

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Jorgenilce de Souza Sales

**Papel imunossupressor da indoleamina 2, 3 -
dioxigenase na Hanseníase**

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

Orientadora: Dra. Euzenir Nunes Sarno.

RIO DE JANEIRO

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

S163

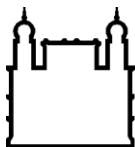
Sales, Jorgenilce de Souza.

Papel imunossupressor da indoleamina 2, 3 : dioxigenase na
Hanseníase / Jorgenilce de Souza Sales. – Rio de Janeiro, 2010.
xii, 128 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em
Biologia Parasitária, 2010.
Bibliografia: f. 78-92

1. IDO. 2. Hanseníase. 3. Mycobacterium leprae. 4. Monócitos. I.
Título.

CDD 616.998



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Jorgenilce de Souza Sales

**Papel imunossupressor da indoleamina 2, 3 -
dioxigenase na Hanseníase**

ORIENTADORA: Dra. Euzenir Nunes Sarno

Aprovada em: 04/08/2010

EXAMINADORES:

Prof. Dra: Claire Fernandes Kubelka

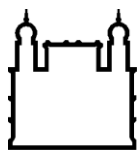
Prof. Dra: Maria Bellio

Prof. Dra: Maria Cristina Vidal Pessolani

Prof. Dra: Alice de Miranda Machado

Prof. Dra: Sandra Maria Barbosa Durães

Rio de Janeiro, 04 de agosto de 2010.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

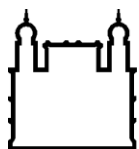
Papel imunossupressor da indoleamina 2, 3 - dioxigenase na Hanseníase

TESE DE DOUTORADO

Jorgenilce de Souza Sales

Resumo

Os mecanismos que levam a ausência de resposta imune celular no pólo lepromatoso da hanseníase frente ao *Mycobacterium leprae* permanecem obscuros. Estudos anteriores mostraram que fatores secretados pelos macrófagos de pacientes lepromatosos inibem a proliferação de linfócitos de indivíduos saudáveis, sugerindo que fatores endógenos produzidos por células da linhagem mielóide podem exercer uma atividade supressora nas células T. Recentemente, diversos estudos têm demonstrado a participação da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) na supressão das células T, indicando que mudanças bioquímicas devido ao catabolismo do triptofano têm efeitos na proliferação dessas células. No presente trabalho nós demonstramos que os pacientes com a forma clínica lepromatosa apresentam uma maior expressão de IDO em biópsias de pele e maior atividade de IDO no soro quando comparados com pacientes com a forma tuberculóide e que o *M. leprae* induz a expressão e a atividade de IDO em monócitos de indivíduos saudáveis e de pacientes lepromatosos. Além disso, observamos que o *M. leprae* induz aumento na atividade de IDO nas células dendríticas derivadas de monócitos de indivíduos saudáveis e que esta atividade aumentada de IDO contribui para o aumento percentual de linfócitos expressando a molécula supressora CTLA-4, sugerindo que IDO participe na anergia T antígeno específico observada em pacientes com a forma lepromatosa da doença.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Papel imunossupressor da indoleamina 2, 3 - dioxigenase na Hanseníase

TESE DE DOUTORADO

Jorgenilce de Souza Sales

Abstract

The absence of cellular immune response to *M. leprae* in lepromatous pole of leprosy remains unclear. Previous studies showed that factors secreted by macrophages of lepromatous patients inhibit the proliferation of lymphocytes from healthy individuals, suggesting that endogenous factors produced by cells of myeloid lineage may have suppressive activity on T cells. Recently, several studies have been demonstrating the involvement of the enzyme indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) in the suppression of T cells, indicating that biochemical changes due to the catabolism of tryptophan affects on the proliferation of these cells. In this study we demonstrated that patients with lepromatous clinical form showed higher IDO expression in skin biopsies and increased IDO activity in serum when compared with patients with the tuberculoid form. In addition, *M. leprae* induces the expression and activity of IDO in monocytes of healthy subjects and lepromatous patients. Moreover, we observed that *M. leprae* induces increased activity of IDO in monocyte-derived dendritic cells of healthy individuals and that this increased IDO activity may contribute to the increase in percentage of T lymphocytes expressing CTLA-4, which suggest that IDO may play a role in T-specific anergy observed in lepromatous leprosy patients.

Agradecimentos

À Dr^a Euzenir Nunes Sarno pela dedicação, incentivo, disponibilidade, orientação e preocupação para que este trabalho terminasse da melhor forma.

À Dr^a Roberta Olmo Pinheiro pela orientação, encorajamento diante das adversidades, pela dedicação e carinho com esse trabalho e comigo. Pela oportunidade de crescer e aprimorar minha visão científica nas agradáveis conversas que tivemos ao longo desses anos.

Ao Dr. Flavio Alves Lara pela orientação, interesse e na colaboração neste trabalho, principalmente na parte dos experimentos com HPLC.

À Dr^a Elizabeth Pereira Sampaio pela oportunidade de realizar este trabalho, incentivo sempre, pelo carinho e pela orientação desde a iniciação científica até o mestrado.

A minha cunhada Márcia Jardim, pela amizade, carinho e por ter me apresentado ao laboratório.

Ao Dr. José Augusto e todos que trabalham no ambulatório Souza Araújo, pela ajuda com os pacientes.

Ao Paulo e a Thaís pela amizade e pelos experimentos.

Aos pacientes do ambulatório Souza Araújo, pela boa vontade. Sem eles este trabalho nunca poderia ter sido realizado.

Aos meus amigos do laboratório de hanseníase pela amizade e por tornar os meus dias mais agradáveis: Ariane, Andressa, Bruno, Danielle, Daniel Serra, Daniel Pedrosa, Eliane, Tatiana, Paula, Rafael, Priscila, Rose, e Verônica.

Aos amigos que não estão mais presentes no laboratório: Maristela, Aninha, Ana Carol, Rosane, Rosaninha, Rogério (*in memoriam*), Leonardo, Paulo Renato Antas, Marilza e Natasha.

A Solange e ao Paulo pela limpeza do material e por sempre me atenderem quando eu precisei de algum material na hora de fazer o experimento.

A Lúcia e a Bené pelo carinho e pelo cafezinho.

A todos os amigos do departamento pelo carinho e amizade.

À Coordenação de Pós-graduação em Biologia Parasitária e aos funcionários do departamento de ensino.

À Cristiane pela boa vontade e ajuda sempre que precisei.

À minha mãe e aos meus irmãos: Marques, Cleo e Claudinha pelo amor, atenção e preocupação comigo o tempo todo. Obrigada por tudo.

Aos meus sobrinhos (amores da minha vida): João Marques, Cauã, Fernanda e Juliana, por tornarem as minhas horas vagas mais alegres.

À minha avó e meu pai (*in memoriam*): Pelo amor, carinho e dedicação.

Aos amigos: Ana Cristina (chaveirinho), Flavia, Rejane e Aline pela amizade. Ao Irapoan pela amizade, carinho e incentivo.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À Deus, pela força e presença constante em mim.

Lista de Abreviaturas

AA- ácido antranílico
APC-célula apresentadora de antígeno
BAAR – bacilo álcool-ácido resistente
BB – borderline borderline
BCG- bacilo Calmette-Guérin
BL – borderline lepromatosa
BT – borderline tuberculóide
cDNA – ácido desoxiribonucleico complementar
COX – ciclooxigenase
DCs- células dendríticas
mDCs- células dendríticas derivadas de monócitos
DC-LAMP- glicoproteína de membrana associada ao lisossoma na célula dendrítica
DTT – ditioneitol
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
ELISA – ensaio imunoenzimático
ENL – eritema nodoso leproso
ERK – sinal extracelular regulado por quinase
FITC – isotiocianato de Fluoresceína
GM-CSF- fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos
HPLC- cromatografia líquida de alta resolução
HIV- vírus imunodeficiência humana
HLA-DR – antígeno leucocitário humano de classe II, alelo DR
IB – índice bacteriológico
ICAM-1 - molécula de adesão intracelular 1
IDO- Indoleamina 2, 3 dioxigenase
KATI ou KATII- quinurenina aminotransferase I ou II
KINU- enzima quinureninase
KYNA- ácido quinurênico
LAM – lipoarabinomanana
LL – pacientes com a forma clínica lepromatosa
LPS – lipopolissacarídeo
MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno

M-CSF- fator estimulador de colônia de macrófago
MCP-1- proteína quimiotática de monócito
MDT – multidrogaterapia
MMP-II- Proteína principal de membrana II
mRNA – ácido ribonucleico mensageiro
NAD- nicotinamida adenina dinucleotídeo
NF- κ B – fator nuclear kappa B
NK- natural killer
NO – óxido nítrico
OMS – Organização Mundial de Saúde
PB – pacientes paucibacilares
PBMC – células mononucleares de sangue periférico
PBS – salina tampão fosfato
PCR – Reação de polimerase em cadeia
PGE₂ – prostaglandina E2
PGL1 – glicolípido fenólico-1
PI – iodeto de propídeo
PI3K – Fosfatidil inositol 3 quinase
PQT – poliquimioterapia
PTK – proteína tirosina quinase
PKC- proteína quinase dependente de cálcio
RF – RNase free
RR – reação reversa
SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida
SFB – soro fetal bovino
TCA- -ácido tricloroacético
TDO- triptofano dioxigenase
TLR – receptores do tipo Toll like
TT – pacientes com a forma clínica tuberculóide
UV – ultravioleta
Xa- xanturênico
x g – velocidade de sedimentação em unidade gravitacional
KMO- quinurenina 3-hidroxilase
1-MT- 1 metil triptofano

3HK- 3-hidroxiquinurenina

3-HAA- ácido 3-hidroxi-antranílico

3-HAO- ácido

3-hidroxi-antranílico

oxidase

Índice

Conteúdo	Pág
Agradecimentos	vi
Lista de abreviaturas	viii
Resumo	iv
Abstract	v
Índice	xi
 Introdução	
1- Hanseníase	1
2- Formas Clínicas	2
3- Episódios Reacionais	4
4- <i>Mycobacterium leprae</i>	5
5- Interação entre <i>M. leprae</i> e a célula hospedeira	8
6- Mecanismo de supressão na hanseníase	13
7- Indoleamina 2, 3 dioxigenase	19
 Justificativa	29
 Objetivos	30
 Metodologia	32
1- Biossegurança e Permissão ética	32
2- Separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)	33
3- Obtenção de monócitos e células dendríticas derivadas de monócitos (mDCs)	33
4- Estimulação das culturas de PBMCs, monócitos e células dendríticas	34
5- Marcação celular para avaliação por citometria de fluxo	35
6- Co-cultura de mDCs e linfócitos e marcação celular avaliada por citometria de fluxo	36
7- Detecção de citocinas no soro e nos sobrenadantes das culturas por multiplex e ensaio imunoenzimático (ELISA)	37
8- Determinação de IDO por HPLC	37
9- RT-PCR em tempo real	38
10- Detecção de IDO por western blotting	40
11- Expressão de IDO e marcadores de superfície celular por Imunohistoquímica e imunofluorescência	42
12- Análise estatística	43
 Resultados	44
1- Análise da expressão de IDO em lesões de pele de pacientes com hanseníase	44
2- Análise da expressão gênica de IDO, IFN- γ , TNF α e IL-10 em biópsias de pele de pacientes com hanseníase	49

3-Análise da atividade de IDO e secreção de IFN- γ e TNF α em soro de indivíduos saudáveis e soro de pacientes com hanseníase	50
4-Estudo do papel do <i>M. leprae</i> na expressão de IDO em PBMCs de indivíduos Saudáveis	52
5-Análise da participação de IFN- γ e ML na expressão de IDO em monócitos	54
6-Avaliação da participação de citocinas na indução de IDO por <i>M. leprae</i>	57
7-Análise de marcadores de superfície celular e atividade de IDO induzidos por <i>M. leprae</i> nas células dendríticas de voluntários saudáveis	59
8-Análise da secreção de citocinas em culturas de mDCs de indivíduos saudáveis estimuladas com <i>M. leprae</i>	61
9-Análise do perfil regulatório das células T em co-cultura com as mDCs de pacientes Lepromatosos	63
Discussão	65
Esquema	75
Conclusão	76
Referências Bibliográficas	77
Anexos	93

Introdução

I- Hanseníase

A hanseníase é uma doença infecciosa sistêmica de curso crônico, que afeta principalmente os nervos periféricos, a pele e a mucosa das vias aéreas superiores. Admite-se que a via de entrada do *Mycobacterium leprae* é o trato respiratório superior, por onde atinge a mucosa e dissemina-se pelo organismo. A hipótese da via de transmissão aérea é confirmada pela grande quantidade de bacilos íntegros isolados de secreções nasais de pacientes. Também é considerada uma doença incapacitante, uma vez que ocorre dano neural causado pela invasão do *M. leprae* e comprometimento do sistema nervoso periférico, irreversível em vários casos (1).

Dados oficiais da Organização Mundial de Saúde mostram que mais de 213.000 pessoas estão infectadas, principalmente na Ásia e na África, com aproximadamente 249.000 novos casos relatados em 2008. Áreas como: Brasil, Angola e Índia apresentam alta endemicidade da doença. O Brasil encontra-se como o primeiro país com maior taxa de incidência da doença (2).

A resposta imune do hospedeiro frente ao bacilo determina a evolução clínica na hanseníase. Acredita-se que mais de 99% da população apresenta resposta imune adequada contra a hanseníase e não desenvolve a doença (3). Entre os sintomáticos, a doença pode se manifestar em diferentes formas clínicas.

I.1- Formas Clínicas

A resposta imune mediada por células T possui um importante papel no controle da infecção por *M. leprae* e isto é caracterizado pelo espectro de formas clínicas observado (1). A resistência à infecção está relacionada à imunidade celular e à interação entre linfócitos T auxiliares, linfócitos T supressores, maturidade dos macrófagos nas lesões, modulação de citocinas e outros fatores elaborados por células presentes nas lesões (4).

De acordo com Ridley e Joplin (1966) (5), a doença é espectral, apresentando dois pólos, podendo ocorrer transição entre as formas clínicas. O pólo lepromatoso (LL) é representado por doença disseminada e o pólo tuberculóide (TT), por lesões limitadas. As formas clínicas intermediárias são chamadas de borderline e classificadas como borderline lepromatoso (BL), borderline borderline (BB) e borderline tuberculóide (BT), de acordo com a maior proximidade a um dos pólos.

Para fins terapêuticos, em 1982, os pacientes foram divididos em dois grupos: multibacilares e paucibacilares. Pacientes BB, BL e LL com índice bacilar ≥ 2 foram classificados como multibacilares e pacientes TT e BT com índice bacilar < 2 foram classificados como paucibacilares (2). Posteriormente, recomendou-se que a classificação se baseasse no número de lesões menor que 5 para os paucibacilares (PB) e maior que 6 para multibacilares (MB). Com relação aos aspectos histopatológicos da hanseníase, foi observado que lesões de pacientes tuberculóides são caracterizadas por infiltrados inflamatórios epitelióides, com predominância de células $CD4^+$, e granulomas no sítio da lesão. Já nos pacientes lepromatosos foi detectada a predominância de células

CD8⁺ e ausência de granuloma (6). O número de bacilos de um paciente lepromatoso recém diagnosticado pode chegar a 10¹⁵ bactérias por grama de tecido.

Os pacientes tuberculóides, na maioria das vezes, apresentam apenas uma lesão, com carga bacilar baixa ou negativa (por isso são chamados de paucibacilares), formação de granuloma e maior número de lesões nervosas associadas. Baixos níveis de anticorpos específicos e presença de resposta imune celular são observados nestes pacientes, que são capazes de restringir o crescimento do patógeno. No outro pólo, estão os pacientes lepromatosos, que possuem doença disseminada, com inúmeras lesões contendo um alto número de bactérias. Estes pacientes, que apresentam altos níveis de anticorpos e ausência de resposta imune celular específica aos antígenos micobacterianos, não respondem ao teste de Mitsuda. Nas formas borderline, a resposta imune celular é mais intensa de acordo com a proximidade ao pólo tuberculóide.

O tratamento quimioterápico é feito através da administração da multidrogaterapia (MDT), que consiste de: Dapsona, rifampicina, clofazimina, ofloxacina e minociclina. Para os pacientes multibacilares, são utilizados rifampicina (600 mg, uma dose por mês), clofazimina (300 mg, uma dose por mês e 50 mg por dia) e dapsona (100 mg por dia). O tratamento de pacientes multibacilares tem duração de um ano. Para pacientes paucibacilares, somente rifampicina (600 mg, uma dose por mês) e dapsona (100 mg diária) são empregados por um período de 6 meses.

I.2- Episódios Reacionais

Os pacientes com hanseníase podem apresentar reações, que são episódios de inflamação aguda associadas a alterações da resposta imune (7). Estes episódios reacionais podem ocorrer durante o curso natural da doença, durante o tratamento e até mesmo após o tratamento, quando os pacientes são considerados curados (8).

Os estados reacionais mais comumente observados são classificados como reação tipo 1 ou reação reversa (RR) e reação tipo 2 ou eritema nodoso lepromatoso (ENL), conforme as características clínicas e imunológicas das reações (9). A reação reversa parece estar associada ao súbito aumento da imunidade celular direcionada a antígenos de *M. leprae*. Clinicamente, a reação reversa se manifesta por um aumento do processo inflamatório nas lesões de pele pré-existentes, bem como pelo aparecimento de novas lesões (10). Esta reação geralmente não está associada a sintomas sistêmicos. Há um aumento do número de receptores de IL-2 nas células imunocompetentes, assim como dos níveis de mRNA de IL-1 β , TNF α , IL-2 e IFN γ . Entretanto, há um decréscimo dos níveis de outras citocinas, como IL-4, IL-5 e IL-10, dando suporte à hipótese de aumento de resposta imune mediada por células (11). Já a reação tipo 2 ou ENL ocorre quase exclusivamente em pacientes lepromatosos (BL e LL). As lesões de pele são geralmente eritematosas e nodulares (12). Ainda observa-se sintomas sistêmicos, tais como febre, mal estar, artralgia e edema, comprometendo inúmeros órgãos (13).

A ocorrência dos episódios reacionais é considerada uma emergência clínica e o tratamento antiinflamatório precisa ser prontamente iniciado.

Pacientes com RR são tratados com esteróides (Prednisona a 1 mg/kg), enquanto pacientes com ENL são tratados preferencialmente com talidomida (300mg/dia) ou pentoxifilina, associada ou não a esteróides (14).

II- O *Mycobacterium leprae*

O *M. leprae* é o agente etiológico da hanseníase. É um bacilo álcool-ácido resistente por corar-se em vermelho pela fucsina e não se descorar pela lavagem com álcool ácido (BAAR) (15). Este microorganismo é um patógeno intracelular obrigatório que infecta preferencialmente macrófagos e que tem uma particular afinidade por células de Schwann no sistema nervoso periférico (16), provocando a destruição dos nervos periféricos, que resulta em incapacidades irreversíveis. O sofrimento decorrente ultrapassa a dor e o mal-estar, estritamente vinculados ao prejuízo físico, com grande impacto social e psicológico, exigindo uma abordagem multidisciplinar ao paciente quanto à necessidade de ações de saúde que visem o controle da doença (17).

O *M. leprae* tem um genoma de aproximadamente 3.2 Mb, que é significativamente menor do que as demais micobactérias, e a ausência de genes fundamentais pode implicar na carência de vias enzimáticas críticas, sendo, desta forma, necessário o parasitismo (18). O envelope do *M. leprae* é constituído por três compartimentos: membrana plasmática, parede celular e a cápsula. A membrana plasmática é uma bicamada assimétrica composta principalmente de fosfolípidos e proteínas. O lipoarabinomannan (LAM), componente do *M. leprae*, encontra-se ancorado à membrana plasmática via fosfatidilinositol.

A parede celular determina a forma e o tamanho da micobactéria e é composta por peptideoglicana. A peptideoglicana confere rigidez ao envelope do microrganismo (18). O *M. leprae* apresenta uma densa cápsula de lipídeos, externa à parede celular, que é rica em PGL-1 (glicolípido fenólico específico de *M. leprae*) (19). Sua estrutura é composta de um trissacarídeo, fenol, fitiocerol e de ácido micoseossídico (Figura 1) (20). Esta cápsula vem sendo relacionada à resistência a radicais livres, permitindo a sobrevivência intracelular da micobactéria e limitando a penetração de drogas antimicrobianas (21). Estudos anteriores já mostraram que o PGL-1 pode ser encontrado em tecidos, no sangue circulante e na urina de doentes multibacilares. Além disso, ele também foi detectado em tatus infectados com o *M. leprae* (22).

Além de se ligar a uma ou mais moléculas receptoras específicas, o *M. leprae* interage com o colesterol da membrana plasmática, o que estabiliza a ligação da micobactéria com o macrófago, permitindo sua posterior internalização (23).

Quanto aos componentes bacterianos críticos para o tropismo, alguns estudos vêm demonstrando evidências de que o PGL-1 esteja envolvido na determinação da afinidade de *M. leprae* pelos nervos periféricos, conforme demonstrou Rambukkana e colaboradores (2001) (24). Mais tarde, acumularam-se evidências apontando a célula de Schwann, nos nervos periféricos, como o alvo para o bacilo.

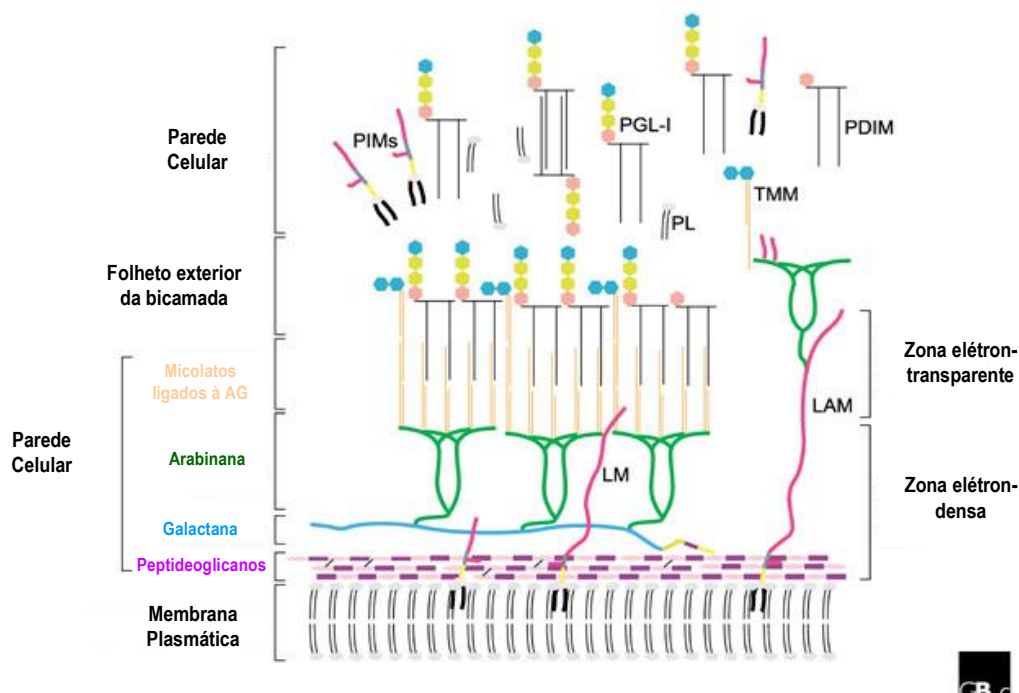


Figura 1: Modelo esquemático da parede celular do *M. leprae*. A membrana plasmática é recoberta por uma parede celular feita de peptidoglicano associada covalentemente à galactana por uma unidade de ligação de arabinogalactana. Por sua vez, três cadeias ramificadas de arabinana são ligadas à galactana. A camada de peptidoglicano-arabinogalactano forma a zona elétron-densa. Ácidos micólicos estão ligados no final da cadeia de arabinana para formar o folheto interno da bicamada lipídica. O folheto externo é formado por ácidos micólicos da trealose monomicolato (TMMs) e ácidos micocerosóicos de fticeroil dimicocerosato (PDIMs) e glicolípido fenólico (PGLs) como indicado no esquema. A bicamada forma a zona elétron-transparente. Uma cápsula composta basicamente de PGLs e outras moléculas como PDIMs, PIMs (fosfatidilinositol manosídeos) e PL (fosfolípídeos) rodeiam a bactéria. Lipoglicanos como PIMs, LM (lipomanana) e LAM, conhecidos por se ancorarem a membrana plasmática, também são encontrados na cápsula (Adaptado de Vissa e Brennan, 2001).

A temperatura é um importante para a sobrevivência do *M. leprae* na célula hospedeira. Em macrófagos humanos o *M. leprae* manteve a sua viabilidade quando as células foram cultivadas a 35°C durante 4 semanas sem a presença da IL-10. No entanto, a viabilidade do *M. leprae* foi quase perdida em duas semanas, quando este foi cultivado a 37°C (25).

Alves e colaboradores (2004) (26) demonstraram que tal como ocorre nos macrófagos, o *M. leprae* viável pode interferir na via endocítica de

maturação do fagossoma nas células de Schwann. Entretanto, o *M. leprae* inativado percorre a via normal de maturação endocítica. Neste mesmo trabalho foi demonstrado que a ativação intracelular de PTK (proteína tirosina quinase), PKC (proteína quinase dependente de cálcio) e PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase) é requerida para a fagocitose da bactéria, tal como ocorre na infecção de monócitos humanos por *M. leprae* e BCG (27).

Na impossibilidade de estudar a interação de *M. leprae* vivo com células humanas, já que esta bactéria não é cultivável, ensaios com outras micobactérias patogênicas têm sido largamente utilizadas para analisar alguns aspectos da infecção por micobactérias. Entre elas, o *M. avium* que tem despertado interesse clínico, por ser uma das micobactérias que mais afetam pacientes infectados com HIV, sendo o seu mecanismo de infecção ainda não completamente elucidado (28).

III- Interação entre o *M. leprae* e a célula hospedeira

O *M. leprae* infecta preferencialmente os macrófagos e as células de Schwann. Trabalhos mostram a interação do *M. leprae* com outras células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas (DCs) (29). Nesse trabalho eles observaram que o *M. leprae*, comparado com *M. tuberculosis* (Mtb) ou BCG, não induz ativação e maturação das mDCs. Isso foi observado através da análise dos marcadores de superfície: CD40, HLA-DR, CD80, CD86, CD83 e CD25. Além disso, o *M. leprae* não induziu a produção de IL-12 e TNF α quando comparada com Mtb ou BCG. Foi observado que as células T não proliferaram em resposta às DCs estimuladas com *M. leprae*. A

capacidade das DCs ativarem as células T depende do grau de maturação dessas células. DCs imaturas são células com alta capacidade fagocítica que após o estímulo com componentes microbianos, passam a expressar na sua superfície os receptores do tipo Toll (TLRs), ativando NF- κ B e MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) induzindo a maturação e ativação dessas células. As DCs maduras são APCs eficientes que apresentam na sua superfície celular o aumento de MHC. Além disso, ocorre o aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias, CD86/B7.2, CD80/B7.1, CD83 e CD40. As DCs migram do tecido infectado para a circulação linfática através da expressão de CCR7, que é o único receptor de quimiocina expresso pelas DCs maduras (30). O *M. leprae* ativa as DCs através de lipoproteínas como a 19kDa via heterodímeros de TLR2-TLR1 (31). Foi observado que o polimorfismo no TLR2 está relacionado à susceptibilidade à hanseníase (32).

O *M. leprae* reside dentro dos macrófagos não só da pele como em vários tecidos e inibe a fusão do fagossoma com o lisossomo (33). Com isso, ele não é digerido pelas enzimas presentes no lisossomo. Além disso, o *M. leprae* induz a produção de IL-10 pelos macrófagos (11,34) inibindo a imunidade adaptativa específica ao antígeno induzida pelas DCs (35).

Os macrófagos são heterogêneos em vários aspectos. Os monócitos podem ser diferenciados em macrófagos utilizando recombinante para o granulócito-macrófago fator estimulador de colônia (GM-CSF) (esse macrófago é chamado de GM-M ϕ) ou diferenciado com fator estimulador de colônia de macrófago (M-CSF) (chamado de M-M ϕ). Embora ambos os macrófagos fagocitem igualmente a micobactéria, o GM-M ϕ infectado com o *M. leprae* e em seguida tratado com IFN- γ e ligante de CD40, estimula as células T a

produzirem IFN- γ , já o M-M ϕ não é capaz de estimular as células T, nas mesmas condições que o GM-M ϕ . Corroborando para isto, o *M. leprae* é capaz de induzir alta produção de IL-10 no M-M ϕ e não no GM-M ϕ . Além disso, o macrófago GM-M ϕ expressa a proteína principal de membrana II (MMP-II), que é uma proteína antigênica capaz de estimular as células T. Isto sugere que o macrófago GM-M ϕ pode processar algum *M. leprae* fagocitado. Estes resultados indicam que GM-CSF contribui para a ativação das células T em macrófagos estimulados com *M. leprae* ao contrário de M-CSF que não é capaz de induzir ativação dessas células (36).

Células da imunidade inata apresentam os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que reconhecem padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) (37). A expressão e a ativação de receptores do tipo Toll (TLRs) foi investigada na hanseníase (31). Como já foi citado, o *M. leprae* é capaz de ativar heterodímeros TLR2-TLR1. Estudos mostraram que lipopeptídeos sintéticos, representando as lipoproteínas de 19 kDa e 33kDa do *M. leprae*, ativam monócitos e DCs. Estudos adicionais demonstraram que a lipoproteína 33kDa e MMP-II do *M. leprae* ativam o TLR2 (38). Essa ativação de TLR2 foi aumentada na presença de citocinas do tipo Th1 e inibida por citocinas do tipo Th2. Citocinas do tipo 1 como IFN- γ e GM-CSF realçam a expressão de TLR1 em monócitos e DCs, respectivamente e citocinas do tipo Th2, como a IL-4, regulam negativamente a expressão de TLR2. TLR2 e TLR1 são mais expressos nas lesões de pacientes com a forma tuberculóide quando comparadas com a forma lepromatosa da doença (39).

O *M. leprae* ou os componentes do *M. leprae* estimulam os macrófagos a produzirem citocinas, como o TNF α *in vitro* (40,41), que indica um papel

direto dessas células na resposta imune contra a infecção. Foi mostrado anteriormente que o *M. leprae* é rapidamente fagocitado por macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 e que ele escapa da fusão fagossoma-lisossoma em 48 horas (26). Estudo preliminar demonstrou que a fagocitose do *M. leprae* por monócitos humanos da linhagem THP-1 (linhagem celular de origem mielóide leucêmica humana) é dependente de quinase (27). Nesse estudo foi observada que a fosforilação de tirosina quinase (TK) representa o principal sinal gerado pela associação do *M. leprae* com os monócitos. Células THP-1 tratadas com um inibidor específico para TK reduziu a associação do *M. leprae* em mais de 65%. Além da TK, nesse mesmo trabalho foi observada a ativação de proteína quinase C (PKC) e lipídio quinase (PI 3-K) pelo *M. leprae*, tanto em células THP-1 como em monócitos primários humanos. Por outro lado, células mononucleares pré-expostas ao *M. leprae* induzem a produção de $\text{TNF}\alpha$ após adição de PGL-1 (42).

