MARIA DE LOURDES PALERMO FERNANDES NEVES

**Análise das células T regulatórias e expressão de moléculas
coestimulatórias em células mononucleares de pacientes com
Hanseníase e sua correlação com a produção de citocinas**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de: Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Gil Benard

**SÃO PAULO
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Neves, Maria de Lourdes Palermo Fernandes

Análise das células T regulatórias e expressão de moléculas coestimulatórias em células mononucleares de pacientes com Hanseníase e sua correlação com a produção de citocinas / Maria de Lourdes Palermo Fernandes Neves. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.

Orientador: Gil Benard.

Descritores: 1.Hanseníase 2.Mycobacterium leprae 3.Linfócitos T reguladores
4.Molécula co-estimuladora B7-1 5.Molécula co-estimuladora B7-2 6.Interleucina-10
7.Interferon gama

USP/FM/DBD-077/13

“Há homens que lutam um dia e são bons, há outros que lutam um ano e são melhores, mas há outros que lutam toda vida”. Estes são imprescindíveis.

Bertold Brech

“Já que vive, busque dar o melhor de si, tente escrever seu nome na história. Faça por onde e aproveite tudo de bom que a vida pode lhe oferecer. Não viva em vão, encontre um sentido”.

William Palermo F. Neves

DEDICATÓRIA

Ao meu marido e grande amor Ricardo Casalino, obrigado pela paciência, por acreditar e me ajudar em mais essa etapa de minha vida. Exemplo de dedicação, persistência e raça, você foi fundamental nesse processo.

A minha amada mãe Alba Palermo, meu maior incentivo. Sempre estive ao meu lado, companheira e amiga fiel, ensinou-me a importância da carreira acadêmica, de atingir o topo da pirâmide, ensinou-me a importância do ensinar acima de tudo, que desde sempre lutou pela hanseníase e mostrou-me qual caminho seguir!

Ao meu querido pai William Neves, batalhador, trabalhador e vencedor na carreira médica. Ensinou-me a necessidade do trabalho, da dedicação e perseverança para alcançar um objetivo.

Ao meu querido irmão William Michel, exemplo de seriedade e dedicação, obrigada pelas conversas e conselhos, que sempre procurei seguir! Estarei sempre ao seu lado!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Gil Benard, pesquisador incansável, obrigada por toda dedicação prestada a minha formação, pelos ensinamentos na área de pesquisa, pelas discussões e todo desenvolvimento de raciocínio imunológico que sem você não seria possível.

À professora, e grande amiga, Dr^a. Suely Carneiro, por acreditar em minha capacidade, por ter me trazido até aqui e por estar sempre ao meu lado, como grande fonte de inspiração. Obrigada pelos ensinamentos médicos, mas, sobretudo pelos conselhos de vida.

À Dr^a. Camila Cacere, que esteve ao meu lado durante o desenvolvimento do projeto, companheira e confidente, obrigada por ter aceitado esse desafio e ter acreditado na realização desse trabalho – obrigada por sua paciência de ensinar e por toda dedicação prestada a minha formação.

À Prof^a. Dr^a. Maria Angela Trindade, grande companheira de ambulatório, obrigada pelos ensinamentos, discussões e grande aprendizado. Sua dedicação e luta contra a hanseníase foi de grande importância para minha formação, sempre me recordo de seus conselhos e de sua forma carinhosa de cuidar dos pacientes.

A Prof^a. Dr^a Míriam Sotto, Coordenadora da pós graduação e do laboratório de Histopatologia do HC -USP. Orientadora incansável, agradeço pela dedicação prestada a pesquisa, ensino e engrandecimento da dermatologia. Tenho grande admiração, respeito e carinho. Obrigada pela oportunidade!

Aos amigos Dra Carla Pagliari e Wellington L. F. Silva, pelo auxílio tão precioso na execução desse projeto, agradeço pelo incentivo e ensinamentos.

A Sra. Eli, secretária do Curso de Pós-Graduação em Dermatologia do HC-USP, gostaria de agradecer pela contribuição para que a minha trajetória se completasse, sempre com boa vontade, carinho e eficiência.

Às secretárias do LIM-56, Juliana, Celeste e Edna, amigas que estiveram sempre presentes, carinhosas, prestativas e ajudando sempre que preciso.

Aos meus amigos queridos (Gildetes – Vanessa, Léa, Suzana, Adriana, Guilherme, Ana Paula) pelo apoio e por estarem sempre ao meu lado nos momentos difíceis.

Aos integrantes, amigos, companheiros do LIM-56 obrigada pela convivência, pela alegria e pelos ensinamentos.

Agradeço todos os colegas professores, alunos e funcionários do setor de dermatologia da Universidade de São Paulo, obrigada pela compreensão, apoio e carinho. Foi um grande presente e orgulho frequentar os ambulatórios e setores do departamento.

Um agradecimento especial para todos os pacientes vocês tornaram essa tese possível. E sei que fizeram com toda boa vontade, vocês se doaram pela ciência.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referencias: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2012.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Hanseníase	2
1.2	Imunopatogenia	6
1.3	Moléculas Coestimulatórias, Células T Regulatórias e a Resposta Imune Celular.....	10
2	OBJETIVOS	18
2.1	Geral	19
2.2	Específicos	19
3	MÉTODOS.....	20
3.1	Pacientes e Controles	21
3.2	Antígenos	21
3.3	Obtenção e Estimulação de Células Mononucleares de Pacientes e Controles.....	22
3.4	Análise da Expressão das Moléculas Coestimulatórias por Citometria de Fluxo	23
3.5	Separação de Células CD14+ por Nanopartículas Magnéticas (EasySep, STEMCELL Technologies).....	23
3.6	Estudo Imunohistoquímico de Células T com Expressão de CD25 e Foxp3	25
3.7	Estudo Imunohistoquímico de Citocinas IL-10 e TGFβ	26
3.8	Dupla-Marcação Imunohistoquímica para Detecção Concomitante de Células com Expressão de Foxp3 e CD25.....	27
3.9	Análise Estatística.....	28
3.10	Aspectos Legais de Bioética, Biossegurança, Propriedades Intelectuais e Outras Determinações Pertinentes	29
4	RESULTADOS	30
4.1	Artigo 1 - Increased Expression of Regulatory T Cells and Down-Regulatory Molecules in Lepromatous Leprosy.....	31
4.1.1	Abstract	31
4.1.2	Introduction	32
4.1.3	Patients and Materials	34
4.1.4	Results	38
4.1.5	Discussion	42
4.1.6	References	46
4.2	Artigo 2 - Differential expression of the costimulatory molecules CD86, CD28, CD152 and PD-1 correlates with the host-parasite outcome in leprosy	49
4.2.1	Abstract	49

4.1.2	Patients, Materials and Methods	53
4.1.3	Results	56
4.1.4	Discussion	62
4.1.5	References	66
5	DISCUSSÃO	70
6	CONCLUSÕES	80
7	ANEXOS	83
8	REFERÊNCIAS.....	92
	APÊNDICE	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	- Células apresentadora de antígeno
BAAR	- Bacilo álcool-ácido resistente
BB	- Bordeline borderline
BCG	- Bacilo de Calmette- Guérin
BL	- Borderline lepromatous
BSA	- Albumina sérica bovina
BT	- Borderline tuberculoid
CD 152	- Cluster of Differentiation 152
CD 39	- Cluster of Differentiation 39
CD 73	- Cluster of Differentiation 73
CD	- Cluster of Differentiation
CD14	- Linfócito T (CD14+)
CD25	- Cluster of Differentiation 25
CD28	- Cluster of Differentiation 28
CD3	- Linfócito T (CD3+)
CD4	- Linfócito T(CD4+)
CD8	- Linfócito T(CD8+)
CD80	- Cluster of Differentiation 80
CD86	- Cluster of Differentiation 86
CFZ	- Clofazimina
CMA	- Candida Metabolic Antigen
CMN	- Célula mononuclear do sangue periférico
CPH	- Complexo Principal de Histocompatibilidade
CTLA-4	- Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
DDS	- Dapsona
DNA	- Acido desoxirribonucléico
EDTA	- Ácido etileno-diamino-tetracético
ELISA	- Enzima- imunoensaio
ENH	- Eritema Nodoso Hansênico
FITC	- Isotiocianato de fluoresceína
FoxP3	- Forkhead box P3
GITR	- Receptor da família do TNF induzido por glicocorticoide
GMCSF	- Fator estimulador do crescimento de granulócito e monócito
HIV	- human immunodeficiency virus
I	- Hanseníase Indeterminada ou Inicial
ICOS	- Indutor coestimulatório de células T

IFN- γ	- Interferon gama
IL-10	- Interleucina 10
IL-12	- Interleucina 12
IL-15	- Interleucina 15
IL-2	- Interleucina 2
IL-4	- Interleucina 4
IL5	- Interleucina 5
LICOS	- Ligantes do Indutor coestimulatório de células T
LL	- Lepromatous
LPS	- Lipopolissacarídeo
MB	- Hanseníase multibacilar
MFI	- Intensidade média de fluorescência
MLCWA	- Antígeno de Mycobacterium leprae
OMS	- Organização Mundial de Saúde
OX40 (CD134)	- Membro da família dos receptores de TNF
PABA	- Ácido para-amino-benzóico
PB	- Hanseníase paucibacilar
PBMC	- Célula mononuclear de sangue periférico
PBS	- Tampão fosfato-salino
PD-1	- Programador de morte 1
PDL-1	- Ligante do programador de morte 1
PDL-2	- Ligante do programador de morte 2
PE	- Fluorocromo ficoeritrina
PE/CY5	- Ficoeritrina-cianina 5
PGL-1	- Phenolic glycolipid-1
PHA	- Mitógeno phytohemagglutinin
PQT	- Poliquimioterapia
PQT-MB	- Poliquimioterapia multibacilar
RFP	- Rifampicina
RNA _m	- áÁcido ribonucleico mensageiro
RPMI	- Roswell Park Memorial Institute medium
RR	- Reação reversa
T	- Tuberculoide
TCR	- Receptor de células T
TGF- β	- Fator de crescimento transformador β
Th-1	- Linfócito T helper tipo 1
Th-2	- Linfócito T helper 2
TNF- α	- Fator de necrose tumoral alfa
Treg	- Células T regulatórias
WHO	- World Health Organization

RESUMO

Moraes MLPFN. *Análise das células T regulatórias e expressão de moléculas coestimulatórias em células mononucleares de pacientes com Hanseníase e sua correlação com a produção de citocinas* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Introdução: Hanseníase, doença crônica, incapacitante, causada pelo *M.leprae*, que afeta a pele e os nervos periféricos. Manifesta-se como doença espectral, que exhibe dois polos imunologicamente distintos, denominados hanseníase virchowiana (lepromatous - LL), caracterizada por uma resposta celular ineficiente; e hanseníase tuberculoide (Tuberculoid - TT), com resposta imune celular efetiva. A ativação de células T requer a sinalização através de moléculas coestimulatórias expressas em células apresentadoras de antígeno e seus ligantes nas células T. As células T regulatórias (Treg) exercem importante papel no mecanismo de falha do controle da disseminação antigênica nas formas graves das doenças crônicas granulomatosas, mas seu real papel na hanseníase ainda não foi elucidado. **Métodos:** Estudamos a expressão das moléculas coestimulatórias e células Treg na resposta imune de pacientes nos diferentes espectros da doença. A expressão de células Treg foi quantificada por citometria de fluxo (CD4+CD25+FoxP3+) nas células mononucleares do sangue periférico de pacientes e controles (16 eram virchowianos, 12 tuberculoides e 6 controles) estimulados *in vitro* com o antígeno do *M. leprae* e com o mitógeno phytohemaglutinina, bem como nas lesões de pele por imunohistoquímica. A expressão de moléculas coestimulatórias (CD80, CD86, CD28, CTLA-4, PD-1, ICOS) foi avaliada por citometria de fluxo *in vitro*, a partir do estímulo de células mononucleares provenientes de 14 pacientes virchowianos, 14 tuberculoides e 10 indivíduos saudáveis expostos ao bacilo. A resposta linfoproliferativa, a produção de citocinas (IL10 e IFN- γ) *in vitro* e a expressão *in situ* de IL-10, TGF β e CTLA-4 também foram determinadas. **Resultados:** Nós demonstramos que pacientes virchowianos apresentam deficiência na expressão da molécula CD86 na superfície de monócitos, e isso contribui para uma apresentação antigênica ineficiente, favorecendo o estado de anergia observado nesse grupo de pacientes. Observamos ainda, que o bloqueio da expressão dessa molécula, mas não do CD80 inibe a resposta linfoproliferativa ao *M.leprae*. Ainda no polo virchowiano anérgico, observamos redução da expressão de moléculas coestimulatórias de sinalização positiva (CD28, CD86) na superfície dos linfócitos. Em contraste, nos

pacientes tuberculoïdes notamos um aumento da expresso de molculas de sinalizao negativa (CTLA-4 e PD-1), que pode representar uma provvel modulao da resposta imune exacerbada, regulando dessa forma os efeitos deletrios da hiperreatividade celular. Notavelmente, os contatos tambm expresso em menor intensidade CD86 e CD28, mas no se observou expresso exacerbada de CTLA-4 ou PD-1, sugerindo que eles provavelmente desenvolvem resposta imune balanceada sem que haja necessidade de sinalizao imunossupressora. Observamos ainda, que o antgeno do *M.leprae* induz uma significativa reduo da resposta linfoproliferativa, mas um aumento significativo de clulas Treg no sangue e na pele dos pacientes virchowianos, quando comparado ao grupo tuberculoide. Em paralelo, notamos o aumento da expresso de molculas anti-inflamatrias (IL-10 e CTLA-4) nas leses cutneas desses pacientes virchowianos. **Concluso:** Nossos resultados sugerem que clulas Treg e molculas coestimulatrias desempenham papel importante na patognese da hansenase, especialmente no polo virchowiano, em que favoreceria a anergia e a multiplicao bacilar.

Descritores: Hansenase. *Mycobacterium leprae*. Linfcitos T reguladores. Molcula coestimuladora B7-1. Molcula coestimuladora B7-2. Interleucina-10. Interferon gama.

SUMMARY

Moraes MLPFN. *T regulatory cells and expression of costimulatory molecules in peripheral blood mononuclear cells from patients with leprosy and their correlation with the cytokine secretion* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Introduction: Leprosy, caused by the bacillus *Mycobacterium leprae*, is a chronic, incapacitating disease that affects the peripheral nerves and skin. Leprosy manifests as a spectral disease, exhibiting two polar sides, namely, lepromatous leprosy (LL) characterised by impaired T-cell responses and tuberculoid leprosy in which T-cell responses are strong. Proper T-cell activation requires signalling through costimulatory molecules expressed by antigen presenting cells and their ligands on T-cells. T regulatory cells (Tregs) play an important role in the mechanism of host's failure to control pathogen dissemination in severe forms of different chronic granulomatous diseases, but their role in leprosy has not yet been elucidated. The objective of this study was to investigate the influence of costimulatory molecules and Tregs cells on the immune responses of subjects along the leprosy spectrum. Patients and **Methods:** Tregs were quantified by flow cytometry (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients (16 lepromatous, 12 tuberculoids and controls (n = 6) stimulated *in vitro* with a *M. leprae* antigenic preparation and phytohemagglutinin as well as in skin lesions by immunohistochemistry. The expression of the costimulatory molecules (CD80, CD86, CD28, CTLA-4, PD-1, ICOS) was evaluated in *in vitro*-stimulated peripheral blood mononuclear cells isolated from 14 lepromatous and 14 tuberculoid patients, and 10 healthy individuals exposed to the bacillus. The lymphoproliferative (LPR), interleukin-10 (IL-10), and interferon-g (IFN-g) responses of the *in vitro*-stimulated peripheral blood mononuclear cells and the *in situ* expression of IL-10, transforming growth factor-b (TGF-b), and cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) were also determined. **Results:** We show that lepromatous patients have defective monocytes' CD86 expression, likely contributing to the impairment of the antigen presentation process and to their anergy. Accordingly, anti-CD86 blocking monoclonal antibody, but not anti-CD80 antibody, inhibited the lymphoproliferative response to *Mycobacterium leprae*. Consistent with the lepromatous pole anergy, there was reduced T-cells' expression of the positive signaling costimulatory molecules CD28 and CD86 in these patients. Tuberculoid patients, on the other hand, had increased

expression of the negative signaling CTLA-4 and PD-1 molecules, probably representing a means of modulating exacerbated immune response and avoiding immunopathology. Interestingly, contacts exhibited proper CD86 and CD28 expression, but not exacerbated CD152 and PD-1 expression, suggesting that they tend to develop a balanced immunity without requiring immunosuppressive costimulatory signaling. We also observed that *M. leprae* antigens induced significantly lower lymphoproliferation but significantly higher Treg numbers in lepromatous than tuberculoid patients and contacts. Mitogen-induced lymphoproliferation and Treg frequencies were not significantly different between the three groups. Tregs were also more frequent *in situ* in multibacillary patients, and this was paralleled by increased expression of the anti-inflammatory molecules IL-10 and CTLA-4, but not TGF. **Conclusion:** Our results suggest that Tregs and costimulatory molecules play a major role in the pathogenesis of leprosy, especially the lepromatous pole, in which they would act to favor the anergy and the unrestricted multiplication of the bacilli.

Descriptors: *Mycobacterium leprae*. Costimulatory molecules B7.1 and B7.2. Interleukin-10. Regulatory T-Lymphocytes. Interferon-gamma.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hanseníase

A hanseníase, causada pelo *Mycobacterium leprae*, é uma doença infecciosa crônica granulomatosa, cujas manifestações clínicas predominantes são lesões de pele, mucosas e nervos periféricos (Lockwood, 2004).

Caracteriza-se por um amplo espectro de formas clínicas as quais dependem em parte, da resposta imune do hospedeiro. O alto potencial incapacitante da doença está diretamente relacionado à capacidade de penetração do *M. leprae* na célula nervosa e seu poder imunogênico. Manifesta-se por um quadro clínico polimorfo, pode apresentar surto de agudização e gerar incapacidades quando diagnosticada tardiamente (Lockwood *et al.*, 1993; Britton e Lockwood, 2004).

Apesar da poliquimioterapia implantada há mais de duas décadas que reduziu muito a prevalência (192.246 casos registrados início 2011), ainda persiste com alta endemicidade em algumas regiões da Angola, Brasil, República Africana Central, República Democrática do Congo, Índia, Madagascar, Moçambique, Nepal e República Unida da Tanzânia (WHO, 2012).

No Brasil a prevalência de casos novos registrados em 2011 foi de 33.955, apresentando um coeficiente de detecção considerado alto (17,65 por 100 mil habitantes), sendo que mais de 35% dos casos novos são diagnosticados com algum grau de incapacidade física, o que indica diagnóstico tardio. Vale ressaltar também que o coeficiente de detecção em indivíduos menores de 15 anos é considerado muito

alto (5,22 por 100 mil habitantes), indicando doença recente e existência de focos de transmissão ativos (Brasil, 2012).

Mycobacterium leprae (ML) é um bastonete álcool ácido resistente (BAAR), reto ou levemente encurvado, com 1,0 a 8,0 micra de comprimento por 0,2 a 0,4 micra de largura, que podem ser vistos isolados, agrupados ou em agrupamentos compactos unidos por uma substância gelatinosa (gleia), quando são chamados globias, dispostos de modo semelhante a cigarros colocados paralelamente em um maço. O ML é a única bactéria que apresenta esse tipo de disposição (Brennan, 1986; Bryceson e Pfaltzgraff, 1990; Colston, 1993).

Geralmente gram-positivo, de crescimento lento (cerca de 13 dias), é um parasita intracelular, possui cápsula constituída por dois lípides: o dimicocerosato de ftiocerol e o glicolípido fenólico-1 (*phenolic glycolipid*-1 - PGL-1), que contém um grupamento trissacarídico específico do *M. leprae* (Brennan, 1986; Bryceson e Pfaltzgraff, 1990). Recentemente, demonstrou-se que o PGL-1 é fundamental na entrada do bacilo na célula de Schwann, unindo-se ao receptor α -destroglicana e laminina α_2 da membrana basal (Rambukkana *et al.*, 1998). Por isso, essa é a única micobactéria com PGL-1 e capacidade neurotrópica. A colonização de células de Schwann por ML também estimula a formação de granuloma e injúria do nervo mediada por célula (Spierings *et al.*, 2001).

A infecção se inicia em macrófagos, células endoteliais e células de Schwann. Esse bacilo não cresce em meios de cultura artificiais, ou seja, não é cultivável *in vitro*.

A transmissão é inter-humana, através do contato íntimo e prolongado com paciente multibacilar (forma infectante da doença), sem tratamento. A principal via de eliminação do bacilo e a mais provável via de entrada deste no organismo são as

vias áreas superiores (mucosa nasal e orofaringe). O período de incubação é considerado longo, cerca de cinco anos em média, podendo variar de dois a mais de 20 anos (Ridley e Jopling, 1966; Britton e Lockwood, 2004).

Após a fase Indeterminada ou Inicial (I) caracterizada por mancha hipocrômica hipoestésica, pode evoluir em diferentes formas que variam segundo a resistência imune celular do indivíduo constituindo um modelo de doença espectral horizontal. De um lado do espectro se dispõe a forma tuberculoide (*tuberculoid* - TT) caracterizada por poucas lesões, bem delimitadas e assimétricas, ou placa eritematosa, anestésica e/ou nervo espessado, com baciloscopia negativa, e do ponto de vista histopatológico observa-se reação granulomatosa tuberculoide, sendo que a reação de Mitsuda revela-se positiva. Todos esses parâmetros apontam para a presença de uma boa resposta imune celular. Do lado oposto do espectro se dispõe a forma virchowiana (*lepromatous* - LL) caracterizada por pápulas, nódulos, infiltração difusa, lesões simétricas, nervo espessado, eventualmente manifestações sistêmicas (nasal, laringe, faringe, olhos, articulações, etc.), baciloscopia altamente positiva, e histopatologia demonstrando infiltrado de histiócitos vacuolizados e grande número de bacilos. A reação de Mitsuda neste polo é sempre negativa e observam-se níveis elevados de anticorpos específicos para o PGL-1. No centro do espectro se encontra o grupo dimorfo (*borderline-tuberculoid* - BT, *borderline borderline* - BB, e *boderline lepromatous* - BL) (Opromolla, 2000).

A fim de operacionalizar o tratamento, os indivíduos podem ser agrupados quanto ao número de lesões: Hanseníase Paucibacilar (PB), em que os indivíduos apresentam até cinco lesões e/ou um tronco nervoso acometido, e que inclui as formas Indeterminada (I), Tuberculoide (T) e *Borderline* Tuberculoide (BT); e

Hanseníase Multibacilar (MB), em que os indivíduos apresentam mais de cinco lesões e/ou mais de um tronco nervoso acometido, e inclui as formas *Borderline borderline* (BB), *Borderline lepromatous* (BL) e *Lepromatous* (LL) (WHO, 2004).

