ligam a moléculas do HLA. Colonna e cols. (1997) descreveram que LILRB1 se liga a moléculas de MHC I clássicas (HLA-A, HLA-B) e também não clássicas (HLA-G). Semelhante aos receptores KIR, este receptor foi capaz de inibir a atividade citotóxica de células NK via tirosina fosfatase SHP-1. Além disso, LILRB1 inibiu atividade citotóxica de linfócitos T e reduziu a mobilização de  $Ca^{++}$  em linfócitos B e células mielomonocíticas em resposta a estimulação do BCR e HLA-DR, respectivamente. LILRB1 foi subsequenteiramente identificado como o ligante para UL18, uma proteína homóloga ao MHC classe I codificada por citomegalovírus (Cosman e cols, 1997).

O receptor LILRB2 também se mostrou capaz de reconhecer moléculas MHC classe I. A proteína recombinante solúvel se ligou a células transfectadas com MHC I, bem como tetrâmeros de MHC I se ligaram a células transfectadas com LILRB2, mas não a células não transfectadas. O “cross linking” deste receptor inibiu ativação de DC *in vitro* (Colonna e cols, 1998). De forma semelhante, Borges e cols (1997) detectaram que a ligação das proteínas recombinante LILRB1 e LILRB2 a linfócitos T ativados era bloqueada por anticorpos anti MHC.

Mais recentemente foi descrito que a ativação de LILRB1 inibiu a sinalização através do TCR em células Jurkat, onde foram observados reduzida fosforilação do TCR $\zeta$  e LAT (linker for activation of T cells). O rearranjo do citoesqueleto também foi reduzido nas células onde LILRB1 foi ativado (Dietrich e cols, 2001). Os receptores LILRB1 e LILRB2 inibiram a ativação mediada através do Fc $\gamma$ RI (Fanger e cols, 1998) e por OSCAR (Tenca e cols, 2005) em monócitos e DC, respectivamente. Ficou assim evidenciado que LILRB1 e LILRB2 se ligam a MHC classe I e que estes receptores tem atividade inibidora em células de origem linfóide e mielóide estimuladas por diferentes vias.

A interação das DC com células HLA-G+ não inibiu a maturação das DC. No entanto, foi observado que as células passam a secretar IL-10 e IL-6 e ainda passam a ter reduzida capacidade aloestimulatória (Apps e cols, 2007). Desta forma, a interação LILRB1 com HLA-G, na placenta, parece modular a resposta imune materna ao feto.

Diferente dos KIR, que interagem com fração polimórfica das moléculas do MHC, Willcox e cols (2003) utilizando cristalografia demonstraram que LILRB1 interage com  $\alpha 3$ , a fração com menor polimorfismo da cadeia  $\alpha$  do MHC classe I e com a cadeia invariável  $\beta 2M$ . Estes resultados explicam o amplo reconhecimento de moléculas MHC classe I de maneira independente de peptídeos pelos LILR. Shiroishi e cols. (2003) descreveram que embora o sítio de ligação LILRB1 e LILRB2 não seja idêntico, estes receptores competem pelo sítio de ligação no MHC com o CD8.

No entanto, nem todos os receptores inibidores parecem reconhecer moléculas do complexo de histocompatibilidade. LILRB3 em experimentos de “cross-linking” teve efeito inibidor, porém não se ligou ao MHC classe I (Colonna e cols, 1998). Embora apresentem alta homologia com os receptores KIR, vem sendo sugerido que os LILR podem reconhecer moléculas bastante distintas daquelas relacionadas ao complexo de histocompatibilidade e tenham funções diversificadas.

LILRB4 foi capaz de regular negativamente a atividade de células apresentadoras de antígeno *in vitro* em resposta a diversos receptores, incluindo CD11b, CD16 e mesmo HLA-DR. Cella e cols (1997) observaram que este receptor parece participar do processo de captura e apresentação de antígenos, semelhante a outras proteínas contendo ITIM que têm a função de internalizar e direcionar antígenos para os compartimentos de processamento antigênico, como FcγRIIB (Muta e cols, 1994). LILRB4 também é expresso por células dendríticas plasmacitóides (Cella e cols, 1999).

Velten e cols (2004) demonstraram que DC mantidas na presença de IL-10 têm a expressão de receptores inibidores aumentada, incluindo LILRB1, B2, B3 e B4. As células com forte expressão de LILRB se mostraram hipoestimulatórias. Na presença de um anticorpo neutralizante anti LILRB2 uma maior linfoproliferação foi observada (Beinhauer e cols, 2004).

É possível que estes receptores além de permitirem às células imunes reconhecerem a falta de MHC classe I (“missing self”), contribuam para estabelecer um limiar de ativação (que deve ser ultrapassado pelos sinais estimulatórios). Por outro lado, a disfunção dos LILRB pode facilitar a ativação inapropriada das células observada em doenças autoimunes crônicas (Colonna e cols, 1999).

#### 1.4 – Os receptores ativadores – LILRA

A função dos LILRA ainda não está bem esclarecida. Não se conhece o ligante da maioria destes receptores. LILRA1 é expresso por macrófagos e monócitos (Belkin e cols, 2003). Allen e cols (2001) descreveram que HLA-B27 se liga a células transfectadas com este receptor. Este então é o único receptor ativador da família LILR a se ligar a moléculas do HLA.

Vem sendo descrito que parte da população apresenta uma deleção no gene da LILRA3, tanto na Grã-Bretanha (Norman e cols, 2003) como no Japão, onde mais de 70% da população apresenta esta deleção (Hirayasu e cols, 2006). No entanto, nenhuma associação foi observada entre a presença da deleção e o desenvolvimento de patologias como a psoríase (Wisniewski e cols, 2003) ou doença celíaca (Moodie e cols, 2002).

LILRA4 parece ser expresso exclusivamente por células dendríticas plasmacitóides (Ju e cols, 2004; Rissoan e cols, 2002). Este receptor também é expresso juntamente com FcR $\gamma$  e após “cross-linkig” a via de sinalização do ITAM é ativada. No entanto, ficou evidenciado que a ativação de LILRA4 reduzia a secreção de IFN tipo I em resposta a estímulos virais (Cao e cols, 2006).

LILRA5 pode ser expresso tanto como receptor de membrana quanto como receptor solúvel. Este receptor foi encontrado em monócitos e neutrófilos e o “cross-linking” aumentou a produção de TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6 (Borges e cols, 2003). Sugerindo que este receptor pode também estar envolvido na regulação da inflamação.

Até hoje o receptor ativador melhor caracterizado é LILRA2. Nakajima e cols (1999) observaram que após o “cross-linkig” deste receptor ocorria influxo de cálcio em monócitos e a liberação de serotonina por células RBL transfectadas, demonstrando assim que este receptor têm atividade estimulatória.

LILRA2 também esta presente em eosinófilos e foi identificado que sua ativação leva à degranulação e à secreção de IL-12 e LTC<sub>4</sub>, mas não a de IL-4. Diferente

da eotaxina que leva à secreção de IL-4 e não de IL-12 (Tedla e cols, 2003). De forma semelhante, Sloane e cols (2004) demonstraram que a ativação de LILRA2 é capaz de induzir a secreção de histamina, IL-4 e LTC<sub>4</sub> por basófilos. A co-estimulação de LILRA2 e LILRB3 reduziu significativamente a secreção destes mediadores, sugerindo o envolvimento destes receptores no balanço regulatório na resposta inflamatória das células.

O envolvimento deste receptor em processos patológicos tem se tornado evidente. Tedla e cols. (2002) detectaram a presença de LILRA2 e de LILRB2 e LILRB3 em macrófagos, fibroblastos e células endoteliais nas lesões dos pacientes com artrite reumatóide. Observou-se ainda uma co-relação entre a melhora clínica dos pacientes após tratamento e redução na expressão destes receptores no sítio da lesão (Huynh e cols, 2007). Os pacientes que não apresentaram melhoras mantiveram níveis altos de expressão das moléculas.

Bleharski e cols (2003), utilizando microarranjos de DNA, fizeram análise da expressão gênica nas lesões de pacientes com hanseníase. Uma elevada expressão de receptores LILRB3, B5 e também LILRA2 e A3 foi encontrada. Estes autores observaram que a ativação de LILRA2 favoreceu a produção de IL-10 e reduziu a atividade microbicida dos monócitos. Sabendo que LILRA2 é preferencialmente expresso em pacientes lepromatosos e que este receptor favorece a produção de IL-10, será importante determinar se LILRA2 favorece a fraca resposta imune observada nos pacientes de hanseníase.

### 1.5 – Os receptores PIR

Dois grupos independentes identificaram um par de receptores murinos, denominados PIR-A e PIR-B (Paired immunoglobulin-like receptors) (Kubagawa e cols, 1997; Hayami e cols, 1997). Estes também são membros da superfamília das imunoglobulinas e devido a sua estrutura, distribuição celular e localização genômica vêm sendo classificados como ortólogos aos LILR (Takai, 2005). Os genes *pirA* e *pirB* se localizam no cromossomo 7, na região homóloga ao LRC humano (Takai e Ono, 2001). Estes receptores são proteínas transmembranas tipo I e cada um possui 6 domínios “imunoglobulina-like”. Semelhante ao observado nos LILR, o PIR-B também possui domínios ITIM em sua porção citoplasmática enquanto que PIR-A se associa com FcR $\gamma$  para induzir transdução de sinal. PIR-A e PIR-B são encontrados em células de origem mielóide e linfócitos B (Kubagawa e cols, 1999). Mais recentemente, com a utilização de tetrâmeros, foi demonstrado que estes receptores se ligam ao MHC classe I (Nakamura e cols, 2004; Kollnberger e cols, 2004).

PIR-B tem atividade inibitória descrita tanto *in vivo* como *in vitro*. Maeda e cols (1999) descreveram que ativação de PIR-B bloqueia ativação induzida pelo BCR, incluindo a fosforilação de Ig $\alpha$ /Ig $\beta$ , Syk e PLC $\gamma$ 2. Da mesma maneira, os linfócitos B2 dos camundongos PIR-B<sup>-/-</sup> se mostraram constitutivamente ativados e hipersensíveis a ativação do BCR, com maior proliferação e produção de anticorpos em resposta a estimulação (Ujike e cols, 2002).

O envolvimento destes receptores em processos patológicos também tem ficado evidente. Após a transferência de esplenócitos alogênicos para camundongos PIR-B deficientes, os animais mostraram altas taxas de morte devido à doença enxerto-versus-hospedeiro. A ativação das células dendríticas através de PIR-A favoreceu uma maior proliferação dos linfócitos T e a alta produção de IFN $\gamma$  (Nakamura e cols, 2004).

Assim, os receptores LILR em humanos e os PIR em camundongos parecem ser importantes na regulação da resposta imune. É importante então investigar de que forma estes receptores podem favorecer processos patológicos.

### **1.6 – As Células Dendríticas (DC)**

As DC de origem mielóide são células apresentadoras de antígeno profissionais muito eficientes. Estas têm a capacidade de capturar, processar e apresentar antígenos a linfócitos T de memória bem como aos não primados (Steinman e cols, 1991). As DC são encontradas em seu estado imaturo nos principais tecidos do corpo. Vários sinais são capazes de induzir a maturação destas células, dos quais o mais potente parece ser o reconhecimento de patógenos, através de receptores de padrões que reconhecem estruturas altamente conservadas presentes nos microorganismos. As citocinas TNF, IL-1 $\beta$  e a ligação do CD40 também favorecem a maturação destas células (Banchereau e cols, 2000). As DC estão constantemente migrando para os órgãos linfóides, onde apresentam antígenos aos linfócitos. Vem se tornando evidente que o estado de ativação das DC é importante na determinação da qualidade da resposta imune que se seguirá.

A interação das DC maduras com os linfócitos desempenha um papel central no direcionamento da resposta imune adaptativa (Janeway e Medzhitov, 2002) ou a proliferação de linfócitos T regulatórios (Yamazaki e cols, 2003). As DC maduras passam a ter reduzida capacidade de captar antígenos, no entanto, elas passam a apresentar alta expressão de MHC e de moléculas co-estimulatórias, como CD40, CD80 e CD86. Regulação positiva do CD83 também ocorre. Dependendo do estímulo que recebem, as DC passam a expressar e secretar mediadores que vão ser importantes na determinação do perfil da resposta imune. A secreção de IL-12, IL-23 e a expressão de ICAM 1 favorecem o desenvolvimento de linfócitos Th1 enquanto que CCL2 e OX40L favorecem o perfil Th2. Já IL-10 e TGF $\beta$  influenciam o desenvolvimento de células T regulatórias (Kapsenberg, 2003). As DC imaturas ou parcialmente maduras têm importância na indução de tolerância central e periférica a antígenos próprios (Banchereau e Steinman, 1998).

As células dendríticas linfóides foram identificadas como altas produtoras de interferon tipo I em resposta a vírus (Cella e cols, 1999). No entanto, estas células não induzem forte proliferação dos linfócitos virgens, mas podem promover a expansão de linfócitos Th1 (Krug e cols, 2003).



Uma das principais famílias de receptores envolvidos no reconhecimento dos patógenos é a dos TLR (Toll like receptors). As DC de origem mielóide podem reconhecer componentes bacterianos via TLR1, 2, 4, 5 e 6, RNA viral fita dupla via TLR3 ou fita simples via TLR7 (Kadowaki e cols, 2001). As DC de origem linfóide reconhecem DNA bacteriano contendo motivos CpG via TLR9 e RNA viral via TLR7 e 8 (de Jong e cols, 2005). Além dos TLR, outros receptores estão envolvidos no reconhecimento dos padrões presentes nos microorganismos, como as proteínas da família NOD (nucleotide-binding oligomerization domain) e as lectinas, como o receptor de manose e o DC-SIGN (DC-specific intercellular-adhesion-molecule-3 grabbing noningrin).

O DC-SIGN está envolvido na internalização de diversos patógenos, incluindo vírus (Dengue, Ebola); bactérias (*Helicobacter pylori*), protozoários (*Leishmania*) e helmintos (*Schistosoma*) (van Kooyk e cols, 2003). Já foi evidenciado que o DC-SIGN é um receptor envolvido no reconhecimento e na internalização de micobactérias (Geijtenbeek e cols, 2003), incluindo o *M. leprae* (Soilleux e col, 2006). A interação entre as micobactérias e o DC-SIGN, que ocorre via ManLAM, induz a secreção de IL-10 e ainda previne a ativação das DC induzida por LPS (Geijtenbeek e cols, 2003). Desta forma, DC-SIGN atua como um receptor imunomodulador. Estudos vêm demonstrando que a transdução de sinal iniciada por estas lectinas pode ter efeito antagônico ou sinérgico na sinalização iniciada pelos TLR (Chen e cols, 2006). Em experimentos de “cross-linking” ficou evidenciado que a ativação de DC-SIGN leva a fosforilação de ERK1/2 e a uma maior produção de IL-10 em resposta ao LPS (Caparros e cols, 2006). Recentemente foi descrito que ocorre a acetilação da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B, favorecendo assim a maior produção de IL-10 (Gringhuis e cols, 2007). Os patógenos que interagem com DC-SIGN modulam a resposta imune iniciada pelas DC e parecem usar este receptor para favorecer um estado de imunossupressão. O balanço entre a ativação via TLR e lectinas pode ter papel importante na função das DC. Investigar se outros receptores são capazes de interagir com estas vias de sinalização pode ajudar a entender a fisiologia das DC e outras células envolvidas com a resposta imune.

## 1.7 – HANSENÍASE

### 1.7.1 – CARACTERÍSTICAS GERAIS

A Hanseníase é uma doença infecciosa crônica, exclusiva do ser humano, que tem como agente etiológico o *Mycobacterium leprae*, um patógeno intracelular obrigatório que infecta predominantemente macrófagos e células de Schwann. Suas manifestações clínicas incluem lesões de pele, mucosas e nervos periféricos.

Uma característica marcante da hanseníase é a diversidade de formas clínicas. Na classificação de Ridley e Jopling (1966) bases imunológicas, além de bases histológicas, bacteriológicas e clínicas foram consideradas. Com base nestes critérios, os pacientes são agrupados em 5 subgrupos, formando, assim, um espectro de formas clínicas. Segundo esta classificação, em um extremo do espectro estão os pacientes lepromatosos (LL). Estes não apresentam reatividade celular contra a bactéria, apresentam alta carga bacilar e múltiplas lesões. Os pacientes não são capazes de eliminar o bacilo e o *M. leprae* se multiplica, atingindo níveis que chegam a  $10^{12}$  bactérias por grama de tecido. No teste cutâneo à lepromina, ou teste de Mitsuda, pacientes lepromatosos apresentam reação negativa.

No outro extremo do espectro, estão os pacientes tuberculóides (TT) que apresentam forte resposta imune celular ao *M. leprae*. Em geral, eles têm uma única lesão, com poucos ou nenhum bacilo e, são positivos no teste de Mitsuda. Além das formas polares, existem as formas clínicas intermediárias denominadas “borderline” [borderline lepromatoso (BL), borderline borderline (BB) e borderline tuberculóide (BT)], onde a resposta imune celular é maior ou menor, de acordo com a proximidade ao pólo tuberculóide ou lepromatoso, respectivamente. Há ainda a forma indeterminada da doença, considerada o início das manifestações clínicas. As lesões apresentadas pelos pacientes são máculas hipopigmentadas assintomáticas que podem se resolver espontaneamente ou progredir para uma das formas clínicas, caso não tratadas.

Com relação à histologia das lesões, observa-se que as lesões de pele dos pacientes lepromatosos apresentam raros linfócitos, predominantemente CD8+, ausência de organização para formar granulomas e atrofia da epiderme. O acúmulo de macrófagos fortemente infectados com *M. leprae* pode ser observado em várias regiões da pele. Já as lesões de pacientes tuberculóides caracterizam-se pela formação de granulomas epitelióides que podem comprometer as terminações nervosas periféricas. Estudos imunocitoquímicos revelaram que a maioria das células T localizadas nas lesões apresenta fenótipo CD4+, embora células CD8+ também estejam presentes (Sieling e Modlin, 1994).

A classificação de Ridley e Jopling é predominantemente utilizada por pesquisadores. O sistema de classificação para fins terapêuticos agrupa os pacientes em paucibacilares (PB) e multibacilares (MB). Este sistema é baseado no índice bacteriológico (IB). Na classificação de Ridley e Jopling, pacientes paucibacilares (IB = 0) incluem pacientes TT e BT, enquanto pacientes multibacilares (IB > 0) incluem pacientes BB, BL e LL.

O tratamento com multidrogaterapia (MDT) para pacientes paucibacilares, por recomendação da OMS, é feito com rifampicina e dapsona por 6 meses. Em pacientes paucibacilares com lesão única é recomendado esquema ROM (600mg rifampicina; 400mg ofloxacina e 100mg minociclina) em dose única. Pacientes multibacilares são tratados com rifampicina, clofazimina e dapsona pelo período de 12 meses.

### **1.7.2 – Epidemiologia**

A hanseníase, no início de 2006, afetava mais de 200 mil pacientes em todo o mundo. A organização mundial de saúde (OMS) estabeleceu como alvo na estratégia para eliminar a hanseníase como problema de saúde pública, uma taxa de prevalência menor que 1 caso para cada 10.000 habitantes até o ano 2000. No entanto, seis países ainda não atingiram esta meta, a saber: Brasil, República Democrática do Congo, Madagascar, Moçambique, Nepal e Tanzânia. ([www.who.in/lep/en](http://www.who.in/lep/en)).

Hoje, dezessete países são responsáveis por 94% do número total de novos casos. A Índia e o país com a maior incidência, seguida pelo Brasil. Em 2005 foram diagnosticados 38.410 novos casos da doença em nosso país (20,6 novos casos/100.000 habitantes). Ainda é importante observar que o número de novos casos diagnosticados aqui se mantem constante por mais de uma década ([www.who.in/lep/en](http://www.who.in/lep/en)).

### 1.7.3 - Patogênese

A complexa interação entre a bactéria patogênica e a célula hospedeira é de vital importância para o estabelecimento da infecção. Diversos receptores participam do processo de fagocitose das micobactérias pelos macrófagos, incluindo o receptor de manose e os receptores de complemento (Schlesinger e Horwitz, 1991; Zimmerli e cols, 1996). Mais recentemente, foi descrito que o DC-SIGN é capaz de se ligar ao *M. leprae* (Soilleux e cols, 2006) bem como ao *M. tuberculosis* e *M. bovis* BCG (Geijtenbeek e cols, 2003) via lipoarabinomanana, um dos principais componentes da parede celular das micobactérias.

O mecanismo pelo qual o *M. leprae* infecta o sistema nervoso periférico também vem sendo explorado. Rambukkana e cols (1997) demonstraram que o *M. leprae* se liga ao domínio G da cadeia  $\alpha 2$  da laminina-2 e este conjunto, laminina-*M. leprae*, se liga a  $\alpha$ -dístroglicana na superfície das células de Schwann (SC). Subseqüente à ligação à superfície celular, a  $\alpha$ -dístroglicana forma agregados, que podem levar a internalização do bacilo (Rambukkana e cols, 1998). As moléculas presentes no *M. leprae* que possibilitam a interação com a laminina-2 também já foram identificadas. Ng e cols (2000) identificaram que PGL-1 se liga à laminina-2 e Shimoji e cols (1999) identificaram ML-LBP21, proteína do *M. leprae* que também tem esta propriedade. Em ensaios *in vitro* e *in vivo*, Rambukkana e cols (2002) confirmaram que o *M. leprae* após se ligar a SC produtoras de mielina, induz a demielinização tornando-as mais susceptíveis à invasão pelo bacilo (Tapinos e cols, 2006).

#### 1.7.4 - Genética

A hipótese de um componente genético que favoreça a susceptibilidade à hanseníase vem sendo sugerida há vários anos. Já foi descrito que a susceptibilidade à hanseníase parece sofrer influência dos alelos e haplótipos do HLA (Gorodezky e cols, 2004). Vanderborght e cols (2007) identificaram que HLA-DRB1\*04 está associado à resistência à hanseníase, enquanto HLA-DRB1\*10 à susceptibilidade tanto na população brasileira como na vietnamita. Mira e cols (2003) mapearam um locus de susceptibilidade à hanseníase no cromossomo 6, na região 6q25-q26 e identificaram associação significativa entre a presença de SNP (mutações de base única) na região promotora compartilhada por PARK2 e PACRG (parkin e parkin co-regulated gene, respectivamente) com a susceptibilidade à doença (Mira e cols, 2004). E mais recentemente, na região 6q21, identificaram que um alelo do gene da linfotoxina- $\alpha$ , (LTA)+80 A, estava também associado a um maior risco de desenvolver hanseníase, especialmente em indivíduos jovens (Alcais e cols, 2007). Polimorfismos em outros genes, como TNF, IL-10 e receptor de vitamina D, também parecem contribuir para a resistência/susceptibilidade ou para a determinação da forma clínica na hanseníase (Moraes e cols, 2006).

#### 1.7.5 – Imunologia

A resposta imune do paciente ao *M. leprae* determina o curso clínico da doença. A resistência a patógenos intracelulares, como as micobactérias, parece associada à capacidade de montar resposta imune com perfil Th1. A habilidade de começar esta resposta imune protetora está diretamente associada à secreção de IL-12/IL-23 e diferenciação de macrófagos tipo 1 e células dendríticas. Este processo favorece a diferenciação de células Th1 produtoras de IFN $\gamma$ , que por sua vez favorece ativação dos macrófagos infectados e a morte do *M. leprae*.

O crescimento do *M. leprae* não é limitado nos macrófagos de pacientes lepromatosos. Entretanto, monócitos destes mesmos pacientes são capazes de restringir o crescimento da micobactéria, da mesma forma que indivíduos saudáveis, na presença de fatores de ativação, sugerindo que os fagócitos mononucleares não são defeituosos, mas sua ativação é impedida ou inibida pelo *M. leprae* no sítio da lesão (Kaplan e cols, 1986). Macrófagos derivados de monócitos de pacientes, tanto lepromatosos quanto tuberculóides, respondem normalmente ao IFN $\gamma$ , com aumento da secreção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em resposta ao *M. leprae* (Kaplan e cols, 1986). Sibley e Krahenbuhl (1987) utilizaram macrófagos isolados de camundongos atímicos (nude mice) infectados com *M. leprae*. Foi observado que macrófagos altamente infectados eram refratários à estimulação com IFN $\gamma$ , potente ativador de macrófagos, diferente do observado com macrófagos peritoneais dos mesmos animais. Estes se mostraram capazes de inibir o crescimento intracelular do *Toxoplasma gondii* quando estimulados com IFN $\gamma$ .

A importância da IL-12 na resposta imune contra micobactérias ficou evidente em estudos realizados por Altare e cols (1998) e de Jong e cols (1998). Estes trabalhos evidenciaram que indivíduos com deficiência genética no receptor de IL-12 (IL-12R) têm severa infecção por micobactérias e fraca produção de IFN $\gamma$ . Kim e cols (2001) demonstraram que pacientes lepromatosos têm reduzida expressão da cadeia  $\beta$ 2 do IL-12R nas lesões de pele e os linfócitos T destes pacientes não respondem à estimulação via IL-12 *in vitro*.

Componentes das micobactérias têm a habilidade de modular a atividade microbicida dos macrófagos. O LAM, lipopolissacarídeo componente altamente imunogênico da parede celular de micobactérias, é um potente inibidor da ativação mediada pelo IFN $\gamma$  (Sibley e cols, 1988a). O PGL-1 (glicolípido fenólico 1), antígeno exclusivo presente na superfície do *M. leprae*, pode também estar associados com a não resposta dos pacientes lepromatosos, já que ele regula negativamente a liberação de citocinas, como o TNF, por monócitos (Silva e cols, 1993).

Monócitos infectados de pacientes lepromatosos, mas não de pacientes tuberculóides, liberam mediadores como a IL-10 e a PGE2 (prostaglandina E2) que inibem a linfoproliferação frente ao *M. leprae* em indivíduos sabidamente respondedores à bactéria. PGE2 inibe a produção de IL-2 e também de IFN $\gamma$ , citocinas, em geral, fracamente expressas nos lepromatosos, mas importantes para gerar resposta imune específica (Misra e cols, 1995b). Desta forma, *M. leprae* parece modular a resposta imune desenvolvida nas lesões, através de componentes de sua parede celular e também via secreção de substâncias com atividade supressora sobre os macrófagos. Monócitos infectados parecem contribuir para a fraca ativação dos linfócitos T nos indivíduos lepromatosos devido à liberação de fatores que possam suprimir a ativação destas células.

Krutzik e cols (2005) observaram que monócitos de pacientes lepromatosos quando estimulados com uma proteína de 19 kDa do *M. leprae* não são capazes de se diferenciar em DC CD1b+. Quando estimuladas com IL-4 e GM-CSF ocorre diferenciação semelhante entre pacientes e controles. Fica evidenciado então que os monócitos são capazes de se diferenciar, mas isto não ocorre na presença do *M. leprae*.

Com a descrição de que macrófagos também são divididos em subgrupos funcionais, começou-se a avaliar o impacto destes diferentes grupos na resposta imune ao *M. leprae*. Foi observado que macrófagos tipo 2, diferenciados *in vitro* com a utilização de M-CSF, não secretam IL-12 ou IL-23, mas produzem grandes quantidades de IL-10 em resposta à micobactérias. Estas células não induzem a produção de IFN $\gamma$  nem a proliferação de linfócitos T reativos ao *M. leprae* (Verreck e cols, 2004).

Trabalhos recentes têm investigado a interação do *M. leprae* com as células dendríticas. As células dendríticas primam linfócitos T virgens e controlam o desenvolvimento de células Th1. Sieling e cols (1999) descreveram a presença de células dendríticas derivadas de monócitos CD1+CD83+ nas lesões de pacientes lepromatosos e Yamauchi e cols (2000) detectaram a expressão de

CD40L, importante para a ativação e maturação das DC, nos linfócitos deste mesmo grupo de pacientes. Poucas DC foram detectadas nas lesões dos pacientes lepromatosos (Sieling e cols, 1999; Krutzik e cols, 2005).

Realizando experimentos *in vitro*, Hashimoto e cols (2002) observaram que o *M. leprae* é fagocitado de forma dose dependente pelas DC. No entanto, as células estimuladas com o bacilo só têm a expressão de marcadores de ativação, CD86 e CD83, aumentada em resposta a altas doses de bactéria (MOI, 160). Diferente das DC estimuladas com *M. bovis* BCG ou *M. avium*, as DC estimuladas com *M. leprae* não induziram a produção de IFN $\gamma$ . Subseqüentemente, este mesmo grupo mostrou que quando as DC eram previamente ativadas com IFN $\gamma$ , a capacidade aloestimulatória era restaurada (Kimura e cols, 2004). Já quando as células eram pré-tratadas com IL-1 $\beta$  as DC não apresentavam atividade ativadora quando estimuladas com o *M. leprae* (Makino e cols, 2006).