A molécula CD209 é um tipo de lectina tipo C que apresenta domínios de reconhecimento de carboidrato (CRD) como ManLAM presente nas micobactérias e contribui para a atividade fagocítica de macrófagos. É expresso por células dendríticas imaturas no sangue e no tecido e por algumas populações de macrófagos (43). Atua como receptor de uma variedade de patógenos, *Mycobacterium tuberculosis*, vírus ebola, *cytomegalovirus* (44), *Leishmania* (45), *Schistosoma mansoni*, *Helicobacter pylori* (46) e cândida (47). Krutzik e cols (2005) (48) observaram predomínio da expressão de CD209 nas lesões de pacientes LL e nas lesões de pele de pacientes tuberculóides as células CD209^+ também foram positivas para marcadores de macrófagos e CD209^- para os marcadores de célula dendrítica. Soilleux e cols (2006) (49)

observaram alta expressão de CD209 em lesões de pacientes lepromatosos, particularmente nas células contendo a bactéria. Pouca expressão de CD209 foi observado nas lesões de pacientes tuberculóides. Corroborando com o trabalho de Krutzik, as células CD209⁺ são positivas para marcadores de macrófagos e negativas para marcadores de células dendríticas.

Trabalhos recentes têm focado o estudo na interação do *M. leprae* com outras células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas, anteriormente citada e células epiteliais (29,50). Sieling e cols. (1999) (51) demonstram que as DCs predominam em lesões de pacientes tuberculóides. Outros estudos mostraram a presença de ligante de CD40 (CD40L) em lesões tuberculóides, o qual está associado com a diferenciação e ativação dessas células (52).

Estudos mostram que DCs são capazes de internalizar o *M. leprae*, entretanto essas células dendríticas ativam com menor intensidade as células T quando comparadas com as DCs infectadas com *M. bovis* ou *M. avium*. Hunger e cols. (2004) (53) mostraram que células de Langerhans, tipo de célula dendrítica presente na pele, são mais eficientes na apresentação do *M. leprae* do que DCs derivadas de monócitos (mDCs). As lesões de pacientes lepromatosos são deficientes em células de Langerhans quando comparado com outros grupos, o que acarreta redução da resposta imune celular nessas lesões. Alta quantidade dessas células foi observada em lesões de pacientes tuberculóides, e na epiderme e derme durante as reações do tipo I e tipo II na hanseníase (54).

Makino e cols (2005) (55) evidenciaram que MMP-II isolada do *M. leprae* é altamente imunogênico. Sugerindo que MMPII estimula DCs derivadas de monócitos diretamente, contribuindo para a forte ativação dos linfócitos T.

IV- Mecanismos de supressão na Hanseníase

A anergia antígeno-específica observada em pacientes com o pólo lepromatoso da doença ainda não foi completamente elucidada, mas sabe-se que pacientes lepromatosos são capazes de responder a outros antígenos que não do *M. leprae* (56).

A anergia é um estado celular em que a célula encontra-se viva, mas não apresenta atividade funcional quando estimulada através dos receptores TCR/CD28 (57). As células T anérgicas apresentam produção de IL-2 ou expressão de IL-2R α reduzida ou ambas. O promotor da IL-2 é ativado através da cascata de sinalização iniciada pela ativação do receptor de célula T (TCR) e do CD28 (58). Clones de células T anérgicas apresentam múltiplas alterações na sinalização associada ao TCR (59) e *in vivo* apresentam defeito na ativação do promotor de IL-2 (60). Esses trabalhos sugerem que a anergia nas células T pode ser devido a alterações nos eventos de sinalização envolvendo a produção de IL-2 e com isso acarretando na perturbação do ciclo celular.

Nos pacientes lepromatosos a baixa produção de IL-2 é responsável pela perda da função das células T. Alguns experimentos mostraram que os pacientes lepromatosos podem passar a responder ao *M. leprae* após a adição de IL-2 na cultura celular (61). Dagur e cols. (2010) (62) mostraram que

antígenos do *M. leprae* reduzem a fosforilação de Erk1/2 e p38 MAPK, conseqüentemente reduzindo a ativação do promotor de IL-2 e a transcrição desse gene e reduzindo a expressão dos marcadores CD25 e CD69. Além disso, frações do *M. leprae* inibem significativamente a secreção de IL-2 e a blastogênese de células T em indivíduos saudáveis. Isto sugere que o *M. leprae* interfere na sinalização de TCR/CD28, resultando na redução da produção de IL-2 e inibição da proliferação das células T. Além disso, já foi observado que o LAM e PGL-1 presentes na superfície do *M. leprae* e livres em tecidos infectados suprimem a resposta de células T por inibirem a produção de IFN- γ , além de modular a produção de TNF α por monócitos *in vitro* (63,64).

Já foi evidenciado que a injeção intradérmica com PPD leva ao acúmulo local de células T auxiliares e monócitos na derme (61). Estes mesmos autores, em 1990, observaram um aumento do número de células T CD4⁺ nas lesões de pacientes lepromatosos após injeção intradérmica de rIFN- γ e rIL-2, separadamente. A presença de células T reativas ao *M. leprae* também é observada durante o desenvolvimento de episódios reacionais de pacientes lepromatosos (65,66) indicando o aparecimento da resposta imune.

A alta carga bacilar presente nos pacientes lepromatosos pode ter um papel *in vivo* na indução da tolerância imune. Componentes da micobactéria, como PGL-1 e outras moléculas parecem ter um papel na inibição da função dos macrófagos e das células T. Monócitos infectados de pacientes lepromatosos, mas não de pacientes tuberculóides, liberam fatores, como IL-10 e prostaglandina E₂ (PGE₂), que inibem a linfoproliferação ao *M. leprae* em indivíduos sabidamente responsivos à bactéria. PGE₂ inibe a produção de IL-2 e IFN γ , citocinas importantes para gerar resposta imune específica, que, em

geral, são fracamente expressas em pacientes lepromatosos (67). Desta forma, o *M. leprae* parece modular a resposta imune, através de componentes de sua parede celular e da secreção de substâncias com atividade supressora sobre os macrófagos. Além disso, monócitos infectados podem contribuir para a fraca ativação dos linfócitos T nos indivíduos lepromatosos devido à liberação de fatores que suprimem a ativação destas células.

Em outros estudos foi evidenciado que a falta de resposta no pólo lepromatoso pode ser devido à baixa expressão de moléculas na superfície celular, CD80 (B7-1) e CD28 em PBMCs e em lesão de pacientes lepromatosos, importantes para a apresentação de antígenos e ativação das células T. Além disso, a resposta proliferativa dos linfócitos em pacientes tuberculóides induzida por *M. leprae* foi inibida com a presença de anticorpo anti-CD80 nas culturas (68), evidenciando a importância da expressão de CD80 na ativação das células T. Antígenos do *M. leprae* podem induzir a inativação de clones de células T reativas, levando ao crescimento do bacilo dentro dos macrófagos. Santos e cols (2007) (69) observaram por citometria de fluxo e imunohistoquímica uma significativa expressão de CD80 nas PBMCs isoladas de pacientes com ENL e RR quando comparado com paciente multibacilar não reacional. Além disso, eles observaram que a expressão de CD80 antes da reação do tipo ENL era baixa e durante o episódio reacional estava aumentada. Sugerindo que CD80 pode servir como um marcador da resposta imune celular nos episódios reacionais da hanseníase.

As citocinas IL-10 e a IL-4 são conhecidas como antagonistas da resposta imune mediada por célula. Foi observado predomínio de mRNA de IL-4 e IL-10 nas lesões de pacientes lepromatosos quando comparado com

lesões de tuberculóides (70). A IL-10 está aumentada nos pacientes lepromatosos, sugerindo que esta citocina participa da imunossupressão da hanseníase (71,72). Neste contexto foi evidenciado por Sieling e cols. (1993) (72) que a principal fonte de IL-10 são os macrófagos induzidos pelo *M. leprae*. Paradoxalmente, a presença da IL-4 aumenta a proliferação de células T CD8⁺ nos pacientes lepromatosos *in vitro* e foi descrito que as células T CD8⁺ de pacientes lepromatosos inibem a resposta de células T CD4⁺. Nesse mesmo estudo foi observado que a IL-4 inibe a secreção de IL-10 e aumenta TNF α e GM-CSF. Isto sugere que o balanço entre IL-10 e IL-4 contribui para a imunossupressão observada na hanseníase.

Outra citocina que está aumentada nas lesões de pacientes lepromatosos quando comparada com as lesões de pacientes tuberculóides é o TGF- β (73). Esta citocina é conhecida por suprimir a imunidade celular. O TGF- β participa no controle da proliferação e diferenciação celular, bem como no reparo do tecido. Também regula negativamente as funções dos monócitos e das células T, além de inibir a produção de IFN- γ e favorecer a secreção de IL-10 (74).

Vários estudos indicam a participação da IL-12 na resposta imune celular ao *M. leprae*. A adição de rIL-12 em cultura de PBMCs de pacientes lepromatosos mostrou que 50% dos pacientes foram capazes de responder ao *M. leprae*. Esta indução foi efetiva quando o efeito da IL-10 foi bloqueado, utilizando um anticorpo anti-IL10 (75,76). A ativação de IL-12 é induzida através do seu receptor (IL-12R) composto por heterodímeros, IL-12R β 1/IL-12R β 2, a ativação da cadeia IL-12R β 2 envolve a sinalização via STAT4. Foi observado que a expressão de IL-12R β 1 é similar nas lesões de pacientes

tuberculóides e pacientes lepromatosos. Já a expressão do receptor IL-12R β 2 apresentou aumento nas lesões tuberculóides quando comparado com as lesões lepromatosas. Além disso, a expressão desse receptor foi aumentada em resposta ao *M. leprae* nas células T de pacientes tuberculóides, mas não sofreu modificação nas células T de pacientes lepromatosos. A IL-12 induziu a fosforilação de STAT4 nas células T ativadas com *M. leprae* de pacientes tuberculóides, mas não induziu nas células de pacientes lepromatosos. Interessantemente, nas células de pacientes lepromatosos a expressão de IL-12R β 2 apresentou aumento após estímulo com *M. tuberculosis*, mostrando que a falta de ativação desse receptor é específica ao *M. leprae* (77). Lopez e cols (2008) observaram que a síntese de IFN- γ após adição de recombinante de IL-12 e IL-18 em cultura de PBMCs de pacientes lepromatosos estava aumentada, bem como a redução da expressão de IL-18r.

Como foi citado, o *M. leprae* é um fraco ativador de macrófagos e de células dendríticas *in vitro*. Quando comparado com BCG, o *M. leprae* induziu baixo ou ausentes níveis das citocinas: IL-18, IL-10, IL-12, IL-6, TNF α e IL1- β em monócitos de indivíduos saudáveis. Além disso, níveis reduzidos dessas citocinas estão associados com a redução da ativação de NF- κ B, avaliada pela fosforilação da sub-unidade p65 do NF- κ B. No mesmo experimento foi observado que o *M. leprae* induz fortemente MCP-1 e IL-1Ra (receptor antagonista da IL1). Esta indução envolve a sinalização de PI3K. A supressão da IL-6 é dependente da sinalização de PI3k, já que na presença de inibidor dessa via, o *M. leprae* é capaz de induzir a secreção dessa citocina. Apesar do *M. leprae* induzir fatores negativos, células pré-tratadas com *M. leprae* são capazes de aumentar a produção de TNF α e IL10 em resposta a um segundo

antígeno (78). No nosso laboratório estudos recentes também mostraram a participação do NF- κ B na indução de TNF α induzido pelo *M. leprae*. Na hanseníase o TNF α apresenta um papel crítico para o desenvolvimento dos danos nos nervos e no tecido durante o ENL. Nesse estudo foi observado que o *M. leprae* induz translocação de NF- κ B em PBMCs e monócitos de indivíduos saudáveis e que a talidomida, droga utilizada nos pacientes durante o ENL, foi capaz de reduzir os níveis de TNF α bem como a translocação de NF- κ B (Hernandez MO e Fulco TO, 2010).

Estudos recentes mostram que os macrófagos podem se comportar de forma diferenciada ao fagocitarem o *M. leprae*. Os macrófagos podem atuar fagocitando o bacilo e permitindo o seu acúmulo intracelular ou fagocitar e direcionar para uma resposta microbida. Foi mostrado que um aumento na fagocitose não necessariamente resulta em aumento da atividade microbida e que na presença de IL-10, há aumento de fagocitose, provavelmente mediada pelo receptor CD209. Em presença de IL-15 o macrófago pode ser direcionado para a via microbida dependente de vitamina D. Este programa de diferenciação na resposta do macrófago frente ao bacilo foi confirmado em lesões de pacientes das formas polares quando macrófagos lepromatosos exibem alta carga bacilar. Os macrófagos podem, em pacientes com reação reversa, se comportar de modo semelhante aos macrófagos tuberculóides, não-reacionais (79).

V- Indoleamina 2, 3 dioxigenase

A indoleamina 2, 3 dioxigenase (IDO) é uma proteína monomérica contendo o grupo protético heme. O gene humano de IDO codifica esta proteína com 403 aminoácidos e peso molecular de aproximadamente 45 kDa. Sua principal função é a degradação do aminoácido essencial, triptofano (trp), através da clivagem oxidativa do anel pirrólico do triptofano, no tecido extra-hepático (80).

O triptofano é um aminoácido necessário para a biossíntese de proteínas, serotonina, nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e ácido nicotínico (vitamina PP). Na ausência do triptofano o ciclo celular para na fase G1 e a via das quinureninas é a principal rota de degradação desse aminoácido. O primeiro passo da rota das quinureninas é a conversão do triptofano em N-formilquinurenina pela enzima IDO. A N-formilquinurenina é inicialmente convertida em quinurenina e, então, pela enzima quinurenina 3-hidroxilase (KMO), na 3-hidroxiquinurenina (3HK). Ambas, quinurenina e 3-hidroxiquinurenina podem ser oxidadas pela enzima quinureninase (KINU) a ácido antranílico (AA) ou ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA), respectivamente; ou eles podem ser transaminados pelas enzimas quinurenina aminotransferase I ou II (KATI ou KATII) a ácido quinurênico (KYNA) ou ácido xanturênico (XA), respectivamente. Então, o ácido 3-HAA, por sua vez, pode ser oxidado pelo ácido 3-hidroxiantranílico oxidase (3-HAO) para formar QUINA (81) (Figura 2). Os metabólitos dessa via, comumente chamados de quinureninas (Figura 2), estão envolvidos em vários processos fisiológicos e patológicos e, diversos trabalhos vêm mostrando a participação das quinureninas na fisiopatologia de

várias doenças neurodegenerativas. Foi proposto por Munn e cols. (2005) (81) que células dendríticas expressando IDO induzem a ativação da proteína GCN2 que seria responsável pelos efeitos causados por IDO. Catabólitos do triptofano, como: Quinurenina, 3-hidroxi-antranílico e ácido quinolínico são capazes de induzir apoptose e exercer efeitos citotóxicos nas células T. A ação citotóxica dos metabólitos do triptofano afeta preferencialmente essas células, células B e células natural killer (NK), sem ter ação sob as células dendríticas (81).

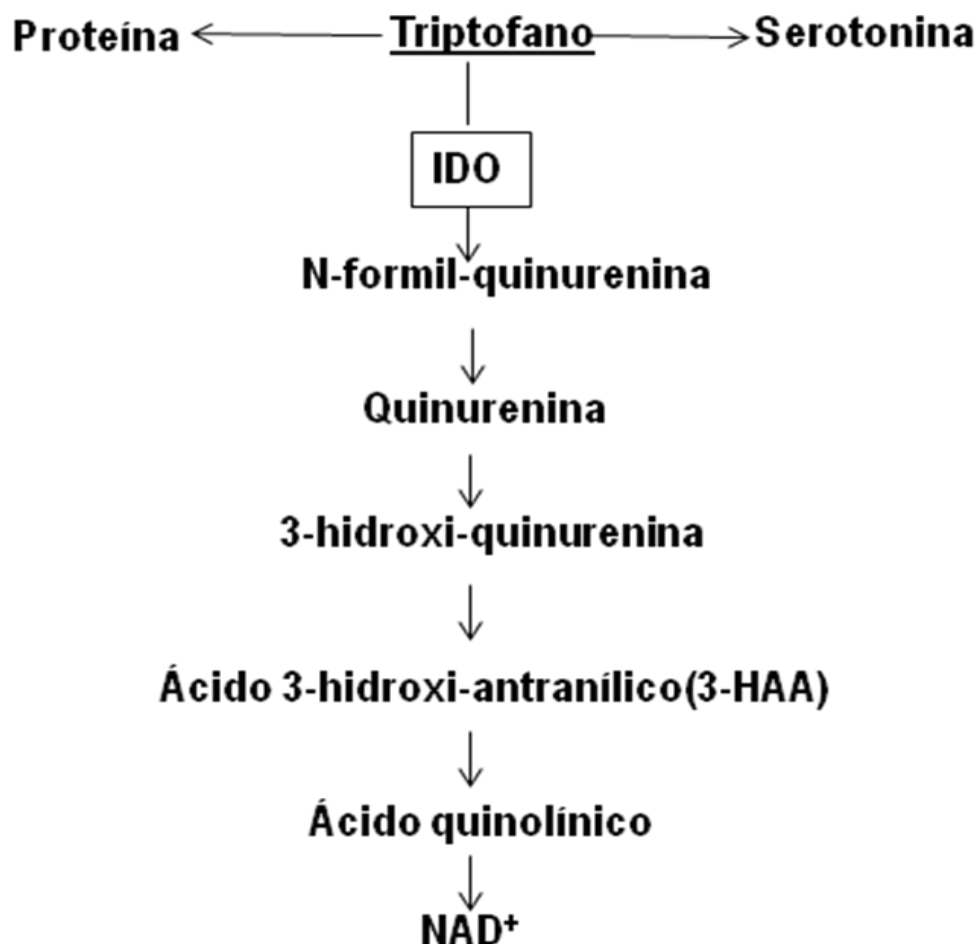


Figura 2: Via da quinurenina no metabolismo do triptofano em mamíferos. Cerca de 95% do triptofano que não é requerido para a síntese de proteínas é metabolizado pela via da quinurenina. A via pode ser iniciada no fígado pela TDO ou em tecidos extra-hepáticos pela IDO. IDO degrada o triptofano em N-formil-quinurenina que é convertida para quinurenina. Dependendo do tipo celular, a quinurenina pode ser metabolizada em vários metabólitos que podem exercer funções imunológicas, antioxidantes ou agir em ações neurológicas (Esquema simplificado da rota da quinurenina. Adaptação de Mackay e cols., 2006).

A IDO é uma enzima induzida por IFN- γ em muitos tipos celulares, como: macrófagos, células dendríticas (DCs), microglia, astrócitos, fibroblastos, eosinófilos, células epiteliais e em células tumorais (80,83,84). Outras citocinas (IFN α , IFN β , TNF α e IL-10) ou lipopolissacarídeos são capazes de induzir IDO, embora, com menos eficiência que o IFN- γ (85). Também foi observado que a molécula CTLA-4 induz IDO nas células dendríticas (DCs) de forma dependente ou independente ao NF- κ B (86). Outras moléculas como: IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β , PGE₂, CD40, supressor de da sinalização de citocina 3 (SOCS3), Bin1 e DAP12 também modulam a expressão de IDO dependendo do tipo celular e das citocinas presentes no meio (87). Agentes microbianos como vírus e alguns patógenos intracelulares podem induzir IDO (88) através da sinalização via TLRs pela interação CTLA4-B7 (89).

In vivo, já foi observado um aumento na degradação do triptofano quando a resposta imune do tipo Th1 é induzida. Nesse caso, ocorre uma redução na concentração de triptofano e um aumento concomitante de quinurenina e outros metabólitos da degradação do triptofano que podem ser detectados no soro (90, 91). A triptofano dioxigenase (TDO) é uma enzima similar a IDO, responsável pela degradação do triptofano, que segue o caminho das quinureninas nas células do fígado, células dos rins e astrócitos (92). Inicialmente IDO foi descrita por inibir o crescimento de protozoários a vírus, incluindo patógenos intracelulares (ex: *Toxoplasma gondii* e *Chlamydia psittaci*) e por inibir a proliferação celular durante o tumor induzida por IFN- γ (93). Posteriormente, o papel de IDO na redução da proliferação celular foi confirmado por Munn e Mellor (1999) (80) ao descreverem que IDO expresso na placenta é responsável por prevenir a rejeição fetal das células T maternas

frente às células do feto em camundongos (94). A ativação de IDO inibe a proliferação de linfócitos através da depleção de triptofano e pela ação direta dos próprios metabólitos produzidos na degradação desse aminoácido, causando a imunotolerância (95).

Há uma necessidade para o uso de potentes inibidores de IDO em pesquisa clínica e como compostos para novas drogas. A tabela 1 mostra os reagentes que inibem a atividade de IDO diretamente, ou que têm efeito inibitório indireto na expressão ou atividade de IDO. Diversos análogos sintéticos do triptofano inibem a atividade enzimática de IDO (96), provavelmente por ligação ao sítio ativo da enzima que aceita o anel indole do substrato e de análogos do substrato (97). Por exemplo, 1-metil- triptofano (1MT) é um inibidor de IDO reversível usado normalmente como inibidor padrão em ensaios para avaliar a atividade de IDO (98). Surpreendentemente, o isômero do 1-MT, o D-isômero é menos tóxico e mais efetivo como inibidor de IDO do que o L-isômero quando testado em estudos pré-clínicos com camundongos. L-isômero de 1-MT reduz o crescimento de tumor *in vivo*. D-1MT também é inibidor efetivo de IDO em estudos com macrófagos e células dendríticas (99). O D-1MT é avaliado atualmente como um potencial adjuvante em vacina para o tratamento do câncer (100).

O Brassinin (do inglês: 3-(S-methyldithiocarbamoyl) aminomethyl índole), é um produto natural de planta, que inibe a atividade de IDO diretamente (101). É um agente que interfere com a tolerância imunológica tumoral. Ele pode ser útil para prevenir ou tratar o câncer e tem um efeito quimiopreventivo em modelos pré-clínicos de câncer. Ele pertence a uma nova classe de compostos com atividade antitumoral *in vivo*.

Pouco se sabe sobre a função biológica do inibidor NSC401366, que foi capaz de inibir o acesso ao triptofano livre e restaurar o crescimento da levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) (96).

Outros compostos exibem propriedades antioxidantes que inibem a expressão de IDO indiretamente por interferir com co-fatores que são requeridos para a atividade enzimática ou sinalizar moléculas que interferem na expressão de IDO. Epigallocatequina galato, ácido rosmarínico e ácido p-cumárico disparam propriedades inibitórias de IDO *in vitro* usando DCs derivadas da medula óssea de camundongos.

A expressão e a função de IDO é bloqueada pelo bloqueio de ciclooxigenase 2 (COX2) ou expressão de prostaglandina E2 (PGE2), reduzindo a fosforilação de STAT1 e impedindo a ligação de STAT1 com o promotor IRF1 (100). Outros antioxidantes como, pirrolidina ditiocarbamato, 2-mercaptoetanol, ebselen e t-butil hidroquinona também têm sido descritos por inibirem ou reduzirem a atividade de IDO (102).

Alguns metabólitos naturais podem inibir a atividade de IDO. O óxido nítrico (NO) inibe a atividade de IDO pela ligação irreversível ao grupo catalítico heme (103). O peroxinitrito causa a nitração de vários resíduos de tirosina no recombinante de IDO levando à inativação da enzima (104). N-chlorotaurine, um produto de oxidação de HOCl inibe IDO em vários modelos murinos (105).

Outros inibidores de outras moléculas podem inibir IDO. Celecoxib, inibidor de COX2 reduziu a expressão de IDO associado ao tumor em câncer de mama em modelo murino (106). Zebularina, um inibidor de DNA metil transferase, mostrou-se ser um indutor de IDO em altas doses e inibidor de IDO em doses baixas em células de tumor de cólon em ratos (107). Além disso,

alguns compostos isolados de organismos marinhos têm atividade inibitória na IDO. Exiguamina A isolada de esponja *Neopetrosia exígua* inibe IDO *in vitro* (108), e frações de extrato bruto de *Garveia annulata* foram potentes inibidores de IDO (109).

Tabela 1: Reagentes que inibem ou reduzem a atividade enzimática de IDO (Kahler e Mellor., 2009).

Modo de ação	Inibidor	Referência
Inibidor competitivo	1-metil-triptofano	Cady e Sono (1991), Agaugue e cols, (2006), Hou e cols, (2007)
Antioxidantes	Brassinin	Gaspari e cols (2006)
	NSC 401366	Banerjee e cols, (2007)
	Epigallocatechingallate	Vottero e cols, (2006)
	Ácido Rosmarinic	Jeong e cols, (2007)
	Ácido p-Coumaric	Lee e cols, (2007)
	Pyrrolidine dithiocarbamate	Kim e cols, (2007) Thomas e cols, (2001)
Metabólitos	Óxido Nítrico	Thomas e cols, (1994, 200
	Peróxido de hidrogênio	Samelson-Jones e Yeh (20
	Peroxinitrito	Poljak e cols, (2006)
	N-chlorotaurine	Fujigaki e cols, (2006) Wirleitner e cols (2004)
Farmacológico	Celecoxib	Basu e cols (2006)
Compostos derivados marinhos	Zebularine	Liu e cols (2007)
	Exiguamine A	Brastianos e cols (2006)
	Garveia annulata	Pereira e cols (2006)

A atividade de IDO pelas DCs pode influenciar na resposta das células T por diversas maneiras, por exemplo: DCs expressando IDO podem reduzir a expansão clonal das células T efectoras ou ativar células T com perfil regulatório (Figura 3).

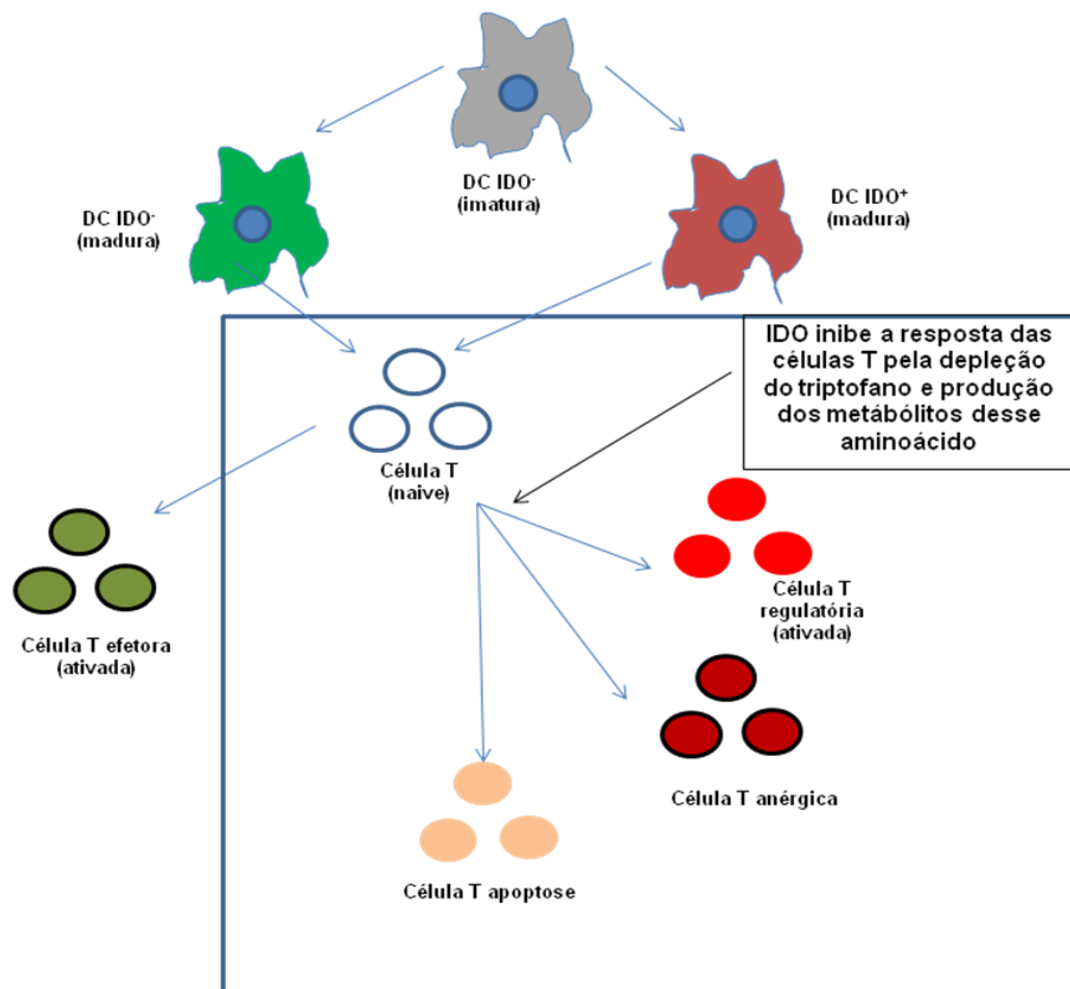


Figura 3: Efeito da expressão de IDO pelas DCs na resposta das células T. Dependendo do estímulo as DCs pode apresentar IDO ativado e com isso ativar as células T naives que podem se diferenciar em células T regulatórias ou podem se tornar anérgicas ou ainda morrerem por apoptose. As DCs que não apresentam IDO ativadas, podem ativar as células T efetivamente (Adaptado de: Mellor, 2005).

O efeito imunossupressor de IDO é melhor descrito em respostas do tipo Th1 do que nas respostas do tipo Th2. Trabalhos mostram que IDO pode inibir a resposta Th1 e manter a resposta Th2 (110). A primeira evidência da participação diferencial de IDO na regulação da resposta Th1/Th2 foi observada quando metabólitos do triptofano, 3- hidróxi-antranílico e ácido quinólnico induziram apoptose nas células Th1, mas não induziram apoptose nas células Th2 *in vitro* (111). Clarck e cols (2005) (112) observaram que a redução de IDO no útero estava correlacionada com o aumento da razão Th1/Th2 junto com o aumento no percentual de células Th1 positivas. Quando ratos foram submetidos a estresse e imunização, níveis de IDO foram

reduzidos e houve uma notável queda de citocinas do tipo Th2, o que resultou no aumento da razão Th1/Th2 (112). Altos níveis de IDO podem limitar a proliferação das células Th1, mas a baixa concentração de IDO pode ser importante para manter a população de células Th2 (110). Odemuyiwa e cols. (2004) (113) mostraram que eosinófilos expressam IDO funcional constitutivamente e essa atividade foi aumentada quando essas células foram tratadas com IFN- γ e ativadas via CD28. Quando a quinurenina produzida pelo eosinófilo ficou em co-cultura com linhagem de células Th1 ou clones de células Th2, ela seletivamente inibiu a proliferação de Th1 induzida por anti-CD3, mas não inibiu a resposta Th2, sugerindo que a IDO expressa por eosinófilos pode criar um ambiente sem triptofano com metabólitos que podem inibir as células Th1 e manter um balanço entre as populações Th1 e Th2. Resultados similares foram observados em culturas de células de baço de camundongos que expressavam IDO ou quando metabólitos do triptofano foram adicionados em cultura, regulando negativamente a resposta Th1 e aumentando a produção de citocinas do tipo Th2 (114). Esses dados citados acima sugerem que células expressando IDO participem de forma diferente na regulação da resposta Th1 e Th2, suprimindo a resposta Th1 e promovendo a resposta Th2.