A hanseníase pode apresentar no curso crônico quadros agudos denominados Estados Reacionais relacionados à resposta imunológica do indivíduo aos antígenos bacilares. Ocorrem em geral durante o tratamento, mas podem surgir após o tratamento ou muitas vezes possibilitam o diagnóstico (tardio) da hanseníase. A reação tipo 1 ou reversa (RR) é mediada por célula (imunidade celular), ocorre nas formas *Borderline* (BT, BB, BL). Caracterizam-se por: pápulas, placas eritemato-edematosas novas ou exacerbação das preexistentes. A reação tipo 2 ou Eritema Nodoso Hansênico (ENH) ocorre em especial por depósito de imunocomplexos nas formas multibacilares (BB, BL, LL). Caracterizam-se por: nódulos eritematosos dolorosos, adenite, artrite, iridociclite, epididimites, febre, mal estar geral (Lockwood *et al.*, 1993; Walker e Lockwood 2007).

O comprometimento neurológico na hanseníase, se clínico ou subclínico, ocorre em todas as formas, em associação, ou não, com o envolvimento dermatológico. O desenvolvimento deste comprometimento pode ocorrer durante os estados reacionais (RR e ENH) em que podem ocorrer neurites agudas e subagudas, e a neurite silenciosa, que provoca lesão neural progressiva sem sinais clínicos evidentes.

1.2 Imunopatogenia

As várias formas clínicas estão relacionadas a diferentes respostas imunes do hospedeiro. No polo tuberculoide, as lesões são caracterizadas por infiltração de linfócitos CD4+ que expressam IFN- γ , os quais formam granulomas compactos contendo células epitelioides e células gigantes envolvendo estruturas nervosas da derme; raramente são encontrados bacilos. Esta potente resposta imune celular é corroborada, *in vitro*, pela intensa resposta linfoproliferativa e secreção de citocinas tipo Th-1, e, *in vivo*, pela positividade da reação de Mitsuda e uma discreta resposta de anticorpos. No polo oposto, a hanseníase virchowiana é caracterizada pela ausência de resposta imune celular específica, porém reatividade relativamente preservada a outras micobactérias. A multiplicação dos bacilos permanece não controlada, e observam-se nas lesões macrófagos repletos de bacilos, com aspecto esponjoso. A presença de células CD4+ e CD8+ é escassa, e os granulomas mal organizados. Há presença de altos títulos de anticorpos anti-PGL-1 contra outras proteínas específicas do bacilo, assim como de antigenemia e antigenúria (Roche *et al.*, 1991; Triccas *et al.*, 1996; Cho *et al.*, 2001).

Entre as formas polares da hanseníase também existem as formas instáveis, com amplo espectro de manifestações clínicas e que podem desencadear quadros reacionais. A hanseníase dimorfa (BB), pode adquirir características tanto tuberculoide (BT), como virchowiana (BL), ou simplesmente permanecer como dimorfa (BB), dependendo da intensidade de resposta imune celular do hospedeiro. No entanto, na evolução da forma BT para BL, observa-se uma progressiva tendência à diminuição da resposta celular associada a um aumento da carga bacilar e da resposta humoral (Foss *et al.*, 1993; Britton e Lockwood, 2004).

O entendimento dos mecanismos imunológicos subjacentes à diversidade do espectro clínico da hanseníase, e em especial da anergia antígeno-específica do polo virchowiano, tem sido o foco principal da investigação imunológica. Entre as possibilidades que têm sido levantadas para elucidar as alterações imunológicas, se incluem as hipóteses de desvio imunológico (“immunedevisation”) da resposta mediada por células TCD4+, de deleção das células T reativas a antígenos bacilares no polo virchowiano, e presença de células T regulatórias ou supressoras. A hipótese de desvio imunológico (de Th-1 para Th-2) é respaldada por várias observações clínico-laboratoriais, desde a infiltração por linfócitos TCD4+ com perfil Th-1, produção intensa de IFN- γ , TNF- α , IL-2 e 15, até a expressão intensa de RNA mensageiro (RNAm) para IL-12, importante para o direcionamento para uma resposta tipo Th-1 (Yamamura *et al.*, 1992). Ademais, células T de pacientes do polo tuberculoide, porém não do polo virchowiano, expressam receptores para IL-12 e respondem à estimulação por IL-12.

Em contraste, as lesões de paciente do polo virchowiano contém RNAm para citocinas do tipo Th-2 como IL-4 e IL-10 e quando analisadas células mononucleares desses pacientes *in vitro*, observam-se níveis elevados de ambas citocinas. Em alguns pacientes, entretanto, o desvio resposta Th-2 não é tão pronunciado, mas anergia a antígenos de *M. leprae* persiste, sugerindo a possibilidade de deleção de células T respondedoras nestes casos (Mutis *et al.* 1994; Misra *et al.*, 1995). Finalmente, a hipótese de inibição ativa por células supressoras ou regulatórias foi aventada a partir do isolamento de clones de células TCD4+ de pacientes do polo virchowiano que têm a capacidade de inibir a resposta específica de outros clones ditos “respondedores” do mesmo paciente (Mutis *et al.*, 1994). Adição exógena combinada

de IL-12 e IL-2 teria a capacidade de reverter este efeito inibitório, sugerindo a natureza “regulatória”, portanto reversível, deste fenômeno (de Jong *et al.*, 1997).

A interação hospedeiro-parasita na hanseníase é um fenômeno dinâmico, sujeito a flutuações, de forma que a classificação de pacientes em um determinado polo pode não ser permanente. Estas flutuações caracterizam um importante fenômeno imunológico, os denominados Estados Reacionais. As reações ditas do tipo 1 (RR) ocorrem por exemplo em cerca de 30 % dos paciente classificados como dimorfos, e se caracterizam por um aumento espontâneo da reatividade de células T a antígenos micobacterianos (Britton, 1998). Estas reações se caracterizam por infiltração de linfócitos TCD4+ que expressam TNF- α e IFN- γ nas lesões cutâneas e nervosas que resultam numa acentuação do processo inflamatório com dor, edema e, às vezes, destruição das estruturas teciduais e perda de função. Há também aumento da produção de uma série de citocinas pró-inflamatórias pelas células mononucleares do sangue periférico.

A reação tipo 1 pode ser de piora também denominada “reação de degradação” (*down grading reaction*) ou de melhora, também denominada reação reversa ou inversa. A primeira ocorre em doentes sem tratamento ou que o fazem de forma irregular. Nesse caso as lesões existentes tornam-se mais eritemato-edematosas, surgem lesões novas agudas, quentes e dolorosas; essas manifestações agudas também ocorrem nos nervos. Na baciloscopia observa-se aumento da carga bacilar. A reação reversa ou de melhora, ocorre, em geral, após três meses de tratamento, apresentando quadro clínico semelhante à reação de degradação, porém com melhor organização dos granulomas tuberculoides e melhor definição das lesões que se tornam mais bem delimitadas, mantendo quadro agudo de dor, calor, eritema e

edema. A melhor organização dos granulomas ocorre também nos nervos, provocando intensa reação destrutiva. Quanto à baciloscopia, há diminuição da carga bacilar e muitas vezes bacilos estão ausentes (Lockwood *et al.*, 1993).

Todos estes eventos regredem com o uso de corticosteroides, porém em alguns pacientes, o processo inflamatório volta a se exacerbar com a retirada da medicação (Sarno *et al.*, 1991; Khanolkar-Yong *et al.*, 1995; Little *et al.*, 2001).

Já o eritema nodoso hansênico se caracteriza por um processo inflamatório sistêmico em resposta à deposição de imuno complexos, e que resulta na infiltração neutrofílica e ativação do sistema complemento em vários órgãos, e forte elevação dos níveis de TNF- α circulantes ocasionado toxicidade sistêmica (Sarno *et al.*, 1991). Além disso, dados recentes sugerem que a resposta imune mediada por células também apresenta um importante papel nesse processo inflamatório agudo (Kahawita e Lockwood 2008). Clinicamente observam-se pápulas e nódulos eritematosos, dolorosos, de distribuição difusa, associado à febre, mal estar, neurite, artrite, irite e linfadenites. Nos quadros graves, as lesões cutâneas podem cursar com vesículas, bolhas ou necrose.

Com a finalidade de entender melhor a interação do *M. leprae* com o sistema imune, este trabalho propõe investigar o envolvimento de moléculas coestimulatórias e das células T regulatórias na resposta imune celular, na tentativa de compreender o desequilíbrio na produção das citocinas, observado nos pacientes anérgicos.

1.3 Moléculas Coestimulatórias, Células T Regulatórias e a Resposta Imune Celular

Além do importante papel desempenhado pelas citocinas na regulação da resposta imune, é importante salientar que uma resposta celular efetiva envolve ativação produtiva da célula T através de dois sinais: o primeiro que se relaciona ao reconhecimento do peptídeo antigênico no contexto do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) pelo receptor da célula T (TCR) e o segundo sinal, também denominado coestimulação, que se relaciona a várias moléculas presentes na superfície da célula apresentadora de antígeno interagindo com correceptores da célula T.

As moléculas coestimulatórias mais bem caracterizadas até o momento nas células apresentadoras de antígeno (APC) são as glicoproteínas B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86), estruturalmente relacionadas, que fazem parte da família B7. Tais moléculas são componentes homodiméricos da superfamília das imunoglobulinas, encontradas exclusivamente na superfície das células capazes de estimular a proliferação de células T. O receptor de moléculas B7 (CD 80 e CD 86), nas células T, é o CD28, outro membro da superfamília das Imunoglobulinas. Vários trabalhos demonstraram que a ligação do CD28 de células T naive com seus ligantes nas células apresentadoras de antígeno B7-1 ou B7-2, acarreta um potente sinal coestimulatório para ativação de células T que resulta na indução de produção de citocinas principalmente IL-2 e IFN- γ , e a expressão do CD25 dando início à ativação do ciclo celular (Dubey *et al.*, 1995; Haynes *et al.*, 1999; Elloso e Scott, 2001). Uma vez ativadas, as células T expressam uma variedade de proteínas que contribuem para sustentação ou modificação dos sinais coestimulatórios que dirigem a expansão clonal e diferenciação das células.

As proteínas relacionadas ao CD28 também são induzidas nas células T ativadas e servem para modificar o sinal coestimulatório de acordo com a resposta que a célula T desenvolverá. Uma delas é a CTLA-4 (CD152), um receptor adicional para as moléculas B7. CTLA-4 se assemelha muito com a sequência de CD28 e as duas moléculas são codificadas por genes estreitamente interligados. Entretanto, CTLA-4 liga-se às moléculas B7 com cerca de 20 vezes mais avidéz do que a CD28 e leva à inibição da ativação celular com diminuição de IL-2 e da progressão do ciclo celular. O papel inibitório regulado pelo CTLA-4 na ativação de células T foi demonstrado em camundongos deficientes dessa molécula, que morreram de 3-4 semanas com infiltração linfocítica maciça levando a destruição dos órgãos e tecidos (Chen, 2004).

Na hanseníase, estudos realizados com clones de células T de pacientes obtidas de lesões do polo tuberculoide, revelaram que a resposta de memória das mesmas pode ser bloqueada por anticorpos anti-B7-1, mas não por anticorpos anti-B7-2 ou anti-CTLA. Por outro lado, a resposta de clones de células T obtidos de células do sangue periférico de pacientes do polo virchowiano era fortemente modulada pelo CD28, diferente das células obtidas do polo tuberculoide. Portanto, coestimulação via B7-1, mas não B7.2, parece ser importante para a manutenção da resposta imune nos pacientes do polo tuberculoide (Schlienger *et al.*, 1998).

A expressão de CD80 e 86 em linfócitos, por outro lado, tem sido pouco explorada na literatura, apesar de vários estudos terem demonstrado função de regulação negativa destas moléculas na resposta imune (Sun, *et al.*, 2005). Nossa observação de que elevada proporção dos linfócitos T de pacientes com paracoccidioidomicose, expressam estas duas moléculas (~25-40%), dependendo do

estímulo, significativamente superior à mesma sub-população em controles curados [$\leq 20\%$]), nos leva a especular que as mesmas possam exercer esta mesma função na resposta a antígenos em pacientes com hanseníase (Cacere *et al.*, 2008). Von Boehmer (2005), em revisão, sugere esta via alternativa (interação CTLA4-CD80/86 não dependente de célula T regulatória) como um importante mecanismo de regulação da resposta imune. Entretanto esta possibilidade também não é corroborada pelos resultados dos experimentos de avaliação da resposta proliferativa na presença de anti-CTLA4, que não resultou em restauração da resposta proliferativa antígeno específica (Cacere *et al.*, 2008).

Uma terceira proteína relacionada ao CD28 é induzida em células T ativadas e expressa rapidamente após a ligação TCR-MHC; ela é chamada de Indutor coestimulatório de células T ou ICOS. Os ligantes dessa molécula denominados LICOS e B7-H2 são produzidos em células dendríticas, monócitos e células B ativadas. ICOS não é expresso constitutivamente em células T naive, o que o diferencia do CD28. Essa molécula regula tanto as células Th1 como Th2 durante a fase inicial de diferenciação. Durante a ativação inicial das células T naive o efeito do ICOS na proliferação de células T e na produção de IL-2 são modestos e suficientes para manter a ativação e diferenciação celular quando comparado com a estimulação com CD28. Vários trabalhos demonstraram que o ICOS pode regular a produção de citocinas por células T efectoras recentemente ativadas. Estes trabalhos se basearam no bloqueio de sinalização via ICOS, por meio de adição de anticorpos anti-ICOS ou de seu receptor (ICOSr), e observaram o aumento na produção de IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ , TNF e GM-CSF (Greenwald *et al.*, 2002 e 2005; Mittrücker *et al.*, 2002; Okamoto *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2001). O bloqueio de ICOS no início da

estimulação das células T naive aumenta a diferenciação celular para um padrão de citocinas Th1 (Freeman, 2002).

Wassink *et al*, 2004, demonstraram que o aumento da expressão de ICOS mantém por vários dias a ativação celular após a ligação via TCR e que a ligação do ICOS em células Th efetoras pré-ativadas aumenta à produção de citocinas com uma magnitude proporcional aos níveis de expressão de ICOS. Observaram também que nos primeiros dias após a ativação, a expressão de ICOS pelas células Th ativadas é regulada positivamente pela IL-12 e IL-23, em contraste a IL-4, que reduz a expressão do ICOS.

Além de ICOS, outra molécula, PD-1 (Programador de morte-1) foi descrita com seus ligantes PDL-1 e PDL-2 encontrados em monócitos e células dendríticas e sua expressão parece ser regulada por IFN- γ ou IFN- γ /LPS. PD-1 é expresso por células T CD4+ e CD8+, células B e células mieloides ativadas e não é encontrado em células não estimuladas. O principal papel de PD-1 no sistema imune é a manutenção da tolerância periférica. Após a interação com seus ligantes mediada pelo TCR, inibe a proliferação e produção de citocinas (IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- γ) pelas células T previamente ativadas (Greenwald *et al.*, 2005; Matsumoto *et al.*, 2008). Vários estudos têm demonstrado que RNAm de PD-1 está expresso em altos níveis em células T regulatória CD4+CD25+ e em células T anérgicas, sugerindo vários meios pelo qual PD-1 estaria envolvido na regulação da tolerância de células T (Lechner *et al.*, 2001; Gavin *et al.*, 2002). A interação PD-1: PDL-2 mediada via TCR também inibe a proliferação de células T e produção de citocinas pelas células T CD4+ (Latchaman *et al*, 2001). Em baixa concentração de antígenos, a interação PD-1: PDL-2 inibe fortemente o sinal B7-CD28. Em contraste altas doses de

antígenos reduzem a produção de citocinas, mas não inibe a proliferação de células T. A interação PD-1: PDL-1 pode contrabalancear a ativação mediada pelo CD3 quando a coestimulação mediada pelo CD28 é sub ótima (Freeman, *et al.*, 2000).

A inibição da proliferação de células T pela interação PD-1:PDL é mediada pela diminuição da produção de IL-2 atingindo tanto o subgrupo de células T CD8+ como as células T CD4+ (Carter *et al.*, 2002). O bloqueio dessa interação aumenta a expansão de células T antígeno-específica em resposta à imunização *in vivo* e afeta tanto células Th-1 como Th-2 (Salama *et al.*, 2003). A inibição de PD-1 induz a proliferação de células T efectoras em indivíduos infectados pelo adenovírus resultando na rápida eliminação do vírus (Iwai *et al.*, 2003).

Em paralelo com a ativação de moléculas coestimulatórias e sua correlação com a produção de citocinas de padrão Th1 e Th2, observamos que as células T regulatórias (Treg) podem também estar envolvidas de alguma forma na supressão de células T de determinados pacientes com hanseníase, seja no aumento desta população celular como na produção de determinadas citocinas por estas produzidas.

Vários tipos de células T regulatórias vêm sendo descritas com base em sua origem, geração e mecanismo de ação. Foram descritos dois subgrupos principais de células regulatórias: as células que expressam foxp-3 naturalmente, produzidas no timo, e as células T regulatórias que se desenvolvem na periferia convencionalmente a partir de células TCD4+ após a exposição a vários sinais como: citocinas regulatórias, drogas imunossupressoras, ou células apresentadoras de antígenos que produzam determinadas citocinas induzidas por produtos microbianos (O'Garra e Vieira, 2004). Estas células também são identificadas por expressarem em sua superfície de forma constitutiva o receptor da cadeia α da IL-2 (CD25). Elas também

expressam CTLA4, fator de necrose tumoral (TNF) e receptores da família TNF (GITR, OX40), além de CD39, CD73 (Deaglio, *et al.*, 2007). No entanto, todos estes marcadores não são específicos para as células Treg, pois células T ativadas também podem expressar transitoriamente estes marcadores (Shevach, 2006).

As Tregs inibem a diferenciação, ativação, proliferação, secreção de citocinas ou migração de células T convencionais. Ensaios *in vitro* demonstraram que o mecanismo de supressão é dependente de contato, visto que, quando separadas das células efectoras por uma membrana semipermeável são incapazes de inibir a proliferação celular. Ao avaliar este mecanismo de supressão foi demonstrado que as Treg induzem a expressão de *indoleamine 2,3-dioxygenase* em células dendríticas, uma potente molécula regulatória que induz o catabolismo do triptofano em quinurerina, particularmente tóxica para células T. Este processo é dependente da molécula CTLA-4, um marcador de superfície expresso pelas Treg que quando bloqueado reverte a supressão da proliferação celular das células T efectoras mediada pelas Treg. Outro mecanismo de supressão utilizado pelas Tregs para inibir a proliferação e diferenciação de células T efectoras é a inativação catalítica da adenosina trifosfato (ATP) pela CD39. Esta observação foi documentada em modelo experimental de alergia de contato, mostrando que as Tregs que expressavam CD39 suprimiram eficientemente a reação de hipersensibilidade, efeito não observado na ausência de expressão de CD39 pelas Tregs (Ring *et al.*, 2009).

Para que as células dendríticas produzam moléculas com atividade imunossupressora, trabalhos sugerem que as células Treg poderiam estar modulando de forma negativa a capacidade destas células de ativarem células T efectoras. Ivar e colaboradores primeiramente documentaram em camundongos que células Treg

direcionam *in vitro* a diminuição da expressão das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 por células dendríticas. Estudos com células Treg humanas indicam que estas células podem modular as funções de monócitos e macrófagos (Taams *et al.*, 2005, Tiemessen *et al.*, 2007). No entanto, o mecanismo preciso envolvido nesta modulação não é conhecido, mas sugere-se que pode ser modulado através de moléculas de superfície como CTLA4, e/ou citocinas como IL-10 e TGF- β .

As Tregs estão presentes em quase todos os tecidos e particularmente um grande número destas células pode ser encontrado na pele. Para avaliar a função das Tregs na pele, camundongos *Scurfy* deficientes de Foxp3 foram reconstituídos com Tregs incapazes de migrar para a pele e rapidamente foi observada inflamação cutânea sugerindo que as células Tregs residentes na pele tem a função de manter a homeostase no local. Desta forma, é possível que inflamações cutâneas e distúrbios autoimunes estejam associados com diminuição no número de Tregs na pele lesionada (Brunkow *et al.*, 2001; Wildin *et al.*, 2001).

Várias moléculas contribuem para o desenvolvimento das células Treg Foxp3+. Até o momento o eixo CTLA-4-B7, parece ser o mais importante no desenvolvimento destas células (Liang *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2006). Wang, *et al.* (2008), demonstraram o importante papel da molécula PDL-1 expressa pelas células dendríticas por induzirem células Treg e controlar desta forma a tolerância periférica. Durante a infecção por *Helicobacter pylori*, células gástricas epiteliais demonstraram um aumento da expressão da molécula PD-1 e seu ligante PDL-1, favorecendo o desenvolvimento das células Treg expressando o Foxp3 (Beswick *et al.*, 2007).

Tendo em vista que a hanseníase é um dos exemplos mais ilustrativos da complexidade da interação hospedeiro-parasito, e, que existe nesses pacientes uma

desregulação na produção de citocinas e uma resposta proliferativa deficiente frente ao *M. leprae*, vimos a importância de estudar o papel dessas moléculas e sua relação com a produção de citocinas na resposta imune celular dos pacientes comparativamente aos indivíduos expostos, porém sem doença.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Desenvolver estudo imunológico de células mononucleares de pacientes com hanseníase estimuladas por antígenos específicos do *M. leprae* com a finalidade de compreender melhor a imunopatogenia da hanseníase, em especial a regulação por moléculas coestimulatórias e células T regulatórias na indução de anergia em pacientes do polo virchowiano.

2.2 Específicos

- a) Avaliar a expressão das moléculas coestimulatórias (B7-1 e B7-2), na superfície de linfócitos T CD3+ e CD 14+ *in vitro*.
- b) Avaliar a expressão das moléculas coestimulatórias (CD28, CTLA-4, ICOS e PD-1) durante a ativação de linfócitos *in vitro*.
- c) Avaliar a expressão de CD25, Foxp-3 em células TCD4+, e relacioná-las à expressão de IL-10, TNF e TGF- β *in vitro*.
- d) Verificar a expressão das citocinas tipo Th1 e Th2 *in situ* (biópsia das lesões) e células T CD25+Foxp3+.
- e) Correlacionar esses achados da expressão de citocinas *in situ* e *in vitro* com a expressão das moléculas coestimulatórias durante a ativação de linfócitos em culturas de PBMC de pacientes e controles estimuladas com antígeno de *Mycobacterium leprae*.

3 MÉTODOS

3.1 Pacientes e Controles

Foram estudados indivíduos adultos (> 18 anos), de ambos os sexos, *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) negativos após consentimento esclarecido: No total, foram analisados 30 pacientes com hanseníase previamente ao tratamento, sendo 14 com a forma tuberculoide (TT, BT) e 16 com a forma virchowiana (BL, LL) da doença. O grupo controle foi composto de 10 indivíduos contatos domiciliares saudáveis, de pacientes multibacilares.

Estes pacientes foram provenientes da Unidade 3902 da Divisão de Clínica Dermatológica, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

3.2 Antígenos

Foram utilizados sonicação de *M. leprae* (*M. leprae* cell wall antigen gentilmente cedido por John Spencer - Mycobacteria Research Laboratories, Colorado State University - contract #N01-AI-25469) e, como antígeno controle, *Candida* Metabolic Antigen (CMA Sanofi- Pasteur, Paris, France). Como controle positivo adicional em alguns experimentos foi usado o mitógeno fitohemaglutinina (PHA Sigma, Saint Louis, MO, USA).

