

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

RAÍSSA MARIA MAGRI CURY

AVALIAÇÃO DOS PERFIS Th1, Th2 e Th17
NA RESPOSTA IMUNE CONTRA *Mycobacterium leprae*
EM MODELO EXPERIMENTAL DE HANSENÍASE

BAURU

2019

RAÍSSA MARIA MAGRI CURY

AVALIAÇÃO DOS PERFIS Th1, Th2 e Th17
NA RESPOSTA IMUNE CONTRA *Mycobacterium leprae*
EM MODELO EXPERIMENTAL DE HANSENÍASE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como parte dos requisitos para obtenção do
título de bacharel em Biomedicina -
Universidade do Sagrado Coração.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ana Paula Fávaro
Trombone Garlet

BAURU

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

C982a	<p>Cury, Raíssa Maria Magri</p> <p>Avaliação dos perfis Th1, Th2 e Th17 na resposta imune contra <i>Mycobacterium leprae</i> em modelo experimental de hanseníase / Raíssa Maria Magri Cury. -- 2019. 29f. : il.</p> <p>Orientadora: Prof.^a Dra. Ana Paula Fávaro Trombone Garlet</p> <p>Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade do Sagrado Coração - Bauru - SP</p> <p>1. Células T regulatórias. 2. Hanseníase. 3. <i>Mycobacterium leprae</i>. I. Garlet, Ana Paula Fávaro Trombone. II. Título.</p>
-------	---

RAÍSSA MARIA MAGRI CURY

AVALIAÇÃO DOS PERFIS Th1, Th2 e Th17
NA RESPOSTA IMUNE CONTRA *Mycobacterium leprae*
EM MODELO EXPERIMENTAL DE HANSENÍASE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como parte dos requisitos para obtenção do
título de bacharel em Biomedicina -
Universidade do Sagrado Coração.

Aprovado em: ___/___/___.

Banca examinadora:

Prof.^a Dra. Ana Paula Fávaro Trombone Garlet (Orientadora)
Universidade do Sagrado Coração

Prof.^a Dra. Camila Peres Buzalaf
Faculdades Integradas de Bauru

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais e ao meu irmão por todo apoio, incentivo e amor incondicional, por me ensinarem a ser forte e a correr atrás dos meus sonhos.

À minha orientadora Prof.^a Dra. Ana Paula Fávaro Trombone Garlet pelos valores profissionais, todo conhecimento e aprendizado, que contribuíram para a minha formação tanto pessoal quanto profissional.

Aos meus amigos pelos grandes momentos que compartilhamos durante toda essa jornada que vai chegando ao fim.

O sentimento é de gratidão, felicidade e orgulho, pelo encerramento deste ciclo! Mais uma etapa vencida.

Sem vocês, esse sonho não seria possível.

RESUMO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica que afeta principalmente a pele e o sistema nervoso periférico, cujo agente etiológico é o *Mycobacterium leprae*. Esta doença apresenta diversas formas clínicas, as quais são diretamente influenciadas pela resposta imune. Neste contexto, estudos têm demonstrado que várias subpopulações de linfócitos T podem atuar na imunopatogênese da hanseníase, tais como, células Th1, Th2, Th17 e T regulatórias. Estudos preliminares do grupo demonstraram que camundongos nocautes para o receptor de quimiocina CCR4 (CCR4KO), o qual é importante para o recrutamento de célula T regulatória (Treg), previamente inoculados com *M. leprae*, apresentaram diminuição significativa na multiplicação bacilar no coxim plantar quando comparado aos camundongos selvagens (WT). Adicionalmente, resultados posteriores demonstraram que no grupo CCR4KO houve a diminuição da expressão de IL-10 e de TGF-beta no coxim plantar quando comparado ao grupo WT. Por outro lado, não houve diferença significativa entre os grupos quando as amostras analisadas foram os linfonodos. Entretanto, estudos adicionais são necessários para entender completamente a participação da resposta imune na patogênese da hanseníase. Desta forma, dando continuidade a este estudo, o presente trabalho teve como objetivo determinar a expressão das citocinas IFN-gama, IL-17 e IL-4 por meio da técnica de Real Time PCR nos coxins plantares e linfonodos drenantes dos camundongos CCR4KO e WT previamente inoculados com *M. leprae*. Os resultados obtidos demonstraram que não foi possível detectar a expressão de IL-4 e IL-17 tanto nos coxins plantares quanto nos linfonodos de ambos os grupos. Em relação à expressão do IFN-gama, a mesma foi significativamente maior nos coxins plantares e linfonodos do grupo WT quando comparado ao CCR4KO, porém quando analisou-se a razão entre IFN-gama/IL-10 e IFN-gama/TGF-beta, não houve diferença significativa. Estes resultados foram contraditórios, pois esperava-se que a expressão do IFN-gama fosse maior no grupo CCR4KO, uma vez que este grupo apresentou diminuição no número de bacilo. Diante desses resultados, estudos adicionais serão realizados para analisar outros alvos envolvidos na imunopatogênese da doença.

Palavra-chave: Células T regulatórias. Hanseníase. *Mycobacterium leprae*.

ABSTRACT

Leprosy is a chronic infectious disease that mainly affects the skin and peripheral nervous system, whose etiological agent is *Mycobacterium leprae*. This disease has several clinical forms, which are directly influenced by the immune response. In this context, studies have shown that several T lymphocyte subpopulations may act on leprosy immunopathogenesis, such as regulatory Th1, Th2, Th17 and T cells. Preliminary studies from our group showed that CCR4 (CCR4KO) chemokine receptor knockout mice, which is important for regulatory T-cell (Treg) recruitment, previously inoculated with *M. leprae*, showed a significant decrease in bacillary multiplication in the plantar cushion when compared to wild mice (WT). Additionally, subsequent results demonstrated that in the CCR4KO group there was a decrease in IL-10 and TGF-beta expression in the plantar cushion when compared to the WT group. On the other hand, there was no significant difference between the groups when the samples analyzed were the lymph nodes. However, further studies are needed to fully understand the role of the immune response in the pathogenesis of leprosy. Thus, continuing this study, the present work aimed to determine the expression of IFN-gamma, IL-17 and IL-4 cytokines by the Real Time PCR technique in the CCR4KO and WT mouse plantar pads and draining lymph nodes previously inoculated with *M. leprae*. The results showed that it was not possible to detect IL-4 and IL-17 expression in both the plantar cushions and lymph nodes of both groups. Regarding IFN-gamma expression, it was significantly higher in WT group plantar and lymph nodes compared to CCR4KO, but when the ratio between IFN-gamma / IL-10 and IFN-gamma / TGF-beta was analyzed, there was no significant difference. These results were contradictory as IFN-gamma expression was expected to be higher in the CCR4KO group as this group showed a decrease in bacillus number. Given these results, additional studies will be performed to analyze other targets involved in the immunopathogenesis of the disease.