Muitos modelos mostram que diversos estímulos induzem as DCs a expressarem IDO, por exemplo: LPS (CTLA4/CD28), co-incubação com IL-10, IFN- γ ou sinalização via receptores de alta afinidade com IgE (86). Recentemente, trabalhos mostraram que PGE2 é um mediador que pode influenciar a tolerância imune através da expressão de IDO(115). A PGE2 apresenta um papel importante na carcinogênese. Níveis aumentados de

PGE2 são observados no câncer e a depleção do receptor de PGE2, o EP2 leva para a redução da carcinogênese e o aumento da imunidade anti-tumor. PGE2 é produzido através do ácido araquidônico por ciclooxigenases (COXs) e síntese de prostaglandina E. A síntese de PGE2 pode ser bloqueada por drogas anti-inflamatórias e por inibidores de COX-2 (ciclooxigenase 2). mDCs maturadas na presença de PGE2 ativam IDO bem como a expressão e secreção de CD25. A consequência disso é a inibição da função das células T, principalmente mediada pela depleção do triptofano. Outros trabalhos também evidenciaram que a inibição de COX2 reduz a expressão de IDO, FoxP3 e COX-2 reduzindo a massa tumoral e metástase do tumor, o que sugere que a inibição de COX-2 está correlacionada com a redução de IDO e células Treg (115).

Outro mediador que participa da regulação de IDO é o óxido nítrico (NO). Tanto a depleção de triptofano resultante da atividade de IDO como NO apresentam importantes mecanismos microbicidas. Entretanto, o efeito bacteriostático de IDO é abolido pela produção de NO, tanto por uma ação inibitória direta como pelo aumento da degradação de IDO pelo proteossoma (116).

Estudos utilizando modelo experimental de artrite autoimune demonstraram que a citocina TNF- α induz aumento da expressão de mRNA para IDO e o nível de células com fenótipo regulatório (CD4+CD25+) (117). Outros estudos demonstraram que a indução de IDO é um processo que envolve duas etapas, PGE2 causando um aumento na expressão de IDO e o TNF- α (ou ligantes de TLR) levando ao aumento da atividade enzimática de IDO (118).

Há poucos estudos relacionando IDO a micobactérias. Enquanto a redução da concentração de *M. avium* em camundongos foi atribuída à atividade de IDO (119), a eliminação de diversas micobactérias parece envolver a síntese de iNOS (120).

Justificativa

A anergia antígeno-específico observada em pacientes com a forma lepromatosa da hanseníase não foi completamente elucidada. Estudos anteriores demonstraram ser a célula hospedeira fundamental no direcionamento da resposta imune efetora. Recentemente, o papel da enzima IDO na manutenção de respostas Th2 e na imunossupressão observada em processos infecciosos e em outras patologias, como o câncer, têm sido demonstrado na literatura. Assim, o presente trabalho justifica-se pela necessidade de avaliarmos o envolvimento de IDO no estabelecimento do pólo anérgico da hanseníase. Para isso, a expressão e atividade de IDO foram analisadas em amostras de pacientes com diferentes formas clínicas da hanseníase, com ou sem reação. Em paralelo, a capacidade do *M. leprae* induzir a expressão e atividade de IDO em monócitos e mDCs humanos provenientes de voluntários saudáveis e pacientes com a forma anérgica da doença também foi avaliada. Espera-se que os dados obtidos levem a identificação de novos alvos terapêuticos, visando à redução da proliferação bacilar e o controle da resposta inflamatória.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o papel de indoleamina 2, 3 dioxigenase na regulação negativa da resposta imune celular nos pacientes na forma lepromatosa da hanseníase.

Objetivos Específicos

In vivo:

- Analisar a expressão de IDO em lesões de pacientes lepromatosos, tuberculóides e com reação reversa por imunohistoquímica, imunofluorescência e PCR em tempo real;
- Avaliar o fenótipo das células IDO⁺, utilizando marcadores de superfície celular (CD68, CD86, CD11c e HLA-DR) por imunohistoquímica e imunofluorescência;
- Estudar a expressão de IDO nos pacientes lepromatosos e tuberculóides por western blotting;
- Estudar a expressão gênica das citocinas, IFN- γ , TNF α e IL-10 em lesões dos pacientes lepromatosos, tuberculóides e com reação reversa;
- Avaliar a atividade de IDO e IFN- γ e TNF α no soro de pacientes com hanseníase e indivíduo saudável;

In vitro:

- Estudar o papel de *M. leprae* na expressão gênica de IDO em PBMCs de indivíduos saudáveis por PCR em tempo real;
- Investigar a participação de IFN- γ e *M. leprae* na expressão e atividade de IDO em monócitos de pacientes lepromatosos e indivíduos saudáveis;
- Investigar a participação de TNF α , IL12-p70, IL1- β e TGF- β na indução de IDO pelo *M. leprae*;
- Análise de marcadores de superfície (CD40, CD83, CD86, DC-LAMP e HLA-DR) e atividade de IDO em mDCs de indivíduos saudáveis induzidos pelo *M. leprae*;
- Análise da secreção de IL-1 β , IL-10, IL-12p40, TGF- β e TNF α em cultura de mDCs de indivíduos saudáveis estimuladas com *M. leprae*;
- Análise da expressão de células CD4⁺CD25⁺CTLA4⁺ em co-cultura de células T com mDCs estimuladas com *M. leprae* na presença de 1-MT.

Material e Métodos

1- Biosegurança e Permissão Ética

As amostras biológicas de pacientes com hanseníase, diagnosticadas de acordo com a classificação de Ridley e Jopling (1966) (5), foram coletadas no Ambulatório Souza Araújo (FIOCRUZ, Rio de Janeiro) e manipuladas na câmara de fluxo laminar, em ambiente estéril, respeitando as normas preconizadas para a manipulação de material biológico.

A participação de cada indivíduo no estudo foi condicionada à assinatura de um termo de consentimento previamente aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da FIOCRUZ (Protocolo nº 518/09). Para a proteção e o bem estar dos indivíduos incluídos neste projeto, o nome de nenhum dos participantes foi divulgado.

2- Separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram obtidas a partir do sangue de pacientes recrutados do Ambulatório Souza Araújo ou de capas leucoplaquetárias resultantes de processamento de bolsas de sangue (*Buffy coat*), cedidas pelo Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (UFRJ). O sangue periférico heparinizado foi diluído 1:1 em salina tampão fosfato (PBS) para separação das células por gradiente de

densidade em Ficoll Hypaque (GE Healthcare, Suécia). Após centrifugação a 900 g, por 30 minutos, à temperatura ambiente, as células mononucleares foram coletadas e as PBMCs lavadas duas vezes com PBS (500 g, por 10 minutos, a 4°C) e ressuspensas em meio RPMI (Gibco Invitrogen Corporation 1640, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco Invitrogen Corporation, EUA), L-glutamina (Gibco Invitrogen Corporation, EUA) a 2mM, penicilina a 100U/mL e estreptomicina (Gibco Invitrogen Corporation, EUA) a 100µg/mL (meio completo). Uma pequena alíquota desta suspensão celular foi diluída em azul de Tripán 0.4% (1:1) (Bio WHITTAKER, EUA) e contada em câmara de Neubauer para a estimativa da concentração de células viáveis.

3- Obtenção de monócitos e células dendríticas derivadas de monócitos (mDCs).

Células mononucleares do sangue periférico obtidas de doadores saudáveis e de pacientes foram marcadas com beads magnéticas para CD14 (20µl de MicroBeads para 10⁷ de células / MACS Miltenyi Biotec) por 15 minutos a 4°C, lavadas com tampão (5% soro fetal bovino, 1mM EDTA e PBS). Após esse período de tempo, essas células foram passadas numa coluna de separação. Em alguns experimentos as células CD14⁺ foram plaqueadas e estimuladas por 24 horas. Alternativamente, após a separação dos monócitos, as células CD14⁺ foram cultivadas na presença de meio contendo IL-4 (10 ng/ml) e GM-CSF (50 ng/ml) (PeproTech, NJ, USA) por 6 dias, para a

diferenciação das células CD14⁺ em células dendríticas derivadas de monócitos (mDCs). Após esse período de tempo as células foram lavadas com PBS-FACS (PBS com 1% de BSA). Foi realizado o bloqueio de receptores de superfície celular FcγR com 100μl de soro inativado de carneiro a 5% em PBS-FACS, por 30 minutos, em banho de gelo. Seguiu-se incubação por 30 minutos, em gelo, com alguns marcadores de superfície, para confirmar o fenótipo dessas células. Foram utilizados nessa etapa, 1μg/mL de anticorpo monoclonal: anti-CD14 conjugado a FITC (Isotiocianato de Fluresceína), anti-CD40 conjugado a FITC, anti-CD83 conjugado a APC (aloficocianina), anti-CD86 conjugado a PE (ficoeritrina), anti-DC-LAMP conjugado a PE e anti-HLA-DR conjugado a PE (BD- Becton and Dickinson) diluídos em PBS-FACS (PBS com 1% de BSA). Ao término da incubação, as células foram lavadas e analisadas com citômetro de fluxo (FACS calibur, BD). Confirmando o fenótipo de células dendríticas (CD14⁻, CD40⁺, CD83⁺, CD86⁺, DC-LAMP⁺ e HLA-DR⁺) essas células foram plaqueadas e estimuladas com os antígenos.

4-Estimulação das culturas de PBMCs, monócitos e células dendríticas.

Nos ensaios de interação entre patógeno e célula hospedeira foram utilizadas suspensões de *M. leprae* irradiado, provenientes de camundongos nude ou tatu, gentilmente doados pelo Dr. Patrick Brennan (Departament of Microbiology, Immunology and Pathology, Colorado State University, Co, USA) ou Dr^a Maria Cristina Pessolani (Laboratório de Microbiologia Celular, Fundação Oswaldo Cruz- RJ); LPS (1μg/ml – Sigma Aldrich), IFN-γ (1ng/ml-

Sigma Aldrich) e 1-MT (1-metil-D, L-triptofano /30 minutos antes do estímulo, 200µM; Sigma Aldrich). As culturas celulares foram expostas à suspensão de *M. leprae* de forma a se obter multiplicidade de infecção igual a 2, 10 ou 50 e incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂ por períodos que variaram de 1 a 24 horas de cultura, para as PBMCs e 24 horas de cultura para os monócitos e células dendríticas derivadas de monócitos.

5-Marcação celular para avaliação por citometria de fluxo

Para a análise fenotípica dos macrófagos e das mDCs nas culturas, foi feita a análise por citometria de fluxo do percentual de células positivas e da média de intensidade de fluorescência (MIF) para CD14, HLA-DR, CD86, CD40, DC-LAMP, e CD83. Também foi feita uma marcação intracelular para avaliar a expressão de IDO. A análise foi realizada no citômetro Cyan (Dako Cytomation, EUA). Para a coleta dos dados, foi utilizado o programa Summit v4.3 (Dako Cytomation, EUA).

Para a marcação e posterior análise por citometria, as células que ficaram em cultura foram lavadas com PBS-FACS a 514 xg, por 10 minutos, a 15°C. A lavagem em PBS-FACS foi repetida. Após a lavagem, as células foram incubadas por mais 30 minutos, em gelo, com anticorpos monoclonais já mencionados marcados com FITC, PE, APC ou PE-Cy7, diluídos 100 vezes em PBS-FACS. Ao término da incubação, as células foram centrifugadas a 514 xg por 5 minutos e a 15°C, e fixadas com PFA 1%. As células foram lavadas com PBS-FCS e ressuspensas em 500µl de PBS-FACS e em seguida foi feita

a leitura em citômetro de fluxo. Para cada amostra, um mínimo de 10.000 células foram analisadas.

Para a marcação intracelular, após a marcação de superfície com anticorpo anti-CD14, as células foram ressuspensas em tampão fixação / permeabilização (eBioscience) por 30 minutos no gelo. Em seguida as células foram lavadas 2 vezes com tampão permeabilização (TP) e marcadas com anticorpo policlonal anti-IDO (Santa Cruz Biotechnology) por 1 hora a 4°C. Após esse período as células foram novamente lavadas 2 vezes com TP e incubadas com anticorpo secundário goat-anti-rabbit IgG alexa flúor 568 (Invitrogen Molecular Probes, EUA) por 30 minutos a 4°C e lavadas com PBS-FACS duas vezes e analisadas por citometria de fluxo.

6-Co-cultura de mDCs e linfócitos e marcação celular avaliada por citometria de fluxo.

Para avaliar o papel funcional de IDO nas células T, mDCs foram coletadas como já descrito e colocadas em cultura em placa de 96 poços (1×10^5). Em seguida, linfócitos foram colocados em co-cultura juntos com as mDCs na proporção de 1:1. Essas células foram estimuladas com *M. leprae* (MOI 2:1) e 1-MT por 24 horas de cultura. Após esse período de tempo, as células foram recolhidas, lavadas com PBS-FACS duas vezes e marcadas com anticorpo anti-CD4, -CD25 e -CTLA-4 por 30 minutos a 4°C, lavadas novamente com PBS-FACS e analisadas por citometria de fluxo.

7-Detecção de citocinas no soro e nos sobrenadantes das culturas por multiplex e ensaio imunoenzimático (ELISA)

Os sobrenadantes das culturas foram recolhidos após o período de incubação e congelados a -20°C . Para dosagem de citocinas nos sobrenadantes de cultura celular, foi utilizado o ensaio de detecção multiplex Luminex que consiste na detecção de várias citocinas em um mesmo poço utilizando microesferas de reatividades específicas para cada citocina. Cada microesfera possui uma mistura de dois fluorocromos que as diferenciam uma das outras. As microesferas são recobertas com anticorpos que se ligam a uma citocina específica. Um anticorpo marcado com ficoeritrina (PE) se liga ao complexo citocina-microesfera, determinando a quantidade de ligante no complexo. O protocolo utilizado na dosagem dos sobrenadantes de cultura foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (Milliplex™ MAP Human Cytokine Assay; Millipore). As citocinas avaliadas foram: IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), e TNF α . O IFN- γ e o TNF α foram detectados no soro pela técnica do ELISA de acordo com instruções do fabricante (R&D Systems, EUA).

8-Determinação da atividade de IDO por HPLC

Os sobrenadantes das culturas celulares estimuladas com *M. leprae*, IFN- γ e LPS, tratadas ou não com 1-MT e soro de pacientes foram avaliados por HPLC para determinação dos níveis de quinurenina e triptofano. Utilizando o ensaio de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), 165 μl da amostra

foi misturado com 5 µl de tirosina e 25 µl de TCA (ácido tricloroacético). Esta mistura foi centrifugada por 10 minutos a 15800 *xg*. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e foram injetados 50 µl na coluna de fase reversa C18. O espectrofotômetro foi calibrado em 365 e 285 nm, para detectar a produção de quinurenina e triptofano, respectivamente. A atividade de IDO foi avaliada através da razão da concentração de quinurenina sobre triptofano, conforme demonstrado anteriormente (121). Alternativamente, a atividade de IDO foi avaliada pela análise da concentração de quinurenina no soro.

9-RT-PCR e RT-PCR em tempo real

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

Síntese de cDNA: Em microtubos contendo cerca de 1µg de RNA, foi adicionado 1µl de oligo dT (invitrogen, MN, USA) e o volume final da reação foi elevado para 10µl, com H₂O livre de RNase. O tubo foi, então, incubado por 10min a 65°C. Em seguida, foram adicionados 1µl de RNAsin (40U/µL) (Applied Biosystems, CA, USA), 1µl de dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 0.2mM cada; Applied Biosystems), 4µl do tampão de transcrição 5X (Tris HCl 250mM, KCL 375mM, MgCl₂ 15mM), 2µl de ditioneitol (DTT 0.1M), e 1µl Super Script II RNase H- (200U/µL). A reação foi realizada a uma temperatura de 42°C por 1h, e em seguida, o tubo foi aquecido a 90°C por 10min. O volume

das amostras foi elevado para 80µL com água estéril e os tubos mantidos a - 20°C até uso posterior.

Foi utilizado o sistema Taqman de RT-PCR em tempo real com o ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) para contínuo monitoramento da fluorescência.

Para a reação de PCR, as amostras de cDNA foram utilizadas na quantidade de 50 ng por reação em um volume final de 25 µl (já contendo o cDNA). Foram adicionados em cada poço (ABI Prism optical plates, Applied Biosystems), 12,5 µl de 2X TaqMan Universal Master Mix (1X) [contendo AmpliTaq Gold 250U, AmpErase UNG, 10X Taqman Buffer A e dNTPs] e 1 µl 20x ensaio TaqMan contendo iniciadores e sondas específicas para as moléculas de interesse (*INDO*, $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, IL-10 e GAPDH). O material foi então amplificado em um total de quatro etapas: 1 ciclo a 50°C por 2 minutos, para a ativação da enzima AmpEraser UNG, 1 ciclo a 95°C por 10 minutos para a ativação da AmpliTaqGold DNA polimerase e 45 ciclos contendo etapas de desnaturação a 95°C por 15 segundos, seguidos pelas etapas de, anelamento e a extensão a 60°C por 1 minuto.

A variação nos níveis de expressão dos genes de interesse foi calculada a partir da variação entre os valores de Ct deste gene e do GAPDH (gene endógeno) (ΔCt). Os valores de ΔCt foram calculados segundo a fórmula abaixo, de modo a gerar resultados que refletem a expressão dos genes em relação à expressão do GAPDH:

ΔCt : (Ct gene de interesse – Ct GAPDH)

De posse dos valores de ΔCt foram calculados os valores de $2^{-\Delta Ct}$, a fim de se ter a noção exata de quantas vezes mais um transcrito está presente em relação ao outro. Os valores foram utilizados como expoente para a base 2 devido ao fato do crescimento ocorrer de forma exponencial nas reações de PCR (122).

10-Detecção de IDO por Western Blotting

Para verificar a expressão de IDO em monócitos de pacientes, $2,0 \times 10^6$ monócitos viáveis/mL foram estimulados com *M.leprae* (MOI 2:1, 10:1 e 50:1) e IFN- γ por 24 horas em estufa com 5% de CO₂.

Para a extração de proteínas totais, as células aderidas foram rinsadas 3 vezes com 1mL de PBS e mecanicamente dissociadas da placa de cultivo. As células foram centrifugadas a 100 *xg*, por 10 minutos a 4°C, para descarte do sobrenadante. Após nova centrifugação, as células foram ressuspensas em tampão de lise (Tris-HCl a 50mM, pH 7,5, EDTA a 5mM, EGTA a 10mM, NaF a 50mM, β -glicerofosfato a 20mM, NaCl a 250mM, Triton X-100 a 0,1% e coquetel de inibidores protease (Calbiochem, Alemanha)) e incubadas por 30 minutos a 4°C. Ao término da incubação, os lisados celulares foram centrifugados a 18.300 *xg*, por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi recolhido para posterior dosagem de proteínas pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

As proteínas presentes nos lisados celulares foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% (SDS-PAGE), como descrito por Laemmli (1970) (123). Para isso, 30 µg de proteína foram acrescidos de tampão de amostra (Tris-HCl a 50mM em pH 8, DTT a 100mM, SDS a 2%, azul de bromofenol a 0,01% e glicerol a 10%) e desnaturados a 100°C, por 5 minutos. Após corrida eletroforética a 100V, em tampão contendo Tris a 25 mM e glicina a 250 mM, foi realizada uma transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose (Amershan, NJ, USA) por corrente elétrica. A transferência para a membrana de nitrocelulose foi feita do catôdo para o ânodo, em tampão de transferência (Tris a 25 mM, glicina a 190 mM e metanol a 20%), a 5V e 264mA por 45 minutos em cuba semi-seca.

Após a transferência, as interações inespecíficas foram bloqueadas com aproximadamente 10 mL de tampão contendo Tris a 20mM, pH7,4, NaCl a 137mM e Tween a 0,1% (TBS-Tween) acrescido de leite desnatado a 5%, por 1 hora. Para verificar a presença de IDO, a membrana foi incubada com 1µg/mL de anticorpo policlonal anti-IDO (Santa Cruz Biotechnology, EUA) em TBS-Tween com 5% de leite desnatado, *overnight* a 4°C. Ao término da incubação, a membrana foi lavada três vezes com TBS-Tween, por 5 minutos, e então incubada, por 1 hora, com 10 mL de anticorpo secundário anti-IgG de coelho ligado a peroxidase (Dako) em TBS-Tween contendo 5% de leite desnatado. Finalmente, foram realizadas 4 lavagens de 5 minutos com TBS-Tween. Com exceção da incubação com o anticorpo primário, todas as outras etapas descritas acima foram realizadas à temperatura ambiente, sob agitação.

A detecção das bandas foi feita por quimioluminescência, utilizando o reagente Western Blotting Luminol (Santa Cruz). Para isso, partes iguais (500

μl de cada) das soluções fornecidas foram misturadas e aplicadas sobre a membrana, por 2 minutos. Em seguida, a membrana foi exposta a um filme de raio X (Kodak X-OMAT LS), por diversos períodos de tempo, e o filme foi revelado após imersão em solução reveladora e em solução fixadora.

11-Expressão de IDO e marcadores de superfície celular por Imunohistoquímica e imunofluorescência

11.1- Imunohistoquímica

A identificação das proteínas nas biópsias pacientes com hanseníase (LL, BT e RR) foi determinada através de imunoperoxidase utilizando anticorpo monoclonal anti- IDO (Santa Cruz Biotechnology, EUA), CD86, CD11c, HLA-DR e CD68 (B&D Biosciences, EUA). Os cortes do criostato foram fixados, permeabilizados e bloqueados antes da incubação com o anticorpo monoclonal numa diluição de 1:50 ou 1:25. Em seguida, os cortes foram incubadas com anticorpo secundário biotinilado. Os anticorpos foram visualizados com o sistema ABC (laboratórios do vetor, Burlingame, CA), que usa o conjugado avidina e biotina-peroxidase para a amplificação do sinal.

11.2- Imunofluorescência

A identificação de proteínas nas biópsias de hanseníase foi determinada através de anticorpos monoclonais anti- IDO, CD86 e CD68. Os cortes foram fixados, permeabilizados e bloqueados antes da incubação com o anticorpo monoclonal numa diluição de 1:50. Em seguida, as secções foram incubadas com anticorpo secundário Alexa 488 (verde) ou Alexa 568 (vermelho). As marcações foram visualizadas através do Microscópio Confocal Zeiss LSM 510 META Microscopy (Heidelberg, DEU).

12-Análise estatística

Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão (SEM). Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas com os testes Mann-Whitney, Kruskal Wallis ou Wilcoxon. Os valores com p-valor $\leq 0,05$ foram considerados significativos.

Resultados

1- Análise da expressão de IDO em lesões de pele de pacientes com hanseníase.

No intuito de investigar o fenótipo das células presentes na lesão, alguns marcadores de superfície celular foram estudados (S100, CD86, CD11c, HLA-DR), bem como a expressão de IDO intracelular. Cortes de pele de pacientes LL, BT e RR foram feitos e analisados por imunohistoquímica e imunofluorescência.

Nas biópsias de pele de pacientes BT, foi observada a presença de um granuloma bem característico, constituído de células epitelióides, com linfócitos ao redor do granuloma (Figura 4A), já a lesão do paciente LL, apresentava um infiltrado de macrófagos e linfócitos dispersos separados da epiderme pela zona clara (Figura 4B). Observamos a expressão de IDO por imunohistoquímica em lesões de pele de pacientes BT (n=7), LL (n=14), e RR (n=4). O número de células IDO⁺ foi maior nas lesões de pacientes LL (>50%; figura 4D) quando comparado com cortes de pele de pacientes BT (<5%; figura 4C), onde poucas células IDO⁺ foram identificadas na periferia do granuloma (Figura 4C). Nos pacientes LL, a maioria das células presentes no infiltrado celular eram IDO⁺. Também foi observado na derme, células com morfologia de células dendríticas. Nas lesões de pacientes RR, poucas células IDO⁺ foram observadas no granuloma, semelhante ao observado nas lesões de pacientes BT (Figura 4J).

No intuito de caracterizar o fenótipo das células IDO⁺, foram realizadas marcações para: S100, CD86, CD11c e HLA-DR. Quase todas as células

presentes no infiltrado inflamatório de pacientes LL que foram IDO⁺, foram também CD86⁺, CD11c⁺, HLA-DR⁺ (Figura 4F, H e I, respectivamente) e CD68⁺ (dado não mostrado). Na lesão de BT foram observadas células CD86⁺ (Figura 4E) e células CD11c⁺ (Figura 4G) no centro do granuloma, rodeadas por um manto de linfócitos, sendo ambas IDO⁻ (Figura 4C).

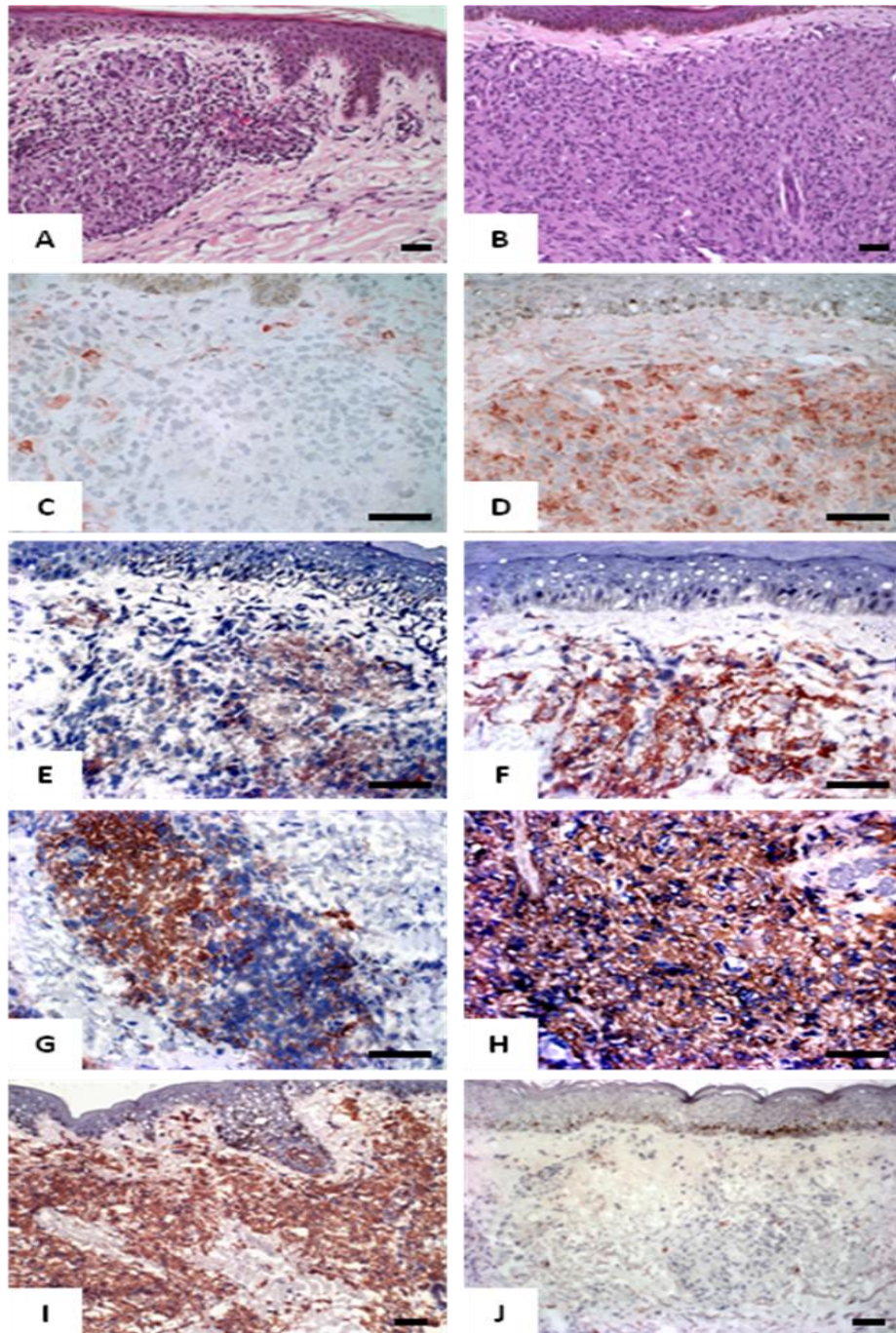


Figura 4: Expressão de IDO e fenótipo celular em lesões de pele de pacientes com hanseníase. Lesão de paciente tuberculóide (BT) é caracterizada pela presença de um granuloma (A) e lesão de paciente lepromatoso (LL) é caracterizada por um infiltrado de macrófagos e linfócitos dispersos separados da epiderme pela zona clara (B). No BT, foram detectadas poucas células IDO⁺ em volta do granuloma (C). No LL, foi detectada uma maior quantidade células IDO⁺ no infiltrado inflamatório (D). Algumas células CD86⁺ foram observadas no interior do granuloma em lesões de pele de paciente tuberculóide (E). No LL, a expressão de CD86 foi detectada na maioria das células do infiltrado inflamatório (F). Nas lesões de BT a expressão de CD11c é detectada principalmente dentro do granuloma (G) e na lesão de LL, a expressão de CD11c e HLA-DR foi observada no infiltrado inflamatório (H, I, respectivamente). Similar às lesões de BT, poucas células IDO⁺ foram detectadas nas lesões de RR (J). Esta figura é representativa de 7 amostras de BT, 14 amostras de LL e 4 amostras de RR. (A-B) Marcação com Hematoxilina e eosina usada como rotina no diagnóstico da doença. (C-J) Imunoperoxidase. Escala da barra = 50 μm. Todas as imagens foram obtidas por Nikon E400 Eclipse e processadas pelo software Image ProPlus.

A co-localização confirmou que a maior parte das células IDO⁺ eram CD68⁺ (cerca de 70%) (Figura 5A – a). Entretanto, nem todas as células que foram CD86⁺, foram IDO⁺ (cerca de 68%) (Figura 5A – b). Também foram observadas células com aparência de células dendríticas com CD86 na membrana celular e IDO no citoplasma (flecha, figura 5A – b).

Para confirmar o aumento da expressão de IDO em biópsias de pele de pacientes LL observado por imunohistoquímica, nós avaliamos a expressão de IDO em biópsias de pacientes LL (n=2) e BT (n=2) por Western Blotting. Como observado por densitometria (IDO / Tubulina) houve um aumento da expressão de IDO nos pacientes LL quando comparado com os cortes de pele de pacientes BT.