3.3 Obtenção e Estimulação de Células Mononucleares de Pacientes e Controles

Inicialmente, foram coletados 40 mL de sangue periférico em tubos heparinizados de pacientes e controles. O sangue coletado foi submetido à separação por centrifugação em gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Sweden) para a obtenção de células mononucleares (PBMC). Após a separação, estas células foram lavadas com salina por duas vezes e no final ressuspensas em meio RPMI suplementado com gentamicina e 10% soro AB (Sigma, USA). Para cada experimento realizado, foram ajustadas as concentrações celulares e antigênicas desejadas.

Para a análise da resposta linfoproliferativa, as células mononucleares foram ajustadas para $2,5 \times 10^5$ /well e cultivadas por seis dias em placas de cultura de 96 alvéolos, (Corning-Costar, Cambridge, MA, USA) à 37° C com 5% de CO₂ na presença de antígenos de *Mycobacterium leprae* (10 µg/mL MLCwA), um antígeno microbiano não relacionado a *M. leprae*, obtido de *Candida albicans* (CMA, diluição 1:200 previamente padronizada em nosso laboratório) e o mitógeno fitohemaglutinina (PHA, na concentração de 5 µg/mL, este adicionada no 4º dia de cultura). A linfoproliferação foi avaliada pela incorporação de timidina triciada (0,5 µCi/well Amersham, NEN) adicionada 18h antes do fim da cultura e a radioatividade foi medida em contador *beta* (1205 Betaplate - Perkin-Elmer, Boston, MA, USA).

A análise da expressão das moléculas coestimulatórias e de células T regulatórias foram realizadas no quarto dia de cultura de acordo com protocolo estabelecido anteriormente em nosso laboratório (Cacere, *et al.*, 2008). Para essas análises as células foram cultivadas em placas de 24 ou 48 alvéolos (Corning-Costar, Cambridge, MA, USA), na concentração de $2,5 \times 10^6$ /well à 37° C com 5% de CO₂ na presença de meio apenas e estimuladas com antígenos e mitógeno conforme mencionados acima.

3.4 Análise da Expressão das Moléculas Coestimulatórias por Citometria de Fluxo

Para a análise da expressão das moléculas coestimulatórias, as células mononucleares foram ajustadas para $2,5 \times 10^5$ /well e cultivadas por seis dias em placas de cultura de 24 (1 mL) ou 48 alvéolos (0,5 mL). Após este período, as células estimuladas ou não foram removidas da placa de 24 alvéolos e lavadas com PBS/BSA 1%. Em seguida foram adicionados 10 μ L dos anticorpos de superfície marcados com seus respectivos fluorocromos. Em um tubo, tanto as células estimuladas como as células sem estímulos, foram marcadas com os anticorpos anti-CD3 (tri-color, Caltag, Burlingame, CA, USA), anti-CD28 (PE, Caltag) e anti-CTLA4 (Cy-chrome, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). Em outro tubo foram acrescidos 10 μ L de anti-CD3 (tri-color, caltag), anti-PD-1 (FITC, eBioscience, San Diego, CA, USA) e anti-ICOS (PE, eBioscience) e outro tubo com os anticorpos anti-CD3, anti-CD80 (eBioscience) e anti-CD86 (eBioscience). As células foram incubadas por 30 minutos, sendo então adicionados mais 500 μ L do tampão de lavagem e submetidas à análise por citômetro de fluxo.

3.5 Separação de Células CD14⁺ por Nanopartículas Magnéticas (EasySep, STEMCELL Technologies)

Para a obtenção de células CD14⁺ por nanopartículas, primeiramente foi realizada a separação de células mononucleares de sangue periférico por ficoll-hypaque conforme descrito acima. Após a separação foi determinado através da contagem na câmara de Newbauer o número de células totais obtidos. A seguir, estas células foram centrifugadas e ressuspensas com tampão específico (PBS/BSA/EDTA), e

imediatamente acrescentado o coquetel com anticorpo anti-CD14 conjugado com fluorocromo (Coktail para seleção positiva de CD14, EasySep, StemCell Technologies) de acordo com o número de células totais, ou seja, para cada $20 \mu\text{L} \times 10^7$. Em seguida, as células foram incubadas por 15 minutos.

Após o primeiro período de incubação, foram adicionadas as nanopartículas magnéticas (Magnetic Nanoparticles, EasySep) e incubadas por 10 minutos (para cada 1×10^7 adicionar $10 \mu\text{L}$ de nanopartículas). Na sequência, o tubo contendo as células com o anticorpo e a nanopartícula, foi inserido em uma base magnética e mantido por cinco minutos. Passado os cinco minutos, a base com o tubo inserido foi invertido sendo dispensado todo o sobrenadante contendo as células CD14-, mantendo-se as células CD14+ aderidas à parede do tubo. Após este procedimento, o tubo foi retirado da base magnética e acrescido de tampão específico sendo repetido este procedimento de descarte do sobrenadante celular por mais duas vezes.

Em seguida, as células foram centrifugadas e ressuspensas em RPMI com 10% de soro AB, e então submetidas à contagem celular. Após a contagem, as células CD14+ foram ajustadas na concentração de 1×10^6 células por well em placas de 24. Estas células foram mantidas em repouso por 48h e então acrescidas de antígeno. Com o acréscimo dos antígenos do estudo, estas células foram mantidas com estímulo por quatro horas e em seguidas analisadas por citometria de fluxo quanto à expressão de moléculas coestimulatórias de superfície (Cacere *et al.*, 2008). Para estas análises foram utilizados um tubo com anti-CD14 (tri-color, Caltag), anti-CD80 (FITC, Caltag) e anti-CD86 (PE, Caltag) e um tubo anti-CD14 (tri-color, Caltag) tanto para as células estimuladas como para as células sem estímulos.

3.6 Estudo Imunohistoquímico de Células T com Expressão de CD25 e Foxp3

Esta etapa do trabalho foi realizada em colaboração com a Dra. Carla Pagliari e o aprimorando Wellington L. F. Silva do Laboratório de Patologia de Moléstias Transmissíveis do Departamento de Patologia da faculdade de medicina da USP. Cortes histológicos de 4 µm de espessura foram obtidos a partir de material embebido em parafina e colhidos em lâminas previamente preparadas com solução adesiva de 3 amino-propyltriethoxy-silane.

A seguir, foi realizado a desparafinização em dois banhos de xilol por 20 e 10 minutos e hidratação em sequência decrescente de etanol (100%, 95%, 70%) e água corrente durante cinco minutos cada. Foi feito o bloqueio de peroxidase endógena em câmara escura com três passagens de 10 minutos cada em solução de água oxigenada 3%, e em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos, água destilada por cinco minutos e solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4 por mais cinco minutos.

Fez-se exposição antigênica com tampão TRIS/EDTA pH 9,0 a 95° C em banho-maria durante 20 minutos. Os cortes foram novamente lavados em água corrente, água destilada e tampão PBS pH 7,4.

Após o procedimento de recuperação antigênica, fez-se a incubação com leite desnatado (Molico, Nestlé) a 10% em água destilada por 30 minutos à temperatura ambiente para bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido. Só então os espécimes foram incubados com os anticorpos primários diluídos a 1:50 em BSA 1% “overnight” a 4° C.

Após duas lavagens com PBS por 10 minutos cada, os espécimes foram incubados com os anticorpos secundários anti-imunoglobulina de camundongo

(Dako, K690) ou anti-imunoglobulina de rato (Dako, E468) para os espécimes em que se pesquisava Foxp3, durante 30 minutos à 37° C. Os espécimes foram novamente lavados com PBS e incubados com o complexo estreptavidina biotina do (LSAB K690, Dako) durante 30 minutos a 37° C. A reação foi revelada com solução cromógena de diaminobenzidina (3,3'- diaminobenzidine, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO/USA) 0,4% em PBS, acrescido de 1,2 mL de água oxigenada 3%. A intensidade de cor foi controlada ao microscópio óptico através de controles positivos que acompanharam cada reação.

A seguir as lamínas foram lavadas em água corrente por 10 minutos e contracoradas com Hematoxilina de Harris por 10 segundos. Os espécimes foram lavados em água corrente e desidratados em sequência crescente de etanol, diafanização em xilol e montagem das lâminas com resina.

3.7 Estudo Imunohistoquímico de Citocinas IL-10 e TGFβ

O protocolo para detecção de células expressando IL10 ou TGF-β assemelha-se ao descrito anteriormente. Porém, ao tampão PBS utilizado na lavagem das lâminas entre as incubações com os anticorpos adicionou-se saponina a 0,1%.

O anticorpo anti-IL10 (AF-217-NA, RD Systems) foi utilizado na diluição 1:50 e o anticorpo anti-TGF-β, na diluição 1:100.

3.8 Dupla-Marcação Imunohistoquímica para Detecção Concomitante de Células com Expressão de Foxp3 e CD25.

Foram analisados biópsias de pele de 18 pacientes, sendo nove tuberculoides e nove virchowianos. Cortes histológicos de 4 µm de espessura foram obtidos a partir de material embebido em parafina e colhidos em lâminas previamente preparadas com solução adesiva de 3 amino-propyltriethoxy-silane.

Foi realizada a desparafinização desse material em dois banhos de xilol por 20 e 10 minutos e hidratação dos cortes em sequência decrescente de etanol (100%, 95%, 70%) e água corrente durante cinco minutos cada. Foi feito o bloqueio de peroxidase endógena em câmara escura com três passagens de 10 minutos cada em solução de água oxigenada 3%, e em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos, água destilada por cinco minutos e solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4 por mais cinco minutos.

Fez-se exposição antigênica com tampão TRIS/EDTA pH 9,0 a 95° C em banho-maria durante 20 minutos. Os cortes foram novamente lavados em água corrente, água destilada e tampão PBS pH 7,4.

A seguir, fez-se a incubação com leite desnatado (Molico, Nestlé) a 10% em água destilada por 30 minutos à temperatura ambiente e os espécimes foram incubados com o anticorpo anti-Foxp3 diluído a 1:50 em BSA 1% “over-night” a 4° C.

Após duas lavagens com PBS por 10 minutos cada, os espécimes foram incubados com o anticorpo secundário anti-imunoglobulina de rato (Dako, E468) na diluição 1:300, durante 30 minutos à 37° C. Os espécimes foram novamente lavados com PBS e incubados com o complexo estreptavidina biotina (LSAB K690, Dako) durante 30 minutos a 37° C. A reação foi revelada com solução cromógena de diaminobenzidina (3,3'- diaminobenzidine, SIGMA Chemical Co., St. Louis,

MO/USA) 0,4% em PBS, acrescido de 40 mg de cloreto de níquel e 1,2 mL de água oxigenada 3%. A intensidade de cor foi controlada ao microscópio óptico. A seguir as lamínas foram lavadas em água corrente por 10 minutos, água destilada e tampão PBS. Em seguida incubou-se os espécimes com anticorpo anti-CD25 na diluição 1:40 em BSA por duas horas a 37°C. Os cortes histológicos foram lavados em PBS e incubados com o polímero Envision-G2-fosfatase (K355, Dako) por 30 minutos. A reação foi revelada com o cromógeno “permanent red” e contracorados com Hematoxilina de Harris por 10 segundos. Os espécimes foram lavados em água corrente e desidratados em sequência crescente de etanol, diafanização em xilol e montagem das lâminas com resina.

As populações de células T CD25+FoxP3+ e células expressando IL-10 e TGFβ foram avaliadas de forma quantitativa utilizando o programa Image-Pro Plus. Foram analisados seis campos, fotografados no aumento de 400x e as células imuno-marcadas foram quantificadas.

3.9 Análise Estatística

Os *resultados* foram submetidos à análise estatística utilizando-se o método não paramétrico de Mann-Whitney. Utilizou-se o programa de estatística “Graph Pad Prism” versão 5.01 para Windows (GraphPad software, San Diego, CA).

3.10 Aspectos Legais de Bioética, Biossegurança, Propriedades Intelectuais e Outras Determinações Pertinentes

Os aspectos éticos e aqueles relativos à biossegurança foram julgados pela comissão científica e comissão de ética para análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os seguintes tópicos foram priorizados: i) anuência formal dos pacientes envolvidos; ii) respeito à privacidade dos pacientes; iii) busca de melhoria de assistência aos portadores de hanseníase.

A inclusão dos pacientes no estudo foi realizada em acordo com as normas estabelecidas pelo comitê de ética em pesquisa médica do HC-FMUSP). O trabalho de pesquisa foi conduzido de forma a contemplar as disposições contidas nas resoluções CNS n 196/1996 sobre a pesquisa envolvendo seres humanos e atendeu as exigências éticas e científicas fundamentais. A elaboração do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) do sujeito da pesquisa e/ou seu representante legal (Anexo A e B) foi baseada nas resoluções vigentes, e seguiu as seguintes orientações: linguagem acessível, esclarecimentos do propósito do estudo e dos procedimentos necessários, confiabilidade e privacidade. Aos pacientes foi assegurada a liberdade de opção de não participarem do estudo, sem prejuízo, atraso ou interferência no seu seguimento, escolha ou realização da coleta dos exames para pesquisa proposta.

4 RESULTADOS

Neste capítulo serão apresentados dois artigos, já publicados, para que se possa fazer a compilação dos dados.

4.1 Artigo 1 - Increased Expression of Regulatory T Cells and Down-Regulatory Molecules in Lepromatous Leprosy

Am. J. Trop. Med. Hyg., 86(5), 2012, pp. 878–883
doi:10.4269/ajtmh.2012.12.0088

Copyright © 2012 by The American Society of Tropical Medicine and Hygiene

Increased Expression of Regulatory T Cells and Down-Regulatory Molecules in Lepromatous Leprosy

Maria L. Palermo, Carla Pagliari, Maria Angela B. Trindade, Tania M. Yamashita-fuji,
Alberto José S. Duarte, Camila R. Cacere,[†] and Gil Benard^{*†}

Laboratory of Medical Investigation Unit 56, Division of Clinical Dermatology, Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil;
Department of Pathology, Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; Health Institute, São Paulo State Health Department,
São Paulo, Brazil; Ambulatory of Specialities, São Paulo City Health Service, São Paulo, Brazil; Laboratory of Medical Investigation Unit 53,
Tropical Medicine Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

4.1.1 Abstract

T regulatory cells (Tregs) play an important role in the mechanism of host's failure to control pathogen dissemination in severe forms of different chronic granulomatous diseases, but their role in leprosy has not yet been elucidated; 28 newly diagnosed patients (16 patients with lepromatous leprosy and 12 patients with tuberculoid leprosy) and 6 healthy *Mycobacterium leprae*-exposed individuals (contacts) were studied. Tregs were quantified by flow cytometry (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺) in peripheral blood mononuclear cells stimulated *in vitro* with a *M. leprae*

antigenic preparation and phytohemagglutinin as well as in skin lesions by immunohistochemistry. The lymphoproliferative (LPR), interleukin-10 (IL-10), and interferon- γ (IFN- γ) responses of the *in vitro*-stimulated peripheral blood mononuclear cells and the *in situ* expression of IL-10, transforming growth factor- β (TGF- β), and cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) were also determined. We show that *M. leprae* antigens induced significantly lower LPR but significantly higher Treg numbers in lepromatous than tuberculoid patients and contacts. Mitogen-induced LPR and Treg frequencies were not significantly different among the three groups. Tregs were also more frequent *in situ* in lepromatous patients, and this finding was paralleled by increased expression of the antiinflammatory molecules IL-10 and CTLA-4 but not TGF- β . In lepromatous patients, Tregs were intermingled with vacuolized histiocyte infiltrates all over the lesion, whereas in tuberculoid patients, Tregs were rare. Our results suggest that Tregs are present in increased numbers, and they may have a pathogenic role in leprosy patients harboring uncontrolled bacillary multiplication but not in those individuals capable of limiting *M. leprae* growth.

4.1.2 Introduction

A spectrum of different clinical, bacteriologic, and histological manifestations is described in leprosy patients, which correlates to variations in host immune responses.¹ In patients with tuberculoid leprosy, the histological findings are characterized by infiltration of CD4⁺ T lymphocytes, compact granulomas, and few or no detectable bacilli. *In vitro*, such patients show vigorous lymphocyte proliferative responses and a Th-1 cytokine profile. In the

opposite pole, lepromatous leprosy reveals a poor granulomatous response, with few infiltrating CD4⁺ T cells, numerous bacilli, decreased Th-1 immune response, and shift to a Th-2 profile.² *In vitro*, these findings are translated into lack of *Mycobacterium leprae*-specific lymphoproliferative responses.³

Recently a subset of CD4⁺ T cells with suppressive function has been characterized⁴; these cells are best identified because of constitutive expression of CD25, the α -chain of the interleukin-2 (IL-2) receptor, and the forkhead/winged helix transcription factor 3 (FoxP3). The mechanisms involved in suppressing effector CD4⁺ T cells are still a subject of intense study, and several non-excluding mechanisms have been described.⁵ These mechanisms can be mediated through either direct interaction between T regulatory cells (Tregs) and effector T cells or the release of cytokines. Tregs express high levels of CTLA-4, a costimulatory molecule that suppresses several functions of CD4⁺ T cells such as proliferation and IL-2 secretion.^{4,5} Tregs also have the ability to secrete high amounts of the antiinflammatory cytokines IL-10 and transforming growth factor- β (TGF- β).^{4,5} Both experimental and human studies have shown that autoimmune disorders like lupus and systemic sclerosis are associated with Treg depletion both *in situ* and in peripheral blood.⁶⁻⁸ However, it has also been shown that Tregs play a crucial role in the regulation of the immune response to microbial antigens and may favor the persistence of pathogens causing chronic granulomatous disease such as leishmaniasis and tuberculosis.⁹⁻¹¹

Although Tregs exert an important role in the mechanism of host's failure to control pathogen dissemination in different chronic granulomatous diseases, their role in leprosy has not yet been elucidated.

4.1.3 Patients and Materials

Patients and controls. A total of 28 consecutive newly diagnosed leprosy patients admitted to our service were analyzed. All patients were studied before start of specific therapy; they were all human immunodeficiency virus (HIV)-negative and without other infectious comorbidities; 16 patients had lepromatous leprosy (age range = 38 ± 4 years; 8 female and 8 male subjects), of which 13 patients had borderline lepromatous leprosy (BL) and 3 patients had polar lepromatous leprosy (LL). The other 12 patients had tuberculoid leprosy (age range = 45 ± 5 years; 7 female and 5 male subjects), of which 10 patients had the borderline form (BT) and 2 patients had the polar form (TT). The first group had multibacillary disease, whereas the second group had a paucibacillary disease. A control group was made of six healthy exposed individuals (contacts; 35 ± 4 years) selected among persons living in close contact with the lepromatous leprosy patients. Exposure was defined by a positive response in the lymphoproliferation assay with the *M. leprae* antigen described below (Figure 1B). The study was approved by the Ethics Committee of the Clinics Hospital, University of São Paulo Medical School (#0955/08). Informed consent was obtained from all participants. Blood was collected from patients and contacts, whereas a biopsy was taken from a typical lesion of the patients; no biopsies could be taken of normal skin of the patients or contacts for ethical reasons.

Figure 1. Treg (CD4+ CD25+ Foxp3+) frequency (A), LPR (B), IL-10 secretion (C), and IFN- γ secretion (D) in 2.5×10^5 PBMCs of tuberculoid (N = 10 -12), and lepromatous (N = 14 -16) leprosy patients and healthy exposed contacts (N = 6) stimulated *in vitro* with phytohemagglutinin (PHA) or a *M. leprae* antigen (MLCwA) or not stimulated (medium). Results are presented as mean $\pm$ SEM. *P < 0.05; **P < 0.01.

Peripheral blood mononuclear cells immunoassays. Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cultures were carried out as previously described.¹² PBMCs were isolated from heparinized peripheral blood by density gradient and resuspended in RPMI supplemented with gentamicin (40 mg/mL) and 10% human AB serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). PBMCs were cultivated in 96 (1.0×10^5 /well) and 24 (1.0×10^6 /well) well flat-bottomed plates with medium only, a cell wall preparation of *M. leprae* (MLCwA; 20 mg/mL), and as positive control, the mitogen phytohemagglutinin (PHA; 5 mg/mL; Sigma) at 37 °C and 5% CO₂ as previously described.⁹

For lymphoproliferation assays (LPR), cells were incubated for 3 (PHA) and 6 (MLCwA) days in triplicates in 96-well plates and pulsed for additional 18 hours with 1.0 mCi/well (^3H)thymidine (Radiochemical Center, Amersham, UK) before harvest. Cell-bound radioactivity was measured using a β -plate scintillation counter (Perkin Elmer, Boston, MA). Results were expressed as mean counts per minute of the triplicates.

For Treg quantification, the cultures were set out on 24-well plates. The cells were harvested at day 4, washed, and incubated with anti-CD4 (PC5; eBioscience, San Diego, CA) and anti-CD25 (FITC; Invitrogen, Camarillo, CA) for 20 minutes. The cells were then fixed and permeabilized (FIX & PERM; Invitrogen), and they were stained with antiFoxP3 (PE; eBiosciences). Cells were then washed and immediately acquired and analyzed by flow cytometry (Coulter Epics XL, Hialeah, FL). The expression of FoxP3 and CD25 was examined in the CD4⁺ lymphocytes gate according to the work by Sakaguchi and others.⁴ Compensation of the populations analyzed was carried out in each experiment using unstained cells and the fluorescence minus one protocol.¹³ The results were expressed as the percentage of FoxP3⁺ CD25⁺ cells per at least 10,000 CD4⁺ lymphocytes. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantification of interferon- γ (IFN- γ) and IL-10 secretion in supernatants was carried out as in previous studies using commercial kits (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN) according to the manufacturer.¹² The supernatants were harvested from 24-well PBMC cultures at day 4 and stored in aliquots at -80 °C until use. The lower limit of detection of the assays was 10 pg/mL.