Ainda neste contexto, Murray e cols (2007) observaram que o *M. leprae* não induziu a ativação/maturação das DC, já que estas células não expressavam CD80 e CD86 e também não secretavam citocinas IL-12, IL-10 e TNF. Em resposta ao *M. tuberculosis* e ao *M. bovis* BCG ocorria ativação das DC. Em experimentos de aloestimulação, as DC estimuladas com *M. leprae* não induziram a proliferação dos linfócitos, e ainda citocinas Th2 foram detectadas no sobrenadante das culturas.

A proteína purificada da membrana do *M. leprae* MMP-II (major membrane protein II) induziu a expressão de moléculas co-estimulatórias, a secreção de IL-12 (Maeda e cols, 2005) e também a produção de IFN $\gamma$  por células T virgens ou de memória (Makino e cols, 2005). As DC infectadas com *M. bovis* BCG recombinante, secretor de MMP-II, induziam aumento na produção de perforina por linfócitos T CD8 (Makino e cols, 2006). Com isso, foi sugerido que o *M. leprae* íntegro pode ser capaz de suprimir a ativação das DC e a interação com os linfócitos (Scollard e cols, 2006). Nigou e cols (2001) demonstraram ainda que o ManLAM inibe a produção de IL-12 induzida por LPS nas DC



Os linfócitos presentes no sangue periférico dos pacientes lepromatosos não proliferam em resposta ao *M. leprae in vitro* (Godal e cols, 1972). Nogueira e cols (1983) descreveram que os linfócitos de pacientes LL/BL, mas não de TT/BT, não produzem IFN $\gamma$  em resposta ao *M. leprae*. Experimentos *in vivo* evidenciaram importância vital do IFN $\gamma$  para ativação da resposta imune nas lesões dos pacientes. Injeções de IFN $\gamma$  foram administradas intradermicamente em pacientes multibacilares. Acúmulo de linfócitos T e de macrófagos, destruição de macrófagos parasitados e redução do número de bacilos foram observados no local da injeção (Kaplan e cols, 1987 e 1989).

Com a descoberta que linfócitos T consistiam em grupos funcionalmente distintos, Th1 e Th2 (Mosmann e cols, 1986), diversos pesquisadores analisaram então as citocinas produzidas pelos pacientes ao longo de todo espectro. Yamamura e cols (1991) observaram por RT-PCR, que citocinas produzidas por macrófagos, como TNF, GM-CSF, IL-1 $\beta$ , TGF $\beta$ 1 e IL-6 eram mais abundantes nas lesões tuberculóides. As produzidas por linfócitos T (IL-2, IFN $\gamma$  e linfotóxina) também só foram encontradas no pólo tuberculóide. Já citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 foram encontradas nas lesões lepromatosas. Por outro lado, ao analisar a expressão gênica e protéica na PBMC de pacientes e de indivíduos saudáveis, Misra e cols (1995a) observaram um grande número de indivíduos em todas as formas clínicas, que, após estimulação *in vitro*, apresentavam perfil Th0. Vários trabalhos descrevem a presença de clones Th0 responsivos ao *M. leprae* nas lesões e no sangue periférico de pacientes ao longo de todo o espectro. No entanto, a maioria destes estudos indica uma predominância de IL-2, TNF e IFN $\gamma$  (perfil Th1) nas lesões tuberculóides e de IL-4 e IFN $\gamma$  (perfil Th0) nas lesões lepromatosas (Scollard e cols, 2006).

Eventos bioquímicos envolvidos com ativação dos linfócitos foram avaliados em células de pacientes (Sharma e cols, 1998). As concentrações de Ca<sup>++</sup> intracelular e de inositol trifosfato nos linfócitos dos pacientes lepromatosos não se alteraram, mesmo após adição de PMA. Este estímulo também não foi capaz

de induzir ativação de PKC (proteína quinase C). A ativação destas três moléculas nos pacientes tuberculóides foi semelhante à observada nos controles. Da mesma forma, Zea e cols (1998) demonstraram alterações na expressão de moléculas envolvidas na transdução de sinal nos linfócitos T de pacientes lepromatosos. As alterações incluem baixa expressão da cadeia  $\zeta$  do TCR (receptor de célula T), da p56<sup>lek</sup> tirosina quinase e da subunidade p65 do fator de transcrição NF- $\kappa$ B. Alterações na transdução de sinal das células T responsivas ao *M. leprae* incluem regulação negativa de três vias bioquímicas ativadas após estimulação do TCR, a via das MAPK, a via de ativação de NFAT e a do NF- $\kappa$ B (Chattree e cols, 2007). Mudanças na transdução de sinal podem contribuir para a incapacidade das células T de pacientes lepromatosos responderem à micobactéria.

#### 1.7.6 –EPISÓDIOS REACIONAIS

A hanseníase não é uma doença estável. Durante o curso crônico da doença podem ocorrer mudanças imunológicas que alteram as manifestações clínicas, são os chamados episódios reacionais. Estes episódios podem ocorrer durante ou mesmo após o tratamento. Existem dois tipos principais de reação: a reação reversa (RR- reação tipo 1) e o eritema nodoso leproso (ENL- reação tipo 2). A reação reversa ocorre predominantemente nos pacientes borderline nos quais clinicamente se observa reativação de lesões pré-existentes, bem como o aparecimento de novas lesões. O influxo de células CD4+ nas lesões e o aumento da resposta imune celular à bactéria também são observados, e o dano tecidual ocorre freqüentemente (Naafs, 1994). A reação tipo 2 é predominantemente observada em pacientes lepromatosos (LL/BL), que apresentam nódulos subcutâneos, eritematosos e dolorosos, associados ou não a manifestações sistêmicas como febre e mal estar (Naafs, 1994). Embora tenha sido proposto que a lesão seja resultado da deposição de complexo imune e fixação de complemento (Wemambu e cols, 1969), existem evidências em vários trabalhos da participação da resposta imune celular (Sampaio e cols, 1992). No

ENL também ocorre influxo de células CD4+. Localmente, a epiderme se torna espessada e uma das principais modificações envolvidas no processo inflamatório das reações parece ser o aumento, local e sistêmico, da expressão do TNF. A RR é preferencialmente tratada com o uso de prednisona, um antiinflamatório esteroide, enquanto o tratamento do ENL é feito utilizando talidomida, ou pentoxifilina, associada ou não à prednisona.

Ainda que os mecanismos envolvidos com o aumento da resposta imune celular durante estes episódios não estejam esclarecidos, as citocinas são essenciais no desenvolvimento da patofisiologia das reações (Sarno e Sampaio, 1996). A ativa participação do IFN $\gamma$  na indução dos episódios foi demonstrada quando pacientes foram tratados com injeções intradérmicas desta citocina. A administração de IFN $\gamma$  aos pacientes resultou no aumento da incidência de ENL e da produção de TNF pelos macrófagos quando estimulados *in vitro*. Tanto o ENL como o TNF eram inibidos quando a talidomida era administrada aos pacientes. Mesmo quando IFN $\gamma$  era administrado *in vitro* a monócitos de pacientes multibacilares, um aumento da produção de TNF $\alpha$  era observado em resposta ao *M. leprae* (Sampaio e cols, 1992). Como IFN $\gamma$  contribui para defesa do hospedeiro contra a micobactéria, esta mudança das células T CD4+ Th1 pode estar diretamente relacionada com a diminuição da carga bacilar nas lesões durante a reação, medida através dos índices baciloscópicos.

Sarno e cols (1991) detectaram níveis elevados de TNF e IL-1 $\beta$  no soro dos pacientes durante o ENL. Khanolkar-Young e cols (1995) descreveram intensa marcação nas lesões de pele e nervo para mRNA do TNF, por hibridização *in situ*, nos granulomas. Na RR, tanto em pacientes BT como nos BL, o aumento no número de células marcadas foi observado em comparação com pacientes fora de episódios reacionais. Resultados foram semelhantes quando a proteína foi detectada nos tecidos. Sampaio e cols (1991) descreveram que talidomida, droga utilizada no tratamento do ENL, inibe seletivamente a secreção de TNF, mas não a de IL-6, IL-1 $\beta$  e GM-CSF, outras citocinas produzidas por macrófagos. Estes resultados parecem indicar uma correlação direta entre redução de TNF e

a melhora dos sintomas locais e sistêmicos observados após administração do tratamento com a talidomida.

Verhagen e cols (1997) descreveram que enquanto clones obtidos de lesões dos pacientes não tratados eram Th0 e alguns polarizados Th2, os clones CD4+ obtidos durante episódios de RR eram todos do perfil Th1. Estas mudanças não ocorreram nas células T não responsivas ao *M. leprae*. Da mesma maneira, foi observado por Sreenivasan e cols (1998) que PBMC de 64% dos pacientes lepromatosos durante ENL apresentou perfil Th1 e o restante perfil Th0, mas nenhum apresentou perfil Th2. Além do IFN $\gamma$ , nestes pacientes, a expressão de IL-12 também foi investigada. As duas subunidades da IL-12 (p40-induzível e P35-constitutivamente expressa) estavam presentes em culturas de todos os pacientes apresentando RR e, na grande maioria dos pacientes, com ENL. Todas as citocinas foram encontradas em culturas não estimuladas indicando que células foram primadas *in vivo*. Marcante diferença foi observada na expressão de IL-10. Pacientes com RR não expressam mRNA, enquanto 52% pacientes com ENL expressam esta citocina. Vem sendo sugerido que durante os episódios reacionais os pacientes migram para o pólo tuberculóide do espectro e apresentam secreção de citocinas Th1. Moraes e cols (1999) demonstraram regulação positiva de citocinas imuno-inflamatórias, como IFN $\gamma$ , GM-CSF e IL-1 $\beta$ , no sangue e no tecido de pacientes durante episódios de reação e sugerem que o padrão de resposta resulta de uma reativação imunológica que pode levar à resposta inflamatória aguda nos dois tipos de reação.

## 1.8 – Justificativa

Embora o *M. leprae* tenha sido o primeiro patógeno a ser identificado, muito precisa ser feito para entender a relação deste patógeno com o hospedeiro. Esclarecer os mecanismos que favorecem a infecção e também determinam qual das formas clínicas será desenvolvida pelos pacientes são uma necessidade urgente. Como descrito acima, mecanismos envolvidos com a ausência de resposta imune ao *M. leprae*, observada nos pacientes lepromatosos, vêm sendo investigados. A presença de clones supressores, desregulação das citocinas nas lesões, indução de tolerância, alterações bioquímicas na transdução de sinal, macrófagos e DC fracamente ativados e componentes genéticos favorecem a ausência de resposta imune específica ao *M. leprae* observada no pólo lepromatoso.

Novos receptores vêm sendo associados às lesões lepromatosas. DC-SIGN, cuja função imunossupressora vem sendo evidenciada, é fortemente expresso nas lesões lepromatosas (ver Apêndice). De forma semelhante, foi identificado que LILRA2 é expresso por estes pacientes no sítio da lesão (Bleharski e cols, 2003). Este receptor reduziu a produção de IL-12 por macrófagos ativados e aumentou a produção de IL-10. Estes macrófagos ainda tiveram reduzida capacidade microbicida, sugerindo que LILRA2 pode contribuir para a fraca/ausente resposta imune observada nos pacientes lepromatosos.

Assim, tanto DC-SIGN como LILRA2, parecem ter atividade imunomodulatória e são preferencialmente expresos por pacientes lepromatosos. Estudar a fisiologia destes receptores pode contribuir para entender a patologia da hanseníase. Nas páginas seguintes, inicialmente estão descritos os resultados obtidos no estudo do receptor LILRA2. Parte destes experimentos foi realizada durante o “doutorado sanduíche” no laboratório do Dr Marco Colonna na Washington University in St Louis. Em seguida, no apêndice I, aqueles obtidos no estudo do receptor DC-SIGN.

## 2 – Objetivos

### **Geral:**

Investigar a função do receptor LILRA2 em células mielóides e sua implicação na hanseníase.

### **Específicos:**

1. Produzir anticorpos anti-LILRA2;
2. Avaliar o efeito da ativação deste receptor em células dendríticas em relação aos seguintes critérios:
  - a. Citocinas produzidas;
  - b. Presença de marcadores de ativação celular e
  - c. Indução da proliferação de linfócitos T virgens.
3. Avaliar se o *M. leprae* induz a maturação das DC e a secreção de citocinas;
4. Avaliar o efeito do *M. leprae* no processo de ativação de células dendríticas induzida por LILRA2;
5. Identificar a presença das células LILRA2 nas lesões dos pacientes lepromatosos;
6. Identificar o ligante da LILRA2.

### 3 – Material e Métodos

#### 3.1 – Produção de anticorpos anti-LILRA2

**3.1.1 Imunização** - Para gerar anticorpos monoclonais, camundongos BalbC de 4 semanas de idade foram imunizados com LILRA2 solúvel previamente produzida no laboratório do Dr. Marco Colonna (esta proteína recombinante é formada pelo primeiro domínio Ig-like da LILRA2 conjugado a fração Fc da IgG humana). Os animais receberam 4 injeções subcutâneas contendo 15µg da proteína recombinante e 50µg de CpG 1826 (Invivogen, San Diego, CA), usado como adjuvante. O intervalo entre cada uma das injeções foi de uma semana. Os animais ainda receberam uma última injeção intravenosa contendo 15µg de LILRA2 recombinante.

**3.1.2 Fusão** - Três dias após a última imunização, os esplenócitos foram purificados, lavados em meio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY) e misturados a células SP20 na proporção 5:1. O precipitado de células foi ressuspenso em 1mL de PEG (Polietilenoglicol 1500 – Roche, Palo Alto, CA). Após leve homogeneização, as células foram incubadas a 37°C por 1 minuto em banho-maria. Foram adicionados mais 2 mL de RPMI e seguia-se nova incubação em banho-maria por 2 minutos. Por fim, 4mL de RPMI eram adicionados e as células mantidas por 4 minutos no banho-maria. As células foram então lavadas e ressuspenso em meio SFM Hybridoma (Gibco) suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB – Hyclone, Logan, UT), 2mM Glutamax (Gibco), 1mM piruvato de sódio (Gibco), 100µg/mL kanamicina (Gibco) e 50ng/mL de IL-6 (Calbiochem, San Diego, CA) na concentração de 100.000 células/ml. Em cada poço (placa de 96 poços fundo chato) (Nunc, Rochester, NY) eram adicionados 100µl. Após 6h de incubação a 37°C eram adicionados mais 100µL do meio de cultura suplementado com HAT (Hypoxanthine-thymidine – Sigma, St. Louis, MO). Quando os clones já eram visíveis a olho nu, o meio de cultura, suplementado com HAT, era trocado por 3 dias consecutivos.

**3.1.3 Seleção dos hibridomas por citometria de fluxo** – O sobrenadante dos hibridomas selecionados era adicionado a células P815 transfectadas ou não com LILRA2, misturadas em igual proporção. Seguiu-se uma incubação de 20 minutos no gelo. As células eram lavadas três vezes em tampão de FACS (PBS, 3% SFB, 0.5% Azida sódica - Sigma) e incubadas então com uma mistura de anticorpos anti- mouse IgG2a marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Southern Biotech, Birmingham, AL), anti-mouse IgG2b marcado com ficoeritrina (PE) (Southern Biotech) e anti-mouse IgG1 biotilado (Southern Biotech), todos à concentração de 100µg/ml. Após 20 minutos no gelo, as células eram lavadas 2 vezes em tampão FACS e mantidas na presença de estreptavidina marcada com APC (Invitrogen) a 100µg/ml. As células eram novamente lavadas, ressuspensas em tampão de FACS com iodeto de propídeo (50µg/ml) (Sigma) e analisadas por citometria de fluxo.

### **3.2 – Isolamento de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC)**

“Buffy coats” foram obtidos junto à Cruz Vermelha americana ou ao departamento de hemoterapia do hospital universitário da UFRJ. A suspensão de células era diluída 1:1 em solução salina (PBS, Gibco) e colocada sobre gradiente de densidade em Ficoll Hypaque (Amersham, Uppsala, Suécia). Após centrifugação a 2000rpm, as células mononucleares (PBMC), que se encontravam na interface do gradiente, foram coletadas, lavadas duas vezes em PBS e contadas com azul de Tripán (corante vital) em câmara de Neubauer.

### **3.3 – Purificação de Monócitos, Linfócitos, DC plasmacitóides e Células NK**

Para purificar subpopulações celulares foram utilizadas “beads” magnéticas de acordo com as instruções do fabricante (Miltenyi, Auburn, CA). As PBMC eram lavadas em tampão (PBS, 3% soro fetal bovino [SFB], 1mM EDTA) e ressuspensas em 700µl-1mL do mesmo tampão. Para cada  $100 \times 10^6$  células eram adicionados 20µL de anticorpo marcado magneticamente. Seguiu-se uma incubação a 4°C por 15 minutos. As células eram novamente lavadas, ressuspensas em 3mL de tampão e adicionadas às colunas. As colunas eram lavadas 4 vezes com 3mL de tampão. Após as lavagens as células de interesse eram então eluídas e contadas como descrito acima. Para purificar



monócitos eram utilizadas beads CD14, linfócitos - beads CD3, linfócitos T CD4 - beads CD4, células NK - beads CD56 e DC plasmacitóides - beads anti BDCA4.

### 3.4 – Cultura de Células

**3.4.1 Células Dendríticas Derivadas de Monócitos** - Os monócitos purificados foram plaqueadas na concentração final de  $0.3 \times 10^6$  células/mL em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2mM Glutamax, 100µg/mL kanamicina, 1mM piruvato de sódio, 10ng/mL IL-4 e 50ng/mL GM-CSF por 5-7 dias para geração de células dendríticas derivadas de monócitos (MDDC).

**3.4.2 Linfócitos, NK, DC plasmacitóides** - As culturas primárias foram plaqueadas na concentração final de  $0.5 \times 10^6$  células/mL em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2mM glutamax, 100µg/mL kanamicina. Nas culturas de células NK eram adicionados 50pg/mL de IL-2 (Calbiochem) e nas de DC plasmacitóides 50pg/mL de FLT3L (eBioscience, San Diego, CA).

**3.4.3 Linhagens celulares** - Todas as linhagens celulares, a exceção das células CHO DHFR-, foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2mM glutamax, 100µg/mL kanamicina. As células aderentes eram soltas utilizando PBS EDTA 1mM.

### 3.5 – Estímulos

Os estímulos foram utilizados nas seguintes concentrações: *M. leprae* irradiado ( $2 \times 10^9$  bactéria/ml) obtido de Tatu, a 5, 10 e 50µg/mL (gentilmente cedido pelo Dr P. Brennan, Department of Microbiology, Colorado State University, Fort Collins, CO), que corresponde às proporções bactéria:célula de 10:1, 20:1 e 100:1, respectivamente. *M. tuberculosis* cepa H37Rv irradiado a 5, 10 e 50µg/mL. Lipopolissacarídeo (LPS de *Salmonella Minnesota* Re595) 500ng/mL ou diferente quando indicado na legenda da figura. As citocinas IL-15, IL-10, IL-4 e GM-CSF a 50ng/mL (Calbiochem).

### 3.6 – Experimentos de “cross-linking”

Placas de 96 poços eram mantidas a 37°C com 1µg/mL da fração F<sub>(ab2)</sub> de anticorpo de cabra anti IgG de camundongo (Southern Biotech) em tampão carbonato (0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.1M NaHCO<sub>3</sub>, pH9.6) por 1h. Os poços eram lavados com PBS e 50µL do sobrenadante das culturas dos hibridomas (anti LILRA2, anti NKp44, anti MHC I) eram adicionados e mantidos por mais 1h também a 37°C. (Todos estes hibridomas foram produzidos no laboratório do Dr Marco Colonna como descrito no item 3.1). Após esse período, os poços eram lavados e as células dendríticas eram plaqueadas (15 x 10<sup>4</sup> células por poço) e estimuladas ou não com LPS ou células J558L transfectadas com CD40L irradiadas (3000 Rads) na proporção 1:10 (J558L:DC). Após 2 dias, a detecção da presença de marcadores de ativação celular foi feita por citometria de fluxo e a presença de citocinas pro-inflamatórias no sobrenadante foi avaliada por CBA (Citometric Bead Array – BD Bioscience, San Francisco, CA) como descrito abaixo.

### 3.7 – Citometria de fluxo para marcadores de superfície

Aproximadamente 50.000 células a serem analisadas, eram lavadas em tampão (PBS, 3% SFB, 0.01% azida sódica) e incubadas no gelo com 1µL dos seguintes anticorpos marcados com FITC: anti HLA-DR (BD Bioscience), anti MHC classe I (Immunotech, Fullerton, CA), anti CD83 (Immunotech), ou marcados com PE: anti CD86 (BD Bioscience), anti CD40 (BD Bioscience), anti CD80 (BD Bioscience). Após 20 minutos as células eram lavadas, fixadas ou não em paraformaldeído 4% e analisadas em citometro Becton & Dickson. Células também foram incubadas com os isotipos controles.

Em alguns experimentos as células dendríticas foram incubadas com 20µL do sobrenadante dos hibridomas produtores dos anticorpos DCN35 ou DCN47 (anti DC-SIGN). Após incubação no gelo por 20 minutos, as células eram lavadas e incubadas com anticorpos secundários (anticorpo de cabra anti IgM ou anti IgG1 de camundongo) biotinilados (Southern Biotech) a 100µg/ml, respectivamente. Após 20 minutos no gelo, as células eram lavadas 2 vezes em tampão FACS e mantidas na presença de estreptavidina marcada com APC (Invitrogen) a 100µg/ml. As células eram novamente lavadas, ressuspensas em tampão de FACS com iodeto de propídeo (50µg/ml) e analisadas por citometria de fluxo.

### **3.8 – “Citometric Bead Array” (CBA)**

Para detectar a presença de citocinas no sobrenadante das culturas eram utilizados kits CBA, conforme orientação do fabricante. Os sobrenadantes eram diluídos 1:5 ou 1:10 e incubados com 5µL da mistura de “beads” (contendo anticorpos anti IL-12 p70, anti TNF, anti IL-10, anti IL-1β, anti IL-6 e anti IL-8) e mais 5µL de anticorpo de detecção conjugado a PE. As amostras eram incubadas por 2h. Após esse período eram lavadas e analisadas em citometro de fluxo utilizando o citometric bead array analysis software da BD Bioscience.

### **3.9 – Ensaios de “Mixed Leukocyte Reaction” (MLR)**

As DC, após o período de diferenciação, eram diluídas serialmente, plaqueadas e ativadas ou não através de LILRA2 nos experimentos de “cross-linking”, como descrito no item 3.6. Após 48h de estimulação, as DC eram lavadas em RPMI e meio de cultura não suplementado com citocinas era então adicionado.

As PBMC de cordão umbilical eram purificadas como descrito acima, lavadas em PBS e incubadas com beads anti CD4 (Miltenyi) por 15 minutos a 4°C e purificadas como descrito no item 3.3.

Os linfócitos purificados eram adicionados às células dendríticas. Após 6-7 dias de co-cultura a 37°C, 1mCi H<sub>3</sub>-timidina (Amersham) era adicionada às culturas, que foram mantidas por mais 18h. A incorporação de timidina era determinada por cintilação líquida utilizando o leitor 1450 Microbeta Plus (Wallac, Oy).

### **3.10 – Fragmentos F(ab')<sub>2</sub>**

O sobrenadante de cultura do hibridoma produtor de anti-LILRA2 IgG2a (mantido em cultura em meio RPMI suplementado com apenas 2% soro fetal bovino ultra low IgG) (Gibco) foi filtrado e adicionado a uma coluna de proteína G sefarose (Amersham) a 4°C. Após todo o sobrenadante ter passado pela coluna por 2 vezes, esta era lavada em PBS e o anticorpo aderido a coluna era eluído em 6 frações de 500µL de solução 100mM de Glicina pH 2.5 (Sigma). Para neutralizar o baixo pH eram adicionados 50µL de solução 1M Tris pH 8.0 (Sigma). As frações eram avaliadas por espectrometria, leitura a 260nm, e as frações positivas eram submetidas a diálise em PBS contendo 0.1% de azida sódica por 12h.

Para gerar fragmentos F(ab')<sub>2</sub> foi utilizado o Kit Immunopure F(ab')<sub>2</sub> preparation kit Pierce Biotechnology (Rockford, IL), aproximadamente 3mg de anti LILRA2 purificados foram dializados em solução 20mM acetato de sodio pH 4.5 por 12h e incubados com a enzima pepsina por 4h em banho-maria a 37°C sob constante agitação. Após a digestão, o material era aplicado em colunas de proteína A previamente equilibradas. O material eluído, contendo os fragmentos F(ab')<sub>2</sub> era coletado e dialisado em PBS 0.1% Azida (Tubo de diálise com poro de exclusão de 50kDa, Pierce, Rockford, IL).

### **3.11 – Detecção de células LILRA2 nas lesões de pacientes lepromatosos**

Imunofluorescência – Biópsias de pele dos pacientes com hanseníase foram retiradas e congeladas em nitrogênio líquido. Cortes de 5µM foram fixados em acetona por 10'. Após esse período, os cortes eram hidratados em PBS pH7,4 por mais 10' e incubados com solução PBS SFB 10% por 30' para inibir ligações inespecíficas. O anti-LILRA2 (fluido ascítico diluído 1:300, fornecido pelo LATAM, Bio-Manguinhos, FIOCRUZ) era adicionado aos cortes e seguia-se incubação de 1h à temperatura ambiente. Após duas lavagens em PBS, era adicionado anticorpo de cabra anti IgG2 de camundongo conjugado com Alexa 488 (Dako, Fort Collins, CO) diluído em PBS SFB 2% por 30'. Os cortes eram contracolorados com azul de evans por 10'. Após a adição de Vectashiel (Vector Labs, Burlingame, CA), as lâminas eram montadas e analisadas em microscópio confocal (Laser scanning confocal microscopy LSM 510-Meta, Carl Zeiss, Berlim, Alemanha) Plataforma PDTIS/FIOCRUZ. As lâminas foram excitadas utilizando laser de 488nm e os seguintes filtros de emissão foram utilizados: bp 505-530nm para Alexa 488 e lp560nm para azul de evans.

Em alguns experimentos, após a incubação com o anticorpo primário, era adicionado anticorpo de cabra anti IgG2a de camundongo conjugado com Alexa 588 (Dako, Fort Collins, CO) diluído em PBS SFB 2% por 30'. Seguia-se nova lavagem em PBS e era adicionado anti CD68 conjugado a FITC (ficoeritrina) (Dako) a 10µg/mL por 2h. O núcleo era corado com bis-benzimida (Sigma) 1µg/mL. Após a adição de Vectashiel (Vector Labs, Burlingame, CA), as lâminas eram montadas e analisadas em microscópio confocal.

### 3.12 – Western Blot

As DC, estimuladas ou não, foram lavadas em PBS e subseqüentemente lisadas em tampão de lise (50mM Tris-HCl pH8.0, 150mM NaCl, 1mM EDTA pH8.0, 0.02% azida sódica, 1% Triton X-100, 1mM ortovanadato de sodio, 1mM PMSF, 2µg/mL aprotinina e 5µg/mL leupeptina). Após 15 minutos no gelo, as células eram centrifugadas a 14.000rpm por mais 15 minutos e o lisado celular era mantido a -70°C até posterior uso. A determinação da concentração de proteínas em cada amostra foi feita pelo método de Bradford.

As amostras (20µg) foram aplicadas em gel 12% poliacrilamida. A eletroforese SDS-PAGE foi realizada com gel de empacotamento/empilhamento a 6% de poliacrilamida e gel de corrida a 12%. A corrida foi realizada a 12mAmp por aproximadamente 1h em tampão de corrida (25mM Tris base, 192mM Glicina pH8.3, 0.1%SDS).

As amostras foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose (BioRad) por 2h a 4°C utilizando o tampão de transferência (25mM Tris base, 192mM Glicina pH8.3, 20% metanol). A membrana era então bloqueada utilizando 3%BSA em TBS por 1h, lavadas com TBS Tween 0,1% e incubada com anticorpo anti Tirosina fosforilada (Santa Cruz Biotechnology) 10µg/mL em TBS. Após 1h de incubação, a membrana era novamente lavada e incubada com anticorpo de coelho anti IgG1 de camundongo por 30 minutos.

A revelação foi realizada com substrato quimioluminescente na proporção 1:1 (Western Blotting Luminol Reagent, Santa Cruz Biotechnology, CA). A membrana era exposta a filme (HyperFilm-βMax, Amersham) por 3 minutos. O filme era revelado.