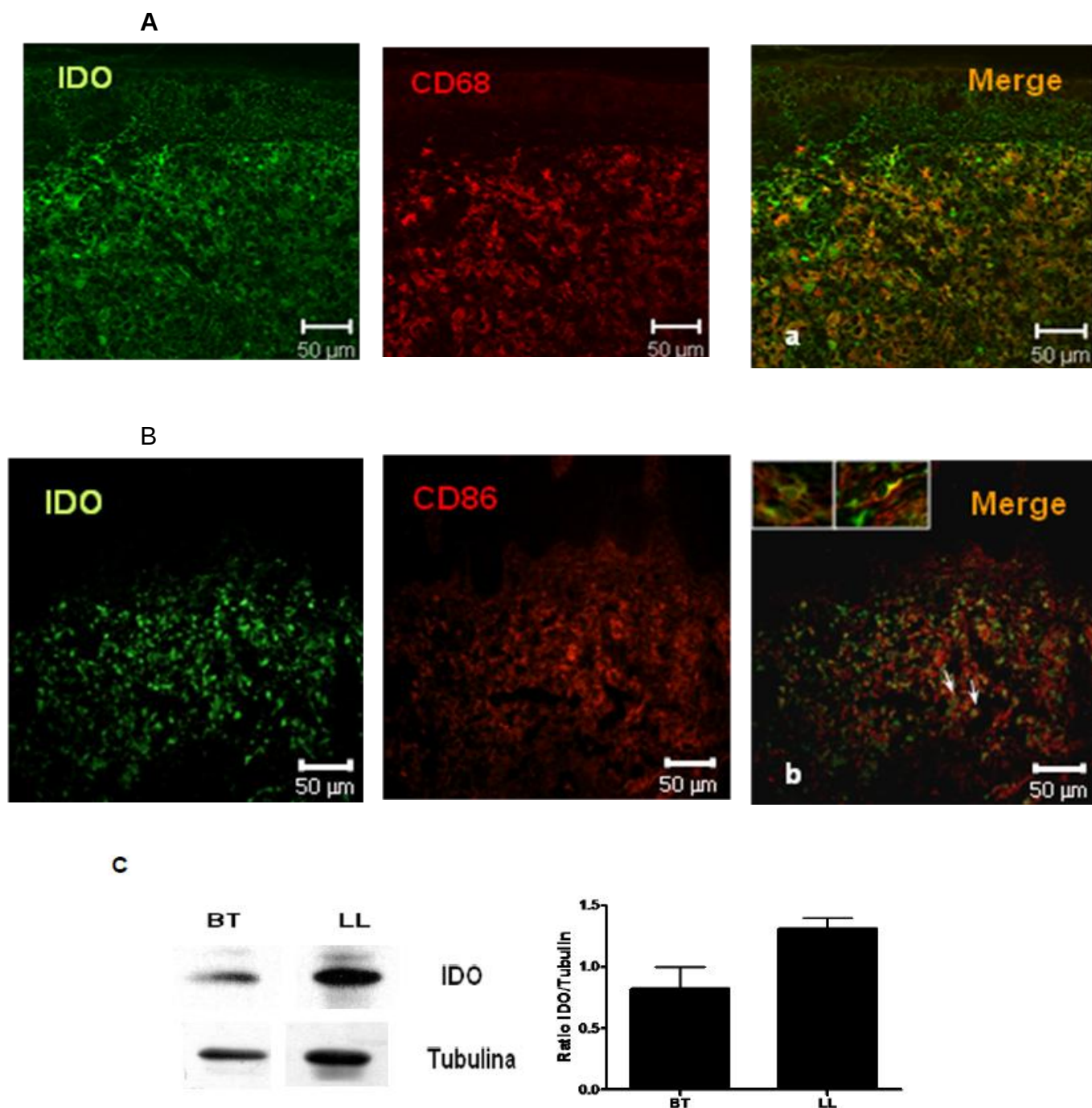


Figura 5: Expressão de IDO em lesões de pele de pacientes lepromatosos por imunofluorescência e imunoblotting. (A) Por imunofluorescência foi observado que a maioria das células IDO⁺ colocalizam com os macrófagos no infiltrado inflamatório (células CD68⁺). Algumas células CD86⁺ e IDO⁺ exibem a morfologia de células dendríticas (setas, b). Foi feita dupla marcação de IDO (verde, Alexa Fluor 488®) seguida por marcação com anticorpos Alexa Fluor 568®- (A) CD68 e (B) CD86 (vermelho). Células duplamente positivas estão em laranja ou amarelo (setas). Células com morfologia de células dendríticas onde IDO está no citoplasma e CD86 na membrana. Fotografia de marcações simples de IDO, CD68 e CD86 também são mostradas. Esta figura é representativa de 3 amostras de LL. As imagens foram visualizadas através do Microscópio Confocal Zeiss LSM 510 META. Escala das barras = 50 μm. (B) Extrato protéico total de lesões de pele (LL, n=2; BT, n=2) foram analisadas por imunoblotting usando um anticorpo contra IDO ou Tubulina. A densitometria mostra a razão IDO/Tubulina.

2- Análise da expressão gênica de IDO, IFN- γ , TNF α e IL-10 em biópsias de pele de pacientes com hanseníase.

Para investigar a expressão gênica de IDO em biópsias de pele de pacientes com as duas formas polares da hanseníase, foi realizado o PCR em tempo real. Foi observado um aumento modesto da expressão de IDO em lesões de pele de pacientes LL (média do número de cópias relativas: $0,51 \pm 0,25$) quando comparados com pacientes BT ($0,21 \pm 0,05$) (Figura 6A). Sabendo-se que as citocinas IFN- γ e TNF α são fortes indutores de IDO (124), a expressão gênica dessas citocinas foi avaliada em biópsias de pele. Não foi observado diferença na expressão gênica de IFN- γ (Figura 6B) e TNF α (Figura 6C) entre os pacientes LL e BT em contraste com alta expressão de IL-10 nos cortes de pele de pacientes LL (n=11) quando comparados com BT (n=10) (média do número de cópias relativas de LL: $0,44 \pm 0,14$ e BT: $0,015 \pm 0,005$) (Fig 6D).

Cortes de pele de pacientes com RR apresentaram um aumento das três citocinas avaliadas: IFN- γ , TNF α e IL-10 quando comparados aos cortes de lesão de pacientes não reacionais. Este dado corrobora com resultados anteriores obtidos do nosso laboratório (125) em que foram observadas as citocinas: IFN- γ , IL-6, IL-10, IL-12p40 e TNF α durante os episódios reacionais em todos os pacientes testados.

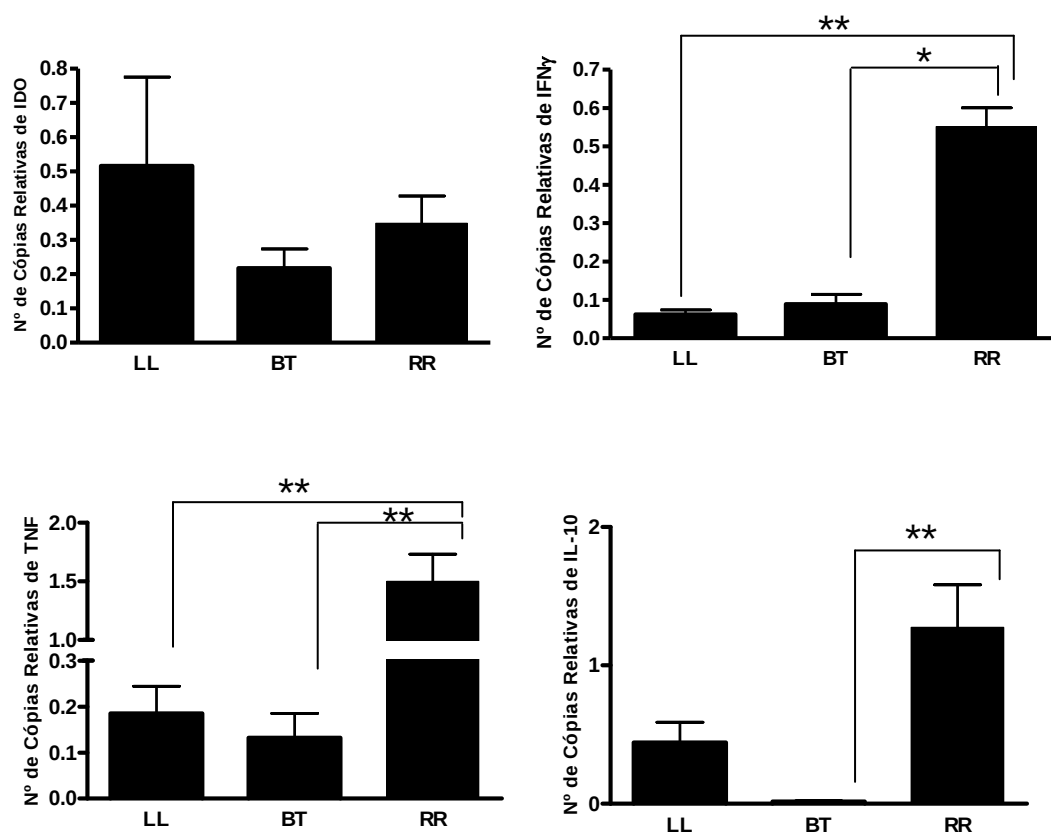


Figura 6: Expressão gênica de IDO, IFN- γ , TNF α e IL-10 em biópsias de pele de pacientes com hanseníase. A expressão de IDO (A), IFN- γ (B), TNF α (C) e IL-10 (D) de biópsias de pele de pacientes LL (lepromatoso, n=11), BT (Boderline tuberculóide, n=10) e RR (Reação reversa, n=5) foi determinada por RT-PCR em tempo real. Os resultados representam médias e erros padrões de quatro experimentos independentes. O teste t Mann-Whitney foi usado para análise estatística. (**) para valor de $p < 0.01$.

3- Análise da atividade de IDO e presença de IFN- γ e TNF α em soro de indivíduos saudáveis e soro de pacientes com hanseníase.

A análise da atividade de IDO no soro reflete o estado sistêmico do paciente e pode ajudar na compreensão das diferenças observadas nos dois pólos da doença. Nesse contexto, a atividade de IDO foi avaliada por HPLC através da razão da concentração de quinurenina sob o triptofano, bem como,

pela concentração de quinurenina. Os dados mostram um aumento na atividade de IDO no soro de pacientes LL nas duas formas de análise (Fig 7A e 7B): a razão entre quinurenina e triptofano (LL: $0,09 \pm 0,008$; n=10 e BT: $0,051 \pm 0,008$, p=0,002; n=9) e a concentração de quinurenina (LL: $1,4 \pm 0,07$; n=10 e BT: $0,82 \pm 0,16$, p<0,0001; n=9); indicando que a atividade de IDO pode ser um importante marcador para avaliar as diferenças na imunidade celular nos dois pólos da doença. Apesar de termos observado expressão de IDO em biópsias de RR, foi detectada baixa atividade de IDO em soro de pacientes RR, comparando com outros grupos de pacientes testados e com soro de indivíduo normal (HC: $0,76 \pm 0,19$ e RR: $0,17 \pm 0,12$, p=0.053; BT: $0,82 \pm 0,16$ e RR: $0,17 \pm 0,12$, p=0.022; LL: $1,4 \pm 0,07$ e RR: $0,17 \pm 0,12$ p<0.0001).

No intuito de se entender os mecanismos envolvidos na variação da atividade de IDO observada nas diferentes formas clínicas da doença, o perfil de citocinas pró-inflamatórias foi observado no soro desses pacientes. Foi observado um aumento dos níveis de IFN- γ no soro de pacientes BTs quando comparado com controles saudáveis e RR (HC: $24,63 \pm 1,36$ e BT: $66,86 \pm 19,10$, p=0.0012) (BT: $66,86 \pm 19,10$ e RR: $25,68 \pm 2,80$, p=0,0093). Não foi observada diferença significativa entre os níveis séricos de IFN- γ em LL e BT. Altos níveis de TNF α foram observados em pacientes LLs, quando comparados aos pacientes BT (Fig. 7D). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os níveis de IFN- γ e TNF α no soro de RR e controles saudáveis. Embora tenha sido observado aumento na expressão gênica de IFN- γ e TNF α em biópsias de pacientes com RR, no soro esse aumento não foi observado quando comparado com pacientes não reacionais.

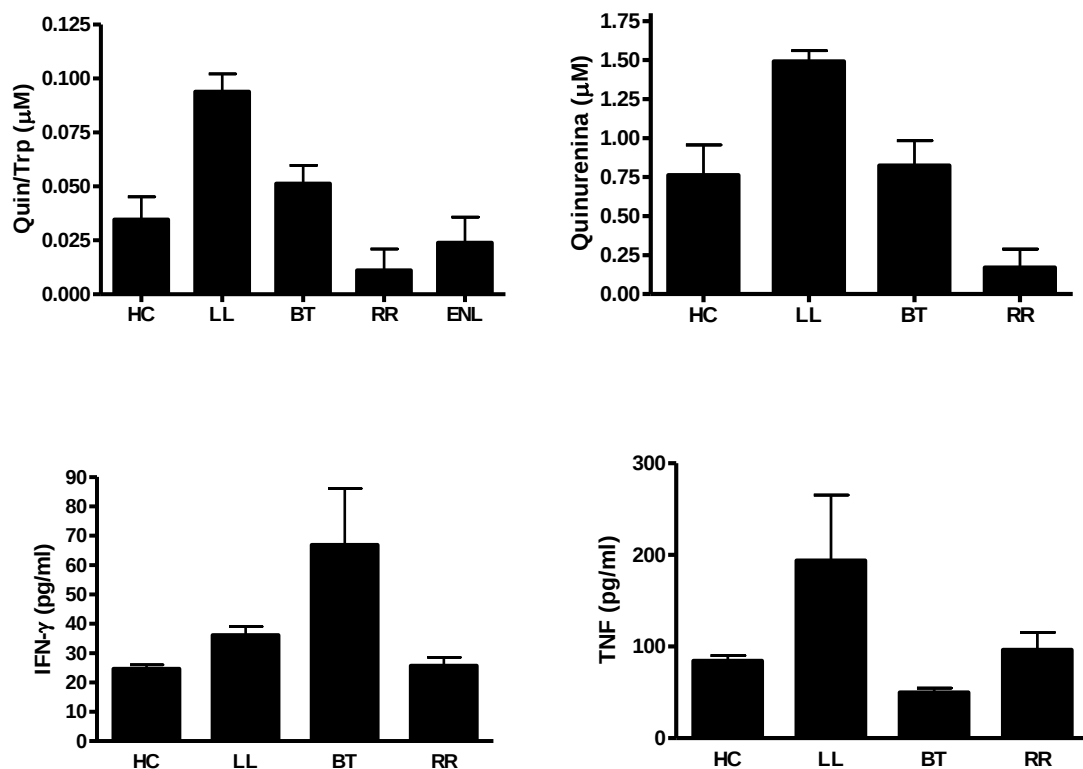


Figura 7: Atividade de IDO e detecção de IFN- γ e TNF α no soro de indivíduos saudáveis, pacientes lepromatosos, tuberculóides e com reação reversa. (A) Atividade de IDO através da razão da concentração da quinurenina sob o triptofano de soro medida por HPLC. (B) Atividade de IDO medida através da concentração de quinurenina por HPLC. (C e D) Secreção de IFN- γ e TNF α avaliados por ELISA. Os gráficos representam as médias e os erros padrões da atividade de IDO medida por HPLC e detecção de IFN- γ e TNF α por ELISA de HC (controle saudável, n=10), LL (Lepromatoso, n=10), BT (Boderline tuberculóide, n=9) e RR (Reação reversa, n=10). Resultados é representado pela média e o erro padrão de 4 experimentos independentes. O teste usado para a análise estatística foi o Kruskal Wallis / Dunn's Multiple Comparasion. *p<0.05, **p< 0.01 e ***p<0.001.

4- Estudo da expressão de IDO em PBMCs de indivíduos saudáveis após estimulação com *M. leprae*.

Após observar a expressão de IDO nas células da pele e a atividade de IDO no soro, resolvemos avaliar se o *M. leprae* induz a expressão gênica de IDO *in vitro*. Para tal, as PBMCs de indivíduos saudáveis foram estimuladas com *M. leprae* no MOI de 2:1 (bacilo : célula) por 1, 3, 6, 12 e 24 horas. Como

observado na figura 8 o tratamento com o *M. leprae* induziu um aumento significativo na expressão gênica de IDO após 12 horas de cultura, mantendo a expressão gênica elevada após esse período. Em outro experimento foi observado que o *M. leprae* aumenta a atividade de IDO em PBMCs de indivíduos saudáveis e de pacientes LL. Além disso, a atividade de IDO é reduzida na presença do 1-MT (dado não mostrado).

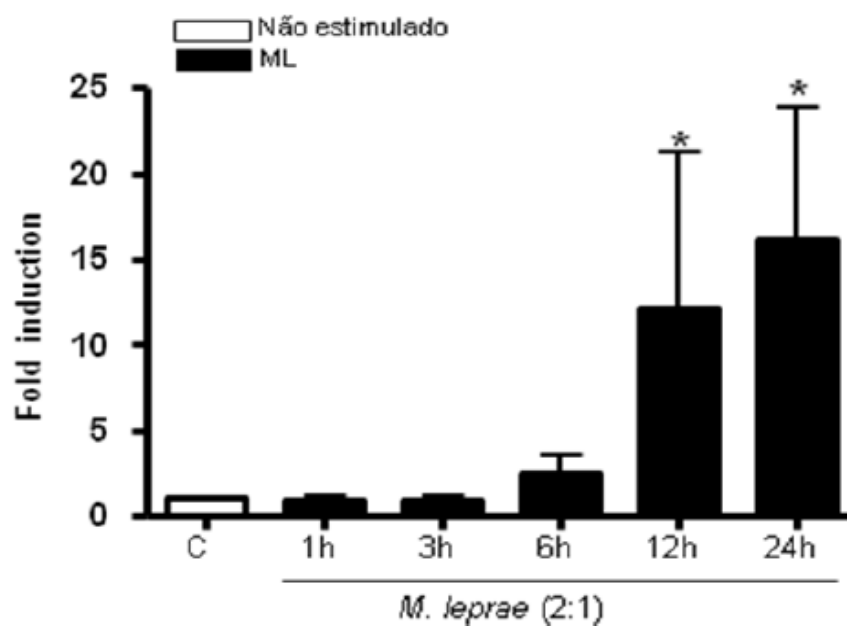


Figura 8: O *M. leprae* induz a expressão de IDO em PBMCs de indivíduos saudáveis. PBMCs foram estimuladas com *M.leprae* (MOI de 2:1) por diversos períodos de tempo (1, 3, 6, 12 e 24h) e foram comparados com as células não estimuladas. A expressão gênica da IDO nessas culturas foi avaliada por PCR em tempo real. O gráfico mostra a média e os erros padrões de 5 experimentos independentes realizados. O teste utilizado para a análise estatística foi Wilcoxon * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$.

5- Análise da participação de IFN- γ e *M. leprae* na expressão e atividade de IDO em monócitos de indivíduos saudáveis e de pacientes lepromatosos.

Sabendo-se que os monócitos, macrófagos e as células dendríticas são as principais células produtoras de IDO (127), foi avaliado se o *M. leprae* induz a expressão e a atividade de IDO em monócitos de indivíduos saudáveis e de pacientes com a forma clínica lepromatosa. Além disso, nós também tratamos essas células com IFN- γ para avaliar o papel dessa citocina na expressão e atividade de IDO. Para avaliar a expressão de IDO, as PBMCs de voluntários saudáveis e pacientes LL foram recolhidas e as células CD14⁺ foram separadas por *beads* magnéticas como descrito no material e métodos.

A separação magnética de monócito foi avaliada por citometria de fluxo resultando em células com as seguintes características: aproximadamente 96 $\pm$ 0,14% eram CD14⁺; 86,44 $\pm$ 4,1% HLA-DR⁺; 87,67 $\pm$ 9,8% CD86⁺; 4,8 $\pm$ 1,5% CD40⁺ e 3,3 $\pm$ 0,62% CD206⁺. A redução no percentual de células CD14⁺ induzido por *M. leprae* foi proporcional ao MOI usado. O elevado MOI de 50:1 induziu uma maior redução no percentual de células CD14⁺, com menos de 20% das células expressando CD14. Somente com um MOI intermediário (10:1) foi observada a modulação na expressão de moléculas de superfície. O *M. leprae* no MOI de 10:1 aumentou significativamente a expressão de CD40, CD86 e CD206 quando comparado às culturas não estimuladas (dados não mostrados).

Essas células ficaram em cultura por 24 horas na presença de *M. leprae* (MOI de 10:1 e 50:1), 1-MT e IFN- γ sozinhos e em alguns poços esses três

estímulos juntos. As células foram recolhidas e avaliadas por citometria de fluxo e os sobrenadantes analisados por HPLC.

O percentual de CD14⁺ IDO⁺ foi similar nos monócitos de indivíduos saudáveis e de pacientes LL (Fig. 9A-B). O *M. leprae* também foi capaz de aumentar IDO em ambas as culturas. Em ambas as culturas o *M. leprae* foi mais potente na indução de IDO no MOI 10:1, quando comparado com as outras concentrações de *M. leprae* (Fig. 9A-B). A atividade de IDO em monócitos de indivíduos saudáveis foi aumentada com *M. leprae* MOI 2:1. Nos monócitos de pacientes houve aumento da atividade de IDO nas células estimuladas com *M. leprae* MOI 10:1. A análise por western blotting mostrou que o *M. leprae* aumenta a expressão de IDO em monócitos de pacientes LL, em todos os MOIs testados (Fig. 9C). Em monócitos de indivíduos saudáveis o estímulo com IFN- γ aumentou a atividade e a expressão da proteína (Fig. 9A). Ao contrário, nos monócitos de pacientes LL o IFN- γ aumentou o percentual de células IDO⁺ mas não aumentou a atividade de IDO (Fig. 9B).

Em monócitos de indivíduos saudáveis um efeito sinérgico foi observado na expressão de IDO quando as células foram estimuladas com IFN- γ na presença de *M. leprae* para alto MOI 50:1 (Fig. 9D). Nos monócitos de pacientes LL, o efeito sinérgico foi observado nas células estimuladas com IFN- γ na presença do *M. leprae* MOI 2:1 (Fig. 9E). A expressão de IDO nas células estimuladas com IFN- γ e *M. leprae* foi reduzida na presença de 1-MT (Fig. 9D-E).

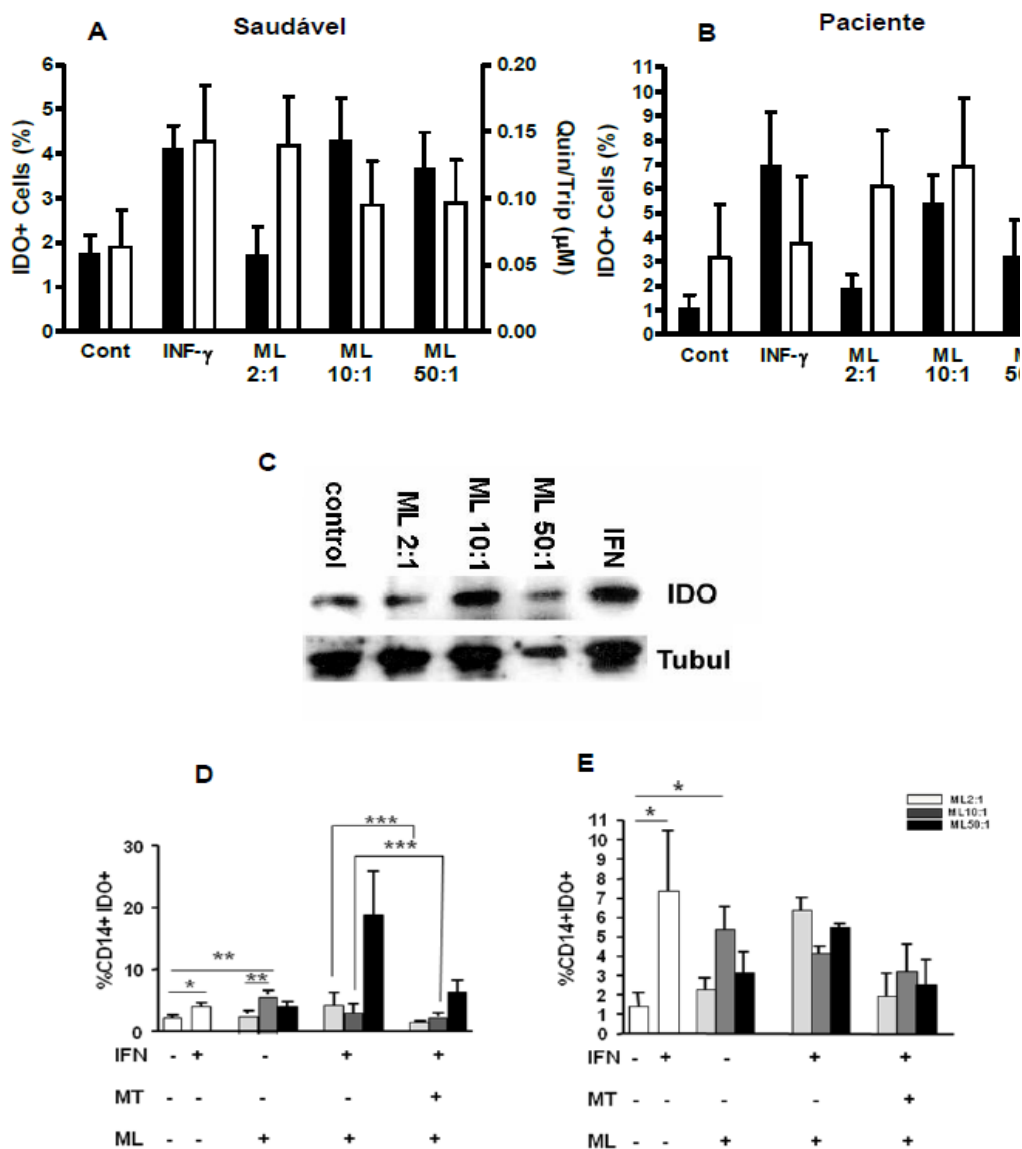


Figura 9: Expressão de IDO em monócitos estimulados com *M. leprae* em diferentes multiplicidades de infecção. Monócitos de pacientes LL (n=5) e indivíduos saudáveis (n=4) foram estimulados com *M. leprae* (MOI de 2:1, 10:1 e 50:1) por 24h. Além disso, monócitos foram estimulados com IFN-γ (10ng/ml). (A-B) A relação entre a expressão de IDO, observada por citometria de fluxo (barra preta), e a atividade de IDO, avaliada pela razão de quinurenina/ triptofano por HPLC (barra branca). (A) Controle e (B) pacientes LL. *p<0.05 em relação as culturas não estimuladas (controle). (C) Lisados celulares de monócitos de pacientes LL foram estimulados com *M. leprae* ou IFN-γ e foram analisados imunoblotting com anticorpo contra IDO ou Tubulina (foto representativa de 3 experimentos) (D-E) O percentual de células IDO⁺ nas células estimuladas com *M. leprae* e IFN-γ. (D) monócitos de indivíduo saudável e (E) monócitos de pacientes LL. O teste utilizado foi o Mann-Whitney t test, com *p<0.05, **p<0.01, e ***p<0.001.

6- Avaliação da participação de citocinas na indução de IDO por *M. leprae*.

Para avaliar as moléculas envolvidas no aumento da expressão de IDO, níveis das diferentes citocinas nos sobrenadantes de monócitos de voluntários saudáveis estimulados com *M. leprae* foram avaliados. Não foram observadas alterações significativas no perfil de citocinas nas culturas estimuladas com *M. leprae* quando comparadas com as culturas não estimuladas.

Nos monócitos de pacientes LL, estimulados com *M. leprae*, o IFN- γ foi capaz de aumentar a secreção de IL-12p70 e de TGF- β , o que demonstra que o IFN- γ nessas células induz a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias. A produção de TNF α foi aumentada quando as células foram estimuladas com baixo MOI. Já o *M. leprae* nos MOIs 10:1 e 50:1 induziu um aumento na produção de IL-12p70 em monócitos de pacientes LL (Fig. 10A-B). Em conjunto, a produção de IL-1 β foi aumentada somente após o estímulo com alto MOI (50:1) de *M. leprae* (Fig. 10C). Foi observada uma redução dos níveis de TGF- β e IL-12p40 secretados nos sobrenadantes estimulados com *M. leprae*. Esses resultados demonstram que o *M. leprae* pode modular a resposta imune nos monócitos de pacientes de forma diferenciada, dependendo da carga bacilar. Assim, o *M. leprae* pode direcionar a resposta imune e induzir uma resposta pró-inflamatória ou anti-inflamatória e ativar IDO. De modo geral, o *M. leprae* levou ao aumento da indução de TNF, IL-12p70 e IL-1 β e redução da expressão de TGF- β e IL-12p40. Estes resultados sugerem que a anergia antígeno-específica em pacientes LL é resultado de vários fatores como a carga bacilar, o balanço entre as citocinas pró e anti-inflamatórias e a expressão de IDO.

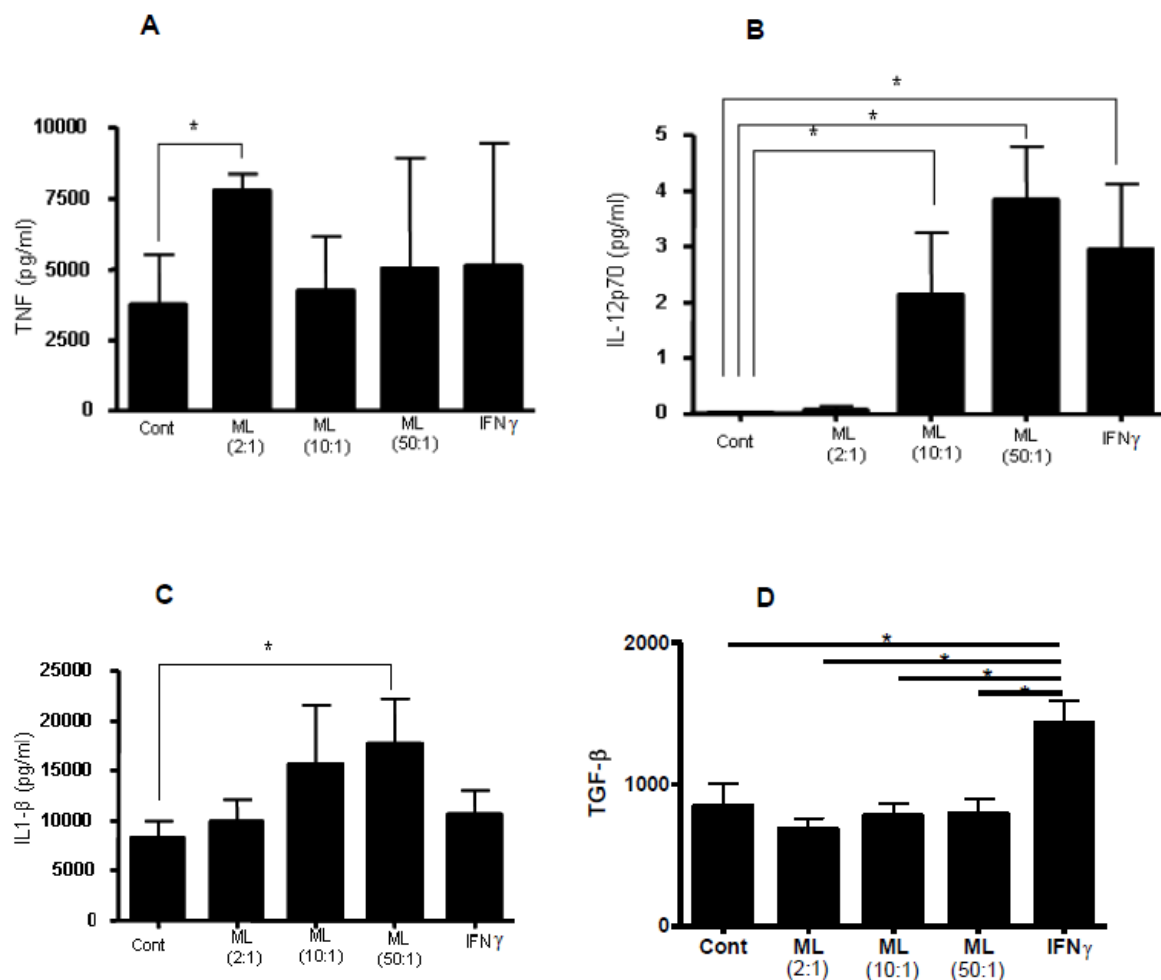


Figura 10: Produção de citocinas em monócitos de pacientes LL estimulados com diferentes concentrações de *M. leprae*. Monócitos de pacientes LL foram estimulados com *M. leprae* (MOI 2:1, 10:1 e 50:1). O sobrenadante dessas culturas foi coletado após 24 horas de cultura e a produção de citocinas foi avaliada por multiplex. Os gráficos representam os resultados para cada citocina. (A) TNF, (B) IL-12p70, (C) IL1- β , (D) TGF- β . O gráfico mostra a média e os erros padrões de 3 experimentos independentes feitos em duplicata. O teste utilizado foi o teste t Mann-Whitney para a análise estatística. *p<0.05.

