

**MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE  
SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T REGULADORES (TREG)  
NA REAÇÃO TIPO 2 (ENL) DA HANSENÍASE**

**KATHERINE KELDA GOMES DE CASTRO**

**Rio de Janeiro  
Março de 2018**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

*KATHERINE KELDA GOMES DE CASTRO*

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE SUBPOPULAÇÕES  
DE LINFÓCITOS T REGULADORES (TREG) NA REAÇÃO TIPO 2 (ENL)  
DA HANSENÍASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz como  
parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em  
Ciências

**Orientador (as):** Prof. Dra. Euzenir Nunes Sarno  
Prof. Dra. Danuza Esquenazi

**RIO DE JANEIRO**  
Março de 2018

Castro, Katherine Kelda Gomes de.

Caracterização fenotípica e funcional de subpopulações de linfócitos T reguladores (Treg) Na reação tipo 2 (ENL) da hanseníase / Katherine Kelda Gomes de Castro. - Rio de Janeiro, 2018.

93 f.

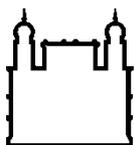
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2018.

Orientadora: Dra. Euzenir Nunes Sarno.

Co-orientadora: Dra. Danuza Esquenazi.

Bibliografia: f. 65-76

1. Linfócito T regulador. 2. Eritema Nodoso Leproso. 3. Hanseníase . I.  
Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***AUTOR: KATHERINE KELDA GOMES DE CASTRO***

### **CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T REGULADORES (TREG) NA REAÇÃO TIPO 2 (ENL) DA HANSENÍASE**

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dra. Euzenir Nunes Sarno  
Prof. Dra. Danuza Esquenazi**

**Aprovada em: 27 de Março de 2018.**

#### **EXAMINADORES:**

**Profa. Dra. Carmem Beatriz Wagner Giacoia Gripp – Presidente e Titular**  
Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular / IOC - FIOCRUZ

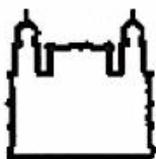
**Profa. Dra. Lucimar Gonçalves Milagres - Titular**  
Departamento de Microbiologia – Faculdade de Ciências Médicas / UERJ

**Prof. Dr. Álvaro Luiz Bertho – Titular**  
Laboratório de Imunoparasitologia / IOC - FIOCRUZ

**Prof. Dr. Flávio Alves Lara – Suplente**  
Laboratório de Microbiologia Celular / IOC - FIOCRUZ

**Profa. Dra. Renata Meirelles Pereira – Suplente**  
Instituto de Microbiologia Paulo de Góes / UFRJ

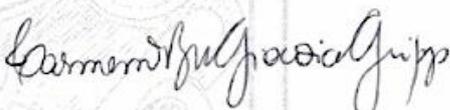
Rio de Janeiro, 27 de março de 2018



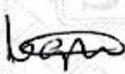
Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado em Biologia Parasitária de **Katherine Kelda Gomes de Castro**, sob orientação da Dr<sup>a</sup> Euzenir Nunes Sarno e coorientada pela Dr<sup>a</sup>. Danuza de Almeida Esquenazi. Ao vigésimo sétimo dia do mês de março de dois mil e dezoito, realizou-se às quatorze horas, na Sala 14B do Pavilhão Hélio & Peggy Pereira, o exame da dissertação de mestrado intitulada: **“CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T REGULADORES (TREG) NA REAÇÃO TIPO 2 (ENL) DA HANSENÍASE”**. No programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Imunologia e Patogenia, na linha de pesquisa: Imunologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr<sup>a</sup>. Carmem Beatriz Wagner Giacoia Gripp - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Álvaro Luiz Bertho dos Santos - IOC/FIOCRUZ, Dr<sup>a</sup>. Lucimar Gonçalves Milagres - UERJ/RJ e como suplentes: Dr. Flavio Alves Lara – IOC/FIOCRUZ e Dr<sup>a</sup>. Renata Meirelles Pereira – UFRJ/RJ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela Aprovação da defesa da dissertação de mestrado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Coordenador do Programa, Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 27 de março de 2018.

Dr<sup>a</sup>. Carmem Beatriz Wagner Giacoia Gripp (Presidente da Banca): 

Dr. Álvaro Luiz Bertho dos Santos (Membro da Banca): 

Dr<sup>a</sup>. Lucimar Gonçalves Milagres (Membro da Banca): 

Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa): 

Aos meus pais e minha irmã Laura por todo apoio, dedicação e carinho

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus por toda força e amor.

Ao meu pai Robson por todo amor, dedicação, conselhos e brincadeiras. Obrigada pela sua constante disposição e ajuda quando mais precisei. Você é a minha constante inspiração em ter foco e correr atrás dos meus sonhos.

À minha mãe Marileide por todo apoio, amor, conselhos, conversas, encorajamento. Obrigada a me ensinar a ver sempre o lado positivo das coisas, nada é tão ruim como aparenta ser. Finalmente agradeço por toda fé que tem depositada em mim e no meu futuro. Esse sentimento me faz ter mais confiança e ir para a frente sem ter medo de nada.

À minha irmã Laura pelas risadas, por ser a minha melhor amiga e maior confidente do mundo. Obrigada por sempre ser minha companheira durante as análises da madrugada, por me ouvir e me ajudar a sorrir quando tudo está um caos. Tenho certeza que você ainda vai muito longe na vida!!

Sem a minha família não teria chegado onde estou, vocês me deixaram mais forte e confiante. Obrigada por tudo sempre, amo vocês demais!

A meu namorado Eric por todo amor, companheirismo, pela força nos momentos que mais precisei.

À Dra. Danuza por ter me recebido de braços abertos no laboratório, por todos ensinamentos, influência no meu amadurecimento científico, pela confiança depositada em mim para conduzir o projeto e por sua amizade.

À Dra. Euzenir por toda a sua experiência, visão dos resultados, apoio técnico-científico, por todos os conselhos e conversas.

Ao Ambulatório Sousa Araújo, em especial ao Dr. José Augusto Nery, sem o seu empenho, dedicação e amizade esse trabalho não seria possível.

À Dra. Íris Alvim Peixoto muito obrigada por sua amizade, ajuda nos experimentos e análises.

Às plataformas de Citometria de Fluxo: Núcleo de Purificação Celular e Subunidade RPT08A da Rede de Plataformas Tecnológicas Fiocruz PDTIS pelo apoio técnico. Às operadoras Íris Alvim, Thaize Quiroga e a Mariana Gandini por toda ajuda, compreensão e flexibilidade nos momentos cruciais do projeto.

Aos amigos que construí no laboratório: Luciana Nahar, Pedro Henrique Lopes, Júlia Leal, Mylena Masseno, Dilzamar Veloso e a Jéssica Pinheiro. Obrigada por toda ajuda científica, metodológica, pelas conversas, conselhos e risadas. Vocês tornaram os meus dias mais leves.

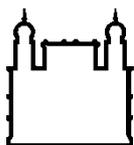
A todos os participantes da escala de processamento celular do Laboratório de Hanseníase em especial a Dra. Verônica Schmitz, Camila, Jessica, Fabiana, Otto e Natasha.

A todos os pacientes e voluntários sadios que aceitaram participar do estudo.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite.

À pós-graduação em Biologia Parasitária.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo financiamento.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

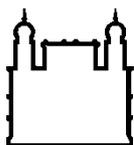
### CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T REGULADORES (TREG) NA REAÇÃO TIPO 2 (ENL) DA HANSENÍASE

#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

**Katherine Kelda Gomes de Castro**

O Eritema Nodoso Leproso (ENL) é uma manifestação aguda e sistêmica, que ocorre de forma súbita, podendo ser grave e levar pacientes de hanseníase ao óbito. O episódio reacional é observado em cerca da metade dos pacientes multibacilares (MB), principalmente na forma lepromatosa polar (LL) e sua gênese pode ocorrer em qualquer momento do tratamento poliquimioterápico, inclusive antecedendo o mesmo. Incapacidades físicas associadas ao ENL são fonte de extremo sofrimento e retirada do mercado de trabalho de grande parte dos pacientes. No ENL ocorre progressão da resposta imune celular para um cenário reativo e ainda pouco compreendido. Assim, esse trabalho se propôs a caracterizar fenotípica e funcionalmente os linfócitos Treg CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> periféricos, tanto *ex vivo*, quanto em resposta ao *M. leprae* (ML), de 12 pacientes com ENL, cujos dados foram comparados com 8 pacientes LL e 10 voluntários sadios (VS) de área endêmica para a hanseníase, todos moradores do Rio de Janeiro. A frequência dessas células e sua atividade funcional foram avaliadas através da análise *ex vivo* da expressão de CTLA-4 e da determinação da frequência *in vitro* de células produtoras de TGF- $\beta$  e IL-10, por citometria de fluxo multiparamétrica. Ademais, a produção de citocinas em sobrenadante (SN) de culturas de células mononucleares periféricas (PBMC) frente ao ML, através de ensaio imunoenzimático (ELISA). Uma redução significativa das células Treg CD4<sup>+</sup> *ex vivo* foi observada nos pacientes com ENL ( $p < 0,001$ ), além do envolvimento restrito de CTLA-4 em suprimir resposta ao ML em todos os grupos. A análise *in vitro* também demonstrou a redução significativa ( $p < 0,0001$ ) das Treg CD4<sup>+</sup> no grupo ENL, com inalteração de suas frequências mesmo após estímulo com ML. A avaliação da atividade funcional *in vitro* revelou que as Treg CD4<sup>+</sup> produtoras de TGF- $\beta$  estão significativamente reduzidas nos pacientes com ENL em relação ao grupo LL ( $p < 0,05$ ), enquanto as Treg CD4<sup>+</sup>/IL-10<sup>+</sup> não diferiram entre os grupos. De acordo com o estudo, as Treg CD8<sup>+</sup> não estão envolvidas na gênese do ENL. Por fim, o grupo ENL apresentou níveis significativamente aumentados na produção de IL-6 por PBMC em comparação aos outros grupos, tanto em culturas não estimuladas (NE), quanto em resposta ao ML ( $p < 0,05$ ). O trabalho revelou ainda níveis mais elevados de produção de IL-17, IL-23 e IFN- $\gamma$  em PBMC no grupo ENL em comparação ao outro grupo LL, embora sem significância. Os dados obtidos sugerem uma mudança transitória na regulação da resposta imune mantida por células Treg CD4<sup>+</sup> no ENL, como observado na forma LL, tornando o microambiente permissivo para a instalação do processo reacional.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### PHENOTYPICAL AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF REGULATORY T CELL (TREG) SUBPOPULATIONS IN THE TYPE 2 REACTION (ENL) OF LEPROSY

#### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

**Katherine Kelda Gomes de Castro**

Erythema Nodosum Leprosum (ENL) is an acute and systemic manifestation, which occurs suddenly, can be severe and lead leprosy patients to death. Reactional episodes are observed among the half of multibacillary (MB) patients, mainly into the polar lepromatous (LL) form, beginning at any time of the multidrug therapy, and even before the treatment. Physical disabilities associated to ENL are the source of extreme suffering and absence from work in most of cases. ENL occurs in progression of the cellular immune response associated with a reactive and still poorly understood scenario. Thus, this work aimed to characterize phenotypic and functionally Treg cells CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>, *ex vivo* and in response to *M. leprae* (ML), from 12 ENL patients, which were compared to 8 LL and 10 healthy volunteers (VS) from leprosy endemic areas, all residents in the city of Rio de Janeiro. The functional activity and frequencies of these cells were evaluated by *ex vivo* analysis of CTLA-4 expression and the *in vitro* frequency of TGF- $\beta$  and IL-10 producing cells, through multiparametric flow cytometry. In addition, the production of cytokines in supernatant (SN) from peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cultures was investigated against ML antigens by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Ex vivo* significant reduction of Treg CD4<sup>+</sup> frequency was observed to ENL patients ( $p < 0,001$ ), and low implication of CTLA-4 in suppressing response was noted in all groups. *In vitro* analysis also demonstrated decrease of Treg CD4<sup>+</sup> in the ENL group ( $p < 0,0001$ ), without change of the frequencies, even after stimulation with ML. *In vitro* functional activity evaluation revealed that the frequency of Treg CD4<sup>+</sup> producing TGF- $\beta$  were significantly reduced among ENL patients compared to LL ( $p < 0,05$ ) and Treg CD4<sup>+</sup>/ IL-10<sup>+</sup> did not differ significantly between groups. According to the study, Treg CD8<sup>+</sup> are not implicated in the genesis of ENL. Finally, the ENL group had significant increased IL-6 levels production by PBMC compared to other groups, in non-stimulated (NE) cultures and in response to ML ( $p < 0,05$ ). The study also showed increase levels of IFN- $\gamma$ , IL-17 and IL-23 in PBMC from ENL group in comparison to LL, although not significant. These data suggest a transient change in the regulation of the immune response maintained by Treg CD4<sup>+</sup> in ENL, making the microenvironment permissive for the installation of the reactional process.

# ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. Características gerais.....	1
1.2. Histórico .....	1
1.3. Epidemiologia .....	4
1.4. <i>Mycobacterium leprae</i> .....	6
1.5. Transmissão.....	8
1.6. Diagnóstico .....	9
1.7. Formas clinicas.....	12
1.8. Tratamento .....	14
1.9. Episódios reacionais .....	15
1.9.1. Reação tipo 1 ou Reação Reversa (RR).....	15
1.9.2. Reação tipo 2 ou Eritema Nodoso Leproso (ENL).....	16
1.10. Genética da hanseníase .....	17
1.11. Bases da resposta imune inata na hanseníase.....	19
1.12. Bases da resposta imune adaptativa na hanseníase.....	20
1.12.1. Linfócito T regulador .....	22
1.12.2. Linfócitos Treg na hanseníase .....	25
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>26</b>
<b>3. OBJETIVO .....</b>	<b>28</b>
3.1. Objetivo geral .....	28
3.2. Objetivos específicos:.....	28
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
4.1. População de estudo e Considerações éticas .....	29
4.2. Obtenção de células mononucleares de sangue periférico.....	29
4.3. Cultura de PBMCs.....	30
4.4. Citometria de fluxo multiparamétrica.....	31
4.5. Estratégia de análise em citometria de fluxo multiparamétrica.....	33
4.7. Análise estatística.....	36

<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
5.1. Características clínicas e demográficas dos voluntários estudados...	37
5.2. Determinação <i>ex vivo</i> das subpopulações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup>	39
5.4. Determinação <i>ex vivo</i> de subpopulações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> /CTLA-4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> /CTLA-4 <sup>+</sup> .....	43
5.5. Determinação <i>in vitro</i> das subpopulações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> em resposta ao <i>M. leprae</i> .....	44
5.6. Determinação <i>in vitro</i> das subpopulações de linfócitos Treg CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> em resposta ao <i>M. leprae</i> .....	46
5.7. Frequência <i>in vitro</i> de subpopulações de linfócitos T reguladores CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> produtores de IL-10 e TGF- $\beta$ , em resposta ao <i>M. leprae</i> . ....	48
5.8. Avaliação do ensaio imunoenzimático em sobrenadantes de cultura de PBMCs em resposta ao <i>M. leprae</i> .....	52
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>64</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>65</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Origem da Hanseníase e sua dispersão através das migrações humanas.	2
<b>Figura 2:</b> Distribuição geográfica dos casos de hanseníase no ano de 2016. ....	4
<b>Figura 3:</b> Hanseníase - Coeficiente de detecção no Brasil em 2015.....	5
<b>Figura 4:</b> <i>Mycobacterium leprae</i> .....	7
<b>Figura 5:</b> Lesões de pele comuns nos pacientes polares da hanseníase.. ....	10
<b>Figura 6:</b> Exame de baciloscopia evidenciando o <i>M. leprae</i> em diferentes formas. .	10
<b>Figura 7:</b> Análise histopatológica de fragmento de pele de pacientes com a hanseníase paucibacilar e multibacilar.....	11
<b>Figura 8:</b> Classificação da hanseníase com base no critério estabelecido por Ridley e Jopling e Ministério da Saúde do Brasil. ....	13
<b>Figura 9:</b> Ilustração da atuação do sistema imune de acordo com os polos da hanseníase.....	22
<b>Figura 10:</b> Estratégia de análise citofluorimétrica para fenotipagem e avaliação funcional dos linfócitos T CD4 <sup>+</sup> , T CD8 <sup>+</sup> e Treg.....	35
<b>Figura 11:</b> Distribuição <i>ex vivo</i> da frequência de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> totais, e da razão de linfócitos T CD4 e CD8 (CD4/CD8). ....	40
<b>Figura 12:</b> Distribuição <i>ex vivo</i> das frequências de linfócitos Treg CD4 <sup>+</sup> , Treg CD8 <sup>+</sup> totais, e da razão TregCD4/CD8. ....	42
<b>Figura 13:</b> Distribuição <i>ex vivo</i> das frequências de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> CTLA-4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> CTLA-4 <sup>+</sup> .....	43
<b>Figura 14:</b> Avaliação da frequência de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> sanguíneos <i>in vitro</i> . ....	45
<b>Figura 15:</b> Avaliação da frequência de linfócitos Treg CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> sanguíneos <i>in vitro</i> .. ....	48
<b>Figura 16:</b> Determinação da frequência de linfócitos Treg CD4 <sup>+</sup> (A) e CD8 <sup>+</sup> (B) produtores de TGF-β.....	49
<b>Figura 17:</b> Determinação da frequência de linfócitos Treg CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> produtores de IL-10. ....	51

**Figura 18:** Produção de citocinas por PBMC, após culturas de 72h frente ao *M. leprae*..  
.....55

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Esquema terapêutico da poliquimioterapia conforme a forma clínica do paciente e a idade. ....	14
<b>Tabela 2:</b> Características fenotípicas de linfócitos T reguladores.....	24
<b>Tabela 3:</b> Anticorpos monoclonais específicos contra moléculas de superfície ou intracelulares e respectivos controles de isotipos utilizados em citometria de fluxo multiparamétrica.....	32
<b>Tabela 4:</b> Caracterização clínica e sociodemográfica dos participantes do estudo. .	38

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

aC – Antes de Cristo

APC – do inglês, Antigen-Presenting Cell (Célula Apresentadora de Antígeno)

ASA - Ambulatório Sousa Araújo

BB – forma clínica Borderline Borderline

BL – forma clínica Borderline Lepromatosa

BT – forma clínica Borderline Tuberculóide

CD – do inglês, Cluster of Differentiation (Cluster de diferenciação)

CTLA-4 – do inglês, Cytotoxic T lymphocyte Antigen-4 (Antígeno 4 de Linfócito T Citotóxico)

dC – Depois de Cristo

DC – do inglês, Dendritic Cell (Célula Dendrítica)

DDS – 4,4'- Diamino-Difenil-Sulfona

DNA – do inglês, Deoxyribonucleic acid (Ácido Desoxirribonucleico)

EDTA – do inglês, Ethylenediaminetetraacetic Acid (Ácido Etilenodiaminotetracético)

ELISA – do inglês, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)

ENL – Episódio reacional Eritema Nodoso Leproso

Foxp3 – do inglês, Forkhead Box P3

FSC – do inglês, Forward Scatter (Espalhamento Frontal)

GI – Grau de Incapacidade

GM-CSF – do inglês, Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (Fator Estimulador de Colônia de Macrófagos e Granulócitos)

H&E – Hematoxilina-eosina

HLA – do inglês, Human Leukocyte Antigen (Antígeno Leucocitário Humano)

HLA-DR – do inglês, Human Leukocyte Antigen Class II, DR Allele (Antígeno Leucocitário Humano de Classe II, Alelo DR)

IB – Índice Baciloscópico

IC: Intervalo de Confiança

IDO – do inglês, Indoleamine 2,3-Dioxygenase (Indoleamina 2,3-Dioxygenase)