Keyword: Regulatory T cells. Leprosy. *Mycobacterium leprae*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Resultado Baciloscopia	14
Figura 2 - Análise da expressão do perfil T regulatório referente às citocinas IL-10 nos coxins plantares (A) e linfonodos (B), e a expressão do TGF-beta nos coxins plantares (C) e linfonodos (D) de camundongos WT e CCR4KO. Análise estatística: Mann- Whitney #p <0, 05.....	15
Figura 3 - Análise da expressão do perfil T regulatório referente à citocina IFN-gama, nos coxins plantares (A) e linfonodos (B) de camundongos WT e CCR4KO. Análise estatística: Mann- Whitney; #p <0, 05.	20
Figura 4 - Análise da razão entre IFN-gama/IL-10 (A) e IFN-gama/TGF-beta (B) nos coxins plantares de camundongos WT e CCR4KO. Análise estatística: Mann- Whitney; #p <0, 05.	21

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO DE LITERATURA	10
3	OBJETIVO	16
4	MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1	EXTRAÇÃO E ANÁLISE DA QUALIDADE/INTEGRIDADE DO RNA	18
4.2	CONFECÇÃO DO cDNA.....	18
4.3	REAÇÕES DE REAL TIME PCR	18
4.4	ANÁLISE DOS RESULTADOS	19
5	RESULTADOS	20
6	DISCUSSÃO	22
7	CONCLUSÃO	23
	REFERÊNCIAS	24

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma infecção granulomatosa infecciosa crônica causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae*. É um bacilo álcool-ácido resistente obrigatoriamente intracelular com predileção pelas células de Schwan (além de macrófagos), que possui temperatura ideal de multiplicação entre 27°C e 30°C. Estas características esclarecem a ocorrência da hanseníase em áreas superficiais e frias, tais como, testículos, via respiratória superior e, principalmente, a pele e os nervos periféricos (AGRAWAL *et al.*, 2005; BRITTON; LOCKWOOD, 2004; SCOLLARD *et al.*, 2006). Apesar de o bacilo ter a capacidade de infectar grande número de indivíduos (alta contagiosidade), poucos adoecem devido a sua patogenicidade (baixa morbidade), propriedade esta de função de suas características intrínsecas e da sua relação com hospedeiro e do grau de endemecidade do meio (TALHARI; GARRIDO 1997; SAMPAIO *et al.*, 1998; OPROMOLLA, 2000).

A doença manifesta-se em cinco formas, sendo dois pólos estáveis e opostos (hanseníase tuberculóide e hanseníase virchowiana), e três pólos instáveis intermediários ou dimorfos (dimorfo-tuberculóide, dimorfo-dimorfo e dimorfo-virchowiano). Além disso, ocorrem dois eventos reacionais tais como, a reação do tipo 1 ou reação reversa (RR), e a reação do tipo 2 ou eritema nodoso hansênico (ENH). Acredita-se que a transmissão e infecção da hanseníase ocorram através de secreções provenientes das vias aéreas superiores, pelo contato íntimo e prolongado de indivíduo suscetível com paciente multibacilar, através da inalação de bacilos. A melhor forma de cessar a transmissão é o diagnóstico e tratamento precoce (LASTÓRIA; ABREU, 2012).

Estudos anteriores destacavam apenas a influência das subpopulações Th1 e Th2 na imunopatogênese da doença. Atualmente, com a descoberta de novas subpopulações de linfócitos, estudos recentes têm demonstrado que outras células, tais como, Th17 e T regulatórias, podem apresentar papel crítico na hanseníase.

Resultados preliminares do grupo têm avaliado a resposta imunológica contra o *M. leprae*, na qual demonstraram que com a ausência das Tregs inibiu a multiplicação bacilar. Houve diferença significativa entre o grupo CCR4KO e selvagem, isto é, uma diminuição na quantidade de bacilos no coxim plantar (CCR4KO). Diante desses resultados, o próximo passo foi avaliar as citocinas envolvidas neste modelo (papel da treg), ou seja, citocinas envolvidas com a célula T regulatória. Cabe ressaltar que os experimentos fizeram parte do projeto de Iniciação Científica (CURY *et al.*, 2018), e os resultados demonstraram que na ausência de Treg houve a diminuição significativa da expressão de IL-10 e de TGF-beta no

coxim plantar do grupo CCR4KO quando comparado com o WT. Porém, para o entendimento da imunoregulação é necessário avaliar outros alvos envolvidos na patogênese da hanseníase. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a expressão das citocinas IFN-gama, IL-17 e IL-4, por meio da técnica de Real Time PCR nos coxins plantares e linfonodos drenantes dos camundongos CCR4KO e WT, previamente inoculados com *M. leprae*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A hanseníase é uma doença infecto-contagiosa crônica que acomete principalmente a pele e os nervos periféricos. É causada pelo agente etiológico *Mycobacterium leprae*, na qual é um bacilo obrigatoriamente intracelular que apresenta tropismo pelas células de Schwan (além de macrófagos) e possui temperatura ideal de multiplicação entre 27°C e 30°C. Essas características peculiares esclarecem a ocorrência da hanseníase em áreas superficiais e frias, tais como pele, nervos periféricos, testículos e via respiratória superior (AGRAWAL *et al.*, 2005; BRITTON; LOCKWOOD, 2004; SCOLLARD *et al.*, 2006).

A forma mais provável de transmissão e infecção ocorre principalmente através de secreções provenientes das vias aéreas superiores. Deste modo, os indivíduos doentes e susceptíveis que não possuem tratamento, na qual convivem frequentemente em um período prolongado, constituem um importante fator determinante para a transmissão do bacilo (TALHARI; GARRIDO, 1997; PINTO NETO *et al.*, 2002; ARAÚJO, 2003).