### 3.13 – A busca pelo Ligante

**3.13.1 PCR** – Os seguintes pares de iniciadores foram comprados da IDT (integrated DNA technologies, Coralville, IA).

LILRA2 1F: 5' TAC TAC CAA TTG CAC CAT GAC ACC CAT CCT CAC GGT CCT GAT C 3'

LILRA2 1R: 5' CTA CTA CGG CCG ATC CTG TCA CCA CCA GCT CCA G 3'

LILRA2 2R: 5' CTA CTA CGG CCG AAC CTG GGA CCA GGA GCT CCA 3'

LILRA2 3R: 5' CTA CTA CGG CCG ATC CTG TGA TCA GGA TGT CCA GG 3'

LILRA2 4R: 5' CTA CTA CGG CCG AAT TCT CCA CTG TGT AAT CCT GGG 3'

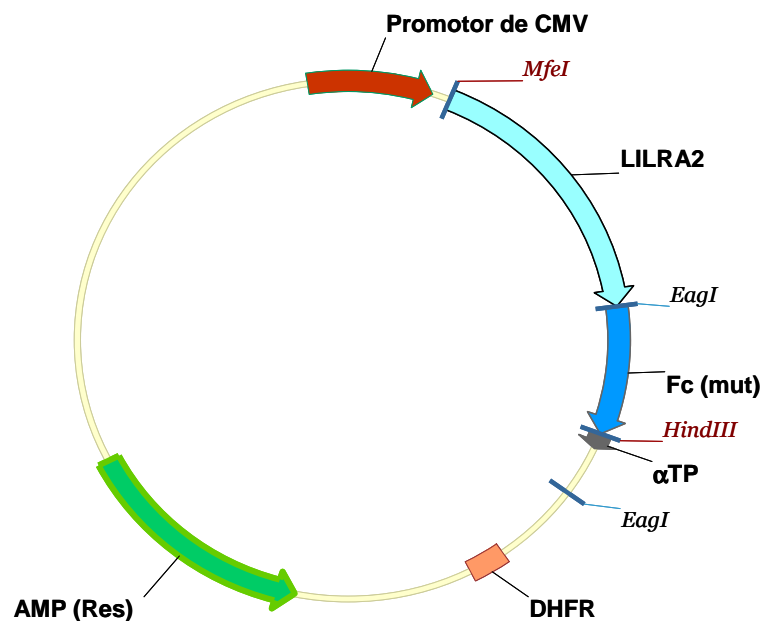
As reações de PCR foram feitas em um volume de 50µL sendo, 1µL dNTP 10mM, 1µL iniciador F 20 nmoles, 1µL do respectivo iniciador R 20 nmoles, 1U Taq polimerase, 1µL do DNA da construção LILRA2 pCRII (Samaridis e Colonna, 1997), 5µL tampão 10x e 40µL H<sub>2</sub>O MilliQ. As amostras foram amplificadas em termociclador (Perkin Elmer Cetus, Emeryville, CA) por 35 ciclos de: desnaturação a 94°C por 30", anelamento a 55°C por 45" e extensão a 72°C por 90". Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1.3% e visualizados por coloração com brometo de etideo sob luz UV.

**3.13.2 Purificação** – Os produtos de PCR eram purificados utilizando o Kit Qiagen (Gel Extraction Kit) (Qiagen, Valencia, CA), seguindo as instruções do fabricante. As bandas eram cortadas e a agarose dissolvida a 55°C utilizando 300µL de tampão QC para cada 0.1g de agarose. Isopropanol era então adicionado, na proporção 1:3 (isopropanol:tampão). Essa mistura era adicionada às colunas e centrifugadas a 14.000 rpm por 30 segundos. As colunas eram lavadas com 700µL de tampão PE e o DNA era eluído em 50µL de tampão E.

**3.13.3 Digestão do produto de PCR**– O produto de PCR era digerido utilizando a enzima Mfe I (New England Biolabs, Ipswich, MA). Para isso, 48µL do DNA purificado eram adicionados a 6µL de enzima Mfe I e a 6µL de tampão NE Buffer #4 10x. A reação era mantida a 37°C por 2h. As amostras eram novamente submetidas a eletroforese em gel de agarose e à purificação. As amostras eram então submetidas a nova digestão, utilizando a enzima Eag I (New England Biolabs) e o tampão NE Buffer #3 10x. Após 2h a 37°C foi feita uma nova eletroforese seguida de extração como descrito acima.

**3.13.4 Digestão do vetor** – O vetor FD1D2Ig- $\alpha$ TP era digerido como descrito acima. No entanto, após a incubação com a enzima *Eag* I, a amostra era aquecida a 75°C por 30' e em seguida, era adicionado 30U de CIP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, New England Biolabs, Ipswich, MA). Após 2h a 37°C, o vetor foi submetido a eletroforese e à purificação. A figura 3.1 mostra um esquema do vetor construído.

**3.13.5 Ligação** – A reação de ligação era feita da seguinte forma: 7 $\mu$ l do produto de PCR digerido eram adicionados a 40U da enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs, Ipswich, MA), 1 $\mu$ l de tampão de ligação e aproximadamente 0.5 $\mu$ g de vetor digerido. A reação era mantida por 12-18h a 15°C.



**Figura 3.1 – Esquema do vetor LILRA2-FD1D2-Ig- $\alpha$ TP.** O vetor contém promotor de citomegalovírus (CMV), Fração Fc de IgG1 mutada (Fc mut),  $\alpha$ TP e o gene da dihidrofolato redutase (DHFR). Os sítios das enzimas de restrição *Mfe*I e *Eag*I também estão indicados

**3.13.6 Transformação** (TOPO A cloning kit – chemical transformation) – Uma alíquota de bactérias *E. coli* era descongelada e mantida no gelo juntamente com 2µL do produto da reação de ligação. Após 30 minutos no gelo, as bactérias eram colocadas a 42°C por 30 segundos. Em seguida, eram adicionados 250µL de meio SOC e as bactérias agitadas a 37°C por 1h. As bactérias foram plaqueadas em meio 2xYT (16g/L triptona, 10g/L extrato de levedura, 5g/L NaCl, 15g/l agar) contendo ampicilina 100µg/mL e mantidas por 18h a 37°C.

**3.13.7 Miniprep de DNA plasmidial** – Para detectar quais colônias continham o inserto foram realizados ensaios de minipreps utilizando kits Quiagen. As colônias selecionadas eram inoculadas em 3mL de meio 2xYT líquido contendo ampicilina a 100µg/mL e mantidas a 37°C sob constante agitação por 10-15h. As bactérias eram coletadas e centrifugadas a 4000rpm por 3 minutos. O sedimento era ressuspenso em 250µL de tampão P1 contendo RNase. Em seguida, eram adicionados 250µL de tampão P2 e 350µL de tampão N3. As amostras eram centrifugadas a 14000rpm por 10 minutos. O sobrenadante era colocado sobre as colunas e estas centrifugadas por 30 segundos a 6000rpm. As colunas eram lavadas em 500µL de tampão PB e posteriormente em 750µL de tampão PE. O DNA era eluído em 50µL de 10mM Tris-HCl, pH8.0.

**3.13.8 Seqüenciamento de DNA** – As reações de seqüenciamento foram feitas em um volume de 10µL sendo, 1µL de DNA obtido nos minipreps, 2µL do iniciador 20nmoles, 2µL “*Big Dye*” (ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit’ - Perkin Elmer Applied Biosystems Division, Foster City, CA), 5µL H<sub>2</sub>O MilliQ. As amostras foram amplificadas por 99 ciclos de desnaturação a 92°C por 10”, anelamento a 50°C por 5” e extensão a 60°C por 4’ (Perkin Elmer thermal cycler 9600/9700).

O produto amplificado era precipitado utilizando 80µL de isopropanol 75%. Após uma incubação de 15 minutos à temperatura ambiente, as amostras eram centrifugadas a 14000rpm por 20 minutos, lavadas com 250µL de etanol 70% e novamente centrifugadas. A análise era feita em seqüenciador automático (ABI 377 sequencer - Applied Biosystems, Foster City, CA).



**3.13.9 MaxiPrep de DNA Plasmidial** – As bactérias contendo o plasmídeo de interesse eram inoculadas em 250mL de meio 2xYT líquido contendo ampicilina a 100µg/mL. Após 15h a 37°C sob constante agitação, as bactérias eram coletadas e centrifugadas a 6000rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante era removido e o precipitado ressuspense em 10mL de tampão P1. Eram adicionados 10mL de tampão P2, seguia-se uma incubação de 5 minutos a temperatura ambiente e adicionava-se 10mL de tampão P3. O lisado era centrifugado por 15 minutos a 6000rpm. O sobrenadante era transferido para outro tubo que era centrifugado a 16000rpm por 10 minutos. Este sobrenadante era transferido para colunas previamente equilibradas com tampão QBT. As colunas eram lavadas com 30 mL de tampão QC e o DNA eluido em 15mL de tampão QE. Adicionava-se 10.5mL de isopropanol e as amostras eram centrifugadas a 3800rpm por 30 minutos. O precipitado era ressuspense em 500µL de etanol e novamente centrifugado por 5 minutos a 14000rpm. O precipitado de DNA era ressuspense em 200-300µL de solução de Tris:EDTA (10mM:1mM).

**3.13.10 Transfecção e Cultura de Células CHO DHFR-** Em uma cubeta de eletroporação, foram adicionadas  $4 \times 10^6$  células CHO DHFR- ressuspensas em 400µL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 30µg do plasmídeo. As amostras foram submetidas a eletroporação a 260V, 75Ω, 1050µF. As células eram então plaqueadas em 10mL em meio α-MEM (alpha minimum essencial medium - Gibco) sem nucleosídeos suplementado com 10% de soro fetal bovino dialisado, 100µg/mL de kanamicina e 200nM de metotrexato (Sigma).

A seleção dos clones positivos foi feita por Elisa. Para isso, placas de 96 poços eram cobertas com o anticorpo de camundongo anti IgG humano diluído em tampão carbonato (0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.1M NaHCO<sub>3</sub>, pH9.6) a 5µg/mL por 1h a 37°C. As placas eram lavadas 6 vezes em solução aquosa 0,2% Tween 20. As amostras eram adicionadas em um volume de 200µL e mantidas a 37°C por 1h.

Após esse período, as placas eram lavadas por mais 6 vezes. O anticorpo secundário conjugado a peroxidase (anticorpo de coelho anti IgG humana conjugado à peroxidase HRP – Southern Biotech) diluído em PBS 5% SFB foi adicionado à concentração de 1µg/ml. Seguiu-se mais uma incubação de 1h. As reações eram reveladas utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluído em ácido cítrico e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e tetrametilbenzidina (TMB - Sigma) usado como substrato. Para bloquear as reações era utilizada solução 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A leitura era feita em leitor de ELISA a 490nm.

**3.13.11 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)** – O sobrenadante da cultura (aproximadamente 3L) de um dos clones altos produtores do tetrâmero LILRA2 foi concentrado por ultrafiltração (membrana Millipore com MWCO 20kDa) e posteriormente purificado em coluna de gel filtração (Sephacryl S200, GE Healthcare) no laboratório do Dr. David Fremont (Washington University in St Louis, MO). As frações obtidas após a passagem pela coluna foram novamente testadas através de ELISA, como descrito acima. As frações positivas foram utilizadas nos experimentos de citometria de fluxo.

**3.13.12 Citometria de Fluxo** – Aproximadamente 200.000 células, tanto de células primárias como das linhagens celulares descritas na tabela 4.1, eram incubadas com 10µL do tetrâmero por 30' no gelo. As células eram lavadas em tampão de FACS e incubadas com anticorpo de cabra anti IgG humana-biotinilado (5µg/ml) por mais 30'. Após esse período, as células eram novamente lavadas e incubadas com estreptavidina conjugada a APC (Invitrogen, Carlsbad, CA) a 5µg/ml. As células eram analisadas em citometro de fluxo.

Em alguns experimentos, as células eram pré-incubadas com anticorpos (sobrenadante da cultura dos hibridomas) anti-células dendríticas (DCN) antes do tetrâmero ser adicionado.

### 3.13.13 – Imunoprecipitação e Espectrometria de Massa

Após 5 dias em cultura, as DC eram lavadas e plaqueadas em meio RPMI sem cisteína e metionina suplementado com 10% SFB dializado, 100µg/mL kanamicina, 1mM piruvato de sódio, 2mM glutamax, IL-4, GM-CSF e 0.5mCi <sup>35</sup>S-metionina. As células eram incubadas por 6h a 37°C, quando era adicionado mais metade do volume do meio de cultura regular das DC. As células eram incubadas por mais 15h e então lavadas por 3 vezes em RPMI. O precipitado de células era lisado em 1mL de tampão (50 mM Tris HCl pH 8, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA pH 8, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% Glicerol, 50 mM NaF, 1 mM Ortovanadato de sódio, 1 mM PMSF, 2µg/ml Aprotinina e 5µg/ml Leupeptina), mantido no gelo por 30' e centrifugado a 12000rpm por 10'a 4°C. O sobrenadante era incubado com 600µL de proteína G sefarose (Invitrogen) e mantido sob constante agitação por 2h a 4°C. Após a centrifugação a 1500rpm por 10', o sobrenadante era coletado e incubado com 300µL do sobrenadante DCN35 e mantido sob constante agitação a 4°C por 15h. Foram então adicionados 15µg de anticorpo de rato anti IgM de camundongo-biotinilado por 15' e subseqüentemente foram adicionados 100µL de "beads" estreptavidin-sefarose 4B (Invitrogen). Como controle, a imunoprecipitação foi feita utilizando 2 outras IgM de origem murina. Os tubos foram incubados por 30'. Após serem lavados 3 vezes em tampão de lise, foram adicionados 100µL de tampão de redução (1% β-mercaptoetanol, 20% glicerol, 2% SDS). As amostras foram aquecidas a 95°C e analisadas em SDS-PAGE.

Em outro experimento, a imunoprecipitação foi feita utilizando células não marcadas radioativamente. O gel corado com colloidal Coomassie blue (Pierce), as bandas recortadas e analisadas por espectrometria de massa.

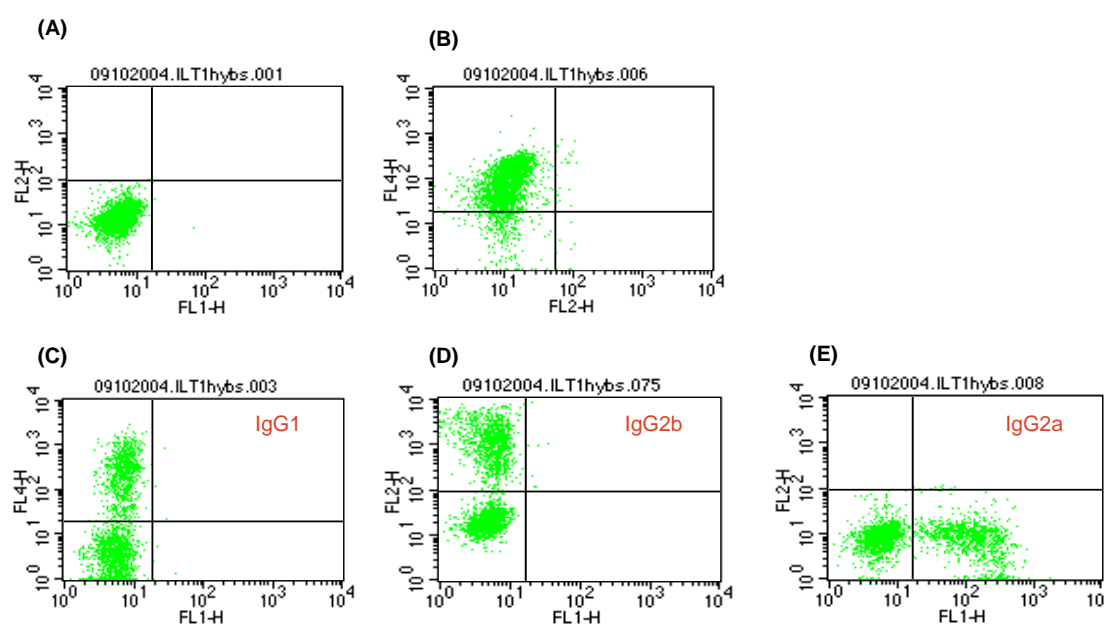
### 3.14 – Análise estatística

Os resultados referentes à produção de citocina estão expressos como média±SEM (erro padrão da média). O teste 1Way Anova foi utilizado na comparação dos grupos estudados. A análise pareada foi feita utilizando o Bonferroni's Multiple Comparison Test (Software GraphPad Prism 4.0).

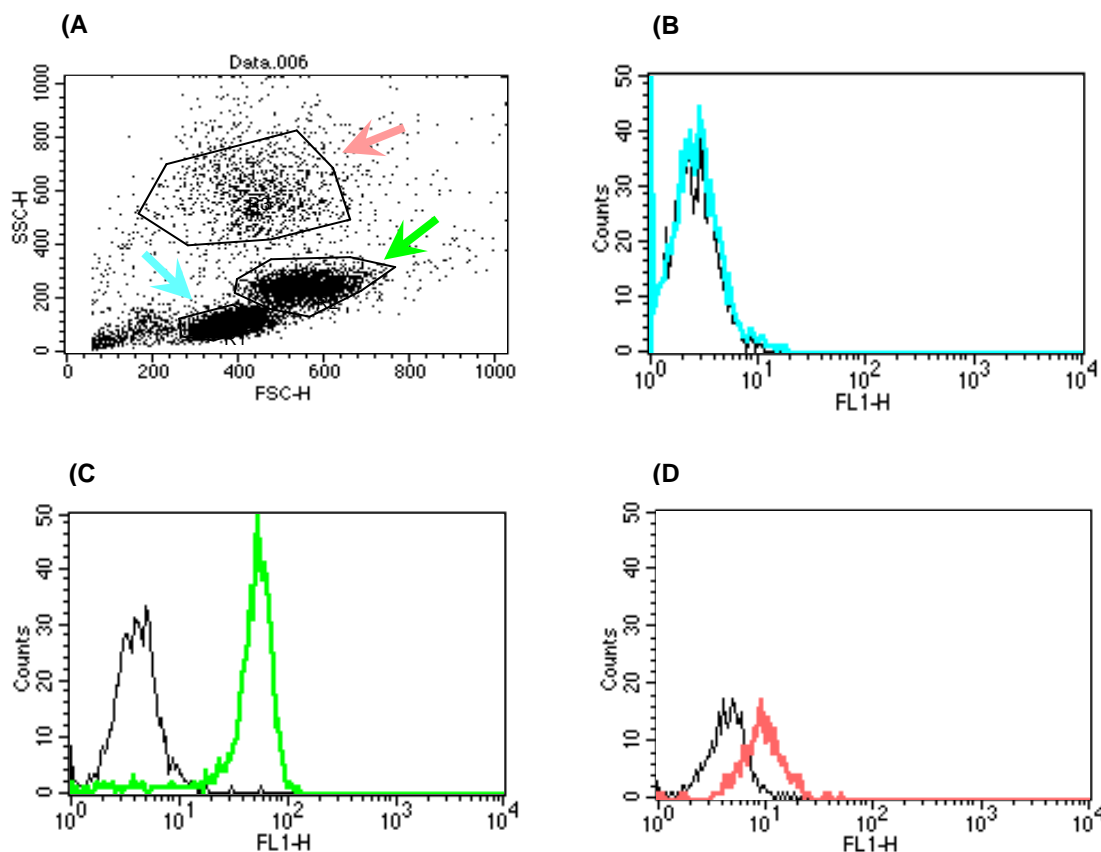
## 4 – Resultados

### 4.1 – Produção de Anticorpos anti LILRA2

Camundongos BalbC foram imunizados com a proteína recombinante solúvel LILRA2-IgGFc e CpG, usado como adjuvante. Os esplenócitos dos animais foram fusionados a células SP20. Após 15 dias, a seleção dos hibridomas produtores de anticorpos anti LILRA2 foi feita por citometria de fluxo utilizando uma mistura de células P815 transfectadas ou não com LILRA2. Os hibridomas produtores de anticorpos capazes de marcar somente as células transfectadas eram selecionados (Figura 4.1). Foram selecionados hibridomas produtores de anticorpos anti-LILRA2 de 3 diferentes isotipos, IgG1, IgG2a e IgG2b. Estes anticorpos foram posteriormente testados em PBMC e semelhante aos resultados já descritos (Colonna e cols., 1999) a expressão de LILRA2 foi observada em monócitos, granulócitos mas não em linfócitos (Figura 4.2). Em alguns experimentos, subpopulações de linfócitos também eram positivas para LILRA2 (não mostrado).



**Figura 4.1- Triagem dos hibridomas.** O sobrenadante dos hibridomas a serem testados era adicionado a uma mistura de células P815 transfectadas ou não com LILRA2. Na ausência de anticorpos anti LILRA2, todas as células se mostravam negativas (A). Na presença de anticorpo inespecífico todas as células eram positivas (B). Quando um anticorpo anti-LILRA2 estava presente somente uma população celular se mostrava positiva. Os seguintes isotipos foram detectados IgG1 (C), IgG2b (D) e IgG2a (E).

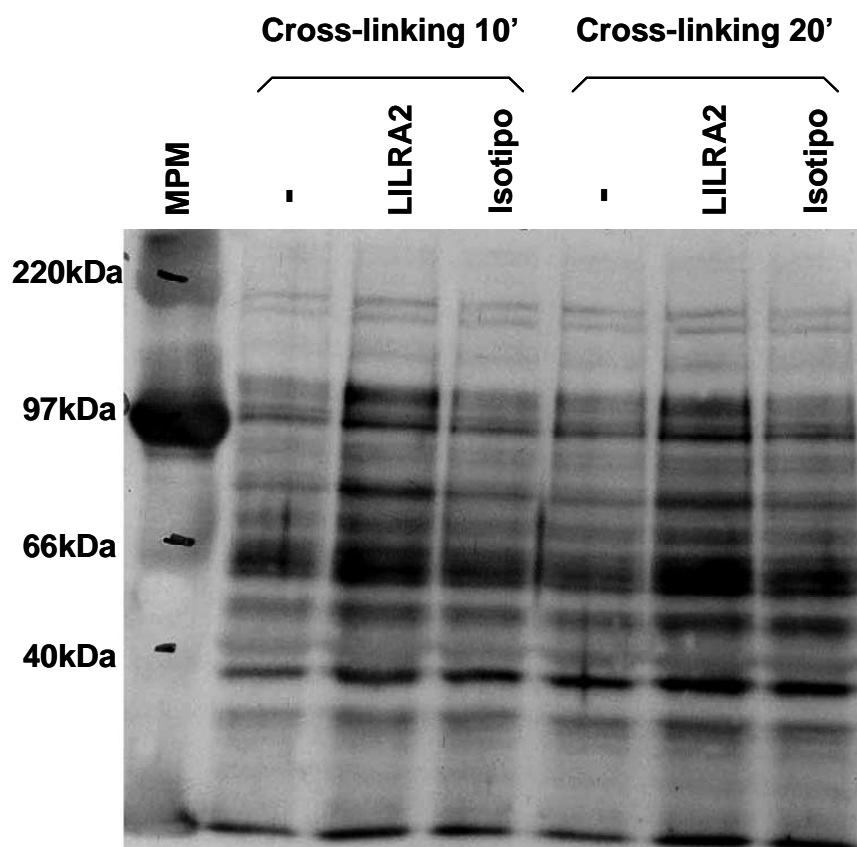


**Figura 4.2 – Análise da expressão de LILRA2 em PBMC por citometria de fluxo.** As PBMC foram marcadas com anti LILRA2 e as diferentes populações celulares foram identificadas com base em tamanho e granulosidade e estão indicadas no gráfico (A) pelas setas: azul – linfócitos, verde – monócitos e rosa – granulócitos. Histogramas de citometria de fluxo mostrando que os linfócitos (B) não expressam LILRA2 enquanto que macrófagos (C) e granulócitos (D) sim.

#### 4.2 – “Cross –linking” do receptor LILRA2 em células mielóides

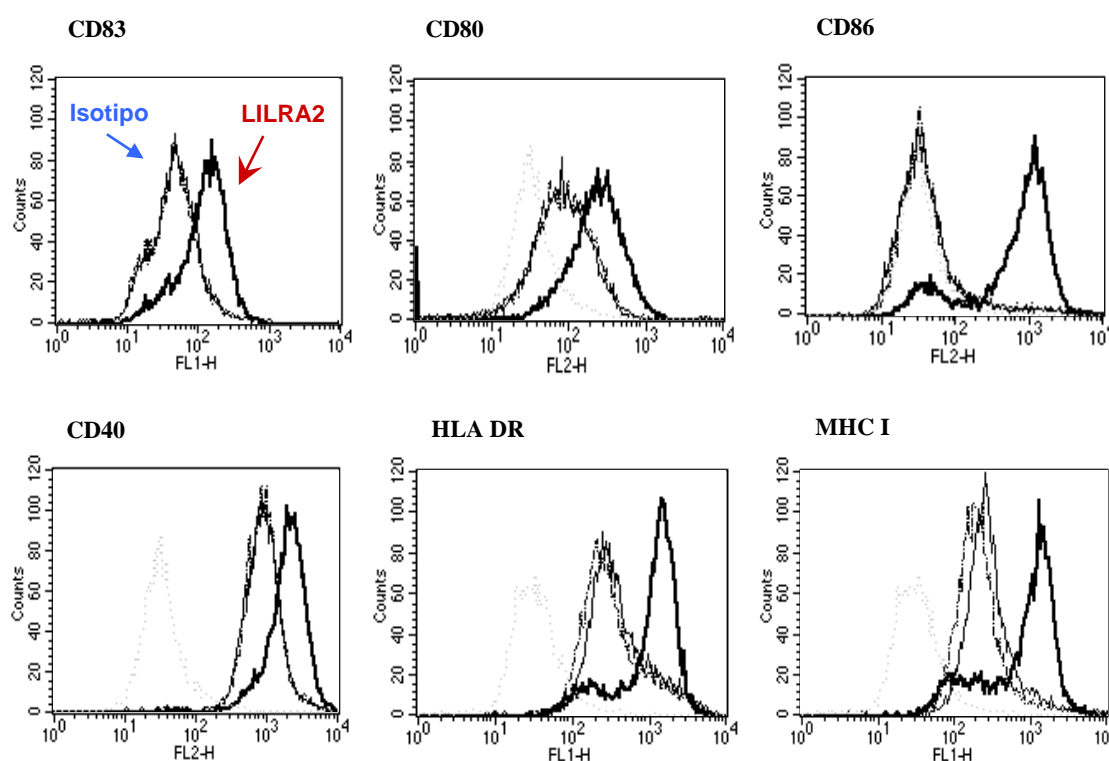
Nos experimentos subsequentes, procuramos avaliar se a ativação de LILRA2 influenciaria a resposta imune *in vitro*. Para isso então começamos a utilizar células dendríticas já que estas são capazes de ativar linfócitos T virgens e de memória, direcionar o perfil de citocinas Th1 e Th2 e induzir tolerância, entre outros. Como o ligante da LILRA2 não foi identificado até o momento, foram realizados experimentos de *cross-linking* em células dendríticas derivadas de monócitos (MDDC). Os monócitos eram inicialmente mantidos em cultura na presença de IL-4 e GM-CSF por 5 ou 6 dias quando eram então utilizados nos experimentos. Procuramos observar se após a estimulação LILRA2 iria induzir eventos de sinalização intracelular nas MDDC. Foi detectado que a ativação via LILRA2 induziu um aumento no conteúdo de proteínas tirosina-fosforiladas após

10 e 20 minutos de estimulação (Figura 4.3). As células estimuladas com o anticorpo isotipo controle, anti NKp44, mostraram nível de fosforilação proteica semelhante ao das células não estimuladas. Este resultado indica que após o cross-link estava ocorrendo transdução de sinal nas MDDC.



**Figura 4.3 – Detecção de proteínas tirosina fosforiladas nas MDDC.** As células eram estimuladas ou não com os anticorpos anti LILRA2 ou o isotipo controle em experimentos de “cross-linking” por 10 ou 20 minutos e então lisadas. A presença de proteínas tirosina fosforiladas era feita por western blot (n=2).

As análises funcionais das MDDC estimuladas por LILRA2 começaram a ser realizadas. Por citometria de fluxo foi detectado que as células estimuladas via LILRA2 por 36-40h apresentavam sinais de ativação. Como observamos na figura 4.4, as MDCC expressam CD83, e mostram aumento na expressão de moléculas co-estimulatórias, como CD80, CD86 e CD40, além do aumento na expressão de moléculas de MHC classe I e II. Nenhum desses efeitos foi observado quando o isotipo controle, anti NKp44, foi utilizado. Ainda foi utilizado um segundo anticorpo isotipo controle, anti MHC I, e novamente nenhum efeito sobre a expressão dos marcadores de ativação celular foi observado (não mostrado).



**Figura 4.4 – LILRA2 induz a expressão de moléculas co-estimulatórias nas MDDC.** Histogramas de citometria de fluxo das MDDC estimuladas ou não com LILRA2 ou isotipo controle em experimentos de “cross-linking”. Após 36-40h de estímulo as células eram coradas com os anticorpos indicados. Linha cinza pontilhada – células marcadas somente com anticorpo secundário. Linha cinza contínua – células não estimuladas. Linha preta fina – células estimuladas com isotipo controle, NKp44. Linha preta grossa – células estimuladas com LILRA2. (n=10). Em determinados histogramas a distinção entre as linhas cinza contínua e preta fina se tornou difícil devido a completa sobreposição das mesmas.