IFN – Interferon

*IFNG* – do inglês, Interferon Gamma (Interferon Gama)

IL - Interleucina

iNOS – do inglês, Inducible Nitric Oxide Synthase (Óxido Nítrico Sintase Induzível)

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

LAHAN - Laboratório de Hanseníase (IOC/FIOCRUZ)

LL – forma clínica polar Lepromatosa Lepromatosa

M-CSF – do inglês, Macrophage Colony-Stimulating Factor (Fator Estimulador de Colônia de Macrófago)

MB – forma Clínica Multibacilar

MDR – do inglês, Multidrug-Resistant (Multi-Droga Resistente)

MHC – do inglês, Major Histocompatibility Complex (Complexo Principal de Histocompatibilidade)

ML – *Mycobacterium leprae*

MRC1 – do inglês, Mannose Receptor C- Type 1 (Receptor de Manose 1)

mRNA – do inglês, Messenger Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucléico Mensageiro)

MS – Ministério da Saúde do Brasil

NE – Não estimulado

NF- $\kappa$ B – do inglês, Nuclear Factor NF- $\kappa$ B (Fator Nuclear  $\kappa$ B)

NLR – do inglês, nucleotide-binding oligomerization domain-like *receptors* (proteína semelhante as proteínas domínio de ligação à nucleotídeos e oligomerização)

NOD – do inglês, Nucleotide-Binding Oligomerization Domain (proteínas com domínio de ligação à nucleotídeos e oligomerização)

OMS – Organização Mundial da Saúde

*PARK2* – do inglês, Parkin 2 (Paquina 2)

*PARKG* – do inglês Parquin Regulation Gene (Gene Regulador de Parquina)

PB – forma clínica polar Paucibacilar

PBMC – do inglês, Peripheral Blood Mononuclear Cell (Células Mononucleares de Sangue Periférico)

PBS – do inglês, Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato-Salino)

PCR – do inglês, Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

PD-1 – do inglês, Programmed Death-1 (Receptor De Morte Programada 1)

PDIM – do inglês, Phthiocerol Dimycocerosate (Ftiocerol dimicocerosato)

PGL1 – do inglês, Phenolic Glycolipid 1 (Glicolípido fenólico 1)

PHA – do inglês, Phytohemagglutinin (Fitohemaglutinina)

PQT – Poliquimioterapia

RR – episódio reacional Reação Reversa

SFB – Soro Fetal Bovino  
SN – Sobrenadante  
SNP – do inglês, Single Nucleotide Polymorphisms (Polimorfismo de base única)  
SPF – do inglês, Specific Pathogen Free (Livre de patógenos específicos)  
SSC – do inglês, Side Scatter (Espalhamento Lateral)  
STAT – do inglês, Signal Transducer and Activator of Transcription (Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição)  
TA – Temperatura ambiente  
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
TCR – do inglês, T-Cell Receptor (Receptor de Célula T)  
TGF- $\beta$  – do inglês, Transforming Growth Factor Beta (Fator de Transformação do Crescimento Beta)  
TLR – do inglês, Toll-Like Receptor (Receptor do Tipo Toll)  
TLR1 – do inglês, Toll-Like Receptor 1 (Receptor do Tipo Toll 1)  
TNF – do inglês, Tumor Necrosis Factor (Fator de Necrose Tumoral)  
Treg – Linfócito T regulador  
TT – forma clínica Tuberculóide Tuberculóide  
VDR – do inglês, Vitamin D receptor (Receptor de Vitamina D)

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Características gerais

A hanseníase é uma doença infecciosa de curso crônico, que afeta principalmente os nervos periféricos e a pele. Seu agente etiológico, o *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), infecta preferencialmente macrófagos, células de Schwann e o endotélio vascular (Gallo et al., 2013). A infecção pelo *M. leprae* leva a danos neurológicos que resultam em acometimento sistêmico e no aparecimento de lesões de pele com diminuição de sensibilidade (Scollard et al., 2006). Também é considerada uma doença incapacitante, uma vez que o dano neural causado pode ser irreversível em muitos casos (Scollard et al., 2006). De modo geral, a história natural da hanseníase inicia-se após a infecção pelo *M. leprae* de células da mucosa das vias aéreas superiores, quando indivíduos geneticamente suscetíveis, adquirem a doença e, de acordo com a resposta imune ao patógeno, desenvolvem diferentes formas clínicas, sendo agrupados em pauci- (PB) ou multibacilares (MB) (Gallo et al., 2013).

## 1.2. Histórico

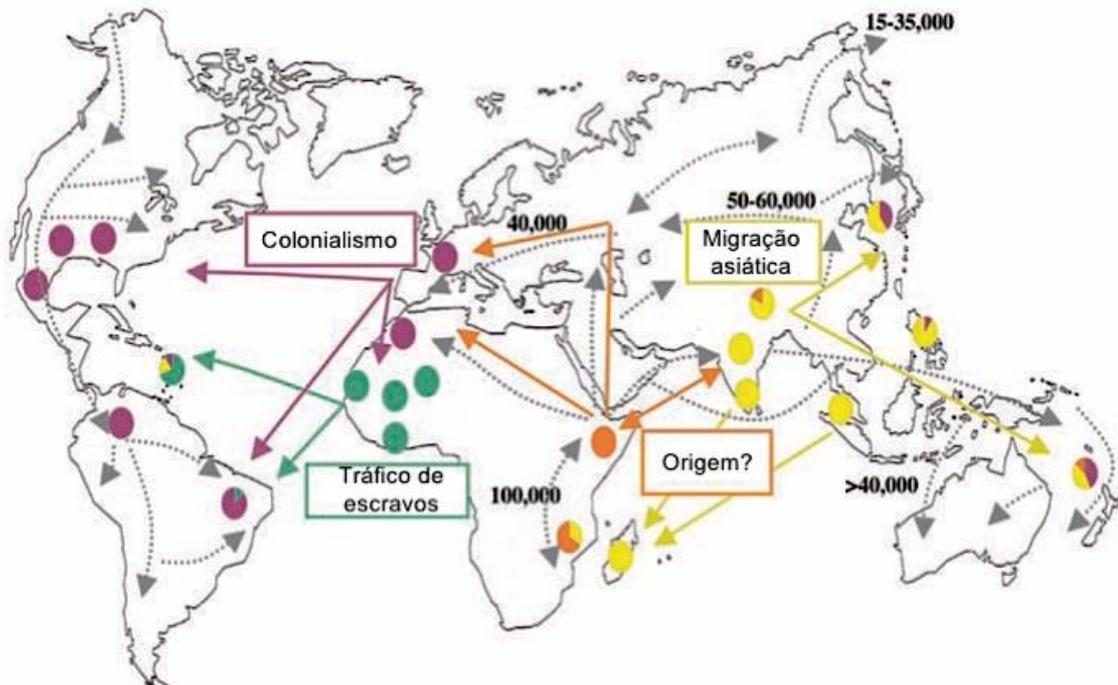
A doença acompanha a humanidade desde os tempos bíblicos, e, na antiguidade, como a aparência era considerada um reflexo do espírito, as deformidades decorrentes da hanseníase já levantavam diversos questionamentos sobre a origem da doença, admitindo-a como uma punição ou maldição lançada pelos Deuses (Pinto, 1995). No velho testamento, o termo genérico “tsara'ath” em hebraico, caracterizava lepra, eczema, psoríase e outras enfermidades como se fossem uma mesma doença, e, de modo geral, provocava estigma e exclusão dos indivíduos acometidos da sociedade (Browne, 1975).

Apenas por volta do século 300 aC na Grécia, Straton, um discípulo do médico Erasistratos, foi o primeiro a descrever a hanseníase de baixa resistência, que foi denominada elefantíase *graecorum*. Esse termo em latim foi empregado para que houvesse a diferenciação da elefantíase clássica, causada pela *Wuchereria bancrofti* (Couto et al., 2017).

Mesmo após o reconhecimento da hanseníase por Straton, a doença ainda era confundida com outras enfermidades dermatológicas descamativas, principalmente com a psoríase. Assim, a verdadeira lepra só foi reconhecida por médicos

extremamente especializados na Alexandria, ao passo que em 94 dC, Areaeus fez uma descrição precisa com os sinais e sintomas da doença (Browne, 1975).

Através de estudos de genômica comparativa foi possível observar que a hanseníase se originou na África Oriental ou próximo ao Oriente Médio, e foi disseminada através das diversas migrações humanas para outros continentes, como pode ser observado na Figura 1 (Monot et al., 2005). Na Europa, acredita-se que a hanseníase foi inicialmente introduzida na Itália em 62 aC, pelos soldados de Pompeu. Mais tarde, com as cruzadas, a doença se espalhou amplamente no continente pelo deslocamento das tropas romanas (Trautman, 1984). Através da continuidade de estudos moleculares cada vez mais robustos, também foi possível a identificação de 4 cepas do *M. leprae* predominantes nas regiões onde o patógeno é encontrado (Monot et al., 2005). A rota de disseminação da doença foi feita com base no achado de variantes muito raras no genoma do bacilo, as quais se mostraram específicas de determinadas regiões (Monot et al., 2005; Monot et al., 2009). Mais recentemente, outras comparações genômicas mostraram que não existem diferenças importantes entre isolados do *M. leprae*, especialmente entre cepas antigas e modernas, indicando que a variabilidade do bacilo é muito baixa (Schuenemann et al., 2013).



**Figura 1: Origem da Hanseníase e sua dispersão através das migrações humanas.**  
Adaptado de Monot et al, 2005.

Nos últimos 500 anos os europeus e norte-africanos levaram a hanseníase para as Américas (Figura 1). No Brasil a doença foi introduzida pelos colonizadores portugueses e disseminada pelos escravos, inicialmente no Rio de Janeiro, Salvador e Recife, entre o final do século XVI e início do XVII (Cunha et al., 2015). O primeiro caso notificado de hanseníase no Rio de Janeiro ocorreu no final do século XVII. Já no século XVIII, o número de doentes aumentou de forma alarmante, com mais de 200 casos confirmados. Dessa forma, em 1741, com o objetivo de reduzir a disseminação da infecção, Antonio Gomes Freire de Andrade, o Conde de Bobadela, confinou 52 pacientes em pequenas barracas na praia, no bairro de São Cristóvão, caracterizando o primeiro leprosário da cidade. Após o falecimento do Conde os pacientes foram transferidos para uma sala em um mosteiro jesuíta ainda em São Cristóvão, que posteriormente se transformou em um hospital (Avelleira et al., 2014).

No território brasileiro, já na década de 1920, a política segregacionista aos pacientes com hanseníase continuava, com a instauração pelo Departamento de Saúde Pública de uma medida de isolamento obrigatório desses indivíduos. Em 1935 a política de atuação para o controle da hanseníase, se baseava em três pilares básicos: leprosários, dispensários e preventórios. Os leprosários albergavam pessoas infectadas, os dispensários tratavam indivíduos que possuíam contato com doentes, e por fim, os preventórios mantinham os filhos de pais com a hanseníase. Esse plano instalou grande sofrimento emocional nos doentes e nas famílias (Maciel & Ferreira, 2014). A partir dessa ação diversos hospitais foram criados longe dos centros urbanos, para manter o distanciamento dos pacientes em relação à sociedade (Avelleira et al., 2014).

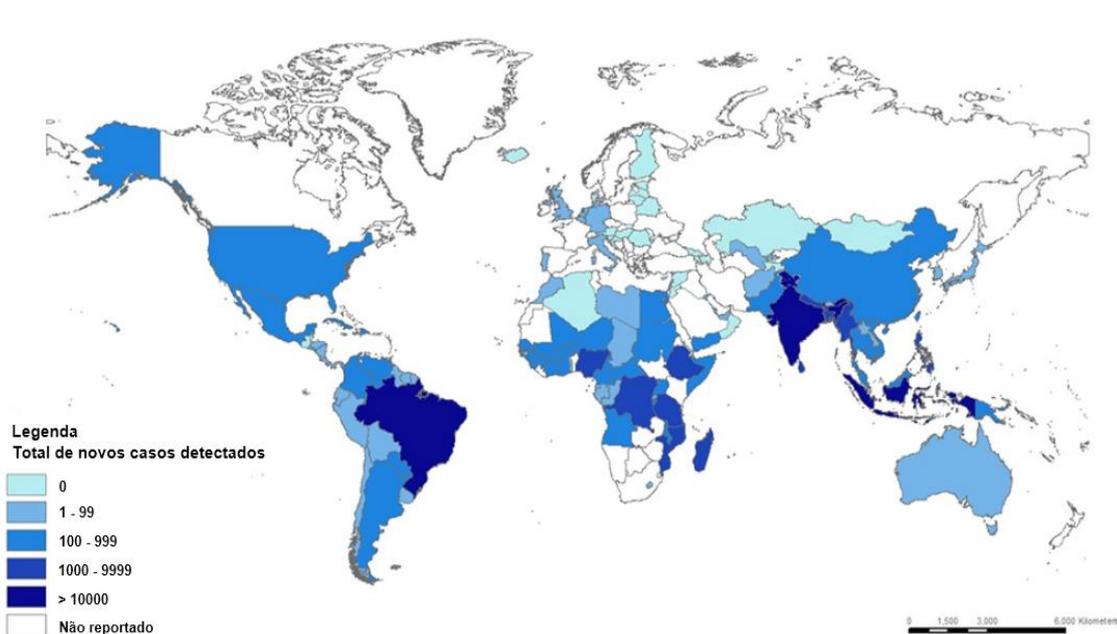
Durante as primeiras quatro décadas do século XX o tratamento contra a hanseníase era realizado por meio de injeção intravenosa do óleo da noz Chaulmoogra (*Hydnocarpus wightiana*; Santos et al., 2008). Em 1943 o óleo foi substituído pela dapsona (Diamino Difenil Sulfona ou DDS) e, posteriormente, a combinação de DDS com Rifampicina levou ao fim da hospitalização obrigatória dos pacientes, fato ocorrido em 1962. Outro salto fundamental no tratamento dos doentes foi o estabelecimento da poliquimioterapia (PQT) em 1984, permitindo assim o acompanhamento ambulatorial para os indivíduos infectados (Avelleira et al., 2014).

Apenas no final de 1980 ocorreu o fim da internação obrigatória dos pacientes com hanseníase no Brasil (Avelleira et al., 2014). A partir desse marco, outras conquistas foram alcançadas, como a publicação da Lei nº 9.010, em 29 de março de

1995, que substituiu o termo lepra por hanseníase, importante para amenizar o estigma histórico dessa doença e associar ao novo termo um prognóstico favorável de tratamento e cura (Brasil, 1995). E através da Lei 11.520/2007, foi garantida a inserção social dos pacientes que viveram nos hospitais-colônia, devido à política de internações compulsórias, por meio do pagamento de pensão especial aos pacientes ou herdeiros diretos destes cidadãos (Brasil, 2007).

### 1.3. Epidemiologia

A Organização Mundial da Saúde (OMS) realiza anualmente um levantamento do número de casos da hanseníase em grande parte do mundo. Segundo o órgão, em 2016 a doença ainda afetava 143 países com 171.948 casos em tratamento (WHO, 2017). Durante esse mesmo período foram registrados e notificados cerca de 214.789 novos doentes, contabilizando uma prevalência de 2,9 casos a cada 100.000 habitantes no mundo. A distribuição dos novos casos em 2016 foi bastante heterogênea, mas como mostrado na Figura 2, o Brasil, a Índia e a Indonésia continuaram sendo os países com o maior número de ocorrências notificadas (WHO, 2017).



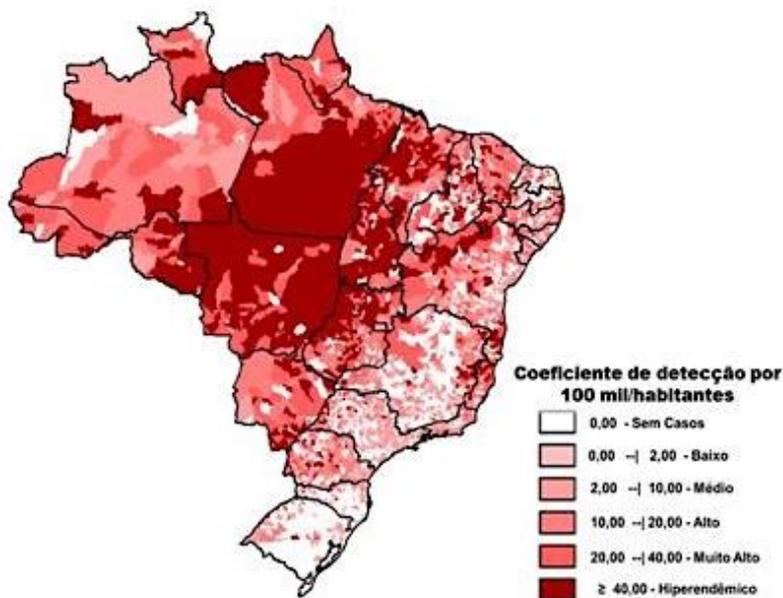
**Figura 2: Distribuição geográfica dos casos de hanseníase no ano de 2016.**

Fonte: WHO, 2016.

É importante ressaltar que 6% dos diagnósticos da doença realizados em 2016 foram feitos em crianças abaixo de 15 anos. Além disso, vários pacientes já

apresentavam grau elevado de incapacidade e até deformidades físicas no momento do diagnóstico. Juntos, esses dois últimos dados indicam que o diagnóstico da hanseníase ainda é feito tardiamente, o que facilita a ocorrência de incapacidades e dificulta sua eliminação (WHO, 2017).

No Brasil, o cenário não é diferente de outros países endêmicos e, dos 25.218 casos da doença registrados em 2016, 54% eram homens, 70% apresentavam as formas MB e 7% dos pacientes apresentavam diferentes graus de incapacidades decorrentes da hanseníase (WHO, 2017). Além disso, cerca de 5% dos diagnósticos realizados no país foram de crianças (WHO, 2017). Em 2015, o coeficiente de detecção ou incidência da hanseníase em nosso país foi de 17,6 casos/100.000 habitantes, de acordo com a distribuição geográfica da doença (MS, 2016). Como pode ser visto no mapa da Figura 3, a hanseníase possui distribuição heterogênea no Brasil. Enquanto alguns estados já atingiram a meta de baixa endemicidade e até a eliminação, como é o caso do Rio Grande do Sul, outros apresentam hiper endemicidade, especialmente aqueles das regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste (Figura 3; MS, 2016).



**Figura 3: Hanseníase - Coeficiente de detecção no Brasil em 2015.**

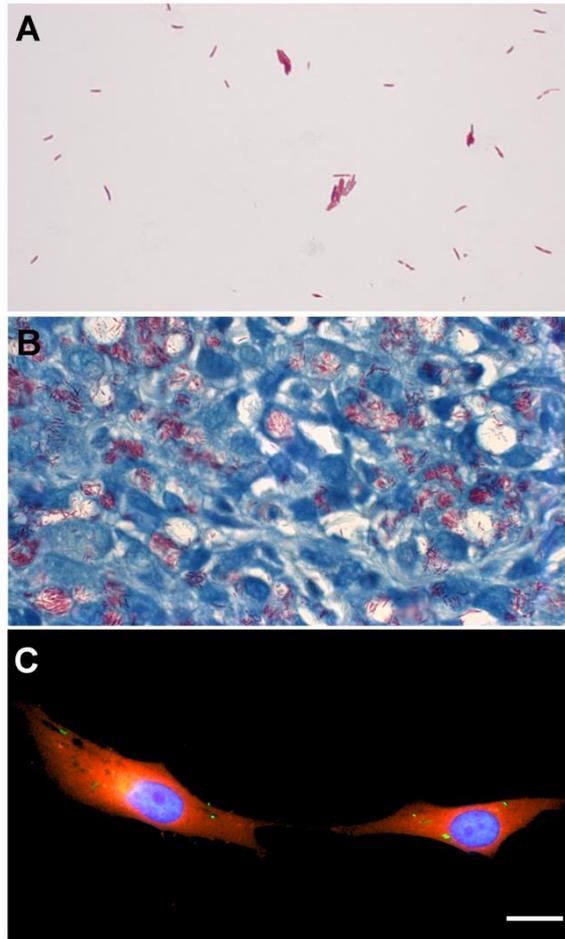
Fonte: Ministério da Saúde, 2016.