Atualmente, acredita-se que a maioria da população não desenvolva a doença devido a capacidade de desenvolver uma resposta imune adequada contra o *M. Leprae*. (FITNESS; TOSH; HILL, 2002; MORAES *et al.*, 2006). Isto é, a maioria dos indivíduos apresenta imunidade natural ao bacilo por apresentar uma alta infectividade e uma baixa patogenicidade. Em contrapartida, uma pequena parcela de indivíduos desenvolve a hanseníase, apresentando um quadro variável de comprometimento. A partir do momento de exposição ao *M. leprae*, a resposta do hospedeiro varia de acordo com a intensidade de infecção, ou seja, pode ser uma infecção seguida de cura, desenvolvimento de formas graves ou formas brandas da doença (FOSS, 1997; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002; MENDONÇA *et al.*, 2008).

Dependendo do padrão de resposta imune e da disseminação da doença, a hanseníase pode ser classificada em cinco formas, sendo duas formas polares [hanseníase tuberculóide (TT) e hanseníase virchoviana (VV)], e três formas intermediárias ou dimorfas [dimorfo-tuberculóide (DT), dimorfo-dimorfo (DD) e dimorfo-virchoviano (DV)] (BRITTON; LOCKWOOD, 2004; FONSECA *et al.* 2017; MOTTA *et al.*, 2010; RIDLEY; JOPLING, 1966; SCOLLARD; TRUMAN; EBENEZER, 2015). Além disso, podem desenvolver dois diferentes eventos reacionais, a reação do tipo 1 ou reação reversa (RR) e a reação do tipo 2 ou eritema nodoso hansênico (ENH), que são processos inflamatórios agudos, localizados ou sistêmicos, e são resultantes de alterações imunológicas entre o hospedeiro e o agente infectante. Ocorrem antes, durante ou após o tratamento com sucesso da doença (MORAES *et*

al., 1999; 2000; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002; MENDONÇA *et al.*, 2008).

Pacientes no pólo tuberculóide (TT) caracterizam-se pela presença de poucas lesões na pele e nervos periféricos, e são encontrados raros ou nenhum bacilo nas lesões devido ao predomínio da imunidade mediada por células. No entanto, no pólo virchoviano (VV), os bacilos são abundantes e a resposta imune correspondente é humoral. De acordo com o padrão de citocinas vistos nas lesões dos pacientes nos pólos (TT e VV), observa-se em alguns estudos, o paradigma do perfil Th1 com o predomínio de IL-2, TNF-alfa e IFN-gama em lesões tuberculóides, e o perfil Th2 com o predomínio de IL-4 e IL-5 em lesões virchovianas (SIELING; MODLIN, 1994; YAMAMURA *et al.*, 1992). Adicionalmente, foram observados que quando isolados da lesão de pacientes com TT, os clones de células T CD4+ secretavam primeiro IFN-gama, e em pacientes com VV, produziam IL-4 predominantemente (SIELING; MODLIN, 1994).

A maioria dos pacientes com hanseníase pertence ao grupo dimorfo (DT, DD e DV), que são caracterizados por serem instáveis, podendo desenvolver reações hansênicas (reação reversa (RR) e o eritema nodoso hansênico (ENH)); e por uma redução gradual da resposta imune celular, devido ao aumento da quantidade de bacilos e das lesões cutâneas. A RR está associada a um aumento da imunidade mediada por células e pela infiltração nas lesões cutâneas e nervos periféricos de células T CD4+ produtoras de IFN-gama e TNF- alfa (BRITTON, 1998; KHANOLKAR-YOUNG *et al.*, 2008; LITTLE *et al.*, 2001). Adicionalmente, foram detectadas nas lesões e no soro dos pacientes as citocinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 (STEFANI *et al.*, 2003). Em relação ao ENH, ocorre em pacientes com as formas DV e VV, e consiste em uma reação inflamatória sistêmica associada a deposição extravascular de imunocomplexos. Neste contexto, há infiltração de neutrófilos, ativação do sistema complemento e elevados níveis de IL-4, IL-5, IL-10, IL-6, IL-7 e TNF- alfa (BARNES *et al.*, 1992; LOCKWOOD, 1996; MORAES *et al.*, 1999; SARNO *et al.*, 1991).

Baseado em todas as formas (polares e dimorfos), e reações hansênicas descritas anteriormente, observou-se o papel das subpopulações Th1 e Th2 na imunopatogênese da hanseníase, indicando um fator determinante da severidade da doença, como o balanço das citocinas produzidas. Porém, outro fator envolvido na patogênese da doença pode ser observado no fato de que após o estímulo de células do sangue periférico com *M. leprae*, aproximadamente 40% dos pacientes apresentaram tanto IFN- γ , IL-4 e IL-2 seguindo um padrão dito Th0, apesar de grande parte dos pacientes com hanseníase tuberculóide apresentarem perfil Th1 e pacientes virchovianos perfil Th2 (MISRA *et al.*, 1995). Diante disso, é possível que, alternativamente, os pacientes estivessem próximos de um padrão

dimorfo (DT ou DV), e as variações da hanseníase não se delimitem corretamente no modelo Th1/Th2, como demonstrado por estudos anteriores. Portanto, o estudo do sistema imunológico torna-se fundamental para o entendimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da doença (MENDONÇA *et al.*, 2008). E de fato, estudos recentes têm demonstrado que outras subpopulações, tais como Th17 e T regulatórias (Tregs), podem apresentar papel crítico no controle da resposta imune da hanseníase (FONSECA *et al.*, 2017; SAINI *et al.*, 2017).

As células Th17 são designadas por produzirem IL-17, ou seja, esse grupo de células tem uma citocina que é prototípica a interleucina-17 (MIOSSEC; KOLLS, 2012). Além disso, estão envolvidas na imunopatogênese da hanseníase, em razão dos marcadores IL-17 e ROR-gama estarem presentes tanto na RR como no ENH (CHAITANYA *et al.*, 2012; GELUK, 2013; MARTINIUK *et al.*, 2012). Essa citocina apresentou níveis maiores no pólo TT quando comparado ao LL (SAINI; RAMESH; NATH, 2013).

Atualmente, destacam-se novos subgrupos de células T auxiliares, como as células T reguladoras, mais conhecidas como Tregs (SHEVACH, 2002), reforçando que as subpopulações de células T com propriedades regulatórias apresentam papel crítico no controle da resposta imune. Além disso, dentre os inúmeros subtipos de células com funções supressoras ou regulatórias, parte das células T CD4+, expressam a molécula IL-2Ra (CD25), ou seja, cadeia α (CD25) do receptor de IL-2 (IL-2R), e o fator de transcrição FoxP3, representando de 5 a 10% todas as células T CD4+ circulantes no sangue periférico (ATTIA *et al.*, 2010; MASSONE *et al.*, 2010). Quanto ao mecanismo de ação das Tregs, as células CD4+CD25+ quando ativadas, interrompem a produção de outras células T [direta ou indiretamente, atuando sobre células apresentadoras de antígeno (APCs)], ou ainda bloqueia ou reduz a proliferação de mediadores inflamatórios por células T e APCs. É possível considerar que as Tregs exerçam suas funções de modo dependente do contato célula-célula a partir da molécula inibitória CTLA-4, ou através da produção de citocinas, como TGF-beta e IL-10 (BILATE; LAFAILLE, 2012; CAMPBELL; KOCH, 2011; HORWITZ; ZHENG; GRAY, 2008; WAN; FLAVELL, 2007).