Em alguns experimentos foram utilizados dois isotipos diferentes dos anticorpos anti LILRA2, IgG2a e IgG2b. Semelhante aos resultados obtidos anteriormente, onde o isotipo IgG2a foi utilizado, as células estimuladas via LILRA2 expressavam marcadores de ativação celular enquanto que as mantidas na presença do isotipo controle não (não mostrado). Nos demais experimentos somente o isotipo IgG2a foi utilizado.

Para excluir que os efeitos observados eram devido à sinalização através dos FcR, foram gerados fragmentos  $F(ab')_2$  dos anticorpos utilizados. Usando estes fragmentos também foi possível observar a maturação das MDDC (não mostrado). Esses resultados indicam que a LILRA2 pode influenciar o processo de maturação das células dendríticas, pelo menos *in vitro*.

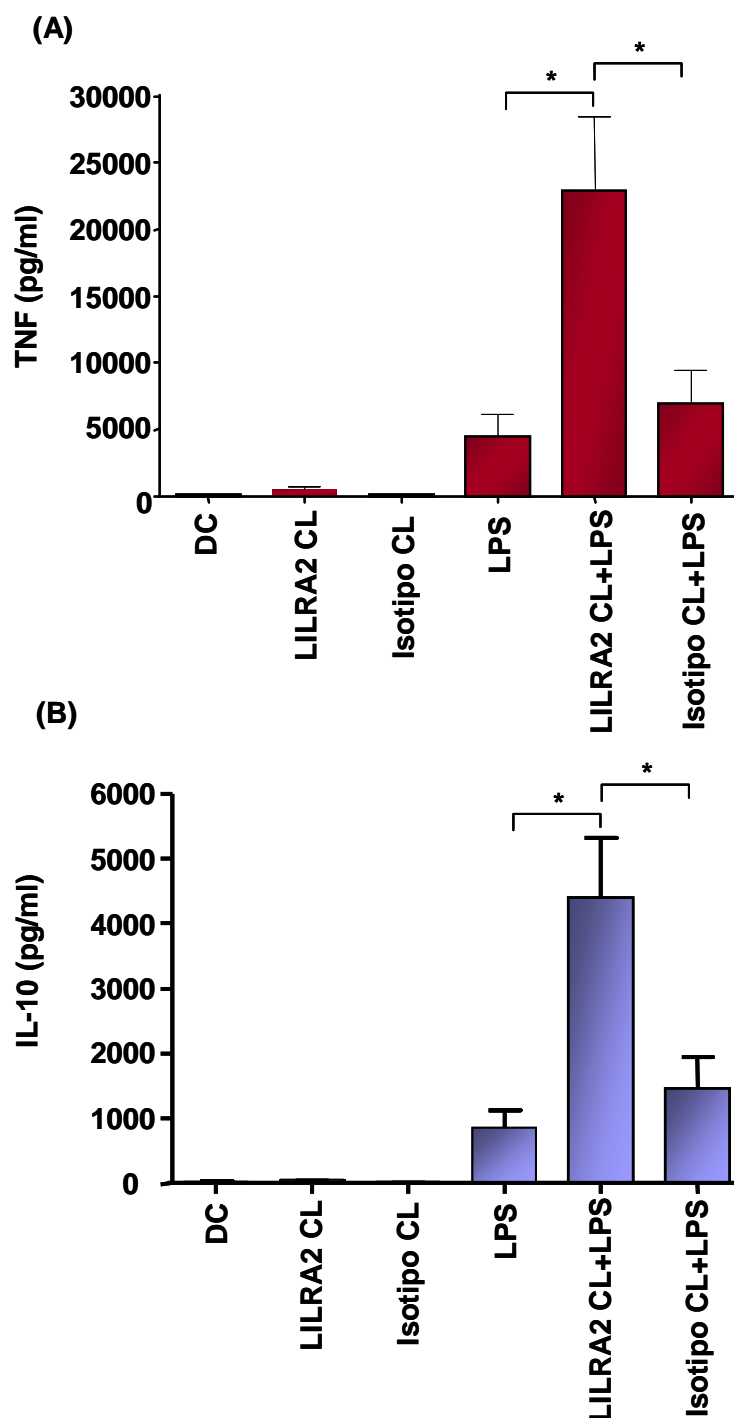
O efeito da ativação através da LILRA2 na secreção de citocinas inflamatórias começou a ser avaliado. As MDDC eram estimuladas via LILRA2 por 36-40h nos experimentos de “cross-linking” e a presença de citocinas no sobrenadante das culturas detectada através de CBA. Como descrito na figura 4.5.A, uma maior produção de TNF foi observada nas culturas estimuladas via LILRA2. Nas culturas não estimuladas foram encontrados  $32 \pm 21.7$  pg/ml, mas nas estimuladas via LILRA2  $462 \pm 220$  pg/mL e nas mantidas com o isotipo controle foram detectados  $29 \pm 21.3$  pg/mL desta citocina. A ativação através de LILRA2 não induziu a secreção das citocinas IL-10, IL-6, IL-12 e IL-1 $\beta$  (não mostrado).

No entanto, um forte efeito sinérgico na secreção de TNF e IL-10 pode ser observado quando as células eram estimuladas simultaneamente através de LILRA2 e TLR4. Como descrito na figura 4.5.A, a produção de TNF em resposta ao LPS foi de  $4451 \pm 1630$  pg/ml, mas quando o receptor LILRA2 também era ativado, foram detectados  $22842 \pm 5547$  pg/mL ( $p < 0.001$ ). Na presença do isotipo controle foram detectados  $6950 \pm 2463$  pg/ml.

Uma aumentada produção de IL-10 também foi observada. Enquanto nas culturas estimuladas unicamente com LPS foram detectados  $855 \pm 257$  pg/mL desta citocina, na presença da estimulação por LILRA2 foram observados  $4396 \pm 923$  pg/mL ( $p < 0.001$ ). Nas culturas mantidas com o isotipo foram



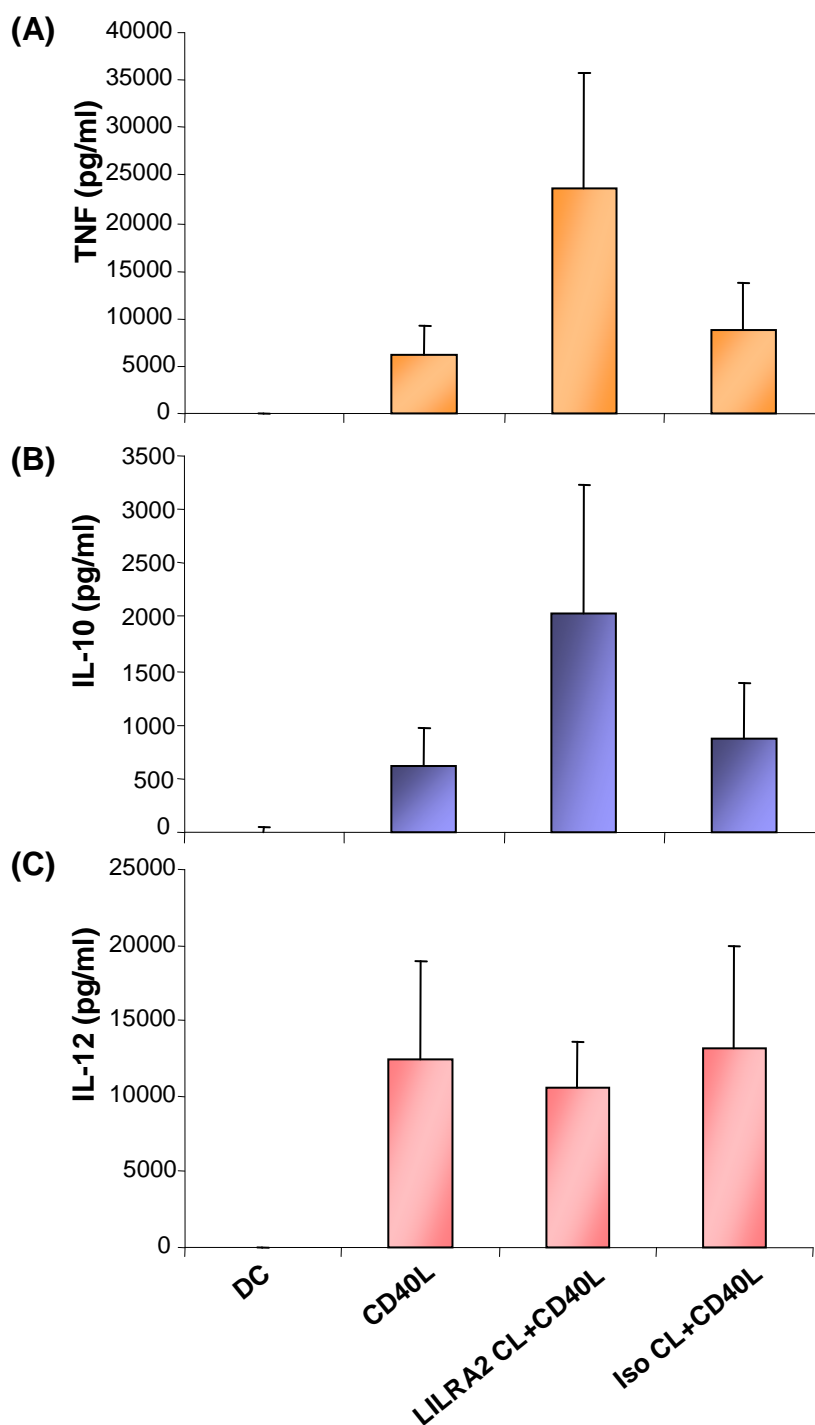
1448±485 pg/mL de IL-10 (Figura 4.5.B). A estimulação através de LILRA2 não alterou os níveis de IL-6, IL-1 $\beta$  ou IL-12 nas culturas co-estimuladas (não mostrado). Com estes dados observamos que LILRA2 tem efeito sinérgico ao LPS na indução de secreção das citocinas inflamatórias TNF e IL-10.



**Figura 4.5 – LILRA2 aumenta a produção de TNF $\alpha$  e IL-10 em resposta ao LPS.** MDDC foram estimuladas ou não com os anticorpos indicados em experimentos de “cross-linking” na presença ou ausência de LPS (0.5 $\mu$ g/ml). Após um período de 36-40h as citocinas TNF (A) e IL-10 (B) foram dosadas no sobrenadante por CBA, \* p=0.001. (n=14)

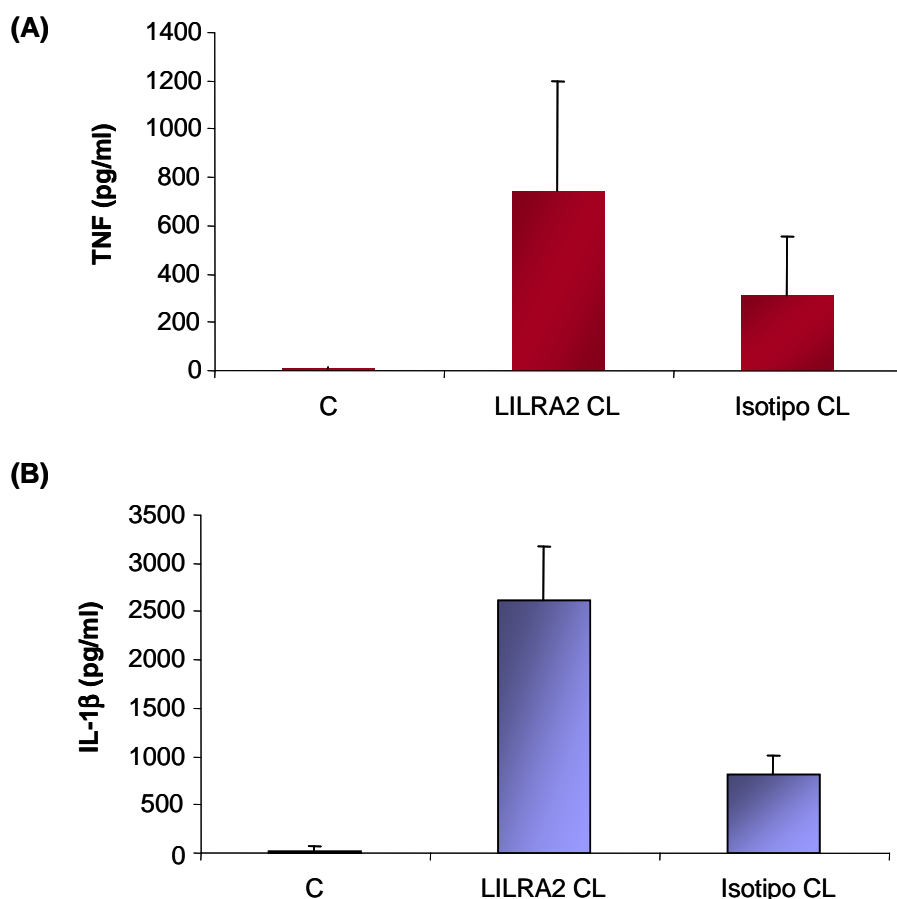
Para averiguar se este efeito sinérgico era observado somente em resposta ao LPS, era necessário utilizar um outro estímulo capaz de ativar as MDDC. As culturas foram estimuladas com células J558L transfectadas com CD40L para mimetizar a interação CD40-CD40L. Nas culturas estimuladas através de CD40 foram detectados  $6035 \pm 3157$  pg/mL de TNF no sobrenadante, enquanto nas estimuladas também com LILRA2 a concentração desta citocina subiu para  $23755 \pm 11883$  pg/ml. A presença do isotipo controle não elevou significativamente os níveis de TNF (Figura 4.6.A). A estimulação via LILRA2 também aumentou a produção de IL-10 em resposta ao CD40 (Figura 4.6.B). As células estimuladas somente com as células transfectadas produziram  $625 \pm 314$  pg/mL e as co-estimuladas  $2047 \pm 1047$  pg/ml. Com o isotipo controle a concentração foi de  $880 \pm 449$  pg/ml. A estimulação através de CD40 foi capaz de induzir elevada produção de IL-12 nestas culturas, no entanto o co-estímulo via LILRA2 não alterou significativamente a produção desta citocina (Figura 4.6.C). Nenhuma diferença foi também observada na secreção de IL-6, IL-8 e IL-1 $\beta$  (não mostrado).

A presença destas citocinas foi também detectada nas culturas onde os F(ab')<sub>2</sub> foram utilizados. Os níveis de TNF nas culturas estimuladas com LPS foram de  $1460 \pm 730$  pg/ml, na presença do anti LILRA2  $3460 \pm 1594$  pg/ml. Com a adição do F(ab')<sub>2</sub> controle foram encontrados  $2107 \pm 1199$  pg/ml. O sinérgico na produção de IL-10 também foi confirmado utilizando esses fragmentos. Enquanto as células estimuladas com LPS produziram  $1163 \pm 490$  pg/ml, as co-estimuladas secretaram  $2464 \pm 850$  pg/ml. Nas culturas onde o F(ab')<sub>2</sub> controle foi utilizado foram encontrados  $1283 \pm 638$  pg/mL de IL-10. Estes resultados indicam que o sinérgico observado é decorrente da estimulação via LILRA2 e não se deve exclusivamente a sinalização via FcR.



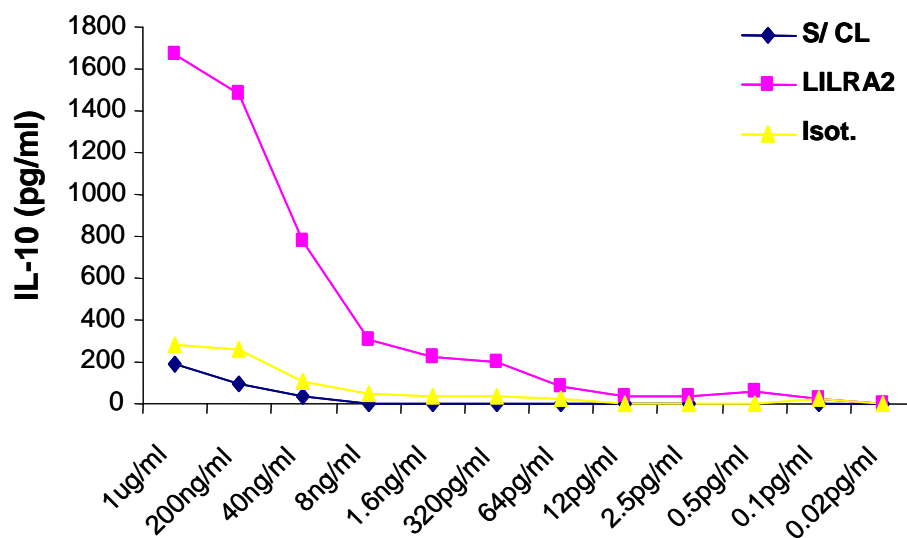
**Figura 4.6 – LILRA2 aumenta a produção de TNF e IL-10, mas não a de IL-12, em resposta ao CD40L.** MDDC foram estimuladas ou não com os anticorpos indicados em experimentos de “cross-linking” na presença ou ausência de células J558L transfectadas ou não com CD40L. Após um período de 36-40h as citocinas TNF (A), IL-10 (B) e IL-12 (C) foram dosadas no sobrenadante por CBA. (n=4)

Para avaliar se LILRA2 também tem efeito ativador em outra célula de origem mielóide, foram realizados experimentos de “cross-linking” em monócitos. Foi observado que a ativação de LILRA2 induz a secreção de TNF e de IL-1 $\beta$  por estas células. Nas culturas estimuladas via LILRA2 foram detectados 746 $\pm$ 262pg/mL de TNF (Figura 4.7.A). Nas culturas estimuladas com o isotipo controle foram observados 311 $\pm$ 142pg/ml. A concentração de IL-1 $\beta$  foi de 2620 $\pm$ 316pg/mL nas culturas estimuladas com LILRA2 e 810 $\pm$ 117pg/mL com o isotipo controle (Figura 4.7.B). O efeito sinérgico entre LPS e LILRA2 foi observado somente na produção de TNF, com um aumento de 10X na produção desta citocina (não mostrado).



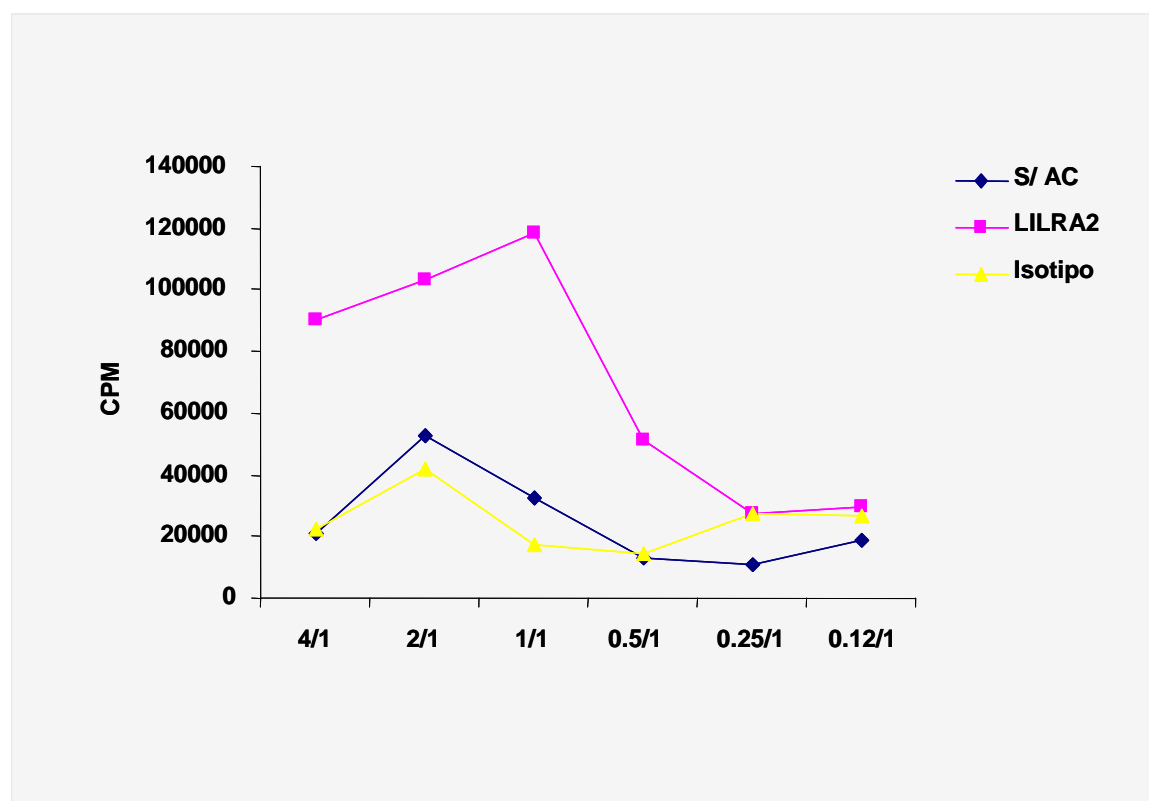
**Figura 4.7 – LILRA2 aumenta a produção de TNF e IL-1 $\beta$  em monócitos.** Monócitos foram estimulados ou não com os anticorpos indicados em experimentos de “cross-linking”. Após um período de 36-40h as citocinas TNF (A) e IL-1 $\beta$  (B) foram dosadas no sobrenadante por CBA. (n=3)

Recentemente vem sendo observado que as moléculas adaptadoras contendo domínios ITAM também podem transmitir sinais inibidores, especialmente quando doses baixas de LPS são utilizadas (Hamerman e cols, 2005). Para detectar se o efeito sinérgico entre LILRA2 e o TLR4 também ocorre quando concentrações mais baixas de LPS são usadas foi feita uma cinética de dose-resposta. Como mostrado na figura 4.8, na presença de LILRA2, a adição de LPS em concentrações que variaram de 1µg/mL até 320pg/mL foi capaz de induzir maior secreção de IL-10. Mesmo utilizando doses menores de LPS, até 0,02pg/ml, nenhum efeito inibidor de LILRA2 pode ser identificado. O efeito sinérgico entre LILRA2 e LPS na produção de TNF foi observado de 1µg/mL até 64pg/mL (não mostrado).



**Figura 4.8 – LILRA2 aumenta a produção de IL-10 em resposta a diferentes concentrações de LPS.** MDDC foram estimuladas ou não com os anticorpos indicados em experimentos de “cross-linking” na presença ou ausência de diferentes concentrações de LPS. Após um período de 36-40h a IL-10 foi dosada no sobrenadante por CBA. (n=2)

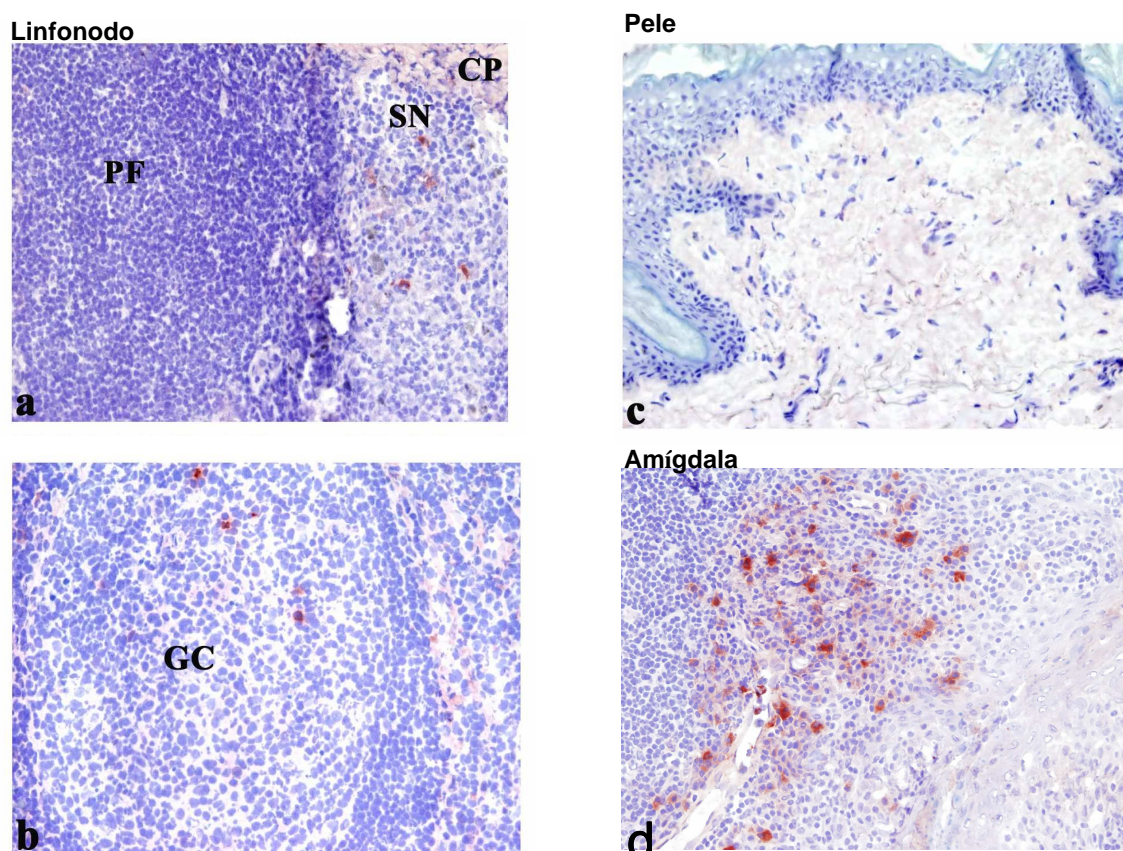
Analisamos ainda o impacto da estimulação via LILRA2 na capacidade aloestimulatória das MDDC. As células dendríticas eram estimuladas em experimentos de cross-linking por 2 dias, lavadas e mantidas em cultura com meio de cultura não suplementado com citocinas. Os linfócitos T CD4 virgens, obtidos de cordão umbilical, eram então adicionados às MDDC. Após 6 dias de co-cultura a linfoproliferação era medida por cintilação líquida. Como descrito na figura 4.9 uma aumentada proliferação das células T CD4 foi detectada nas culturas onde as DC foram estimuladas por LILRA2 quando comparada com as não estimuladas ou tratadas com isotipo controle.



**Figura 4.9 – MDDC estimuladas através de LILRA2 estimulam a proliferação dos linfócitos T CD4.** MDDC foram estimuladas ou não com os anticorpos anti LILRA2 ou o isotipo controle em experimentos de “cross-linking” por 2 dias. O meio contendo IL-4 e GM-CSF era substituído por outro não suplementado com citocinas e os linfócitos T CD4, obtidos de cordão umbilical, eram adicionados as culturas na proporção indicada (linfócito/MDDC). As culturas eram mantidas por mais 6 dias quando H<sup>3</sup>-timidina era adicionada. Após 18h os resultados eram avaliados por cintilação líquida. Experimento representativo de 3.

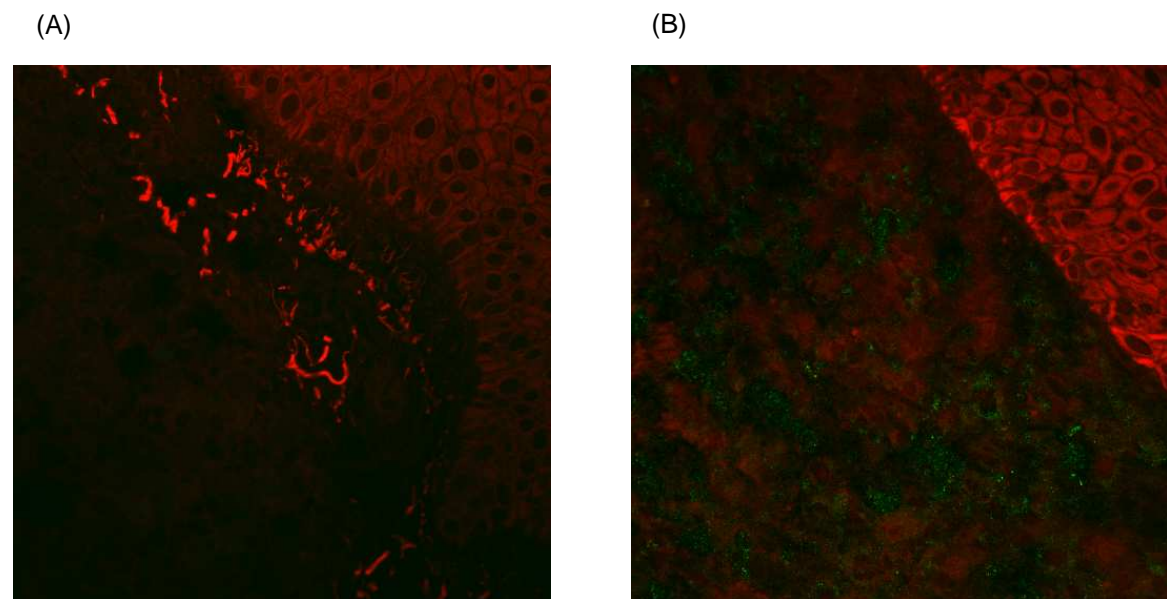
### 4.3 - Expressão de LILRA2 nos tecidos

Bleharski e cols (2003) detectaram maior expressão gênica de LILRA2 nas lesões de pacientes lepromatosos, quando comparados a pacientes tuberculóides. Em experimentos iniciais feitos em colaboração com Dr. William Verni foi possível observar a presença de algumas células LILRA2+ nos sinos (Figura 4.10.A) e no centro germitavivo de linfonodos (Figura 4.10.B) e em amígdalas (Figura 4.10.D). Nenhuma célula positiva foi encontrada na pele saudável (Figura 4.10.C).