Immunohistochemistry of lesion biopsies. Biopsies were taken with a standard dermatologic biopsy punch. Biopsies were preferentially taken of well-

circumscribed plaques in tuberculoid patients and in lepromatous patients, the most infiltrated lesions. For the immunohistochemical (IHC) study of patients' biopsies, a streptavidin-biotin peroxidase method was used.¹⁴ Briefly, after deparaffinization and hydration, antigen recovery was performed in a retrieval solution at pH 9.0 (S2368; Dako, Carpinteria, CA) for 20 minutes at 95 °C. The primary antibodies anti-IL-10 (MAB17; R&D), anti-TGF- β (Novocastra Leyca Biosystem, New Castle, UK), and anti-CTLA-4 (AF386-PB; R&D) as well as a labeled streptavidin-biotin complex (LSAB; Dako) were applied. 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Sigma) was used as chromogen, and the slides were counterstained with hematoxylin. All reactions were performed with positive and negative controls. The latter comprised isotype controls and omission of the primary antibody. Double immunostaining reaction was used to detect Foxp3/CD25 coexpression. Tissue sections were incubated with anti-Foxp3 antibody (14-4776; eBioscience) and developed with the LSAB complex (Dako). The peroxidase reaction was revealed with DAB/NiCl₂ (Sigma). The second reaction was performed with the anti-CD25 antibody (Leyca Biosystem, New Castle, UK), and the reaction was developed with Envision alkaline phosphatase (K401; Dako) and Permanent Red chromogen (Dako). Quantification of immunostained cells was performed using AxioVision 4.8.2 software (Zeiss). Six images from each specimen were considered. The area of the granulomatous inflammatory infiltrate was measured, and quantification of positive cells was done exclusively in these areas by two independent observers (M.L.P. and C.P.) blinded to the patients' clinical status (lepromatous or tuberculoid leprosy). Adjacent non-inflamed areas of the biopsies were also examined for the eventual presence of Tregs, which were not found. Ten biopsies of normal skin obtained during elective cardiac

surgery of patients with coronary disease were used for standardizing the double immunostaining reaction as well as negative controls.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test for the immunoassays data and the Mann-Whitney test for the IHC data.

4.1.4 Results

In vitro induction of Tregs (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺) expansion in PBMC cultures with PHA and MLCwA were evaluated in tuberculoid patients, lepromatous patients, and contacts (Figure 1A). There were significantly higher percentages of MLCwA-induced Tregs in lepromatous leprosy than tuberculoid patients and contacts. There was apparently no difference in the capacity of Treg expansion between the three groups, because the PHA-induced Tregs frequencies were not significantly different. To address the functional relevance of the observed higher proportion of Tregs in lepromatous patients, we investigated two major phenotypic markers that characterize *in vitro* the anergic pole of leprosy, namely the high production of IL-10 and the lack of *M. leprae* antigens-specific lymphocyte proliferative responses.^{2,3} In fact, lymphocytes from tuberculoid patients and contacts presented vigorous proliferative responses to PHA and MLCwA, whereas cells from lepromatous patients were only able to proliferate to PHA (Figure 1B). Significantly higher responses to MLCwA were found in tuberculoid patients and contacts than lepromatous patients, whereas PHA responses did not show significant differences. Conversely, both unstimulated and MLCwA-stimulated PBMCs from lepromatous patients released significantly more IL-10 than those PBMCs from

tuberculoid patients and contacts, whereas release on PHA stimulation was not significantly different among the three groups (Figure 1C). We additionally determined the IFN- γ level in these supernatants. As expected, IFN- γ levels were significantly lower in MLCwA-stimulated cultures from lepromatous patients than tuberculoid patients and contacts; those levels in PHA-stimulated cultures were again equivalent (Figure 1D). Thus, the increased expression of Treg cells in lepromatous patients coincided with deficient antigen-specific INF- γ and lymphocyte proliferative responses but increased IL-10.

To further assess the role of Tregs in leprosy patients, their frequency was investigated in the lesions of the patients. Biopsies of lesions were available from most tuberculoid (N = 9; 75%) and lepromatous (N = 11; 69%) patients. There was a significantly increased (2^x) amount of Tregs (CD25⁺ Foxp3⁺) infiltrating the cutaneous lesions in lepromatous patients compared with those Tregs from tuberculoid patients (Figures 2A and 3). In lepromatous patients, Tregs were intermingled with vacuolized histiocyte infiltrates all over the lesion, whereas in tuberculoid patients, rare Tregs were seen, usually within the granuloma (Figure 3). No labeled cells were seen outside the inflamed areas. Tregs were rarely found in normal human skin; of 10 normal skin biopsies, no immunostained cells were identified in 8 biopsies, whereas in 2 biopsies, only one immunostained cell was counted in all fields. Analysis of the expression of IL-10 and TGF- β showed that IL-10 but not TGF- β was significantly more expressed in lesions of lepromatous than tuberculoid patients (Figure 2B and D). CTLA-4 expression was also significantly higher in lepromatous than tuberculoid lesions (Figure 2C).

Figure 2. Frequency of CD25+ Foxp3+ (A), IL-10+ (B), CTLA-4+ (C), and TGF-β+ (D) cells in biopsies of lesions from tuberculoid and lepromatous leprosy patients. Each dot represents a sample; horizontal lines represent mean values.

Figure 3. Representative sections of (A) Fite-Faraco staining showing numerous bacilli in purple (lepromatous patient) and (B-F) IHC staining for (B) CD25 (cytoplasmatic) and Foxp3 (nuclear), (C) IL-10, (D) CTLA-4, and (E) TGF- β in lepromatous leprosy and (F) CD25 and Foxp3 in tuberculoid leprosy. Note the high number of double-positive (CD25/Foxp3) cells intermingled with the vacuolized hystiocyte infiltrate all over the lesion in B, whereas in F, rare double-positive cells were seen within the granuloma. Original magnification: A, 1,000 x; B-F, 400x. Insets show the intracellular staining in more detail.

4.1.5 Discussion

Antigen-specific T-cell anergy is a major feature of the severe forms of chronic granulomatous infectious diseases. The mechanisms driving this anergy are still a matter of debate. Elucidation of the mechanisms is an important issue, because it may facilitate the development of new strategies to treat these often serious infectious challenges. This issue has been renewed with the characterization of a subset of T cells with regulatory properties (Tregs)⁴ that have the capacity to disarm effector T cells and thus, prevent disease-associated pathology.⁵ However, in the case of infectious diseases, this prevention may be at the cost of reduced effectiveness of the immune response against the pathogen.^{4,15} In fact, Tregs have been shown to contribute to the failure of the host in controlling the invading organisms, representing a mechanism that leads to persistence of the pathogen and consequently, chronic inflammation.¹⁶ Although better characterized in experimental models of infectious diseases, Tregs data on humans are less clear. Participation of these cells in the immunopathology varies depending on the agent, localization of the disease, and clinical presentation.

In cutaneous leishmaniasis, Tregs with immunosuppressive function have been shown to accumulate in the early phase of acute lesions but decrease thereafter, and they reappear in chronic lesions.¹⁷ They were nevertheless diminished in peripheral blood compared with healthy subjects.¹⁷ Other works also did not find increased numbers of Tregs in peripheral blood of chronic cutaneous leishmaniasis, although these cells overexpressed the inhibitory molecule CTLA-4.¹⁰ They, however, accumulated in skin lesions and showed

immunosuppressive activity. Paradoxically, Tregs seem not to play a role in visceral leishmaniasis, and they are not expanded or accumulated in the peripheral blood or spleen of these patients.¹⁸ On the contrary, they were found to play a role in post-kala-azar dermal leishmaniasis patients in India¹⁹ but not Sudanese patients.²⁰ Similarly, Tregs with suppressive functions were increased in the peripheral blood of tuberculosis patients with disseminated disease but not in those patients with localized pulmonary disease.⁹ They also accumulated in disease sites relative to peripheral blood. Part of this variability may eventually relate to different methodologies used to characterize Tregs, which in most studies based on the expression of CD25 or Foxp3 but not in the coexpression of both molecules.

However, the role of Tregs in leprosy has been addressed in only a few studies, and a clear picture has not emerged.^{21,22} We show here that Tregs are present in increased numbers and may have a pathogenic role in leprosy patients harboring uncontrolled bacillary multiplication (lepromatous leprosy) but not in those individuals capable of limiting *M. leprae* growth (tuberculoid leprosy). Increased frequency of CD25+ FoxP3+ T cells was seen both in *in vitro* *M. leprae*-stimulated PBMCs and disease sites. Our results differ from those results of another group, which found higher frequency of circulating Tregs in the peripheral blood of tuberculoid patients than lepromatous patients.²¹ Diversity in cytometry strategy for defining the Treg population may account, at least in part, for the differences. In addition, this work studied *ex vivo* cells, whereas we analyzed *in vitro*-stimulated cells. Thus, altered Treg numbers among *ex vivo* PBMCs may reflect mainly the redistribution of these cells from peripheral blood to disease

sites. FoxP3+ Tregs have also been previously detected in biopsies of leprosy patients.²² However, no statistical differences between Tregs frequency in the distinct categories of patients could be detected in that study, probably because of the limited number of patients within each category of the leprosy spectrum. Moreover, neither *in situ* double staining (CD25+/FoxP3+) nor appropriate quantitative imaging analysis could be performed in this study.²²

We also showed that the increased expression of Tregs was paralleled by higher *in situ* expression of CTLA-4 and IL-10 but not TGF- β , suggesting potential mechanisms by which these cells could suppress CD4+ T cell responses. Although several studies verified the *in vitro* immunosuppressive ability of Tregs isolated from sites of disease, the mechanisms through which Tregs exerted this ability remained to be determined. Expression of both TGF- β and IL-10 was reported to be augmented in tuberculosis patients, but this expression was associated with other cells than Tregs.⁹ In cutaneous leishmaniasis, a potential role was attributed to IL-10, with levels that were correlated with the parasite burden,¹⁷ whereas others showed increased release of both IL-10 and TGF- β by Tregs derived from skin lesions as well as increased CTLA-4 expression by these cells.¹⁰ Increased IL-10 expression but not CTLA-4 expression was associated with increased parasite burden in post-kala-azar dermal leishmaniasis.¹⁹ A limitation of our study is the lack of functional analysis of Tregs and related immunoregulatory molecules to provide direct evidence of their participation in the immunopathology of the polar forms of leprosy. However, Tregs do not exert their immunosuppressive action systemically but rather *in situ* (i.e., at sites of pathogen replication).¹⁵ The importance of *in situ* findings is illustrated by

studies of chronic HIV-infected patients showing that, although the frequency of peripheral blood Tregs was not elevated, their expression in the gut was highly increased and correlated with the patients' HIV replicative status.²³ Thus, our findings of increased expression of Tregs and IL-10 not only in blood but especially *in situ*, together with the increased *in situ* expression of CTLA-4, do suggest a suppressive role for Tregs in lepromatous patients. The increased Tregs expression could mediate the depressed antigen-specific proliferative responses and reduced IFN- γ release observed in our lepromatous patients, resulting in deficient Th-1 responses and lack of control of the bacillary load.

In fact, our observation of high number of *in situ* Tregs in lepromatous leprosy may help to explain earlier findings of reduced numbers of IL-2-producing cells in lepromatous biopsies compared with tuberculoid biopsies.²⁴ A role for suppressor (regulatory) cells was also suggested in sequential IHC studies of lepromin reactions by the same group.²⁵ Although the presence of a high number of IL-2-producing cells was equally observed in the early phase of lepromin reaction of lepromatous and tuberculoid patients, at later phases these cells persisted in tuberculoid patients but markedly decreased in lepromatous patients.

In conclusion, as in other chronic granulomatous diseases, our results suggest that Tregs may play a role in the outcome of the host-parasite interaction in leprosy. Providing a balanced level of Treg function to achieve an appropriate level of parasite control without inducing immunopathology would be a major goal in the management of this still-challenging infectious disease.

Received February 7, 2012. Accepted for publication February 14, 2012.
 Acknowledgments: We would like to thank John Spencer from the Mycobacteria Research Laboratories, Colorado State University, for the kind donation of the Mycobacterium leprae antigen (contract #N01-AI-25469) and Wellington L. F. Silva for his skillful help with the immunohistochemical studies.

Financial support: This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Conselho Nacional de Pesquisa Científica, and Coordenação de Aprimoramento de Pessoal de Nível Superior.

Authors' addresses: Maria L. Palermo and Camila R. Cacere, Laboratory of Medical Investigation Unit 56, Division of Clinical Dermatology, Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, E-mails: luli_neves@yahoo.com.br and cacerec@hotmail.com. Carla Pagliari, Department of Pathology, Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, E-mail: cpagliari@usp.br. Maria Angela B. Trindade, Health Institute, São Paulo State Health Department, São Paulo, Brazil, E-mail: angelatrindade@uol.com.br. Tania M. Yamashitafuji, Ambulatory of Specialities, São Paulo City Health Service, São Paulo, Brazil, E-mail: fernanda_fuji@yahoo.com.br. Alberto José S. Duarte, Laboratory of Medical Investigation Unit 56, Department of Pathology, Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, E-mail: adjsduar@usp.br. Gil Benard, Laboratory of Medical Investigation Unit 56, Division of Clinical Dermatology, Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; and Laboratory of Medical Investigation Unit 53, Tropical Medicine Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, E-mail: mahong@usp.br.

4.1.6 References

1. Ridley DS, Jopling WH, 1966. Classification of leprosy according to immunity: a five-group system. *Int J Lepr* 34: 255-273.
2. Montoya D, Modlin RL, 2010. Learning from leprosy: insight into the human innate immune response. *Adv Immunol* 105: 1-24.
3. Modlin RL, Mehra V, Wong L, Fujimiya Y, Chang WC, Horwitz DA, Bloom BR, Rea TH, Pattengale PK, 1986. Suppressor T lymphocytes from lepromatous leprosy skin lesions. *J Immunol* 137: 2831-2834.
4. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA, 2010. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 10: 490-500.
5. Shevach EM, 2009. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell mediated suppression. *Immunity* 30: 636-645.
6. Kuhn A, Beissert S, Krammer PH, 2009. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in human lupus erythematosus. *Arch Dermatol Res* 301: 71-81.

7. Antiga E, Quaglino P, Bellandi S, Volpi W, Del Bianco E, Comessatti A, Osella-Abate S, De Simone C, Marzano A, Bernengo MG, Fabbri P, Caproni M, 2010. Regulatory T cells in the skin lesions and blood of patients with systemic sclerosis and morphoea. *Br J Dermatol* 162: 1056-1063.
8. Engler JB, Undeutsch R, Kloke L, Rosenberger S, Backhaus M, Schneider U, Egerer K, Dragun D, Hofmann J, Huscher D, Burmester GR, Humrich JY, Enghard P, Riemekasten G, 2011. Unmasking of autoreactive CD4 T cells by depletion of CD25 regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 70: 2176-2183.
9. Guyot-Rovol V, Innes JA, Hackforth S, 2006. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in tuberculosis patients. *Am J Respir Crit Care Med* 173: 803-810.
10. Campanelli AP, Roselino AM, Cavassani KA, Pereira MSF, Mortara RA, Brodskyn CI, Goncalves HS, Belkaid Y, Barral-Netto M, Barral A, Silva JS, 2006. CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *J Infect Dis* 193: 1313-1322.
11. Silva LC, Silveira GG, Arnone M, Romiti R, Geluk A, Franken KC, Duarte AJ, Takahashi MD, Benard G, 2010. Decrease in Mycobacterium tuberculosis specific immune responses in patients with untreated psoriasis living in a tuberculosis endemic area. *Arch Dermatol Res* 302: 255-262.
12. Cavassani KA, Campanelli AP, Moreira AP, Vancim JO, Vitali LH, Mamede RC, Martinez R, Silva JS, 2006. Systemic and local characterization of regulatory T cells in a chronic fungal infection in humans. *J Immunol* 177: 5811-5818.
13. Herzenberg LA, Tung J, Moore WA, Herzenberg LA, Parks DR, 2006. Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. *Nat Immunol* 7: 681- 685.
14. Pagliari C, Fernandes ER, Stegun FW, da Silva WL, Duarte MIS, Sotto MN, 2011. Paracoccidioidomycosis: cells expressing IL17 and Foxp3 in cutaneous and mucosal lesions. *Microb Pathog* 50: 263-267.
15. Baecher-Allan C, Hafler DA, 2004. Suppressor T cells in human diseases. *J Exp Med* 200: 273-276.
16. Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL, 2002. Role for CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *Nature* 420: 502-507.

17. Bourreau E, Ronet C, Darcissac E, Lise MC, Sainte Marie D, Clity E, Tacchini-Cottier F, Couppie P, Launois P, 2009. Intralesional regulatory T-cell suppressive function during human acute and chronic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*. *Infect Immun* 77: 1465-1474.
18. Maurya R, Kumar R, Prajapati VK, Manandhar KD, Sacks D, Sundar S, Nylén S, 2010. Human visceral leishmaniasis is not associated with expansion or accumulation of Foxp3+ CD4 cells in blood or spleen. *Parasite Immunol* 32: 479-483.
19. Katara GK, Ansari NA, Verma S, Ramesh V, Salotra P, 2011. Foxp3 and IL-10 expression correlates with parasite burden in lesional tissues of post kala azar dermal leishmaniasis (PKDL) patients. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1171.
20. Ismail A, Gadir AF, Theander TG, Kharazmi A, El Hassan AM, 2006. Pathology of post-kala-azar dermal leishmaniasis: a light microscopical, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin lesions and draining lymph nodes. *J Cutan Pathol* 33: 778-787.
21. Attia EA, Abdallah M, Saad AA, Afifi A, El Tabbakh A, El-Shennawy D, Ali HB, 2010. Circulating CD4+ CD25 high FoxP3+T cells vary in different clinical forms of leprosy. *Int J Dermatol* 49: 1152-1158.
22. Massone C, Nunzi E, Ribeiro-Rodrigues R, Talhari C, Talhari S, Schettini AP, Parente JN, Brunasso AM, Puntoni M, Clapasson A, Noto S, Cerroni L, 2010. T regulatory cells and plasmacytoid dendritic cells in Hansen disease: a new insight into pathogenesis? *Am J Dermatopathol* 32: 251-256.
23. Epplé HJ, Loddenkemper C, Kunkel D, Tröger H, Maul J, Moos V, Berg E, Ullrich R, Schulzke JD, Stein H, Duchmann R, Zeitz M, Schneider T, 2006. Mucosal but not peripheral FOXP3+ regulatory T cells are highly increased in untreated HIV infection and normalize after suppressive HAART. *Blood* 108: 3072-3078.
24. Longley J, Haregewoin A, Yemaneberhan T, Warndorff van Diepen T, Nsibami J, Knowles D, Smith KA, Godal T, 1985. In vivo responses to *Mycobacterium leprae*: antigen presentation, interleukin-2 production, and immune cell phenotypes in naturally occurring leprosy lesions. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 53: 385-394.
25. Haregewoin A, Longley J, Bjune G, Mustafa AS, Godal T, 1985. The role of interleukin-2 (IL-2) in the specific unresponsiveness of lepromatous leprosy to *Mycobacterium leprae*: studies in vitro and in vivo. *Immunol Lett* 11: 249-252.

4.2 Artigo 2 - Differential expression of the costimulatory molecules CD86, CD28, CD152 and PD-1 correlates with the host-parasite outcome in leprosy

4.2.1 Abstract

Leprosy is a spectral disease exhibiting two polar sides, namely, lepromatous leprosy (LL) characterised by impaired T-cell responses and tuberculoid leprosy in which T-cell responses are strong. Proper T-cell activation requires signalling through costimulatory molecules expressed by antigen presenting cells and their ligands on T-cells. We studied the influence of costimulatory molecules on the immune responses of subjects along the leprosy spectrum. The expression of the costimulatory molecules was evaluated in in vitro-stimulated peripheral blood mononuclear cells of lepromatous and tuberculoid patients and healthy exposed individuals (contacts). We show that LL patients have defective monocyte CD86 expression, which likely contributes to the impairment of the antigen presentation process and to patients anergy. Accordingly, CD86 but not CD80 blockade inhibited the lymphoproliferative response to Mycobacterium leprae. Consistent with the LL anergy, there was reduced expression of the positive signalling costimulatory molecules CD28 and CD86 on the T-cells in these patients. In contrast, tuberculoid leprosy patients displayed

increased expression of the negative signalling molecules CD152 and programmed death-1 (PD-1), which represents a probable means of modulating an exacerbated immune response and avoiding immunopathology. Notably, the contacts exhibited proper CD86 and CD28 expression but not exacerbated CD152 or PD-1 expression, suggesting that they tend to develop a balanced immunity without requiring immunosuppressive costimulatory signalling.

Key words: *Mycobacterium leprae* - costimulatory molecules - CD80 - CD86 - CD152 - PD-

Financial support: FAPESP, CNPq, CAPES, Fundação Paulista contra a Hanseníase

+ Corresponding authors: mahong@usp.br

Received 3 March 2012

Accepted 27 July 2012

Although the prevalence of leprosy has been decreasing all over the world, hyper-endemic areas persist where the transmission of leprosy is still out of control (WHO 2010). Leprosy, caused by the bacillus *Mycobacterium leprae*, is a chronic, incapacitating disease that affects the peripheral nerves and skin. Leprosy manifests as a spectral disease. The lepromatous form of the disease, comprising both borderline lepromatous leprosy (BL) and lepromatous leprosy (LL), is a consequence of the impaired immune cellular response of the patient and is characterised by an antigen-specific anergy, a Th-2 pattern of immune response and a lack of control of bacilli multiplication. The tuberculoid form of the disease, comprising both borderline tuberculoid (BT) and tuberculoid tuberculoid (TT) leprosy, corresponds to the more benign form of the disease and is characterised by a strong granulomatous response and the control of bacilli multiplication (Yamamura et al. 1991, Sinsimer et al. 2010).

Thus, a protective immune response in leprosy is considered to rely on the cellular arm of the immune system, specifically on the generation of helper T-cells that can activate cells from the monocytic lineage (macrophages, dendritic cells and Schwann cells, among others) to destroy the bacilli that they harbour, along with effector T-cells, rendering them capable of killing these infected cells. Therefore, T-cell activation is a crucial step in leprosy immunity (Murray et al. 2007). The activation of T-cells by cognate antigens to proliferate and release cytokines requires a two-step signalling process. The first signal is produced by the interaction between the T-cell receptor and the antigen-major histocompatibility complex provided by the antigen-presenting cell and the second signal is mediated through the interaction of costimulatory molecules present on the surfaces of the antigen presenting cells (APCs) with their ligands on the T-cells (Mueller et al. 1989). The latter is crucial for driving the balance between the induction of tolerance or anergy and productive T-cell effector and helper immune responses. CD80 and CD86 are molecules expressed by APCs that play a major role in the outcome of T-cell activation. Although structurally and functionally similar (Bhatia et al. 2006), they exhibit different immunological properties leading to distinct T-cell functional outcomes. CD86 has a higher relative affinity for CD28, while CD80 has higher affinity for CD152 (Collins et al. 2002). CD28 is involved in productive T-cell activation, signalling for cellular proliferation, interleukin (IL)-2 secretion and cell survival through enhanced Bcl-2 expression (Bour-Jordan et al. 2011), while CD152 halts T-cell activation, favours apoptosis and induces either anergy or tolerance (Fife & Bluestone 2008). Moreover, while

CD86 and CD28 are constitutively expressed by APC and T-cells, respectively, CD80 and CD152 are expressed only following 24-48 h of activation of the APC and T-

cell (Lenschow et al. 1996, Bour-Jordan et al. 2011). A model of T-cell costimulation has thus been proposed in which the distinct structures and binding properties of CD86 and CD80 significantly enhance the activating and inhibitory functions of CD28 and CD152, respectively (Collins et al. 2002). This seems to be relevant to the regulation of the immune responses in several clinical conditions. For example, the increased expression of CD86 by monocytes was shown to play a key role in the exacerbated inflammatory response of multiple sclerosis (Filion et al. 2003); conversely, the defective expression of CD86 on monocytes was shown to be crucial in uraemia-associated immunodeficiency (Girndt et al. 2001).