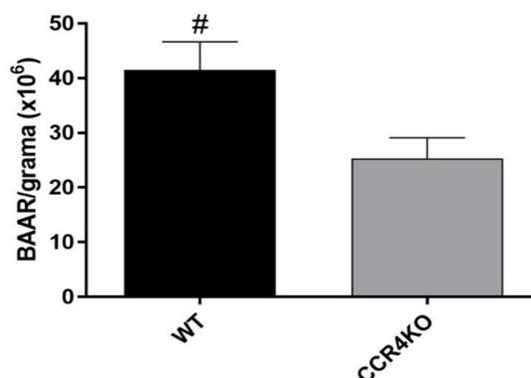
Recentemente, alguns estudos evidenciavam a participação das Tregs na hanseníase, especificamente no pólo virchoviano, e a presença destas células pode ser a causa de não obterem uma reação característica das células T na hanseníase virchoviana (MODLIN *et al.*, 1986; OTTENHOFF *et al.*, 1991; PALERMO *et al.*, 2012). Essa possibilidade foi comprovada em um estudo que relatou que os clones de células T CD4+ isolados de pacientes com hanseníase virchoviana, inibiam a resposta específica de outros clones de células T do

mesmo paciente (MUTIS *et al.*, 1994). Palermo *et al.* (2012) demonstraram em pacientes virchovianos aumento na expressão de moléculas regulatórias (CTLA-4) e na porcentagem de Tregs. Outros estudos também demonstraram a participação das Tregs na hanseníase, tanto por meio da produção de TGF-beta como de IL-10 (BABOSHA *et al.*, 2014; KUMAR *et al.*, 2014; SADHU *et al.*, 2016).

O fato que embasa a migração das Tregs para sítios cutâneos e de mucosa é dependente do receptor de quimiocina CCR4 (em resposta aos ligantes CCL17 e CCL22), e influenciou na escolha dos animais CCR4KO para avaliação do papel das Tregs na hanseníase experimental (CAMPANELLI *et al.*, 2006; HIRAHARA *et al.*, 2006). O período necessário para avaliar a multiplicação do *M. leprae* é longo (9 meses), e por esse motivo a utilização de animais nocautes de Foxp3 é inviável devido ao desenvolvimento de doença linfoproliferativa letal incompatível com a cinética do modelo experimental, podendo ser utilizados apenas em teoria estes animais. Desse modo, conforme mencionado previamente, optou-se pela utilização de camundongos CCR4KO, já que a migração das células Tregs para sítios cutâneos e de mucosa é dependente deste receptor. Adicionalmente, a utilização dos CCR4KOs possibilita analisar o papel das Tregs na multiplicação de bacilos sem intervir na imunorregulação de forma sistêmica, assim, privando o desenvolvimento de autoimunidade e letalidade que dificultariam o modelo.

Neste quadro, por meio do modelo experimental de hanseníase [conforme a técnica de Shepard (LEVY; JI, 2006)], o grupo de pesquisa demonstrou que camundongos nocautes para o receptor de quimiocina CCR4 (CCR4KO), previamente inoculados com *M. leprae*, apresentaram diminuição significativa na multiplicação bacilar nos coxins plantares quando comparado aos camundongos selvagens (WT). Isto é, a interferência na migração das Tregs (nos CCR4KO) afetou a multiplicação bacilar, ou seja, diminuiu a quantidade de bacilos nos coxins plantares como demonstrado na Figura 1. Isso ocorre provavelmente devido à capacidade das Tregs em inibir subpopulações celulares essenciais para eliminação do *M. leprae* por meio da produção de citocinas, tais como, TGF-beta e IL-10. Assim, as Tregs podem ter inibido, por exemplo, as células Th1, e conseqüentemente a produção do IFN-gama, citocina esta responsável pela ativação do macrófago e eliminação do bacilo (FONSECA *et al.*, 2017).