O diagnóstico precoce e o início imediato do tratamento são as medidas corretas para o controle global da hanseníase. Em abril de 2016 a OMS lançou o programa “Estratégia Global da Hanseníase 2016-2020: acelerando o desenvolvimento de um

mundo sem hanseníase”, plano mundial baseado em três pilares básicos: fortalecer ações governamentais nas coordenações de saúde e em parcerias entre estados e países; eliminar a doença e as complicações atreladas a ela; acabar com a discriminação e promover a inclusão dos pacientes na sociedade (WHO, 2017).

#### **1.4. *Mycobacterium leprae***

A descoberta do *M. leprae* ou bacilo de Hansen mudou o rumo da pesquisa científica em hanseníase, pois, pela primeira vez, foi atribuído a um patógeno a origem de uma doença humana (Couto et al., 2017). O *M. leprae* é um patógeno intracelular obrigatório que possui infectividade alta e patogenicidade baixa. Como microorganismo gram-positivo, é álcool-ácido resistente quando corado pela técnica de Ziehl-Neelsen e mede de 1-8µm de comprimento e 0,3µm de diâmetro (Figura 4). Possui período de incubação de 2 a 7 anos e apresenta tropismo para regiões corpóreas com temperaturas abaixo de 30°C (Scollard et al., 2006).



**Figura 4: *Mycobacterium leprae*.** (A) *M. leprae* retirado de coxim plantar de camundongo “nude”, purificado e corado pelo método de Kinyoun (cortesia Dr. Flávio Lara, FIOCRUZ). (B) Fotomicrografia de lesão de pele de paciente multibacilar com inúmeros bacilos no interior do citoplasma de macrófagos teciduais espalhados em infiltrado mononuclear difuso e inespecífico (coloração de Ziehl-Neelsen, 1000X; cortesia Dra Euzenir Sarno, FIOCRUZ). (C) Imagem em microscopia confocal de imunohistoquímica de células de Schwann identificadas pelo anticorpo S100 (em vermelho) infectadas com *M. leprae* corados com FITC (em verde). Os núcleos das células foram corados com DAPI (azul; cortesia Dr. Victor Resende, UFRJ). Barra de escala: 20uM.

Filogeneticamente o *M. leprae* provem da ordem *Actinomycetales* e família *Mycobacteriaceae* (Diório, 2014). O sequenciamento completo do genoma do bacilo revelou que cerca da metade dos genes encontrados são codificadores de proteínas, enquanto que 27% e 23,5% correspondem, respectivamente, a pseudogenes e a sequências reguladoras (Cole et al., 2001). Acredita-se que o genoma do *M. leprae* foi reduzido durante a evolução e que a perda de genes possa estar atrelada à

incapacidade de crescimento do bacilo em meio de cultura (Cole et al., 2001). O longo período de incubação no hospedeiro, associado à não multiplicação *in vitro*, são grandes limitadores ao estudo do patógeno e da doença (Diório, 2014). Entretanto, a multiplicação do *M. leprae* em coxim plantar de camundongo “nude”<sup>1</sup> e em tatu nove bandas, sua obtenção e purificação, contribuíram para o avanço das pesquisas científicas, nas quais o bacilo inteiro ou seus componentes antigênicos são utilizados (Shepard, 1960; Adams et al., 2012).

Em relação a sua estrutura, o *M. leprae* possui parede celular composta por peptídeoglicanos associados à glicina. Além da parede celular, o bacilo dispõe de uma cápsula externa constituída por ácidos micólicos, micosídeos e lipídeos, principalmente, o ftiocerol dimicocerosato (PDIM) e o glicolípido fenólico 1 (PGL-1), este último, encontrado unicamente no *M. leprae* (Hunter & Brennan, 1981). O PGL-1 parece ser fundamental no início da infecção pelo bacilo, pois foi demonstrado que o lipídeo induz macrófagos residentes no tecido a fagocitar o *M. leprae* e estimular a expressão da quimiocina CCL2. Esse processo recruta macrófagos permissivos ao patógeno para o tecido infectado, possibilitando que os bacilos migrem dos macrófagos primários para os de crescimento permissivo que foram recrutados (Cambier et al., 2017). Além disso, o PGL-1 pode estar relacionado aos acometimentos neuronais observados na doença. Em estudo publicado recentemente, foi demonstrado que o excesso da produção de óxido nítrico por macrófagos, em resposta ao PGL-1, pode danificar as mitocôndrias axonais e iniciar o processo de desmielinização (Madigan et al., 2017).

## 1.5. Transmissão

Apesar da transmissão inter-humana ser a mais aceita até os dias atuais, foram relatados casos da hanseníase resultantes de infecção pelo *M. leprae* naturalmente adquirida em tatus da espécie *Dasypus novemcinctus* nos Estados Unidos e no nordeste do Brasil (Walsh et al., 1977; Frota et al., 2012), em esquilos da espécie *Sciurus vulgaris* em alguns países da Grã-Bretanha (Meredith et al 2014; Avanzi et al., 2016) e ainda em macacos da espécie *Cercocebus atys* na África (Hamilton et al., 2008).

---

<sup>1</sup> Camundongos “nude” possuem o background Balb/C e são naturalmente atímicos, predispondo o crescimento de patógenos. Esses animais sobrevivem em ambiente SPF (“specific pathogen free”).

A transmissão do patógeno ocorre provavelmente por meio da eliminação do bacilo, através das vias aéreas superiores, de indivíduos multibacilares não tratados, e a inalação por outra pessoa susceptível ocorre pela mesma via, sugerindo que as vias aéreas constituem o sítio primário de infecção (Suneetha et al., 1998). Vários questionamentos são levantados a respeito desse mecanismo, pois, a transmissão através de insetos (Kirchheimer, 1976), ou por meio do manuseio ou ingestão da carne de tatu infectada, ainda não foram totalmente descartadas (Domozych et al., 2016).

Como os dados epidemiológicos mostram, o patógeno pode acometer pessoas de qualquer idade e os homens são os mais acometidos (WHO, 2017). A incidência da doença está relacionada a locais onde há uma baixa qualidade de vida, e, principalmente, quando existe um grande número de indivíduos vivendo em um mesmo local, ou seja, em áreas de densidade demográfica alta (MS, 2002). Assim, o contato próximo e contínuo de um indivíduo saudável com um paciente é o principal determinante na transmissão da hanseníase, sendo a proximidade não apenas limitada aos contatos intradomiciliares, mas também a vizinhos e pessoas com relações sociais próximas (van Beers., et al 1999). Sem dúvida, a proximidade dos contatos com o caso índice, e ainda, a consanguinidade entre eles, são os principais fatores associados ao risco de adoecimento (Sales et al., 2011). Outro aspecto importante na transmissão é a forma clínica e a carga bacilar do paciente. Foi demonstrado que contatos com maior risco de contrair hanseníase são aqueles próximos a pacientes multibacilares (Moet et al., 2004).

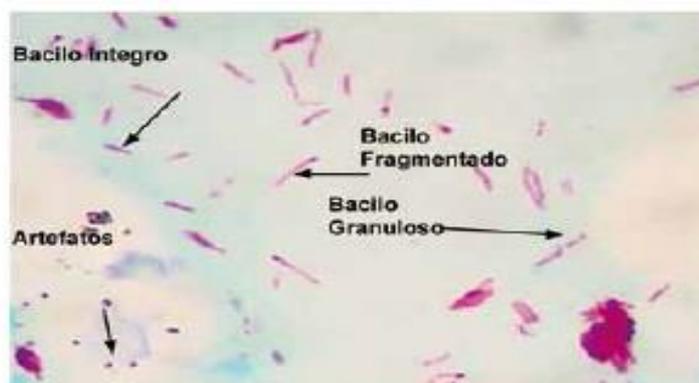
## **1.6. Diagnóstico**

O diagnóstico da hanseníase é principalmente clínico, com a observação dos sinais e sintomas clássicos da doença que podem ser decorrentes das alterações da pele com lesões características (Figura 5) e/ou dos nervos periféricos, que podem ser dolorosos à palpação e apresentarem-se espessos. Devido às incapacidades neurológicas decorrentes da infecção pelo *M. leprae*, é mandatária a avaliação fisioterápica dos pacientes com hanseníase. De acordo com o Ministério da Saúde, a avaliação do grau de incapacidade (GI) varia numa escala de 0 a 2, sendo 0: nenhuma alteração; 1: alteração parcial; 2: alteração irreversível (MS, 2010).



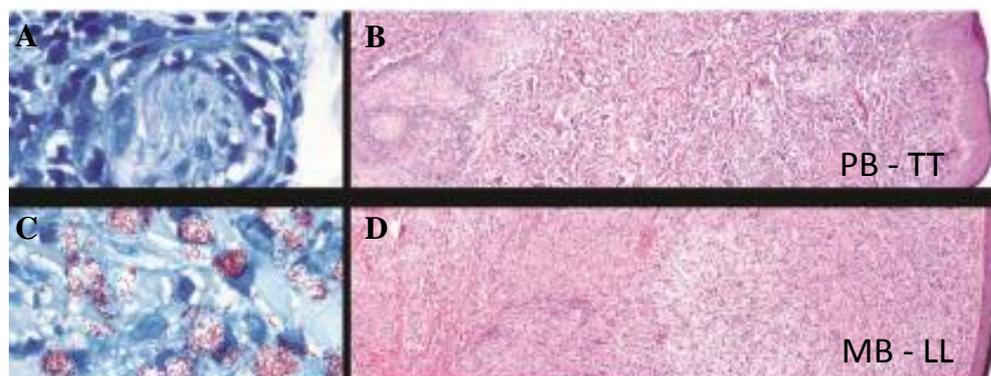
**Figura 5: Lesões de pele comuns nos pacientes polares da hanseníase.** Lesões macroscópicas dos pacientes tuberculóides (A) na forma de placa, e lepromatosos (B) na forma de nódulos disseminados.  
Fonte: Nery et al, 2015.

Complementar ao diagnóstico clínico, a baciloscopia tem importância no diagnóstico e na classificação clínica da hanseníase. Esse exame tem como objetivo encontrar o bacilo em raspados intradérmicos das lesões presentes nos lóbulos auriculares e nos cotovelos, através da coloração de Ziehl-Neelsen (MS, 2002). Como resultado é obtido o índice baciloscópico (IB) que corresponde ao número de bacilos contados ao microscópio em uma escala logarítmica variando de 0-6. Na maioria dos casos os indivíduos PB são negativos e os MB positivos (Lastória & Abreu, 2012). Através desse exame ainda é possível observar a viabilidade do *M. leprae* e correlacionar com a sintomatologia do paciente. Bacilos íntegros correspondem a indivíduos ainda não tratados ou com recidiva da doença, enquanto a presença de bacilos fragmentados e granulosos condiz com pacientes tratados ou em estado reacional (Figura 6; MS, 2010).



**Figura 6: Exame de baciloscopia evidenciando o *M. leprae* em diferentes formas.**  
Fonte: Guia de procedimentos técnicos em Hanseníase (2012).

Por sua vez, a análise histopatológica é realizada a partir de fragmentos de lesão de pele retirados por biopsia e corados por Hematoxilina-Eosina (H&E) para observação do infiltrado inflamatório e Ziehl-Neelsen ou Fite-Faraco, que permitem observar a presença do *M. leprae*. Além disso, é possível, em correlação com os sinais clínicos, determinar a forma da doença de acordo com os aspectos morfológicos observados (Lastória & Abreu, 2012) (Figura 7).



**Figura 7: Análise histopatológica de fragmento de pele de pacientes com a hanseníase paucibacilar (TT; A e B) e multibacilar (LL; C e D) e. A e C: Tecido corado com Fite-Faraco, aumento 1000x. Na figura C é possível observar as globias de *M. leprae*. B e D: tecido corado com Hematoxilina-Eosina (H&E, aumento de 400X. PB: Paucibacilar, TT: forma polar tuberculóide tuberculóide, MB: Multibacilar, LL: forma polar lepromatosa lepromatosa. Fonte: Scollard 2016.**

Técnicas sorológicas para quantificação de componentes do *M. leprae*, como o PGL-1, têm sido empregadas para auxílio diagnóstico na hanseníase. Essa molécula induz a produção de IgM específicas, e já foi mostrado que os títulos de anticorpos anti-PGL-1 estão relacionados ao grau de exposição ao bacilo (Ulrich et al., 1991; van Beers et al., 1999). No entanto, uma das limitações dessa metodologia é a dificuldade de prever quando a exposição ocorreu, e de diagnosticar formas PB. De fato, os testes sorológicos, auxiliam na classificação clínica da doença, no monitoramento do tratamento dos pacientes e, ainda, em contatos, podem ser indicativos de maior risco em desenvolver a doença (Barreto et al., 2011; Duppre et al., 2012).

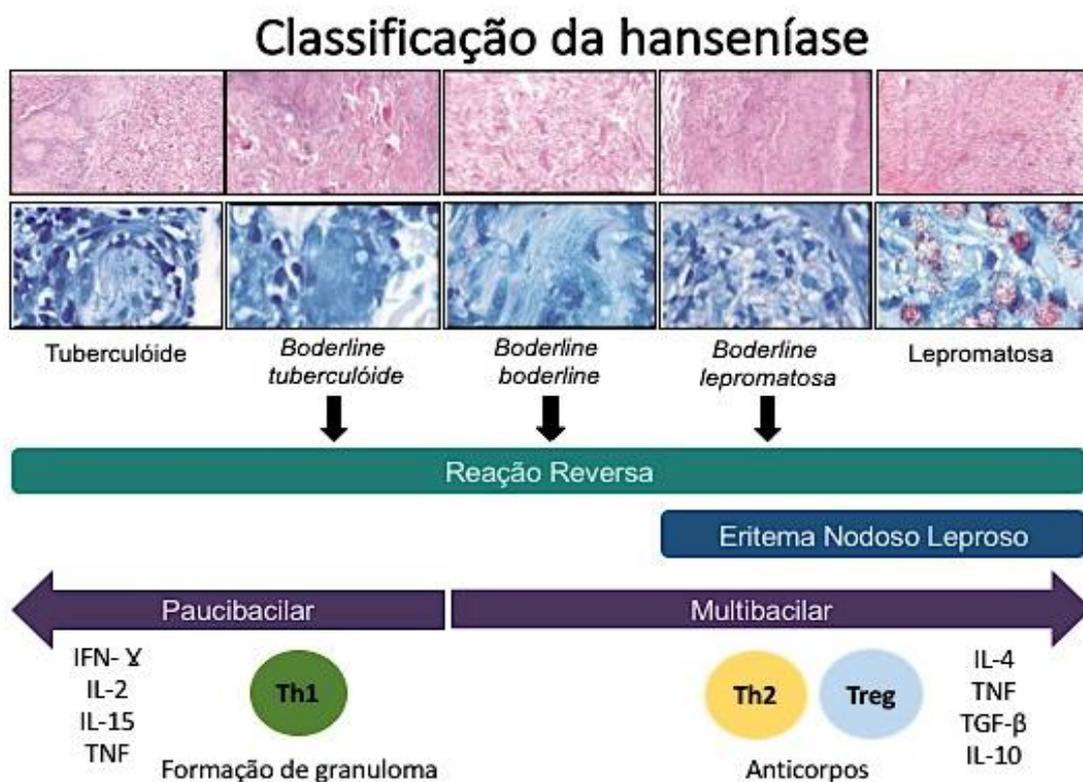
O desenvolvimento de técnicas de identificação de material genético do *M. leprae* em amostras clínicas através da reação em cadeia da polimerase (PCR) trouxe grande avanço para o diagnóstico da hanseníase. A identificação molecular consiste na amplificação de regiões específicas do DNA do *M. leprae* a partir de amostras clínicas, como sangue, lesões cutâneas, nervo e muco nasal. O PCR é útil para auxiliar em casos de difícil diagnóstico, tais como naqueles em que a baciloscopia é

negativa e a análise histopatológica é inconclusiva, além da forma neural pura, na qual o paciente não exibe lesões de pele (Martinez et al., 2014).

Por fim, com valor apenas preditivo, o teste de intradermorreação da lepromina consiste na injeção do *M. leprae* morto pelo calor e ressuspenso em solução de cloreto de sódio, sendo a observação da reação (Mitsuda) feita após 4 semanas do inóculo. Se houver o aparecimento de pápula maior que 5mm o resultado é considerado positivo e significa que o indivíduo é capaz de responder imunologicamente ao patógeno (Beiguelman & Quagliato, 1964; Lastória & Abreu, 2012).

### **1.7. Formas clínicas**

A apresentação da hanseníase difere de acordo com o balanço entre a resposta imune do hospedeiro e a disseminação do patógeno, que leva a um espectro de formas clínicas polares, o qual varia do polo lepromatoso (forma LL) ao tuberculóide (forma TT), incluindo as formas intermediárias chamadas de *borderline* (formas BL, BB e BT) e a forma indeterminada (I). Para fins de pesquisa científica, utiliza-se a classificação de Ridley e Jopling (1966) e, para fins operacionais, o Ministério da Saúde do Brasil estabelece a doença PB (TT, BT e I) e MB (BB, BL e LL) (Figura 8) (Ridley & Jopling, 1966; MS, 2002). A classificação do Ministério da Saúde foi criada para ser utilizada em locais onde não é possível fazer a baciloscopia e a análise histopatológica, e leva em consideração o número de lesões observadas no diagnóstico clínico, de forma que, pacientes PB apresentam menos de 5 lesões e pacientes MB, mais de 5 lesões (MS, 2002). A classificação de Ridley e Jopling é baseada nos achados histopatológicos, bem como na avaliação da resposta imunológica do paciente (Figura 8) (Ridley & Jopling, 1966).



**Figura 8: Classificação da hanseníase com base no critério estabelecido por Ridley e Jopling e Ministério da Saúde do Brasil.**  
Imagens: Scollard 2016 (Elaborado pela autora – Katherine Kelda Gomes de Castro).

A responsividade de linfócitos T ao *M. leprae* é progressivamente alterada ao longo do espectro clínico da doença, englobando grupos de indivíduos altamente responsivos no polo tuberculóide, assim como aqueles incapazes de organizar resposta celular contra o bacilo, alocados no polo lepromatoso. Nas formas clínicas intermediárias (*borderlines*) a resposta imune celular varia, de acordo com a proximidade a cada um dos polos (Ridley & Jopling, 1966). A forma indeterminada da doença é desenvolvida no início da infecção, nesse momento, o paciente pode evoluir para a cura espontânea, que ocorre na grande maioria dos casos, ou migrar lentamente para uma das formas clínicas (Gallo et al., 2013).

Classicamente os pacientes TT possuem uma ou poucas lesões de pele, resposta celular com perfil T helper (Th1) e produção de citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-15 e TNF (Fonseca et al., 2017). O infiltrado inflamatório local apresenta a formação de granuloma com presença de células epitelióides, além da expansão predominante de linfócitos T CD4<sup>+</sup> no sangue e na lesão cutânea (Scollard et al., 2006). Em contrapartida, os pacientes LL apresentam várias lesões disseminadas pelo corpo,

não apresentam resposta imune celular protetora, mas sim resposta mediada por anticorpos. As lesões de pele caracterizam-se por infiltrados inflamatórios inespecíficos, com inúmeros macrófagos espumosos repletos de bacilos, frequência elevada de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e produção, principalmente, de IL-4 e IL-10, tanto na circulação quanto nas lesões (Scollard et al., 2006, Fonseca et al., 2017). Com relação às formas *borderlines*, observa-se uma diminuição gradual da resposta celular da forma BT à forma BL, concomitante com o aumento da carga bacilar (de Sousa et al., 2017).