However, other costimulatory molecules have been described that influence the subsequent adaptive immune responses, such as programmed death-1 (PD-1) and inducible costimulatory protein (ICOS) (Greenwald et al. 2005). These molecules have been shown to play major roles in triggering autoimmunity or peripheral tolerance and directing the protective immune response to pathogens or facilitating the persistence of the parasite leading to chronic immune activation (Zhu et al. 2011, Bour-Jordan et al. 2011).

This study aimed to verify the influence of costimulatory molecules on the immune response of subjects along the leprosy spectrum. The expression levels of the costimulatory molecules CD80, CD86, CD28, CD152, PD-1 and ICOS were evaluated in in vitro-stimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from both lepromatous and tuberculoid patients and healthy exposed individuals.

4.1.2 Patients, Materials and Methods

Patients and healthy contacts - A total of 28 consecutive, newly diagnosed leprosy patients admitted to our service were analysed. All patients were studied before the start of the specific therapy; they were all human immunodeficiency virus-negative and had no other infectious comorbidities. Some of the patients had participated in a previous study (Palermo et al. 2012). Fourteen had tuberculoid leprosy (age range 43 ± 5 years, 4 female and 10 male subjects), 11 of whom presented with the BT and three of whom presented TT. The other 14 patients had LL (age range 38 ± 4 years, 6 female and 8 male subjects); of these patients, 10 had BL and four presented polar LL. A control group composed of 10 healthy *M. leprae*-exposed individuals (contacts, age range 32 ± 4 years) was selected from among persons living in close contact with the LL patients. Exposure was defined by a positive response in the lymphoproliferation assay with *M. leprae* antigen, as described below (Table). The study was approved by the Ethical Committee of the Clinics Hospital, University of São Paulo Medical School (protocol 0955/08). Informed consent was obtained from all participants.

TABLE
Lymphocyte proliferative responses

Subjects	Medium	MLCwA (cpm)	Phytohaemagglutinin
Contacts (n = 9)	521 ± 66	6.216 ± 621	27.351 ± 7.457
Tuberculoid leprosy (n = 11)	744 ± 266	6.734 ± 1771	28.813 ± 9.331
Lepromatous leprosy (n = 13)	509 ± 138	<i>a</i>	34.379 ± 7.606

a: $p < 0.01$ vs. contacts and tuberculoid leprosy (one-way analysis of variance with Newmans-Keuls post-test); cpm: counts per minute; MLCwA: *Mycobacterium leprae* antigen.

PBMC isolation and cultures - PBMCs were cultured as previously described (Cacere et al. 2008). Briefly, PB- MCs were isolated from heparinised peripheral blood by a density gradient and then resuspended in RPMI medium supplemented with gentamicin (40 µg/mL) and 10% human AB serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). PBMCs (2.5×10^5 /well) were cultivated at 37°C and 5% CO₂ in the presence of medium only, a cell wall preparation from *M. leprae* (MLCwA)(10 µg/mL) or, as a positive control, phytohaemagglutinin (PHA) (5 µg/mL) (Sigma, Saint Louis, MO, USA). For the lymphoproliferation assays, cells were incubated for three days (PHA) or six days (MLCwA) and then pulsed for an additional 18 h with 1.0 µCi/well [3H]-thymidine (Radiochemical Centre, Amersham, UK) before harvesting. Cell-bound radioactivity was measured using a β-counter (Perkin-Elmer, Boston, MA, USA). In some experiments, the following blocking monoclonal antibodies were added to the cultures, at 10 µg/mL, from the start of the culture (day 0), as described elsewhere (Cacere et al. 2008): anti-CD152 (IgG2a, clone BI3) (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), anti-CD80 (IgG1,6 clone 2D10.4) (eBioscience, San Diego, CA, USA) and anti-CD86 (IgG2b, clone IT2.2) (eBioscience).

The expression of costimulatory molecules by monocytes and T-cells - For T-cell staining, PBMCs, which were isolated as described above from both the contacts and the leprosy patients, were cultured in 24-well plates for four days and the cells were then carefully collected. Day 4 was considered to be optimal for the expression of CD152 and the B7 family of molecules on T-cells according to preliminary time-course experiments and previous reports (Cacere et al. 2008). The cells were washed twice with cold phosphate buffered saline (PBS) and then re-

suspended at 1×10^6 cells/mL in PBS/bovine serum albumin (BSA) 1% buffer. Aliquots containing 2.5×10^5 cells were distributed to cytometer tubes and the Fc receptors were blocked by incubation for 20 min with human immunoglobulin (50 mg/mL) (Baxter Biosciences, Vienna, Austria). After washing with PBS-BSA 1%, 10 μ L of the following antibodies was added: anti-CD3 (tri-colour, Caltag) and anti-CD28 (PE, Caltag), anti-CD152 (Cy-chrome, Pharmingen), anti-PD-1 (FITC, eBioscience), anti-ICOS (PE, eBioscience), anti-CD80 (FITC, Caltag) or anti-CD86 (PE, Caltag). To analyse the expression of CD86 and CD80 on peripheral blood monocytes, CD14⁺ cells were isolated from the entire PBMC population by positive selection with anti-CD14-conjugated beads (EasySep, StemCell Technologies). The purity of the population was always $\geq 98\%$. The purified CD14⁺ population was allowed to rest in 24-well plates for 48 h at 37°C and 5% CO₂, a step that was necessary for the cells to return to a resting state after the column passage. After the 24 h resting period, MLCwA or *Candida* Metabolic Antigen (Sanofi- Pasteur, Paris, France) (5 μ g/mL), a control non-related antigen, was added and the incubation was continued for 4 h. Monocytes were carefully collected from the wells through several washes with cold RPMI using a 1 mL pipette and the cells were washed again with PBS/BSA 1%, resuspended in PBS/BSA 1% buffer at 10^6 cells/mL and stained with 10 μ L of the following antibodies: anti-CD14 (tri-colour, Caltag, Burlingame, CA, USA) plus anti-CD80 (FITC, Caltag) or anti-CD86 (PE, Caltag). For both T-cell and monocyte staining, the tubes containing the labelled cells were gently vortexed and incubated in the dark for 30 min at room temperature, resuspended in 500 μ L of PBS/BSA 1% buffer, washed in PBS to remove unbound antibody and finally suspended in PBSazide. In

each experiment, one tube remained without mAb addition as an autofluorescence control. In addition, each protocol was set up with colour compensation controls. Cells were immediately acquired and analysed on a Coulter flow cytometer using the software System II (Coulter Epics XL-MCL, Hialeah, FL, USA). The results were expressed as percentages of costimulatory molecule-expressing cells and mean fluorescence intensities (MFIs) per at least 10,000 CD3⁺ or CD14⁺ gated cells.

Statistical analysis - The comparison of data from among the three groups was performed using one-way analysis of variance and the Newman-Keuls multiple comparison test. The differences were considered significant when $p < 0.05$. GraphPad Prism 5.0 software was used (Graph Pad Software Inc San Diego, CA).

4.1.3 Results

Proliferative responses - The Table shows that the PBMCs of patients with the lepromatous form of leprosy were anergic to MLCwA, while positive responses were observed for the tuberculoid patients and contacts. The responses to PHA were not significantly different among the three groups.

CD86 and CD80 expression by CD14⁺ cells - Significantly fewer monocytes (CD14⁺ cells) from lepromatous patients (~50%) expressed the costimulatory molecule CD86 compared with tuberculoid patients and contacts (~80%) after 4 h of culture in the presence of medium only or MLCwA (Fig. 1A). There were no significant differences in CD86 expression when the monocytes were challenged with a control antigen from *Candida* spp. The analysis of the CD86 MFI data revealed a similar trend; monocytes from lepromatous patients expressed the molecule at lower

densities in the presence of medium only or MLCwA (Fig. 1B). In contrast, CD80 was poorly expressed by monocytes (< 10%) that were either unchallenged or challenged with the antigens, with no significant differences among the three groups (data not shown).

Fig. 1: expression of CD86 on monocytes (CD14⁺ cells) from tuberculoid (n = 7) and lepromatous (n = 10-11) leprosy patients and healthy exposed contacts (n = 6) challenged with *Candida* Metabolic Antigen (CMA) or a *Mycobacterium leprae* antigen (MLCwA) or unchallenged (medium). Results are presented as mean $\pm$ standard error of the means of the percentage of expressing cells (A) and mean fluorescence intensity (MFI) of the molecule (B). *: p < 0.05; **: p < 0.01.

The expression of costimulatory molecules by CD3⁺ cells - CD28 was similarly expressed by high percentages of CD3⁺ cells from all three groups of patients (Fig. 2C); however, the MFI differed among the groups (Fig. 2D). CD3⁺ cells from unstimulated and MLCwA-stimulated cultures of PBMCs from both lepromatous patients and contacts expressed CD28 at lower intensities than those

from tuberculoid patients. The CD28 MFI was comparable in CD3⁺ cells stimulated with PHA, which was used as a positive control.

As observed above for CD14⁺ cells, CD80 expression in unstimulated and MLCwA-stimulated CD3⁺ cells was poor (< 10%) in all three groups (data not shown). CD86 was expressed by higher numbers of CD3⁺ cells, but with no significant differences among the three groups (Fig. 2A). However, the MFI of CD86 in lepromatous patients' CD3⁺ cells was significantly reduced compared with the MFIs from tuberculoid patients and contacts in all three experimental conditions (Fig. 2B).

Fig. 2: expression of CD86 and CD28 on T-lymphocytes (CD3⁺ cells) from tuberculoid (n = 10) and lepromatous (n = 12-14) leprosy patients and healthy exposed contacts (n = 10) stimulated with phytohemagglutinin (PHA) or a *Mycobacterium leprae* antigen (MLCwA) or unstimulated (medium). Results are presented as mean $\pm$ standard error of the means of the percentage of expressing cells (A, C) and mean fluorescence intensity (MFI) of the molecule (B, D). *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$.

The expression of the negative signalling molecules CD152 and PD-1 also differed among groups (Fig. 3). Higher proportions of unstimulated and PHA and ML- CwA-stimulated CD3⁺ cells from tuberculoid patients expressed CD152 with a higher MFI than the same cells from lepromatous patients and contacts (Fig. 3A, B). With regard to PD-1, significantly higher proportions of CD3⁺ cells from both lepromatous and tuberculoid patients expressed this molecule compared with contacts either when cultured in medium only or in the presence of MLCwA (Fig. 3C). With PHA, the patients' CD3⁺ cells also expressed higher levels than the cells from contacts, although the differences did not reach statistical significance. PD-1 MFI did not differ among groups (Fig. 3D).

Fig. 3: expression of CD152 and programmed death-1 (PD-1) on T- lymphocytes (CD3⁺ cells) from tuberculoid (n = 9-14) and lepromatous (n = 10-11) leprosy patients and healthy exposed contacts (n = 8) stimulated with phytohemagglutinin (PHA) or a *Mycobacterium leprae* antigen (MLCwA) or unstimulated (medium). Results are presented as mean $\pm$ standard error of the means of the percentage of expressing cells (A, C) and mean fluorescence intensity (MFI) of the molecule (B, D). *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$.

ICOS expression was low in CD3⁺ cells and was not different among groups in any of the experimental conditions studied (data not shown).

Blocking experiments - We tested the effect of anti- CD152, anti-CD86 and anti-CD80 blocking antibodies in PBMC cultures from six donors, three tuberculoid patients and three contacts who had positive proliferative responses to MLCwA. As shown in Fig. 4, CD86 blockade reduced the proliferative response to MLCwA to less than 50% of the control cultures while CD80 blockade had no effect; CD152 blockade slightly but significantly increased the response.

Fig. 4: effect of anti-CD80, anti-CD86 and anti-CD152 blocking monoclonal antibodies on the lymphocyte proliferative response to *Mycobacterium leprae* antigen (MLCwA) of six subjects responders (3 contacts and 3 tuberculoid patients) to MLCwA (●). No effect was seen in unstimulated cells (○). *: $p < 0.05$ vs. nil.

4.1.4 Discussion

Our data demonstrate that CD86, but not CD80, seems to play a critical role in the presentation of leprosy antigens by monocytes. The blockade of CD86 signalling, but not the blockade of CD80 signalling, with a neutralising monoclonal antibody resulted in significant inhibition of the proliferative response to *M. leprae* antigens. Accordingly, CD86, but not CD80, was differentially expressed among contacts and

patients; the former was highly expressed by monocytes from both healthy individuals exposed to *M. leprae* (contacts) and patients at the tuberculoid pole of leprosy, while the latter was poorly expressed by both patients and contacts. In contrast, monocytes from patients at the LL pole exhibited a striking deficiency in the expression of CD86. This deficiency may help to explain the well-described differences in the T-cell responses between lepromatous and tuberculoid patients (Yamamura et al. 1991). In fact, unlike the tuberculoid patients, our lepromatous patients were unable to mount strong cellular immune responses against *M. leprae* antigens, as demonstrated in vivo by the poor granulomatous inflammatory response and high bacillary load reported in a previous study (Palermo et al. 2012) and as observed in vitro in this study by the reduced antigen-specific proliferative responses. These findings may be explained by the reduced expression of CD86 during the early stage of recognition and presentation of *M. leprae*-derived antigens in lepromatous lesions, which interferes with the formation of the immune synapse that is required to efficiently activate the T-cells and generate effector T-cells (Lanzavecchia & Sallusto 2000).

Previous data on CD80 and CD86 in leprosy are scarce and controversial, suggesting either a role for CD80 in the anergy of lepromatous patients or enhanced CD80 expression as a predictor of reaction states (Agrewala et al. 1998, Schlienger et al. 1998, Santos et al. 2007). Differences in the methods and the types of cells analysed and in the nature of the antigen used may account for the different results.

Several mechanisms may be put forward to explain the deficient CD86 expression by LL patients. T-regs have been shown to down-modulate the expression of CD80 and CD86 on APCs (Cederbom et al. 2000), likely through direct cell-to-cell

interactions. We have previously demonstrated that these patients have increased numbers of T-regs, both in situ and in vitro (Palermo et al. 2012). IL-10 has been shown to down-modulate CD86 expression on monocytes (Creery et al. 1996). In LL, the monocytes are exposed to highly IL-10-enriched microenvironments because in this form of leprosy, IL-10 expression is significantly enhanced in both in situ and in vitro-stimulated PBMCs; in contrast, in tuberculoid leprosy, the IL-10 levels are low (Moubasher et al. 1998, Palermo et al. 2012). Alternatively, the process of monocyte invasion by *M. leprae* by itself could down-modulate CD86 expression on the host cell, as has been demonstrated with *Mycobacterium tuberculosis* infection (Castaño et al. 2011).

Differential costimulatory molecule expression by T-cells was also verified among our lepromatous and tuberculoid patients and contacts. Molecules that either signal for (CD86 and CD28) or reduce (CD152 and PD-1) T-cell activation were evaluated. Probably as a consequence of defective APC function, T-cells from lepromatous patients were driven to an anergic state and exhibited reduced expression of both CD86 and CD28, especially when compared with tuberculoid patients. The latter exhibited the highest levels of expression, especially regarding CD28 expression, which was even significantly higher than even that of the contacts. This would indicate an on-going exacerbated T-cell response. However, T-cells from these patients also exhibited enhanced CD152 expression, possibly preventing an uncontrolled immune reaction. The net result would be an effective immune response capable of limiting bacillary multiplication and the dissemination of lesions without causing immunopathology. The expression of CD152 by the T-cells from contacts was significantly lower than that from tuberculoid patients,

which suggests that distinct immune regulatory mechanisms take place in tuberculoid patients' and contacts' *M. leprae*-specific responses. Consistent with the fact that CD152 expression is cell-activation dependent, when resting-state molecules found in intracellular reservoirs are rapidly mobilised to the cell surface (Schneider et al. 2006), T- cells from lepromatous patients exhibited low levels of expression of this molecule. Moreover, corroborating with its inhibitory function in leprosy, the blockade of CD152 resulted in a slight but significant enhancement of the *M. leprae*-specific proliferative responses.

Interestingly, the pattern of expression of the inhibitory molecule PD-1 differed from that of CD152. In fact, it has been suggested that PD-1 and CD152 play complementary and non-overlapping roles in peripheral T-cell hypo-responsiveness (Fife & Bluestone 2008). CD152 may predominantly control the T-cell response at the induction phase, while PD-1 may be responsible for the maintenance of the tolerant or anergic state. PD-1 intrinsically inhibits the function of effector T-cells (Fife et al. 2006) and it may also act by affecting the stability of their ligation with DCs (Fife et al. 2009). A significantly higher number of T-cells expressed PD-1 in tuberculoid and lepromatous patients than in contacts, thus serving as a marker of disease. In fact, PD-1 is highly expressed in situations of high and constant antigen exposure, such as chronic viral infections or malignancy (Barber et al. 2006, Zhu et al. 2011). Chronic exposure to mycobacterial antigens is indeed a feature of leprosy patients due to the protracted evolution of the disease.

Finally, the T-cell expression levels of CD80 and ICOS were also examined and indicated low levels of expression (data not shown), likely suggesting that they play minor roles in the regulation of the immune response in leprosy.

Based on our findings, a model can be built that proposes that, in LL, the defective APC function due to reduced CD86 expression by these cells results in an abnormal T-cell activation characterised by reduced antigen-specific proliferative responses and the deficient expression of CD28 and CD86 on T-cells. CD152 is not required for the induction of this anergic state. However, the chronic exposure to *M. leprae* antigens enhances PD-1 expression, which reinforces the state of tolerance against the bacillus. Consequently, patients develop a disseminated multi-bacillary disease. In tuberculoid leprosy, proficient APC function exists, positive proliferative responses are detected and high expression levels of positive signalling molecules on T-cells (CD28 and CD86) are detected. However, these positive signalling molecules need to be counter-regulated by the enhanced expression of inhibitory molecules (CD152 and PD-1), thus allowing a balanced effective immune response to be reached, i.e., control of the parasite burden without causing immune pathology. In contacts, there is no deficiency in the antigen-presenting process and a balanced immune response “naturally” develops because enhanced expression of negative signalling molecules is not required. A better understanding of the immune regulation of the host immune response in leprosy may allow for immune interventions that would impact the prognosis of this still poorly controlled infectious disease.

4.1.5 References

- Agrewala JN, Kumar B, Vohra H 1998. Potential role of B7-1 and CD28 molecules in immunosuppression in leprosy. *Clin Exp Immunol* 111: 56-63.
- Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R 2006. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439: 682-687.

- Bhatia S, Edidin M, Almo SC, Nathenson SG 2006. B7-1 and B7-2: similar costimulatory ligands with different biochemical, oligomeric and signaling properties. *Immunol Lett* 104: 70-75.
- Bour-Jordan H, Esensten JH, Martinez-Llordella M, Penaranda C, Stumpf M, Bluestone JA 2011. Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/B7 family. *Immunol Rev* 241: 180-205.
- Cacere CR, Mendes-Giannini MJ, Fontes CJ, Kono A, Duarte AJS, Benard G 2008. Altered expression of the costimulatory molecules CD80, CD86, CD152, PD-1 and ICOS on T-cells from paracoccidioidomycosis patients: lack of correlation with T-cell hyporesponsiveness. *Clin Immunol* 129: 341-349.
- Castaño D, Barrera LF, Rojas M 2011. *Mycobacterium tuberculosis* alters the differentiation of monocytes into macrophages *in vitro*. *Cell Immunol* 268: 60-67.
- Cederbom L, Hall H, Ivars F 2000. CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 30: 1538-1543.
- Collins AV, Brodie DW, Gilbert RJ, Iaboni A, Manso-Sancho R, Walse B, Stuart DI, van der Merwe PA, Davis SJ 2002. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity* 17: 201-210.
- Creery WD, Diaz-Mitoma F, Filion L, Kumar A 1996. Differential modulation of B7-1 and B7-2 isoform expression on human monocytes by cytokines which influence the development of T helper cell phenotype. *Eur J Immunol* 26: 1273-1277.
- Fife BT, Bluestone JA 2008. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev* 224: 166-182.
- Fife BT, Guleria I, Gubbels Bupp M, Eagar TN, Tang Q, Bour-Jordan H, Yagita H, Azuma M, Sayegh MH, Bluestone JA 2006. Insulin-induced remission in new-onset NOD mice is maintained by the PD-1-PD-L1 pathway. *J Exp Med* 203: 2737-2747.
- Fife BT, Pauken KE, Eagar TN, Obu T, Wu J, Tang Q, Azuma M, Krummel MF, Bluestone JA 2009. Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal. *Nat Immunol* 10: 1185-1192.
- Filion LG, Matusevicius D, Graziani-Bowering GM, Kumar A, Freedman MS 2003. Monocyte-derived IL-12, CD86 (B7-2) and CD40L expression in relapsing and progressive multiple sclerosis. *Clin Immunol* 106: 127-138.

- Girndt M, Sester M, Sester U, Kaul H, Köhler H 2001. Defective expression of B7-2 (CD86) on monocytes of dialysis patients correlates to the uremia-associated immune defect. *Kidney Int* 59: 1382-1389.
- Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH 2005. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 23: 515-548.
- Lanzavecchia A, Sallusto F 2000. From synapses to immunological memory: the role of sustained T cell stimulation. *Curr Opin Immunol* 12: 92-98.
- Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14: 233-258.
- Moubasher AD, Kamel NA, Zedan H, Raheem DD 1998. Cytokines in leprosy. I. Serum cytokine profile in leprosy. *Int J Dermatol* 37: 733-740.
- Mueller DL, Jenkins MK, Schwartz RH 1989. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu Rev Immunol* 7: 445-480.
- Murray RA, Siddiqui MR, Mendillo M, Krahenbuhl J, Kaplan G 2007. *Mycobacterium leprae* inhibits dendritic cell activation and maturation. *J Immunol* 178: 338-344.
- Palermo ML, Pagliari C, Trindade MAB, Yamashitafuji TM, Duarte AJS, Cacere CR, Benard G 2012. Increased expression of regulatory T cells and down regulatory molecules in lepromatous leprosy. *Am J Trop Med Hyg* 86: 878-883.
- Santos DO, Castro HC, Bourguignon SC, Bastos OM, Rodrigues CR, Van Heuverswyn H, Nery JA, Miranda A 2007. Expression of B7-1 costimulatory molecules in patients with multibacillary leprosy and reactional states. *Clin Exp Dermatol* 32: 75-80.
- Schlienger K, Uyemura K, Jullien D, Sieling PA, Rea TH, Linsley PS, Modlin RL 1998. B7-1, but not CD28, is crucial for the maintenance of the CD4⁺ T-cell responses in human leprosy. *J Immunol* 161: 2407-2413.
- Schneider H, Downey J, Smith A, Zinselmeyer BH, Rush C, Brewer JM, Wei B, Hogg N, Garside P, Rudd CE 2006. Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4. *Science* 313: 1972-1975.

- Sinsimer D, Fallows D, Peixoto B, Krahenbuhl J, Kaplan G, Manca C 2010. *Mycobacterium leprae* actively modulates the cytokine response in naïve human monocytes. *Infect Immun* 78: 293-300.
- WHO World Health Organization 2010. Leprosy - global situation 2010. *Wkly Epidemiol Rec* 85: 337-348.
- Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL 1991. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 254: 277-279.
- Zhu Y, Yao S, Chen L 2011. Cell surface signaling molecules in the control of immune responses: a tide model. *Immunity* 34: 466-478.