Figura 1 - Resultado Baciloscopia

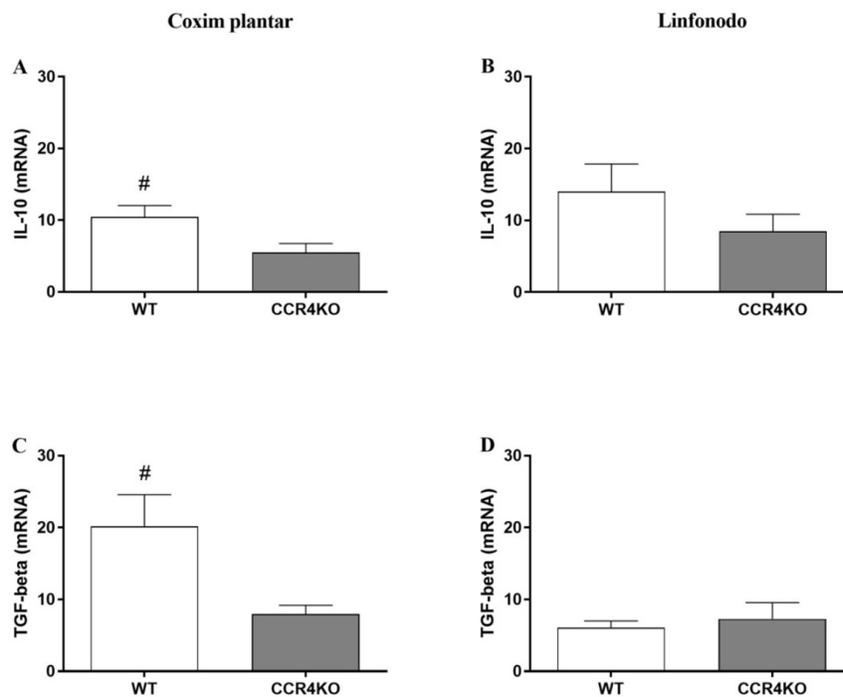


Fonte: Elaborada pela autora

De fato, os resultados obtidos referentes à Iniciação Científica foram confirmados, que na ausência das células T regulatórias (grupo CCR4KO), a expressão das citocinas TGF-beta e IL-10 (marcadores funcionais de células T regulatórias) nos coxins plantares, foram significativamente menores quando comparado ao grupo selvagem (CURY *et al.*, 2018). Estes resultados corroboram com outros estudos que têm associado às células regulatórias a persistência do bacilo, uma vez que estas células são capazes de inibir outras subpopulações de linfócitos essenciais para a resposta imune contra o *M. leprae*, tais como Th1 e Th17. Ou seja, na ausência das células T regulatórias, Th1 e Th17 (subpopulações celulares essenciais para eliminação do *M. leprae*) não foram inibidas por essas células, permitindo assim a diminuição da multiplicação bacilar no coxim plantar (AZEVEDO *et al.*, 2017; BABOSHA *et al.*, 2014; KUMAR *et al.*, 2014; SADHU *et al.*, 2016). Porém, não houve diferença significativa para ambas as citocinas nos linfonodos, apenas no coxim plantar. Estes resultados podem ser justificados pelo fato de que linfócitos efetores já diferenciados são encontrados nos linfonodos, não sendo possível detectar níveis maiores de citocinas. Em contrapartida, no sítio de infecção (coxins plantares), a presença do bacilo estimula as células T regulatórias (e outros linfócitos) a produzirem maiores quantidade de citocinas, consequentemente ocorrendo uma diferença na expressão de IL-10 e TGF-beta.

A partir dos resultados de expressão gênica relativos aos alvos IL-10 e TGF-beta, a expressão foi significativamente maior nos coxins plantares do grupo WT quando comparado ao CCR4KO (Figura 2 - A e C). No entanto, nos linfonodos não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 2 - B e D).

Figura 2 - Análise da expressão do perfil T regulatório referente às citocinas IL-10 nos coxins plantares (A) e linfonodos (B), e a expressão do TGF-beta nos coxins plantares (C) e linfonodos (D) de camundongos WT e CCR4KO. Análise estatística: Mann-Whitney #p < 0,05.



Fonte: Resultado da Iniciação Científica.

Diante dos resultados acima, demonstrou-se o papel das células T regulatórias na multiplicação, porém, para entender a imunopatologia da doença é necessário avaliar outras subpopulações, tais como citocinas envolvidas com os perfis Th1, Th2, Th17.

3 OBJETIVO

Para esclarecer os mecanismos envolvidos na inibição da multiplicação bacilar, o presente estudo tem como objetivo avaliar a expressão das citocinas IFN- gama, IL-17 e IL-4 por meio da técnica de Real Time PCR nos coxins plantares e linfonodos drenantes dos camundongos CCR4KO e selvagens (WT), previamente inoculados com *M. leprae*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo é uma continuação dos experimentos realizados anteriormente pelo grupo de pesquisa. Desta forma, as seguintes etapas já haviam sido executadas previamente:

- Obtenção da suspensão de *Mycobacterium leprae* para inoculação nos camundongos CCR4KO e selvagens: como o *M. leprae* não cresce em meio de cultura, camundongos nude foram utilizados para a multiplicação e manutenção dos bacilos. Assim, os bacilos para a infecção dos camundongos nocautes e selvagens foram obtidos dos coxins plantares de camundongos nude previamente inoculados (tempo de infecção de 4 a 6 meses) com uma cepa gentilmente cedida pelo Dr. James Krahembuhl – National Hansen’s Disease Program/Baton Rouge, Louisiana, EUA. O processamento do inóculo foi realizado semelhante ao descrito por Trombone *et al.* (2014).

- Inoculação da suspensão de *Mycobacterium leprae* nos camundongos CCR4KO e selvagens (background C57BL/6): os camundongos CCR4KO e selvagens foram inoculados (30 ul) no coxim plantar (ambos os coxins) com *M. leprae* ($1,0 \times 10^4$ bacilos/coxim), proveniente do camundongo nude. Durante os experimentos os animais foram mantidos em microisoladores (cinco animais por caixa), e cada grupo experimental foi composto por nove animais. O experimento foi realizado em duplicata e oito meses após a inoculação realizou-se a eutanásia dos animais. O presente estudo faz parte de um projeto maior, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de São Paulo - Faculdade de Odontologia de Bauru, sob número de protocolo: 012/2009.

- Amostras coletadas: após a eutanásia dos camundongos CCR4KO e selvagens, foram coletadas as seguintes amostras:

a) Coxim plantar esquerdo: foi coletado e armazenado em formol tamponado para posterior análise histopatológica (coloração H&E/análise infiltrado). Esta etapa já foi realizada e não houve diferença no infiltrado inflamatório.

b) Coxim plantar direito: metade do coxim plantar direito foi utilizado para a realização da baciloscopia (contagem dos bacilos – resultado mencionado no tópico Introdução – houve diferença significativa entre o grupo CCR4KO e selvagem). A outra parte do coxim foi armazenada em RNA later para posterior análise da expressão de citocinas.

c) Linfonodos drenantes (poplíteo - linfonodos drenantes de ambas as patas): foram coletados e armazenados em RNA later para posterior análise da expressão de citocinas.

Estas amostras (coxim plantar e linfonodos), armazenadas em RNA later, foram utilizadas neste estudo. Seguem abaixo os materiais e métodos desenvolvidos para realização

da pesquisa.

4.1 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DA QUALIDADE/INTEGRIDADE DO RNA

As amostras (coxim plantar e linfonodos drenantes, previamente armazenadas em RNA later) foram picotadas, individualmente, com o auxílio de um bisturi e transferidas para um tubo com esferas de cerâmica (CK28 - Bertin Technologies). Note que foram processadas amostras provenientes de oito animais do grupo CCR4KO e onze do grupo WT. Em seguida foi adicionado o reagente QIAzol (700ul - Qiagen), para processamento das amostras (homogeneização e lise) no aparelho Precellys24 - Bertin Technologies (1 pulso de 10 segundos e incubação a 4°C por 5 minutos, o ciclo foi repetido 3 vezes). O RNA total foi extraído utilizando o RNeasy Plus Universal Mini Kit e o aparelho Qiacube, de acordo com as especificações do fabricante (Qiagen). O RNA foi recuperado em 30ul de água RNase-free, e sua quantificação foi realizada no aparelho Nanodrop 2000 (ThermoScientific). A avaliação da integridade das amostras foi realizada no aparelho Bioanalyzer 2100, conforme as especificações do fabricante (GE Healthcare Bio - Sciences) utilizando o kit Agilent RNA 6000 Nano.