**Figura 4.10 – Expressão de LILRA2 em linfonodos (a and b), pele (c) e amígdalas (d).** A presença de células LILRA2+ foi observada no sinus (SN) e no centro germitavivo (GC) dos linfonodos e também em amígdalas. Nenhuma reatividade foi observada em células de Langerhans e células dendríticas da derme de pele saudável. PF indica folículo primário e CP indica cápsula.

Para detectar a expressão proteica deste receptor em biópsias dos pacientes lepromatosos foram feitos experimentos de imunofluorescência. Como descrito na figura 4.11, a expressão de LILRA2 pode ser detectada nas lesões dos pacientes. Nos experimentos subseqüentes, foi detectado que o padrão de expressão de LILRA2 no infiltrado inflamatório presente nas lesões lepromatosas é semelhante ao do CD68 e CD14, marcadores presentes em macrófagos/monócitos (não mostrado). Raras células LILRA2+ foram encontradas em lesões tuberculóides.

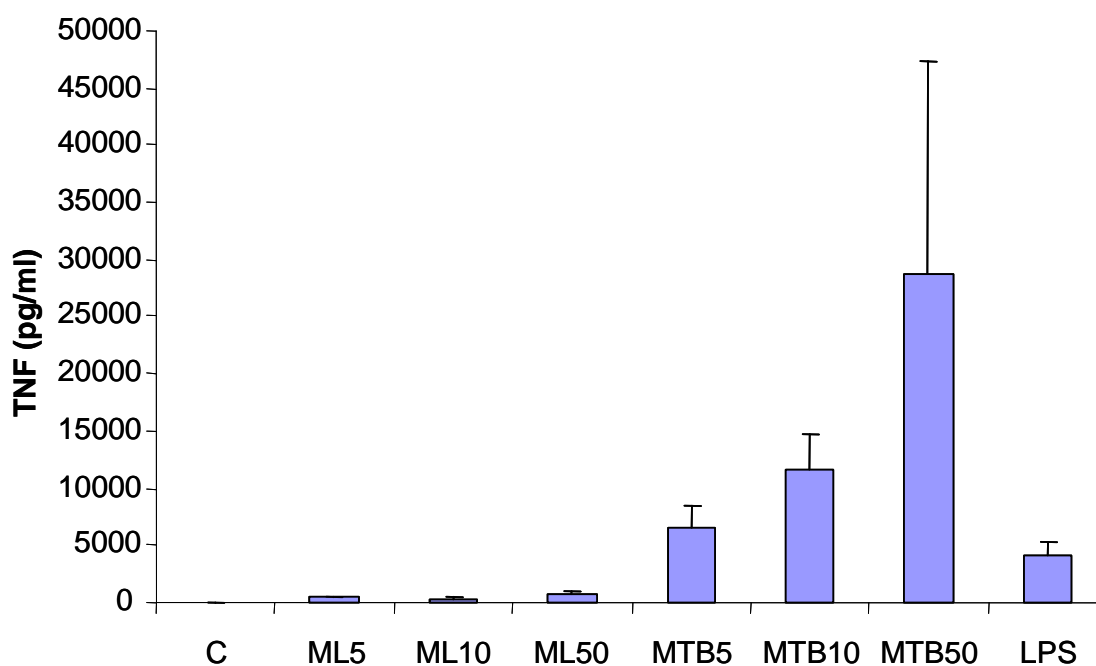


**Figura 4.11 – Expressão de LILRA2 em lesões de pacientes com hanseníase.** A presença de células LILRA2+ (fluorescência verde) foi observada na derme, mas não na epiderme, das lesões lepromatosas (B). Nenhuma reatividade foi observada em amostras tratadas com o isotipo controle (A). As biópsias foram contra-coradas com azul de evans (Fluorescência vermelha). A visualização das lâminas foi feita por microscopia confocal, aumento x40.



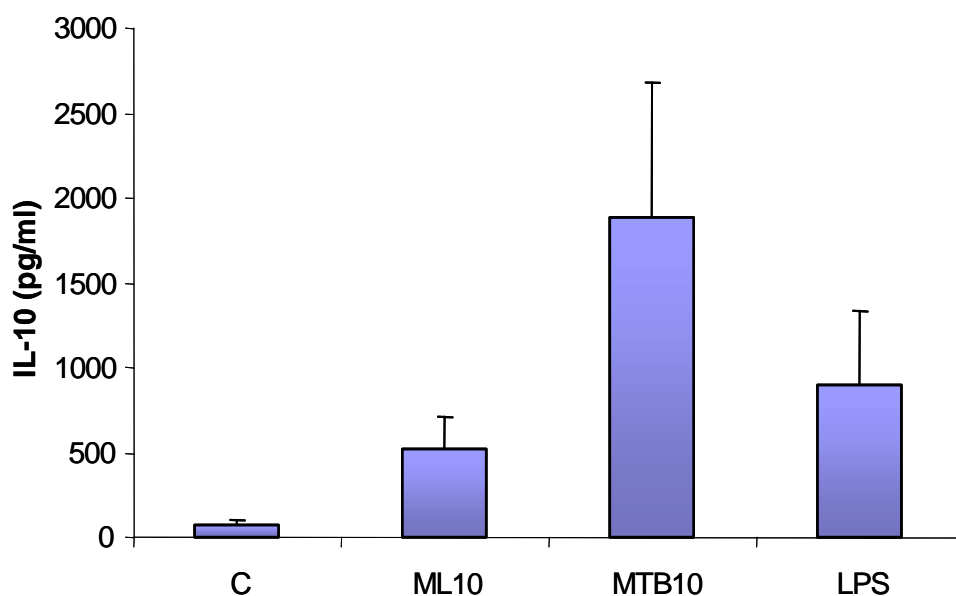
#### 4.4 - Efeito das Micobactérias sobre as DC

Sabendo que a ativação de LILRA2 pode influenciar a ativação das células dendríticas, começamos a avaliar se a presença do *M. leprae* modularia o estado de ativação destas células. Foi inicialmente avaliado se a presença do *M. leprae* induziria a secreção de citocinas pelas células dendríticas. Como descrito na figura 4.12, o *M. leprae* induziu quantidades muito inferiores às observadas nas culturas estimuladas com *M. tuberculosis*. Nas culturas estimuladas com *M. leprae* a 5, 10 ou 50µg/mL foram detectados 365±228, 324±84 e 750±319 pg/mL de TNF, respectivamente. Porém, na presença destas mesmas concentrações de *M. tuberculosis* níveis mais altos de TNF foram encontrados, 6565±1918, 11563±3521 e 28835±18501.



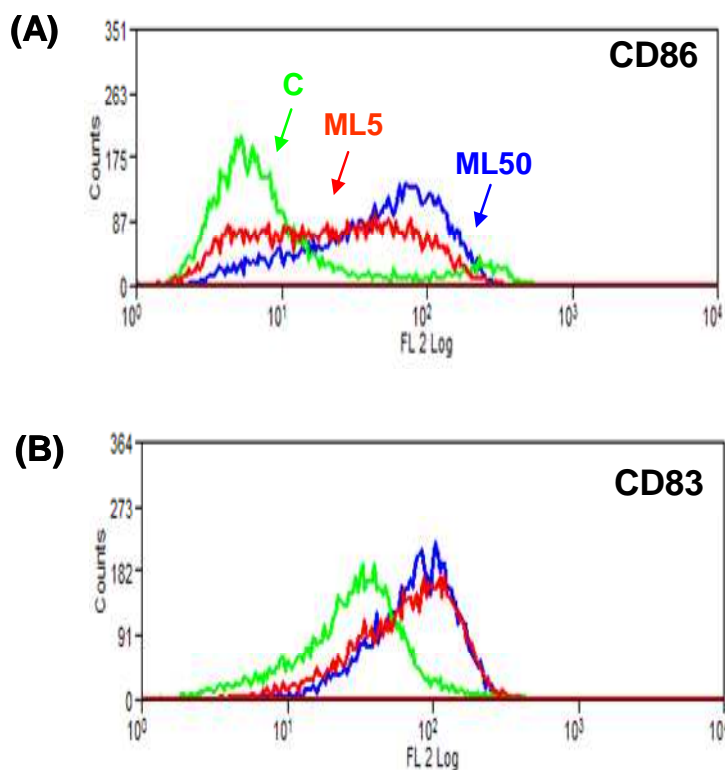
**Figura 4.12 – *M. tuberculosis*, mas não o *M. leprae* induz a secreção de TNF de forma dose dependente.** As MDCC foram incubadas com diferentes concentrações de micobactérias (5, 10 e 50µg/ml, correspondendo a MOI 10, 20 e 100) ou LPS (0.5µg/ml) por 36-40h. Após esse período o SN era coletado e a presença de citocinas analisada por CBA. (n=3)

Em seguida, os níveis de IL-10 também foram quantificados. Nas culturas estimuladas com 10 $\mu$ g/mL de *M. leprae* já foi possível detectar este mediador, 526 $\pm$ 177pg/ml. Nas culturas controles foram encontrados 70 $\pm$ 35pg/ml. Mais uma vez o *M. tuberculosis* induziu maiores níveis de citocina, 1888 $\pm$ 806 (Figura 4.13).



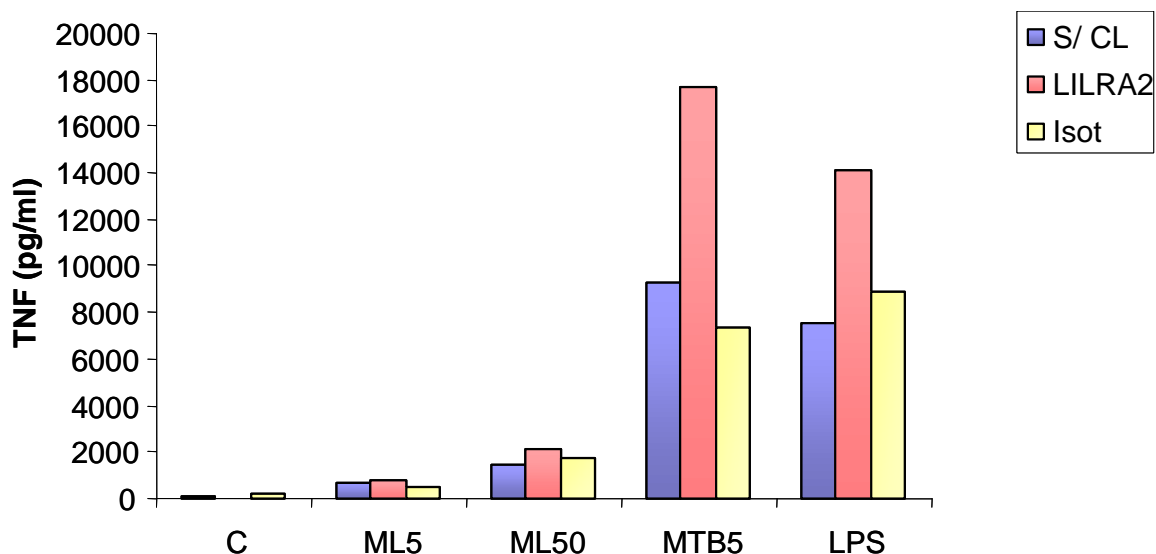
**Figura 4.13 – *M. tuberculosis* e *M. leprae* induzem a secreção de IL-10.** As MDCC foram incubadas com *M. leprae*, *M. tuberculosis* (10 $\mu$ g/ml, correspondendo a MOI 20) ou LPS (0.5 $\mu$ g/ml) por 36-40h. Após esse período o SN era coletado e a presença de citocinas analisada por CBA. (n=3)

Ainda observamos que nas culturas estimuladas com *M. leprae* ocorre aumento na expressão de CD83 e CD86 de forma dose dependente (Figura 4.14), ainda que de forma menos eficiente que nas culturas mantidas na presença de *M. tuberculosis* (não mostrado).



**Figura 4.14 – *M.leprae* induz a expressão de moléculas co-estimatórias nas MDDC.** Histogramas de citometria de fluxo das MDDC estimuladas ou não com *M. leprae*. Após 36-40h de estímulo as células eram coradas com os anticorpos CD86 (A) ou CD83 (B). Linha verde – células não estimuladas. Linha vermelha – células estimuladas com *M. leprae* 5µg/ml. Linha azul – células estimuladas com *M. leprae* 50µg/ml. Histograma de experimento representativo de 3.

Em novos experimentos de “cross-linking” nenhum efeito sinérgico entre o *M. leprae* e LILRA2 foi observado (Figura 4.15). Diferente do observado quando as culturas eram estimuladas com LPS ou *M. tuberculosis*. Enquanto nas culturas estimuladas unicamente com *M. leprae* foram detectados 1445 pg/mL desta citocina, com a co-estimulação via LILRA2 foram observados 2097 pg/ml. Nas culturas mantidas com o isotipo foram 1711 pg/mL de TNF. Já nas culturas estimuladas com *M. tuberculosis* foram encontrados 9277pg/mL e nas co-estimuladas 17638. Com o isotipo controle foram 7365 pg/mL de TNF.



**Figura 4.15 – *M. leprae* não tem efeito sinérgico a LILRA2 na produção de TNF.** MDCC foram estimuladas ou não com os anticorpos indicados em experimentos de “cross-linking” na presença ou ausência de *M. leprae* ou *M. tuberculosis* (5 e 50µg/ml, correspondendo a MOI 10 e 100) ou LPS (0.5µg/ml). Após um período de 36-40h, TNF foi dosado no sobrenadante por CBA. Experimento representativo de 3.

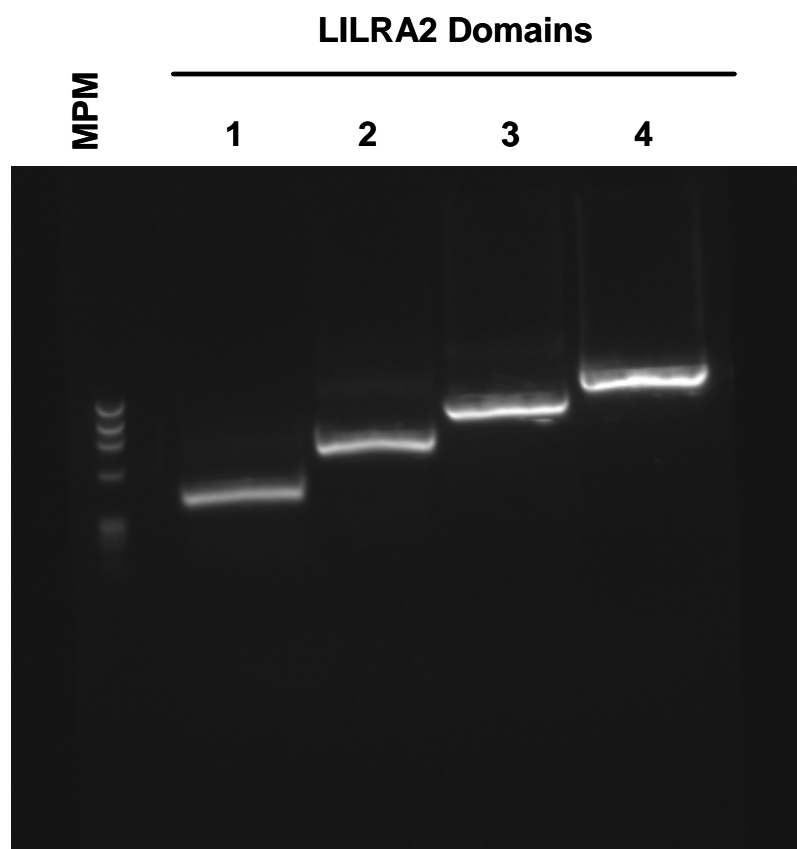
#### 4.5 - A busca pelo ligante

Para tentar identificar o ligante de LILRA2 foi construída uma proteína recombinante formada pela LILRA2 conjugada à fração Fc de IgG e a  $\alpha$ TP (alpha tail piece). A  $\alpha$ TP quando conjugada à fração Fc das IgA é a responsável pela formação dos dímeros dessa imunoglobulina, no entanto, quando conjugada a fração Fc das IgG ocorre a formação de multímeros, levando à formação de dodecâmeros (descrito nas páginas seguintes como tetrâmero). É importante ressaltar que a fração Fc-IgG foi previamente mutata em seu sítio de ligação, evitando assim a ligação inespecífica do tetrâmero a receptores Fc.

Inicialmente foram realizados PCR para amplificar a região extracitoplasmática de LILRA2. Foram amplificados diferentes fragmentos, contendo um, dois, três ou os quatro domínios Ig-like. A figura 4.16 mostra a foto do gel contendo os diferentes fragmentos de LILRA2. Os fragmentos foram purificados, digeridos e

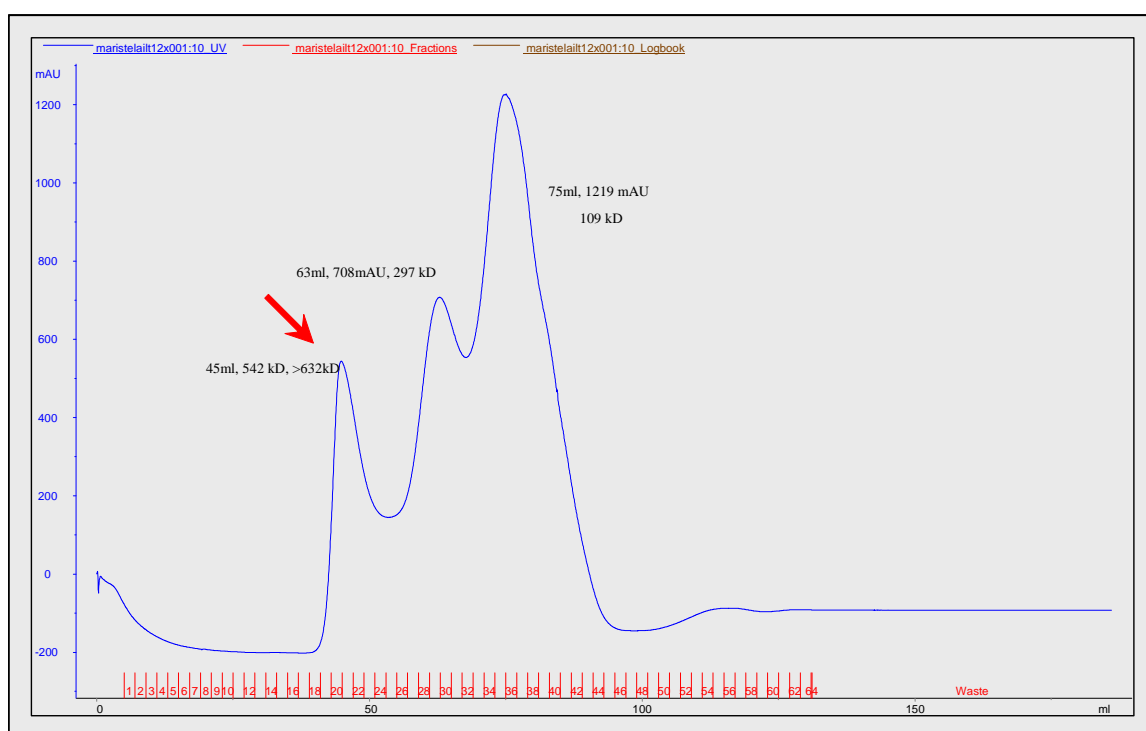
inseridos no vetor. Os produtos de PCR tinham os seguintes tamanhos 383pb, 685pb, 983pb e 1330pb.

O vetor contendo os insertos foi transfectado em células CHO DHFR<sup>-</sup> e as células produtoras da molécula recombinante foram selecionadas por ELISA. Células produtoras de tetrâmeros contendo 1, 2 ou os 4 domínios Ig-like da LILRA2 foram obtidas. Somente o tetrâmero contendo a LILRA2 completa foi utilizado, já que o sítio de ligação ao ligante poderia estar presente nos domínios mais distais da molécula, semelhante ao observado com LILRB1 e B2.



**Figura 4.16 – Amplificação da região extracelular de vários domínios de LILRA2 por PCR.** Diferentes fragmentos da região extracelular de LILRA2, contendo 1, 2, 3 ou os 4 domínios Ig-like (canais 1 a 4, respectivamente) foram amplificados por PCR. MPM – marcador de peso molecular.

Aproximadamente 2 litros do sobrenadante das culturas foram posteriormente fracionados por FPLC. A figura 4.17 mostra o gráfico obtido durante a cromatografia em coluna de gel filtração. As frações positivas foram novamente identificadas por ELISA. O tetrâmero foi detectado nas primeiras frações (seta indicativa no gráfico).



**Figura 4.17 – Fracionamento por FPLC do sobrenadante das culturas de células CHO produtoras do tetrâmero.** A seta indica o pico correspondente às frações onde o tetrâmero foi encontrado.

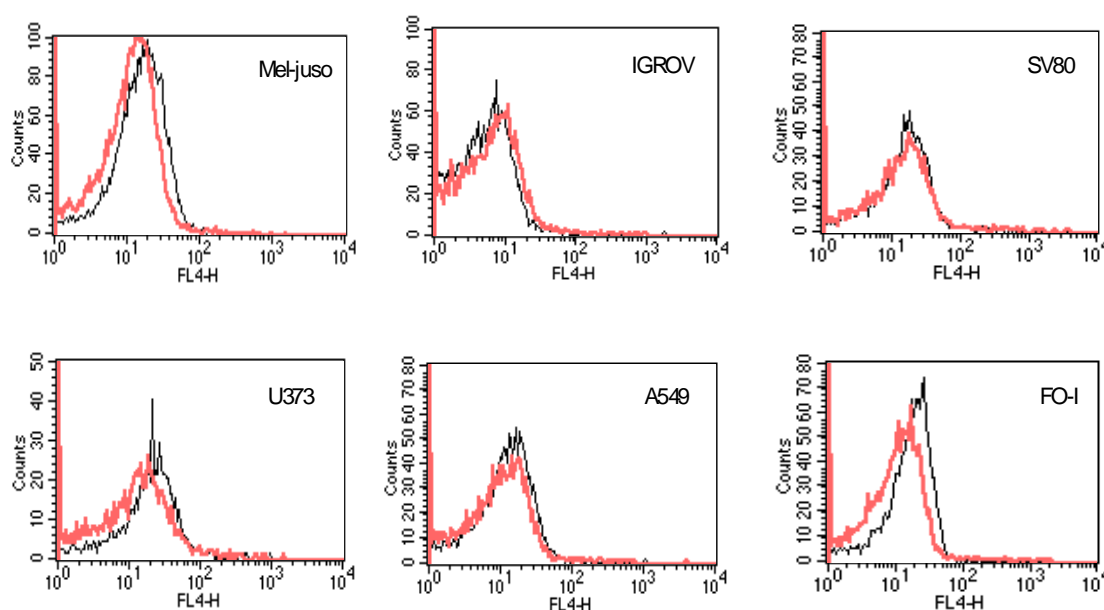
Para identificar possíveis células que expressassem o ligante da LILRA2, adicionávamos 10 $\mu$ L da fração contendo o tetrâmero a diversos tipos de linhagens celulares e também células primárias (Tabela 4.1). Para detectar a possível ligação era utilizado um anticorpo secundário anti hIgG-Fc. Os resultados eram analisados por citometria de fluxo.

Tabela 4.1 – Lista das células humanas testadas quanto à ligação ao tetrâmero.

Nome	Tipo Celular	Nome	Tipo Celular
NALM6	Linfoma de células pre-B	SV80	Fibroblato transformado por SV40*
K562	Linfoma mieloide	HT 1080	Fibrosarcoma
KGI	Linfoma agudo pro-mielomonocítico	HCC 1395	Carcinoma mamário
Reh	Linfoma agudo linfoblástico	MCF	Adenocarcinoma mamário
HL 60	Linfoma agudo mielóide	A549	Carcinoma de pulmão
U937	Linfoma monocítico	KJ29	Carcinoma renal
Raji	Linfoma de linfócitos B	HEK 293	Linhagem de rim embrionário transformada por adenovírus
Daudi	Linfoma de linfócitos B	KN2	Linfoma de linfócitos B
RPMI8866	Linfoma de linfócitos B	SKLMSI	Miosarcoma
Jurkat	Linfoma de linfócitos T	Colo 38	Carcinoma de cólon
NK92	Linfoma de células NK	LAZ 221	Linfoma agudo linfocítico
Meljuso	Melanoma		
SK-Mel 15	Melanoma		
MZ2 - Mel	Melanoma	Linfócitos	(CD3+)
FO-I	Melanoma	Monócitos	(CD14+)
U373	Glioblastoma	DC	células dendríticas
HTB 12	Glioblastoma	NK	células natural killer
IGROV	Carcinoma de ovário	pDC	plasmacitóide DC

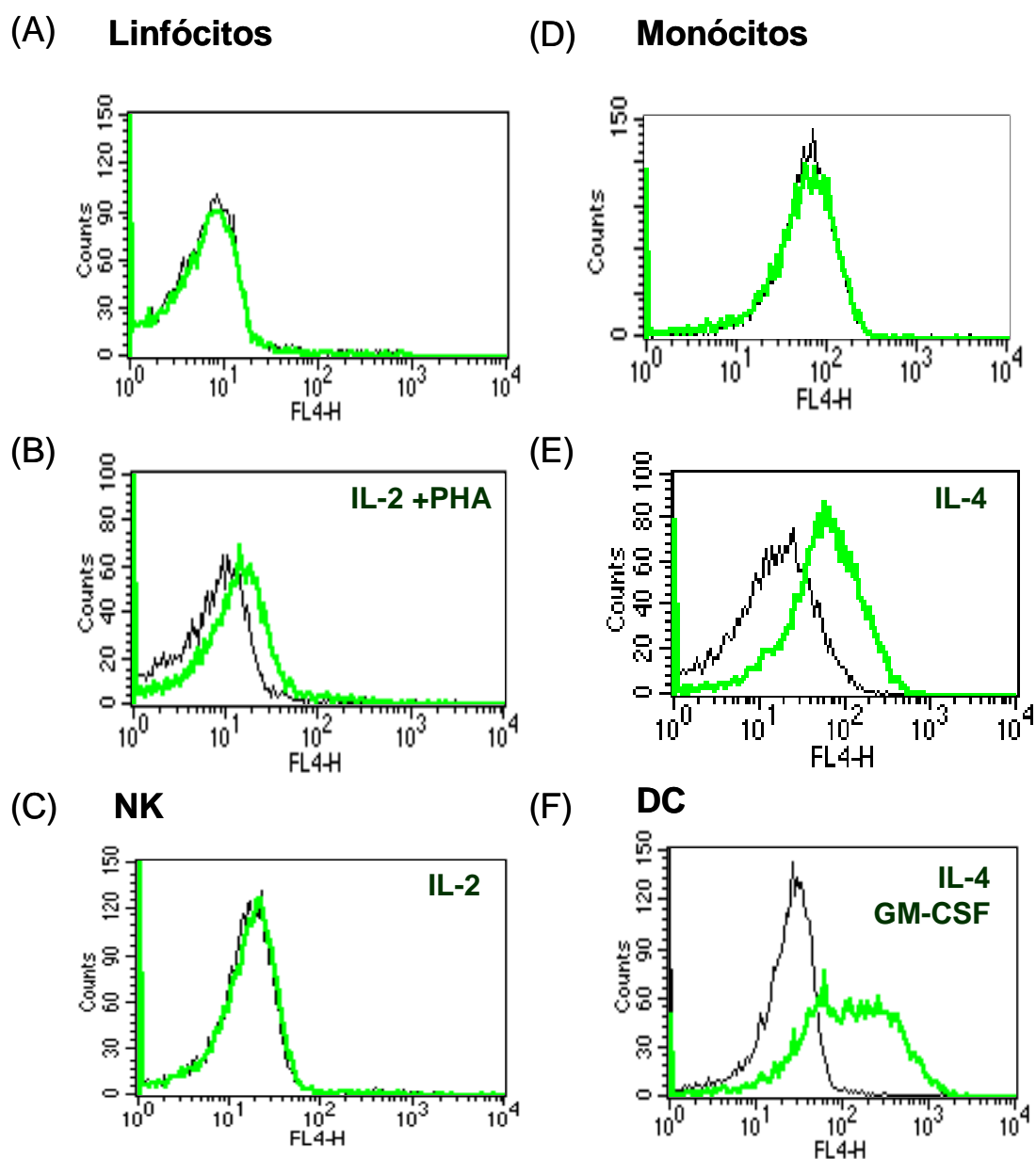
\*SV40 – simian virus 40

Foram utilizadas nos experimentos linhagens celulares de origem linfóide, mielóide, além de células epiteliais, endoteliais, fibroblastos e carcinomas de diversos tipos, nenhuma ligação do tetrâmero foi observada. A lista de todas as linhagens testadas pode ser vista na tabela 4.1. A figura 4.18 mostra alguns histogramas representativos. Da mesma maneira, as seguintes células primárias: linfócitos, estimulados ou não, monócitos, células NK e pDC (células dendríticas plasmacitóides, não mostrado) também se mostraram negativas. No entanto, o tetrâmero foi capaz de se ligar a células dendríticas imaturas e também a monócitos mantidos na presença de IL-4 (figura 4.19), mas não na de IL-2, IL-15, GM-CSF (não mostrado).