7- Análise de marcadores de superfície celular e atividade de IDO induzidos por *M. leprae* nas células dendríticas de voluntários saudáveis.

Além dos macrófagos, as células dendríticas são as principais células produtoras de IDO. Desse modo, a indução de IDO em mDCs estimuladas com *M. leprae* foi avaliada. Após 24 h de cultura na presença ou não de *M. leprae* os marcadores de superfície foram estudados. Em paralelo, foi avaliada a atividade de IDO nos sobrenadantes. Como observado na Figura 11 A-J, o *M. leprae* não foi capaz de modular o percentual de células positivas e a intensidade de fluorescência de CD40, CD83, CD86, DC-LAMP e HLA-DR. Esses dados corroboram com os resultados obtidos por Murray e colaboradores (2007) (29) que observaram, através de marcadores de superfície e secreção de citocinas, que o *M. leprae* não induzia maturação das células dendríticas.

Foi observado um aumento significativo da atividade de IDO nas mDCs estimuladas com *M. leprae* (MOI 2:1) quando comparado com as células não estimuladas. Além disso, o inibidor de IDO (1-MT) reduziu a atividade de IDO induzida pelo *M. leprae* (Figura 11L).

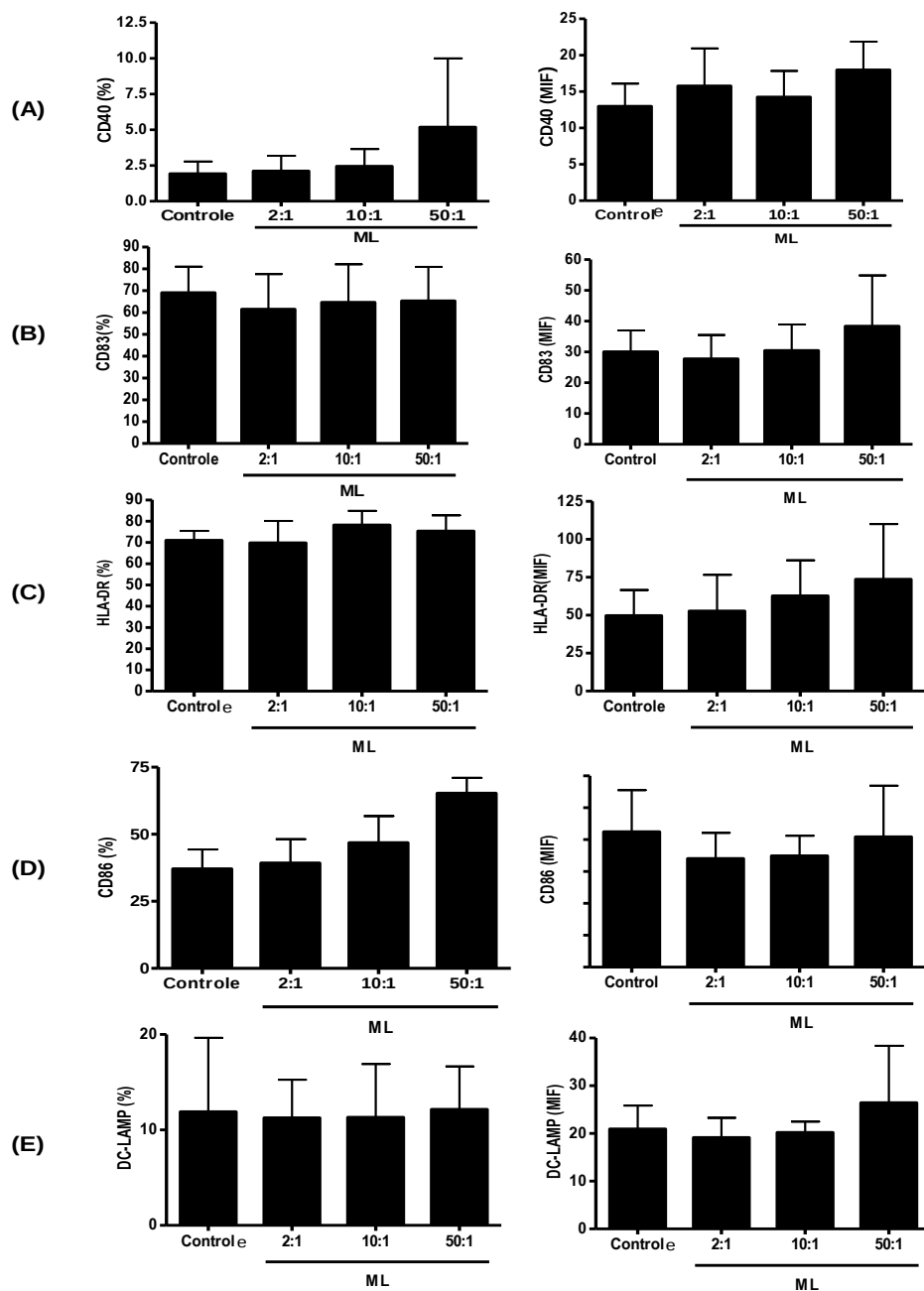


Figura 11- Análise da expressão de moléculas de superfície e atividade de IDO em DCs derivadas de monócitos de indivíduos saudáveis estimuladas com *M. leprae* (MOI 2:1, 10:1 e 50:1). Dcs derivadas de monócitos foram estimuladas com ML (MOI 2:1, 10:1 e 50:1), após 24 horas de culturas essas células foram coletadas e marcadas com anticorpos específicos para cada molécula de superfície e avaliado por citometria de fluxo. Os gráficos da esquerda representam o percentual de células positivas para cada molécula e o da direita a intensidade de fluorescência. (A) CD40, (B) CD83, (C) HLA-DR, (D) CD86, (E) DC-LAMP.

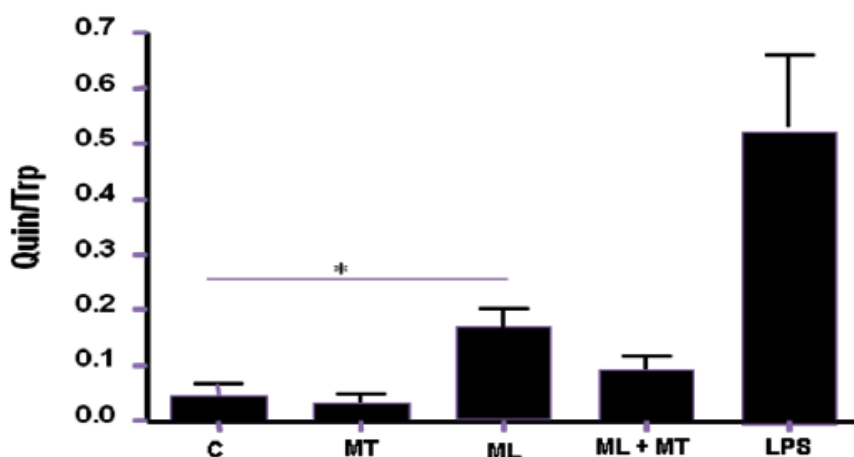


Figura 12 – Análise da produção de IDO em DCs derivadas de monócitos de indivíduos saudáveis estimuladas com *M. leprae* (MOI 2:1). Os sobrenadantes foram coletados e a atividade de IDO foi avaliada por HPLC nas culturas estimuladas com ML(2:1). O gráfico representa as médias e os erros padrões de 5 experimentos realizados. O teste utilizado foi o teste t Mann-Whitney para a análise estatística. *p<0.05.

8- Análise da secreção de citocinas em culturas de mDCs de indivíduos saudáveis estimuladas com *M. leprae*.

Além da atividade de IDO e expressão de alguns marcadores de superfície, nós nos propusemos a avaliar o perfil de citocinas em culturas de células dendríticas estimuladas com *M. leprae* (MOI 2:1 e 10:1) na presença ou não do inibidor de IDO (1-MT) por 24 horas de cultura.

O *M. leprae* (MOI 10:1) aumentou de forma significativa os níveis de IL-10 e IL-12p40 em mDCs de indivíduos saudáveis. Não foi observado modulação de IL1 β , TGF- β e TNF quando as mDCs estimuladas com *M. leprae* foram comparadas com as células não estimuladas.

Quando foi adicionado o inibidor de IDO (1-MT) foi observado o aumento da IL-12p40 nas DCs estimuladas com ML (MOI 10:1) e aumento da IL-10 e TGF- β nas DCs estimuladas com *M. leprae* (MOI 2:1).

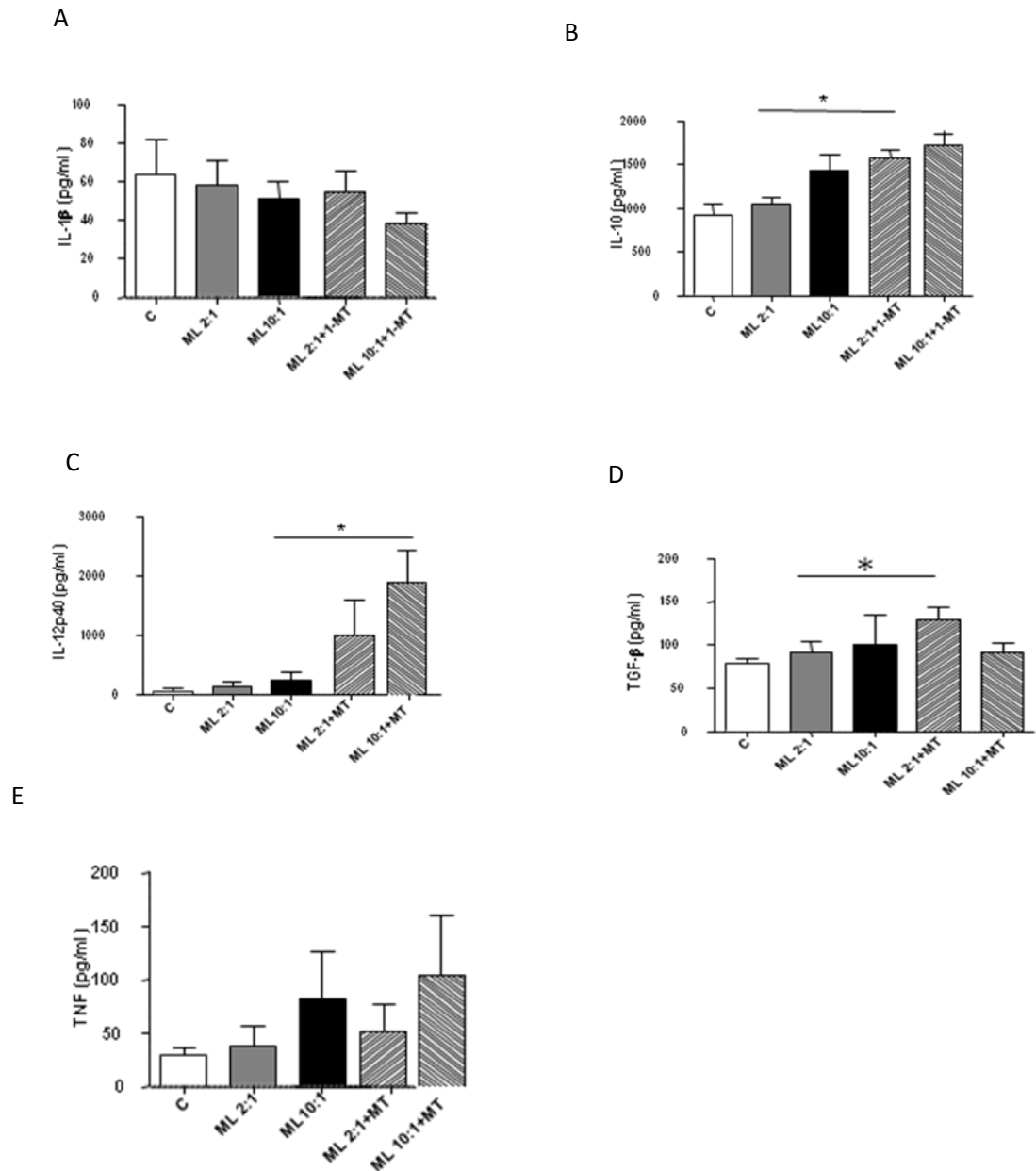


Figura 13: Análise da secreção de citocinas em DCs derivadas de monócitos em indivíduos saudáveis em presença de ML e do inibidor de IDO. DCs derivadas de monócitos foram estimuladas com ML(MOI 2:1, 10:1 e 50:1), por 24 horas de cultura. O sobrenadante dessas culturas foi coletado e avaliado por ELISA. Secreção de (A) IL-1 β , (B) IL-10, (C) IL-12, (D) TGF- β e (E) TNF α . O gráfico representa as médias e os erros padrões (n=4). O teste utilizado foi o teste t Mann Whitney para a análise estatística. *p<0.05.

9- Análise do perfil regulatório das células T em co-cultura com as mDCs de pacientes lepromatosos.

Para investigar o fenótipo celular induzido por *M. leprae*, mDCs foram cultivadas em cultura com linfócitos T CD4⁺ purificados por *beads* magnéticas na proporção 1:1, estimuladas por 24 horas e avaliadas por citometria de fluxo. Foi observado um aumento no percentual de células CD4⁺CD25⁺CTLA4⁺ nas células estimuladas com *M. leprae* (MOI 2:1) (C: 5.05 ± 3,8 e ML: 21,71 ± 7,14; n=4). A presença do 1-MT reduziu de forma significativa o percentual de células T com perfil supressor (ML: 21,71 ± 7,14 e ML+MT: 5,58 ± 1,29; n=4). Curiosamente, apesar do aumento observado na população positiva para CTLA-4, não foi observada diferença significativa na população FoxP3⁺ entre os grupos estudados após 24 horas de cultura, bem como nos índices de proliferação avaliados pela análise da incorporação de ³H-timidina após 5 dias de cultura (dados não mostrados).

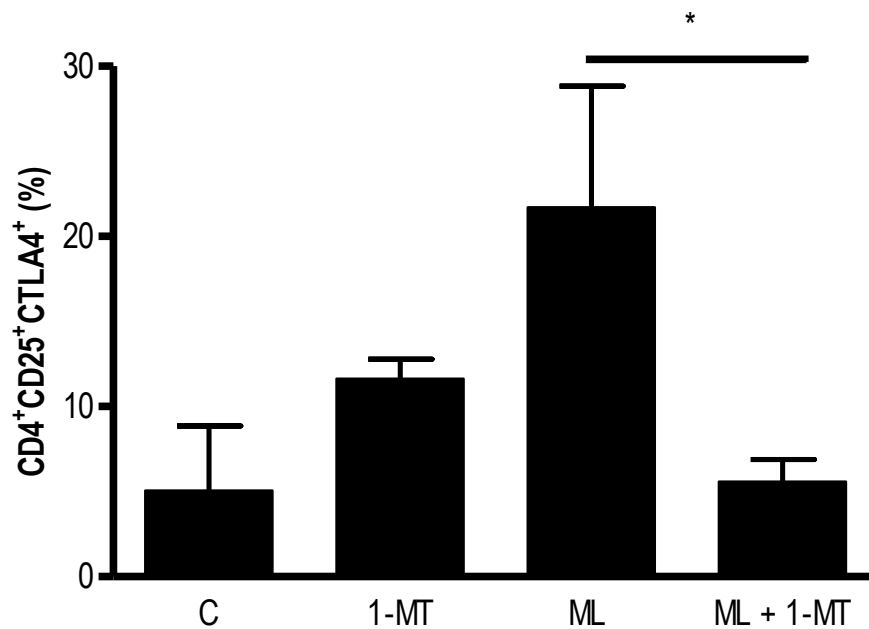


Figura 14: Expressão de marcadores de célula T regulatória em co-cultura de mDCs e linfócitos de pacientes lepromatosos. A expressão de CD4⁺CD25⁺CTLA4⁺ em co-cultura de mDCs + linfócitos (1:1; 24h), foi determinada por citometria de fluxo. Os resultados representam médias e erros padrões de quatro experimentos independentes.

Discussão

Durante este estudo investigamos um novo mecanismo fisiopatológico ainda não previamente abordado com o intuito de esclarecer a baixa ou ausente resposta imune celular ao *M. leprae* em indivíduos com hanseníase. Relatos genéticos anteriores tentam explicar a polaridade da resposta imune que oscila da alta resposta nos pacientes tuberculoides em oposição aos lepromatosos. Entretanto, até o momento, os estudos apontam em geral para a associação de marcadores genéticos e à hanseníase *per se* sugerindo que a evolução espectral sofre a influência de fatores não genéticos tais como individuais, ambientais, vacinais entre outros. Sabe-se que a resposta imune é um processo dinâmico e se tratando de uma infecção extremamente crônica, os mecanismos efetores e reguladores caminham em paralelo com períodos de predomínio de um ou de outro, dando ao curso da inflamação crônica um padrão alternado de quiescência e agudização como é observado em todas as doenças inflamatórias crônicas, infecciosas ou não, inclusive na hanseníase.

Neste trabalho, demonstramos que a degradação do triptofano pela enzima IDO, parece ser mais uma alça regulatória, nesta infecção, contribuindo para a progressão da redução da resposta imune celular efetora resultando em aumento predominante da carga bacilar.

IDO tem sido considerado uma molécula chave na imunossupressão em tumores e durante a gravidez. A inibição de IDO no tratamento de neoplasias tem permitido analisar a possibilidade de reversão do estado de supressão o que poderia vir a beneficiar outras situações semelhantes, abrindo assim, novos alvos terapêuticos no tratamento de algumas imunopatias.

Recentemente, o papel das APC em direcionar a resposta imune tem sido fortemente enfatizado por inúmeros estudos. A descrição de diferentes fenótipos e funcionalidade das APCs caracteriza essas células como ativadoras ou supressoras das células T (127).

Estudos com macrófagos e células dendríticas obtidos de pacientes com hanseníase demonstraram que lipoproteínas do *M. leprae* têm potente efeito sob essas células via TLRs (128). Chattré e cols. (2007) (129) demonstraram que antígenos do *M. leprae* estão associados com a regulação negativa de PKC, cálcio, calcineurina, MAPK e vários fatores de transcrição nos pacientes com hanseníase. Além disso, Cruz e cols. (2008) (130) mostraram que a oxidação de fosfolípidos nos pacientes com hanseníase previne a diferenciação das células dendríticas para o fenótipo CD1. Também foi observado que a proteína, triptofano aspartato (TACO; também conhecida como CORO1A) mantém o *M. leprae* dentro de vesículas no fagossomo inibindo a sinalização via TLR e a maturação dessas células, mantendo a infecção (131). Além disso, o *M. leprae* é capaz de induzir altos níveis de moléculas regulatórias: tais como MCP-1 e IL-1Ra em monócitos de indivíduos saudáveis (78) e estudos prévios demonstraram a presença de TGF- β , uma citocina supressora, em biópsias de pele de pacientes lepromatosos, sendo observado aumento na expressão de iNOS em pacientes tuberculóides (132).

Nesse trabalho nós mostramos pela primeira vez, que a enzima IDO, responsável pela degradação do triptofano, está associada com a forma lepromatosa da doença. Além disso, demonstramos que o *M. leprae* é capaz de induzir a expressão de IDO em monócitos de pacientes lepromatosos e de indivíduos saudáveis, bem como, em células dendríticas derivadas de

monócitos de indivíduos saudáveis. A IDO regula negativamente os linfócitos e é expressa predominantemente nas células dendríticas e nos macrófagos (133,134). Esta enzima apresenta um papel ativo na resposta imune por catabolizar o aminoácido triptofano em quinurenina e outros compostos biologicamente ativos.

A atividade de IDO na regulação da resposta imune, através da degradação do triptofano, não está completamente elucidada e diversos trabalhos vêm mostrando o envolvimento de IDO no controle da imunidade inata e adaptativa contra patógenos. Já foi demonstrado o envolvimento de IDO na resposta imune contra os seguintes patógenos: toxoplasma, *Trypanosoma cruzi*, plasmódio, bactérias intracelulares (ex: chlamydia e rickettsia) e bactérias extracelulares como streptococci, enterococci e staphylococci (revisado por 95,135,136,137). Recentemente, foi demonstrado que IDO e outras enzimas que participam da degradação do triptofano, têm um papel central na infecção crônica. Este mecanismo evita o efeito prejudicial da resposta inflamatória, além de controlar a proliferação do patógeno, devido à depleção do triptofano (138,139,140). Tem sido demonstrado que a expressão de IDO em células dendríticas plasmocitóides regula a resposta imune adaptativa negativamente, levando ao aumento de células T regulatórias (141).

Nossa hipótese atual de trabalho é a de que inicialmente o *M. leprae* induz a IDO via TNF e IFN- γ , mas em seguida os metabólitos do triptofano levam à supressão da população de células T efectoras, com indução de células T regulatórias e secreção de IL-10, levando à perda progressiva na capacidade de resposta. Embora mais dados experimentais sejam necessários para confirmar essa hipótese, muitas evidências clínicas apóiam o envolvimento de

IDO no direcionamento para a forma anérgica da doença. Nesse estudo, nós demonstramos a expressão de mRNA de IDO em lesões de pele de pacientes LL e BT, com altos níveis nas lesões de pacientes LL. Estes dados corroboram com os níveis de proteínas analisados por imunohistoquímica. Nas lesões de LL quase todos os macrófagos do infiltrado celular foram IDO⁺ em contraste com poucas células positivas nas lesões de pele de pacientes tuberculóides e com reação reversa. Entretanto, sabe-se que a expressão de IDO nem sempre resulta na atividade da enzima já que esta tem regulação pós-transcricional e mesmo na sua atividade como acontece com o NO que inibe a atividade enzimática.

Nós observamos que a maioria das células IDO⁺ co-localizaram com CD68, sugerindo uma população celular identificada como macrófagos de tecido. Entretanto, foi detectado IDO em células que parecem ser células dendríticas, pois apresentam morfologia característica dessas células e foi observado a presença de IDO em células CD11c⁺ e CD86⁺ de lesões de pacientes lepromatosos e tuberculóides, marcadores de células dendríticas humanas favorecendo assim este conceito, foi observado que IDO está ausente em tecidos de pele normais (142), onde há distribuição de células dendríticas CD11c⁺, CD1b⁺, CD1c⁺ na derme superior e as subpopulações de macrófagos (CD68⁺, FXIIIA⁺, CD163⁺, CD209⁺) na derme são proeminentes (143,144). Nas lesões de pele de pacientes lepromatosos, duas subpopulações de macrófagos (CD209⁺ CD1b⁻ e CD209⁻ CD16⁺) têm sido descritas (48). No presente estudo nós mostramos que o infiltrado inflamatório de lesões de pele de pacientes lepromatosos apresenta grande quantidade de células dendríticas mielóides CD11c⁺, CD86⁺, HLA-DR⁺ e células CD68⁺. Baseado nesses resultados nós

não podemos excluir a possibilidade de que células IDO⁺ representem outro grupo de células dendríticas com a função e o fenótipo dos macrófagos. O papel exato das células dendríticas IDO⁺ ou macrófagos IDO⁺ na hanseníase precisa ser assim melhor estudado.

A análise por PCR em tempo real revelou um aumento modesto de mRNA de IDO em lesões de pele de pacientes lepromatosos quando comparado com lesões de BT. De acordo com esses dados, a análise por *western blotting* demonstrou um aumento na expressão de IDO em biópsias de pacientes lepromatosos quando comparados aos BTs. Embora não tenha sido observada diferença significativa na expressão gênica de TNF α e IFN- γ quando comparado às biópsias de LL e BT, a análise da secreção destas citocinas demonstrou um aumento dos níveis de IFN- γ no soro de pacientes BT, ao passo que no soro de pacientes LL foi observado um aumento dos níveis de TNF. Apesar dos altos níveis de IFN- γ no soro de pacientes BT, nós não podemos excluir o envolvimento de IFN- γ na indução de IDO nos pacientes LL. Já se sabe que a presença de níveis sub-ótimos de IFN- γ no local da infecção pode induzir a persistência do crescimento da bactéria devido à insuficiente depleção do triptofano (139).

Jürgens e cols. (2009) (145) descreveram que o catabolismo do triptofano não afeta a produção de citocinas nas mDCs, sugerindo que o IFN- γ ativa a IDO e a produção de citocinas pró-inflamatórias por vias celulares distintas. Nós sugerimos que outros estímulos, como o *M. leprae* podem ter a mesma capacidade, de induzir IDO e citocinas inflamatórias por vias distintas, o que poderia explicar o aumento dos níveis de TNF α no soro de pacientes com a forma lepromatosa e também em culturas de células estimuladas com *M.*

leprae observadas aqui e em outros trabalhos do nosso laboratório (41,146). Um aumento significativo na expressão de mRNA de IL-10 também foi detectado nas lesões de pacientes lepromatosos e no soro desses pacientes, corroborando com outros estudos (72,147).

O aumento da atividade de IDO foi detectado no soro de pacientes lepromatosos contrastando com os níveis de IDO observados no soro de pacientes com a forma clínica BT e durante as reações RR e ENL. A redução de IDO durante os episódios reacionais poderia estar relacionada com o aumento de resposta imune celular observada nessa fase. Além disso, foram detectados altos níveis de TNF no soro de pacientes LL. O TNF é conhecido indutor da expressão de IDO em mDCs de indivíduos saudáveis (118). Nós sugerimos que o TNF, que se encontra aumentado no soro de pacientes LL, possa contribuir para aumentar a expressão gênica e protéica de IDO nesses pacientes. Relatos anteriores descreveram que os monócitos de sangue periférico de indivíduos saudáveis são a principal fonte de IDO ativado (148). No presente trabalho, a expressão de IDO foi avaliada em monócitos estimulados com *M. leprae* ou IFN- γ por citometria de fluxo e *western blotting*. O IFN- γ foi capaz de aumentar a expressão de IDO em monócitos de indivíduos saudáveis e de pacientes lepromatosos. Entretanto, o aumento na atividade de IDO induzido pelo IFN- γ foi observado somente nas culturas celulares de indivíduos saudáveis, mas não foi aumentada nas culturas celulares de pacientes LL. A atividade enzimática de IDO é regulada de modo pós-transcricional e vários mecanismos podem influenciar o nível e a atividade de IDO. Após observarmos a expressão gênica de IDO em biópsias de pacientes BT, nós sugerimos que no tecido desses pacientes, os altos níveis de IFN- γ

poderiam induzir NO que por sua vez inibiria a IDO rapidamente através da hidrólise pelo proteossoma, transformando a atividade de IDO ou imunolocalização em biópsias de pacientes BT em um fenômeno raro. Esta hipótese corrobora com resultados observados por Hucke e cols., (2004) (116) que mostraram que o óxido nítrico (NO) é capaz de inibir a atividade de IDO através da reação com o grupo heme de IDO, além de induzir a proteólise de IDO através do proteossoma. Algumas citocinas, também sofrem regulação pós-transcricional, como: TNF, IFN- γ , GM-CSF, IL-1 β , IL-10 entre outras (149).

O *M. leprae* foi capaz de aumentar a expressão e a atividade de IDO em monócitos tanto de indivíduos saudáveis como em monócitos de pacientes lepromatosos. Quando a expressão de IDO nas células CD14⁺ foi analisada, nós observamos que o *M. leprae* presente no MOI 10:1 aumentou a expressão de IDO e os níveis foram similares aos níveis induzidos por IFN- γ , sendo esse dado confirmado por *western blotting*. Uma vez que o IFN- γ foi capaz de induzir a expressão de IDO em monócitos de indivíduos saudáveis e de pacientes LL nós avaliamos se o *M. leprae* é capaz de modular a expressão de IDO induzida por IFN- γ . Foi ainda observado um efeito sinérgico na expressão de IDO quando os monócitos foram estimulados com *M. leprae* e IFN- γ simultaneamente. Nos monócitos de indivíduos saudáveis o aumento de IDO nas culturas estimuladas com IFN- γ foi principalmente observado nos monócitos estimulados com baixo MOI (2:1) de *M. leprae*. Ao contrário, nos monócitos de pacientes lepromatosos o aumento foi observado com *M. leprae* a 50:1.

De modo intrigante, nós observamos uma tendência para a redução da expressão de IDO em culturas de monócitos estimuladas com *M. leprae* (10:1)

e IFN- γ , quando comparado com as culturas estimuladas somente com o *M. leprae* (10:1), contrastando com o observado com o *M. leprae* em baixo e elevado MOI. Conforme descrito anteriormente (148) nós observamos uma discrepância entre a expressão de IDO e a atividade em monócitos humanos. A atividade de IDO avaliada nos sobrenadantes de culturas estimuladas com *M. leprae* se encontrou aumentada nos monócitos de indivíduos saudáveis quando estimulados com baixo MOI (2:1), já nos monócitos de pacientes lepromatosos, nós não observamos diferenças entre os MOI testados. Estes dados sugerem que o *M. leprae* possa modular a expressão de IDO e a atividade por um mecanismo dinâmico. Nos monócitos de indivíduos saudáveis a atividade de IDO estaria aumentada na presença de IFN- γ , somente nas células estimuladas com *M. leprae* (10:1), não sendo relacionada com a expressão de IDO observada. Já nas células dos pacientes lepromatosos a atividade de IDO nas células estimuladas com *M. leprae*, na presença de IFN- γ seria observada para alto MOI (50:1) de *M. leprae*, seguindo assim a expressão da proteína (dado não mostrado).

Além dos monócitos, nós observamos que o *M. leprae* induz aumento da atividade de IDO em mDCs de indivíduos saudáveis. O *M. leprae* com baixo MOI (2:1) foi suficiente para aumentar a atividade de IDO em mDCs quando comparado com as células não estimuladas.