Cabe ressaltar que todos os passos envolvidos na extração e na avaliação da integridade do RNA, utilizando o RNeasy Plus Universal Mini Kit (e o aparelho Qiacube) e o Agilent RNA 6000 Nano kit, respectivamente, foram realizados conforme descrito pelos fabricantes, sem qualquer alteração. Os protocolos estão disponíveis no site das empresas mencionadas.

4.2 CONFECÇÃO DO cDNA

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado por meio de uma reação de transcrição reversa, com a utilização do QuantiTect Rev. Transcription Kit (Qiagen), utilizando 1ug de RNA, de acordo com as especificações do fabricante. A qualidade do cDNA foi verificada por meio da expressão do gene constitutivo (controle endógeno).

4.3 REAÇÕES DE REAL TIME PCR

Os ensaios de expressão foram realizados no aparelho ViiA7 Real Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando os reagentes TaqMan Gene Expression Master Mix e TaqMan Gene Expression Assay (inventoriados/best coverage), conforme determinado pelo

fabricante (Thermo Fisher Scientific). Foram avaliadas a expressão das citocinas IL-4, IL-17 e IFN-gama e do controle endógeno (Gapdh Mm99999915_g1). Para todos os alvos foi determinada a eficiência baseada em curva padrão relativa em triplicata com variação de Threshold Cycle (Ct) < 0,5, $R^2 > 0,9$ e % eficiência entre 90-110, conforme “The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments” (STEPHEN *et al.*, 2009). Baseados nos resultados das curvas foram analisadas as expressões dos alvos acima mencionados. Os dados obtidos foram normalizados utilizando o gene endógeno (ΔCt).

4.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS

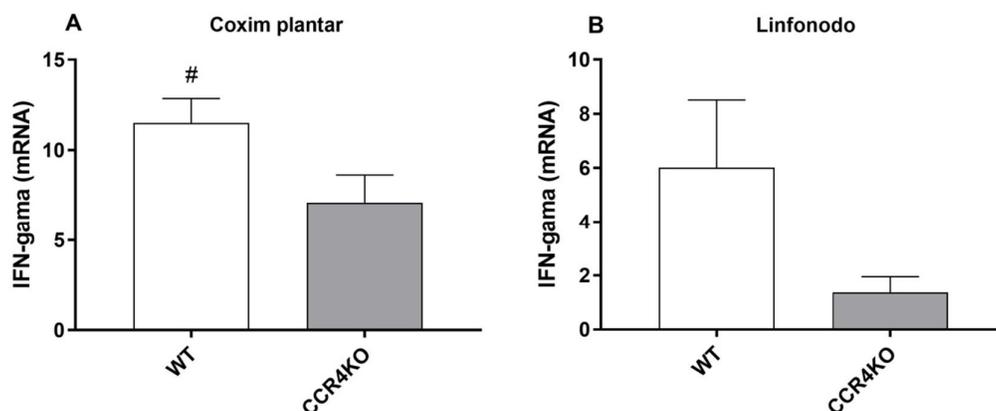
Após a obtenção dos dados, de acordo com a normalidade de sua distribuição, os resultados obtidos foram avaliados pelo teste Mann-Whitney. Para a análise foi utilizado o programa GraphPad Prism 6.05 (GraphPad, San Diego, CA).

5 RESULTADOS

Neste estudo, avaliaram-se os perfis e a expressão das citocinas relacionados com a resposta imune contra o *M. Leprae*, por meio da técnica de Real Time PCR nos coxins plantares e linfonodos drenantes dos camundongos CCR4KO e WT. Os alvos IL-4 e IL-17 não foram detectados tanto nos coxins plantares quanto nos linfonodos de ambos os grupos.

Em relação aos resultados de expressão gênica referentes ao alvo IFN-gama, a expressão foi significativamente maior nos coxins plantares e linfonodos do grupo WT quando comparado ao CCR4KO (Figura 3).

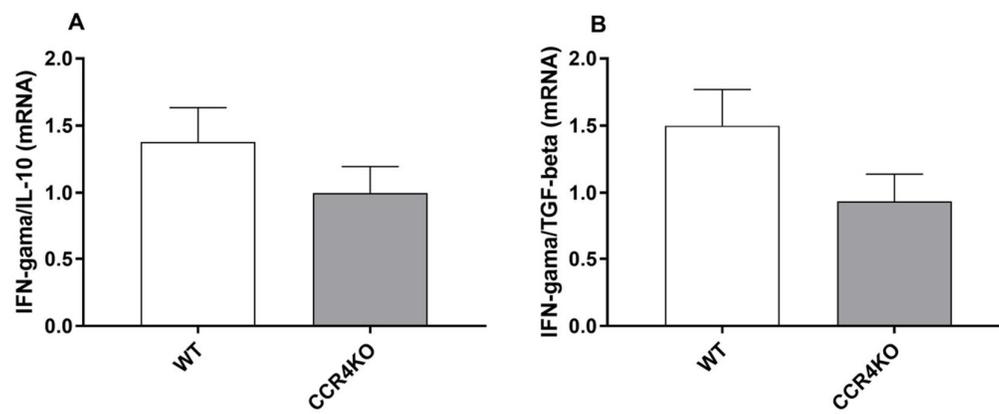
Figura 3 - Análise da expressão do perfil T regulatório referente à citocina IFN-gama, nos coxins plantares (A) e linfonodos (B) de camundongos WT e CCR4KO. Análise estatística: Mann-Whitney; #p <0,05.



Fonte: Elaborada pela autora.

Comparando os resultados obtidos neste trabalho com os anteriores (avaliação das citocinas T regulatórias), foi calculada a razão entre IFN-gama/IL-10 e IFN-gama/ TGF-beta, e conforme demonstrado na figura 4, não houve diferença significativa nos coxins plantares de camundongos WT e CCR4KO.

Figura 4 - Análise da razão entre IFN-gama/IL-10 (A) e IFN-gama/TGF-beta (B) nos coxins plantanares de camundongos WT e CCR4KO. Análise estatística: Mann-Whitney; #p < 0,05.



Fonte: Elaborada pela autora.

6 DISCUSSÃO

Baseado nos resultados obtidos no presente estudo, a expressão da principal citocina envolvida na eliminação do *M. leprae*, IFN-gama, foi significativamente maior nos coxins plantares do grupo WT quando comparado ao CCR4KO. Este resultado pode parecer contraditório, uma vez que o resultado esperado era um aumento significativo de IFN-gama no grupo CCR4KO (na ausência de células T regulatórias) quando comparado ao selvagem.