5 DISCUSSÃO

As várias formas clínicas da hanseníase estão relacionadas a diferentes respostas imunes do hospedeiro. Nos pacientes tuberculoides, as lesões são caracterizadas por infiltração de linfócitos CD4+ que expressam IFN- γ , os quais formam granulomas compactos nos quais raramente são encontrados bacilos. Esta potente resposta imune celular é corroborada, *in vitro*, pela intensa resposta linfoproliferativa e secreção de citocinas tipo Th-1. No polo oposto, a hanseníase virchowiana é caracterizada pela ausência de resposta imune celular específica, porém a reatividade a outras micobactérias é relativamente preservada. A hipótese de desvio imunológico (de Th-1 para Th-2) é respaldada por várias observações clínico-laboratoriais, desde a infiltração por linfócitos TCD4+ com perfil Th-1, até a produção intensa de IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-12, importante para o direcionamento para uma resposta tipo Th-1 (Yamamura *et al.*, 1992). Em contraste, nas lesões de paciente do polo virchowiano contém RNAm para citocinas do tipo Th-2 como IL-4 e IL-10 e quando analisadas células mononucleares desses pacientes, observam-se níveis elevados de ambas citocinas (Mutis *et al.*, 1994).

Nossos resultados da análise de resposta linfoproliferativa indicam que células de pacientes virchowianos têm diminuição desta resposta quando estimuladas com antígeno MLCWA, diferentemente dos tuberculoides e indivíduos controles. Nossos resultados corroboram dados obtidos por Launois *et al.* (1993) e Sachdeva *et al.* (1999), entre outros, que também demonstraram diminuição da resposta a

diferentes preparações antigênicas de *Mycobacterium leprae* em pacientes virchowianos comparadas com indivíduos controles e tuberculoides. Com relação a resposta linfoproliferativa dos pacientes virchowianos com o antígeno de *Candida albicans*, também observamos uma tendência à diminuição quando comparadas com a resposta dos pacientes tuberculoides e controles. Estes dados sugerem que a resposta imune celular pode estar diminuída também com outros antígenos que não o *M. leprae*.

Com o objetivo de melhor compreendermos a desregulação na produção de citocinas e uma resposta proliferativa deficiente frente ao *M. leprae*, inicialmente sugerimos que esta hiporreatividade observada principalmente em pacientes virchowianos poderia estar relacionada com um padrão específico e característico na expressão de moléculas coestimulatórias nas quais exercem um papel crucial na ativação celular e consequente regulação da resposta imunológica.

No *entanto*, há um grande número de moléculas para as quais se descreveu atividade coestimulatória de linfócitos sinalizando tanto negativa como positivamente a resposta. Para este estudo, optamos por analisar moléculas já bem caracterizadas como sinalizadoras positivas ou negativas no controle da resposta imunológica, ou seja, membros da família B7, como CD28, CTLA4 e seus ligantes CD80 e CD86. Alguns estudos prévios avaliaram a expressão e o papel de moléculas coestimulatórias em pacientes com hanseníase.

Estudos realizados com clones de células T de pacientes obtidas de lesões do polo tuberculoide revelaram que a resposta de memória das mesmas pode ser bloqueada por anticorpos anti-CD80, mas não por anticorpos anti-CD86 ou anti-CTLA. Por outro lado, a resposta de clones de células T obtidos de células do sangue

periférico de pacientes do polo virchowiano eram fortemente moduladas via a molécula CD28, diferente das células obtidas do polo tuberculoide. Portanto, coestimulação via CD80, mas não CD86, parece ser importante para a manutenção da resposta imune nos pacientes do polo tuberculoide (Schlienger *et al.*, 1998).

Por outro lado Santos *et al.* (2001) demonstraram que células T de pacientes com hanseníase independente da forma clínica da doença mantidas em cultura, quando acrescidas de células apresentadoras de antígenos e anticorpos bloqueadores anti-CD86 e anti-CD80 observava-se diminuição da resposta linfoproliferativa ao *M. leprae* apenas na presença do anticorpo anti-CD86, sugerindo a importância desta molécula na apresentação antigênica.

Posteriormente, este mesmo grupo avaliou a participação da molécula CD80 nos estados reacionais da hanseníase. Foi analisada a expressão desta molécula na superfície de células mononucleares “*ex vivo*” e em células inflamatórias de biópsias de lesões cutâneas de pacientes virchowianos sem e durante o eritema nodoso hansênico (ENH) ou reação reversa (RR). Tanto por citometria de fluxo (MFI) como por imunohistoquímica (cels/mm³) verificou-se aumento da expressão da molécula CD80 em pacientes com ENH e RR comparados com pacientes virchowianos. Um dos pacientes estudados foi acompanhado antes e durante o ENH demonstrando que o pico de expressão da molécula B7-1 ocorreu antes do episódio reacional. Estes resultados sugerem que o aumento da expressão de CD80 precede o episódio reacional da forma multibacilar da doença (Santos *et al.*, 2007).

Desta forma, os estudos são discordantes em relação à principal via coestimulatória (CD80 vs. CD86). Esta discrepância pode estar relacionada tanto às diferenças nos protocolos experimentais como à variabilidade das formas clínicas

dos pacientes estudados. Tendo em vista esta discrepância de resultados e a possível participação destas moléculas coestimulatórias na manutenção da resposta imune destes indivíduos, consideramos importante definir melhor as vias de coestimulação nas formas polares da doença.

Além da análise de expressão das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86, Sridevi *et al.* (2004) analisaram a expressão das moléculas CD28 e CTLA4 (ligantes de CD80 e CD86 nas APCs), outras moléculas acessórias (TCR $\alpha\beta/\gamma\delta$) e moléculas de linhagens de células T (CD4 e CD8). Estas moléculas foram analisadas em células mononucleares de indivíduos normais e pacientes com hanseníase estimuladas com antígeno total da parede do *M. leprae* associado a adjuvantes de células T. Quando as células mononucleares foram estimuladas com este complexo antigênico, houve aumento na expressão de CD80, CD86, CD28 e diminuição na expressão de CTLA4 na superfície das células dos indivíduos normais e pacientes BT/TT e BL/LL, enquanto resultados opostos foram obtidos em células estimuladas com o antígeno sem as moléculas imunomoduladoras da resposta de células T. Com a inibição das moléculas CD80 e CD86 com seus respectivos anticorpos monoclonais, houve uma diminuição completa da resposta linfoproliferativa destes três grupos, chamando atenção novamente para a importância destas moléculas na ativação e diferenciação das células T nos pacientes com hanseníase. Nossos resultados demonstraram aumento na expressão das moléculas CD86, CD28, CTLA4 na superfície de células mononucleares estimuladas com o antígeno de *M. leprae* e na ausência do antígeno, no entanto, diferentemente destes autores, apenas nos pacientes tuberculoídes.

Diferentemente dos trabalhos mencionados acima, para analisarmos a expressão de moléculas coestimulatórias na superfície de células CD14+ e CD3+

além do antígeno específico de MLCwA utilizamos um antígeno não relacionado, obtido de *Candida albicans*, reconhecido pelo sistema imune da maioria dos indivíduos (pacientes e controles), e o mitógeno PHA como controle positivo da ativação celular. Nossos resultados demonstraram diminuição na expressão de CD86 nas células CD14 de pacientes virchowianos estimuladas ou não, comparadas com células nas mesmas condições de pacientes tuberculoídes e controles, da mesma forma que Sridevi *et al.* (2004) e Santos *et al.* (2007). A diminuição da expressão de CD86 pode estar relacionada com a incapacidade desses pacientes virchowianos em promover uma resposta imune celular efetiva contra o antígeno, o que também foi corroborado pela ausência da resposta linfoproliferativa ao *M. leprae*. A expressão da molécula CD86 é constitutiva em baixos níveis na superfície de monócitos e quando ativados de forma adequada ocorre um aumento na expressão do CD86 na superfície destas células (von Boehmer, 2005). Quanto à molécula CD80 não observamos diferenças entre os grupos.

Também verificamos que a porcentagem de CTLA4 também está aumentada na superfície de células T estimuladas ou não nos pacientes tuberculoídes comparadas com pacientes virchowianos e controles. Provavelmente este aumento estaria relacionado com a ligação de CTLA4 com CD80 na superfície de células apresentadoras regulando a ativação celular e a mantendo efetiva, ao contrário dos virchowianos em que a ativação celular não é efetiva e a expressão de CTLA4 não está aumentada.

Outra hipótese que poderia estar relacionada com a imunossupressão observada nos pacientes virchowianos é a de aumento da expressão das moléculas CD80 e CD86 na superfície de linfócito. Este mecanismo é pouco explorado na

literatura, apesar de vários estudos terem demonstrado função de regulação negativa destas moléculas na resposta imune (Sun *et al.*, 2005). No entanto observamos um aumento de CD86 em células TCD3+ de pacientes tuberculoides, provavelmente relacionada com a ativação celular positiva observada nestes pacientes comparados com os virchowianos, mas semelhante ao grupo controle.

Outras moléculas coestimulatórias da família B7 vêm sendo estudadas entre elas ICOS (Indutor coestimulatório de células T), expressa em células T e seus ligantes ICOSL e B7-H2, expressos em células B, monócitos e células dendríticas. Além de ICOS, outra molécula, PD-1 (Programador de morte-1) foi descrita, com seus ligantes PDL-1 e PDL-2 encontrados em monócitos e células dendríticas e sua expressão parece ser regulada por IFN- γ ou IFN- γ /LPS. ICOS é expressa em células T rapidamente após a ligação TCR-MHC mas não é expressa constitutivamente em células T naive, o que a diferencia do CD28. Essa molécula regula tanto as células Th1 como Th2 durante a fase inicial de diferenciação (Freeman, 2002; Wassink *et al.*, 2004). PD-1 é expresso por células T CD4+ e CD8+, células B e células mieloides ativadas e não é encontrado em células não estimuladas. O principal papel de PD-1 no sistema imune é a manutenção da tolerância periférica. Após a interação com seus ligantes mediada pelo TCR, inibe a proliferação e produção de citocinas (IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- γ) pelas células T previamente ativadas (Lechner *et al.*, 2001; Gavin *et al.*, 2002).

Tendo em vista o importante papel das citocinas na hanseníase e a imunossupressão observada em alguns pacientes provavelmente pela ativação inadequada de células T, vimos a importância de estudarmos estas duas moléculas que também estão envolvidas na regulação da resposta imune.

Até o momento, nossos resultados sugerem que não houve diferença na expressão de ICOS entre os grupos nas nossas condições experimentais. Já a molécula PD-1 está discretamente aumentada nos pacientes com hanseníase, tuberculoides e virchowianos, com ou sem estímulo antigênico comparados com o grupo controle, funcionando como um possível marcador de doença.

Vários trabalhos com relação à hanseníase vêm sendo descritos na literatura com relação à análise da ativação celular, sendo a maioria dos trabalhos focados na avaliação das células apresentadoras. Nosso grupo, além de propor o estudo de algumas moléculas de expressão na superfície de células CD14+, também procurou analisar algumas moléculas coestimulatórias já estudadas ou não em hanseníase, na superfície de células T.

As células T regulatórias (células Treg) exercem papel fundamental na manutenção da tolerância imunológica periférica e têm sido observado número reduzido ou ausentes destas células em biópsia de pele de pacientes com doenças auto-imunes como lúpus eritematoso sistêmico e dermatomiosite, ou pacientes com dermatite atópica e doença enxerto versus hospedeiro (Verhagen *et al.*, 2006; Fujita *et al.*, 2007; Solomon *et al.*, 2008). Células Treg CD4⁺CD25⁺ são encontradas no sangue periférico e timo em humanos e camundongos (Shevach, 2002). Seu mecanismo de ação ainda é controverso, apesar de muitos estudos atribuírem a expressão de marcadores fenotípicos como CTLA-4, FoxP3, GITR e sua capacidade de produzir grandes quantidades de IL-10 e TGF- β ao seu papel imunomodulador (Mchugh *et al.*, 2002, O'Garra e Vieira, 2004, Piccirillo e Thornton, 2004).

A expressão de FoxP3 foi avaliada em uma variedade de infiltrados linfocíticos cutâneos (células T) e observou-se que a expressão de células T regulatórias foi

maior em condições reativas e menor em linfomas de células T, corroborando com a possibilidade de que a diminuição da função das Tregs possa ser permissiva a transformações neoplásicas (Solomon *et al.*, 2008). As células T regulatórias também possuem papel fundamental no controle da resposta imune excessiva a antígenos microbianos, especialmente contra patógenos que estabelecem infecção persistente incluindo *Leishmania major*, *Helicobacter pylori*, infecção pelo vírus da hepatite C e HIV entre outros (Belkaid, 2003).

Em nosso estudo observamos a presença de células T CD25+FoxP3+ em lesões de pele de pacientes tuberculoides e virchowianos. A densidade de células imuno-marcadas foi menor em pacientes tuberculoides, mediana: 48,0/mm², com presença de células CD25+FoxP3+ no interior e ao redor dos granulomas. Em pacientes virchowianos a densidade de células imuno-marcadas foi maior (mediana: 66.4/mm²) e sua distribuição se deu de forma aleatória ao longo do infiltrado inflamatório difuso.

Buscando entender se essas células CD25+ FoxP3+ presentes no infiltrado inflamatório desses pacientes apresentavam a capacidade de limitar a habilidade do sistema imune em responder de forma efetiva e em controlar a infecção pelo *M. Leprae*, optamos por investigar as propriedades regulatórias dessas células a partir da análise imunohistoquímica de citocinas como IL-10, TGF- β e CTLA-4.

IL-10 é uma importante citocina imunomoduladora, essencial em limitar a resposta imune a inúmeros patógenos. Está relacionada à supressão da resposta proliferativa de céls T em resposta a apresentação antigênica, bem como inibe a produção de citocinas Th1 e tornam macrófagos refratários a ativação via IFN- γ (Gazzinelli *et al.*, 1992; Vieth *et al.*, 1994). É bem conhecido o envolvimento da IL-10 na persistência e reativação da infecção micobacteriana em humanos. Semelhante

a IL-10, TGF- β também apresenta importante papel regulatório em doenças infecciosas, aumentando a virulência do parasita e sua replicação em macrófagos (Barral *et al.*, 1993).

O grupo de pacientes virchowianos apresentou maior número de células com expressão de IL-10, típica do padrão Th-2, quando comparado ao grupo de pacientes tuberculoides. Esse resultado reforça ser esse grupo o de menor capacidade de organização de resposta tecidual frente ao bacilo.

As Treg têm se mostrado essencial em iniciar e manter a resposta a infecção persistente por *L. major* e *Leishmania viannia brasiliensis*. Essas células acumulam na derme e suprimem os mecanismos de eliminação do parasita via IL-10 dependente ou independente, levando a persistência da infecção (Belkaid *et al.*, 2002; Campanelli *et al.*, 2006). Estudos mostraram que quando as células Treg foram eliminadas de camundongos C57BL/6 infectados observava-se também a erradicação da *L. major* (Belkaid, 2003).

Na tuberculose, o aumento de células T reg no sangue, sua proliferação e acúmulo em sítios de infecção incluindo os agregados linfocitários, levou a depressão da imunidade celular em pacientes com doença ativa, mediada pela supressão da produção IFN- γ *Mtb*-específico (Chen *et al.*, 2007, Li *et al.*, 2007). Estudos mostraram que indivíduos com tuberculose pulmonar apresentavam três vezes mais céls Treg do que indivíduos controles (Ribeiro-Rodrigues *et al.*, 2006).

Com relação aos nossos resultados, a porcentagem de células CD4+CD25+Foxp3+ de PBMC estimuladas com MLCwA foi maior nos pacientes virchowianos comparado tanto com os tuberculoides como com controles, corroborando os dados *in situ*.

6 CONCLUSÕES

Observamos que células T regulatórias exercem um importante papel na patogênese da doença de Hansen.

O aumento destas células no sangue periférico de pacientes virchowianos esteve associado à limitação na habilidade do sistema imune destes pacientes em responder efetivamente ao *M. leprae*. Este mecanismo pode estar envolvido na multiplicação exacerbada dos bacilos nesta forma da doença, diferentemente dos pacientes tuberculoides que controlam melhor a multiplicação do bacilo com a formação de granulomas compactos.

Em paralelo, também em pacientes virchowianos, houve aumento destas células *in situ* acompanhada do aumento de células marcadas com a molécula coestimulatória CTLA4 e com IL-10, sugerindo um possível mecanismo de regulação negativa na resposta efetora de células TCD4+ também na pele.

Verificamos também que o padrão de expressão de moléculas coestimulatórias variou conforme a interação hospedeiro-parasita na hanseníase. Naqueles indivíduos que desenvolveram hanseníase lepromatosa observamos resposta linfoproliferativa ao *M. leprae* diminuída; Redução da expressão de CD86 nas APC e CD28 na superfície das células T. Esta redução pode estar implicada na ativação celular deficiente, caracterizada pela resposta linfoproliferativa antígeno específica ausente.

Nos pacientes tuberculoides observamos elevada expressão de moléculas de sinalização positiva na superfície das APC e cels T (CD86 e CD28) fundamentais no

processo de ativação celular, caracterizada pela resposta linfoproliferativa positiva a antígenos de *M. Leprae*, levando ao aumento da expressão de moléculas inibitórias/regulatórias (CTLA4 e PD1), sem causar inflamação exacerbada.

Por fim, observamos também que no grupo de indivíduos sadios, expostos ao *M. leprae* a apresentação celular foi adequada (↑ da expressão CD86 e CD28) e a resposta imune “balanceada”, não havendo aumento da expressão de moléculas inibitórias (CTLA4, PD1).

Anexo A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

- 1. NOME:**
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: **SEXO:** M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO **Nº** **APTO:**
BAIRRO: **CIDADE**
CEP: **TELEFONE:** DDD (.....)
- 2. RESPONSÁVEL LEGAL**
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE: **SEXO:** M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: **Nº** **APTO:**
BAIRRO: **CIDADE:**
CEP: **TELEFONE:** DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA Imunorregulação na Hanseníase: avaliação da ativação celular de pacientes através da análise de moléculas coestimulatórias e expressão de STATS e correlação com a produção de citocinas na resposta imune ao *Mycobacterium leprae*

PESQUISADOR: Gil Benard

CARGO/FUNÇÃO: Docente –MS3 INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 48049

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de dermatologia – LIM 56

AValiação DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO x RISCO MÉDIO ☐
 RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

DURAÇÃO DA PESQUISA: 2 ANOS.

- 1 - **Desenho do estudo e objetivo(s):** O Laboratório de Investigação Médica nº56, da Faculdade de Medicina da USP, está desenvolvendo uma pesquisa para melhor compreender porque o sistema imunológico da maioria dos doentes com hanseníase não conseguem controlar a infecção e evitar o aparecimento dos sintomas. Dessa forma será estudado por meio da participação voluntária dos doentes, como o sistema imunológico dos doentes com hanseníase responde a infecção pela micobactéria (micróbio) que causa a hanseníase.

- 2 - Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros: Se concordar em participar desta pesquisa será coletado 40 mL de sangue do antebraço em 3 momentos diferentes, para realização de exame de laboratório onde será realizado ensaio imunológico, que é exame onde há análise da resposta imunológica.
- 3 - Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados : Serão coletadas amostras de sangue por punção periférica da veia do antebraço.
- 4 - Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3: Como em qualquer coleta de sangue pode haver desconforto local. As medidas habituais para com a coleta de sangue serão tomadas para que isto não aconteça. Sempre que possível esta coleta será junto com os exames de rotina evitando assim uma coleta extra.
- 5 - Benefícios para o participante: Este estudo não prevê benefícios ou diretos para participantes, mas poderá ajudar no desenvolvimento de métodos para melhorar o controle do tratamento.
- 6 - Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: Não se aplicam.
- 7 - Garantia de acesso: Os participantes terão acesso ao Dr. Gil Benard para esclarecimento de eventuais dúvidas. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 3069-6442 ou ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappelq@hcnnet.usp.br. O principal investigador é o Dr Gil Benard que pode ser encontrado no endereço: R. Dr Enéas de Carvalho Aguiar, 470, 3º andar Telefone(s) 11 – 3061-7499.
- 8 - É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição: Estou ciente de que posso suspender o tratamento ou as coletas de sangue a qualquer momento, sem que este fato implique qualquer forma de constrangimento entre mim e meu medico, que se dispõe a continuar me tratando em quaisquer circunstâncias.
- 09 - Direito de confidencialidade: As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;
- 10 - Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores: Caso alguma informação obtida a partir dessa pesquisa possa ser útil a mim, a equipe fará todo o possível para repassá-la o mais rápido possível.
- 11 - Despesas e compensações: Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
- 12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa: O pesquisador utilizará os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Imunorregulação na Hanseníase: avaliação da ativação celular de pacientes através da análise de moléculas coestimulatórias e expressão de STATS e correlação com a produção de citocinas na resposta imune ao *Mycobacterium leprae*.” Eu discuti com o Dr. Gil Benard sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____/____/____

Assinatura da testemunha

Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____

Anexo B - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa **APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 19/11/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0955/08**, intitulado: **"IMUNORREGULAÇÃO NA HANSENÍASE: AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO CELULAR DE PACIENTES ATRAVÉS DA ANÁLISE DE MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS E EXPRESSÃO DE STATS E CORRELAÇÃO COM A PRODUÇÃO DE CITOCINAS NA RESPOSTA IMUNE AO MYCOBACTERIUM LEPRAE"** apresentado pelo Departamento de **DERMATOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Gil Benard**

Pesquisadores Executantes: **Camila Rodrigues Cacere, Maria de Lurdes Palermo Neves, Maria Ângela Bianconcini Trindade, Carla Pagliari.**

CAPPesq, 24 de Novembro de 2008

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de

Anexo C - Ficha de Cadastro**HANSENÍASE – PRIMEIRO ATENDIMENTO****1. IDENTIFICAÇÃO**

Identidade _____ CPF: _____ Registro: _____

DN: ____/____/____ Telefones: _____

1.1 Sexo 1.1.1 () Fem. 1.1.2 () Masc

1.2 Cor: 1.2.1 () BR 1.2.2 () PD 1.2.3 () PT 1.2.4 () AM 1.2.5 () IN

1.3 Estado Civil: 1.3.1 () solteiro 1.3.2 () casado 1.3.3 () viúvo 1.3.4 () outro

Nacionalidade : _____ Naturalidade _____

1.1 Data: _____

Nome: _____

Filiação: Mãe: _____ Pai _____

Endereço: _____

Tempo na residência atual () anos () meses

Tempo na residência anterior () anos () meses

Endereço anterior _____

Profissão: _____ Tel do emprego: _____

Endereço do Emprego: _____

2. HISTÓRIA SOCIAL

2.1 Tipo de Habitação:

2.1.1 () Própria 2.1.2 () Alugada 2.1.3 () Cedida 2.1.4 () Posse 2.1.5 () outros

2.2 N° de cômodos:

2.2.1 () ≤ 5 2.2.2 () > 5

2.3 N° pessoas que a habitam:

2.3.1 () até 3 2.3.2 () entre 3 e 6 () acima 6

2.4 Alvenaria:

2.4.1 () Sim 2.4.2 () Não 2.5 Saneamento básico: 2.5.1 () Sim 2.5.2 () Não

2.6 Escolaridade:

2.6.1 () Analfabeto 2.6.2 () Alfabetizado 2.6.3 () 1º Grau 2.6.4 () 2º Grau () 2.6.5 () 3º Grau

3. HISTÓRIA EPIDEMIOLÓGICA

3.1 Perfil:

3.1.1 () Caso novo 3.1.2. () Recidiva 3.1.3 () Re-tratamento

Data do início do tratamento: ____/____/____ Data do término do tratamento: ____/____/____

3.2. Alta:

3.2.1. () Término tratamento 3.2.2 () Transferência 3.2.3 () Abandono 3.2.4 () Outros: _____

3.3 BCG:

3.3.1 () Cicatriz 3.3.2 () Contato com BK

3.4 Detecção:

3.4.1 () Espontânea 3.4.2 () Contato 3.4.3 () Exame médico 3.4.4 () investigação epidemiológica

4. DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

4.1 Diagnóstico Clínico:

4.1.1 () Neural 4.1.2 () Indeterminada 4.1.2 () Tuberculoide

4.1.3 () Dimorfa 4.1.4 () Virchowiana 4.1.5 () Reação tipo 1

4.1.6 () Reação tipo 2

4.2 Diagnóstico Histopatológico:

4.2.1 () NP 4.2.2 () I 4.2.3 () TT 4.2.4 () BT 4.2.5 () BB 4.2.6 () BL 4.2.7 () LL

4.2.8 () ENL 4.2.9 () EM 4.2.10 () RR 4.2.11 () DESCRITIVO

4.3 Índice bacilosκόpio:

Inicial _____ Final _____

4.4 Grau de incapacidade Inicial:

4.4.1 () 0 4.4.2 () 1 4.4.3 () 2

4.5 Grau de incapacidade Final:

4.5.1 () 0 4.5.2 () 1 4.5.3 () 2

4.6 Tratamento:

4.6.1 () PB 4.6.2 () MB 4.6.3 () adaptado sem dapsona

4.6.4 () adaptado sem rifampicina 4.6.5 () adaptado sem clofazimina

4.6.6 () Descritivo _____

5. FONTE DE INFECÇÃO

5.1 () Conhecida

5.2 () Não conhecida

5.3 Nome da fonte de infecção _____ REG. _____

5.3.1 Tipo de parentesco _____

5.4 Forma clínica

5.4.1 () Neural 5.4.2 () BB 5.4.3 () BL 5.4.4 () LL 5.4.5 () Ignorado

5.5 Convivência

5.5.1 () Leito 5.5.2 () Quarto 5.5.3 () Casa 5.5.4 () Terreno 5.5.5 () outro domicílio

5.6 Tempo de convivência _____(anos) _____(meses)

5.7 Número de contactos intradomiciliares

5.8 Número de contatos examinados

[illegible]

8 REFERÊNCIAS

Barral A, Barral-Netto M, Yong EC, Brownell CE, Twardzik DR, Reed SG. Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90:3442-6.

Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*. 2002; 420:502-7.

Belkaid Y. The role of CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ regulatory T cells in *Leishmania* infection. *Expert Opin Biol Ther*. 2003; 3:875-85.

Beswick EJ, Pinchuk IV, Das S, Powell DW, Reyes VE. Expression of the programmed death ligand 1, B7-H1, on gastric epithelial cells after *Helicobacter pylori* exposure promotes development of CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells. *Infect Immun*. 2007; 75(9):4334-41.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica: situação epidemiológica da hanseníase no Brasil. 2012. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/arquivos/pdf/boletim_novembro.pdf>. Acesso em 24 de abr 2012.

Brennan PJ. The carbohydrate-containing antigens of *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev*. 1986; 57(Suppl 2):39-51.

Britton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. *Lancet*. 2004; 363:1209-19.

Britton WJ, The management of leprosy reversal reactions. *Lepra Rev*. 1998; 69:225-3.

Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paeper B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*. 2001; 27(1):68-73.

Bryceson A, Pfaltzgraff RE. *Leprosy*. 3^a ed. New York: Churchill Livingstone; 1990.

Cacere CR, Mendes-Giannini MJ, Fontes CJ, Kono A, Duarte AJ, Benard G. Altered expression of the costimulatory molecules CD80, CD86, CD152, PD-1 and ICOS on T-cells from paracoccidioidomycosis patients: lack of correlation with T-cell hyporesponsiveness. *Clin Immunol*. 2008;1 29(2):341-9.

Campanelli AP, Roselino AM, Cavassani KA, Pereira MS, Mortara RA, Brodskyn CI, Goncalves HS, Belkaid Y, Barral-Netto M, Barral A, Silva JS. CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *J Infect Dis*. 2006; 193(9):1313-22.

Carter L, Fouser LA, Jussif J, Fitz L, Deng B, Wood CR, Collins M, Honjo T, Freeman GJ, Carreno BM. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol*. 2002; 32(3):634-43.

Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4(5):336-47.

Chen X, Zhou B, Li M, Deng Q, Wu X, Le X, Wu C, Larmonier N, Zhang W, Zhang H, Wang H, Katsanis E. CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells suppress Mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease. *Clin Immunol.* 2007; 123:50-9.

Cho SN, Cellona RV, Villahermosa LG, Fajardo TT JR, Balagon MV, Abalos RM, Tan EV, Walsh GP, Kim JD, Brennan PJ. Detection of phenolic glycolipid I of Mycobacterium leprae in sera from leprosy patients before and after start of multidrug therapy. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001; 8:138-42.

Colston MJ. The molecular biology of Mycobacterium leprae. *Lepr Rev.* 1993; 64(4):289-94.

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; 15(159):786-93.

Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjyoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med.* 2007; 204:1257-65.

Dong C, Juedes AE, Temann UA, Shresta S, Allison JP, Ruddle NH, Flavell RA. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature.* 2001; 409(6816):97-101.

Dubey C, Croft M, Swain SL. Costimulatory requirements of naive CD4⁺ T cells. ICAM-1 or B7-1 can costimulate naive CD4 T cell activation but both are required for optimum response. *J Immunol.* 1995; 155(1):45-57.

Elloso MM, Scott P. Differential requirement of CD28 for IL-12 receptor expression and function in CD4(+) and CD8(+) T cells. *Eur J Immunol.* 2001; 31(2):384-95.

Foss NT, de Oliveira EB, Silva CL. Correlation between TNF production, increase of plasma C-reactive protein level and suppression of T lymphocyte response to concanavalin A during erythema nodosum leprosum. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1993; 61: 218-26.

Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T. Engagement of the pd-1 immunoinhibitoryreceptor by a novel b7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med.* 2000; 192(7):1027-34.

Freeman GJ, Sharpe AH. The B-7 - CD28 superfamily. *Nat Rev.* 2002; 2:116-26.

Fujita S, Sato Y, Sato K, et al. Regulatory dendritic cells protect against cutaneous chronic graft-versus-host disease mediated through CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T Cells. *Blood.* 2007; 110:3793-803.

Gavin MA; Clarke SR, Negrou EG, Rudensky A. Homeostasis and anergy of CD4⁺CD25⁺ suppressor t cells in vivo. *Nat Immunol.* 2002; 3:33-41.

Gazzinelli RT, Oswald IP, James SL, Sher A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *J Immunol.* 1992; 148(6):1792-6.

Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol.* 2005; 23:515-48.

Greenwald RJ, McAdam AJ, van der Woude D, Satoskar AR, Sharpe AH. Cutting edge: inducible costimulator protein regulates both Th1 and Th2 responses to cutaneous leishmaniasis. *J Immunol.* 2002; 168(3):991-5.

Haynes L, Linton PJ, Eaton SM, Tonkonogy SL, Swain SL. Interleukin 2, but not other common gamma chain-binding cytokines, can reverse the defect in generation of CD4 effector T cells from naive T cells of aged mice. *J Exp Med.* 1999; 190(7):1013-24.

Iwai H, Abe M, Hirose S, Tsushima F, Tezuka K, Akiba H, Yagita H, Okumura K, Kohsaka H, Miyasaka N, Azuma M. Involvement of inducible costimulator-B7 homologous protein costimulatory pathway in murine lupus nephritis. *J Immunol.* 2003; 171(6):2848-54.

Kahawita IP, Lockwood DNJ. Towards understanding the pathology of erythema nodosum leprosum. *Trans Roy Soc Trop Med And Hyg.* 2008; 102:329-37.

Khanolkar-Young S, Rayment N, Brickell PM, Katz DR, Vinayakumar S, Colston MJ, Lockwood DN. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) synthesis is associated with the skin and peripheral nerve pathology of leprosy reversal reactions. *Clin Exp Immunol.* 1995; 99:196-202.

Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Boussiotis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N, Nishimura H, Okazaki T, Honjo T, Sharpe AH, Freeman GJ. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol.* 2001; 2(3):261-8.

Launois P, Niang MN, Sarthou JL, Rivier F, Drowart A, Van Vooren JP, Millan J, Huygen K. T-cell stimulation with purified mycobacterial antigens in patients and healthy subjects infected with *Mycobacterium leprae*: secreted antigen 85 is another immunodominant antigen. *Scand J Immunol.* 1993 Aug;38(2):167-76.

Lechner O, Lauber J, Franzke A, Sarukhan A, von Boehmer H, Buer J. Fingerprints of anergic T cells. *Curr Biol.* 2001; 11(8):587-95.

Li L, Lao SH, Wu CY. Increased frequency of CD4(+)CD25(high) Treg cells inhibit BCG-specific induction of IFN-gamma by CD4(+) T cells from TB patients. *Tuberculosis (Edinb).* 2007; 87:526-34.

Liang S, Alard P, Zhao Y, Parnell S, Clark SI, Kosiewicz MM. Conversion of CD4+ CD25- cells into CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo requires B7 costimulation, but not the thymus. *J Exp Med.* 2005; 201:127-37.

Little D, Khanolkar-Young S, Coulthart A, Suneetha S, Lockwood DN. Immunohistochemical analysis of cellular infiltrate and gamma interferon, interleukin-12, and inducible nitric oxide synthase expression in leprosy type 1 (reversal) reactions before and during prednisolone treatment. *Infect Immun.* 2001; 69(5):3413-7.

Lockwood DNJ, Vinayakumar S, Stanley JN, McAdam KP, Colston MJ.. Clinical features and outcome of reversal (type 1) reactions in Hyderabad, Índia. *Int. J. Lepr Micobact Dis.* 1993; 61(1):8-15.

Lockwood DNJ. Leprosy. In: Burns DA, Breathnach SM, Cox NH, Griffiths CEM, editors. *Rook's textbook of dermatology*. Vol. 2. 7^a ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2004. p. 29.1 - 29.21.

Matsumoto K, Fukuyama S, Eguchi-Tsuda M, Nakano T, Matsumoto T, Matsumura M, Moriwaki A, Kan-o K, Wada Y, Yagita H, Shin T, Pardoll DM, Patcharee R, Azuma M, Nakanishi Y, Inoue H. B7-DC induced by IL-13 works as a feedback regulator in the effector phase of allergic asthma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 365(1):170-5.

McHugh RS, Shevach EM. The role of suppressor T cells in regulation of immune responses. *J Allergy Clin Immunol.* 2002; 110(5):693-702.

Misra N, Murtaza A, Walker B, Narayan NP, Misra RS, Ramesh V, Singh S, Colston MJ, Nath I. Cytokine profile of circulating T cells of leprosy patients reflects both indiscriminate and polarized T-helper subsets: T-helper phenotype is stable and uninfluenced by related antigens of Mycobacterium leprae. *Immunology.* 1995; 86(1):97-103.

Mittrücker HW, Kursar M, Köhler A, Yanagihara D, Yoshinaga SK, Kaufmann SH. Inducible costimulator protein controls the protective T cell response against Listeria monocytogenes. *J Immunol.* 2002; 169(10):5813-7.

Mutis T, Cornelisse YE, Datema G, van den Elsen PJ, Ottenhoff TH, de Vries RR. Definition of a human suppressor T-cell epitope. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91(20):9456-60.

O'Garra A, Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med*. 2004; 10:801-5.

Okamoto T, Saito S, Yamanaka H, Tomatsu T, Kamatani N, Ogiuchi H, Uchiyama T, Yagi J. Expression and function of the co-stimulator H4/ICOS on activated T cells of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2003; 30(6):1157-63.

Opromolla DVA. *Noções de hansenologia*. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato,. 2000. 126p.

Piccirillo CA, Thornton AM. Cornerstone of peripheral tolerance: naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *Trends Immunol*. 2004; 25:374-80.

Rambukkana A, Yamada H, Zanazzi G, Mathus T, Salzer JL, Yurchenco PD, Campbell KP, Fischetti BA. Role of alpha-dystroglican as a Schwann cell receptor for Mycobacterium leprae. *Science*. 1998; 282(5396):2076-9.

Ribeiro-Rodrigues R, Resende Co T, Rojas R, Toossi Z, Dietze R, Boom WH, Maciel E, Hirsch CS. A role for CD4+CD25+ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. *Clin Exp Immunol*. 2006; 144:25-34.

Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity: a five group system. *Int J Lepr*. 1966; 34:255-73.

Ring S, Oliver SJ, Cronstein BN, Enk AH, Mahnke K. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions through a CD39, adenosine dependent mechanism. *J Allergy Clin Immunol*. 2009; 123(6):1287-96.

Roche PW, Britton WJ, Neupane KD, Failbus SS, Cho SN, Theuvenet WJ. The response to chemotherapy of serum *Mycobacterium leprae*-specific antigen in multibacillary leprosy patients. *Am J Trop Med Hyg*. 1991; 44(6):702-8.

Sachdeva G, Kaur G, Bhutani LK, Bamezai RN. Lymphoproliferative responses of leprosy patients and healthy controls to nitrocellulose-bound *M. Leprae* antigens. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1999; 67:133-42.

Salama AD, Chitnis T, Imitola J, Ansari MJ, Akiba H, Tushima F, Azuma M, Yagita H, Sayegh MH, Khoury SJ. Critical role of the programmed death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 2003; 198(1):71-8.

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; 32:75-80.

Santos DO, Santos SL, Esquenazi D, Nery JA, Defruyt M, Lorré K, Van Heuverswyn H.. Evaluation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) costimulatory molecules and dendritic cells on the immune response in leprosy. *Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi*. 2001; 70(1):15-24.

- Sarno EN, Grau GE, Vieira LM, Nery JA. Serum levels of tumour necrosis factor- α and interleukin-1 β during leprosy reactional states. *Clin Exp Immunol*. 1991; 84(1):103-8.
- Schlienger K; Uyemura K; Jullien D; Sieling PA, Rea TH, Linsley PS, Modlin RL. B7-1, but not CD28, is crucial for the maintenance of the cd4+ t cell responses in human leprosy. *J Immunol*. 1998; 161:2407-13.
- Shevach EM. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2:389-400.
- Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity*. 2006; 25:195-201.
- Solomon GJ, Magro CM. Foxp3 expression in cutaneous T-cell lymphocytic infiltrates. *J Cutan Pathol*. 2008; 35:1032-9.
- Spierings E, de Boer T, Wieles B, Adams LB, Marani E, Ottenhoff TH. Mycobacterium leprae-specific, HLA class II-restricted killing of human Schwann cells by CD4+ Th1 cells: a novel immunopathogenic mechanism of nerve damage in leprosy. *J Immunol*. 2001; 15;166(10):5883-8.
- Sridevi K, Neena K, Chitralkkha KT, Arif AK, Tomar D, Rao DN. Expression of costimulatory molecules (CD80, CD86, CD28, CD152), accessory molecules (TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$) and T cell lineage molecules (CD4+, CD8+) in PBMC of leprosy patients using Mycobacterium leprae antigen (MLCWA) with murabutide and T cell peptide of tat protein. *Int immunopharmacol*. 2004; 4(1):1-14.

- Sun ZW, Qiu YH, Shi YJ, Tao R, Chen J, Ge Y, Hu YM, Ma HB, Shi Q, Zhang XG. Time courses of B7 family molecules expressed on activated T-cells and their biological significance. *Cell Immun.* 2005; 236(1-2):146-53.
- Taams LS, van Amelsfort JM, Tiemessen MM, Jacobs KM, de Jong EC, Akbar AN, Bijlsma JW, Lafeber FP. Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Hum Immunol.* 2005; 66:222-30.
- Tiemessen MM, Jagger AL, Evans HG, van Herwijnen MJ, John S, Taams LS. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104:19446-51.
- Triccas JA, Roche PW, Winter N, Feng CG, Butlin CR, Britton WJ. A 35-kilodalton protein is a major target of the human immune response to *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun.* 1996; 64(12):5171-7.
- Verhagen J, Akdis M, Traidl-Hoffmann C, Schmid-Grendelmeier P, Hijnen D, Knol EF, Behrendt H, Blaser K, Akdis CA. Absence of T-regulatory cell expression and function in atopic dermatitis skin. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 117:176-83.
- Vieth M, Will A, Schröppel K, Röllinghoff M, Gessner A. Interleukin-10 inhibits antimicrobial activity against *Leishmania major* in murine macrophages. *Scand J Immunol.* 1994; 40(4):403-9.
- Von Boehmer H. Shaping the T cell repertoire. *J immunol.* 2005; 175:7067-8.
- Walker SL, Lockwood DN. Leprosy. *Clin Dermatol.* 2007; 25(2):165-72.

Wang L, Pino-Lagos K, de Vries VC, Guleria I, Sayegh MH, Noelle RJ. Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3+CD4+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105:9331-6.

Wassink L, Vieira PL, Smits HH, Kingsbury GA, Coyle AJ, Kapsenberg ML, Wierenga EA. ICOS expression by activated human Th cells is enhanced by IL-12 and IL-23: increased ICOS expression enhances the effector function of both Th-1 and Th-2 cells. *J Immunol*. 2004; 173(3):1779-86.

WHO - World Health Organization. *Leprosy Elimination Project, Status Report 2003, Draft*. WHO: Genebra, 2004.

WHO - World Health Organization. *Leprosy elimination*. Disponível em: <www.who.int/lep>. Acesso em 25 mai 2012.

Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, Levy-Lahad E, Mazzella M, Goulet O, Perroni L, Bricarelli FD, Byrne G, McEuen M, Proll S, Appleby M, Brunkow ME. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet*. 2001; 27(1):18-20.

Yamamura M, Wang XH, Ohmen JD, Uyemura K, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. *J Immunol*. 1992; 149(4):1470-5.

Zheng SG, Wang JH, Stohl W, Kim KS, Gray JD, Horwitz DA. TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+ regulatory cells. *J Immunol*. 2006; 176:3321-9.

APÊNDICE

Apêndice A

© 2010 John Wiley & Sons A/S

Transplant Infectious Disease . ISSN 1398-2273

Case report

Leprosy in transplant recipients: report of a case after liver transplantation and review of the literature

M.A.B. Trindade, M.L. Palermo, C. Pagliari, N. Valente, B. Naafs, P.C.B. Massarollo, L.A.C. D'Albuquerque, G. Benard. Leprosy in transplant recipients: report of a case after liver transplantation and review of the literature.

Transpl Infect Dis 2011; 13: 63–69. All rights reserved

Abstract: Leprosy still is an important public health problem in several parts of the world including Brazil. Unlike the diseases caused by other mycobacteria, the incidence and clinical presentation of leprosy seems little affected in immunosuppressed patients. We report the first case, to our knowledge, of a liver transplant patient who developed multi-bacillary leprosy. The patient presented with papules and infiltrated plaques with loss of sensation suggestive of leprosy 3.5 years after living-related liver transplantation for autoimmune hepatitis. A skin biopsy showing non-caseating macrophagic granulomas, neuritis, and intact acid-fast bacilli on Fite-Faraco stain, confirmed the diagnosis of borderline lepromatous leprosy. The donor of the liver did not show any evidence of leprosy. During follow-up, the patient presented 2 episodes of upgrading leprosy type I reactions, 1 mild before leprosy treatment, and 1 moderate 3 months after receiving standard multi-drug treatment (rifampicin, clofazimine, and dapsone). These reactions were accompanied by increase in liver function tests, especially of canalicular enzymes. This reaction occurred despite the patient's triple immunosuppression regimen. The moderate reaction was successfully treated with further immunosuppression (prednisone, 0.5 mg/kg). Currently, the patient is asymptomatic, off leprosy medication, with routine liver transplant follow-up. The dilemmas in diagnosis and management of such a case are discussed and the literature on leprosy in transplant recipients is reviewed.

M.A.B. Trindade^{1,2}, M.L. Palermo³, C. Pagliari⁴, N. Valente¹, B. Naafs⁵, P.C.B. Massarollo⁶, L.A.C. D'Albuquerque⁷, G. Benard^{3,8}

¹Division of Clinical Dermatology, Clinics Hospital, Medical School of the University of São Paulo, São Paulo, Brazil,

²Health Institute, São Paulo State Health Department, São Paulo, Brazil, ³Laboratory of Medical Investigation Unit 56,

Department of Dermatology, ⁴Department of Pathology, Medical School of the University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ⁵Leiden University Medical Center, Leiden, The

Netherlands, ⁶Liver Transplantation Service, 'Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo', São Paulo, Brazil,

⁷Specialized Therapeutic Center of the Liver, 'Hospital Beneficência Portuguesa de São Paulo', São Paulo, Brazil,

⁸Laboratory of Medical Investigation Unit 53, Tropical Medicine Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Key words: liver transplant; leprosy; immunosuppression; *Mycobacterium leprae*

Correspondence to:

Gil Benard, LIM-56, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470 São Paulo, Brazil

Tel: + 55 11 30617499

Fax: + 55 11 30817190

E-mail: mahong@usp.br

Received 18 December 2009, revised 8 April 2010, accepted for publication 20 April 2010

DOI: 10.1111/j.1399-3062.2010.00549.x

Transpl Infect Dis 2011; 13: 63–69

Leprosy, also known as Hansen's disease, is still an important public health problem in several parts of the world. More than 200,000 cases were registered worldwide by the World Health Organization (WHO) in 2009, with about 40,000 of them in Brazil (1).

Mycobacterium leprae is an obligatory intracellular bacillus, which has a very low replication rate inside macrophages (~ 13 days) as compared with other pathogenic mycobacteria such as *Mycobacterium tuberculosis* (~ 22 h) (2). Therefore, its incubation period is long, estimated to be around 5 years, but may reach 20 years or more. Leprosy mainly affects skin and nerves, and sensory damage may progressively lead to permanent disabilities (3).

Owing to variations of the host's cellular immune response, the disease has multiple forms, ranging from the tuberculoid to the lepromatous form, with the borderline forms in between. The disease runs a chronic course, with about 50% of the borderline patients developing acute reactions, often during treatment (3, 4). The disease in patients with a borderline classification is unstable. Patients may either show slow changes toward the lepromatous pole or experience a sudden type I leprosy reaction (reversal reaction) or a type II leprosy reaction (erythema nodosum leprosum). The reversal reaction presents as exacerbation of the skin lesions and/or new erythematous–edematous lesions, and/or neuritis, and may also affect other organs,

Trindade et al: Leprosy in a liver transplant patient

such as the liver (4, 5). Erythema nodosum leprosum presents with painful erythematous nodules and plaques and may involve other organs as well.