### 1.8. Tratamento

O tratamento da hanseníase é considerado estratégico no controle epidemiológico da doença, uma vez que leva à interrupção da transmissão logo após seu início. Em 1981, a OMS introduziu o esquema poliquimioterápico, uma combinação de fármacos, de ministração oral, composto por rifampicina, dapsona e clofazimina. As diferenças na combinação e administração das drogas variam de acordo com a forma clínica do paciente. Pacientes PB recebem 6 doses mensais e pacientes MB, 12 doses mensais. Para crianças de 10 a 14 anos o esquema terapêutico é o mesmo, apenas com redução da dosagem ministrada. Já para menores de 10 anos, a dose varia de acordo com o peso do paciente (Tabela 1) (MS, 2002).

**Tabela 1:** Esquema terapêutico da poliquimioterapia conforme a forma clínica do paciente e a idade.

Forma Clínica	Esquema terapêutico	Dose		Forma de administração
		Adulto	Criança	
<b>Paucibacilar</b>	Rifampicina	600mg	450mg	Mensal
	Dapsona	100mg	50mg	Diário
<b>Multibacilar</b>	Rifampicina	600mg	450mg	Mensal
	Dapsona	100mg	50mg	Diário
	Clofazimina	300mg / 50mg	150mg / 50mg	Mensal / Diário

Fonte: Ministério da Saúde, 2002.

## 1.9. Episódios reacionais

Cerca de 50% dos pacientes com hanseníase desenvolvem estados reacionais, que se manifestam por quadros clínicos de respostas inflamatórias agudas com comprometimento sistêmico, como artralgia, anorexia e febre (Nery et al., 1998; Walker et al., 2015). Esses episódios, podem se manifestar a qualquer momento no curso da doença, acometem pacientes de todas as formas clínicas, porém, são mais prevalentes nas formas *borderlines* (Nery et al., 1998). As reações são classificadas em tipo 1 ou reação reversa (RR), e tipo 2 ou eritema nodoso leproso (ENL), e são a principal causa de morbidade e de danos permanentes aos nervos periféricos (Nery et al., 2015). De fato, o tropismo do *M. leprae* pelos nervos periféricos faz da hanseníase uma neuropatia, na qual, a infecção das células de Schwann pelo bacilo leva ao comprometimento neural, e à perda de condutividade do axônio (de Freitas & Said, 2013).

### 1.9.1. Reação tipo 1 ou Reação Reversa (RR)

Pacientes *borderlines* são os mais acometidos pela reação do tipo 1 que se desenvolve gradualmente, podendo apresentar um curso natural de várias semanas. Clinicamente, na reação do tipo 1, ocorre um aumento do processo inflamatório nas lesões já existentes, assim como surgem novas lesões de pele e neurites dolorosas (Nery et al., 2013). A RR ocorre geralmente antes do início da PQT e, em vários pacientes o episódio reacional é a primeira manifestação clínica da doença (Nery et al., 2013). No Brasil, dentre os fatores de risco mais importantes para esse episódio reacional está a faixa etária, em torno da quarta década de vida. Além disso, o IB acima de 3 e um número grande de lesões no diagnóstico da doença, também são fatores de risco importantes para a reação tipo 1 (Nery et al., 2013). Para o tratamento da reação, a droga de escolha é a prednisona, administrada junto à PQT, que melhora a sintomatologia e evita o avanço da lesão neural (Kamath et al., 2014). Apesar de manifestar-se mais localmente, sobretudo na reativação de lesões cutâneas antigas, com ou sem espessamento de nervos periféricos, a neurite costuma ser severa nesses episódios, trazendo grande sofrimento e aumentando as incapacidades físicas nos pacientes (Walker & Lockwood, 2008).

Alguns mecanismos imunopatogênicos envolvidos na reação do tipo 1 já foram relatados e, dentre eles, destaca-se a elevação transitória da reposta imune celular ao *M. leprae*, com aumento na secreção de mediadores pró-inflamatórios como o IL-2, IL-6 e IFN- $\gamma$  na circulação sanguínea (Andrade et al., 2015). Ademais, em recente trabalho desenvolvido pelo nosso grupo, foi observado aumento significativo na expressão do gene *TBX21* que codifica o fator de transcrição t-bet, envolvido na diferenciação de linfócitos Th1 em concomitância com o aumento na frequência de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  na gênese da reação reversa de pacientes BL (dos Santos et al., 2016).

#### 1.9.2. Reação tipo 2 ou Eritema Nodoso Leproso (ENL)

A reação tipo 2 ou ENL consiste em um episódio sistêmico de inflamação aguda que ocorre somente em pacientes LL e BL. A reação tipo 2 pode ocorrer antes, durante e após a PQT e, nestes episódios, os pacientes desenvolvem resposta inflamatória aguda sistêmica, apresentam nódulos subcutâneos profundos e dolorosos, além de febre muitas vezes alta, edema e cianose de extremidades, perda de peso, mal-estar geral, danos nos nervos, pele, olhos e testículos (Gallo et al., 2013; Voorend & Post, 2013).

Esse episódio ocorre em aproximadamente 50% dos pacientes LL e 5 - 10% dos pacientes BL, principalmente aqueles com IB maior que 4. A reação tipo 2 pode acometer o paciente mais de uma vez durante o curso da infecção, sendo que, em alguns indivíduos, quadros subentrantes de difícil manejo são observados (Voorend & Post 2013; Polycarpou, Walker, Lockwood, 2017). Para o tratamento da reação tipo 2 são administrados corticosteróides orais como a prednisona, e no Brasil, a talidomida é a principal droga de escolha para homens. Mulheres que não estejam em idade fértil ou tenham exame de gravidez negativo, e que se responsabilizem pelo uso da droga, após os esclarecimentos de seu efeito teratogênico, também são tratadas com talidomida. De fato, o envolvimento do TNF é tão importante na gênese do ENL, que a talidomida, um potente inibidor dessa molécula, foi instituída como tratamento para a reação. Essa droga impede a funcionalidade do TNF a partir da inibição da expressão gênica da molécula (Sampaio et al., 2002). Contudo, assim como na reação tipo 1, a PQT deve ser mantida nos pacientes com reação tipo 2 (Penna et al., 2005; Polycarpou, Walker, Lockwood, 2017). Há relação significativa entre o IB inicial e o

aparecimento da reação, especialmente após o início da PQT, provavelmente pela grande quantidade de bacilos fragmentados pelos antimicrobianos utilizados no tratamento da doença que são liberados no organismo (Manandhar et al., 1999).

Na análise histopatológica de fragmentos de lesões cutâneas de pacientes com a reação tipo 2 são encontrados leucócitos polimorfonucleares, principalmente neutrófilos. Por isso, ao longo de muitos anos, esse processo reacional foi associado como uma condição mediada por imuno complexos. Entretanto, cada vez mais é observada a participação de subpopulações de linfócitos T e de mediadores pró-inflamatórios na gênese e no curso do episódio reacional (Schmitz et al., 2016; Polycarpou, Walker, Lockwood, 2017; Silva et al., 2017).

### **1.10. Genética da hanseníase**

Como a hanseníase é uma patologia com intensa base genética, capaz de influenciar a resposta imune do hospedeiro contra o *M. leprae*, as variações nos genes, tanto a nível individual, quanto a nível populacional, estão envolvidas no desfecho da infecção (Alter et al., 2008; Pinheiro et al., 2011). Nesse contexto, um dos estudos genéticos mais importantes da hanseníase, foi aquele desenvolvido por Mira e colaboradores (2013), que associou o gene da parkina (*PARK2*) e o seu gene regulador (*PARKG*) à susceptibilidade da doença (Mira et al., 2003). A parkina é uma ubiquitina ligase cujo mecanismo central é a sinalização de proteínas para a degradação e, num processo denominado xenofagia, está envolvida na resistência a patógenos intracelulares (Manzanillo et al., 2013).

Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos no sentido de determinar genes candidatos que sirvam como biomarcadores da hanseníase. Até o momento, genes associados, tanto ao início da infecção e ao estabelecimento de suas formas clínicas, como ao desenvolvimento dos episódios reacionais, já foram descritos em várias populações e tomam como base a resposta imune do hospedeiro ao bacilo (Cardoso et al., 2011a; Gaschignard et al., 2016).

Alterações na expressão gênica e polimorfismos de base única (SNP) acometendo a aderência e entrada do *M. leprae* na célula hospedeira, foram descritas, como no gene *TLR1*, responsável por um fenótipo protetor (Wong et al., 2010), enquanto outro SNP do mesmo gene foi associado ao desenvolvimento da doença (Schuring et al., 2009). Essas variantes estão diretamente envolvidas com a resposta

imune inata no controle da infecção ou no avanço para a resposta adaptativa e estabelecimento dos fenótipos da hanseníase. Outros SNPs de genes do sistema TLR (do inglês Toll like receptors), especialmente *TLR2* e *4* também já foram associados com suscetibilidade ou proteção contra a doença (Hart & Tapping 2012). Ainda no perfil de respostas inatas, variações no gene *NOD 2* (proteínas com domínio de ligação à nucleotídeos e oligomerização) estão associadas ao desenvolvimento da reação tipo 2 (ENL), ao contrário da evidência em conferir proteção ao desenvolvimento da reação tipo 1 (RR) (Berrington et al., 2010). Além dessas moléculas, o gene que codifica o receptor de manose (*MRC1*) e gene que codifica o receptor de vitamina D (*VDR*) também já foram descritos como contribuintes na susceptibilidade/proteção ao *M. leprae* (Roy et al., 1999; Zhang et al., 2009).

Em relação ao sistema imune adaptativo, o antígeno leucocitário humano (HLA) é a região mais variável do genoma (Goldberg & Luiz Vicente Rizzo, 2015a, b), e, dessa forma, diversos são os estudos avaliando a sua contribuição na infecção pelo *M. leprae*. O *HLADR* é o alelo mais estudado, principalmente o *HLADR2*, que possui variáveis que estão associados com resistência/susceptibilidade à infecção (Sauer et al., 2015). O TNF é uma molécula importante atrelada ao desenvolvimento da hanseníase, e o SNP -308 A>G é o mais analisado. Os resultados dessa mutação já foram bastante divergentes, entretanto, um trabalho recente de meta-análise de 14 estudos concluiu que, na população brasileira e latino-americana, essa alteração está associada à proteção ao desenvolvimento da hanseníase (Cardoso et al., 2011b). Porém, em asiáticos, o efeito não é o mesmo, estando a mutação associada com o desfecho doença (Areeshi et al 2017). O gene *IL10* e seu receptor (*IL10R*) que codifica a citocina imunoreguladora IL-10 também foi amplamente associado com a hanseníase. Um estudo de 2013 avaliou haplótipos importantes (ACC/ ACC e ACC/GCC) que caracterizam uma baixa produção e produção média da citocina, respectivamente. Os resultados revelaram que esses perfis estão associados com proteção ao desenvolvimento da hanseníase (Garcia et al., 2013).

Outros genes relacionados com a resposta imune adaptativa estão sendo estudados e, mais recentemente, naquele que codifica a citocina IFN- $\gamma$  (*IFNG*) foi observado uma associação entre o SNP +847 com proteção à doença na população brasileira (Cardoso et al., 2010).

### 1.11. Bases da resposta imune inata na hanseníase

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa contra os patógenos, seguida pela resposta adaptativa que ocorre em conjunto, mas, se manifesta mais tardiamente. Na infecção pelo *M. leprae* os macrófagos e as células de Schwann envolvidos na resposta inata são utilizados como fonte metabólica, sítio de replicação, e proteção contra o meio externo, sendo cruciais na definição do estabelecimento ou não da hanseníase.

Inicialmente, TLR 1 e 2 reconhecem lipoproteínas triaciladas do *M. leprae*, ativam macrófagos e os induzem a produzir TNF, IL-12 e GM-CSF, promovendo a diferenciação dessas células, assim como a expansão das células dendríticas (DC; Modlin, 2010). A frequência de TL1/2 altera de acordo com a forma clínica, ao passo que pacientes do polo TT possuem mais receptores do que os LL (Krutzik et al., 2003). Para sobrevivência metabólica e evasão do sistema imune, o *M. leprae* induz o acúmulo de fosfolípidos oxidados derivados do hospedeiro no local da infecção. Esse mecanismo prejudica a resposta imune através da inibição da expressão de CD1b em DCs e através de TLR 1/2 altera a via antimicrobiana da vitamina D, e estimula a produção de IL-10. Esse processo é mais observado na forma lepromatosa da doença (Cruz et al., 2008).

Em contato com TNF e IFN- $\gamma$  pode ocorrer a polarização de macrófagos para o fenótipo inflamatório do tipo M1, que tem ação antimicrobiana, através da produção de óxido nítrico sintase (iNOS) e atuação de radicais livres. Esse perfil de resposta é principalmente observado no polo TT. No polo oposto da doença é observada a presença de macrófagos supressores do tipo M2, produtores IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ , perfil que inibe a atividade antimicrobiana (Nath et al., 2015; Fonseca et al., 2017; de Sousa et al., 2017). Em lesões de pele de pacientes com as formas polares de hanseníase, o padrão microbicida de macrófagos do tipo M1 foi confirmado na forma TT e sugerido que a expressão acentuada de IL-15 observada nessas lesões estava diretamente relacionada a esse perfil, em contraste com a IL-10, predominante nas lesões de pacientes LL (Montoya et al., 2009).

Em linhas gerais, outros receptores vêm sendo descritos e associados à internalização de patógenos, como *M. leprae*, e a sua multiplicação ou não no interior das células hospedeiras. Dentre eles, destacam-se os receptores de  $\alpha$ 2-laminina e o de manose (MRC1), o VDR, família de receptores do tipo NLR (domínio de

oligomerização de nucleotídeos), especialmente os receptores NOD1 e 2 e a via do IFN tipo I (IFN- $\alpha/\beta$ ). Em condições fisiológicas esses receptores atuam em sinergia na sinalização e indução de cascatas de ativação da via NF- $\kappa$ b, levando à indução da transcrição de mediadores pró-inflamatórios e antimicrobianos (Iwasai & Medzhitov, 2015).

Na infecção pelo *M. leprae*, vários trabalhos têm mostrado que, alterações nessas moléculas ou nos genes que as codificam, levam ao estabelecimento da hanseníase *per se* ou aumentam a susceptibilidade às formas reacionais da doença (Roy et al., 1999; Marques et al., 2001; Alter et al., 2010; Teles et al., 2013; Cardoso et al., 2011a; Schenk et al., 2016). Na hanseníase, as alterações descritas para esses receptores, interferem em processos cruciais da resposta protetora contra o *M. leprae*, impedindo ou diminuindo o desencadeamento de eventos microbicidas e de autofagia (Scollard et al., 2006).

### **1.12. Bases da resposta imune adaptativa na hanseníase**

Através da ligação do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), presente nas APCs (Células apresentadoras de antígeno), ao receptor de célula T (TCR), é reconhecida a especificidade do antígeno pela resposta imune, e assim fornecido o primeiro sinal de ativação celular. Em seguida, a ligação da molécula CD28, presente na superfície do linfócito T, com CD80 e/ou CD86 na superfície das APCs, promovem o segundo sinal e, conseqüentemente, a ativação dos linfócitos T “naïve”. Após a ativação dos linfócitos T “naïve” há uma secreção parácrina de IL-2, seguida pela expansão clonal e diferenciação celular de acordo com o perfil de citocinas presentes no microambiente. As células Th1 se diferenciam a partir da expressão de *TBX21* e *STAT4* induzidas por IL-12 e IFN- $\gamma$ , e, através da produção de IFN- $\gamma$  estimulam macrófagos a realizarem atividades antimicrobianas e inibem a atuação supressora de TGF- $\beta$  e IL-10 (Abbas et al., 2017).

Na hanseníase, experimentos clássicos da década de 1980 mostraram a frequência aumentada de linfócitos T CD4<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> nas lesões cutâneas de pacientes TT, em contraposição às lesões dos pacientes LL (Modlin et al., 1982; Modlin et al., 1983). Outros estudos seguiram mostrando que na forma lepromatosa da doença, os pacientes não possuíam padrões imunes compatíveis com a contenção do *M. leprae*.

Dentre esses padrões, destacam-se a proporção CD4:CD8 invertida nas lesões de pele, células dendríticas em menor número, incapacidade de produção de IL-2 e IFN- $\gamma$  por leucócitos sanguíneos, assim como diminuição da ativação e proliferação antígeno-específica de linfócitos T (Sampaio et al., 2003). Dessa forma, acreditava-se que nas formas multibacilares da doença prevaleciam os linfócitos Th2, especialmente pela produção aumentada de IL-4 e IL-10 circulantes (Sieling, 1994).

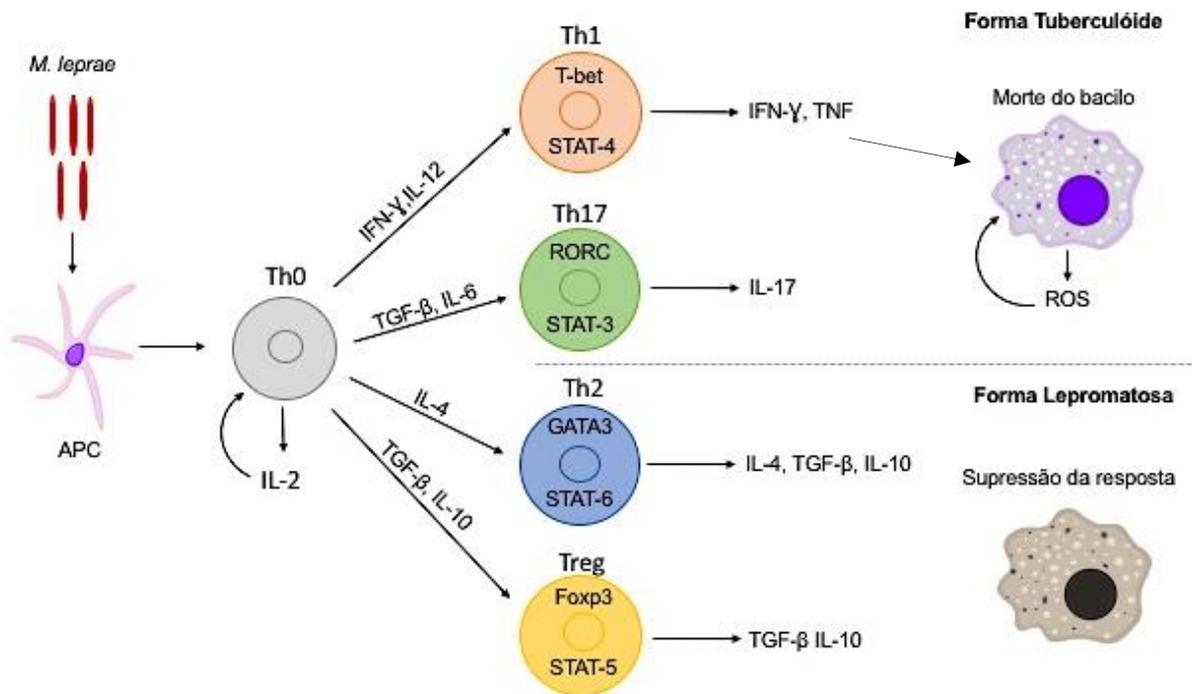
O conceito de que nas formas multibacilares, e, sobretudo nos pacientes LL, o perfil predominante seja Th2 ainda é aceito por muitos autores, sendo fonte de discussão no que diz respeito à imunologia da hanseníase, uma vez que os linfócitos Th2 expressam os fatores de transcrição *GATA3* e *STAT-6*, e produzem IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  (Sousa et al., 2017). Entretanto, à medida que novas subpopulações de linfócitos T são descritas, o paradigma Th1-Th2 na hanseníase vem perdendo o sentido (Figura 9). Afinal, num ambiente ineficaz de resposta protetora, e no qual anticorpos produzidos por linfócitos B não têm papel relevante, como já apontado anteriormente, mediadores envolvidos com a regulação da resposta adaptativa tornam-se fundamentais, destacando-se nesse cenário a IL-10 e o TGF- $\beta$ .