Este resultado contraditório é evidenciado pelo fato de que, em humanos, no polo tuberculose há predomínio do perfil Th1, o qual é caracterizado pela produção do interferon gama, que é principal citocina que ativa macrófago, célula esta responsável pela eliminação de bactérias intracelulares, como por exemplo, o *M. leprae*. Sendo assim, o polo tuberculose apresenta menor quantidade de bacilos e lesões devido ao predomínio do interferon gama. Por outro lado, no polo virchoviano, não há predomínio dessa população (Th1), mas sim, das células Th2 e Tregs, favorecendo o aumento no número de bacilos e lesões (SIELING, MODLIN, 1994; YAMAMURA *et al.*, 1992; CURY *et al.*, 2018).

Adicionalmente, quando analisou-se a expressão do IFN-gama nos linfonodos, os resultados não apresentaram diferença significativa entre os grupos. Apesar da diferença entre esses grupos ser visualmente diferente, é possível que não houve diferença significativa devido ao desvio padrão apresentado entre os mesmos. Quanto ao IL-4 e IL-17, não foi possível detectá-los tanto nos coxins plantares quanto nos linfonodos de ambos os grupos, devido à baixa expressão de cada alvo.

Adicionalmente, foi realizada a razão entre IFN-gama/IL-10 e IFN-gama/TGF-beta, para avaliar se haveria correlação entre estas citocinas, porém, não houve diferença significativa entre os grupos.

Diante do resultado contraditório, futuramente pretende-se analisar outros alvos envolvidos na imunopatogênese da doença por meio de PCR Array, visando avaliar outros marcadores para obter um resultado conclusivo do estudo.

7 CONCLUSÃO

Analisando a imunorregulação envolvida neste processo, o resultado obtido neste estudo demonstrou que a expressão (RNAm) da citocina IFN-gama foi significamente maior nos coxins plantares e linfonodos do grupo WT quando comparado ao CCR4KO. Este resultado parece contraditório, pois esperava-se que a expressão do IFN-gama fosse maior no grupo CCR4KO, uma vez que, este grupo apresentou diminuição no número de bacilo. Diante disso, estudos adicionais serão necessários para esclarecer tal resultado.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, Amit *et al.* Neurological manifestations of Hansen's disease and their management. **Clin Neurol Neurosurg**, v. 107, n. 6, p. 445-454, out. 2005.
- ARAÚJO, M. G. Hanseníase no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**. Uberaba, v. 36, n. 3, p. 373-382, maio./jun. 2003.
- ATTIA, Enas A. S *et al.* Circulating CD4⁺ CD25 high FoxP3⁺ T Cells vary in different clinical forms of leprosy. **Int J Dermatol**, v. 49, n. 10, p. 1152-1158, out. 2010.
- AZEVEDO, Michelle de Campos Soriani *et al.* Simultaneous analysis of multiple T helper subsets in leprosy reveals distinct patterns of Th1, Th2, Th17 and Tregs markers expression in clinical forms and reactional events. **Med Microbiol Immunol**, v. 206, n. 6, p. 429-439, dez. 2017.
- BABOSHA, Kidist *et al.* T-cell regulation in lepromatous leprosy. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 8, p. e2773, abr. 2014.
- BARNES, Peter F *et al.* Tumor necrosis factor production in patients with leprosy. **Infect Immun**, v. 60, n. 4, p. 1441-1446, abr. 1992.
- BILATE, A. M.; LAFAILLE, J. J. Induced CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in immune tolerance. **Annu Rev Immunol**, v. 30, p. 733-758, abr. 2012.
- BRITTON, W. J.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy. **The Lancet**, v. 363, n. 9416, p. 1209-1219, abr. 2004.
- BRITTON, W. J.; The management of leprosy reversal reactions. **Leprosy Rev**, v. 69, n. 3, p. 225-234, set. 1998.
- CAMPBELL, D. J.; KOCH, M. A.; Phenotypical and functional specialization of FOXP3⁺ regulatory T cells. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 2, p. 119-130, fev. 2011.
- CAMPANELLI, A. P *et al.* 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**, v. 193, n. 9, p. 1313-1322, maio. 2006.
- CHAITANYA, Sundeep *et al.* Increased serum circulatory levels of interleukin 17F in type 1 reactions of leprosy. **J Clin Immunol**, v. 32, n. 6, p. 1415-1420, jul. 2012.
- CURY, Raíssa Maria Magri *et al.* Impacto da deficiência genética do receptor CCR4 na modulação da expressão de marcadores funcionais de células T regulatórias em modelo de hanseníase experimental em camundongos. *In: FÓRUM DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA*, 2018, Bauru. **Anais [...]**. Bauru: USC, 2018.
- FITNESS, J.; TOSH, K.; HILL, A.V. Genetics of susceptibility to leprosy. **Genes Immun**, v. 3, n. 8, p. 441-453, dez. 2002.

FONSECA, Adriana Barbosa de Lima *et al.* The influence of innate and adaptative immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy. **Infect Dis Poverty**, fev. 2017.

FOSS, N. T. Aspectos imunológicos da hanseníase. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 30, p. 335-339, jul./set. 1997.

GELUK, A.; Challenges in immunodiagnostic tests for leprosy. **Expert Opin Med Diagn**, v. 7, n. 3, p. 265-274, mar. 2013.

GOULART, I. M. B.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. **Rev Soc Bras Med Trop**. Uberaba, v. 35, n. 4, p. 365-375, jul./ago. 2002.

HIRAHARA, K *et al.* The majority of human peripheral blood CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ regulatory T cells bear functional skin-homing receptors. **J Immunol**, v. 177, n. 7, p. 4488-4494, out. 2006.

HORWITZ, D. A.; ZHENG, S. G.; GRAY, J. D. Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+)CD4(+) CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other. **Trends Immunol**, v. 29, n. 9, p. 429-435, set. 2008.

KHANOLKAR-YOUNG S *et al.* Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) synthesis is associated with the skin and peripheral nerve pathology of leprosy reversal reactions. **Clin Exp Immunol**, v. 99, n. 2, p. 196-202, fev. 1995.

KUMAR, Sudhir *et al.* FoxP3 provides competitive fitness to CD4⁺ CD25⁺ T cells in leprosy patients via transcriptional regulation. **Eur J Immunol**, v. 44, n. 2, p. 431-439, dez. 2014.