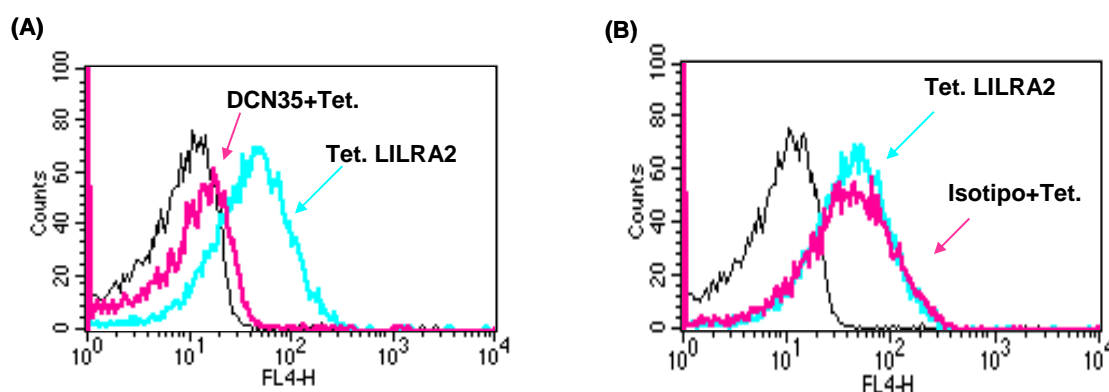
**Figura 4.18 – Tetrâmero não se liga a linhagens celulares.** As linhagens celulares de diversas origens foram incubadas com o tetrâmero (linha rosa) ou somente com os anticorpos secundários (linha preta) e avaliadas por citometria de fluxo. Histogramas representativos de alguns dos tipos celulares são mostrados. Para todas as células testadas nenhuma ligação ao tetrâmero foi observada. (n=3)





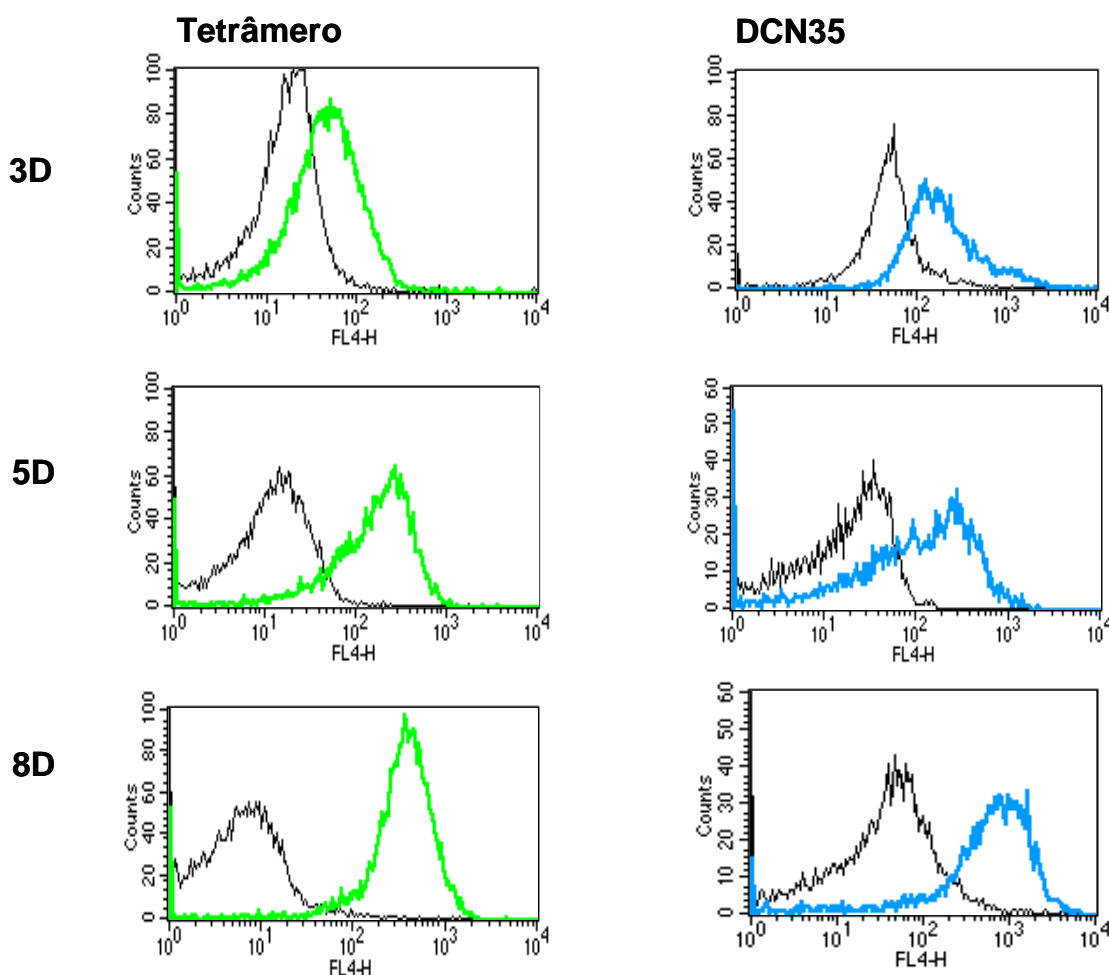
**Figura 4.19 – Tetrâmero se liga a células dendríticas e monócitos estimulados com IL-4.** As células, estimuladas ou não, foram incubadas com o tetrâmero (linha verde) ou somente com os anticorpos secundários (linha preta) e avaliadas por citometria de fluxo. Linfócitos estimulados com IL-2 e PHA (B) ou não (A), células NK mantidas em cultura na presença de IL-2 (C) e monócitos (D) não se ligaram ao tetrâmero (n=3). Monócitos estimulados com IL-4 (E) ou células dendríticas (F) se ligaram ao tetrâmero (n=20).

Embora o tetrâmero tenha alta avidéz, sua afinidade pela molécula alvo é possivelmente baixa, o que impossibilita seu uso para experimentos de imunoprecipitação. O passo seguinte então foi procurar um anticorpo que bloqueasse a ligação do tetrâmero à célula alvo. Uma biblioteca de anticorpos anti células dendríticas já estava disponível no laboratório do Dr Marco Colonna. Toda a biblioteca foi testada e um dos anticorpos, denominado DCN35 se mostrou capaz de inibir a interação LILR2-célula dendrítica (Figura 4.20.A). A utilização do isotipo controle não interferiu na interação tetrâmero-DC (Figura 4.20.B).



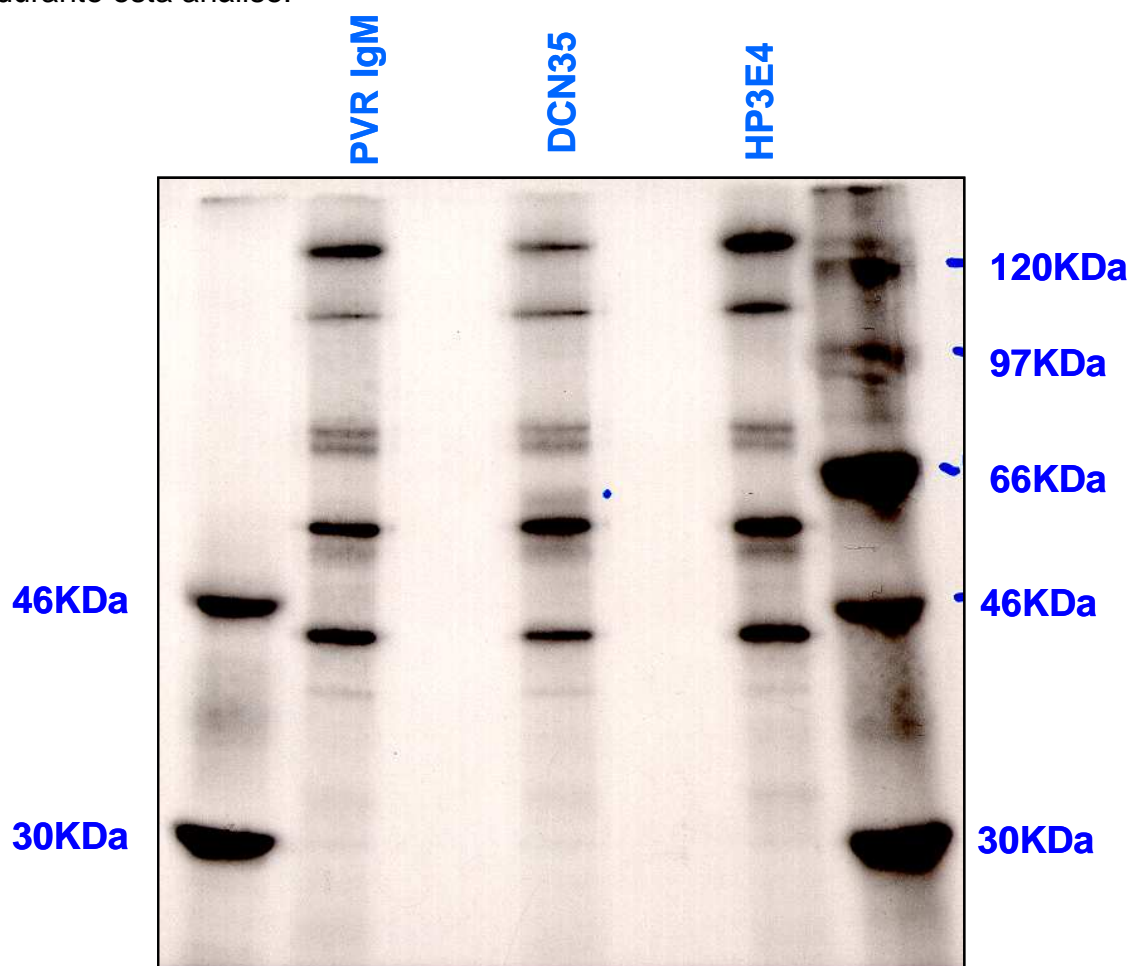
**Figura 4.20 - DCN35 inibe a ligação da LILRA2 a células dendríticas.** As células dendríticas foram pré-incubadas (linha rosa) ou não (linha azul) com o anticorpo DCN35 (A) ou um isotipo controle (B), posteriormente o dodecâmero foi adicionado e os resultados foram avaliados por citometria de fluxo. Células incubadas somente com os anticorpos secundários (linha preta) foram utilizadas como controle negativo. Histograma representativo de 15 experimentos. Tet. – tetrâmero

Foram realizados ainda experimentos de cinética para avaliar se a expressão da molécula reconhecida pelo DCN35 coincidia com a ligação do tetrâmero às células dendríticas. No primeiro dia de cultura com IL-4 e GM-CSF não há ligação do tetrâmero às DC e também não ocorre ligação do DCN35 a estas células. No entanto, a partir do terceiro dia começamos a detectar simultaneamente a ligação do tetrâmero e do DCN35 às células. A intensidade de fluorescência da ligação dos dois reagentes foi aumentando até o oitavo dia de cultura (Figura 4.21). Todos estes resultados sugeriam que DCN35 poderia reconhecer o ligante de LILRA2. Este anticorpo, embora sendo do isotipo IgM foi utilizado nos experimentos de imunoprecipitação.



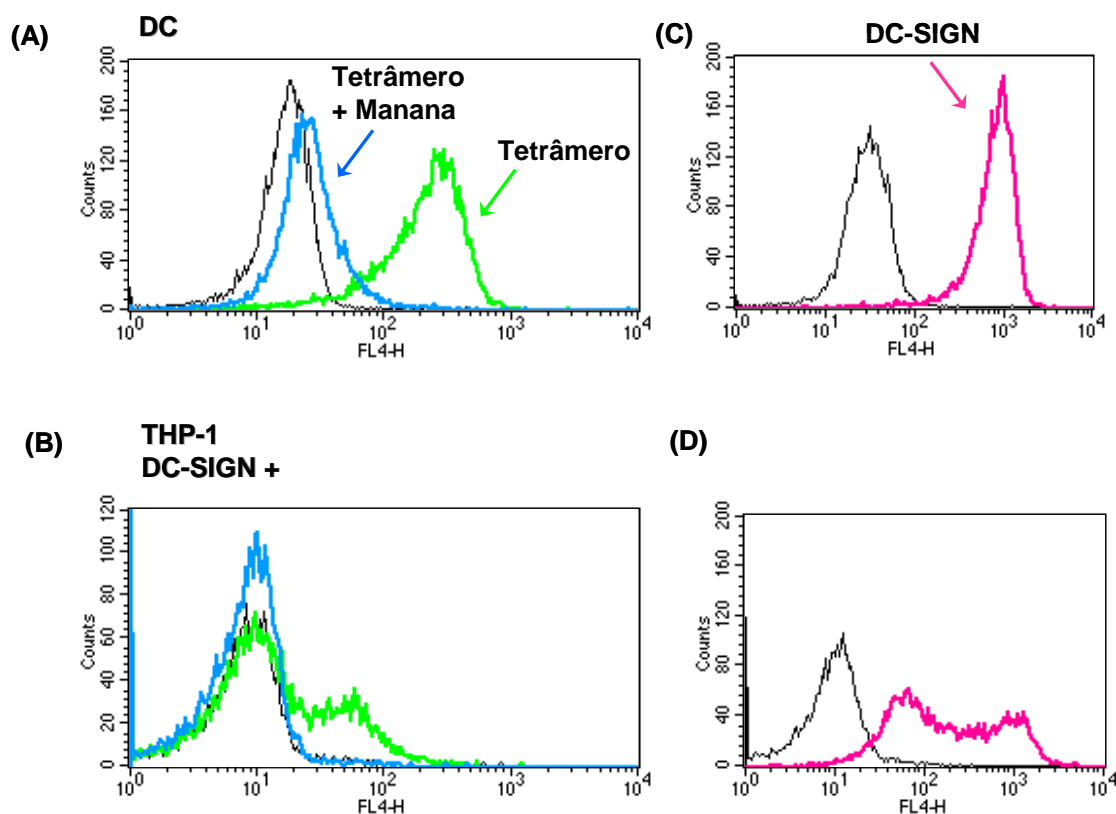
**Figura 4.21 – Tetrâmero e DCN35 se ligam a células dendríticas de forma tempo dependente.** Células dendríticas foram mantidas em cultura por diferentes períodos de tempo (3, 5 ou 8 dias) e a ligação do tetrâmero (linha verde) e de DCN35 (linha azul) foi avaliada por citometria de fluxo. Células incubadas somente com os anticorpos secundários (linha preta) foram utilizadas como controle negativo. Histograma representativo de 2 experimentos.

Para tentar identificar a molécula reconhecida pelo anticorpo DCN35, o possível ligante da LILRA2, foram realizados experimentos de imunoprecipitação (IP). As células dendríticas foram marcadas com enxofre radioativo ( $S^{35}$ ) e DCN35 foi utilizado para a precipitação. O precipitado foi avaliado por eletroforese e autoradiografia. Dois anticorpos do mesmo isotipo foram utilizados como controle. Uma banda de aproximadamente 60Kda foi observada na IP feita com DCN35 (Figura 4.22). Um segundo experimento de IP foi realizado e a banda de 60kDa foi avaliada por espectrometria de massa. No entanto, os resultados não foram satisfatórios, já que grande quantidade de imunoglobulina foi identificada durante esta análise.



**Figura 4.22 – Imunoprecipitação feita em células dendríticas utilizando DCN35.** Células dendríticas foram marcadas radioativamente ( $S^{35}$ ) e DCN35 foi utilizado para a imunoprecipitação. Dois anticorpos do mesmo isotipo foram usados como controles. Marcadores de peso molecular também podem ser visualizados. Uma banda de aproximadamente 60kDa (indicada com um ponto azul) foi visualizada.

Foram feitos ainda experimentos para analisar a possível interação entre o tetrâmero e diversas linhagens transfectadas também disponíveis no laboratório do Dr Marco Colonna. Observamos que o tetrâmero se ligava a células DC-SIGN+. No entanto, já está descrito que DC-SIGN interage com moléculas ricas em manose. Como o tetrâmero foi produzido em células CHO onde a glicosilação da proteínas é rica em manose, isto nos levou a crer que a interação entre o tetrâmero e as MDDC poderia ser apenas devida ao excesso de manose presente nesta molécula recombinante. Foi realizado então um experimento onde as MDDC foram pré-incubadas com Manana, capaz de saturar os receptores que reconhecem manose, e posteriormente com o tetrâmero. Como descrito na figura 4.23, a presença de manana aboliu a interação entre LILRA2 e as MDDC ou com as células transfectadas. Sendo assim, não foi possível identificar o ligante da LILRA2.



**Figura 4.23 – Manana inibe a ligação da LILRA2 a células DC-SIGN+.** As células dendríticas (A) ou THP-1 transfectadas com DC-SIGN (B) foram pré-incubadas (linha azul) ou não (linha verde) com manana. Posteriormente o tetrâmero foi adicionado e os resultados foram avaliados por citometria de fluxo. Células incubadas somente com os anticorpos secundários (linha preta) foram utilizadas como controle negativo. Expressão de DC-SIGN nas células dendríticas (C) e nas THP1 DC-SIGN+ (D). Histograma representativo de 2 experimentos.

## 5 – Discussão

### O ligante de LILRA2

Embora os experimentos de “cross-linking” possam contribuir para o entendimento da fisiologia do LILRA2, para entender a fisiologia do LILRA2 será essencial identificar seu ligante. Várias tentativas já foram realizadas. No laboratório do Dr. M. Colonna, inicialmente foram desenvolvidos dímeros de LILRA2 conjugados à fração Fc das Ig murinas (M. Colonna, comunicação pessoal). Esta molécula recombinante foi utilizada na triagem de diversos tipos celulares, mas nenhuma ligação do dímero foi encontrada. Ainda neste período, eles observaram que tetrâmeros do MHC não se ligavam a células transfectadas com LILRA2. Ficou assim evidente que diferente do LILRB1 e B2, LILRA2 não reconhecia moléculas do HLA. No entanto nenhuma informação a respeito do ligante para este receptor foi obtida.

Posteriormente foi desenvolvida uma linhagem celular LILRA2 “reporter” (M. Colonna, comunicação pessoal). Neste sistema quando LILRA2 fosse ativada a célula teria fluorescência verde que seria detectada por citometria de fluxo. Em experimentos de “cross-linking”, LILRA2 era ativado e a fluorescência detectada, indicando que o sistema funcionava. Porém o contato com nenhuma célula induziu a ativação do reporter.

Na tentativa de gerar um reagente com alta afinidade e/ou avidéz que possibilitasse a busca pelo ligante, foi então utilizado o vetor que possibilita a secreção do dodecâmero (descrito na tese como tetrâmero). Este vetor se mostrou bastante eficiente pois apresenta promotor de citomegalovírus que favorece a alta expressão do inserto. A presença do  $\alpha$ TP possibilita a formação de multímeros, dando a molécula recombinante maior avidéz pelo seu ligante. Esta maior avidéz é especialmente importante para receptores ativadores já que eles tendem a ter menor afinidade que os receptores inibidores. Com o uso de metotrexato nas culturas ainda se pode favorecer uma maior secreção da molécula recombinante. A utilização do fração Fc mutada em seu sítio de ligação reduz/inibe interações inespecíficas desta molécula recombinante com células

que expressem FcR humano. De fato, nenhuma interação foi detectada entre o tetrâmero e células transfectadas com CD32 (não mostrado).

Como descrito na figura 4. 19, o tetrâmero se ligou a DC e a monócitos mantidos na presença de IL-4. Um anticorpo, DCN35, capaz de bloquear esta interação foi identificado (Figura 4.20) e usado em experimentos de imunoprecipitação, já que este anticorpo possivelmente reconhecia o ligante de LILRA2. Nestes experimentos de imunoprecipitação e espectrometria de massa foi utilizado o sobrenadante da cultura dos hibridomas contendo o anticorpo DCN35. No entanto, este sistema não foi eficiente porque grande quantidade do anticorpo foi detectada na espectrometria de massa, especialmente porque nossa banda de interesse tinha 60kDa, tamanho próximo àquele da cadeia pesada das imunoglobulinas (50kDa). Para sanar este problema, o DCN35 deveria ser purificado e utilizado em experimentos de imunoprecipitação com o anticorpo imobilizado em colunas. Desta forma, a proteína reconhecida pelo DCN35 estaria livre de imunoglobulinas no gel. A eletroforese em gel bidimensional também poderia ser utilizada para obter uma melhor separação das possíveis proteínas presentes no gel. No entanto, detectamos que o tetrâmero se ligava a células transfectadas com DC-SIGN e que a adição de manana era capaz de bloquear esta interação (Figura 4.21). Manana também inibiu a ligação das DC com o tetrâmero (Figura 4.21). Estes resultados sugeriam que a interação do tetrâmero com as células ocorria em decorrência do excesso de manose provavelmente presente no tetrâmero produzido em células CHO.

Uma alternativa seria “subclonar”, remover o fragmento LILRA2-Fc- $\alpha$ TP, colocá-lo em outro vetor e transfectá-lo em uma linhagem celular de origem humana. Este processo não foi bem sucedido (não mostrado) já que as células HEK 293, amplamente utilizadas em experimentos de transfecção, não secretaram a proteína recombinante.

Com estes resultados algumas hipóteses a respeito do ligante do LILRA2 foram formuladas:

1. A afinidade do tetrâmero não é suficiente para detectar a presença do ligante da LILRA2 ou o excesso de manose inibe a interação com o verdadeiro ligante.
2. As células que expressam o ligante não foram testadas. Embora tenham sido testadas células de origens diferentes (tabela 4.1) esta hipótese não pode ser descartada.
3. O ligante é expresso sob condições não testadas. Células primárias (Figura 4.17) e linhagens celulares (não mostrado) foram estimuladas com citocinas e mitógenos mas nenhuma interação foi detectada.
4. O ligante é solúvel. Utilizando o tetrâmero não é possível detectar interação com moléculas solúveis. Para detectar esta interação, a molécula a ser testada poderia ser imobilizada em placas e a ativação da linhagem LILRA2 reporter avaliada por citometria de fluxo.
5. O ligante não é endógeno. Foram realizados experimentos utilizando fibroblastos infectados com citomegalovírus, pois este vírus induz a expressão de moléculas “MHC-like” na célula hospedeira. Aqui também não detectamos interação das células com o tetrâmero (não mostrado).

Tendo como base os resíduos de aminoácidos presentes nos domínios “Ig-like” D1 e D2, onde está localizado o sítio de ligação ao MHC dos receptores LILRB1 e B2, os receptores foram divididos em 2 grupos (Willcox e cols, 2003). Um destes grupos seria aquele capaz de reconhecer HLA. Esta interação já foi confirmada para os receptores LILRB1, B2 e A1. No entanto, nenhuma interação foi observada entre o MHC e LILRA2 ou A3 que também estão localizados neste grupo. Curiosamente, LILRA2 contém apenas duas substituições não conservativas em relação ao sítio de ligação descrito em LILRB1. Logo, existe a possibilidade de nenhum dos reagentes testados até o momento ter tido afinidade suficiente para detectar a interação LILRA2-MHC ou LILRA2 se ligar a alguma outra molécula que tenha uma conformação quaternária semelhante à do MHC I. Já no segundo grupo, que inclui LILRB3, B4, B5, A4, A5 e A6, este sítio é bem diferente, sugerindo que estes receptores não devem reconhecer moléculas do MHC. Sendo assim, uma nova estratégia será necessária para encontrar o ligante destes receptores.



## LILRA2 na Imunologia

Os receptores LILR foram inicialmente identificados utilizando iniciadores desenhados para amplificar moléculas da família das imunoglobulinas e também na procura por receptores para a molécula viral UL18, uma proteína do citomegalovírus semelhante ao MHC classe I. Logo foi descrito que alguns destes receptores reconheciam moléculas do HLA, especialmente LILRB1 e B2. A presença de receptores LILR inibidores nas células mielóides começou a ser descrita como um mecanismo vantajoso pelo qual monócitos, macrófagos e DC podem regular a resposta inflamatória a antígenos próprios. O reconhecimento de moléculas do MHC por estes receptores em células mielóides representa assim uma expansão do conceito do reconhecimento do próprio além daquele já caracterizado em células T e NK.

A função e o ligante dos demais receptores não são conhecidos. Diversos autores (Colonna e cols, 2000; Brown e cols, 2004) começaram a atribuir funções imunomodulatórias a estes receptores, já que estes parecem influenciar a sinalização induzida por outros receptores, como os TLR. Estas observações foram feitas tanto estudando membros ativadores como inibidores da família. LILRB1 modula negativamente a sinalização iniciada pelo TCR (Dietrich e cols, 2001), enquanto LILRA4 inibe a produção de IFN $\alpha$  por células dendríticas plasmacitóides (Cao e cols, 2006), entre outros.

Este efeito imunomodulador também vem sendo observado quando LILRA2 é ativado. Huynh e cols (2007) detectaram que macrófagos ativados via LILRA2 em experimentos de “cross-linking” secretam TNF e esta é inibida na presença de dexametasona. De forma semelhante, Bleharski e cols (2003) observaram que o “cross-linking” deste receptor em monócitos ativados com IFN $\gamma$  reduz a secreção de IL-12 e aumenta a de IL-10 em resposta ao LPS. A ativação de LILRA2 ainda reduziu a atividade microbicida dos macrófagos. Como descrito na figura 4.7 foi detectado que além de induzir a produção de TNF por monócitos, o “cross-linking” de LILRA2 induz também a secreção de IL-1 $\beta$  por estas células. A produção de IL-8, IL-12, IL-10 e IL-6 no entanto não foi afetada após a estimulação (não mostrado). Nos experimentos realizados por Bleharski e cols

(2003), diferente dos realizados em nosso laboratório, os monócitos foram previamente ativados com  $IFN\gamma$ . Estes autores foram capazes de detectar maior produção de IL-10 pelos macrófagos ativados via  $IFN\gamma$  e LILRA2. No futuro será importante investigar se o estágio de ativação celular é importante para determinar as citocinas secretadas em resposta a ativação via LILRA2. Os nossos resultados confirmam dados anteriores da literatura já que a ativação de LILRA2 induziu a secreção de TNF por monócitos e ainda adicionam que o efeito ativador da LILRA2 não é observado em outras citocinas inflamatórias produzidas por estas células.

Além de investigar o efeito da ativação de LILRA2 em monócitos, em nosso laboratório foram feitos experimentos utilizando DC. A secreção de citocinas e a expressão de moléculas co-estimulatórias foi avaliada após a estimulação via LILRA2. Como descrito na figura 4.4 as DC após o “cross-linking” expressavam marcadores de ativação celular (CD80, CD86, CD83 e CD40) além de aumentada expressão de HLA I e II. Esta é a primeira vez onde o efeito ativador de um receptor LILR é observado em moléculas co-estimulatórias. O aumento na expressão de moléculas co-estimulatórias é importante para garantir a capacidade estimulatória das DC. No entanto, as células estimuladas somente por LILRA2, embora apresentem marcadores de ativação, não parecem ser potentes produtoras de citocinas. Nestas culturas foi encontrada a presença de TNF, mas estes níveis não foram significativos quando comparados ao isotipo controle. Como descrito posteriormente neste texto, as DC com este perfil parecem estar envolvidas na indução de tolerância.