Citocina com propriedades imunomoduladoras, a IL-10 é produzida por monócitos, células dendríticas e linfócitos T. Como moduladora da imunidade, atua inibindo macrófagos M1 por meio da regulação negativa do MHC e de CTLA-4 (Antígeno 4 de Linfócito T Citotóxico) (McBride et al., 2002). Além de níveis sanguíneos de IL-10 estarem aumentados em pacientes multibacilares (Sieling, 1994), em um estudo desenvolvido em nosso laboratório com comunicantes domiciliares de pacientes com hanseníase, foi demonstrado que a razão TNF/IL-10 era a mesma que a encontrada em pacientes LL, levando os autores a concluírem que esse perfil estaria associado com a progressão da doença (Lima et al., 2000).

Outra citocina envolvida com a diferenciação de linfócitos T é o TGF- $\beta$ . Através do seu papel pleiotrópico, essa molécula se destaca pela atuação na regulação negativa de monócitos e linfócitos T, inibindo a produção de IFN- $\gamma$  e favorecendo a secreção de IL-10 (Ludviksson et al., 2000). Em sinergia com a IL-6 o TGF- $\beta$  estimula a polarização para Th17, subpopulação associada principalmente com a autoimunidade, caracterizada pela expressão dos fatores de transcrição *RORC* e *STAT3* e por produzir IL-17 (Figura 9) (Miossec et al., 2009; Jin & Dong, 2013). Na hanseníase, o mecanismo de ação das Th17 ainda não é consensual, pois diversos

grupos de estudo mostram resultados controversos entre si (Saini et al., 2016, Santos 2016, Azevedo et al., 2017, Santos et al., 2017). Entretanto, já é bem estabelecido que pacientes do polo TT apresentam frequência maior de Th17 no sangue e na lesão de pele, contribuindo no recrutamento de células inflamatórias e ativação de células endoteliais (Saini et al., 2013; Attia et al., 2014).

Uma vez produzido em conjunto com a IL-10, o TGF- $\beta$  estimula e mantém ativada outra subpopulação de linfócitos T, denominadas de T reguladoras (Treg; Sakaguchi et al., 2010).



**Figura 9: Ilustração da atuação do sistema imune de acordo com os polos da hanseníase.**  
Adaptado: Sousa 2017 (Elaborado pela autora – Katherine Kelda Gomes de Castro).

### 1.12.1. Linfócito T regulador

Os linfócitos T reguladores (Treg) tiveram, por muito tempo, seu fenótipo associado apenas à molécula CD25, receptor constitutivo da cadeia  $\alpha$  da IL-2 (Piccirillo & Shevach, 2004). Estudos posteriores sobre uma mutação recessiva ligada ao cromossomo X levaram à descoberta do fator de transcrição específico para essas células e envolvido na sua identificação, o “Forkhead Box P3” (Foxp3; Fontenot et al.,

2003). O Foxp3 é um fator de transcrição constitutivo dos linfócitos Treg, capaz de se ligar a 700-1.400 genes atuantes no desenvolvimento e estabelecimento dessas células. A expressão contínua de Foxp3 é essencial para o desenvolvimento e estabilização de uma programação supressora nas Treg periféricas maduras (Corthay, 2009).

Os linfócitos Treg são fundamentais na manutenção da tolerância periférica, provocando uma regulação negativa na amplitude das respostas imunes, prevenindo reações autoimunes, inibindo a ativação dos linfócitos T convencionais e controlando o processo inflamatório (Chaudhry & Rudensky, 2013). Esse tipo celular pode ainda ser dividido em duas subpopulações: as tTregs, que são provenientes do timo e constituem cerca de 10% dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, e pelas pTregs, que se diferenciam a partir de células T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> “naïve” na periferia, por meio de vários estímulos diferentes, através do TCR e por citocinas, como o TGF- $\beta$ , a IL-2 e a IL-10 (Josefowicz et al., 2012). Atualmente, ainda não existe um marcador eficiente para diferenciar os dois grupos celulares, entretanto, em revisão sobre o tema, Mills (2004) sugere que essas subpopulações possuam funções complementares e sobrepostas.

Outro dado relevante, é a relação entre células Treg e Th17. Já foi observado que o TGF- $\beta$  é uma citocina chave na conversão de células Foxp3<sup>-</sup> em Foxp3<sup>+</sup> (Figura 9) (Campbell & Koch, 2011). Dessa forma, o TGF- $\beta$  é fundamental para a aquisição de um fenótipo regulador a partir de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> “naïve” na periferia, e para a manutenção de Foxp3. O *STAT3* é um grande antagonista na atuação do Foxp3, ou seja, quando ele é expresso, ocorre a inativação de moléculas que atuam na expressão do Foxp3 (Lu et al., 2017). Além disso, na presença de IL-6, TGF- $\beta$  passa a induzir a secreção de IL-17 e, concomitantemente, inibe a diferenciação das Treg, alterando o perfil para células inflamatórias, as Th17 (Figura 9) (Tran, 2012). Este fato decorre da ativação de *RORC*, fator de transcrição responsável pela indução de células Th17. Assim, já é consenso que tanto o perfil regulador quanto o inflamatório, dado pelas Treg ou Th17 respectivamente, depende de TGF- $\beta$ , mais especificamente da molécula que apresenta a isoforma  $\beta$ 1, além da citocina proinflamatória IL-6, o que influi diretamente na expressão de *RORC* e/ou foxp3 (Tran, 2012). Já a presença constante de IL-2 estimula CD25, levando ao aumento na transcrição de *STAT5* e, conseqüentemente, de Foxp3 (Flynn & Hartley 2017). Assim, como o Foxp3, o CD25 é constitutivo das Treg, mas é observado transitoriamente em outras células, em virtude ao aumento do aporte de IL-2. A frequência elevada de

CD25 na superfície celular das Treg é um dos mecanismos de supressão celular realizado através do sequestro de IL-2 do meio (Shevach, 2009). Além disso, o excesso dessa citocina mantém a expressão de Foxp3 constante (Lu et al., 2017).

Uma molécula com capacidade endocítica alta, que permanece grande parte do tempo em vesículas no citoplasma das células e, apesar de presente em outros linfócitos T é constitutiva das Treg, é a CTLA-4. Sua função mais conhecida é modular negativamente os receptores CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2) das células apresentadoras de antígenos, impedindo assim a posterior ativação de células T (Walker & Sansom, 2015). Essa molécula ainda pode induzir a produção de indoleamina 2, 3-dioxygenase (IDO) das APCs, limitando o triptofano e, conseqüentemente, suprimindo vias metabólicas importantes para a ativação de linfócitos T (Tai et al., 2012). Além dos mecanismos de supressão citados no texto e mostrados na Figura 10, os linfócitos T reguladores ainda são capazes de produzir IL-10, TGF e IL-35 (Shevach, 2009). Os artifícios para controle da imunidade ainda podem levar à parada do ciclo celular e a célula alvo à morte, além da inibição da produção de citocinas inflamatórias, através da galectina 1, molécula importante na modulação da inflamação (Garín et al., 2007; Tabela 2).

**Tabela 2:** Características fenotípicas de linfócitos T reguladores.

Fator de transcrição	Ativação e memória	Migração	Supressão	Apoptose e outros
FOXP3	CD25	CD62L	CTLA-4	PD1
	CD45RO	CCR4	ICOS	
	CD45RA	CCR6	LAP	GITR
	HLA-DR	CCR9	IL-10	
	CD127 <sup>-low</sup>	CD103	TGF-β	CD95
	CD69	CD304	Granzima B	
CD31				

Adaptado de Sakaguchi, 2010.

### 1.12.2. Linfócitos Treg na hanseníase

Palermo e colaboradores (2012) foram pioneiros no estudo das Treg na hanseníase, sugerindo que essas células desempenham papel central na interação *M. leprae*-hospedeiro. Os autores demonstraram frequência aumentada de Treg no sangue periférico e em lesões cutâneas de pacientes LL. Além disso, também observaram aumento da expressão de IL-10 e CTLA-4 nos pacientes estudados, sugerindo que as células Treg facilitam a multiplicação do patógeno (Palermo et al., 2012). Outro estudo demonstrou aumento na positividade de TGF- $\beta$  nas lesões cutâneas de pacientes lepromatosos quando comparado com lesões granulomatosas de pacientes tuberculóides (Kiszewski et al., 2003).

Mais recentemente foi demonstrado que a frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup> encontrava-se aumentada no sangue de pacientes LL não reacionais, corroborando a hipótese de que ao inibirem a diferenciação de linfócitos Th1, as Treg contribuem para a multiplicação do *M. leprae* (Bobosha et al., 2014; Saini et al., 2014). Saini e colaboradores (2014) ainda identificaram que as Treg CD4<sup>+</sup> produzem mais TGF- $\beta$  do que as Treg CD8<sup>+</sup>, e a geração dessa citocina parece estar associada a fosforilação de *STAT5*. Outro estudo observou que pacientes MB apresentaram frequência aumentada de células T reguladoras produtoras de IL-35 e PD-1, assim como o ligante de PD-1 em DCs e linfócitos B (Tarique et al., 2017). Tomados em conjunto, esses dados corroboram a participação das Treg, tanto no curso crônico da hanseníase, quanto em estados reacionais.

## 2. JUSTIFICATIVA

A hanseníase permanece um problema de saúde pública no Brasil, ocupando atualmente o segundo lugar no número de casos da doença no mundo, mantendo o alto patamar de incidência que a mantém endêmica (WHO, 2017). Pacientes com a forma clínica LL da hanseníase apresentam falha na resposta imune, levando a um padrão funcional ineficaz para a destruição do patógeno que se multiplica nas células hospedeiras e é causa de lesões cutâneas disseminadas (Kaplan & Cohn, 1991; Sengupta, 2000).

Interrompendo o curso crônico da hanseníase, cerca da metade dos pacientes desenvolvem episódios de resposta inflamatória aguda, denominadas reações, causa de grande morbidade e aumento de incapacidades físicas. Além do sofrimento acarretado aos pacientes pela sintomatologia, as reações têm impacto direto na economia do país, pois dados epidemiológicos mostram que os pacientes reacionais estão concentrados entre a terceira e quarta década de vida e, muitas das vezes, devido a complicações clínicas e sequelas motoras provocadas pelas reações, os pacientes são retirados do mercado de trabalho (Gallo et al., 2013). Os mecanismos que levam ao desenvolvimento da reação tipo 2 ou (ENL), objeto de estudo deste trabalho, ainda não estão totalmente esclarecidos. Ao longo de várias décadas foram dadas contribuições importantes ao entendimento da imunopatogenia do ENL dentre os quais, destacam-se o desbalanço imunológico observado nos pacientes, com o desenvolvimento de lesões majoritariamente infiltradas por neutrófilos e a produção de citocinas pró-inflamatórias na circulação, especialmente, o TNF (Nery et al., 2016).

As Treg são caracterizadas por realizar a supressão e o controle da resposta imune exacerbada, com papel de destaque na autoimunidade (Chaudhry & Rudensky, 2013). Em doenças infecciosas crônicas, como a hanseníase, o papel de diferentes subpopulações de linfócitos T tem sido abordado, demonstrando que as Treg mantêm a cronicidade das enfermidades (Belkaid & Rouse, 2005; Stephen-Victor et al., 2017).

Com o avanço da metodologia de anticorpos monoclonais específicos para a identificação dessas subpopulações e de moléculas que participam da ativação e proliferação dessas células, bem como da citometria de fluxo multiparamétrica, inúmeros trabalhos vêm sendo realizados em diferentes amostras biológicas, dentre as quais, se destacam as células mononucleares sanguíneas. Essas metodologias, aliadas ao ensaio imunoenzimático (ELISA) serão aqui empregadas para caracterizar

fenotípica e funcionalmente as Treg, incluindo a produção de citocinas relacionadas ao perfil dessas células. Os resultados poderão trazer esclarecimentos acerca da participação das Tregs em pacientes de hanseníase, em especial daqueles acompanhados no Ambulatório Souza Araújo, parte do Laboratório de Hanseníase do IOC/Fiocruz, o que pode vir a auxiliar o manejo terapêutico desses pacientes.

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1. Objetivo geral**

Caracterizar fenotípica e funcionalmente as subpopulações de linfócitos T reguladores de pacientes com a forma clínica lepromatosa polar (LL) da hanseníase e na abertura da reação tipo 2 ou Eritema Nodoso Leproso (ENL).

#### **3.2. Objetivos específicos:**

- 1) Determinar a frequência *ex vivo* e *in vitro* das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, e das Treg CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes LL recém diagnosticados e na abertura do ENL, por citometria de fluxo multiparamétrica;
- 2) Determinar a frequência da expressão de CTLA-4 em Treg *ex vivo* e a frequência de Treg produtoras de TGF- $\beta$  e IL-10 em resposta ao *M. leprae* de pacientes LL recém diagnosticados e na abertura do ENL, por citometria de fluxo multiparamétrica;
- 3) Quantificar os níveis de IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-23 e IL-10 em sobrenadantes (SN) de culturas de PBMC de pacientes LL recém diagnosticados e na abertura do ENL, frente ao estímulo com *M. leprae*, por ensaio imunoenzimático (ELISA).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. População de estudo e Considerações éticas**

Neste trabalho foi feito um estudo observacional de corte transversal, com uma amostra composta por pacientes hansênicos acompanhados no Ambulatório Souza Araújo, parte integrante do Laboratório de Hanseníase – IOC/Fundação Oswaldo Cruz. Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz (protocolo 518/09). A participação dos indivíduos aqui analisados só foi permitida mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Para os participantes menores de 18 anos, a assinatura do TLCE foi realizada por responsável legal.

Foram considerados como critério de exclusão:

- Histórico prévio de vacinação com BCG nos últimos 3 meses;
- Coinfecções conhecidas (por ex., HIV, TB, Hepatite B e C);
- Presença de doenças autoimune ou alérgicas;
- Diabetes e hipertensão;
- Gestantes;
- Participantes menores de 15 anos.

Assim, 30 indivíduos foram selecionados de ambos os sexos e com idades entre 15 – 76 anos, definidos de acordo com seu perfil clínico em três grupos, no modelo *ex vivo* e *in vitro* respectivamente: 7/8 pacientes multibacilares (lepromatosos polares - LL) recém-diagnosticados e não tratados, 12/10 pacientes LL com Eritema Nodoso Leproso e ainda não tratados para a reação e 9/10 voluntários sadios de área endêmica para a hanseníase com idade e condição socioeconômica semelhante à dos pacientes.

### **4.2. Obtenção de células mononucleares de sangue periférico**

Os indivíduos selecionados para o projeto foram submetidos à punção venosa e coleta de ~40mL de sangue em tubos contendo o anticoagulante heparina. Em cabine de biossegurança nível 2 o sangue foi diluído em tampão fosfato-salino (PBS; Gibco Invitrogen Co., EUA), em temperatura ambiente (TA) na proporção 1:1, e adicionado lentamente em tubo contendo Ficoll Hypaque (GE Healthcare, Suécia), na proporção

final 1:1. O preparado foi centrifugado por 30 minutos a 2000 rpm, em TA em ausência de freio. Após a centrifugação o anel contendo as PBMCs foi coletado e transferido para tubo cônico de 50mL (Falcon, EUA) sendo as células ressuspensas em PBS gelado, e lavadas duas vezes, por centrifugação a 1800 rpm, 10 minutos, a 4°C. Ao final das lavagens, as PBMCs foram ressuspensas em 2mL de meio AIM-V (Thermo Fisher Scientific, EUA), sendo realizada a contagem de células com azul de Tripán 0.4% (Bio Whittaker, EUA), na proporção 1:10 em câmara de Neubauer, para a avaliação da viabilidade celular. Após a contagem, as PBMCs foram ajustadas, a  $1 \times 10^6$  (para as análises citométricas) e  $5 \times 10^5$  (para os pontos de ajustes dos fluorocromos conjugados aos anticorpos monoclonais e para o controle de morte celular), e transferidas para placas de 96 poços de polietileno com capacidade para 200 $\mu$ L, com fundo U (Nunc, EUA) para avaliação dos ensaios *ex vivo* e *in vitro*.

#### **4.3. Cultura de PBMCs**

PBMCs ressuspensas em meio AIM-V foram dispostas em cada poço das placas de cultura nas concentrações pré-determinadas identificadas como NE (culturas não estimuladas); ML (culturas estimuladas com *M. leprae*) e PHA (culturas estimuladas com o mitógeno fitohemaglutinina). Em seguida, foram adicionados em poços específicos, antígeno ou mitógeno, a saber: antígeno de *M. leprae* (20 $\mu$ g/mL) irradiado e sonicado, proveniente de tatu (fornecido pelo contrato NIH/NIAID N01 AI-25469 com a Universidade do Estado do Colorado, CO, EUA). Como mitógeno (controle positivo) foi utilizado 1 $\mu$ g/mL de Fito hemaglutinina (Sigma, EUA) nos poços específicos.

Em todos os poços, incluindo as culturas não estimuladas, foi adicionado 1 $\mu$ g/mL das moléculas co-estimuladoras CD28 e CD49d (Biolegend, EUA). Em seguida, as culturas foram mantidas por 72h em incubadora a 37°C com atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub>. Após 68h de cultura, visando avaliar a produção de citocinas no interior das células, foi incluído às culturas 10 $\mu$ g/mL do bloqueador de transporte de proteínas intracelulares (BD GolgiPlugTM, EUA), e ao final do período, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos e analisadas por citometria de fluxo multiparamétrica.

#### 4.4. Citometria de fluxo multiparamétrica

As PBMCs cultivadas *in vitro* por 72h e as não cultivadas *ex vivo* foram centrifugadas a 1500 rpm, por 5 minutos a 4°C, com sistema de freio leve acionado. Em seguida, os SNs das culturas foram coletados, transferidos para tubos de 1,5 µL devidamente identificados e armazenados em freezer -80°C para avaliação posterior das citocinas por ELISA.

Após esse procedimento, as culturas foram lavadas duas vezes com 150µL de PBS a 1500 rpm, por 5 minutos a 4°C, com sistema de freio leve acionado. As PBMCs foram ressuspensas em 150µL de PBS contendo 0,02% EDTA e incubadas por 15 minutos a TA, seguindo-se mais uma lavagem por centrifugação (1500 rpm por 5 minutos a 4°C). As PBMCs foram, então, coradas na proporção 1:5, com o Kit Live/Dead (Invitrogen, EUA), o qual baseia-se na reação de um corante fluorescente com proteínas celulares (aminas). Esse corante não é capaz de penetrar as células vivas cuja membrana celular encontra-se íntegra, associando-se apenas às proteínas de superfície, resultando em coloração de menor intensidade ou “dim”. Ao contrário, as células mortas ou em processo de morte, permitem a entrada do corante, a qual reage com proteínas internas e de superfície, gerando maior intensidade de fluorescência, como pode ser observado na figura 10C. Após a adição do reagente do Kit, as PBMCs foram ressuspensas em 200µL de PBS a 4°C e incubadas por 30 minutos a 4°C. Para a obtenção de controles positivos de morte celular, uma alíquota contendo  $5 \times 10^5$  de PBMCs foi previamente mantida em banho-maria por 30 minutos a 55°C. Ao final da incubação as PBMCs foram lavadas por centrifugação (1500 rpm por 5 minutos, a 4°C) com PBS/FACS (0,1% de Azida, 1% Soro Fetal Bovino, Sigma-Aldrich, Alemanha).