The frequency and characteristics of most mycobacterial infections in the immunosuppressed patient markedly differ from those in immunocompetent hosts. In contrast, leprosy outcomes in people living with human immunodeficiency virus (HIV) infection or other immunosuppressive conditions, such as transplant recipients, were not much different from those in non-immunosuppressed populations (6, 7). There was neither a higher incidence of lepromatous disease nor an impaired response to multi-drug therapy (MDT) (7). The effect of solid organ transplantation (SOT) and subsequent immunosuppression on the acquisition and presentation of leprosy remains to be studied (8–16). Here, we report a case of multi-bacillary leprosy in a patient who had received a liver transplant for autoimmune hepatitis. This patient presented episodes of reversal reaction accompanied by altered liver function tests (LFTs). The difficulties in the diagnosis and management of a patient afflicted with these conditions are discussed.

Case report

A 61-year-old male with autoimmune hepatitis underwent living-related liver transplantation in São Paulo, Brazil, in June 2002. The patient's recovery during the first 42 post-operative months was uneventful, except for a persistent mild to moderate increase in the LFTs, especially of the canalicular enzymes, alkaline phosphatase and gamma

Fig. 1. Course of the liver function tests. Arrows indicate the type I reaction episodes. Normal values range: aspartate amino transferase (AST): <37 U/L, alanine aminotransferase (ALT): <41 U/L, alkaline phosphatase (AP): 40–129 U/L, gamma glutamyl transferase (GGT): 8–61 U/L. The asterisk indicates the time of diagnosis of leprosy.

glutamyl transferase (2.5- and 4.0-fold, respectively), which was attributed to his autoimmunity (Fig. 1). He was kept under triple immunosuppressive therapy with low-dose prednisone (10 mg/day), tacrolimus (6 mg/day; blood level: 10.9 ng/mL), and mycophenolate mofetil (MMF) (2 g/day).

In March 2006, he developed multiple erythematous-infiltrated papules and plaques over his penis, knees, and upper and lower limbs (Fig. 2), in association with erythema, and ulcerations on the right foot. The main diagnostic hypothesis was an opportunistic cutaneous mycobacteriosis. The patient was then referred to the dermatology service. Further physical examination showed additional bilateral ulnar nerve enlargement without tenderness or

Fig. 2. Leprosy skin lesions. Multiple erythematous-infiltrated papules and plaques over the lower limbs, right knee, and right forearm.

Fig. 3. Skin lesion biopsy. (A) Hematoxylin and eosin staining showing nodular and diffuse infiltrate consisting of vacuolated histiocytes, few of them multi-nucleated, few lymphocytes (original magnification [OM] $\times$ 400). Inset shows a neuritis (OM $\times$ 1000). (B) Fite-Faraco stain disclosing numerous intact acid-fast bacilli with globi formation (OM $\times$ 400).

sensory and motor loss; however, the skin lesions were hypoesthetic. A biopsy from a lesion was compatible with multi-bacillary borderline lepromatous leprosy and characterized by a nodular and diffuse infiltrate of vacuolated histiocytes, few of them being multi-nucleated, the presence of scarce lymphocytes, and nerve involvement (Fig 3). The Fite-Faraco stain disclosed numerous intact acid-fast bacilli (AFB) (5+/6+), with globi formation (Fig. 3). Attempts to isolate other *Mycobacterium* species from cultures of the skin biopsy were negative, as were the Mitsuda and tuberculin skin tests.

The patient has been living for the last 4 decades in São Paulo city, which is an area with only a moderate endemicity for leprosy, but he frequently visited Goiás, his native state, which is a highly endemic area. Biopsies of the liver graft and of the removed liver were reviewed. They were negative by Fite-Faraco stain and showed no histopathology suggestive of leprosy. Physical examination of the living liver donor did not show any signs or symptoms of leprosy, and a serological test for anti-PGL1 antibodies was negative.

A few weeks later, before starting leprosy treatment, the patient presented a new, painful, erythematous, and infiltrated plaque on the left foot. The aspect was suggestive of a leprosy reaction. A biopsy of the lesion confirmed the diagnosis of mild leprosy type 1 reaction by showing a dermal infiltrate of vacuolated histiocytes and a moderate number of lymphocytes, with areas of focal necrosis. Fite-Faraco stain showed intact but also granular AFB. This coincided with a discrete increase in the canalicular enzymes (Fig. 1). The patient was prescribed MDT, consisting of monthly doses of rifampicin 600mg and clofazimine 300mg, plus daily doses of dapsone 100mg and clofazimine 50mg, and a non-steroidal anti-inflammatory to alleviate symptoms of the left foot lesion; the immunosuppressive drug regimen was not modified.

After 1 month of treatment, the patient already presented partial regression of the skin lesions and a marked reduc-

tion (to only 1.5-fold normal values) of the canalicular enzymes, as well as a slight decrease in the other liver enzymes (Fig. 1). However, after 3 months of MDT, when the skin lesions had significantly improved, new and more painful infiltrated and erythematous skin lesions appeared, while the levels of hepatic and canalicular enzymes increased to more than twice the reference values (Fig. 1). Biopsy of a newly inflamed skin lesion was taken which showed a granulomatous response with central fibrinoid necrosis, surrounded by epithelioid and multi-nucleated and vacuolated histiocytes. No AFB were identified on Fite-Faraco stain. These findings led again to the diagnosis of a type 1 leprosy reaction in a borderline leprosy patient; there were no signs of a type II reaction.

In the face of the diagnostic dilemma of whether the deterioration of the LFTs was due to either the reversal reaction, exacerbation of the autoimmune hepatitis triggered by the *M. leprae* infection, or hypersensitivity or toxicity caused by some of the components of the MDT, it was decided to treat the reaction by increasing the dose of prednisone (0.5 mg/kg/day) and to remove rifampicin from the MDT. Symptoms and liver enzymes promptly subsided. However, the patient developed hemolytic anemia, which was attributed to dapsone. This drug was also removed from the MDT, even though he had normal levels of glucose-6-phosphate dehydrogenase: deficiency of this enzyme predisposes to dapsone-induced hemolytic anemia in patients under MDT.

After 2 months with anti-leprosy monotherapy with clofazimine and prednisone, in addition to the routine transplantation immunosuppressive therapy, the canalicular enzymes were normal for the first time since transplantation, the hemoglobin levels returned to normal, and there was healing of all the skin lesions. With that, rifampicin and dapsone were re-introduced while prednisone was returned to the previous low dosage (10 mg/day). However, 15 days later he again presented with hemolytic anemia, which was then controlled by a definitive

Trindade et al: Leprosy in a liver transplant patient

Case reports of leprosy after solid organ transplantation

Reference	Sex and age at diagnosis	Type of transplant	Time to onset of disease	Type of leprosy	Diagnostic test	Immunosuppression protocol	Therapy	Duration of therapy	Outcome
(8)	37/male	Renal	22 months	Histioid leprosy	Skin biopsy	P, A	MDT	NA	Improved over 10 months
(8)	45/male	Renal	6 years	LL	Skin biopsy	P, A	MDT	NA	NA
(8)	55/male	Renal	7 years	BL	Skin biopsy	P, A	MDT	NA	Improved over 7 months LFU
(8)	32/female	Renal	6 years	BL	Skin biopsy	P, A	DDS, CFZ	4 years	Improve over 4 year
(8)	60/male	Renal	12 years	LL	Skin biopsy	P, A, C	MDT	30 months	Improved at 30 months
(9)	37/male	Renal	5 months	LL	Positive slit-skin test	P, A	MDT	31 months	Died of unknown cause
(9)	55/male	Renal	5 years	BB	Skin biopsy, positive slit-skin test	P, A	DDS	7 1/2 years	Recovered
(10)	68/male	Renal	3 years	BL	Skin biopsy	P, M, T	MDT	5 months	Died
(11)	25/male	Renal	10 years	LL	Skin biopsy	P, A	MDT	7 years	Recovered
(12)	48/male	Renal	8 years	LL	Skin biopsy	P, C	MDT	18 months	Recovered
(13)	63/male	Renal	11 years	BL + ENL	Skin biopsy, positive slit-skin test	P, A, C	MDT, TLD, P	2 years	Recovered
(14)	65/male	Heart	5 years	BL	Skin biopsy	P, C, M	DDS, MNC, ETN, MFX	25 months	Recovered
(15)	72/male	Heart	4 years	LL	Skin biopsy, slit-skin test and PCR	P, A, C	DDS, MNC, ETN	18 months	Recovered
(16)	66/male	Heart	3 years	BL	Skin biopsy	P, A, C	DDS, MNC, ETN	NA	NA
Present case	64/male	Liver	3.5 years	BL	Skin biopsy	P, T, M	MDT	20 months	Recovered

P, prednisolone; A, azathioprine; C, cyclosporin A; M, mycophenolate mofetil; T, tacrolimus; MDT, multi-drug therapy; NA, not available; DDS, dapsone; CFZ, clofazimine; MNC, minocycline; TLD, thalidomide; ETN, etanercept; MFX, moxifloxacin; LFU, lost to follow-up; BL, borderline-lepromatous leprosy; BB, borderline-borderline leprosy; ENL, erythema nodosum leprosum; LL, lepromatous leprosy; PCR, polymerase chain reaction.

Table 1

Case reports of leprosy after bone marrow transplantation

Reference	Age at diagnosis/ sex	Transplant disease	Time to onset of disease	Type of leprosy	Diagnostic test	Immunosuppression protocol	Therapy	Duration of therapy	Outcome
(18)	23/male	CML-1st CP	7.4 months	LL	Skin biopsy	No	MDT, P, TLD	32 months	Recovered
(18)	25/male	CML-1stCP	5.8 months	BL	Skin biopsy	No	MDT	68 months	Recovered
(18)	40/female	CML 1stCP	44 months	BT	Skin biopsy	No	MDT	NA	NA

CML-1stCP, chronic myeloid leukemia in first chronic phase; LL, lepromatous leprosy; BL, borderline-lepromatous leprosy; BT, borderline tuberculoid; MDT, multi-drug therapy; P, prednisolone; TLD, thalidomide; NA, not available.

Table 2

withdrawal of dapsone from the MDT. The patient continued on rifampicin and clofazimine with no more adverse events. Subsequent biopsies showed a regressive picture, with an infiltrate predominantly of vacuolated histiocytes and no AFB.

Currently the patient is asymptomatic, presenting total resolution of skin lesions and, since the end of 2007, not under any specific leprosy medication.

Discussion

Unlike the diseases caused by other mycobacteria, the incidence, course, and clinical presentation of leprosy are little affected in patients with immunosuppressive conditions. Previous studies indicated that neither a consistent increase in the incidence of leprosy nor development of more severe manifestations occurred in HIV-infected persons (7), although, more recently, leprosy-associated immune reconstitution inflammatory syndrome has been increasingly reported (17).

Among drug-induced immunosuppressed patients, e.g., SOT patients, only 14 patients have been reported to have developed leprosy post transplantation: 11 after kidney transplantation and 3 after heart transplantation. Table 1 (8–16) summarizes the case reports of leprosy in SOT recipients. Recently a report documented 6 cases of leprosy among Brazilian bone marrow transplant recipients, 3 of them having developed leprosy post transplantation; the latter are summarized in Table 2 (18). The reasons for the lack of a clear association between immunosuppression and increased susceptibility to leprosy are still a matter of debate. So far, there are no guidelines for the management of leprosy in such patients.

To our knowledge, this is the first report of multi-bacillary leprosy developing in a liver recipient. The particularities of the present case illustrate the challenges in the management of both conditions, and the importance of an appropriate diagnosis.

The patient presented with skin lesions 3.5 years after transplant with characteristics that were suggestive of leprosy, such as papules and infiltrated plaques with loss of sensation. The main differential diagnosis at that time was a skin infection from other, non-tuberculous mycobacteria. A skin biopsy showing a non-caseating macrophagic inflammation with nerve involvement, together with the presence of numerous intact AFB and globi formation on Fite-Faraco stain, confirmed the diagnosis of borderline lepromatous leprosy. The appearance of a new lesion before the leprosy treatment was instituted, which on histopathological examination showed a mild up-grading type 1 reaction, suggests that *in situ* immune reactivity can bypass systemic immunosuppression. At that time the patient was under a triple immunosuppressive therapy, which is routinely used in recipients with previous autoimmune hepatitis. The patient presented a second, more severe, up-grading reaction 3 months after starting MDT, which was then appropriately controlled by increasing the dose of prednisone. An increase in liver enzyme levels was observed coincidentally with both reaction episodes (Fig. 1). Hepatic reactions in liver transplant recipients may pose a diagnostic dilemma, as type 1 leprosy reactions may cause abnormal LFTs (5). Thus differentiation between rejection, drug toxicity, or worsening of patient's autoimmunity (triggered by the *M. leprae* infectious process itself) is imperative. Remarkably, in this patient, once the reaction subsided, the liver tests improved to near-normal.

Dissociation between the general immunosuppression and the *in situ* immune responses has been previously reported in HIV-infected patients (19), and seems also to occur in transplant-related immunosuppressed patients. Leprosy type 1 reactions are T-helper-1 mediated flare ups of immune reactivity, and consist of increased CD4 T-cell reactivity and *in situ* up-regulation of several pro-inflammatory cytokines, such as gamma-interferon, tumor necrosis factor, and interleukin-12, as well as the appearance of oxygen free radicals (20). In fact, by immunohistochemistry (Fig. 4), we observed that the cellular infiltrate was rich in T-lymphocytes, especially CD4+ cells, suggesting the

Trindade et al: Leprosy in a liver transplant patient

Fig. 4. Immunohistochemical study of an initial lesion (A–C) and of a lesion during the second reaction episode (D–F). Note the decreased staining for *Mycobacterium* antigens in the cytoplasm of macrophages from the initial (A) to the reaction lesion (D). In contrast, there was increase in the infiltration of CD4 + and CD8 + T cells in the reaction lesion vs. the initial lesion (CD4 + : E vs. B; CD8 + : F vs. C, respectively). Streptavidin-biotin technique with diaminobenzidine chromogen (original magnification $\times 400$).

patient's preserved ability to activate and recruit these cells to *M. leprae* infected sites. Moreover, during the second reaction episode, this infiltrate was even richer in CD4 + and CD8 + T cells, while the amount of mycobacterial antigen decreased.

One would expect that tacrolimus and MMF, which the patient was using at optimal doses and were maintained during the leprosy treatment, would have not only predisposed to a more severe disease but also curtailed any up-grading reaction. Tacrolimus blocks T-lymphocyte proliferation by inhibiting the phosphatase activity of the Ca^{2+} -dependent enzyme calcineurin. It also reduces the expression of several cytokine genes that are normally induced during T-lymphocyte activation, including most of the above-mentioned cytokines that mediate leprosy reactions (21). MMF is an inhibitor of inosine monophosphate dehydrogenase, a rate-limiting enzyme in *de novo* synthesis pathway of guanosine nucleotides to which T- and B-lymphocytes are more dependent than other cell types. MMF therefore has a more potent cytostatic effect on lymphocytes than on other cell types. Its immunosuppressive effect can also be mediated by inducing apoptosis of activated T-lymphocytes and suppression of the expression of adhesion molecules and inducible nitric oxide synthase, resulting in the suppression of T-lymphocyte responses (22). However, a few anecdotal reports showed that tacrolimus and MMF failed to control leprosy type 1 reactions (23, 24). Corticosteroids, on the other hand, have a broader immunosuppressive effect, especially with respect to the range of

target cells (25). They regulate the expression of many genes, with a net anti-inflammatory effect. Corticosteroids target the functions of monocytes and macrophages and reduce the number of CD4 + T cells. They reduce the production of inflammatory mediators, including cytokines, prostaglandins, and nitric oxide. They inhibit inflammatory cell migration to sites of inflammation by inhibiting the expression of adhesion molecules and promote death by apoptosis of leukocytes and lymphocytes. However, the precise and different mechanisms by which corticosteroids, but not the other immunosuppressive drugs, curtail leprosy reactions are still not known and need further investigations.

Although it is claimed that immunosuppression does not interfere with the development or manifestations of leprosy, we noted that, as in the present case, all 14 SOT recipients with post-transplantation leprosy reported in the literature presented as multi-bacillary leprosy (8–16), even those who presented with a single lesion, opposed to the disease spectrum that is usually observed in non-immunocompromised populations. For example, in Brazil, only 53.5% of the cases are multi-bacillary, while in some areas in south Asia this can range from 43.8% to 79.6% (1). Interestingly, among the 3 bone marrow transplant recipients with post-transplantation leprosy, the 2 who were diagnosed within the first year post transplant, and thus still immunosuppressed, had a multi-bacillary disease, while the other patient, who was diagnosed at almost 4 years post transplantation when fully immune-reconstituted, had a pauci-bacillary disease.

These data suggest that, contrary to the current notion, transplant-induced immunosuppression may weaken, by an as-yet-unknown mechanism, the *M. leprae* bactericidal capacity of the host's immune response and modify the disease spectrum.

The treatment of leprosy in SOT recipients reported in the literature was variable, both in terms of the drugs employed and the duration of treatment. While most prescribed MDT, as recommended by WHO for multi-bacillary disease, a few were concerned about drug interactions (mainly clofazimine and rifampicin) and used alternative drugs such as moxifloxacin, minocycline, and ethionamide (14–16). However, WHO recommends only minocycline and ofloxacin in presence of adverse effects or drug interactions (1). We chose the WHO MDT and did not observe complications with regard to the transplanted organ, except for the side effect of dapsone on the hemoglobin levels. Potential drug interactions did not occur in our patient. WHO recommends 1 year of MDT for multi-bacillary patients; however, most patients, including the present case (treated for 20 months), were treated for longer periods of time (up to 7 years).

In conclusion, transplantation physicians must be aware of leprosy in the differential diagnosis of skin lesions in their patients, especially, but not exclusively, in areas where leprosy is endemic, as cases have also been reported from areas of low endemicity (15). Special emphasis should be placed on searching for localized alterations in sensation and nerve thickening, the hallmarks of leprosy, which may be the only clue to distinguish them from skin lesions from other causes. Moreover, even under immunosuppression, patients may develop upgrading reactions and their differential diagnosis may pose a challenge.

Acknowledgements:

We would like to thank Drs Ana Guidethi, Maria de Lourdes Lopes Capacci, Celina Maruta, Sheila Siqueira, and Eliane Aparecida Silva for their support in the care of the patient and liver donor.

References

1. WHO. Global Leprosy Situation 2009. Wkly Epidemiol Rec 2009; 33: 333–340.
2. Qin MH, Madiraju MV, Rajagopalan M. Characterization of the functional replication origin of *Mycobacterium tuberculosis*. Gene 1999; 233: 121–130.
3. Britton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. Lancet 2004; 363: 1209–1217.
4. Naafs B, Wheate HW. The time interval between the start of anti-leprosy treatment and the development of reactions in borderline patients. Lepr Rev 1978; 49: 153–157.
5. Moura AK, Melo BL, Brito AE, et al. High levels of liver enzymes in five patients with type I leprosy reaction. Eur Acad Dermatol Venereol 2009; 23: 96–98.
6. Pereira GA, Stefani MM, Araújo Filho JA, Souza LC, Stefani GP, Martelli CM. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and *Mycobacterium leprae* co-infection: HIV-1 subtypes and clinical, immunologic, and histopathologic profiles in a Brazilian cohort. Am J Trop Med Hyg 2004; 71: 679–684.
7. Hussain T, Sinha S, Kulshreshtha KK, et al. Seroprevalence of HIV infection among leprosy patients in Agra, India: trends and perspective. Int J Lepr Other Mycobact Dis 2005; 73: 93–99.
8. Date A, John GT, Thomas PP, Jacob CK. Leprosy and renal transplantation. Lepr Rev 1998; 69 (1): 40–45.
9. Roselino AM, de Almeida AM, Foss NT, et al. Renal transplantation in leprosy patients. Int J Lepr Other Mycobact Dis 1993; 61: 102–105.
10. Shih HC, Hung TW, Lian JD, Tsao SM, Hsieh NK, Yang JH. Leprosy in a renal transplant recipient: a case report and literature review. J Dermatol 2005; 32 (8): 661–666.
11. Mushatt DM, Wattanamano P, Alvarado FS. Lepromatous leprosy in a renal transplant recipient. Clin Infect Dis 1998; 26: 217–218.
12. Agarwal DK, Mehta AR, Sharma AP, et al. Coinfection with leprosy and tuberculosis in a renal transplant recipient. Nephrol Dial Transplant 2000; 15: 1720–1721.
13. Guditi S, Ram R, Ismail KM, et al. Leprosy in a renal transplant recipient: review of the literature. Transpl Infect Dis 2009; 11 (6): 557–562 [Epub ahead of print July 28].
14. Gasink LB, Seymour C, Blumberg EA, Goldberg LR, Fishman NO. An uncommon presentation of an uncommon disease: leprosy in a heart transplant recipient. J Heart Lung Transplant 2006; 25: 854–856.
15. Modi K, Mancini M, Joyce MP. Lepromatous leprosy in a heart transplant recipient. Am J Transplant 2003; 3: 1600–1603.
16. Launius BK, Brown PA, Cush E, Mancini MC. A case study in Hansen's disease acquired after heart transplant. Crit Care Nurs Q 2004; 27: 87–91.
17. Batista MD, Porro AM, Maeda SM, et al. Leprosy reversal reaction as immune reconstitution inflammatory syndrome in patients with AIDS. Clin Infect Dis 2008; 46: 56–60.
18. Pieroni F, Stracieri ABPL, Moraes DA, et al. Six cases of leprosy associated with allogeneic hematopoietic SCT. Bone Marrow Transplant 2007; 40: 859–863.
19. Sampaio EP, Caneshi JR, Nery JA, et al. Cellular immune response to *Mycobacterium leprae* infection in human immunodeficiency virus-infected individuals. Infect Immun 1995; 63: 1848–1854.
20. Walker SL, Lockwood DNJ. The clinical and immunological features of leprosy. Br Med Bull 2006; 77–78: 103–121.
21. Janeway C, Travers P, Walport M, Capra JD. The manipulation of the immune response. In Murphy K, Travers P, Walport M (eds): Janeway's Immunobiology, 7th edn. London, UK: Garland Science, Taylor & Francis Group Publishing, 2008: 656–659.
22. Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. Immunopharmacology 2000; 47: 85–118.
23. Safa G, Darrieux L, Coic A, Tisseau L. Type I leprosy reversal reaction treated with topical tacrolimus along with systemic corticosteroids. Indian J Med Sci 2009; 63: 359–362.
24. Burdick AE, Ramirez CC. The role of mycophenolate mofetil in the treatment of leprosy reactions. Int J Lepr Other Mycobact Dis 2005; 73: 127–128.
25. Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs. N Engl J Med 2005; 353: 1711–1723.