O *M. leprae* não foi capaz de modular a expressão de diferentes marcadores de superfície celular nas células dendríticas. Esses resultados corroboram com resultados observados por Murray e cols. (2009) (29) nos quais eles não observaram diferença nos marcadores de superfície e citocinas induzidas pelo *M. leprae*.

De modo a verificar se o aumento da expressão de IDO pelo *M. leprae* foi capaz de induzir um perfil de resposta T – supressor, foram realizadas co-culturas mDCs-células T CD4⁺, provenientes de voluntários saudáveis, na proporção 1:1. Apesar de ainda preliminares, nossos dados claramente indicaram que o *M. leprae*, além de aumentar a atividade de IDO nas mDCs, aumenta significativamente o percentual de células T CD4⁺CD25⁺CTLA4⁺, o efeito foi revertido na presença de 1-MT. Apesar do aumento da população CTLA-4⁺ após o estímulo com *M. leprae*, nós não conseguimos avaliar um aumento da população FoxP3⁺. Assim, podemos concluir preliminarmente que o mecanismo supressor de IDO deve estar associado ao aumento de CTLA-4. A participação de IDO na indução de células T regulatórias já foi observada em outras patologias. Foi observado que a inibição de IDO com INCB024360, promoveu o crescimento de células NK, aumento da produção de IFN- γ e reduziu a conversão de células T em células T regulatórias (150).

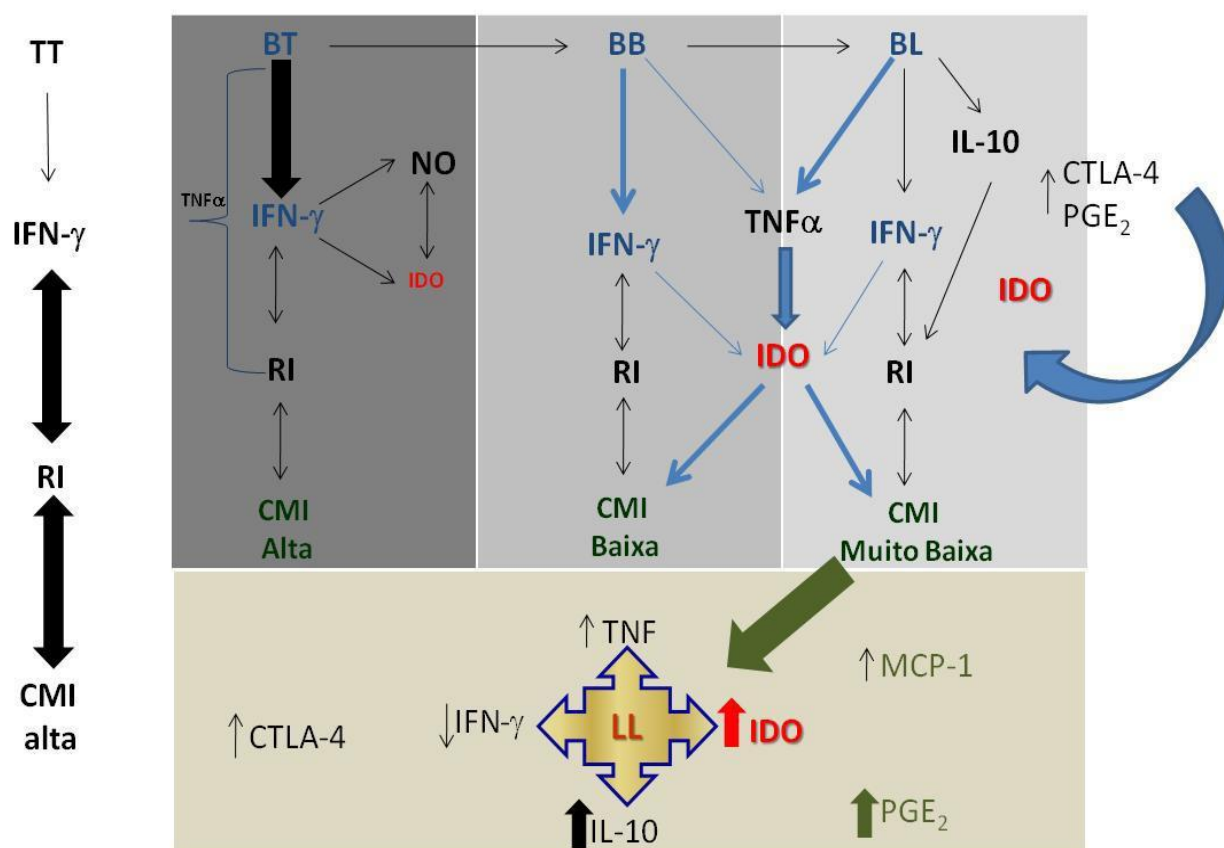
Nossos resultados sugerem que as células de pacientes lepromatosos estejam induzindo IDO por um caminho independente de IFN- γ , uma vez que este não seja capaz de aumentar a atividade de IDO em lepromatosos, sendo que outras citocinas como o TNF, podem ser importantes para a indução de IDO. O envolvimento de IDO no mecanismo imunomodulatório por um processo independente de IFN- γ já foi previamente demonstrado por Manéglier e cols. (2009) (151) no modelo de infecção pelo HIV. Foi observado que a ativação de IDO pelo HIV ocorre por um efeito direto da infecção pelo vírus.

Corroborando com estes resultados, o IFN- γ não promoveu nenhum aumento da atividade de IDO nas células de pacientes lepromatosos, sugerindo que a indução dessa enzima ocorra por uma via independente de

IFN- γ . Estes resultados sugerem que o *M. leprae* seja capaz de ativar a expressão gênica e a atividade enzimática de IDO, que por sua vez contribui para a anergia antígeno específica presente no pólo lepromatoso da doença.

Nós mostramos que a atividade de IDO é diferenciada nos dois pólos da doença, e nós acreditamos que esta diferença possa representar um dos mecanismos relevantes na resposta imune diferenciada observada nos dois pólos da hanseníase. Mais estudos sobre o papel de IDO na hanseníase podem levar a uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na dualidade da doença.

Esquema



Esquema 1. Espectro da resposta imune na hanseníase. No pólo tuberculóide, indivíduos TT apresentam elevados níveis de $IFN-\gamma$, apresentando efetiva resposta imune (RI) à micobactéria. Os indivíduos borderline apresentam diminuição gradativa do padrão de resposta imune à medida que evoluem para o pólo lepromatoso. Duas importantes citocinas parecem regular o direcionamento da resposta em indivíduos com hanseníase: $IFN-\gamma$ e TNF , sendo ambas pró-inflamatórias e ao mesmo tempo fortes indutoras de IDO, o que sugere que mecanismos regulatórios associados a expressão dessas duas citocinas contribuem para o direcionamento da resposta. O pólo lepromatoso é decorrente da RI baixa mediada pelo aumento de IDO, $IL-10$, $CTLA-4$, PGE_2 e $MCP-1$ em resposta a micobactéria, com redução progressiva da resposta imune celular adaptativa. RI = resposta imune inata / CMI= resposta imune adaptativa.

Conclusão

Os resultados apresentados nesse trabalho sugerem que lesões de pele de pacientes LL apresentam aumentada expressão de IDO quando comparadas com as lesões de pele de pacientes BT e com pacientes com reação reversa. Em conjunto, uma maior atividade de IDO foi observada em soro de pacientes LL quando comparado aos demais grupos testados. O aumento da atividade de IDO em soro de pacientes LL estava associado a níveis elevados de TNF. Foi ainda avaliada a capacidade do *M. leprae* de induzir a expressão de IDO *in vitro*. O *M. leprae* aumentou a expressão gênica de IDO em PBMCs e mDCs de voluntários saudáveis. A expressão gênica e protéica de IDO também foi aumentada em monócitos provenientes de indivíduos saudáveis e pacientes LL, o que foi revertido após a adição de 1-MT. O IFN- γ , conhecido indutor de IDO, foi capaz de aumentar a atividade de IDO somente em células de voluntários saudáveis, mas não de pacientes lepromatosos. Em células de voluntários saudáveis, o IFN- γ quando em associação com o *M. leprae*, apresentou um aumento significativo na expressão e atividade de IDO quando em comparação com o *M. leprae* sozinho. No entanto, esse aumento só foi observado quando o *M. leprae* foi utilizado em elevado MOI 50:1, o que sugere que a carga bacilar contribui para o direcionamento da resposta ao IFN- γ pela célula hospedeira. No intuito de observar se o aumento da expressão de IDO nas APCs resultaria em modulação da resposta imune efetora, co-culturas de mDCs – linfócitos T de pacientes lepromatosos foram realizadas e observou-se que o estímulo com *M. leprae* em mDCs aumenta o percentual de células T CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺ nas culturas. Em resumo, nossos dados apontam IDO como uma importante molécula associada a imunossupressão observada em pacientes lepromatosos.

REFERÊNCIA

1. Gallo, M. E. N., Sampaio, E. P., Nery, J. A. C., Moraes, M. O., Antunes, S. L. G., Pessolani, M. C. V., & Sarno, E. N. 2005. Hanseníase: Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Imunológicos. *Coura, J.R. (ed.) Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*: 1383-1394. Guanabara Koogan.
2. WHO. Global leprosy situation. Weekly epidemiological record. 25[82], 225-232. Disponível em: <http://www.who.int/wer>. Acesso em: 25 mai. 2009.
3. Spierings E, De Boer T, Zulianello L, Ottenhoff TH. Novel mechanisms in the immunopathogenesis of leprosy nerve damage: the role of Schwann cells, T cells and Mycobacterium leprae. Immunol. Cell Biol. 2000 Ago;78(4):349-355
4. Jacobson R, Krahenbuhl JL, Patout C, Axelrod C. Public health applications of Hansen's disease research and treatment. Public Health Rep. 1994 Dez;109(6):818-820.
5. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis. 1966 Set;34(3):255-273.
6. Sieling PA, Modlin RL. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. Immunobiology. 1994 Out;191(4-5):378-387
7. Sarno EN, Sampaio EP. The role of inflammatory cytokines in the tissue injury of leprosy. Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis. 1996 Dez;64(4 Suppl):S69-73; discussion S73-74.
8. Naafs B. Leprosy reactions. New knowledge. Trop Geogr Med. 1994;46(2):80-84.
9. Naafs B, Kolk AH, Chin A Lien RA, Faber WR, Van Dijk G, Kuijper S, et al. Anti-Mycobacterium leprae monoclonal antibodies cross-react with human skin: an alternative explanation for the immune responses in leprosy. J. Invest. Dermatol. 1990 Maio;94(5):685-688

10. Jih MH, Kimyai-Asadi A, Levis WR. Reversal reaction to Hansen's disease. *J Drugs Dermatol*. 2002 Jul;1(1):70-71.
11. Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, et al. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science*. 1991 Oct 11;254(5029):277-279.
12. Husser JA, Daumerie D, Grossetête G, Nebout M. [Necrotic course of erythema nodosum leprosum]. *Acta Leprol*. 1986 Jun;4(2):239-250.
13. Sarno EN, Grau GE, Vieira LM, Nery JA. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosy reactional states. *Clin. Exp. Immunol*. 1991 Apr;84(1):103-108.
14. Ustianowski AP, Lockwood DNJ. Leprosy: current diagnostic and treatment approaches. *Curr. Opin. Infect. Dis*. 2003 Oct;16(5):421-427
15. Rees RJ. LEPRO's elective period student programme, 1973-1983. *Leprosy Rev*. 1984 Dec;55(4):321-325.
16. Bloom BR, Godal T. Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world. V. Leprosy. *Rev. Infect. Dis*. 1983 Aug;5(4):765-780.
17. Chacha JJ, Sotto MN, Peters L, Lourenço S, Rivitti EA, Melnikov P. [Peripheral nervous system and grounds for the neural insult in leprosy]. *An Bras Dermatol*. 2009 Oct;84(5):495-500
18. Cole ST, Supply P, Honoré N. Repetitive sequences in *Mycobacterium leprae* and their impact on genome plasticity. *Leprosy Rev*. 2001 Dec;72(4):449-461.
19. Hunter SW, Fujiwara T, Brennan PJ. Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae*. *J. Biol. Chem*. 1982 Dec 25;257(24):15072-15078.
20. Hunter SW, Brennan PJ. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. *J Bacteriol*. 1981 Sep;147(3):728-35
21. Klebanoff SJ, Shepard CC. Toxic effect of the peroxidase-hydrogen peroxide-halide antimicrobial system on *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun*. 1984 May;44(2):534-6.

22. Hunter SW, Stewart C, Brennan PJ. Purification of phenolic glycolipid I from armadillo and human sources. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 1985 Set;53(3):484-486
23. Gatfield J, Pieters J. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science*. 2000 Jun 2;288(5471):1647-50
24. Rambukkana A. Molecular basis for the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2001 Fev;4(1):21-27.
25. Fukutomi Y, Maeda Y, Matsuoka M, Makino M. Temperature dependency for survival of *Mycobacterium leprae* in macrophages. *Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi*. 2009 Fev;78(1):7-16
26. Alves L, de Mendonça Lima L, da Silva Maeda E, Carvalho L, Holy J, Sarno EN, et al. *Mycobacterium leprae* infection of human Schwann cells depends on selective host kinases and pathogen-modulated endocytic pathways. *FEMS Microbiol. Lett.* 2004 Set 15;238(2):429-437
27. Lima CS, Ribeiro ML, Souza LA, Sardella AB, Wolf VM, Pessolani MC. Intracellular signals triggered during association of *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium bovis* BCG with human monocytes. *Microb. Pathog.* 2001 Jul;31(1):37-45.
28. Turenne CY, Wallace R, Behr MA. *Mycobacterium avium* in the postgenomic era. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007 Abr;20(2):205-229.
29. Murray RA, Siddiqui MR, Mendillo M, Krahenbuhl J, Kaplan G. *Mycobacterium leprae* inhibits dendritic cell activation and maturation. *J. Immunol.* 2007 Jan 1;178(1):338-344.
30. Steinman RM. Some interfaces of dendritic cell biology. *APMIS*. 2003 Ago;111(7-8):675-697
31. Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat. Med.* 2003 Maio;9(5):525-532.
32. Kang TJ, Chae GT. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2001 Jul;31(1):53-58

33. Frehel C, Rastogi N. Mycobacterium leprae surface components intervene in the early phagosome-lysosome fusion inhibition event. Infect. Immun. 1987 Dez;55(12):2916-2921
34. Salgame P, Abrams JS, Clayberger C, Goldstein H, Convit J, Modlin RL, et al. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. Science. 1991 Out 11;254(5029):279-282.
35. Granelli-Piperno A, Golebiowska A, Trumpfheller C, Siegal FP, Steinman RM. HIV-1-infected monocyte-derived dendritic cells do not undergo maturation but can elicit IL-10 production and T cell regulation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2004 Maio 18;101(20):7669-7674
36. Makino M, Maeda Y, Fukutomi Y, Mukai T. Contribution of GM-CSF on the enhancement of the T cell-stimulating activity of macrophages. Microbes Infect. 2007 Jan;9(1):70-77.
37. Sochocka M [Recognition of pathogens by innate immunity]. Postepy Hig Med Dosw (Online). 2008 Dec 11;62:676-87. Review.
38. Maeda Y, Mukai T, Spencer J, Makino M. Identification of an immunomodulating Agent from Mycobacterium leprae. Infect. Immun. 2005 Maio;73(5):2744-2750.
39. Modlin RL. The innate immune response in leprosy. Curr. Opin. Immunol. 2010 Fev;22(1):48-54.
40. Adams E, Britton WJ, Morgan A, Goodsall AL, Basten A. Identification of human T cell epitopes in the Mycobacterium leprae heat shock protein 70-kD antigen. Clin Exp Immunol. 1993 Dec;94(3):500-6.
41. Hernandez MO, Neves I, Sales JS, Carvalho DS, Sarno EN, Sampaio EP. Induction of apoptosis in monocytes by Mycobacterium leprae in vitro: a possible role for tumour necrosis factor-alpha. Immunology. 2003 Maio;109(1):156-164
42. Charlab R, Sarno EN, Chatterjee D, Pessolani MC. Effect of unique Mycobacterium leprae phenolic glycolipid-I (PGL-I) on tumour necrosis factor production by human mononuclear cells. Lepr Rev. 2001 Mar;72(1):63-69.
43. Granelli-Piperno A, Pritsker A, Pack M, Shimeliovich I, Arrighi JF, Park CG, Trumpfheller C, Piguet V, Moran TM, Steinman RM. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin/CD209 is

- abundant on macrophages in the normal human lymph node and is not required for dendritic cell stimulation of the mixed leukocyte reaction. *J Immunol.* 2005 Oct 1;175(7):4265-73.
44. Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. Pathogens target DC-SIGN to influence their fate DC-SIGN functions as a pathogen receptor with broad specificity. *APMIS.* 2003 Jul-Aug;111(7-8):698-714. Review.
 45. Colmenares M, Corbí AL, Turco SJ, Rivas L. The dendritic cell receptor DC-SIGN discriminates among species and life cycle forms of *Leishmania*. *J Immunol.* 2004 Jan 15;172(2):1186-90.
 46. Appelmelk BJ, van Die I, van Vliet SJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells. *J Immunol.* 2003 Feb 15;170(4):1635-9
 47. Cambi A, Gijzen K, de Vries JM, Torensma R, Joosten B, Adema GJ, Netea MG, Kullberg BJ, Romani L, Figdor CG. The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2003 Feb;33(2):532-8
 48. Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE, et al. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat. Med.* 2005 Jun;11(6):653-660.
 49. 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*
78
 50. Barker LP. *Mycobacterium leprae* interactions with the host cell: recent advances. *Indian J. Med. Res.* 2006 Jun;123(6):748-759.
 51. Sieling PA, Jullien D, Dahlem M, Tedder TF, Rea TH, Modlin RL, et al. CD1 expression by dendritic cells in human leprosy lesions: correlation with effective host immunity. *J. Immunol.* 1999 Feb 1;162(3):1851-1858.
 52. Yamauchi PS, Bleharski JR, Uyemura K, Kim J, Sieling PA, Miller A, et al. A role for CD40-CD40 ligand interactions in the generation of type 1

- cytokine responses in human leprosy. *J. Immunol.* 2000 Ago 1;165(3):1506-1512.
53. Hunger RE, Sieling PA, Ochoa MT, Sugaya M, Burdick AE, Rea TH, et al. Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells. *J. Clin. Invest.* 2004 Mar;113(5):701-708.
 54. Miranda A, Amadeu TP, Schueler G, Alvarenga FBF, Duppré N, Ferreira H, et al. Increased Langerhans cell accumulation after mycobacterial stimuli. *Histopathology.* 2007 Nov;51(5):649-656
 55. Makino M, Maeda Y, Ishii N. Immunostimulatory activity of major membrane protein-II from *Mycobacterium leprae*. *Cell. Immunol.* 2005 Jan;233(1):53-60.
 56. Sarno EN, Espinosa M, Sampaio EP, Vieira LM, Figueiredo AA, Miranda CF, et al. Immunological responsiveness to *M. leprae* and BCG antigens in 98 leprosy patients and their household contacts. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1988;21(3):461-470.
 57. Crabtree GR. Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science.* 1989 Jan 20;243(4889):355-61.
 58. Schwartz RH. Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *J. Exp. Med.* 1996 Jul 1;184(1):1-8.
 59. Gajewski TF, Qian D, Fields P, Fitch FW. Anergic T-lymphocyte clones have altered inositol phosphate, calcium, and tyrosine kinase signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994 Jan 4;91(1):38-42
 60. Sundstedt A, Sigvardsson M, Leanderson T, Hedlund G, Kalland T, Dohlsten M. In vivo anergized CD4⁺ T cells express perturbed AP-1 and NF-kappa B transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996 Feb 6;93(3):979-984.
 61. Kaplan G, Weinstein DE, Steinman RM, Levis WR, Elvers U, Patarroyo ME, et al. An analysis of in vitro T cell responsiveness in lepromatous leprosy. *J. Exp. Med.* 1985 Set 1;162(3):917-929.
 62. Dagur PK, Sharma B, Kumar G, Khan NA, Katoch VM, Sengupta U, et al. Mycobacterial antigen(s) induce anergy by altering TCR- and TCR/CD28-induced signalling events: insights into T-cell unresponsiveness in leprosy. *Mol. Immunol.* 2010 Feb;47(5):943-952.

63. Mehra V, Brennan PJ, Rada E, Convit J, Bloom BR. Lymphocyte suppression in leprosy induced by unique *M. leprae* glycolipid. *Nature*. 1984 Mar 8;308(5955):194-196
64. Prasad HK, Mishra RS, Nath I. Phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae* induces general suppression of in vitro concanavalin A responses unrelated to leprosy type. *J. Exp. Med.* 1987 Jan 1;165(1):239-244.
65. Laal S, Bhutani LK, Nath I. Natural emergence of antigen-reactive T cells in lepromatous leprosy patients during erythema nodosum leprosum. *Infect. Immun.* 1985 Dez;50(3):887-892.
66. Laal S, Mishra RS, Nath I. Type 1 reactions in leprosy--heterogeneity in T-cell functions related to the background leprosy type. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 1987 Set;55(3):481-493.
67. Misra N, Selvakumar M, Singh S, Bharadwaj M, Ramesh V, Misra RS, et al. Monocyte derived IL 10 and PGE2 are associated with the absence of Th 1 cells and in vitro T cell suppression in lepromatous leprosy. *Immunol. Lett.* 1995 Dez;48(2):123-128.
68. Agrewala JN, Kumar B, Vohra H. Potential role of B7-1 and CD28 molecules in immunosuppression in leprosy. *Clin. Exp. Immunol.* 1998 Jan;111(1):56-63
69. Santos DO, Castro HC, Bourguignon SC, Bastos OM, Rodrigues CR, Van Heuverswyn H, Nery JA, Miranda A. Expression of B7-1 costimulatory molecules in patients with multibacillary leprosy and reactional states. *Clin Exp Dermatol.* 2007 Jan;32(1):75-80.
70. Barnes PF, Abrams JS, Lu S, Sieling PA, Rea TH, Modlin RL. Patterns of cytokine production by mycobacterium-reactive human T-cell clones. *Infect. Immun.* 1993 Jan;61(1):197-203.
71. Lima MC, Pereira GM, Rumjanek FD, Gomes HM, Duppre N, Sampaio EP, et al. Immunological cytokine correlates of protective immunity and pathogenesis in leprosy. *Scand. J. Immunol.* 2000 Abr;51(4):419-428
72. Sieling PA, Abrams JS, Yamamura M, Salgame P, Bloom BR, Rea TH, et al. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. In vitro modulation of T cell responses in leprosy. *J. Immunol.* 1993 Jun 15;150(12):5501-5510.

73. Kiszewski CA, Becerril E, Baquera J, Aguilar LD, Hernández-Pando R. Expression of transforming growth factor-beta isoforms and their receptors in lepromatous and tuberculoid leprosy. *Scand. J. Immunol.* 2003 Mar;57(3):279-285.
74. Lúdvíksson BR, Seegers D, Resnick AS, Strober W. The effect of TGF-beta1 on immune responses of naïve versus memory CD4+ Th1/Th2 T cells. *Eur. J. Immunol.* 2000 Jul;30(7):2101-2111
75. Libraty DH, Airan LE, Uyemura K, Jullien D, Spellberg B, Rea TH, et al. Interferon-gamma differentially regulates interleukin-12 and interleukin-10 production in leprosy. *J. Clin. Invest.* 1997 Jan 15;99(2):336-341.
76. de Jong R, Janson AA, Faber WR, Naafs B, Ottenhoff TH. IL-2 and IL-12 act in synergy to overcome antigen-specific T cell unresponsiveness in mycobacterial disease. *J. Immunol.* 1997 Jul 15;159(2):786-793.
77. 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 Jul 15;167(2):779-86.
78. Sinsimer D, Fallows D, Peixoto B, Krahenbuhl J, Kaplan G, Manca C. *Mycobacterium leprae* actively modulates the cytokine response in naive human monocytes. *Infect. Immun.* 2010 Jan;78(1):293-300.
79. Montoya D, Cruz D, Teles RMB, Lee DJ, Ochoa MT, Krutzik SR, et al. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. *Cell Host Microbe.* 2009 Oct 22;6(4):343-353
80. Mellor AL, Munn DH. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? *Immunology Today.* 1999 Oct 1;20(10):469-473.
81. Mackay GM, Forrest CM, Stoy N, Christofides J, Egerton M, Stone TW, et al. Tryptophan metabolism and oxidative stress in patients with chronic brain injury. *European Journal of Neurology.* 2006;13(1):30-42.
82. Munn DH, Sharma MD, Baban B, Harding HP, Zhang Y, Ron D, et al. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity.* 2005 May;22(5):633-642.
83. Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on

- tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat. Med.* 2003 Out;9(10):1269-1274.
84. Popov A, Schultze JL. IDO-expressing regulatory dendritic cells in cancer and chronic infection. *J. Mol. Med.* 2008 Feb;86(2):145-160.
 85. Schröcksnadel K, Wirleitner B, Winkler C, Fuchs D. Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation. *Clin. Chim. Acta.* 2006 Feb;364(1-2):82-90.
 86. Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat. Rev. Immunol.* 2004 Out;4(10):762-774.
 87. Thomas SR, Stocker R. Redox reactions related to indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan metabolism along the kynurenine pathway. *Redox Rep.* 1999;4(5):199-220.
 88. King NJC, Thomas SR. Molecules in focus: indoleamine 2,3-dioxygenase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007;39(12):2167-2172.
 89. Xu H, Oriss TB, Fei M, Henry AC, Melgert BN, Chen L, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase in lung dendritic cells promotes Th2 responses and allergic inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008 Maio 6;105(18):6690-6695.
 90. Werner ER, Werner-Felmayer G, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Wachter H. Effect of interferon gamma on tryptophan and pteridine metabolism of human cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 1988 Ago 17;80(12):974-975.
 91. Heyes MP, Saito K, Major EO, Milstien S, Markey SP, Vickers JH. A mechanism of quinolinic acid formation by brain in inflammatory neurological disease. Attenuation of synthesis from L-tryptophan by 6-chlorotryptophan and 4-chloro-3-hydroxyanthranilate. *Brain.* 1993 Dez;116 (Pt 6):1425-1450.
 92. Guillemin GJ, Brew BJ. Implications of the kynurenine pathway and quinolinic acid in Alzheimer's disease. *Redox Rep.* 2002;7(4):199-206.
 93. Mellor AL, Keskin DB, Johnson T, Chandler P, Munn DH. Cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase inhibit T cell responses. *J. Immunol.* 2002 Abr 15;168(8):3771-3776.
 94. Mellor AL, Sivakumar J, Chandler P, Smith K, Molina H, Mao D, et al. Prevention of T cell-driven complement activation and inflammation by

- tryptophan catabolism during pregnancy. *Nat. Immunol.* 2001 Jan;2(1):64-68.
95. MacKenzie CR, Heseler K, Müller A, Däubener W. Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in antimicrobial defence and immuno-regulation: tryptophan depletion versus production of toxic kynurenines. *Curr. Drug Metab.* 2007 Apr;8(3):237-244.
 96. Vottero E, Balgi A, Woods K, Tugendreich S, Melese T, Andersen RJ, et al. Inhibitors of human indoleamine 2,3-dioxygenase identified with a target-based screen in yeast. *Biotechnol J.* 2006 Mar;1(3):282-288.
 97. Sugimoto H, Oda S, Otsuki T, Hino T, Yoshida T, Shiro Y. Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: catalytic mechanism of O₂ incorporation by a heme-containing dioxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006 Feb 21;103(8):2611-2616.
 98. Cady SG, Sono M. 1-Methyl-DL-tryptophan, beta-(3-benzofuranyl)-DL-alanine (the oxygen analog of tryptophan), and beta-[3-benzo(b)thienyl]-DL-alanine (the sulfur analog of tryptophan) are competitive inhibitors for indoleamine 2,3-dioxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 1991 Dez;291(2):326-333.
 99. Duluc D, Delneste Y, Tan F, Moles M, Grimaud L, Lenoir J, et al. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood.* 2007 Dez 15;110(13):4319-4330.
 100. Kahler DJ, Mellor AL. T cell regulatory plasmacytoid dendritic cells expressing indoleamine 2,3 dioxygenase. *Handb Exp Pharmacol.* 2009;(188):165-196
 101. Banerjee T, Duhadaway JB, Gaspari P, Sutanto-Ward E, Munn DH, Mellor AL, et al. A key in vivo antitumor mechanism of action of natural product-based brassinins is inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Oncogene.* 2008 Maio 1;27(20):2851-2857.
 102. Thomas SR, Salahifar H, Mashima R, Hunt NH, Richardson DR, Stocker R. Antioxidants inhibit indoleamine 2,3-dioxygenase in IFN-gamma-activated human macrophages: posttranslational regulation by pyrrolidine dithiocarbamate. *J. Immunol.* 2001 Maio 15;166(10):6332-6340

103. Thomas SR, Mohr D, Stocker R. Nitric oxide inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase activity in interferon-gamma primed mononuclear phagocytes. *J. Biol. Chem.* 1994 Maio 20;269(20):14457-14464.
104. Fujigaki H, Saito K, Lin F, Fujigaki S, Takahashi K, Martin BM, et al. Nitration and inactivation of IDO by peroxynitrite. *J. Immunol.* 2006 Jan 1;176(1):372-379.
105. Wirleitner B, Neutrauer G, Nagl M, Fuchs D. Down-regulatory effect of N-chlorotaurine on tryptophan degradation and neopterin production in human PBMC. *Immunol. Lett.* 2004 Maio 15;93(2-3):143-149
106. Basu GD, Tinder TL, Bradley JM, Tu T, Hattrup CL, Pockaj BA, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor enhances the efficacy of a breast cancer vaccine: role of IDO. *J. Immunol.* 2006 Ago 15;177(4):2391-2402.
107. Liu H, Xue Z, Sjögren H, Salford LG, Widegren B. Low dose Zebularine treatment enhances immunogenicity of tumor cells. *Cancer Lett.* 2007 Nov 8;257(1):107-115
108. Brastianos HC, Vottero E, Patrick BO, Van Soest R, Matainaho T, Mauk AG, et al. Exiguamine A, an indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) inhibitor isolated from the marine sponge *Neopetrosia exigua*. *J. Am. Chem. Soc.* 2006 Dez 20;128(50):16046-16047.
109. Pereira A, Vottero E, Roberge M, Mauk AG, Andersen RJ. Indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors from the Northeastern Pacific Marine Hydroid *Garveia annulata*. *J. Nat. Prod.* 2006 Out;69(10):1496-1499.
110. Xu H, Oriss TB, Fei M, Henry AC, Melgert BN, Chen L, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase in lung dendritic cells promotes Th2 responses and allergic inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008 Maio 6;105(18):6690-6695.
111. Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Bianchi R, Orabona C, Spreca A, et al. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ.* 2002 Out;9(10):1069-1077
112. Clark DA, Blois S, Kandil J, Handjiski B, Manuel J, Arck PC. Reduced uterine indoleamine 2,3-dioxygenase versus increased Th1/Th2 cytokine ratios as a basis for occult and clinical pregnancy failure in mice and humans. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2005 Out;54(4):203-216

113. Odemuyiwa SO, Ghahary A, Li Y, Puttagunta L, Lee JE, Musat-Marcu S, et al. Cutting edge: human eosinophils regulate T cell subset selection through indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Immunol.* 2004 Nov 15;173(10):5909-5913
114. Molano A, Illarionov PA, Besra GS, Putterman C, Porcelli SA. Modulation of invariant natural killer T cell cytokine responses by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunol. Lett.* 2008 Apr 15;117(1):81-90
115. Lee SY, Choi HK, Lee KJ, Jung JY, Hur GY, Jung KH, et al. The immune tolerance of cancer is mediated by IDO that is inhibited by COX-2 inhibitors through regulatory T cells. *J. Immunother.* 2009 Jan;32(1):22-28.
116. Hücke C, MacKenzie CR, Adjogble KDZ, Takikawa O, Däubener W. Nitric oxide-mediated regulation of gamma interferon-induced bacteriostasis: inhibition and degradation of human indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect. Immun.* 2004 May;72(5):2723-2730.
117. Kim EY, Chi HH, Rajaiah R, Moudgil KD. Exogenous tumour necrosis factor alpha induces suppression of autoimmune arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2008;10(1):R38
118. Braun D, Longman RS, Albert ML. A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation. *Blood.* 2005 Oct 1;106(7):2375-2381
119. Hayashi T, Rao SP, Takabayashi K, Van Uden JH, Kornbluth RS, Baird SM, et al. Enhancement of innate immunity against *Mycobacterium avium* infection by immunostimulatory DNA is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect. Immun.* 2001 Oct;69(10):6156-6164
120. Nozaki Y, Hasegawa Y, Ichiyama S, Nakashima I, Shimokata K. Mechanism of nitric oxide-dependent killing of *Mycobacterium bovis* BCG in human alveolar macrophages. *Infect. Immun.* 1997 Sep;65(9):3644-3647
121. López AS, Alegre E, Díaz A, Mugueta C, González A. Bimodal effect of nitric oxide in the enzymatic activity of indoleamine 2,3-dioxygenase in human monocytic cells. *Immunol. Lett.* 2006 Aug 15;106(2):163-171.

122. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dez;25(4):402-408
123. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
124. O'Connor JC, André C, Wang Y, Lawson MA, Szegedi SS, Lestage J, Castanon N, Kelley KW, Dantzer R. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha mediate the upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice in response to bacillus Calmette-Guerin. *J Neurosci* 2009, 29: 4200-9.
125. Moraes MO, Duppre NC, Suffys PN, Santos AR, Almeida AS, Nery JA, ET AL: Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism TNF2 is associated with a stronger delayed-type hypersensitivity reaction in the skin of borderline tuberculoid leprosy patients. *Immunogenetics* 2001, 53:45-47.
126. Liu P, Xie B, Cai S, He Y, Zhang G, Yi Y, et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in nasopharyngeal carcinoma impairs the cytolytic function of peripheral blood lymphocytes. *BMC Cancer*. 2009;9:416.
127. Savage NDL, de Boer T, Walburg KV, Joosten SA, van Meijgaarden K, Geluk A, et al. Human anti-inflammatory macrophages induce Foxp3+ GITR+ CD25+ regulatory T cells, which suppress via membrane-bound TGFbeta-1. *J. Immunol*. 2008 Ago 1;181(3):2220-2226.
128. Modlin RL. Mammalian toll-like receptors. *Ann. Allergy Asthma Immunol*. 2002 Jun;88(6):543-547; quiz 548-550, 583
129. 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 Mar;44(8):2066-2077
130. Cruz D, Watson AD, Miller CS, Montoya D, Ochoa M, Sieling PA, et al. Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy. *J. Clin. Invest*. 2008 Ago;118(8):2917-2928.
131. Tanigawa K, Suzuki K, Kimura H, Takeshita F, Wu H, Akama T, et al. Tryptophan aspartate-containing coat protein (CORO1A) suppresses

- Toll-like receptor signalling in *Mycobacterium leprae* infection. *Clin. Exp. Immunol.* 2009 Jun;156(3):495-501.
132. Khanolkar-Young S, Snowden D, Lockwood DN. Immunocytochemical localization of inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta (TGF-beta) in leprosy lesions. *Clin. Exp. Immunol.* 1998 Sep;113(3):438-442
 133. Curti A, Trabanelli S, Salvestrini V, Baccarani M, Lemoli RM. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the induction of immune tolerance: focus on hematology. *Blood.* 2009 Mar 12;113(11):2394-2401
 134. Thackray SJ, Mowat CG, Chapman SK. Exploring the mechanism of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Biochem. Soc. Trans.* 2008 Dez;36(Pt 6):1120-1123.
 135. Knubel CP, Knubel CP, Martínez FF, Fretes RE, Díaz Lujan C, Theumer MG, Cervi L, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is critical for host resistance against *Trypanosoma cruzi*. *FASEB J [Internet]*. 2010 Mar 24 [citado 2010 Jun 6].
 136. Pfaff AW, Mousli M, Sénégas A, Marcellin L, Takikawa O, Klein J, et al. Impact of foetus and mother on IFN-gamma-induced indoleamine 2,3-dioxygenase and inducible nitric oxide synthase expression in murine placenta following *Toxoplasma gondii* infection. *Int. J. Parasitol.* 2008 Feb;38(2):249-258.
 137. Popov A, Abdullah Z, Wickenhauser C, Saric T, Driesen J, Hanisch F, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells form suppurative granulomas following *Listeria monocytogenes* infection. *J. Clin. Invest.* 2006 Dez;116(12):3160-3170.
 138. Njau F, Geffers R, Thalmann J, Haller H, Wagner AD. Restriction of *Chlamydia pneumoniae* replication in human dendritic cell by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Microbes Infect.* 2009 Nov;11(13):1002-1010
 139. Zelante T, Fallarino F, Bistoni F, Puccetti P, Romani L. Indoleamine 2,3-dioxygenase in infection: the paradox of an evasive strategy that benefits the host. *Microbes Infect.* 2009 Jan;11(1):133-141.

140. Romani L, Zelante T, De Luca A, Fallarino F, Puccetti P. IL-17 and therapeutic kynurenines in pathogenic inflammation to fungi. *J. Immunol.* 2008 Apr 15;180(8):5157-5162.
141. Derks RA, Jankowska-Gan E, Xu Q, Burlingham WJ. Dendritic cell type determines the mechanism of bystander suppression by adaptive T regulatory cells specific for the minor antigen HA-1. *J. Immunol.* 2007 Sep 15;179(6):3443-3451
142. Scheler M, Wenzel J, Tüting T, Takikawa O, Bieber T, von Bubnoff D. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO): the antagonist of type I interferon-driven skin inflammation? *Am. J. Pathol.* 2007 Dec;171(6):1936-1943.
143. Zaba LC, Fuentes-Duculan J, Steinman RM, Krueger JG, Lowes MA. Normal human dermis contains distinct populations of CD11c+BDCA-1+ dendritic cells and CD163+FXIIIa+ macrophages. *J. Clin. Invest.* 2007 Sep;117(9):2517-2525.
144. Ochoa MT, Loncaric A, Krutzik SR, Becker TC, Modlin RL. "Dermal dendritic cells" comprise two distinct populations: CD1+ dendritic cells and CD209+ macrophages. *J. Invest. Dermatol.* 2008 Sep;128(9):2225-2231.
145. Jürgens B, Hainz U, Fuchs D, Felzmann T, Heitger A. Interferon-gamma-triggered indoleamine 2,3-dioxygenase competence in human monocyte-derived dendritic cells induces regulatory activity in allogeneic T cells. *Blood.* 2009 Oct 8;114(15):3235-3243
146. Fulco TO, Lopes UG, Sarno EN, Sampaio EP, Saliba AM. The proteasome function is required for *Mycobacterium leprae*-induced apoptosis and cytokine secretion. *Immunol. Lett.* 2007 May 15;110(1):82-85.
147. Teles RMB, Teles RB, Amadeu TP, Moura DF, Mendonça-Lima L, Ferreira H, et al. High matrix metalloproteinase production correlates with immune activation and leukocyte migration in leprosy reactional lesions. *Infect. Immun.* 2010 Mar;78(3):1012-1021.
148. Tattevin P, Monnier D, Tribut O, Dulong J, Bescher N, Mourcin F, et al. Enhanced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in patients with severe sepsis and septic shock. *J. Infect. Dis.* 2010 Mar 15;201(6):956-966

149. Anderson P. Post-transcriptional control of cytokine production. *Nat. Immunol.* 2008 Apr;9(4):353-359.
150. Liu X, Shin N, Koblisch HK, Yang G, Wang Q, Wang K, et al. Selective inhibition of IDO1 effectively regulates mediators of antitumor immunity. *Blood.* 2010 Apr 29;115(17):3520-3530.
151. Manéglier B, Malleret B, Guillemin GJ, Spreux-Varoquaux O, Devillier P, Rogez-Kreuz C, et al. Modulation of indoleamine-2,3-dioxygenase expression and activity by HIV-1 in human macrophages. *Fundam Clin Pharmacol.* 2009 Oct;23(5):573-581.

Anexo 1

Artigo Submetido for Clinical & Experimental Immunology

**The role of Indoleamine 2,3-dioxygenase in lepromatous leprosy
immunosuppression**

Jorgenilce de Souza Sales*, Flávio Alves Lara[#], Thaís Porto Amadeu*, Tatiana
de Oliveira Fulco*, José Augusto da Costa Nery*, Elizabeth Pereira Sampaio*^Ψ,
Roberta Olmo Pinheiro*, and Euzenir Nunes Sarno*

*Leprosy Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz – Rio de Janeiro, Brazil

[#] Cellular Microbiology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz – Rio de
Janeiro, Brazil

^Ψ Laboratory of Clinical Infectious Diseases, Clinical Center, National Institutes
of Health, Bethesda, Maryland

Running title: IDO is involved in immunosuppression during
lepromatous leprosy

Corresponding author:

Euzenir Nunes Sarno, M. D., Ph.D.

Leprosy Laboratory

Oswaldo Cruz Foundation

Av. Brasil 4365, Manguinhos

Rio de Janeiro

CEP: 21040-900

E-mail: euzenir@fiocruz.br

Supported by CNPq and FAPERJ.

Abstract

To further elucidate the possible role of the tryptophan, rate-limiting enzyme indoleamine 2, 3 dioxygenase (IDO) in leprosy, the distribution of IDO-positive cells and IDO activity in the skin biopsies and sera of these patients representing the entire spectrum of the disease were studied. An increased number of macrophages/DC - lineage IDO⁺ cells were found in lepromatous (LL) as compared to tuberculoid (BT) and reversal reaction (RR) patients. IDO-positive cells showing CD68 and CD86 surface markers predominated in LL lesions while higher levels of IDO activity were observed in the sera of LL versus BT patients. Tests revealed an increased IDO message in *M. leprae*-stimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by real time PCR and increased IDO expression in *M. leprae*-stimulated CD14⁺ cells of both healthy controls (HC) and LL patients, as evaluated via flow cytometry. Increased *M. leprae*-induced IDO - protein synthesis was also confirmed by Western blot. Based on our in vitro studies, it was confirmed that *M. leprae* up-regulated IDO expression and activity in HC and LL monocytes. Interferon γ (IFN- γ) synergized with *M. leprae* in promoting IDO expression and activity in monocytes. IDO expression induced by both IFN- γ and *M. leprae* was abrogated by 1-methyltryptophan (1-MT). Our data suggest that *M. leprae* chronic infection activates the suppressive molecule IDO, which, in turn, contributes to the specific immunosuppression observed in LL leprosy.

Keywords: IDO, lepromatous leprosy, IFN- γ , *Mycobacterium leprae*, monocytes.

Introduction

While extensively investigated both in vivo and in vitro, the fact that lepromatous (LL) patients do not present a T cell response to *M. leprae* remains undecipherable [1,2]. In these patients, disseminated skin lesions with high bacterial loads and negative lepromin skin tests are associated with the absence of both T cell proliferation and Interferon γ (IFN- γ) production in vitro by *M. leprae*-stimulated blood cells [3,4].

It is known that T cell responsiveness to *M. leprae* is progressively reduced, resulting in an immunological and clinical spectrum of the disease ranging from high Th1 responder patients at the tuberculoid pole toward the complete absence of the cellular immune response at the lepromatous end of the spectrum [5,3]. As a whole, the intrinsically unstable borderline forms present a gradually decreasing immune response. These patients may show spontaneous immune reactivation at any time during the course of *M. leprae* infection. The emergence of a *M. leprae*-specific, T cell response and higher Th1 cytokine production has been documented during these episodes [6,7].

Moreover, the immunological changes taking place in the different forms of leprosy correlate with clinical and histopathological findings. The Ridley-Jopling classification of leprosy is fundamentally based on the histopathology of skin lesions [8]. The presence of activated epithelioid macrophages organized in granuloma, as seen in BT lesions, for example, is progressively reduced in all the borderline forms. On the other hand, in LL lesions, these epithelioid macrophages are completely switched off and replaced by deactivated Virchow cells.

The emergence of cell immunity attracts newly-activated macrophages toward previously borderline LL lesions that substitute the inactive macrophages. In a previous study, it was demonstrated that CD68-positive macrophages isolated from LL lesions suffered morphological and functional changes in culture, suggesting an environmental-dependent state [9], which the natural-occurring reversal reaction (RR) phenomenon seems to confirm [10,11].

Recent data indicate that the mononuclear phagocytic system in vivo differentiates and migrates in response to a combination of factors leading to the development of a variety of cell phenotypes associated with the inflammatory phase [11,12].

Evidence of a provoked reversion of the specific anergy to *M. leprae* observed in LL cells has been reported, having motivated attempts at therapeutic interventions in the past [13,14]. *M. leprae* components, genetic background, and long-lasting antigen stimulation are among the factors capable of explaining the anergy observed in LL patients [15,16]. Secretions from the adherent cells of LL patients have been shown to inhibit lymphocyte proliferation in healthy volunteers [17]. Recent data have upheld the idea that macrophage deactivation is controlled by inflammatory suppressor genes [11]. Indeed, in leprosy, both IL-10 and cyclooxygenase-2 (COX-2) have clearly been identified as suppressor genes [18,19].

Several recent studies have described indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) -dependent T cell suppression by Antigen Presenting Cells (APCs) in many infectious and inflammatory conditions, indicating that biochemical changes due to tryptophan catabolism have a profound effect on T cell proliferation and effector functions in tissue microenvironments [20,21]. IDO

plays an active role in the human immune response by catalyzing the first and also rate-limiting step in the kynurenine pathway of tryptophan degradation, the end product being N-formyl-kynurenine in conjunction with the production of 3-hydroxyanthranilic and quinolinic acids. These products are known to function as intercellular messengers with neuroactive, pro-apoptotic, and immunoregulatory properties. However, the pro-apoptotic effects seem to be more effective in the Th1 than the Th2 lymphocytes [22,23].

The suppressor activity of the downstream tryptophan metabolites due to rate-limiting IDO enzymatic activity is assumed to be exerted by many pathways such as the generation of regulatory T cell (Treg) CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, the dependency on cytotoxic T – lymphocyte - associated protein 4 (CTLA4)-expressing cells, and IL-10 production [24,25]. Besides inhibiting intracellular pathogens [28,29], the local tryptophan-deficient environment and even the direct effect of accumulating tryptophan metabolites have also been demonstrated to induce T cell tolerance during immunosurveillance in pregnancy [26] and tumors [20,27].

The IFN- γ -dependent IDO induction by dendritic cells and macrophages so often seen during infection represents an innate pathogen elimination mechanism [29] through antimicrobial molecular synthesis and tryptophan privation. On the other hand, IDO induction could also represent an effective adaptation to an intracellular microorganism such as *M. leprae*, which, although presenting massive gene decay in its genome, can still maintain the ability to synthesize a complex amino acid like tryptophan [30]. IDO could also inhibit intracellular oxidative stress, the most efficient bactericidal mechanism against *M. leprae*. As a heme protein, IDO consumes superoxide anions during the

oxidative cleavage of tryptophan into N-formyl-kynurenine. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) is also inhibited by IDO activity through activation of heme oxygenase 1 (HO-1) [31], responsible for dismutating heme in iron, biliverdin, and carbon monoxide (CO). CO is an endogenous inhibitor of iNOS involved, together with bilirubin, in Treg tolerance induction [32]. As such, IDO would also act as a systemic attenuator of the inflammatory phase, inhibiting excessive T cell proliferation and inducing apoptosis [33].

It has been reported that prolonged secretion of inflammatory cytokines such as the presence of Tumor Necrosis Factor (TNF) in foci of chronic inflammation seems to play an anti-inflammatory role by supporting IDO expression [34-36]. In this context, it has been hypothesized that, in chronic infections, effective immunity could be impaired by the generation of IDO-mediated suppression [36].

In the present study, it was seen that IDO expression was significantly higher in LL lesions than in either BT or RR lesions. Increased IDO activity along with lower levels of L-tryptophan, and higher levels of L-kynurenine in LL than in BT patient sera were also found. It was likewise observed that *M. leprae* increased pro-inflammatory cytokine levels in monocytes as well as in IDO expression and activity.

These combined data strongly support the view of IDO as an additional mechanism in determining the gradual development of T cell - *M. leprae* - specific anergy across the clinical spectrum of leprosy, and, as such, creating a myriad of possibilities for future interventions.

Materials and Methods

Patients and clinical specimens

The acquisition of all specimens was approved by the Human Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Foundation in Brazil. Leprosy patients (20 lepromatous [LL], 19 borderline tuberculoid [BT], and 13 reversal reaction [RR]) were classified according to the Ridley and Jopling classification scale [8].

Buffy coats were obtained from normal donors (healthy controls - HCs) at the Hemotherapy Service of the Clementino Fraga Filho University Hospital, associated with the Federal University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil, in accordance with the guidelines set down in the Declaration of Helsinki.

Immunohistochemical studies

Leprosy patient (7 BT, 14 LL) skin biopsies were obtained prior to treatment at diagnosis. Four RR biopsies were collected at the onset of reversal reaction. For routine histopathological analyses, all skin tissues were stained with haematoxylin and eosin (HE) in addition to Wade stains.

To detect IDO and the phenotype of IDO⁺ cells, immunoperoxidase-labeling of cryostat sections was performed. Sections were then incubated with anti-IDO (1:50), anti-S100 (1:200), anti-CD86 (1:50), anti-CD11c (1:25), anti-CD68 (1:100), and anti-HLA-DR (1:100) in 0.1% BSA and in Ca²⁺Mg²⁺-free PBS for 1h at room temperature. Biotinylated horse or goat secondary antibodies were incubated for 1h at room temperature. Primary Abs were visualized with the Vector Elite Avidin-biotin complex kit (ABC, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), which uses an avidin-peroxidase conjugate for signal

amplification. The ABC reagent was incubated for 40 min, washed, and then incubated with substrate (3-amino-9-ethylcarbazole) for 10 min. Slides were counterstained with Mayer's haematoxylin and mounted with paramount medium (DAKO). Images were obtained via a Nikon Eclipse microscope with Image ProPlus software.

Double immunofluorescences were also performed to confirm the macrophage subtype of the IDO⁺ cells. Cryostat sections (LL, n=3) were fixed in acetone and incubated with 10% normal goat serum. Sections were incubated overnight with primary antibody anti-IDO (1:100), CD68 (1:100), CD86 (1:50), or CD209 (1:50), followed by goat anti-rabbit labeled with fluorochrome Alexa Fluor 488[®] (1:1000, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) or by goat anti-mouse labeled with fluorochrome Alexa Fluor 568[®] (1:1000, Molecular Probes). After washing, slides were mounted with Vectashield (Vector Laboratories). Images were obtained via confocal laser microscopy (LSM 510 META scanning, Zeiss, Göttingen, Germany).

Cell culture and stimulation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated under endotoxin-free conditions from heparinized venous blood by Ficoll-Hypaque (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, USA) density centrifugation. PBMC, suspended in RPMI 1640 medium containing 2mM L-glutamine, 10% fetal calf serum, and antibiotics, were cultured overnight in tissue culture plates at 37°C/5% CO₂. Monocyte purification was done by cell sorting using the CD14-positive selection magnetic cell sorting kit (Miltenyi Biotec). Monocytes were recovered, re-suspended in complete culture medium, and cultured in 24-

well plates (Costar, Cambridge, MA, USA) at 1×10^6 cells / well. Monocyte cultures were >90% pure, as judged by flow cytometry analysis. Irradiated, armadillo-derived *M. leprae* sonicate was added to the cultures at a MOI (multiplicity of infection) of 2 bacteria: cell or 10:1 for 24h. When necessary, monocytes were treated with 10 ng/ml IFN- γ (R&D Systems) overnight. For evaluation of cytokine secretion, supernatants from *M. leprae*-stimulated monocytes were harvested after 2 days of culture and stored at -20°C until future use.

RNA Preparation and Real Time PCR

RNA was extracted from frozen skin fragments or *M. leprae*-stimulated PBMC cultures. Total RNA was prepared using the Trizol reagent (Invitrogen). RNA purity was verified and cDNA synthesis carried out using the Superscript III first-strand RT-PCR kit (Invitrogen). The Taqman PCRs were performed via the universal PCR Master Mix (2x) and specific primers and probes (Applied Biosystems). PCR was performed in the ABI Prism 7000-sequence detection system (Applied Biosystems) at 50°C for 5 min, 95°C for 10 min, 50 cycles of 95°C for 15s, and 60°C for 1 min. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as an endogenous control. *IDO* (Hs00158032), *TNF* (Hs00174128), and *IFN- γ* mRNA (Hs00174143) were quantified using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method for PBMC samples and $2^{-\Delta C_t}$ (in which C_t is a threshold cycle) for biopsies [37].

Estimation of IDO activity in patient sera and supernatants from monocyte cell cultures by high performance liquid chromatography analysis (HPLC)

To detect IDO activity, serum samples from leprosy patients and supernatants from *M. leprae*-stimulated CD14⁺ cell cultures were collected and frozen in -20°C until HPLC analysis. Tryptophan (Trp) and Kynurenine (Kyn) concentrations were measured by HPLC, as previously described [38].

Immunoblotting

IDO expression was quantified by Western blot analysis. Protein extracts were obtained from skin biopsies (4 BT and 4 LL) and cellular cultures. The skin fragments (4 BT and 4 LL) and monocytes were both washed twice with ice-cold PBS and incubated for 30 min with 50µl of lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 50 mM NaF, 20 mM β-glycerophosphate, 250 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 1 mg/ml BSA, and 1:1000 of protease inhibitor cocktail II (Calbiochem, CA, USA)) adapted from Scheinman et al [39]. Afterwards, the extracts were sonified for 90 sec followed by centrifugation (15,000 xg, 20 min). Proteins (30µg) were resolved on 12% SDS-polyacrylamide gels and blotted onto nitrocellulose membranes (Bio Rad) with a semidry transfer cell (Bio-Rad). After blocking with 5% BSA and 0.15% Tween (TBS-T), blots were incubated for 1h at room temperature with 1 µg/ml antibody against IDO (H-110) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Nitrocellulose membranes were then washed three times for 5 min each with TBS-T. Anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated IgG (1:2000) was used as a secondary antibody. An enhanced chemiluminescence detection system (ECL; Amersham Biosciences) was used in all blots to detect the related secondary antibody. Blots were then stripped and reprobed for α tubulin and used as controls of the protein load.

FACS analysis of monocyte phenotypes and intracellular staining of IDO-expressing cells

Monocytes were collected with a cell scraper after 24h of culture. Cells were harvested and stained with anti-CD14, anti-CD80, anti-CD86, and anti-HLA-DR antibodies. For IDO intracellular staining after fixation and permeabilization (Fixation/Permeabilization Buffer; eBioscience, CA, USA), cells were stained with rabbit anti-IDO polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) followed by Phycoerythrin (PE)-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology). Normal rabbit IgG was used as the corresponding isotype antibody control. Flow cytometry analyses used a Cyan flow cytometer (DAKO, CA, USA). Gates were set for collection and analysis of 20,000 live events. Data were analyzed via Summit Software (DAKO).

Cytokine detection by immunoassay or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Cytokine production in *M. leprae*-stimulated monocyte cultures (TNF, IL-10, TGF- β , IL-12p40, IL-6, and IL-1 β) was measured by ELISA according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, MN, USA).

Statistical analysis

Results are reported as pooled data from the entire series of experiments. All experimental data are mean $\pm$ SE. For comparison of patient

and control data, the Friedman analysis of variance (ANOVA), Kendall coefficient of concordance test, and Wilcoxon signed-rank test were used whenever appropriate. The adopted statistical significance level was $p \leq 0.05$.

Results

High IDO protein expression in LL skin lesions

Routine histopathological analyses of skin biopsies were performed to select representative specimens of the polar forms of leprosy and RR lesions. BT lesions were characterized by an organized dermal granuloma composed of phagocytic cells with evident epithelioid differentiation surrounded by lymphocytes or giant cells (Fig. 1A). On the other hand, LL lesions were characterized by massive macrophage infiltration containing a variable number of Virchow cells full of bacilli accompanied by few lymphocytes, separated from the flat epidermis by a clear zone (Fig.1B). RR lesions showed activated macrophages with an epithelioid appearance, organized or not as granuloma (Fig. 1J).

Immunohistochemistry was performed to identify IDO protein expression in leprosy skin lesions (BT, n=7; LL, n=14; and RR, n=4). The number of IDO-positive cells was higher in the LL (50-75%) than BT lesions (<25%), in which only scattered positive cells in the periphery and in the subepidermal area outside the granuloma could be detected (Fig.1C). In LL lesions, besides the high positivity in the LL cellular infiltrate in which foamy cells predominated, isolated IDO⁺ cells with a dendritic-like morphology were detected on the dermis (Fig.1D) and in some endothelial cells. In RR lesions and, as is often the case,

in BT lesions as well, very few IDO⁺ cells (<25%) were observed in the dermal granuloma (Fig. 1J).

To characterize the IDO⁺ cell phenotype, leprosy skin tissues were also immunostained for S100, CD86, CD11c, and HLA-DR, which are surface markers present in the macrophage / DC lineage. Almost all cells constituting the LL dermal infiltrate were positive for CD86, CD11c, HLA-DR (Fig. 1F, H, and I, respectively), and CD68 (data not shown) (>75% for all markers). These patterns differed from the ones in the BT lesions, in which CD86⁺ and CD11c⁺ cells (25-50%) were detected in the center of the granuloma corresponding to the epithelioid macrophages and surrounded by a lymphocyte mantle similar to that found in RR lesions (Figs. 1E and G, respectively). In the BT and RR lesions, however, most cells were negative for IDO staining (Fig. 1C). But, in both types of lesions, some dendritic-like shaped, S100-positive cells, which may be IDO positive, were discerned on the dermis itself (Fig 1C) (data not shown).

Double-immune labeling and confocal laser microscopy were used to examine the nature of the cells expressing IDO in LL skin lesions. About 70% of the IDO-expressing cells in the inflammatory infiltrate colocalized with CD68 (50-75%) (Fig. 2A) while approximately 50% co-expressed CD86, indicating that IDO-positive cells have their origin in macrophages. Within the CD86 population (50-75%), both positive and negative IDO cells were present, suggesting the simultaneous occurrence of two different CD86⁺ cells (Fig. 2B). Single cells with a dendritic-like cell morphology revealed the presence of CD86 in the cellular membrane and IDO in the cytoplasm (insert in Fig. 2B).

To confirm the increased IDO protein expression in LL skin biopsies observed by immunohistochemistry, the IDO protein content in LL and BT biopsies was evaluated via immunoblotting. IDO expression was higher in LL in comparison to BT biopsies (Fig. 2C). This result all but confirms that IDO protein is highly expressed in LL patient cells.

IDO mRNA transcripts were assessed in tissue samples by real time PCR. The mRNA expression of IDO was observed in all groups tested although the IDO message in the LL lesions only moderately increased in comparison to what was seen to occur in the BT and RR lesions (Fig. 3A). IFN- γ and TNF mRNA expression in leprosy skin lesions were likewise analyzed. The LL and BT samples showed no differences in IFN- γ and TNF mRNA expression, except for being significantly higher in the RR lesions (Fig. 3, B and C). Although IDO protein expression was reduced in the BT and RR lesions, a strong reduction in IDO mRNA was also observed in both these samples, but notably not in LL.

High IDO activity is detected in the sera of lepromatous leprosy patients

The tryptophan:kynurenine ratio and kynurenine concentration level(s) observed in the serum are indices that reflect the systemic state of IDO activity, an important aspect that could broaden our understanding of the sometimes stark differences in the spectral clinical forms of leprosy. The IDO-activity index was measured in the sera of leprosy patients. IDO activity dramatically increased in LL patient sera relative to the findings of HCs and BT patients. The major differences observed in the tryptophan : kynurenine ratio (0.09 ± 0.008 in LL vs. 0.051 ± 0.008 in BT, $p=0.002$) and kynurenine concentration (1.4 ± 0.07 in LL vs. 0.82 ± 0.16 in BT, $p<0.0001$) indicate that IDO activity could be an

important marker and, in this capacity, might also be useful in analyzing differences in cellular immune activity and cellular microbicidal oxygen species at the two opposite poles of leprosy disease (Fig. 4 A and B).

In comparison to the IDO protein levels detected in RR lesions, the activity level in the sera of BT patients was higher. The RR levels were the lowest in all groups, including among HCs (Fig. 4A).

The patterns of the pro-inflammatory cytokines in leprosy patient sera were also examined. In this connection, the serum levels of two known IDO inducers – IFN- γ and TNF - were analyzed. In the same set of experiments reported in Fig. 4 A-B, it was evident that IFN- γ serum levels were higher in the BT versus the HC and RR sera but importantly not in the LL sera (24.63 ± 1.36 in HC vs. 66.86 ± 19.10 in BT, $p=0.0012$ and 66.86 ± 19.10 in BT vs. 25.68 ± 2.80 in RR, $p=0.0093$) while TNF was higher in the LL patients (173.1 ± 63.9 in LL vs. 49.90 ± 4.63 in BT, $p=0.02$) (Fig. 4D).

M. leprae increases IDO expression and activity in naïve and lepromatous monocytes

In order to verify whether *M. leprae* increases IDO expression in vitro, PBMC from HCs were exposed to *M. leprae* at a low MOI of 2:1 (bacilli: monocyte) for 1, 3, 6, 12, and 24 hours. As observed in Fig. 5, *M. leprae* alone successfully increased IDO mRNA expression in HC-derived PBMC after 12h of culture, maintaining a higher IDO expression for 24h after exposure to *M. leprae*. Since increased IDO gene expression in PBMC (Fig. 5) and monocytes was observed (not shown) in the present study and because macrophages and dendritic cells are the major IDO-producing cells, it was deemed appropriate to

evaluate the percentage of IDO-positive cells and IDO activity in naïve and LL monocytes. The capacity of IFN- γ to modulate IDO expression and activity in LL cells was also evaluated.

The percentage of IDO-positive cells was similar in naïve and LL non-stimulated monocytes ($2.22 \pm 0.33\%$ in HC vs. $1.52 \pm 0.69\%$ in LL) (Fig. 6A-B). By adding IFN- γ to the culture, the percentage of IDO⁺ cells in both HC and LL monocytes increased ($4.11 \pm 0.52\%$ in HC vs. $7.39 \pm 3.07\%$ in LL). Similarly, *M. leprae* increased IDO expression in both HC and LL monocytes.