Em seguida, foi adicionado 5 µL de Human TruStain FcX™ - Fc Receptor Blocking Solution (Biolegend, EUA) em 100µL de PBS/FACS e incubado por 10 minutos a 4°C. Após essa etapa, as PBMCs foram marcadas com os diferentes anticorpos monoclonais específicos, utilizados na definição dos perfis fenotípicos das subpopulações de linfócitos T avaliados no presente estudo (Tabela 3). As concentrações ideais de uso dos anticorpos monoclonais foram obtidas após curva de titulação (dados não mostrados). Controles de isotipo e seus respectivos anticorpos monoclonais foram usados nas mesmas concentrações e incubados com as células

por 30 minutos a 4°C, em ambiente protegido da luz. Ao final da incubação as PBMCs foram submetidas à lavagem por centrifugação (1500 rpm por 5 minutos, a 4°C) com PBS/FACS e posterior permeabilização para a detecção das moléculas intracelulares. Assim, as células foram ressuspensas em 1% Fcγ3 Fix/Perm (Biolegend, EUA) e incubadas por 20 minutos a 4°C. As PBMCs foram então submetidas a duas lavagens seguidas por centrifugação, a primeira com PBS/FACS e a segunda com Fcγ3 Perm Buffer a 1% (Biolegend, EUA), 1500 rpm por 5 minutos, a 4°C, com descarte do sobrenadante entre as lavagens. Em seguida, 150µL da solução Perm Buffer foi novamente adicionada às PBMCs, as quais foram incubadas por mais 15 minutos em TA e protegidas da luz. Ao final, os anticorpos monoclonais específicos para Fcγ3, TGF-β e IL-10 foram adicionados e as PBMCs foram incubadas por 30 minutos em ambiente protegido da luz, a 4°C. Subsequentemente, as PBMCs foram lavadas por centrifugação (1500 rpm por 5 minutos a 4°C) com PBS/FACS, ressuspensas em 150µL de paraformaldeído a 1% e transferidas para tubos de 5mL (Falcon, EUA). Para a avaliação em citometro de fluxo CytoFLEX (Beckman Coulter, EUA), foram adquiridos um total de 100.000 eventos na região estratégica inicial de linfócitos e as análises foram conduzidas utilizando o software FlowJo versão 3.0 (Tree Star Inc., EUA).

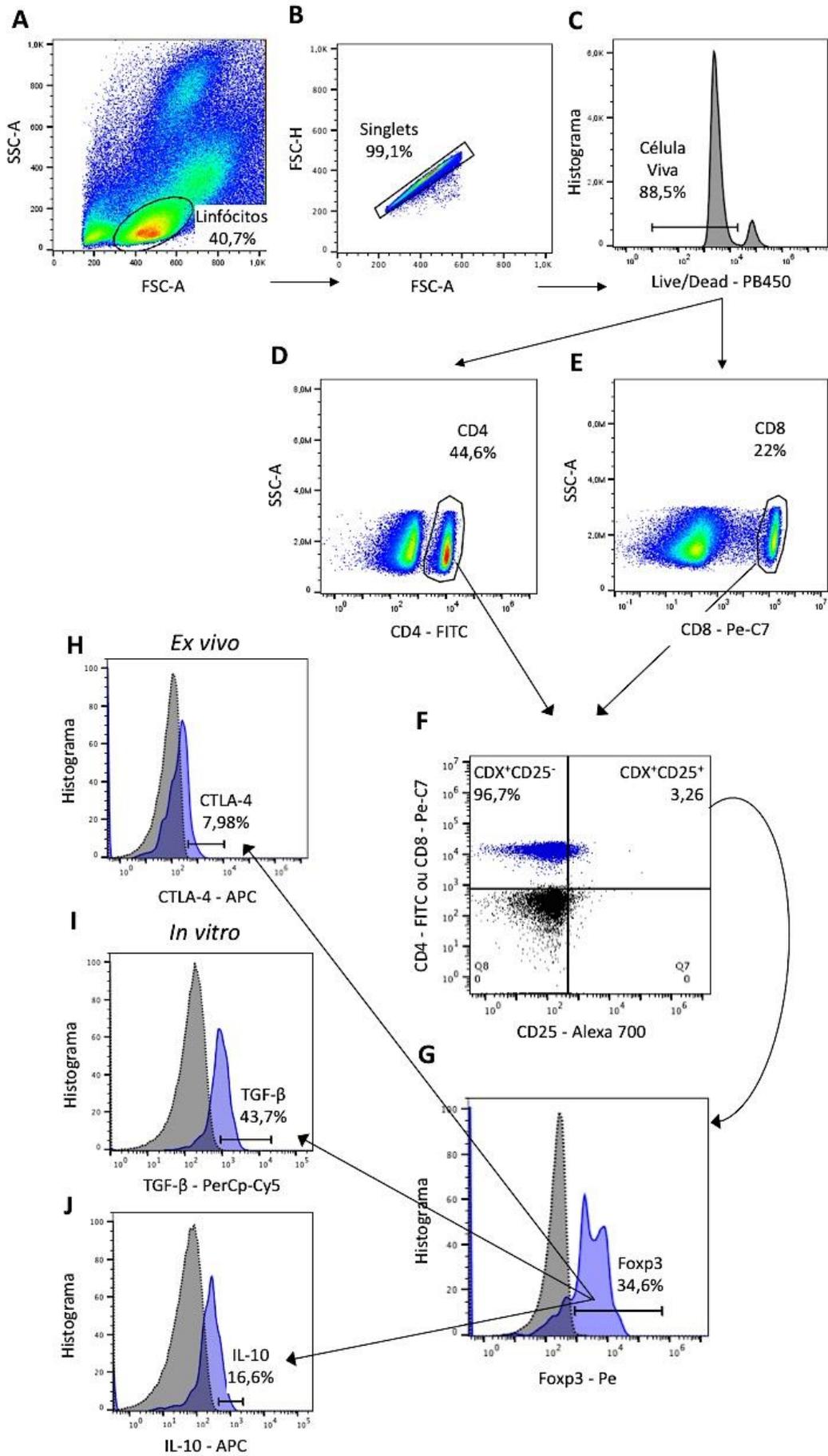
**Tabela 3:** Anticorpos monoclonais específicos contra moléculas de superfície ou intracelulares e respectivos controles de isotipos utilizados em citometria de fluxo multiparamétrica.

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Concentração de uso	Fabricante	Catálogo	Isotipo
<b>CD4</b>	FITC	A161A1	15 µg/mL	Biolegend	357406	Rat IgG2b, κ
<b>CD8</b>	Pe-Cy7	SK1	30 µg/mL	Biolegend	344712	Mouse IgG1, κ
<b>CD25</b>	Alexa 700	M-A251	40 µg/mL	Biolegend	356118	Mouse IgG1, κ
<b>CTLA-4</b>	APC	L3D10	40 µg/mL	Biolegend	349908	Mouse IgG1, κ
<b>FoxP3</b>	Pe	259D	40 µg/mL	Biolegend	320208	Mouse IgG1, κ
<b>IL-10</b>	APC	JES3-19F1	4 µg/mL	Biolegend	506807	Rat IgG2a, κ
<b>TGF-β</b>	Percp	TW4-2F8	40 µg/mL	Biolegend	349612	Mouse IgG1, κ

#### 4.5. Estratégia de análise em citometria de fluxo multiparamétrica

Para determinar a frequência de linfócitos Treg CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, as PBMCs provenientes dos indivíduos participantes do estudo, foram avaliadas *ex vivo* (tempo zero) ou *in vitro* frente ao *M. leprae* e a PHA em culturas de 72h. Todas as aquisições foram realizadas no citometro de fluxo CytoFLEX (Beckman Coulter, EUA), pertencente à Plataforma de Citometria Fluxo, Núcleo de Purificação Celular – IOC/FIOCRUZ.

Os parâmetros utilizados para a identificação da região estratégica inicial de linfócitos foram o tamanho celular (FSC-A: “Forward Scatter”- área) e a complexidade estrutural (SSC-A: “Side Scatter” – área; Figura 10A). A partir dessa região, os possíveis eventos celulares duplicados (“doublets”) contidos na amostra foram excluídos utilizando-se um gráfico do tipo “dot plot” FSC-A vs FSC-H (“Forward Scatter” – altura; Figura 10B). As células definidas como “singlets” ou unitárias foram, então, avaliadas quanto a sua viabilidade. O perfil de célula vivas e mortas foi obtido utilizando-se do kit Live/Dead e analisados através de um histograma de intensidade de fluorescência. As células viáveis foram definidas entre as células com menor intensidade de fluorescência correspondente à emissão mais à esquerda do histograma (Células vivas; Figura 10C). A partir das células viáveis, as regiões de linfócito T CD4<sup>+</sup> (Figura 10D) e T CD8<sup>+</sup> (Figura 10E), foram definidas para essas subpopulações e por meio da marcação com anticorpos monoclonais específicos e com os respectivos controles de isotipo. Através do “dot plot” SSC-A vs fluorescência a frequência de células CD25<sup>+</sup> nessas subpopulações foi avaliada no contexto de “dot plot” de fluorescências, no qual definiu-se a população de células duplo-positiva como CDX vs CD25<sup>+</sup>, em que “CDX” corresponde às células T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> (Figura 10F). A expressão de Foxp3<sup>+</sup> foi, então usada, para determinar o fenótipo regulador (Figura 10G). O perfil *ex vivo* funcional dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> foi definido a partir da expressão de CTLA-4, através do histograma de intensidade de fluorescência para essa molécula (Figura 10H), enquanto a avaliação do perfil funcional dos linfócitos T *in vitro* foi realizada com base na frequência de células produtoras de TGF- $\beta$  (Figura 10I) e IL-10 por marcação intracelular (Figura 10J).



**Figura 10: Estratégia de análise citofluorimétrica para fenotipagem e avaliação funcional dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e Treg.** A partir da região estratégica inicial de linfócitos em um “dot plot” FSC-A vs SSC-A (A) foram excluídas células duplas (B), para a definição da população de células viáveis (C), no contexto das quais foram estabelecidas as subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> (D) e T CD8<sup>+</sup> (E). Por sua vez, foram definidas as células CDX<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (F), nas quais “CDX” corresponde à CD4 ou CD8. A expressão de Foxp3, no contexto dessas células duplo-positivas definiu os fenótipos de células T reguladoras (G), avaliados para o perfil funcional *ex vivo* quanto à expressão de CTLA-4 (H), e *in vitro* quanto à produção de TGF- $\beta$  (I) e IL-10 (J). Os histogramas em preto correspondem aos controles de Isotipo e os em azuis às citocinas e ao Foxp3.

#### 4.6. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Todos os ensaios imunoenzimáticos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante de cada kit. Os SNs obtidos após culturas de 72h de PBMCs não estimulados (NE), estimulados com *M. leprae* e PHA, foram analisados para as citocinas IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-23, IL-6 e IL-10 (eBioscience, EUA). Os resultados obtidos para os SNs de culturas estimuladas com PHA não foram apresentados, uma vez que foram utilizados apenas como controles positivos dos ensaios realizados.

Inicialmente, o anticorpo de captura, diluído conforme instrução contida no kit, foi adicionado aos poços das placas de fundo reto. A placa foi coberta e armazenada a 4°C por 12 horas. Após essa etapa de sensibilização, os poços foram lavados 3 vezes com tampão de lavagem (PBS/0,05% Tween 20), posteriormente, o diluente de bloqueio foi adicionado e incubado por 1 hora em TA. Nesta fase, os padrões (proteínas recombinantes) foram reconstituídos, diluídos em série para a obtenção da curva padrão, adicionados aos poços específicos, em paralelo com os SNs e incubados por 12h, a 4°C. Ao final da incubação, os SNs foram lavados 3 vezes e, o anticorpo de detecção, já diluído, foi adicionado e mantido por 1 hora. Em seguida, a placa foi submetida a 3 lavagens, o complexo avidina-HRP foi diluído, e incubado por 30 minutos. Por fim, os poços foram lavados, a solução TMB foi adicionada e a placa incubada por aproximadamente 15 minutos, quando foi adicionada a solução de parada (2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Ao final do ensaio a leitura foi realizada no equipamento SpectraMax 190 (Molecular Devices – EUA/Canadá) em 450nm, utilizando o software SoftMax versão 5.3 (Molecular Devices – EUA/Canadá).

#### **4.7. Análise estatística**

Os resultados foram expressos em média e desvio padrão ou mediana e intervalo de confiança (IC) 95%. Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas com os testes não paramétricos Mann-Whitney e/ou Wilcoxon. O programa Prisma versão 6.0 foi utilizado para a análise estatística e gráfica (Graph Prism, EUA). Os valores com  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*), e  $p < 0,001$  (\*\*\*) e  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*) foram considerados significativos.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Características clínicas e demográficas dos voluntários estudados

Os participantes avaliados neste estudo foram definidos de acordo com a apresentação clínica da hanseníase. Foram incluídos 30 participantes no total, sendo 8 pacientes com a forma lepromatosa polar da hanseníase (LL), 12 pacientes lepromatosos polares em abertura de reação tipo 2 ou Eritema Nodoso Leproso (ENL), e 10 voluntários sadios (VS) de área endêmica para a hanseníase. Os pacientes de hanseníase foram acompanhados no Ambulatório Souza Araújo (ASA- IOC-Fiocruz). A coleta das amostras biológicas ocorreu após a confirmação do diagnóstico da doença e/ou do episódio reacional, imediatamente antes do início da PQT ou do uso das drogas antireacionais (Prednisona e/ou Talidomida). O diagnóstico da doença e do episódio reacional foi realizado por médicos especializados do ASA com base nos sinais e sintomas clínicos apresentados pelos pacientes, confirmados por patologistas experientados através da análise histopatológica de fragmentos de lesão de pele obtidos por meio de biopsia cutânea. Exames complementares para a hanseníase como a determinação do índice baciloscópico (IB) e do grau de incapacidade (GI), assim como o teste prognóstico da lepromina também foram realizados.

A casuística foi inicialmente analisada quanto às suas características sociodemográficas. A Tabela 4 apresenta informações sobre as variáveis nominais de idade e sexo dos participantes, além de parâmetros laboratoriais referentes à infecção pelo *M. leprae*. A idade média observada para o grupo ENL foi de  $47,8 \pm 17,1$  de desvio-padrão,  $30 \pm 11,8$  para o grupo LL e  $33,5 \pm 12,2$  para os VS. Ao todo, 70% dos participantes eram do sexo masculino, cuja distribuição não se demonstrou diferente entre os grupos estudados, sendo 75% no grupo ENL, 62,5% no grupo LL e 70% no grupo VS.

O IB, o qual varia de 0 a 6 na escala de Ridley e Jopling, foi analisado nos dois grupos. No grupo ENL o IB médio na abertura da reação foi de  $3,4 \pm 2,0$ . A coleta retrospectiva dos dados mostrou que antes de entrar em reação, esses mesmos pacientes tinham o IB médio de  $5,0 \pm 0,48$ , corroborando o fato de que  $IB > 4,0$  é considerado fator de risco para o desenvolvimento de ENL. No grupo de pacientes LL recém-diagnosticados o IB médio foi de  $4,6 \pm 1,0$ . Dentre os indivíduos que foram analisados para o teste de lepromina, todos obtiveram resultado negativo. Dois

participantes apresentavam grau de incapacidade 2, sendo um do grupo ENL e outro do grupo LL, enquanto seis indivíduos com ENL apresentaram grau de incapacidade 1 (Tabela 4).

**Tabela 4:** Caracterização clínica e sociodemográfica dos participantes do estudo.

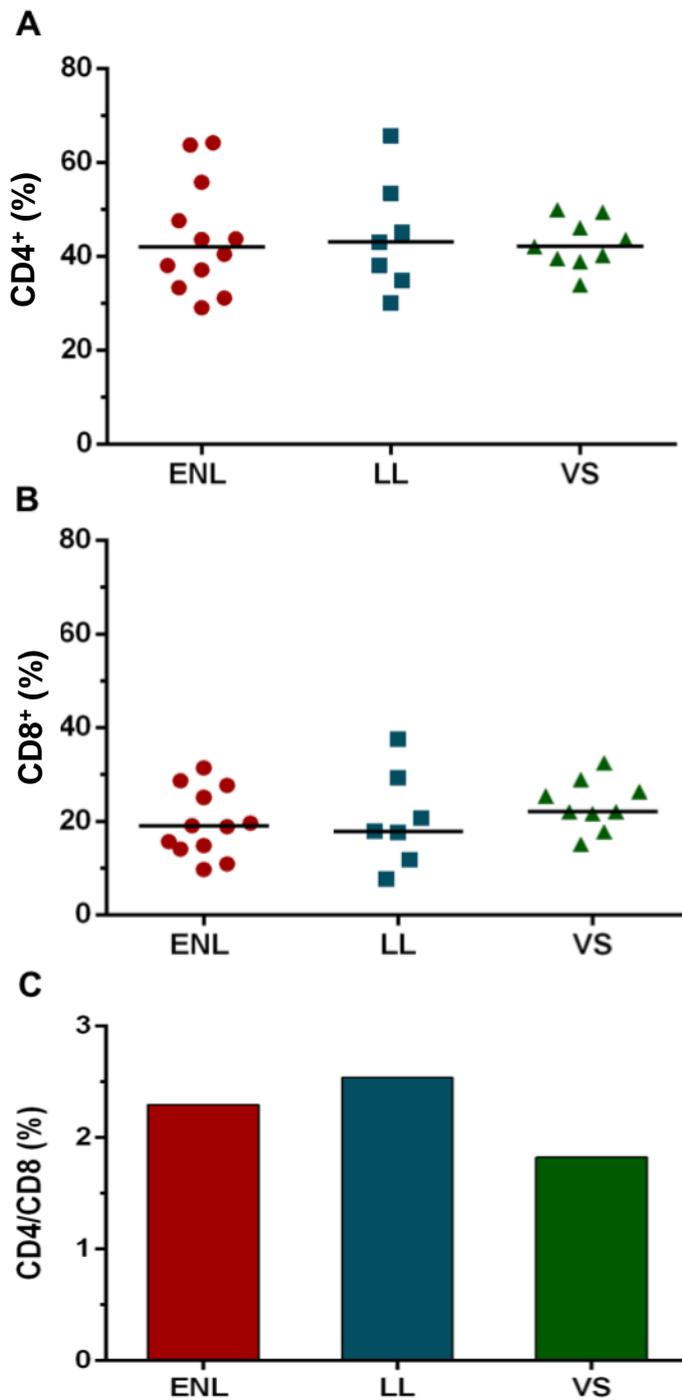
ID	Forma Clínica	Idade	Sexo	IB Inicial	IB Reação	GI	Lepromina
ENL-01	LL/ENL	34	M	NR	5,5	NR	NR
ENL-02	LL/ENL	40	M	5	2,75	0	NEG
ENL-03	LL/ENL	38	M	5	NR	1	NEG
ENL-04	LL/ENL	52	M	5,75	5,25	1	NEG
ENL-05	LL/ENL	76	F	4,5	3	0	NEG
ENL-06	LL/ENL	43	M	5	NR	0	NEG
ENL-07	LL/ENL	34	M	5	NR	2	NEG
ENL-08	LL/ENL	30	M	4,25	NR	1	NEG
ENL-09	LL/ENL	70	M	5,5	4,75	1	NR
ENL-10	LL/ENL	74	F	4,75	0	1	NEG
ENL-11	LL/ENL	30	M	5	2,75	0	NEG
ENL-12	LL/ENL	52	F	5,5	NR	1	NEG
LL-01	LL	34	M	5	-	2	NEG
LL-02	LL	22	M	5,2	-	NR	NEG
LL-03	LL	44	F	5,5	-	NR	NEG
LL-04	LL	16	M	5	-	NR	NR
LL-05	LL	15	M	5	-	0	NEG
LL-06	LL	25	F	5,25	-	NR	NEG
LL-07	LL	31	F	2,2	-	0	NR
LL-08	LL	38	M	4	-	NR	NR
VS-01	VS	24	M	-	-	-	-
VS-02	VS	24	M	-	-	-	-
VS-03	VS	33	M	-	-	-	-
VS-04	VS	36	M	-	-	-	-
VS-05	VS	58	F	-	-	-	-
VS-06	VS	50	M	-	-	-	-
VS-07	VS	38	F	-	-	-	-
VS-08	VS	24	M	-	-	-	-
VS-09	VS	24	F	-	-	-	-
VS-10	VS	24	M	-	-	-	-

ID: código de identificação do indivíduo, afim de preservar sua identidade; M: masculino; F: feminino; LL: forma clínica lepromatosa; LL/ENL: forma clínica lepromatosa em reação tipo II ou Eritema Nodoso Leproso (ENL); VS: voluntários sadios de área endêmica; IB: índice baciloscópico; GI: grau de incapacidade; NR: não realizado, NEG: negativo.

