

## BANCO DE TESES - HANSENOLOGIA

**JOÃO RENATO REBELLO PINHO.** "EXPRESSÃO DO ANTÍGENO DE 18kDa DE *Mycobacterium leprae* NA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* E ESTUDO DAS PROPRIEDADES IMUNOGÊNICAS DO ANTÍGENO RECOMBINANTE". Tese de Doutorado. Orientadora: ANA CLARA GUERRINI SCHENBERG. INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Data: 14.11.95. Suporte financeiro: World Health Organization / Tropical Diseases Research Programme / World Bank, Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia, LIMHCFMUSP e CAPES.

### RESUMO

O agente etiológico da hanseníase, a bactéria *Mycobacterium leprae*, não pôde ser cultivada *in vitro* até o momento, o que constitui um obstáculo para a produção de antígenos purificados desta micobactéria. É, portanto, de grande relevância a clonagem dos genes de tais antígenos, para sua expressão em outros microrganismos, de crescimento e manuseio mais fáceis.

No âmbito de um projeto OMS/TDR, visando a produção de grandes quantidades de antígenos de *M. leprae*, desenvolvemos dois sistemas diferentes de expressão do antígeno de 18 kDa de *M. leprae* na levedura *S. cerevisiae* (p18), um intracelular e outro de secreção. Ambos os sistemas mostraram-se efetivos para a expressão, mas a purificação da p18 secretada mostrou-se mais simples. Comparando diferentes cepas hospedeiras e condições de cultivo, foi obtido um sistema de secreção de alto rendimento (mais de 100 mg/l de proteína biologicamente ativa).

A p18 foi purificada do meio de cultura da levedura por precipitação, seguida de cromatografias de troca jônica e por filtração em gel. As propriedades imunológicas da

proteína recombinante, nativa ou previamente irradiada com raios, foram analisadas em camundongos. Ambas as preparações desencadearam respostas do tipo humoral e celular (monitorizadas pela produção de anticorpos e pelo teste da hipersensibilidade tardia, respectivamente). Em adição, a irradiação prévia do antígeno potencializou sua imunogenicidade a nível celular. Estes resultados demonstram ser esta proteína forte candidata para utilização em testes cutâneos de última geração para a monitorização da resposta celular contra *M. leprae*.

### SUMMARY

*Mycobacterium leprae*, the aetiologic agent of leprosy, so far has not been grown *in vitro*, resulting in obstacles for the production of purified antigens from this bacterium. It is therefore of interest to clone the relevant *M. leprae* antigens in other easy-to-handle microbial hosts. In the context of a WHO/TDR project, we developed two different systems for expressing the *M. leprae* 18kDa antigen in *Saccharomyces cerevisiae*, intracellularly or secreted. Each system was shown to be effective in antigen expression, but the secretion system provided easier purification. Working with different host strains under different growth conditions, large quantities of biologically active protein were obtained (>100 mg/ml).

This protein was purified from the yeast culture media by precipitation, ion exchange chromatography and exclusion size chromatography. The biological properties of the recombinant protein, native or previously irradiated, were assayed by immunization of mice. Humoral and cellular responses (monitored by antibody production and delayed type hypersensitivity, respectively) were obtained either with the native or the irradiated protein. Furthermore, the previous

irradiation of this protein was shown to potentiate its immunogenicity at the cellular level. These data provide evidence that this recombinant antigen could be used in more specific skin-tests to monitor cellular response against *M. leprae*.

**OLIVEIRA, M.S.A.** Correlação entre a resposta imunocelular periférica e características imunohistoquímicas das lesões cutâneas nas formas polares da hanseníase. Tese (Doutorado). Data: 1986

### RESUMO

Conhecendo que a hanseníase é uma doença de evolução crônica e insidiosa, como também se caracteriza por apresentar duas formas polares distintas em seus aspectos clínicos, imunológicos e histológicos, e ainda, que o desenvolvimento destas formas está relacionado à característica imunológica do hospedeiro e à presença do *M. leprae* (parasita intracelular), desenvolveu-se este estudo com objetivos de avaliar a resposta imunocelular dos doentes nos dois pólos da doença.

Deve ser destacado que a defesa do hospedeiro a parasitas intracelulares resulta da interação entre as células apresentadoras de antígenos (macrófagos) e as células efectoras (linfócitos T). Esta interação é viabilizada pela ação de mediadores celulares (citocinas) produzidas por estas células.

Dependendo das características do parasita e das células de defesa do hospedeiro esta resposta poderá ser exacerbada (forma tuberculóide) ou deficiente (forma virchowiana).

Assim, foi avaliada a resposta imunocelular de doentes tuberculóides e virchowianos, através da quantificação de citocinas macrofágicas e linfocitárias, correlacionando a presença destas citocinas no soro e o aspecto imunohistoquímico de lesões cutâneas ("in vivo") com os valores obtidos no sobrenadante de culturas, com a finalidade de observar a potencialidade de resposta imunocelular de cada paciente, em um determinado momento.

Para verificar estas hipóteses foram realizadas as quantificações de citocinas séricas de 31 indivíduos: sendo 21 com hanseníase (11 virchowianos e 10 tuberculóides) e 10 indivíduos normais. Os doentes foram classificados segundo critérios clínicos, histológicos, índice baciloscópico e reação de Mitsuda. A maioria deles estava em tratamento (multidrogaterapia - OMS), num período que variava de 1 a 12 ciclos para os virchowianos e até 5 ciclos para os tuberculóides.