As described in Materials and Methods, the induction of IDO expression by *M. leprae* was more effective in 10:1 MOI. IDO activity was also evaluated in culture supernatants by HLPC. Curiously, IFN- γ increased IDO activity in HC but not in LL supernatants in comparison to the non-stimulated cultures (0.14 ± 0.04 in IFN- γ vs. 0.063 ± 0.03 in non-stimulated cells in HC and 0.051 ± 0.037 in IFN- γ vs. 0.043 ± 0.029 in non-stimulated cells in LL supernatants) (Fig. 6A-B). *M. leprae* increased IDO activity in the supernatants of both HC and LL monocytes *versus* the supernatants of non-stimulated cells. In naïve monocytes, *M. leprae* 2:1 increased IDO activity to levels similar to those induced by IFN- γ (Fig. 6A). In LL monocyte supernatants, increased IDO activity was observed in both 2:1 and 10:1 MOI (Fig. 6B). Immunoblotting analysis demonstrated that, in LL monocytes, both *M. leprae* and IFN- γ increased IDO protein synthesis (Fig. 6C). However, 10:1 *M. leprae* MOI was, according to our flow cytometry data, more effective in inducing IDO than 2:1 MOI.

Since IFN- γ is a known IDO inducer and our results clearly suggested that *M. leprae* could also increase IDO expression and activity, it was decided to

evaluate the effect of the simultaneous addition of *M. leprae* and IFN- γ in evaluating IDO expression.

In naïve monocytes, a synergistic effect on IDO expression was seen when cells were stimulated with *M. leprae* at a high MOI 50:1 in the presence of IFN- γ (not shown) whereas no significant changes were observed when using lower MOI 2:1 or 10:1 (Fig. 6D). In LL monocytes, the synergistic effect on IDO expression could be verified when cells were stimulated with a low *M. leprae* MOI 2:1 in the presence of IFN- γ (Fig. 6E). IDO expression induced by both *M. leprae* and IFN- γ was abrogated by the IDO inhibitor, 1- methyltryptophan (1-MT) (not shown).

In order to verify the pro-inflammatory cytokine levels known to interfere with IDO induction [40], the TNF and IL-1 β levels in monocyte supernatants were analyzed. In naïve monocytes, *M. leprae* was able to increase TNF levels, as previously demonstrated by the present authors [41, 42]. In the supernatants of LL monocytes, *M. leprae* at 2:1 MOI increased TNF production in contrast to what occurred in non-stimulated cultures (7610 $\pm$ 380 pg/ml in *M. leprae* 2:1 treated vs. 3850 $\pm$ 2100 pg/ml in non-stimulated cultures). Interestingly, higher concentrations of *M. leprae* did not lead to increased TNF levels in comparison to non-stimulated cultures (Fig. 7A). TNF levels seemed to correlate with higher IDO activity in the same culture. No significant differences were observed in IL-10 production in the *M. leprae*-stimulated cells as opposed to the non-stimulated (Fig. 7C). On the other hand, IL-1 β levels increased at the higher *M. leprae* concentrations of 10:1 (Fig. 7B) and 50:1 MOI (data not shown).

Discussion

The role of the APCs in the outcome of the immune response has recently been reviewed [43]. Leprosy is a unique human disease presenting a typical clinical spectrum in correlation with the degree of the specific immune response to the infectious agent – *M. leprae*. Indeed, an antigen-specific anergy has been reported in LL [1,2]. Although genetic factors have been decisively implicated in the susceptibility of leprosy, however, the immunological spectrum is most likely dependent on other interacting factors during the course of infection [44].

The present study has demonstrated for the first time that the tryptophan rate-limiting enzyme IDO was associated with the LL form of the disease and, even more importantly, that *M. leprae* was able to induce IDO expression in LL and naïve monocytes in vitro. Moreover, high IDO expression was evident in the resident macrophages of LL lesions. At the same time, it was possible to confirm an increase in the IDO protein via immunoblotting.

Nonetheless, higher IDO activity was detected by HPLC in the sera of LL patients than that found in BT and RR patients. In the LL lesions, almost all macrophages in the infiltrate were IDO⁺, in contrast to the presence of few positive cells in the BT and RR lesions.

Our study also observed that most IDO⁺ cells co-localized with CD68 and CD86. IDO was likewise detected in dendritic-like shaped cells in both BT and LL lesions. In the latter, two subpopulations of macrophages (CD209⁺ CD1b⁻ and CD209⁻ CD16⁺) have been described [45]. It was shown that the inflammatory infiltrates in LL skin lesions presented large amounts of CD11c⁺, CD86⁺, HLA-DR⁺ and CD68⁺ cells. Altogether, these data suggest that the

infiltrate contains a mixture of macrophages and potential DCs with either a stimulatory or inhibitory function. The functional activity of IDO seems to be dependent on CD86 occupation [46]. It has been reported that IDO DC-positive cells are also positive for CD11c, HLA-DR, and CD86. However, in regard to the human macrophage, this remains a subject of debate. The availability of more well-defined surface markers capable of discriminating between the origins and differentiation stages of these populations would be welcome.

It was also shown that the expression of IDO mRNA occurred in both BT and LL lesions, being higher in the latter. These data are in correlation with the protein levels analyzed by immunohistochemistry and immunoblotting analyses. Although the IDO transcript was seen to only moderately increase in LL patients, the higher tissue protein and IDO activity levels found in the sera suggest that the regulatory steps followed in IDO function, transcription, translation, and enzymatic activity distinguish the two polar forms of leprosy since they are regulated independently [47]. Moreover, the low activity found in RR sera reinforces the idea that RR is the result of immune activation in previously non-responding patients [10, 48].

Although no significant differences were seen in TNF and IFN- γ gene expression when comparing LL and BT biopsies, analysis of cytokine production in leprosy patient sera demonstrated that BT patients had increased IFN- γ levels whereas the TNF levels were higher among the LL. Despite the low IFN- γ levels in their sera, however, the involvement of IFN- γ in IDO induction in these patients cannot be excluded as it is known that the presence of suboptimal IFN- γ levels at the infection site can induce persistent bacterial growth due to insufficient tryptophan depletion [47]. Unfortunately, sera IDO

activity has only rarely been investigated in infectious diseases. In this connection, Becerra et al. [49] found increased IDO activity in the sera of dengue virus (DENV)-infected patients during the most febrile days of the disease, indicating that IDO activity was at least partially dependent on IFN- γ .

It is known that, although they have opposite effects, IDO and iNOS are both IFN- γ - inducible genes. Nitric oxide (NO) has an inhibitory effect on IDO activity but not on its production [46]. There is a possibility that this same mechanism occurs in leprosy infection. Our previous data indicated that NO predominates in BT lesions and that macrophages isolated from LL lesions acquire the capacity to produce NO [9]. While responsible for inducing tissue damage and inflammation, iNOS and other reactive oxygen species (ROS) from the respiratory burst are closely associated with the killing of microorganisms. One response to superoxide generation is the induction of IDO [50,51], which detoxifies superoxide by using it to break up the pyrrole ring in tryptophan [52]. As such, it could be hypothesized that *M. leprae* has an advantage over this anti-oxidant axis of IDO activity. It could also be hypothesized that, in BT patients, the response for the most part takes place via iNOS and ROS induction by IFN- γ , which maintains a low bacterial load. In contrast, high bacterial loads in LL patients could contribute to increased pro-inflammatory cytokines like TNF capable of inducing relative amounts of ROS, which are then degraded by IDO activity.

Since previous studies have described monocytes as a major source of active IDO in normal peripheral blood [53], IDO protein expression was evaluated in *M. leprae* and IFN- γ -stimulated monocytes by flow cytometry and immunoblotting. *M. leprae* increased both IDO expression and activity in HC

and LL monocytes. In contrast, in BT monocytes neither *M. leprae* nor IFN- γ was able to increase IDO expression and activity (not shown). Furthermore, IFN- γ triggered an increase in IDO⁺ cells in HC monocytes and LL patient cells. However, as previously described, IDO activity was seen to increase in HC to the exclusion of LL cells. IDO enzymatic activity is regulated on both the post-transcriptional and post-translational levels [54,55] while several mechanisms are capable of affecting its functions [55]. Again [56], a discrepancy between IDO expression and activity in human monocytes was found as well. As observed in HIV models [57], it can be concluded that IFN- γ did not increase IDO activity in LL cells due to the fact that, in leprosy, IDO induction may also occur in an IFN- γ -independent pathway.

Overall, our results suggest that, in LL, *M. leprae* is capable of activating IDO gene expression and enzymatic activity, which, in turn, may perhaps lead to the unresponsiveness of T cells to *M. leprae*, precisely the opposite of what is observed in BT and RR cells. It could also be speculated that, in the early stages of *M. leprae* infection, IFN- γ -induced IDO could have an antimicrobial effect through tryptophan deprivation. However, the tryptophan metabolites might also function as either suppressors of specific T cell clones or inducers of T regulatory cells and IL-10 secretion, leading to the subsequent loss of responsiveness.

In addition to taking control of pathogen proliferation provoked by tryptophan depletion, IDO works as a counter-regulatory mechanism in avoiding the harmful effects of the inflammatory response [47,58]. Doing so IDO could downregulate the adaptive immune response as a negative feed-back loop for Th1 cells.

Moreover, in both HC and LL patient monocytes, *M. leprae* increased TNF levels, suggesting the involvement of a TNF-dependent pathway. It is curious that our in vitro data demonstrated that even though IL-1 β levels increased in intermediate MOI 10:1, low MOI 2:1 was able to augment TNF levels in LL cells.

The capacity of IFN- γ to modulate IDO expression induced by *M. leprae* was investigated since it was able to induce IDO expression in both HC and LL patient monocytes. In HC cells, a synergistic effect between *M. leprae* and IFN- γ was only observed in the presence of increased MOI 50:1 (not shown), indicating that different mycobacterial components may have an influence on IDO expression. On the other hand, in LL cells, an increase in IDO expression induced by both *M. leprae* and IFN- γ occurred in the presence of low MOI 2:1.

In summary, the present study demonstrated that *M. leprae* was able to induce IDO expression and activity in human cells, implying that the immunosuppression presented by LL patients is a multifaceted and multistep phenomenon in which the clinical presentation of each patient across the entire spectrum of leprosy depends on preserving a tight balance among the activating and deactivating factors. Considering that the IDO inhibitor has shown promising results in clinical trials [59], therapeutic interventions in LL may thus soon be forthcoming.

Acknowledgements

We would especially like to thank Helen Ferreira for her excellent technical assistance, Dr. Paulo Redner, Dr. Daniel Serra de Carvalho, Ariane Leite de Oliveira, and Danielle Fonseca de Moura for their insightful discussion of the manuscript, and Judy Grevan for editing the text.

Statement of author contributions

JSS, FAL, TPA and TOF developed and carried out experiments. JACN recruited the patients and collected the samples. EPS, ROP and ENS conceived the experiments and analysed data. JSS, ROP and ENS were involved in writing the paper and all authors approved the submitted and published versions.

References

1. Kaplan G, Weinstein DE, Steinman RM, Levis WR, Elvers U, Patarroyo ME, Cohn ZA. An analysis of in vitro T cell responsiveness in lepromatous leprosy. *J Exp Med* 1985; 162: 917- 929
2. Sieling PA, Abrams JS, Yamamura M, Salgame P, Bloom BR, Rea TH, Modlin RL. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. In vitro modulation of T cell responses in leprosy. *J Immunol* 1993; 150: 5501- 5510
3. Barnes PF, Abrams JS, Lu S, Sieling PA, Rea TH, Modlin RL. Patterns of cytokine production by mycobacterium-reactive human T-cell clones. *Infect Immun* 1993; 61: 197- 203
4. Modlin RL, Mehra V, Wong L, Fujimiya Y, Chang WC, Horwitz DA, Bloom

- BR, Rea TH, Pattengale PK. Suppressor T lymphocytes from lepromatous leprosy skin lesions. *J Immunol* 1986; 137: 2831- 2834
5. Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 1991; 254: 277- 279
 6. Laal S, Bhutani LK, Nath I. Natural emergence of antigen-reactive T cells in lepromatous leprosy patients during erythema nodosum leprosum. *Infect Immun* 1985; 50: 887- 892
 7. Moraes MO, Sarno EN, Almeida AS, Saraiva BC, Nery JA, Martins RC, Sampaio EP. Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon-gamma and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). *Scand J Immunol* 1999; 50: 541- 549
 8. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1966; 34: 255-273
 9. Moura DF, Teles RM, Ribeiro-Carvalho MM, Teles RB, Santos IM, Ferreira F, Fulco TO, Nery JA, Sampaio EP, Sarno EM. Long-Term culture of multibacillary leprosy macrophages isolated from skin lesions: a new model to study *Mycobacterium leprae*-human cell interaction. *Br J Dermatol* 2007; 157: 273-283
 10. Nath I, Vemuri N, Reddi AL, Jain S, Brooks P, Colston MJ, Misra RS, Ramesh V. The effect of antigen presenting cells on the cytokine profiles of stable and reactional lepromatous leprosy patients. *Immunol Lett* 2000; 75: 69-76
 11. Hume DA. Differentiation and heterogeneity in the mononuclear phagocyte system. *Mucosal Immunol* 2008; 1: 432-441

- 12.Hume DA. Macrophages as APC and the dendritic cell myth. J Immunol 2008; 181: 5829-5835
- 13.Sampaio EP, Moreira AL, Sarno EN, Malta AM, Kaplan G. Prolonged treatment with recombinant interferon gamma induces erythema nodosum leprosum in lepromatous leprosy patients. J Exp Med 1992; 175: 1729-1737
- 14.Kaplan G, Nusrat A, Sarno EN, Job CK, McElrath J, Porto JA, Nathan CF, Cohn ZA. Cellular responses to the intradermal injection of recombinant human gamma-interferon in lepromatous leprosy patients. Am J Pathol 1987; 128: 345-353
- 15.Alcaïs A, Sanchez FO, Thuc NV, Lap VD, Oberti J, Lagrange PH, Schurr E, Abel L. Granulomatous reaction to intradermal injection of lepromin (Mitsuda reaction) is linked to the human NRAMP1 gene in Vietnamese leprosy sibships. J Infect Dis 2000; 181: 302-308
- 16.Moraes MO, Duppre NC, Suffys PN, Santos AR, Almeida AS, Nery JA, Sampaio EP, Sarno EN. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism TNF2 is associated with a stronger delayed-type hypersensitivity reaction in the skin of borderline tuberculoid leprosy patients. Immunogenetics 2001; 53: 45-47
- 17.Salgame PR, Birdi TJ, Mahadevan PR, Antia NH. Role of macrophages in defective cell mediated immunity in lepromatous leprosy. I. Factor(s) from macrophages affecting protein synthesis and lymphocyte transformation. Int J Lepr Other Mycobact Dis 1980; 48: 172-177
- 18.Mattos KA, D'Avila H, Rodrigues LS, Oliveira VG, Sarno EN, Atella GC, Pereira GM, Bozza PT, Pessolani MC. Lipid droplet formation in leprosy:

- Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and Mycobacterium leprae pathogenesis. J Leukoc Biol 2010; 87: 371-384
- 19.Kiszewski AE, Becerril E, Baquera J, Ruiz-Maldonado R, Hernández Pando R. Expression of cyclooxygenase type 2 in lepromatous and tuberculoid leprosy lesions. Br J Dermatol 2003; 148: 795-798
- 20.Katz JB, Muller AJ, Prendergast GC. Indoleamine 2, 3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape. Immunol Rev 2008; 222: 206-221
- 21.Munn DH, Mellor AL. Macrophages and the regulation of self-reactive T cells. Curr Pharm Des 2003; 9: 257-264
- 22.Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Orabona C, Spreca A, Fioretti MC, Puccetti P. T cell apoptosis by kynurenines. Adv Exp Med Biol 2003; 527: 183-190
- 23.Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Bianchi R, Orabona C, Spreca A, Fioretti MC, Pucetti P. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. Cell Death Differ 2002; 9: 1069-1077
- 24.Savage ND, de Boer T, Walburg KV, Joosten SA, van Meijgaarden K, Geluk A, Ottenhoff TH. Human anti-inflammatory macrophages induce Foxp3⁺ GITR⁺ CD25⁺ regulatory T cells, which suppress via membrane-bound TGFbeta-1. J Immunol 2008; 181: 2220-2226
- 25.Ribas A, Comin-Anduix B, Economou JS, Donahue TR, de la Rocha P, Morris LF, Jalil J, Dissette VB, Shintaku IP, Glaspy JA, Gomez-Navarro J, Cochran AJ. Intratumoral immune cell infiltrates, FoxP3, and indoleamine 2,3-dioxygenase in patients with melanoma undergoing

- CTLA4 blockade. Clin Cancer Res 2009; 15: 390-399
26. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. Science 1998; 281: 1191-1193
27. Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. J Clin Invest 2007; 117: 1147-1154
28. Däubener W, Spors B, Hücke C, Adam R, Stins M, Kim KS, Schroten H. Restriction of Toxoplasma gondii growth in human brain microvascular endothelial cells by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. Infect Immun 2001; 69: 6527-6531
29. Popov A, Abdullah Z, Wickenhauser C, Saric T, Driesen J, Hanisch F, Domann E, Raven EL, Dehus O, Hermann C, Eggle D, Debey S, Chakraborty T, Krönke M, Utermöhlen O. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells form suppurative granulomas following Listeria monocytogenes. Infection J Clin Invest 2006; 116: 3160-3170
30. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, Honoré N, Garnier T, Churcher C, Harris D, Mungall K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies RM, Devlin K, Duthoy S, Feltwell T, Fraser A, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Lacroix C, Maclean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, Rutter S, Seeger K, Simon S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Whitehead S, Woodward JR, Barrell BG. Massive gene decay in the leprosy bacillus. Nature 2001; 409: 1007-1011

31. Oh GS, Pae HO, Choi BM, Chae SC, Lee HS, Ryu DG, Chung HT. 3-Hydroxyanthranilic acid, one of metabolites of tryptophan via indoleamine 2,3-dioxygenase pathway, suppresses inducible nitric oxide synthase expression by enhancing heme oxygenase-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320: 1156-1162
32. Lee SS, Gao W, Mazzola S, Thomas MN, Csizmadia E, Otterbein LE, Bach FH, Wang H. Heme oxygenase-1, carbon monoxide, and bilirubin induce tolerance in recipients toward islet allografts by modulating T regulatory cells. *FASEB J* 2007; 21: 3450-3457
33. Xu H, Zhang G, Ciric B, Rostami A. IDO: a double-edged sword for T(H)1/T(H)2 regulation. *Immunol Lett* 2008; 121: 1-6
34. Zganiacz A, Santosuosso M, Wang J, Yang T, Chen L, Anzulovic M, Alexander S, Gicquel B, Wan Y, Bramson J, Inman M, Xing Z. TNF-alpha is a critical negative regulator of type 1 immune activation during intracellular bacterial infection. *J Clin Invest* 2004; 113: 401-413
35. Muller AJ, Sharma MD, Chandler PR, Duhadaway JB, Everhart ME, Johnson BA 3rd, Kahler DJ, Pihkala J, Soler AP, Munn DH, Prendergast GC, Mellor AL. Chronic inflammation that facilitates tumor progression creates local immune suppression by inducing indoleamine 2,3 dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 17073-17078
36. Prendergast GC, Metz R, Muller AJ. Towards a genetic definition of cancer-associated inflammation: role of the IDO pathway. *Am J Pathol* 2010; 176: 2082-2087
37. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)}. *Method Methods*

- 2001; 25: 402-408
38. Widner B, Werner ER, Schennach H, Wachter H, Fuchs D. Simultaneous measurement of serum tryptophan and kynurenine by HPLC. Clin Chem 1997; 43: 2424-2426
39. Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, Baldwin AS. Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. Science 1995; 270: 283-286
40. O'Connor JC, André C, Wang Y, Lawson MA, Szegedi SS, Lestage J, Castanon N, Kelley KW, Dantzer R. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha mediate the upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice in response to bacillus Calmette-Guerin. J Neurosci 2009; 29: 4200-4209
41. Hernandez MO, Neves I, Sales JS, Carvalho DS, Sarno EN, Sampaio EP. Induction of apoptosis in monocytes by *Mycobacterium leprae* in vitro: a possible role for tumour necrosis factor-alpha. Immunology 2003; 109: 156-164
42. Fulco TO, Lopes UG, Sarno EN, Sampaio EP, Saliba AM. The proteasome function is required for *Mycobacterium leprae*-induced apoptosis and cytokine secretion. Immunol Lett 2007; 110: 82-85
43. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nat Rev Immunol 2008; 8: 958-969
44. Zhang FR, Huang W, Chen SM, Sun LD, Liu H, Li Y, Cui Y, Yan XX, Yang HT, Yang RD, Chu TS, Zhang C, Zhang L, Han JW, Yu GQ, Quan C, Yu YX, Zhang Z, Shi BQ, Zhang LH, Cheng H, Wang CY, Lin Y, Zheng HF, Fu XA, Zuo XB, Wang Q, Long H, Sun YP, Cheng YL, Tian

- HQ, Zhou FS, Liu HX, Lu WS, He SM, Du WL, Shen M, Jin QY, Wang Y, Low HQ, Erwin T, Yang NH, Li JY, Zhao X, Jiao YL, Mao LG, Yin G, Jiang ZX, Wang XD, Yu JP, Hu ZH, Gong CH, Liu YQ, Liu RY, Wang DM, Wei D, Liu JX, Cao WK, Cao HZ, Li YP, Yan WG, Wei SY, Wang KJ, Hibberd ML, Yang S, Zhang XJ, Liu JJ. Genomewide association study of leprosy. *N Engl J Med* 2009; 361: 2609-2618
45. 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: 653-660
46. Popov A, Schultze JL. IDO-expressing regulatory dendritic cells in cancer and chronic infection. *J Mol Med* 2008; 86: 145-160
47. Zelante T, Fallarino F, Bistoni F, Puccetti P, Romani L. Indoleamine 2,3-dioxygenase in infection: the paradox of an evasive strategy that benefits the host. *Microbes Infect* 2009; 11: 133-141
48. Walker SL, Lockwood DN. Leprosy type 1 (reversal) reactions and their management. *Lepr Rev* 2008; 79: 372-386
49. Becerra A, Warke RV, Khaja K, Evans B, Evans J, Martin K, de Bosch N, Rothman AL, Bosch I. Increased activity of indoleamine 2,3-dioxygenase in serum from acutely infected dengue patients linked to gamma interferon antiviral function. *J Gen Virol* 2009; 90: 810-817
50. Löb S, Königsrainer A, Zieker D, Brücher BL, Rammensee HG, Opelz G, Terness P. IDO1 and IDO2 are expressed in human tumors: levo-but not dextro-1-methyl tryptophan inhibits tryptophan catabolism. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58: 153-157

51. Sun Y. Indoleamine 2,3-dioxygenase--a new antioxidant enzyme. Mater Med Pol 1989; 21: 244-250
52. Hayaishi O. Utilization of superoxide anion by indoleamine oxygenase-catalyzed tryptophan and indoleamine oxidation. *Adv Exp Med Biol* 1996; 398: 285-289
53. Tattevin P, Monnier D, Tribut O, Dulong J, Bescher N, Mourcin F, Uhel F, Le Tulzo Y, Tarte K. Enhanced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis* 2010; 201: 956-966
54. Thomas SR, Terentis AC, Cai H, Takikawa O, Levina A, Lay PA, Freewan M, Stocker R. Post-translational regulation of human indoleamine 2,3-dioxygenase activity by nitric oxide. *J Biol Chem* 2007; 282: 23778-23787
55. Anderson P. Post-transcriptional control of cytokine production. *Nat Immunol*, 2008; 9: 353-359
56. Knubel CP, Martínez FF, Fretes RE, Díaz Lujan C, Theumer MG, Cervi L, Motrán CC. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is critical for host resistance against *Trypanosoma cruzi*. *FASEB J* 2010; 24: 2689-2701
57. Manéglier B, Malleret B, Guillemin GJ, Spreux-Varoquaux O, Devillier P, Rogez-Kreuz C, Porcheray F, Théron P, Dormont D, Clayette P. Modulation of indoleamine-2,3-dioxygenase expression and activity by HIV-1 in human macrophages. *Fundam Clin Pharmacol* 2009; 23: 573-581
58. Romani L, Zelante T, De Luca A, Fallarino F, Puccetti P. IL-17 and therapeutic kynurenines in pathogenic inflammation to fungi. *J Immunol* 2008; 180: 5157-5162

59. Soliman HH, Antonia S, Sullivan, Vahanian N, Link C. Overcoming tumor antigen anergy in human malignancies using the novel indeolamine 2,3 dioxygenase (IDO) enzyme inhibitor, 1-methyl-D-tryptophan (1MT). J Clin Oncol 2009; 27: 15s

Figure Legends

Figure 1. *IDO protein expression in leprosy lesions in vivo and cell phenotypes.*

BT lesions are characterized by the presence of dermal epithelioid granuloma (white arrow, A) and LL lesions by the presence of massive, foamy macrophage infiltration and scattered lymphocytes (black asterisk, B) separated from the flat epidermis by a clear zone (black arrow, B). In BT, a few scattered IDO⁺ cells are detected within the sub-epidermal area but are almost entirely absent in the dermal granuloma (black arrows, C). In LL, high numbers of IDO⁺ cells are detected in the dermal inflammatory infiltrates in both lesions (black asterisk, D). IDO-positive cells and DC-like shaped cells can be seen within the subepidermic zone (black arrows, D). Some scattered CD86⁺ cells were observed inside the dermal granuloma in a BT lesion (black arrows, E). In LL, CD86 expression is detected in the dermal inflammatory infiltrate in the majority of cells (black arrows, F). In BT, CD11c expression is mainly detected inside the granuloma (white asterisk, G) while, in the LL lesions, CD11c and HLA-DR expression are observed inside the dermal inflammatory infiltrate (white asterisks, H, I, respectively). Similarly to the BT lesions, very few IDO⁺ cells are detected in the RR lesions (black arrows, J). The findings shown are representative of 7 BT, 14 LL, and 4 RR samples. (A-B) Haematoxylin-eosin staining was used for routine diagnosis. (C-J) The immunoperoxidase method

was counterstained with haematoxylin. Scale bars = 50 μ m. All images were obtained via Nikon E400 Eclipse and processed by Image ProPlus software.

Figure 2. *IDO protein expression in lepromatous skin lesions by immunofluorescence and immunoblotting assays.* (A) Double-immunofluorescent images revealed that most IDO⁺ cells co-localize to inflammatory macrophages (CD68⁺ cells) (white arrows). (B) Some single CD86⁺ cells also express IDO, exhibiting a dendritic-like cell morphology (white arrows and insert). Isolated cells present dendritic-like cell morphology in which IDO is located in the cytoplasm (white asterisk) and CD86 is inside the cellular membrane (white arrowhead) (see insert). IDO (green, Alexa Fluor 488[®]) is double-stained with CD68 or CD86 antibodies (red, Alexa Fluor 568[®]). Double-positive cells are yellow. Photographs of the single stainings for IDO, CD68, and CD86 are also shown. Data shown are representative of 3 LL cryostat samples. Images were visualized and obtained by a laser confocal microscope (Zeiss). Scale bars = 50 μ m. (C) The expression of IDO in skin biopsies was evaluated by immunoblotting. Extracts of 4 LL and 4 BT skin lesions were evaluated; and a representative blot of one LL and one BT extract was demonstrated. A densitometry analysis of the blots was performed, showing an IDO/Tubulin ratio. Results are expressed as mean $\pm$ SEM (n=4); * = $p < 0.05$.

Figure 3. *Differential cytokines and IDO expression in skin biopsies of leprosy patients.* Biopsies were obtained from LL (n=11), BT (n=10), and RR leprosy (n=5) patients. Real time PCR was performed to measure the mRNA levels of indoleamine 2,3- dioxygenase (IDO) (A), IFN- γ (B), and TNF (C). Results are

the means $\pm$ standard error from 4 independent experiments. A Mann-Whitney t test was used for statistical analysis, in which (*) means p value < 0.05 and (**) means p value < 0.01 .

Figure 4. *Higher IDO activity in LL patient sera.* The rate of IDO activity was evaluated by determining the amounts of kynurenine and tryptophan (kyn/trp), as determined by HPLC analysis in the sera of: (HC) $n=10$, (LL) $n=10$, (BT) $n=9$ and (RR) $n=10$; (A). (B) Sera kynurenine levels are shown. (C-D) Serum levels of IFN- γ and TNF were evaluated by ELISA. Results are the means $\pm$ standard error of at least 4 independent experiments. A Kruskal Wallis Test / Dunn's Multiple Comparison Test was used for statistical analysis, in which (*) means p value < 0.05 , (**) means p value < 0.01 , and (***) means p value < 0.001 .

Figure 5. *M. leprae increases IDO expression in blood cells.* PBMCs from HCs were stimulated or not with *M. leprae* at a MOI of 2:1 (bacilli: cells) for 1, 3, 6, 12, and 24 h, respectively. Cells were processed, as described in Materials and Methods, and analyzed by real time PCR. Results are expressed as a fold induction in a mean $\pm$ standard error of 5 independent experiments. A Wilcoxon test was used for statistical analysis in which (*) means p value < 0.05 and (**) means p value < 0.01 . NS = non-stimulated cells.

Figure 6. *Differential IDO expression by monocytes stimulated with M. leprae at a different multiplicity of infection.* Monocytes of LL patients ($n=5$) and HCs ($n=4$) were stimulated with *M. leprae* at a low MOI of 2:1 (bacilli: monocyte) and an intermediate multiplicity of infection (MOI) of 10:1 for 24h. Alternatively,

monocytes were stimulated with IFN- γ (10ng/ml). (A-B) The relationship between IDO expression, observed by flow cytometry analysis (black bars), and IDO activity, as evaluated by the kynurenine / tryptophan ratio via HPLC (white bars), in HCs (A) and LL patients (B). (*) means p value < 0.05 in relation to non-stimulated cultures. (C) Cell lysates from *M. leprae* or IFN- γ -stimulated LL monocytes were analyzed by immunoblotting with an antibody against IDO or Tubulin. A representative of 3 independent blottings is shown. (D-E) The percentage of IDO⁺ cells in both *M. leprae* and IFN- γ -stimulated cells was ascertained. (D) HC monocytes and (E) LL monocytes. A Mann-Whitney t test was used for statistical analysis, in which (*) means p value < 0.05, (**) means p value < 0.01, and (***) means p value < 0.001. NS = non-stimulated cells.

Figure 7. *Cytokine production in LL patient monocytes stimulated with M. leprae at a different multiplicity of infection.* LL patient monocytes were stimulated with *M. leprae* at 10:1. Cell supernatants were collected 24h post-stimulation and assayed by ELISA for the presence of cytokines. Results are shown for TNF (A), IL-1 β (B), IL-10 (C). Results are the means $\pm$ standard error of 3 independent experiments performed in duplicate. A Mann-Whitney t test was used for statistical analysis in which (*) means p value < 0.05. NS = non-stimulated cells.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)