## 5.2. Determinação *ex vivo* das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>

As subpopulações sanguíneas de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos acoplados a diferentes fluorocromos (Tabela 3), para a determinação da frequência dessas células no tempo zero (*ex vivo*), em todos os grupos estudados. A frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> foi basicamente a mesma em todos os grupos, sendo as medianas 42% (IC: 33,3 – 58,8%) no grupo ENL, 43% (IC: 30 – 65,7%) no grupo LL, e 42,1% (IC: 38,9 – 49,4%) no grupo VS (Figura 11A).

Para os linfócitos T CD8<sup>+</sup> também não houve diferença significativa entre a mediana dos grupos, com 19% (IC: 14,1 – 27,6%) no grupo ENL, 17,9% (IC: 7,73 – 37,6%) no LL e 22,1% (IC: 17,8 – 28,9%) no VS (Figura 11B). Em relação à razão entre os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, a mediana do grupo ENL (2,29%; IC: 1,52 - 3,70%) não variou significativamente quando comparada com o grupo LL (2,54%; IC: 0,92 – 5,83) ou com o grupo VS (1,82%; IC: 1,52 – 2,66%) (Figura 11C). O cálculo da razão entre as frequências celulares foi realizado a partir da divisão do valor percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup>. A partir desse dado foi possível observar que o resultado mediano entre os grupos foi de 2:1.

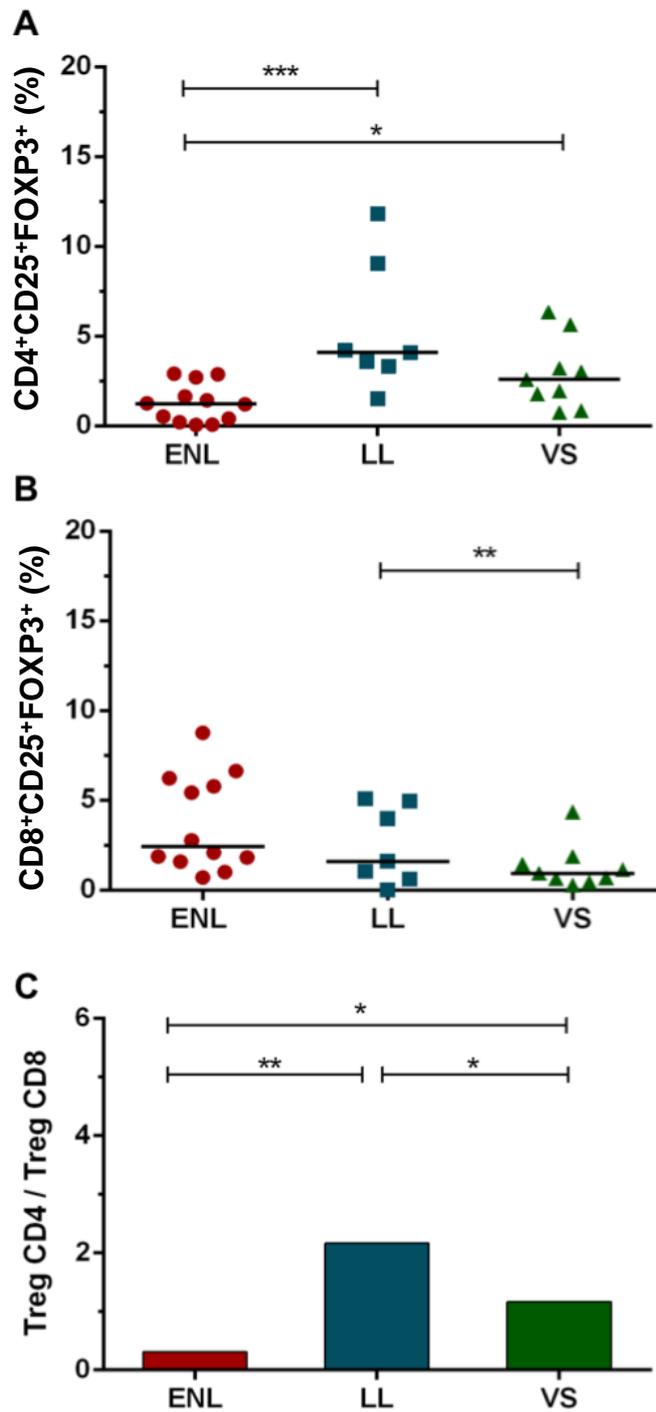


**Figura 11: Distribuição ex vivo da frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (A) e CD8<sup>+</sup> (B) totais, e da razão de linfócitos T CD4 e CD8 (CD4/CD8) nos três grupos avaliados (C). Em A e B, cada símbolo representa um participante e os traços horizontais a mediana. Em C, cada barra representa um grupo, e o resultado é mostrado em mediana da razão. Foram analisados 12 ENL, 7 LL e 9 VS. LL: pacientes lepromatosos polares, ENL: pacientes com Eritema Nodoso Leproso, VS: voluntários saudáveis. O teste Mann-Whitney foi usado para as análises estatísticas.**

### 5.3. Determinação *ex vivo* das subpopulações de linfócitos T reguladores CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.

Em continuidade às avaliações *ex vivo* (tempo zero), foram analisadas as subpopulações dos linfócitos Tregs CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, definidas como CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Figura 10), nos diferentes grupos do estudo e essas diferenças foram todas significativas entre os grupos estudados. A frequência da subpopulação Treg CD4<sup>+</sup> apresentou-se mediana significativamente menor no grupo de pacientes ENL [1,23% (IC: 0,2 – 2,71%)], em comparação aos grupos LL [4,1% (IC: 1,52 – 11,80%)] ( $p=0,0005$ ) e ao grupo VS [2,59% (IC: 0,86 – 5,64%)] ( $p=0,0278$ ) (Figura 12A).

Quanto às Treg CD8<sup>+</sup>, embora nenhuma diferença significativa tenha sido encontrada entre o grupo ENL e os outros dois grupos estudados, a mediana encontrava-se mais elevada no quadro reacional com valor de 2,43% (IC: 1,59 – 6,22%). As frequências foram significativamente menores no grupo VS [0,95% (IC: 0,44 – 1,87%)] em comparação ao grupo LL [1,6% (IC: 0,014 – 5,09%)] ( $p=0,0060$ ) (Figura 12B). A razão TregCD4<sup>+</sup>/TregCD8<sup>+</sup> também foi avaliada. No grupo de pacientes com ENL, a mediana da razão foi de 0,31% (IC: 0,03 – 1,44%), de 2,16% (IC: 0,38 – 5,69%) nos LL e de 1,16 % (IC: 0,63 – 5,93%) nos VS (Figura 12C). Esse resultado demonstra que pacientes com ENL têm razão TregCD4/TregCD8 significativamente menor na circulação do que os pacientes LL ( $p=0,0097$ ) e os VS ( $p=0,0018$ ; Figura 12C). A razão reduzida no grupo ENL provavelmente se deve ao aumento de Treg CD8<sup>+</sup> nesses pacientes. O cálculo da razão entre as células Treg foi conduzido de mesmo modo que nas subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.



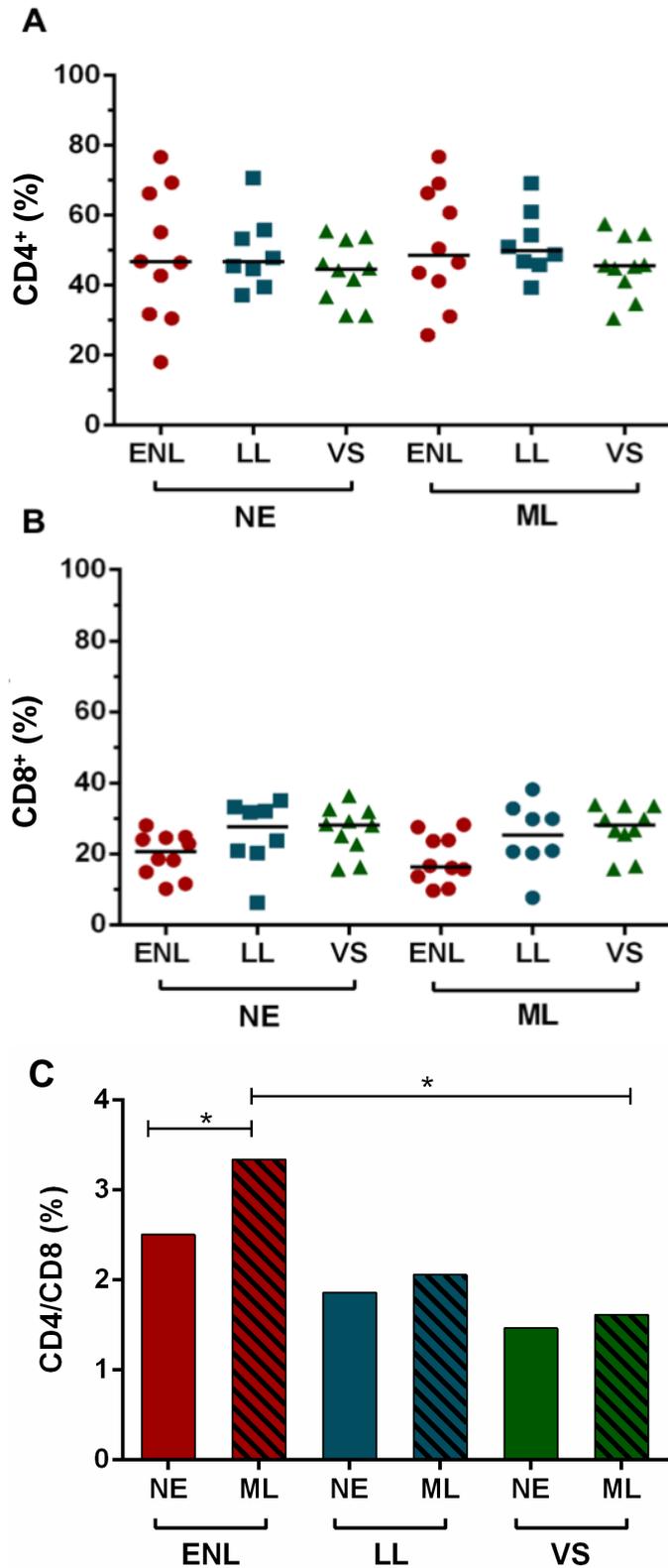
**Figura 12: Distribuição ex vivo das frequências de linfócitos Treg CD4<sup>+</sup> (A), Treg CD8<sup>+</sup> (B) totais, e da razão TregCD4/CD8 nos três grupos avaliados. Em A e B, cada símbolo representa um participante e os traços horizontais a mediana. Em C, cada barra representa um grupo, e os resultados obtidos estão mostrados em mediana. Foram analisados 12 ENL, 7 LL e 9 VS. LL: pacientes lepromatosos polares, ENL: pacientes com Eritema Nodoso Leproso, VS: voluntários sadios. O teste Mann-Whitney foi usado na análise estatística, sendo \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .**



### 5.5. Determinação *in vitro* das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> em resposta ao *M. leprae*.

Os ensaios *in vitro* foram realizados para determinar o padrão da resposta antígeno-específica dos grupos do estudo. Para isso, as PBMCs dos indivíduos foram cultivadas por 72h em presença de ML e PHA, conforme metodologia descrita. Os resultados mostraram que não houve alteração significativa na frequência mediana de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Figura 14A) (ENL: 46,7%, IC:30,5 – 69,4%; LL: 46,7%, IC:37,2 – 70,7% e VS: 44,6%, IC: 31,5 – 53,9%), ou T CD8<sup>+</sup> (ENL: 20,7%, IC: 11,5 – 24,8%; LL: 27,7%, IC: 6,24 – 35% e VS: 28,2%, IC: 16,3 – 32,5%) (Figura 14B) em relação aos diferentes grupos estudados e, portanto, o ML não parece ter induzido variações nessas subpopulações, tanto CD4<sup>+</sup> (ENL: 48,5%, IC: 34,1 – 69,1%; LL: 49,9%, IC: 39,3 – 69,1% e VS: 45,5%, IC: 34,7 – 54,6%) quanto CD8<sup>+</sup> (ENL: 16,3%, IC: 10,1 – 27,5%; LL: 25,3% IC: 7,6% – 38,2% e VS: 28,1%, IC: 16,5 – 33,5%). Para avaliar quanto o antígeno conseguiu de fato estimular e/ou modular a frequência das células avaliadas, foi realizada a razão CD4/CD8 e a comparação entre a mediana dos percentuais de células na condição estimulada (ML) em relação às células não estimuladas (NE) (Figura 14C).

O resultado da avaliação CD4/CD8, revelou que nos pacientes com ENL houve aumento significativo das razões frente ao estímulo com ML (NE= 2,50% IC: 1,23 – 4,60%; ML= 3,38% IC: 1,58 – 5,23%;  $p=0,0195$ ; Figura 14C). A razão CD4/CD8 dos ENL estimulados também se mostrou elevada em relação aos VS [1,61% (IC: 1,61 – 2,72%;  $p= 0,0431$ )]. As frequências dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> estimulados com PHA foram cerca de duas vezes maiores do que as frequências apresentadas nas culturas NE (dados não mostrados).

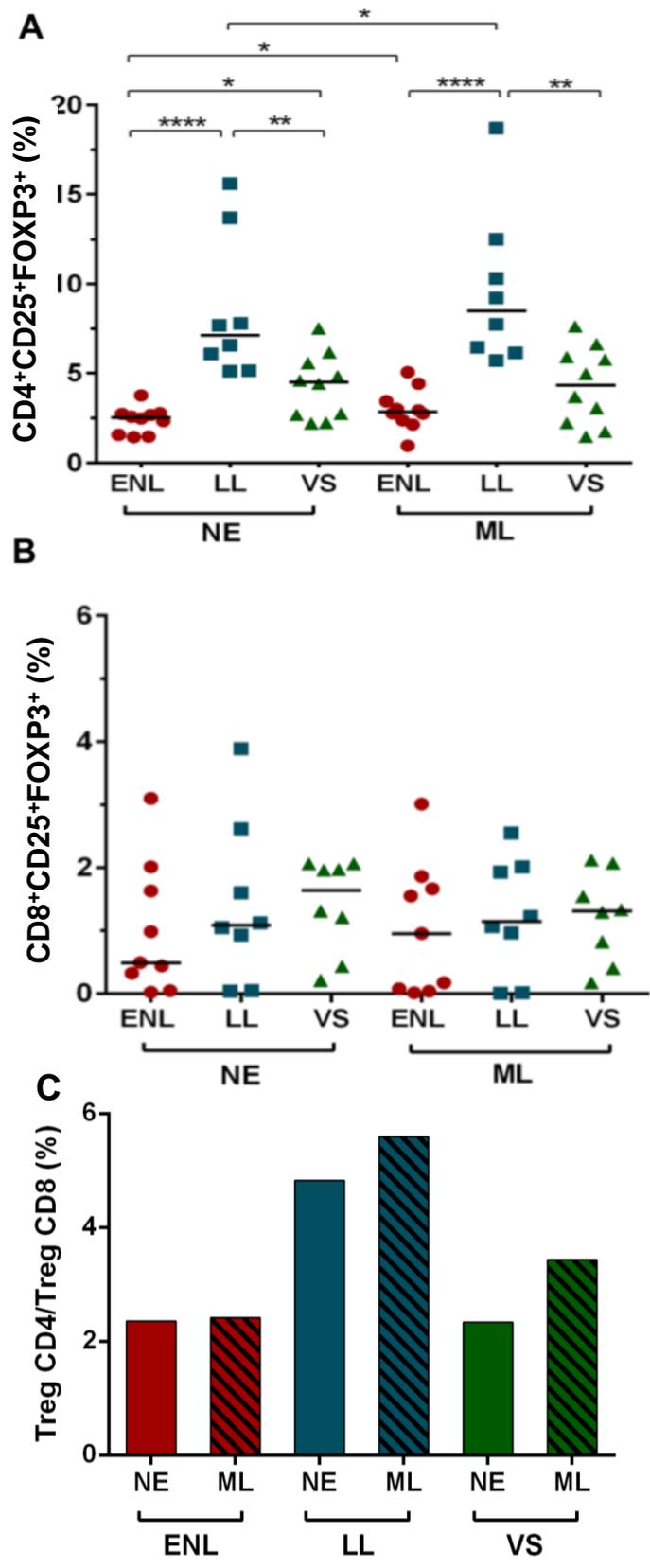


**Figura 14: Avaliação da frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> sanguíneos *in vitro*.** A: Frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. B: Linfócitos T CD8<sup>+</sup>. C: Relação entre linfócitos T CD4/TCD8. Nas figuras A e B cada símbolo colorido representa um indivíduo estudado de acordo com o grupo e as condições de cultura, os traços horizontais representam a mediana. Na figura C cada barra representa a mediana dos grupos e a condição de cultura. Foram analisados 10 ENL, 8 LL, 10 VS. LL: pacientes lepromatosos polares, ENL: pacientes com Eritema Nodoso Leproso, VS: voluntários sadios, NE: não estimulado,

## 5.6. Determinação *in vitro* das subpopulações de linfócitos Treg CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> em resposta ao *M. leprae*.

A análise *in vitro* também foi conduzida para avaliar a frequência de linfócitos Treg CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, definidas no contexto das células CD25<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup> (Figura 10). Nas culturas sem o antígeno foi observada frequência significativamente reduzida de linfócitos Treg CD4<sup>+</sup> no grupo ENL [2,54% (IC: 1,48 – 2,79%)], quando comparado com os pacientes LL [7,13% (IC: 5,1 – 15,6%)] ( $p < 0,0001$ ) e os VS [4,51% (IC: 2,25 – 6,18%)] ( $p < 0,05$ ) (Figura 15A). O fenômeno observado nas culturas estimuladas com ML foi semelhante ao constatado sem a adição do estímulo. Nessa condição, o grupo ENL apresentou como mediana 2,85% (IC: 2,14 – 4,42%), o LL 8,48% (IC: 5,71 – 18,7%;  $p < 0,0001$ ) e VS 4,34% (IC: 1,74 – 6,63%;  $p = 0,0031$ ), assim, o ML promoveu aumento significativo na frequência dessas células no grupo de pacientes com ENL ( $p = 0,0137$ ) e LL ( $p = 0,0469$ ) em comparação às culturas NE (Figura 15A). Entre as Treg CD8<sup>+</sup>, não foram observadas variações significativas na frequência dessas células, frente às diferentes condições de estímulo e entre os grupos analisados (Figura 15B). Mais uma vez, o estímulo com PHA, usado como controle, gerou frequências maiores nas subpopulações de Treg (dados não mostrados).