As DC ativadas via LILRA2 induziram a proliferação dos linfócitos T virgem (Figura 4.9). Ainda não foi possível determinar se estas DC ativadas via LILRA2 direcionam a diferenciação dos linfócitos para o perfil Th1 ou Th2. A presença de IL-12, citocina que direciona para perfil Th1, não foi encontradas nas culturas. Ainda procuramos identificar a presença de OX40L e ICOSL (não mostrado), que favorecem o perfil Th2, mas nenhuma diferença foi encontrada. Outros experimentos precisam ser realizados. A identificação de citocinas intracelulares presentes nos linfócitos T pode mostrar se estas células têm perfil Th1, Th2 ou

mesmo Th0. A análise de outras moléculas co-estimulatória como, B7-H3, B7-H4 ou mesmo LILRB3 e LILRB4 presentes na superfície das DC ativadas via LILRA2 pode auxiliar no direcionamento da resposta imune. A presença de células T regulatórias também deve ser investigada, já que a IL-10 é detectada nas culturas (Figuras 4.5 e 4.6).

Os resultados descritos neste trabalho são a primeira demonstração de que LILRA2 pode influenciar a produção de citocinas iniciadas por 2 vias diferentes de ativação das DC. Forte efeito sinérgico na produção de TNF e IL-10 foi observado quando as DC eram estimuladas simultaneamente via LILRA2 e TLR4 ou CD40 (Figuras 4.5 e 4.6). Estes resultados indicam que LILRA2 pode estar envolvido na regulação da resposta imune, aumentando a secreção de citocinas e a expressão de moléculas co-estimulatórias nas células mielóides ativadas.

Embora com estes experimentos funcionais já tenha sido possível observar que LILRA2 pode sim atuar como um receptor ativador e/ou imunomodulador, muitos outros ainda precisam ser feitos para esclarecer a função dele na resposta imune e em processos patológicos. No entanto, para estudar a total contribuição de LILRA2 na produção de citocinas e ativação das células mielóides é essencial identificar o ligante deste receptor. Será importante validar os resultados observados até agora nos experimentos *in vitro*. Ao identificar o ligante para este receptor será também possível identificar as circunstâncias onde ele pode ser ativado *in vivo*.

É importante ressaltar que os experimentos de “cross-linking” requerem muitos controles quando realizados em células que expressem FcR, como é o caso das DC e dos monócitos utilizados neste estudo. Neste sentido, foram realizados experimentos onde o sobrenadante dos hibridomas era fervido antes de ser usado nos experimentos de “cross-linking” e também foram utilizados F(ab')<sub>2</sub>. Nos dois casos os resultados foram muito satisfatórios. Quando o sobrenadante foi fervido, nenhum efeito sinérgico de LILRA2 foi observado na produção de citocinas ou na indução de moléculas co-estimulatórias (não mostrado). Já com o uso de Fab<sub>2</sub>, foi observado que semelhante aos resultados obtidos utilizando o

anticorpo íntegro, ocorria um aumento na expressão dos marcadores de ativação e sinergismo na produção de citocinas. No entanto, a produção de citocinas foi menor que nas cultura onde o anticorpo íntegro foi utilizado, mas esta diferença era esperada visto que o último sistema é mais eficiente por utilizar um anticorpo secundário.

Foi descrito recentemente que receptores com domínio ITAM também podem transduzir sinais inibidores. Uma hipótese para tentar explicar esta possível dualidade foi sugerida por Hamerman e Lanier (2006). Estes sugeriram que ligantes com alta afinidade podem ser os responsáveis pela atividade estimulatória dos receptores que sinalizam através de ITAM e os com baixa afinidade levariam a atividade inibitória. Nos experimentos de “cross-linking” não é provável conseguir fazer esta distinção já que a ativação do receptor é feita através de anticorpos, que normalmente apresentam alta afinidade pelo receptor. No entanto, o verdadeiro ligante pode ter afinidade mais baixa e com isso induzir uma resposta diferente da observada nos experimentos descritos acima. Com a descoberta do ligante será possível detectar se LILRA2 também é capaz de induzir sinais inibidores ou somente estimulatórios.

### **LILRA2 na Imunologia da Hanseníase**

A hanseníase apresenta um padrão imunológico único baseado numa complexa interação entre as células do hospedeiro, micobactérias e fatores solúveis produzidos durante a infecção. Vem sendo proposto que a exposição contínua dos indivíduos ao *M. leprae* leva à infecção, mas somente alguns indivíduos desenvolvem a hanseníase. Os pacientes que apresentam uma forte resposta imune com perfil Th1 no início da infecção, controlam a replicação da micobactéria e desenvolvem o perfil tuberculóide. Alguns outros pacientes, devido à fraca ou lenta resposta imune ao *M. leprae*, em um longo processo, evoluem para um quadro de alta carga bacilar, inativação dos macrófagos que amplifica a não resposta. Do momento da infecção até o diagnóstico, o nível da resposta imune pode definir ainda as formas borderlines. Nos indivíduos borderline ou mesmo nos pacientes lepromatosos, uma reativação da resposta imune com perfil Th1 pode acontecer nos chamados episódios reacionais. O

controle da produção de citocinas parece ser essencial na determinação da doença, da forma clínica e dos episódios reacionais.

A expressão gênica de LILRA2 foi detectada em lesões de pacientes lepromatosos através de microarranjos de DNA (Bleharski e cols, 2003). Em nossos experimentos, utilizando microscopia confocal, foi possível detectar a presença de células LILRA2+ nas lesões dos pacientes lepromatosos (Figura 4.11). A expressão de LILRA2 foi observada no infiltrado inflamatório, e teve distribuição semelhante à do CD68, marcador de macrófagos.

Sabendo que LILRA2 pode influenciar a produção de citocinas por DC e macrófagos ativados, procuramos avaliar se o LILRA2 poderia influenciar a resposta imune ao *M. leprae*. Inicialmente, em nossos experimentos, foi observado que o *M. leprae* é menos eficiente do que o *M. tuberculosis* (Figuras 4.12 e 4.13) ou o *M. bovis* BCG (não mostrado) na indução de citocinas pelas DC. O mesmo acontece com relação à expressão de moléculas co-estimulatórias (não mostrado). Nas culturas estimuladas com *M. leprae* IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10 e TNF foram detectadas, no entanto o *M. tuberculosis* foi um indutor mais potente destas citocinas (Figura 4.12, 4.13 e não mostrado). Mesmo as DC estimuladas com altas doses de *M. leprae* não secretaram IL-12, diferente do observado nas culturas estimuladas com *M. tuberculosis* (não mostrado). Todos estes resultados indicam que o *M. leprae* não é um potente indutor da maturação das DC e isto pode contribuir para o desenvolvimento da fraca resposta imune específica ao *M. leprae* observada nos pacientes lepromatosos. Nossos resultados são semelhantes a alguns já descritos na literatura. Hashimoto e cols (2002) descreveram que o *M. leprae* aumenta a expressão de CD86 e CD83, somente quando adicionado em grandes quantidades. As DC estimuladas com *M. leprae* não foram eficientes na indução da resposta imune por células T, tanto na proliferação como na produção de IFN $\gamma$  por estas células. Murray e cols (2007) observaram que as DC estimuladas com *M. leprae* MOI 1:1 também não secretam TNF ou IL-10.

Ainda foi avaliado se a estimulação via LILRA2 juntamente com o *M. leprae* iria alterar a produção de citocinas e a expressão das moléculas co-estimulatórias. Nenhum efeito sinérgico entre LILRA2 e o *M. leprae* foi observado. Mesmo sendo estimuladas simultaneamente via LILRA2 e com o *M. leprae* as DC não secretam IL-12 (não mostrado) ou maiores níveis de TNF (Figura 4.15). Resultado diferente foi observado nas culturas estimuladas com *M. tuberculosis*, já que as culturas co-estimuladas tiveram maior produção de TNF. O efeito sinérgico não foi observado na secreção de IL-12. A ativação de LILRA2 *per se* parece favorecer o aumento da produção de IL-10 e TNF em DC ativadas por diferentes vias, mas a interação das DC ativadas via LILRA2 com o *M. leprae* não parece influenciar a produção de citocinas. Talvez este resultado se deva ao fato do *M. leprae* não ser um potente ativador de DC e como consequência não ocorre o efeito sinérgico.

Componentes das micobactérias parecem ter também a habilidade de inibir a ativação das DC. Nigou e cols (2001) descreveram que ManLAM inibe a produção de IL-12 em resposta ao LPS *in vitro*, de forma dose-dependente. Recentemente, Dulphy e cols (2007) descreveram que as DC estimuladas com ManLAM não se tornam totalmente ativadas. Quando comparadas às células estimuladas com LPS, as DC estimuladas com ManLAM têm menor expressão de MHC I e II, CD83, CD86 e CCR7, a secreção de IL-12 não foi observada.

No entanto, alguns autores já identificaram a ativação das DC em resposta a proteínas do *M. leprae*. DC estimuladas com a proteína da membrana do *M. leprae* MMP11, que sinaliza através de TLR2, produzem IL-12 (Maeda e cols, 2005) e estimulam a proliferação de linfócitos T virgem e de memória (Makino e cols, 2006). As DC tratadas com IFN $\gamma$  se tornaram ativadas, produziram IL-12 e induziram a proliferação de linfócitos após infecção com *M. leprae* (Kimura e cols, 2006).

*Que função estas DC estimuladas com M. leprae podem ter?*

A participação das DC no direcionamento da resposta imune vem sendo amplamente investigada. Foi inicialmente proposto como as DC imaturas induziam anergia dos linfócitos T ou a ativação dos linfócitos T regulatórios, enquanto que as DC maduras seriam as responsáveis pela indução da resposta imune efetora (Shortman e Liu, 2002). No entanto, vem se tornando evidente que a ativação das DC não é um processo linear e que a natureza, a intensidade e/ou a duração do sinal estimulador são importantes para determinar a função efetora destas células. Na ausência de estímulo externo, as DC são encontradas em estado de “repouso”, elas têm ampla capacidade de endocitose, baixa expressão de MHC e moléculas co-estimulatórias. A apresentação de antígeno nessas condições pode levar à anergia dos linfócitos T. Este processo deve contribuir para a homeostasia, já que as DC que apresentam antígenos próprios sem estarem totalmente maduras auxiliam na indução da tolerância periférica. Em resposta a inflamação ou infecções, as DC sofrem diversas mudanças fenotípicas e funcionais e passam a promover a expansão de linfócitos. Vem sendo descrito que em determinadas condições as DC se tornam apenas “parcialmente ativadas” ou “semi-maduras”, estas são células com alta expressão de moléculas co-estimulatórias e do MHC, mas que não produzem citocinas importantes para direcionar a resposta imune (Lutz e Schuler, 2002). Os mecanismos que levam à total maturação ou à semi maturação não estão bem esclarecidos. O reconhecimento de microorganismos através dos receptores de reconhecimento de padrões (PRR), como os TLR, estão entre os mais potentes sinais que levam à completa ativação das DC. Utilizando um elegante sistema de quimeras, Sporri e cols (2005) demonstraram que as DC ativadas apenas indiretamente pelos mediadores químicos secretados pelas DC diretamente ativadas via TLR apesar de terem alta expressão de MHC, CD40 e CD86, estas células não eram capazes de secretar IL-12 e de induzir a diferenciação de linfócitos com perfil Th1. As DC diretamente ativadas através do contato com microorganismos se tornaram maduras e induziram a proliferação e diferenciação dos linfócitos Th1. Estes resultados indicam que inflamação não substitui o contato com componentes de microorganismos na ativação das células T e sugere que a função do reconhecimento de padrões associados a patógenos (PAMP) é associar a qualidade da resposta imune adaptativa à

natureza do patógeno. Da mesma forma, Christensen e cols (2002) descrevem que microorganismos da flora intestinal induzem a regulação positiva de MHC I e CD86, mas não induzem a secreção de IL-12. Lutz e Schuler (2002) propuseram que a migração de DC imaturas e “semi-maduras” para os linfonodos seja importante para manter a homeostasia, induzindo tolerância a antígenos próprios e ativando linfócitos T CD4 regulatórios. A maturação parcial das DC por citocinas, especialmente o TNF, também estaria envolvida na indução de tolerância, já que a inflamação sem a infecção não seria necessariamente perigosa para o sistema imune.

No sítio de entrada no organismo, mucosa nasal ou pele, as DC entram em contato com o *M. leprae*. Já está demonstrado que as DC são capazes de internalizar o *M. leprae* e apresentar antígenos (Hashimoto e cols, 2002). No entanto, vem ficando evidente que em determinadas circunstâncias este patógeno não favorece a diferenciação total destas células. Uma hipótese que pode então ser formulada é a de que as DC após contato com o *M. leprae* podem se tornar maduras ou “semi-maduras”, dependendo das condições de estimulação. Alguns dados da literatura sugerem que os receptores TLR e DC-SIGN podem ser decisivos durante o processo de infecção com micobactérias.

Já foi identificado que heterodímeros TLR2/TLR1 reconhecem lipoproteínas do *M. leprae* e um maior número de células TLR2+ foi observada nas lesões dos pacientes tuberculóides (Krutzik e cols, 2003). Uma variação (polimorfismo) que impede a ativação do TLR2 foi encontrada em pacientes lepromatosos, mas não nos tuberculóides (Bochud e cols, 2003). Os pacientes que apresentaram a mutação mostraram menor produção de TNF, IL-2, IL-12 e IFN $\gamma$  e alta produção de IL-10 quando comparados a pacientes sem a variação gênica (Kang e cols, 2004). A ativação de TLR2/TLR1 parece ser essencial para a ativação das DC e macrófagos em resposta à micobactéria.

Também vem sendo descrito que o DC-SIGN atua como receptor para micobactérias, incluindo o *M. leprae* (ver apêndice). No entanto, a ativação deste receptor contribui para suprimir a ativação das DC infectadas. Geijtenbeek e cols (2003) mostraram que a ativação do DC-SIGN induz a produção de IL-10 e inibe a ativação das DC iniciada através do TLR4. A sinalização iniciada por DC-SIGN

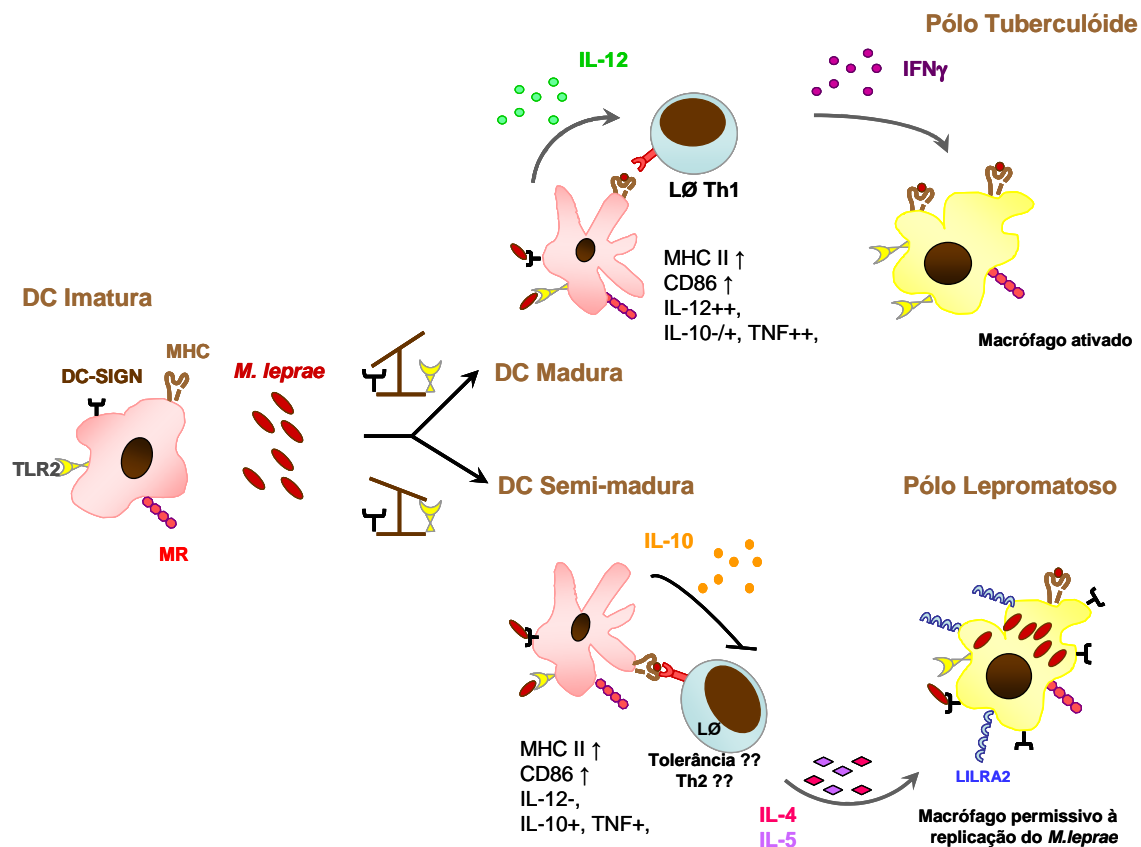


é capaz de modular a ativação induzida por TLR (Caparrós e cols, 2006; Gringhuis e cols, 2007). Desta forma um equilíbrio na sinalização iniciada por TLR e DC-SIGN deve ser essencial para o controle da infecção por micobactérias. Pode ser proposto então que nos pacientes tuberculóides, o *M. leprae* é reconhecido através do TLR presente nas DC, estas se tornam maduras e capazes de primar linfócitos T. Ocorre a secreção de citocinas como a IL-12, IL-23 e a expressão de moléculas co-estimulatórias. Os linfócitos ativados migram para o sítio da lesão onde secretam IFN $\gamma$ , possibilitando a ativação dos macrófagos e a morte do *M. leprae*. Neste grupo de indivíduos, a sinalização via DC-SIGN pode atuar como um mecanismo contra-regulatório, limitando a patologia decorrente do processo inflamatório (Figura 5.1).

Nos pacientes lepromatosos, devido à sinalização desbalanceada entre TLR e DC-SIGN, observa-se que o *M. leprae* favorece a diferenciação de DC “semi-maduras”. Embora apresentem moléculas co-estimulatórias, estas células não secretam IL-12. Estas DC podem contribuir para a indução de tolerância dos linfócitos T que reconhecem antígenos do *M. leprae*. Também é possível que estimulem a ativação das células T supressoras. Na ausência de linfócitos T produtores de IFN $\gamma$  a atividade microbicida dos macrófagos fica comprometida e a multiplicação do *M. leprae* é alcançada. Estas células altamente infectadas expressam DC-SIGN e LILRA2 que favorecem a amplificação da resposta imune com perfil Th2, com alta produção de IL-10 (Figura 5.1).

O mecanismo que regula a expressão de LILRA2 nas lesões não é conhecido. E na hanseníase o que determina a expressão deste receptor em lesões lepromatosas e não nas tuberculóides também precisa ser elucidado. Experimentos realizados em nosso laboratório (não mostrado) não identificaram qualquer alteração na expressão deste marcador quando monócitos eram tratados com citocinas como TNF, IFN $\gamma$ , IL-10 ou IL-4, mediadores envolvidos no processo patológico da hanseníase. Porém, monócitos estimulados com IL-13 ou IL-4, citocina presente nas lesões lepromatosas, expressam DC-SIGN (Soillex e cols, 2002). Assim, nas lesões com perfil Th2 deve haver aumento na expressão de DC-SIGN e este pode contribuir para a infecção de macrófagos recém

chegados à lesão. Como as células ativadas via DC-SIGN têm sua atividade suprimida e produzem IL-10 forma-se assim um ciclo vicioso com amplificação da não resposta ao *M. leprae*. Mas, não sabemos ainda se LILRA2 e DC-SIGN têm participação na indução direta da tolerância no início da infecção ou se a maior expressão destes ocorre em decorrência do tipo de resposta imune observada neste grupo de pacientes.



**Figura 5.1 – Esquema mostrando envolvimento do TLR, DC-SIGN e LILRA2 na hanseníase.** Indivíduos expostos continuamente ao *M. leprae* se tornam infectados. Em alguns indivíduos a resposta imune elimina o bacilo e a hanseníase não se desenvolve (não ilustrado). Em outros indivíduos, as DC se tornam ativadas após contato com *M. leprae*, há equilibrada transdução de sinal entre os diferentes receptores que reconhecem o *M. leprae*, como DC-SIGN, TLR e MR (receptor de manose). Ocorre a produção de IL-12 e os linfócitos T *M. leprae*-específicos com perfil Th1 migram para as lesões. Lá produzem IFN $\gamma$ , que favorece a ativação dos macrófagos e a morte da micobactéria (Pacientes tuberculóides). Em outro grupo de indivíduos, pacientes lepromatosos, o *M. leprae* favorece a diferenciação de DC semi-maduras, estas não secretam IL-12, mas sim IL-10, em resposta ao *M. leprae*. A apresentação de antígenos nestas condições pode favorecer o desenvolvimento de linfócitos tolerantes. Na ausência de IFN $\gamma$ , os macrófagos se tornam permissivos à replicação do *M. leprae*. A expressão de LILRA2 e DC-SIGN é detectada nas lesões e estes receptores favorecem a amplificação da fraca resposta imune ao *M. leprae*.

Além da possível contribuição para o desenvolvimento de células envolvidas na tolerância nas DC teciduais, foi sugerido que LILRA2 pode inibir a diferenciação destas células. Lee e cols (2007) descreveram que o “cross-linking” de LILRA2 inibe a diferenciação de monócitos em DC induzida por GM-CSF e ainda inibiu a apresentação de antígenos do *M. leprae* via CD1b e MHC II. Estas células ativadas via LILRA2 diminuem a habilidade do sistema imune inato de instruir a resposta imune adaptativa.

Durante os episódios reacionais ocorre regulação positiva da resposta imune de perfil Th1, mesmo nos pacientes lepromatosos que anteriormente não desenvolviam resposta imune específica ao *M. leprae*. O TNF é uma citocina pro-inflamatória que tem papel central neste processo. Esta citocina parece contribuir para a redução da carga bacilar, formação do granuloma e dano neural. A ocorrência do dano neural, além de ser uma emergência clínica, pode provocar lesões irreversíveis e isso mantém a hanseníase estigmatizante e um grande problema de saúde pública. Então entender porque ocorre maior produção de TNF pode facilitar o tratamento e/ou a prevenção dos episódios reacionais. LILRA2 é capaz de aumentar a produção de TNF por DC e macrófagos ativados via TLR e provavelmente pelo contato com linfócitos T via CD40. Investigar se a expressão de LILRA2 é modulada durante o curso crônico da doença, detectar se ele é expresso por células recém chegadas do sangue ou somente por células onde ocorre a contínua exposição antigênica pode ajudar a entender se LILRA2 contribui para a aumentada produção de citocinas durante as reações. A expressão de LILRA2 também já foi detectada nas lesões dos pacientes com artrite reumatóide. Nos pacientes que apresentaram melhora após o tratamento ocorreu redução na expressão de LILRA2 no sítio inflamatório. Com isso, foi sugerido que a modulação da expressão e/ou função de LILRA2 pode regular o estado de ativação das células inflamatórias.

## Considerações Finais

Embora o ligante de LILRA2 não seja conhecido, nossos resultados mostram que este receptor, expresso em lesões lepromatosas, pode contribuir para a produção das citocinas TNF e IL-10. Estas duas citocinas têm efeito importante na imunopatologia da hanseníase. O TNF está envolvido com o dano tecidual observado nos episódios reacionais. A IL-10 tem tanto atividade modulatória sobre a resposta Th1 detectada durante estes episódios como também pode estar diretamente envolvida na indução de tolerância observada nos pacientes lepromatosos. Por serem diferentemente expressos entre os grupos de paciente, estudar a contribuição de LILRA2 e DC-SIGN pode ajudar a entender a resposta inflamatória observada nas lesões de hanseníase e os mecanismos que determinam o balanço da resposta imune, que hora não é eficiente no ataque ao *M. leprae* e hora é exacerbada e causa danos ao hospedeiro.

## 6 – Conclusões

1. LILRA2 é um receptor ativador que tem efeito sinérgico na produção de IL-10 e TNF em DC e monócitos estimulados via TLR4 ou CD40.
2. LILRA2 não tem efeito sinérgico na produção de IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-12 por DC ativadas.
3. DC estimuladas via LILRA2 têm capacidade aloestimulatória.
4. Células LILRA2+ são encontradas em tecidos linfóides.
5. Células LILRA2+ são encontradas em lesões de pacientes lepromatosos mas não na pele saudável.
6. O *M. leprae* induz a secreção de IL-10 e TNF, ainda que de forma menos eficiente que o *M. tuberculosis*, por DC *in vitro*.
7. Nenhum efeito sinérgico foi observado entre o *M. leprae* e LILRA2 na produção de TNF ou IL-10.

## 7 – Referências Bibliográficas

1. Alcaïs A, Alter A, Antoni G, Orlova M, Nguyen VT, Singh M, Vanderborght PR, Katoch K, Mira MT, Vu HT, Ngyuen TH, Nguyen NB, Moraes M, Mehra N, Schurr E, Abel L. Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin-alpha allele as a major risk factor for early-onset leprosy. *Nat Genet.* 2007; 39(4):517-22.
2. Allen RL, Raine T, Haude A, Trowsdale J, Wilson MJ. Leukocyte receptor complex-encoded immunomodulatory receptors show differing specificity for alternative HLA-B27 structures. *J Immunol.* 2001; 167(10):5543-7.
3. Altare F, Durandy A, Lammas D, Emile JF, Lamhamedi S, Le Deist F, Drysdale P, Jouanguy E, Döffinger R, Bernaudin F, Jeppsson O, Gollob JA, Meinel E, Segal AW, Fischer A, Kumararatne D, Casanova JL. Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science.* 1998; 280(5368):1432-5.
4. Apps R, Gardner L, Sharkey AM, Holmes N, Moffett A. A homodimeric complex of HLA-G on normal trophoblast cells modulates antigen-presenting cells via LILRB1. *Eur J Immunol.* 2007; 37(7):1924-37.
5. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18:767-811.
6. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998; 392(6673):245-52.
7. Banham AH, Colonna M, Cella M, Micklem KJ, Pulford K, Willis AC, Mason DY. Identification of the CD85 antigen as ILT2, an inhibitory MHC class I receptor of the immunoglobulin superfamily. *J Leukoc Biol.* 1999; 65(6):841-5.
8. Beinhauer BG, McBride JM, Graf P, Pursch E, Bongers M, Rogy M, Korthauer U, de Vries JE, Aversa G, Jung T. Interleukin 10 regulates cell surface and soluble LIR-2 (CD85d) expression on dendritic cells resulting in T cell hyporesponsiveness in vitro. *Eur J Immunol.* 2004; 34(1):74-80.
9. Belkin D, Torkar M, Chang C, Barten R, Tolaini M, Haude A, Allen R, Wilson MJ, Kioussis D, Trowsdale J. Killer cell Ig-like receptor and leukocyte Ig-like receptor transgenic mice exhibit tissue- and cell-specific transgene expression. *J Immunol.* 2003; 171(6):3056-63.
10. Bleharski JR, Li H, Meinken C, Graeber TG, Ochoa MT, Yamamura M, Burdick A, Sarno EN, Wagner M, Röllinghoff M, Rea TH, Colonna M, Stenger S, Bloom BR, Eisenberg D, Modlin RL. Use of genetic profiling in

- leprosy to discriminate clinical forms of the disease. *Science* 2003; 301(5639):1527-30.
11. Bochud PY, Hawn TR, Aderem A. Cutting edge: a Toll-like receptor 2 polymorphism that is associated with lepromatous leprosy is unable to mediate mycobacterial signaling. *J Immunol.* 2003; 170(7):3451-4.
  12. Borges L, Cosman. LILs/ILTs/MIRs, inhibitory and stimulatory Ig-superfamily receptors expressed in myeloid and lymphoid cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000; 11(3):209-17.
  13. Borges L, Hsu ML, Fanger N, Kubin M, Cosman D. A family of human lymphoid and myeloid Ig-like receptors, some of which bind to MHC class I molecules. *J Immunol.* 1997; 159(11):5192-6.
  14. Borges L, Kubin M, Kuhlman T. LIR9, an immunoglobulin-superfamily-activating receptor, is expressed as a transmembrane and as a secreted molecule. *Blood* 2003; 101(4):1484-6.
  15. Brown D, Trowsdale J, Allen R. The LILR family: modulators of innate and adaptive immune pathways in health and disease. *Tissue Antigens.* 2004; 64(3):215-25.
  16. Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall AS, Gordon S. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med.* 2003; 197(9):1119-24.
  17. Cao W, Rosen DB, Ito T, Bover L, Bao M, Watanabe G, Yao Z, Zhang L, Lanier LL, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cell-specific receptor ILT7-Fc epsilonRI gamma inhibits Toll-like receptor-induced interferon production. *J Exp Med.* 2006; 203(6):1399-405.
  18. Caparrós E, Munoz P, Sierra-Filardi E, Serrano-Gómez D, Puig-Kröger A, Rodríguez-Fernández JL, Mellado M, Sancho J, Zubiaur M, Corbí AL. DC-SIGN ligation on dendritic cells results in ERK and PI3K activation and modulates cytokine production. *Blood* 2006; 107(10):3950-8.
  19. Cella M, Döhning C, Samaridis J, Dessing M, Brockhaus M, Lanzavecchia A, Colonna M. A novel inhibitory receptor (ILT3) expressed on monocytes, macrophages, and dendritic cells involved in antigen processing. *J Exp Med.* 1997; 185(10):1743-51.
  20. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med.* 1999; 5(8):919-23.

21. Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS, Yuan J, Colovai AI, Piazza F, Lederman S, Colonna M, Cortesini R, Dalla-Favera R, Suciú-Foca N. Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol.* 2002; 3(3):237-43.
22. Chattree V, Khanna N, Rao DN. Alterations in T cell signal transduction by *M. leprae* antigens is associated with downregulation of second messengers PKC, calcium, calcineurin, MAPK and various transcription factors in leprosy patients. *Mol Immunol.* 2007; 44(8):2066-77.
23. Chen CH, Floyd H, Olson NE, Magaletti D, Li C, Draves K, Clark EA. Dendritic-cell-associated C-type lectin 2 (DCAL-2) alters dendritic-cell maturation and cytokine production. *Blood* 2006; 107(4):1459-67.
24. Christensen HR, Frøkiaer H, Pestka JJ. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol.* 2002; 168(1):171-8.
25. Colonna M, Nakajima H, Cella M. A family of inhibitory and activating Ig-like receptors that modulate function of lymphoid and myeloid cells. *Semin Immunol.* 2000; 12(2):121-7.
26. Colonna M, Nakajima H, Navarro F, López-Botet M. A novel family of Ig-like receptors for HLA class I molecules that modulate function of lymphoid and myeloid cells. *J Leukoc Biol.* 1999; 66(3):375-81.
27. Colonna M, Navarro F, Bellón T, Llano M, García P, Samaridis J, Angman L, Cella M, López-Botet M. A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J Exp Med.* 1997; 186(11):1809-18.
28. Colonna M, Samaridis J, Cella M, Angman L, Allen RL, O'Callaghan CA, Dunbar R, Ogg GS, Cerundolo V, Rolink A. Human myelomonocytic cells express an inhibitory receptor for classical and nonclassical MHC class I molecules. *J Immunol.* 1998; 160(7):3096-100.
29. Cosman D, Fanger N, Borges L, Kubin M, Chin W, Peterson L, Hsu ML. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity* 1997; 7(2):273-82.
30. Coutanceau E, Decalf J, Martino A, Babon A, Winter N, Cole ST, Albert ML, Demangel C. Selective suppression of dendritic cell functions by *Mycobacterium ulcerans* toxin mycolactone. *J Exp Med.* 2007 11; 204(6):1395-403.
31. de Jong R, Altare F, Haagen IA, Elferink DG, Boer T, van Breda Vriesman PJ, Kabel PJ, Draaisma JM, van Dissel JT, Kroon FP, Casanova JL,



- Ottenhoff TH. Severe mycobacterial and Salmonella infections in interleukin-12 receptor-deficient patients. *Science* 1998 29; 280(5368):1435-8.
32. Dietrich J, Cella M, Colonna M. Ig-like transcript 2 (ILT2)/leukocyte Ig-like receptor 1 (LIR1) inhibits TCR signaling and actin cytoskeleton reorganization. *J Immunol.* 2001; 166(4):2514-21.
  33. Dulphy N, Herrmann JL, Nigou J, Réa D, Boissel N, Puzo G, Charron D, Lagrange PH, Toubert A. Intermediate maturation of Mycobacterium tuberculosis LAM-activated human dendritic cells. *Cell Microbiol.* 2007; 9(6):1412-25.
  34. Fanger NA, Cosman D, Peterson L, Braddy SC, Maliszewski CR, Borges L. The MHC class I binding proteins LIR-1 and LIR-2 inhibit Fc receptor-mediated signaling in monocytes. *Eur J Immunol.* 1998; 28(11):3423-34.
  35. Fodor S, Jakus Z, Mocsai A. ITAM-based signaling beyond the adaptive immune response. *Immunol Lett.* 2006; 104(1-2):29-37.
  36. Geijtenbeek TB, Van Vliet SJ, Koppel EA, Sanchez-Hernandez M, Vandembroucke-Grauls CM, Appelmelk B, Van Kooyk Y. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med.* 2003 6; 197(1):7-17.
  37. Godal T, Lofgren M, Negassi K, 1972. Immune response to M. leprae of health leprosy contacts. *Int. J. Lep.* 40:243-250.
  38. Gorodezky C, Alaez C, Munguía A, Cruz R, Vazquez A, Camacho A, Flores O, Rodriguez M, Rodriguez O. Molecular mechanisms of MHC linked susceptibility in leprosy: towards the development of synthetic vaccines. *Tuberculosis* 2004; 84(1-2):82-92.
  39. Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, van Het Hof B, van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB. *Immunity* 2007; 26(5):605-16.
  40. Hamerman JA, Lanier LL. Inhibition of immune responses by ITAM-bearing receptors. *Sci STKE.* 2006 Jan 31;2006(320):re1.
  41. Hamerman JA, Tchao NK, Lowell CA, Lanier LL. Enhanced Toll-like receptor responses in the absence of signaling adaptor DAP12. *Nat Immunol.* 2005; 6(6):579-86.
  42. Hashimoto K, Maeda Y, Kimura H, Suzuki K, Masuda A, Matsuoka M, Makino M. Mycobacterium leprae infection in monocyte-derived dendritic

- cells and its influence on antigen-presenting function. *Infect Immun.* 2002; 70(9):5167-76.
43. Hayami K, Fukuta D, Nishikawa Y, Yamashita Y, Inui M, Ohyama Y, Hikida M, Ohmori H, Takai T. Molecular cloning of a novel murine cell-surface glycoprotein homologous to killer cell inhibitory receptors. *J Biol Chem.* 1997 Mar 14;272(11):7320-7.
  44. Hirayasu K, Ohashi J, Kashiwase K, Takanashi M, Satake M, Tokunaga K, Yabe T. Long-term persistence of both functional and non-functional alleles at the leukocyte immunoglobulin-like receptor A3 (LILRA3) locus suggests balancing selection. *Hum Genet.* 2006; 119(4):436-43.
  45. Humphrey MB, Lanier LL, Nakamura MC. Role of ITAM-containing adapter proteins and their receptors in the immune system and bone. *Immunol Rev.* 2005; 208:50-65.
  46. Huynh OA, Hampartzoumian T, Arm JP, Hunt J, Borges L, Ahern M, Smith M, Geczy CL, McNeil HP, Tedla N. Down-regulation of leucocyte immunoglobulin-like receptor expression in the synovium of rheumatoid arthritis patients after treatment with disease-modifying anti-rheumatic drugs. *Rheumatology* 2007; 46(5):742-51.
  47. Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20:197-216.
  48. Ju XS, Hacker C, Scherer B, Redecke V, Berger T, Schuler G, Wagner H, Lipford GB, Zenke M. Immunoglobulin-like transcripts ILT2, ILT3 and ILT7 are expressed by human dendritic cells and down-regulated following activation. *Gene.* 2004; 331:159-64.
  49. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med.* 2001; 194(6):863-9.
  50. Kanazawa N. Dendritic cell immunoreceptors: C-type lectin receptors for pattern-recognition and signaling on antigen-presenting cells. *J Dermatol Sci.* 2007; 45(2):77-86.
  51. Kang TJ, Yeum CE, Kim BC, You EY, Chae GT. Differential production of interleukin-10 and interleukin-12 in mononuclear cells from leprosy patients with a Toll-like receptor 2 mutation. *Immunology* 2004; 112(4):674-80.

52. Kaplan G, Mathur NK, Job CK, Nath I, Cohn ZA, 1989. Effect of multiple interferon  $\gamma$  injections on the disposal of *Mycobacterium leprae*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 86:8073-8078.
53. Kaplan G, Nathan CF, Gandhi R, Horwitz MA, Levis WR, Cohn ZA. Effect of recombinant interferon-gamma on hydrogen peroxide-releasing capacity of monocyte-derived macrophages from patients with lepromatous leprosy. *J Immunol*. 1986 Aug 1;137(3):983-7.
54. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3(12):984-93.
55. Khanolkar-Young S, Rayment N, Brickell PM, Katz DR, Vinayakumar S, Colston MJ, Lockwood DNJ, 1995. Tumor necrosis factor-alpha (TNF $\alpha$ ) synthesis is associated with the skin and peripheral nerve pathology of leprosy reversal reaction. *Clin. Exp. Immunol*. 99:196-202.
56. Kim J, Uyemura K, Van Dyke MK, Legaspi AJ, Rea TH, Shuai K, Modlin RL. A role for IL-12 receptor expression and signal transduction in host defense in leprosy. *J Immunol*. 2001; 167(2):779-86.
57. Kimura H, Maeda Y, Takeshita F, Takaoka LE, Matsuoka M, Makino M. Upregulation of T-cell-stimulating activity of mycobacteria-infected macrophages. *Scand J Immunol*. 2004; 60(3):278-86.
58. Kollnberger S, Bird LA, Roddis M, Hacquard-Bouder C, Kubagawa H, Bodmer HC, Breban M, McMichael AJ, Bowness P. HLA-B27 heavy chain homodimers are expressed in HLA-B27 transgenic rodent models of spondyloarthritis and are ligands for paired Ig-like receptors. *J Immunol*. 2004 Aug 1;173(3):1699-710.
59. Krug A, Veeraswamy R, Pekosz A, Kanagawa O, Unanue ER, Colonna M, Cella M. Interferon-producing cells fail to induce proliferation of naive T cells but can promote expansion and T helper 1 differentiation of antigen-experienced unpolarized T cells. *J Exp Med*. 2003; 197(7):899-906.
60. Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, Liu PT, Cole ST, Godowski PJ, Maeda Y, Sarno EN, Norgard MV, Brennan PJ, Akira S, Rea TH, Modlin RL. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med*. 2003; 9(5):525-32.
61. Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE, Graeber TG, Sieling PA, Liu YJ, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat Med*. 2005; 11(6):653-60.

62. Kubagawa H, Burrows PD, Cooper MD. A novel pair of immunoglobulin-like receptors expressed by B cells and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 May 13;94(10):5261-6.
63. Kubagawa H, Cooper MD, Chen CC, Ho LH, Alley TL, Hurez V, Tun T, Uehara T, Shimada T, Burrows PD. Paired immunoglobulin-like receptors of activating and inhibitory types. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1999;244:137-49.
64. Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol*. 2002; 23(9):445-9.
65. Maeda A, Scharenberg AM, Tsukada S, Bolen JB, Kinet JP, Kurosaki T. Paired immunoglobulin-like receptor B (PIR-B) inhibits BCR-induced activation of Syk and Btk by SHP-1. *Oncogene*. 1999 Apr 8;18(14):2291-7.
66. Maeda Y, Mukai T, Spencer J, Makino M. Identification of an Immunomodulating Agent from *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun*. 2005; 73(5):2744-50.
67. Makino M, Maeda Y, Inagaki K. Immunostimulatory activity of recombinant *Mycobacterium bovis* BCG that secretes major membrane protein II of *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun*. 2006; 74(11):6264-71.
68. Makino M, Maeda Y, Ishii N. Immunostimulatory activity of major membrane protein-II from *Mycobacterium leprae*. *Cell Immunol*. 2005; 233(1):53-60.
69. Makino M, Maeda Y, Mukai T, Kaufmann SH. Impaired maturation and function of dendritic cells by mycobacteria through IL-1beta. *Eur J Immunol*. 2006; 36(6):1443-52.
70. Mira MT, Alcaïs A, Nguyen VT, Moraes MO, Di Flumeri C, Vu HT, Mai CP, Nguyen TH, Nguyen NB, Pham XK, Sarno EN, Alter A, Montpetit A, Moraes ME, Moraes JR, Doré C, Gallant CJ, Lepage P, Verner A, Van De Vosse E, Hudson TJ, Abel L, Schurr E. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature*. 2004; 427(6975):636-40.
71. Mira MT, Alcaïs A, Van Thuc N, Thai VH, Huong NT, Ba NN, Verner A, Hudson TJ, Abel L, Schurr E. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. *Nat Genet*. 2003; 33(3):412-5.
72. Misra N, Murtaza A, Walker B, Narayan NPS, Misra RS, Ramesh V, 1995a. Cytokine profile of circulating T cells of leprosy patients reflect both indiscriminate and polarized T-helper subsets: T-helper phenotype is

- stable and uninfluenced by related antigens of *Mycobacterium leprae*. *Immunol* 86:97-103.
73. Misra N, Selvakumar M, Singh S, Bharadwaj M, Ramesh V, Misra RS, Nath I, 1995b. Monocytes 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.* 48:123-128.
  74. Moodie SJ, Norman PJ, King AL, Fraser JS, Curtis D, Ellis HJ, Vaughan RW, Ciclitira PJ. Analysis of candidate genes on chromosome 19 in coeliac disease: an association study of the KIR and LILR gene clusters. *Eur J Immunogenet.* 2002; 29(4):287-91.
  75. Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborght PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. *Lepr Rev.* 2006; 77(3):189-202.
  76. Moraes MO, Sarno EN, Almeida AS, Saraiva BCC, Nery JAC, Martins RCL, Sampaio EP, 1999. Cytokine mRNA Expression In Leprosy: A Possible Role For Interferon  $\gamma$  And IL-12 In Reaction (RR And ENL). *Scand. J. Immunol.* 50:541-549.
  77. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL, 1986. Two Types Of Murine Helper T Cell Clone. *J. Immunol.* 136:1367-2348.
  78. Murray RA, Siddiqui MR, Mendillo M, Krahenbuhl J, Kaplan G. *Mycobacterium leprae* inhibits dendritic cell activation and maturation. *J Immunol.* 2007; 178(1):338-44.
  79. Muta T, Kurosaki T, Misulovin Z, Sanchez M, Nussenzweig MC, Ravetch JV. A 13-amino-acid motif in the cytoplasmic domain of Fc gamma RIIB modulates B-cell receptor signalling. *Nature* 1994; 369(6478):340.
  80. Naafs B, 1994. Leprosy Reaction. *Trop. Geo. Med.* 46:80-84.
  81. Nakajima H, Samaridis J, Angman L, Colonna M. Human myeloid cells express an activating ILT receptor (ILT1) that associates with Fc receptor gamma-chain. *J Immunol.* 1999; 162(1):5-8.
  82. Nakamura A, Kobayashi E, Takai T. Exacerbated graft-versus-host disease in Pirb<sup>-/-</sup> mice. *Nat Immunol.* 2004 Jun;5(6):623-9.
  83. Ng V, Zanazzi G, Timpl R, Talts JF, Salzer JL, Brennan PJ, Rambukkana A. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cell.* 2000; 103(3):511-24.

84. Nigou J, Zelle-Rieser C, Gilleron M, Thurnher M, Puzo G. Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J Immunol.* 2001; 166(12):7477-85.
85. Norman PJ, Carey BS, Stephens HA, Vaughan RW. DNA sequence variation and molecular genotyping of natural killer leukocyte immunoglobulin-like receptor, LILRA3. *Immunogenetics* 2003; 55(3):165-71.
86. Pasquier B, Launay P, Kanamaru Y, Moura IC, Pfirsch S, Ruffié C, Hénin D, Benhamou M, Pretolani M, Blank U, Monteiro RC. Identification of Fc $\alpha$ R1 as an inhibitory receptor that controls inflammation: dual role of FcR $\gamma$  ITAM. *Immunity* 2005; 22(1):31-42.
87. Rambukkana A, Salzer JL, Yurchenco PD, Tuomanen EI. Neural targeting of *Mycobacterium leprae* mediated by the G domain of the laminin- $\alpha$ 2 chain. *Cell* 1997; 88(6):811-21.
88. Rambukkana A, Yamada H, Zanazzi G, Mathus T, Salzer JL, Yurchenco PD, Campbell KP, Fischetti VA. Role of alpha-dystroglycan as a Schwann cell receptor for *Mycobacterium leprae*. *Science* 1998; 282(5396):2076-9.
89. Rambukkana A, Zanazzi G, Tapinos N, Salzer JL. Contact-dependent demyelination by *Mycobacterium leprae* in the absence of immune cells. *Science* 2002; 296(5569):927-31.
90. Ravetch JV, Lanier LL. Immune inhibitory receptors. *Science* 2000; 290(5489):84-9
91. Reth M. Antigen receptor tail clue. *Nature* 1989; 338(6214):383-4.
92. Ridley DS, Jopling WH, 1966. Classification of leprosy according to immunity: A five group system. *Int. J. Lepr.* 34:255-273.
93. Rissoan MC, Duhén T, Bridon JM, Bendriss-Vermare N, Péronne C, de Saint Vis B, Brière F, Bates EE. Subtractive hybridization reveals the expression of immunoglobulin-like transcript 7, Eph-B1, granzyme B, and 3 novel transcripts in human plasmacytoid dendritic cells. *Blood.* 2002; 100(9):3295-303.
94. Samaridis J, Colonna M. Cloning of novel immunoglobulin superfamily receptors expressed on human myeloid and lymphoid cells: structural evidence for new stimulatory and inhibitory pathways. *Eur J Immunol.* 1997; 27(3):660-5.

95. Sampaio EP, Moreira AL, Sarno EN, Malta AM, Kaplan G, 1992. Prolonged treatment with recombinant interferon  $\gamma$  induces erythema nodosum leprosum in lepromatous leprosy patients. *J. Exp. Med.* 175:1729-1737.
96. Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, Cohn ZA, Kaplan G, 1991. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor  $\alpha$  production by stimulated human monocytes. *J. Exp. Med.* 173:699-703.
97. Sarno EN, Grau GE, Vieira LM, Nery JAC, 1991. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1 $\beta$  during leprosy reactional states. *Clin. Exp. Immunol.* 84:103-108.
98. Sarno EN, Sampaio EP, 1996. The role of inflammatory cytokines in tissue injury of leprosy. *Int J. Lepr.* 64, S69-S74.
99. Schlesinger LS, Horwitz MA. Phagocytosis of *Mycobacterium leprae* by human monocyte-derived macrophages is mediated by complement receptors CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18), and CR4 (CD11c/CD18) and IFN-gamma activation inhibits complement receptor function and phagocytosis of this bacterium. *J Immunol.* 1991; 147(6):1983-94.
100. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19(2):338-81.
101. Sharma N, Sharma VK, Gupta A, Kaur S, Ganguly NK, 1998. Alteration in early biochemical events following T cell activation in leprosy patients. *Clin. Immunol. Immunopath.* 88:142-149.
102. Shimoji Y, Ng V, Matsumura K, Fischetti VA, Rambukkana A. A 21-kDa surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(17):9857-62.
103. Shiroishi M, Tsumoto K, Amano K, Shirakihara Y, Colonna M, Braud VM, Allan DS, Makadzange A, Rowland-Jones S, Willcox B, Jones EY, van der Merwe PA, Kumagai I, Maenaka K. Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(15):8856-61.
104. Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2(3):151-61.

105. Sibley LD, Hunter SW, Brennan PJ, Krahenbuhl JL, 1988a. Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma interferon-mediated activation of macrophages. *Infect. Immun.* 56:1232-1236.
106. Sibley LD, Krahenbuhl JL, 1987. Mycobacterium leprae- burdened macrophages are refractory to activation by gamma interferon. *Infect. Immun.* 55:446-450.
107. Sieling PA, Jullien D, Dahlem M, Tedder TF, Rea TH, Modlin RL, Porcelli SA. CD1 expression by dendritic cells in human leprosy lesions: correlation with effective host immunity. *J Immunol.* 1999; 162(3):1851-8.
108. Sieling PA, Modlin RL, 1994. Regulation Of Cytokine Patterns In Leprosy. *Annals New York Academy Of Science* 42-52
109. Silva CL, Faccioli, Foss NT, 1993. Suppression of human monocytes cytokines release by phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae*. *Int. J.Lep.* 61:107-108.
110. Sloane DE, Tedla N, Awoniyi M, Macglashan DW, Borges L, Austen KF, Arm JP. Leukocyte immunoglobulin-like receptors: novel innate receptors for human basophil activation and inhibition. *Blood* 2004; 104(9):2832-9.
111. Soilleux EJ, Morris LS, Leslie G, Chehimi J, Luo Q, Levroney E, Trowsdale J, Montaner LJ, Doms RW, Weissman D, Coleman N, Lee B. Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro. *J Leukoc Biol.* 2002; 71(3):445-57.
112. Soilleux EJ, Sarno EN, Hernandez MO, Moseley E, Horsley J, Lopes UG, Goddard MJ, Vowler SL, Coleman N, Shattock RJ, Sampaio EP. DC-SIGN association with the Th2 environment of lepromatous lesions: cause or effect? *J Pathol.* 2006; 209(2):182-9.
113. Spörri R, Reis e Sousa C. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function. *Nat Immunol.* 2005 Feb;6(2):163-70.
114. Sreenivasan P, Misra RS, Wilfred D, Nath I, 1998. Lepromatous leprosy patients show T helper 1-like cytokines profile with differential expression of interleukin-10 during type 1 and 2 reactions. *Immunol.* 95:529-536.
115. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol.* 1991;9:271-96
116. Takai T, Ono M. Activating and inhibitory nature of the murine paired immunoglobulin-like receptor family. *Immunol Rev.* 2001 Jun;181:215-22.



117. Takai T. A Novel Recognition System for MHC Class I Molecules Constituted by PIR. *Adv Immunol.* 2005;88:161-92.
118. Tapinos N, Ohnishi M, Rambukkana A. ErbB2 receptor tyrosine kinase signaling mediates early demyelination induced by leprosy bacilli. *Nat Med.* 2006; 12(8):961-6.
119. Tedla N, Bandeira-Melo C, Tassinari P, Sloane DE, Samplaski M, Cosman D, Borges L, Weller PF, Arm JP. Activation of human eosinophils through leukocyte immunoglobulin-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(3):1174-9.
120. Tedla N, Gibson K, McNeil HP, Cosman D, Borges L, Arm JP. The co-expression of activating and inhibitory leukocyte immunoglobulin-like receptors in rheumatoid synovium. *Am J Pathol.* 2002; 160(2):425-31.
121. Tenca C, Merlo A, Merck E, Bates EE, Saverino D, Simone R, Zarcone D, Trinchieri G, Grossi CE, Ciccone E. CD85j (leukocyte Ig-like receptor-1/Ig-like transcript 2) inhibits human osteoclast-associated receptor-mediated activation of human dendritic cells. *J Immunol.* 2005; 174(11):6757-63.
122. Ujike A, Takeda K, Nakamura A, Ebihara S, Akiyama K, Takai T. Impaired dendritic cell maturation and increased T(H)2 responses in PIR-B(-/-) mice. *Nat Immunol.* 2002 Jun;3(6):542-8.
123. van Kooyk Y, Appelmelk B, Geijtenbeek TB. A fatal attraction: *Mycobacterium tuberculosis* and HIV-1 target DC-SIGN to escape immune surveillance. *Trends Mol Med.* 2003; 9(4):153-9.
124. Vanderborght PR, Pacheco AG, Moraes ME, Antoni G, Romero M, Verville A, Thai VH, Huong NT, Ba NN, Schurr E, Sarno EN, Moraes MO. HLA-DRB1\*04 and DRB1\*10 are associated with resistance and susceptibility, respectively, in Brazilian and Vietnamese leprosy patients. *Genes Immun.* 2007; 8(4):320-4.
125. Velten FW, Duperrier K, Bohlender J, Metharom P, Goerdts S. A gene signature of inhibitory MHC receptors identifies a BDCA3(+) subset of IL-10-induced dendritic cells with reduced allostimulatory capacity in vitro. *Eur J Immunol.* 2004; 34(10):2800-11.
126. Vély F, Vivier E. Conservation of structural features reveals the existence of a large family of inhibitory cell surface receptors and noninhibitory/activatory counterparts. *J Immunol.* 1997; 159(5):2075-7.
127. Verhagen CE, van der Pouw Kraan TCTM, Buffing AMA, Chand MA, Faber WR, Aarden LA, Das PK, 1998. Type1- and type 2-like lesional skin-derived *Mycobacterium leprae*-responsive T cell clones are

- characterized by coexpression of IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$  and IL-4/IL-5/IL-13, respectively. *J. Immunol.* 160:2380-2387.
128. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, Kastelein R, Kolk A, de Waal-Malefyt R, Ottenhoff TH. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(13):4560-5.
  129. Wagtmann N, Rojo S, Eichler E, Mohrenweiser H, Long EO. A new human gene complex encoding the killer cell inhibitory receptors and related monocyte/macrophage receptors. *Curr Biol.* 1997; 7(8):615-8.
  130. Wemambu SNC, Turk JL, Waters MFR, Rees RJW, 1969. Erythema Nodosum Leprosum: A Clinical Manifestation Of The Arthus Phenomenon. *Lancet* II:933-935.
  131. Wende H, Colonna M, Ziegler A, Volz A. Organization of the leukocyte receptor cluster (LRC) on human chromosome 19q13.4. *Mamm Genome.* 1999; 10(2):154-60.
  132. Wende H, Volz A, Ziegler A. Extensive gene duplications and a large inversion characterize the human leukocyte receptor cluster. *Immunogenetics* 2000; 51(8-9):703-13.
  133. Willcox BE, Thomas LM, Bjorkman PJ. Crystal structure of HLA-A2 bound to LIR-1, a host and viral major histocompatibility complex receptor. *Nat Immunol.* 2003; 4(9):913-9.
  134. Wiśniewski A, Łuszczek W, Mańczak M, Jasek M, Kubicka W, Cislo M, Kuśnierz P. Distribution of LILRA3 (ILT6/LIR4) deletion in psoriatic patients and healthy controls. *Hum Immunol.* 2003; 64(4):458-61.
  135. Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL, 1991. Defining protective response to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 254:277-281.
  136. Yamauchi PS, Bleharski JR, Uyemura K, Kim J, Sieling PA, Miller A, Brightbill H, Schlienger K, Rea TH, Modlin RL. A role for CD40-CD40 ligand interactions in the generation of type 1 cytokine responses in human leprosy. *J Immunol.* 2000; 165(3):1506-12.
  137. Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K, Olson K, Velinzon K, Inaba K, Steinman RM. Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med.* 2003; 198(2):235-47.

138. Zea AH, Ochoa MT, Ghosh P, Longo DL, Gregory-Alvord W, Valderrama L, Falebella R, Harvey LK, Saravia N, Moreno LH, Ochoa AC, 1998. Changes in expression of signal transduction proteins in T lymphocytes of patients with leprosy. *Infect. Immun.* 66:499-504.
  
139. Zimmerli S, Edwards S, Ernst JD. Selective receptor blockade during phagocytosis does not alter the survival and growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1996; 15(6):760-70.

*Apêndice*

### Apêndice

O DC-SIGN é uma lectina expressa em células dendríticas e macrófagos inicialmente descrita como receptor para ICAM 2 e ICAM3. A interação do DC-SIGN com ICAM2 no endotélio pode favorecer o rolamento das DC imaturas através do endotélio, possibilitando a saída das células do sangue para o tecido (Kaufmann e Schaible, 2003).

O DC-SIGN está envolvido na internalização de diversos patógenos. Tailleux e cols (2003) descreveram que DC-SIGN é o principal receptor para *M. tuberculosis* em DC. Células contendo antígenos de micobactéria nos linfonodos dos pacientes com tuberculose eram CD14-/HLA-DR+/DC-SIGN+, sugerindo que a interação DC-SIGN-micobactéria é importante na patogênese da doença. Geijtenbeek e cols, 2003 mostraram que a interação do *M. tuberculosis* e do *M. bovis* BCG com DC-SIGN ocorre através do ManLAM. A ativação deste receptor reduziu a maturação das DC induzida pelos TLR e aumentou a secreção de IL-10.

Vem ficando evidente que os patógenos que interagem com DC-SIGN modulam a resposta imune iniciada pelas DC e parecem usar este receptor para favorecer um estado de imunossupressão. Com a descoberta de que a ativação das lectinas, como DC-SIGN ou DCAL-2, influencia a ativação induzida por TLR ou CD40, fica sugerido que estes atuam como receptores imunomoduladores, sendo importante para limitar a resposta imune celular iniciada por patógenos intracelulares. Por outro lado, os patógenos que conseguem ativar este receptor também podem usa-lo para limitar a resposta imune desenvolvida contra eles. O balanço entre a ativação das DC via TLR e lectinas deve ter papel importante na função das DC e conseqüentemente na resposta imune a patógenos.

Como descrito no artigo em anexo, o *M. leprae* também se liga a DC-SIGN. Semelhante às outras micobactérias, a interação ocorre através do ManLAM. Em nossos experimentos, ficou bem evidente que este receptor é amplamente expresso em lesões de pacientes lepromatosos, mas não nos pacientes do pólo tuberculóide. A expressão do DC-SIGN foi detectada nas células infectadas com o *M. leprae*. Semelhante ao LILRA2, DC-SIGN é um receptor expresso preferencialmente nas lesões dos pacientes lepromatosos. Estudar a função deles pode ajudar a entender a resposta imune observada nos pacientes de hanseníase.