De cada paciente foram coletadas amostras de sangue venoso, para realização das dosagens séricas e culturas de células e biópsias de lesão cutânea para avaliação imuno-histoquímica.

Os soros foram conservados a  $-70^{\circ}\text{C}$ , para dosagens de citocinas (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$ ). Células mononucleares do sangue periférico foram separadas através do gradiente Ficoll-Hypaque e, após avaliação de viabilidade, cultivadas em placas contendo LPS (10  $\mu\text{g/ml}$ ) e LEP (2 x 10<sup>6</sup> bacilos/ml), durante 24 horas, à temperatura de 37  $^{\circ}\text{C}$ , em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Os sobrenadantes foram coletados e estocados a  $-70^{\circ}\text{C}$  para dosagem de IL-1, IL-6, e TNF- $\alpha$ . Paralelamente, realizou-se a linfoproliferação na presença de PHA (20  $\mu\text{g/ml}$ ), Con-A (10  $\mu\text{g/ml}$ ) e LEP (2 x 10<sup>6</sup> bacilos/ml) > durante 72 horas, nas condições já descritas. Coletaram-se os sobrenadantes que foram estocados a  $-70^{\circ}\text{C}$  para quantificação de IL-2 e IL-4.

As biópsias foram envolvidas em Tissue-Tek e armazenadas em nitrogênio líquido a  $-70^{\circ}\text{C}$ , para avaliação imunohistoquímica pelo método de Avidina-Biotina-Peroxidase (ABP).

Foi observado que no soro de doentes virchowianos a concentração de citocinas macrofágicas foi significativamente menor que nos tuberculóides (IL-1 P = 0,000 e Z = 3,510; IL/E P = 0,002 e Z = 3,067 e TNF- $\alpha$  P = 0,000 e Z = 3,736).

Em virchowianos encontraram-se níveis séricos de IL-4 elevados em relação aos soros de tuberculóides (P = 0,002 e Z = 3,139).

Os resultados obtidos dos sobrenadantes das culturas foram semelhantes aos do

soro, sendo observada menor produção de citocinas na presença de lepromina, tanto em tuberculóides quanto em virchowianos. Inclusive, células de virchowianos na presença de mitógenos são menos reativas que as de tuberculóides.

Nas lesões cutâneas de pacientes virchowianos observou-se alta positividade para marcadores relacionados à função supressora (TGF-B, CDB+), contrariamente, nas lesões de pacientes tuberculóides, encontrou-se pequena quantidade destes marcadores e quantidade expressiva de marcação para CD4+.

A análise destes resultados mostra que pacientes virchowianos apresentam depressão da capacidade de produção de citocinas relacionadas à resposta imunocelular, prejudicando a relação hospedeiro-parasita. Enquanto que em tuberculóides ocorre exacerbação destas respostas, levando-as ao aparecimento de alterações associadas a hiper-reatividade imunocelular. Estes dados correlacionam-se positivamente com as alterações "in vivo", que demonstram a depressão imunológica de virchowianos, frente ao *M. leprae* e sua incapacidade para formar o granuloma tecidual, limitando a infecção.

Portanto, foi observada correlação positiva entre os resultados do sangue periférico (soro e "in vitro") e das lesões cutâneas ("in vivo"), indicando que, na presença do bacilo (*M. leprae*), há predominância do padrão de resposta imunossupressora e que a redução da carga bacilar tende a melhorar a capacidade de resposta imunocelular.

### SUMMARY

Considering that the characteristic alterations of the polar forms in the spectral presentation of leprosy can be associated with

immunological alterations of this form of the disease, we developed this study evaluating the production of cytokines in peripheral levels (serum and cells cultures) and in the skin lesions of 21 leprosy patients (11 lepromatous leprosy and 10 tuberculoid leprosy) and 10 normal individuals (controls). The cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-4 and IL-6, from serum samples and cultures supernatant were measured by ELISA (R&D systems). The PMNBC cultures were developed separately, adherent PMNBC cultures in presence of LPS (10-g/ml) and lepromin ( $2 \times 10^7$  bac/ml) at 37°C/ 5% CO<sub>2</sub>/ 24 hs and lymphoproliferation test in the presence of PHA (20-g/ml), Con-A (10-g/ml) and lepromin ( $2 \times 10^7$  bac/ml), during 72 hsl 37°C/ 5% CO<sub>2</sub>.

The immunohistochemical study in skin biopsies were developed using the method Avidin-Biotin-Peroxidase (ABP), to detect the markers of CD68+, CDB+, CD4+ and the presence of TGF-B. The results showed elevated levels of IL-4 in the serum and cultures supernatant of lepromatous leprosy and IL-1, IL-2, IL-6 and TNF- $\alpha$  levels elevated in tuberculoid leprosy. In the biopsies high concentrations of TGF-BI and CDB+ cells were found in the inflammatory infiltrate of lepromatous leprosy, whereas in tuberculoid leprosy elevated number of CD4+ cells were determined associated with the TGF-BI absent. With these results it is possible to conclude that the immunosuppression of lepromatous leprosy were related with the presence of suppressor mediators and with the bacillary flux, and when the bacillary number can be reduced it might be expected improvement of immunological response in lepromatous leprosy.