LASTÓRIA, J. C.; ABREU, M. A. M. M. Hanseníase: Diagnóstico e Tratamento. **Diagn Tratamento**. São Paulo, v. 17, n. 4, p. 173-179, 2012.

LEVY, L.; JI, B.; The mouse foot-pad technique for cultivation of *Mycobacterium leprae*. **Leprosy Rev**, v. 77, n. 1, p. 5-24, mar. 2006.

LITTLE D *et al.* 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**, v. 69, n. 5, p. 3413-3417, maio. 2001.

LOCKWOOD, D. N.; The management of erythema nodosum leprosum: current and future options. **Leprosy Rev**, v. 67, n. 4, p. 253-259, dez. 1996.

MASSONE, C *et al.* T regulatory cells and plasmacytoid dendritic cells in Hansen disease: a new insight into pathogenesis? **Am J Dermatopathol**, v. 32, n. 3, p. 251-256, maio. 2010.

MARTINIUK, Frank *et al.* Lessons of leprosy: the emergence of TH17 cytokines during type II reactions (ENL) is teaching us about T-cell plasticity. **J Drugs Dermatol**, v. 11, n. 5, p. 626-630, maio. 2012.

MENDONÇA, Vanessa Amaral de *et al.* Imunologia da hanseníase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. Rio de Janeiro, v. 83, n. 4, p. 343-350, jul./ago. 2008.

MIOSSEC, P.; KOLLS, J. K. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. **Nat Rev Drug Discov**, v. 11, n. 10, p. 763-776, out. 2012.

MISRA, N *et al.* 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**, v. 86, n. 1, p. 97-103, set. 1995.

MODLIN, Robert L *et al.* Genetically restricted suppressor T-cell clones derived from lepromatous leprosy lesions. **Nature**, v. 322, n. 6078, p. 459-461, jul. 1986.

MORAES, Milton O *et al.* Anti-inflammatory drugs block cytokine mRNA accumulation in the skin and improve the clinical condition of reactional leprosy patients. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 115, n. 6, p. 935-941, dez. 2000.

MORAES, Milton O *et al.* Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for Interferon-gamma and Interleukin-12 in reactions (RR and ENL). **Scand J Immunol**, v. 50, n. 5, p. 541-549, nov. 1999.

MORAES, Milton O. *et al.* Genetics of host response in leprosy. **Leprosy Review**, v. 77, n. 3, p. 189-202, set. 2006.

MOTTA, Ana Carolina F *et al.* The recurrence of leprosy reactional episodes could be associated with oral chronic infections and expression of serum IL-1, TNF- α , IL-6, IFN- γ and IL-10. **Braz Dent J**. Ribeirão Preto, v. 21, n. 2, p. 158-164, 2010.

MUTIS, Tuna *et al.* Definition of a human suppressor T-cell epitope. **Proc Nat Acad Sci USA**, v. 91, n. 20, p. 9456-9460, set. 1994.

OPROMOLLA, D. V. A. **Noções de hansenologia**. Bauru: Instituto Lauro de Souza Lima, 2000.

OTTENHOFF, Tom H. M. *et al.* Regulation of mycobacterial heat-shock protein-reactive T cells by HLA class II molecules: lessons from leprosy. **Immunol Rev**, v. 121, p. 171-191, jun. 1991.

PALERMO, Maria L *et al.* Increased expression of regulatory T cells and down-regulatory molecules in lepromatous leprosy. **Am J Trop Med Hyg**, v. 86, n. 5, p. 878-883, maio. 2012.

PINTO NETO, José Martins *et al.* Considerações epidemiológicas referentes ao controle dos comunicantes de hanseníase. **Hansenologia Internationalis**. Bauru, v. 27, n. 1, p. 23-28, 2002.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 34, n. 3, p. 255-273, jul./set. 1966.

SADHU, Soumi *et al.* Reciprocity between Regulatory T Cells and Th17 Cells: Relevance to Polarized Immunity in Leprosy. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n.1, e. 0004338, jan. 2016.

SAINI, Chaman *et al.* T helper cells in leprosy: An update. **Immunol Lett**, v. 184, p. 61-66, abr. 2017.

SAINI, C.; RAMESH, V.; NATH, I. CD4+ Th17 cells discriminate clinical types and constitute a third subset of non Th1, non Th2 T cells in human leprosy. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 7, e. 2338, jul. 2013.

SAMPAIO, S. A. P. *et al.* **Dermatologia: Hanseníase**. São Paulo: Artes Médicas, 1998.

SARNO, E. N *et al.* Serum levels of tumour necrosis factor- alpha and interleukin-1 beta during leprosy reactional states. **Clin Exp Immunol**, v.84, n. 1, p. 103-108, abr. 1991.

SCOLLARD, D. M.; TRUMAN, R. W.; EBENEZER, G. J. Mechanisms of nerve injury in leprosy. **Clin Dermatol**, v. 33, n. 1, p. 46-54, jan. /fev. 2015.

SCOLLARD, David M. *et al.* The continuing challenges of leprosy. **Clin Microbiol Rev**, v. 19, n. 2, p. 338-381, abr. 2006.

SHEVACH, E. M. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 6, p. 389-400, jun. 2002.

SIELING, P. A.; MODLIN, R. L. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. **Immunobiology**, v. 191, n. 4-5, p. 378-387, out. 1994.

STEFANI, Mariane M. A *et al.* In situ type 1 cytokine gene expression and mechanisms associated with early leprosy progression. **J Infect Dis**, v. 188, n. 7, p. 1024-1031, out. 2003.

STEPHEN, A. Bustin *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

TALHARI, S.; GARRIDO, R. **Medicina Tropical: Hanseníase**, 3.ed. Manaus: Gráfica Tropical, 1997.

TALHARI, S.; Neves, R. G. **Hanseníase, Dermatologia Tropical**. 3 ed. Rio de Janeiro: Medesi, 1997.

TROMBONE, Ana Paula Fávaro *et al.* Optimized protocols for mycobacterium leprae strain management: frozen stock preservation and maintenance in athymic nude mice. **J Vis Exp**, v. 23, n. 85, mar. 2014.

WAN, Y.Y.; FLAVELL, R. A. 'Yin-Yang' functions of transforming growth factor-beta and T regulatory cells in immune regulation. **Immunol Rev**, v. 220, p. 199-213, dez. 2007.

YAMAMURA, M *et al.* Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. **J Immunology**, v. 149, n. 4, p. 1470-1475, ago. 1992.