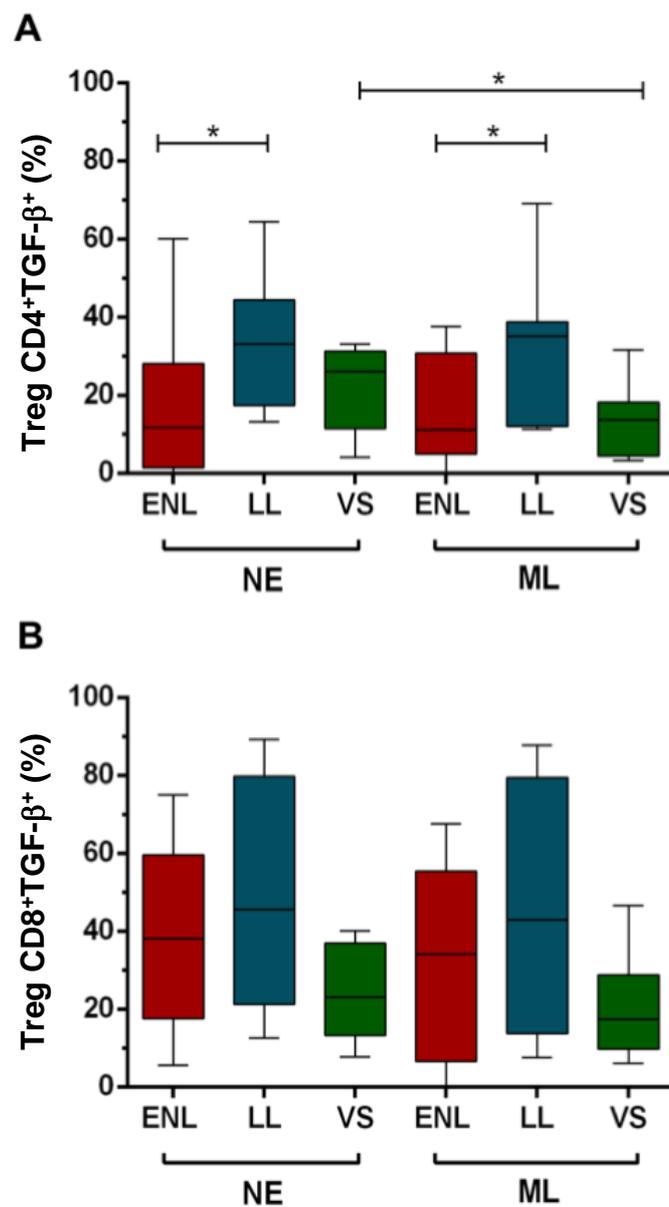
A razão entre Treg CD4<sup>+</sup> e Treg CD8<sup>+</sup> sem estímulo, embora mais alta no grupo LL [4,82% (IC: 1,32 – 7,07%)], em relação ao VS [2,30% (IC: 1,07 – 5,23%)] e ENL [2,35% (IC: 0,47 – 7,78%)], não foi estatisticamente diferente (Figura 15C). O ML ainda parece estimular o aumento da razão dessas células nos pacientes LL [5,60% (IC: 2,23 – 6,38%)] e nos VS [3,43% (IC: 1,22 – 8,08%)].



**Figura 15: Avaliação da frequência de linfócitos Treg CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e Linfócitos Treg CD8<sup>+</sup> *in vitro*.** A: Frequência de linfócitos Treg CD4<sup>+</sup>. B: Linfócitos Treg CD8<sup>+</sup>. C: Relação entre linfócitos TregCD4<sup>+</sup>/TregCD8<sup>+</sup>. Nas figuras A e B cada símbolo colorido representa um indivíduo estudado de acordo com o grupo e a condições de cultura, os traços horizontais representam a mediana. Na figura C cada barra representa a mediana dos grupos e a condição de cultura. Foram analisados 10 ENL, 8 LL e 10 VS. LL: grupo de pacientes lepromatosos polar, ENL: grupo de pacientes com reação tipo 2 ou Eritema Nodoso Leproso, VS: grupo de voluntários de área endêmica, NE: não estimulado, ML: estimulado com *M. leprae*. Os testes Mann-Whitney e Wilcoxon foram utilizados para análise estatística, sendo: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

### **5.7. Frequência *in vitro* de subpopulações de linfócitos T reguladores CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> produtores de IL-10 e TGF- $\beta$ , em resposta ao *M. leprae*.**

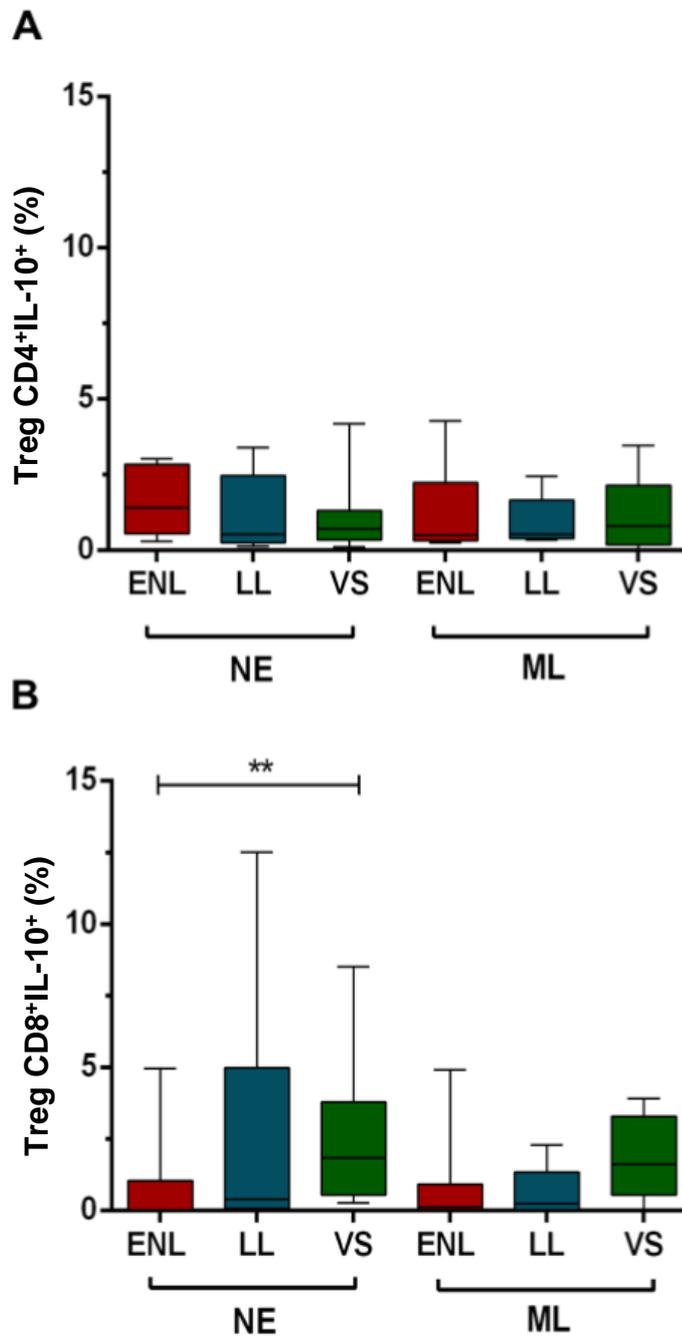
Visando a avaliação da atividade funcional das subpopulações de Treg, as células produtoras de TGF- $\beta$  e IL-10 foram analisadas *in vitro*, sendo a detecção dessas citocinas conduzida de modo intracelular. As Treg CD4<sup>+</sup>/TGF- $\beta$ <sup>+</sup> apresentaram-se significativamente reduzidas no grupo ENL [11,7% (CI: 0,54 – 38,9%) e 11,5% (CI: 0,31 – 35,14%)] em relação ao grupo LL [33,15% (CI: 13,3 – 64,4%) e 35,1% (11,2 – 69%)], ( $p=0,0434$ ; ( $p=0,0343$ ), com e sem a atuação do antígeno, respectivamente. Na condição NE, o grupo VS apresentou mediana de 26,1% (CI: 4,02 – 33,1%), com queda significativa na frequência dessas células quando as culturas foram estimuladas com ML [13,7% (CI: 3,33 – 31,5%)], ( $p=0,0391$ ; Figura 16A). Com relação às Treg CD8<sup>+</sup>/TGF- $\beta$ <sup>+</sup>, embora presentes em maior frequência nas culturas, do que as Treg CD4<sup>+</sup>, em todos os grupos estudados, não foram observadas diferenças significativas (Figura 16B).



**Figura 16: Determinação da frequência de linfócitos Treg CD4<sup>+</sup> (A) e CD8<sup>+</sup> (B) produtores de TGF-β.** Cada caixa “box plot” representa um grupo de pacientes, as barras externas são os valores máximos e mínimos e os traços internos as medianas. Foram analisados 10 ENL, 8 LL e 10 VS. LL: grupo de pacientes lepromatosos polares, ENL: grupo de pacientes com Eritema Nodoso Leproso, VS: grupo de voluntários saudáveis de área endêmica, NE: não estimulado, ML: estimulado com *M. leprae*. Os testes Mann-Whitney e Wilcoxon foram utilizados para análise estatística, sendo: \* $p < 0,05$ .

No que se refere a frequência de Treg CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup>, foi possível observar uma redução quando comparado com as Treg produtoras de TGF- $\beta$  em ambas condições de estímulo (Figura 17A e B). Em relação a essas células, somente foi constatada diferença significativa entre as Treg CD8<sup>+</sup> produtoras de IL-10 entre os ENL [0% (CI: 0 – 1,63%)] e o grupo VS [1,85 (0,26 – 8,51%)] ( $p=0,0024$ ; Figura 17B), sem a atuação do ML. Além disso, foi observado que o *M. leprae* modulou negativamente as frequências dessas subpopulações nos grupos LL e VS, mas não no grupo de pacientes ENL, cujos valores foram idênticos nas duas condições de cultura (NE e ML).

As culturas estimuladas com PHA (utilizado como controle positivo), geraram frequências maiores nas duas subpopulações de Treg produtoras de TGF- $\beta$  e IL-10 em todos os grupos estudados, no entanto, sem diferenças significativas entre eles (dados não mostrados).



**Figura 17: Determinação da frequência de linfócitos Treg CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> produtores de IL-10.** Cada caixa “box plot” representa um grupo de pacientes, as barras externas são os valores máximos e mínimos e os traços internos as medianas. Foram analisados 10 ENL, 8 LL e 10 VS. LL: grupo de pacientes lepromatosos polares, ENL: grupo de pacientes com Eritema Nodoso Leproso, VS: grupo de voluntários sadios de área endêmica, NE: não estimulado, ML: estimulado com *M. leprae*. Os testes Mann-Whitney e Wilcoxon foram utilizados para análise estatística, sendo \*\*p<0,01

## 5.8. Avaliação do ensaio imunoenzimático em sobrenadantes de cultura de PBMCs em resposta ao *M. leprae*.

A determinação dos níveis das citocinas IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-23 e IL-10, presentes em SNs de cultura de PBMCs cultivadas por 72h, frente aos antígenos de ML, foi realizada por ELISA.

Mediador de fase aguda, envolvida em respostas inflamatórias exacerbadas, a IL-6 foi produzida em altos níveis nos grupos de pacientes analisados de modo geral, especialmente nos SNs das culturas dos pacientes reacionais (ENL), tanto na condição NE [29145 pg/mL (CI: 27195 – 31508 pg/mL)], quanto em resposta ao *M. leprae* [30708 pg/mL (27646 – 31229 pg/mL)]. No grupo LL observou-se as medianas: NE= 27235 pg/mL (CI: 25891 – 28107 pg/mL) e ML= 23709 (CI: 20858 – 26792 pg/mL);  $p=0,0433$  e  $p=0,0031$ , respectivamente. No grupo VS os valores das medianas foram de NE= 8475 pg/mL (CI: 7983 – 9158 pg/mL) e ML= 8484 pg/mL (CI: 7680 – 8944);  $p<0,0001$  e  $p<0,0001$ , respectivamente (Figura 18A). Esses resultados reforçam a característica inflamatória aguda e sistêmica do ENL.

Outra citocina com funções pró-inflamatórias, conhecida principalmente por amplificar respostas Th1, e já descrita nas reações hansênicas, o IFN- $\gamma$  teve sua produção mais elevada no grupo ENL em comparação ao grupo LL, mas sem diferença significativa em qualquer das condições de cultura. De modo interessante, a produção dessa citocina atingiu níveis elevados no grupo de voluntários sadios [NE= 23091 pg/mL (CI: 18295 – 23348 pg/mL) e ML= 19379 pg/mL (CI: 17023 – 20263 pg/mL)], os quais foram significativamente maiores em comparação ao grupo ENL [NE= 16147 pg/mL (CI: 10029 – 19798 pg/mL);  $p=0,0080$  e ML= 12939 pg/mL (CI: 6778 – 18238 pg/mL);  $p=0,0140$  e, ainda em relação ao grupo LL [NE= 10265 pg/mL (CI: 53,51 – 14367pg/mL);  $p=0,0159$  e ML= 10523 (CI: 259,8 – 17866 pg/mL);  $p=0,0317$ ] nas condições sem estímulo (NE) e em resposta ao *M. leprae* (ML) respectivamente (Figura 18B).

Também foi avaliada a citocina IL-17, produzida por linfócitos Th17 e, nessa análise, os VS apresentaram maiores níveis da molécula sem o estímulo [NE= 750,7 pg/mL (CI: 39,73 – 1137 pg/mL)] em relação aos outros grupos. Entretanto, foi possível observar que os indivíduos com ENL [NE= 736 pg/mL (CI: 251,8 – 2197 pg/mL)] apresentaram maior frequência de IL-17 do que os LL [NE= 368,8 pg/mL (CI: 144,2 – 865,9 pg/mL)]. No entanto, não foram constatadas diferenças significativas

entre esses grupos (Figura 18C). Em resposta ao *M. leprae* os valores continuaram não diferindo significativamente entre os grupos, com medianas de: ENL [868,3 pg/mL (207,4 – 1182 pg/mL)], LL [329,7 pg/mL (GI: 37,82 – 614,2 pg/mL)] e VS [444,7 pg/mL (CI: 111,5 – 666,4 pg/mL)] mas, foi possível constatar uma redução nos pacientes ENL em comparação aos LL e VS. Esses dados nos levam a concluir que, pelo menos em nosso modelo de estudo, a IL-17 não participa da forma multibacilar da hanseníase e parece não estar envolvida na imunopatologia do ENL.

A IL-23 tem papel no desencadeamento e na manutenção de processos inflamatórios. Dessa forma, objetivou-se verificar sua participação no ENL. Embora seus níveis tenham sido mais altos no grupo de pacientes com ENL [2590 pg/mL (CI: 212,2 – 4116 pg/mL)] em comparação aos LL não reacionais [1345 pg/mL (CI: 31,61 – 2528 pg/mL)], a diferença não foi estatisticamente significativa. Frente ao antígeno do ML não houve variação entre os participantes do estudo (ENL: 1540 pg/mL CI: 1182 – 3780 pg/mL e LL: 1771 pg/mL CI: 354,1 – 2901 pg/mL). Interessante observar o fato do grupo VS ter produzido níveis mais altos dessa citocina, tanto nas culturas não estimuladas [NE= 3138 pg/mL (CI: 1957 – 5193 pg/mL)], quanto em resposta ao antígeno [ML= 3954 pg/mL (CI: 1978 – 5198 pg/mL)] com diferenças significativas em relação ao grupo LL ( $p=0,0159$  e  $p=0,0317$  respectivamente; Figura 18D).

Por fim, a IL-10, citocina reconhecidamente mediadora da forma lepromatosa polar da hanseníase, também foi avaliada. Apesar da IL-10 ter apresentado níveis mais elevados nos VS [1159 pg/mL (CI: 206 – 1511 pg/mL)] e no grupo LL [1076 pg/mL (CI: 757,1 – 2181 pg/mL)] em relação aos ENL [805,3 pg/mL (CI: 352,4 – 1711 pg/mL)], na ausência de estímulo (NE), não foi observada produção capaz de diferir significativamente entre os grupos analisados. Um dado que chamou atenção foi a modulação negativa induzida pelo *M. leprae* sobre a produção de IL-10 em todos os grupos estudados [ENL: 600,1 pg/mL (CI: 285,8 – 1249 pg/mL) e VS: 1044 pg/mL (CI: 138 – 1359 pg/mL) e LL [600,9 pg/mL (CI: 410,9 – 1605 pg/mL)] (Figura 18E).

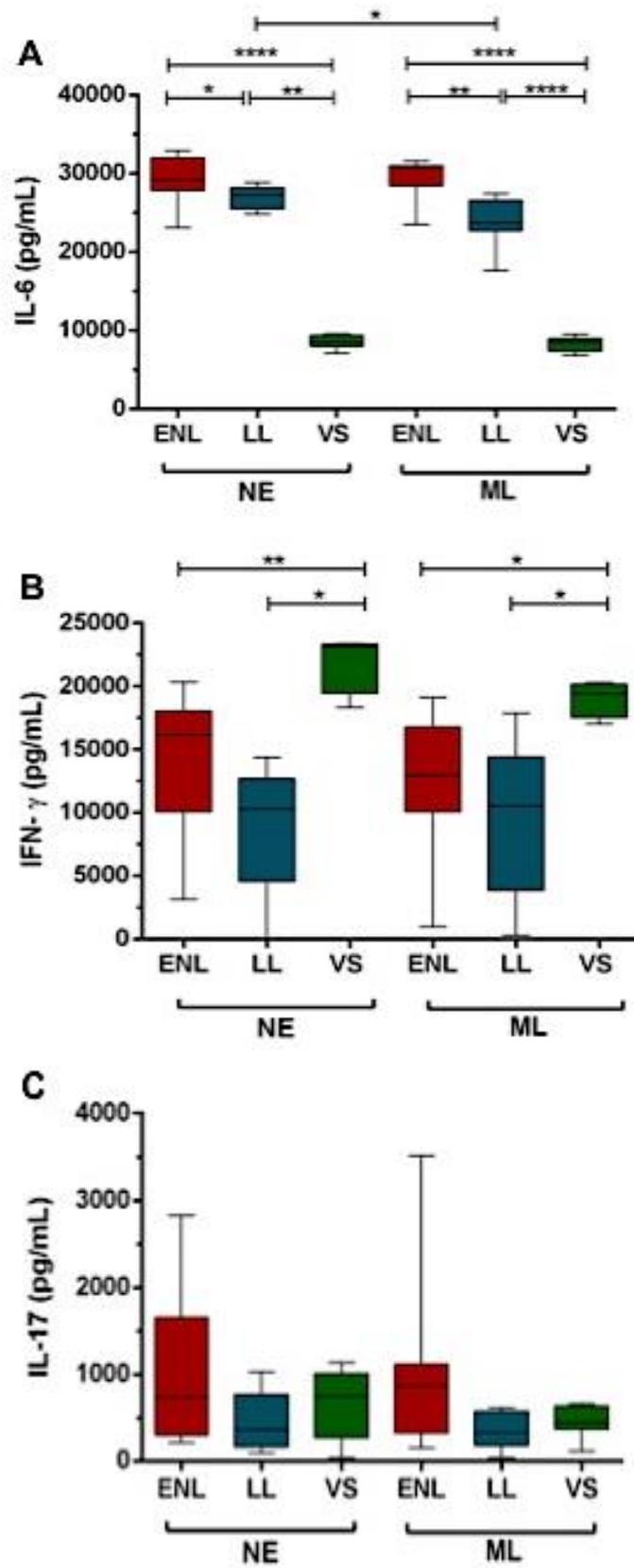
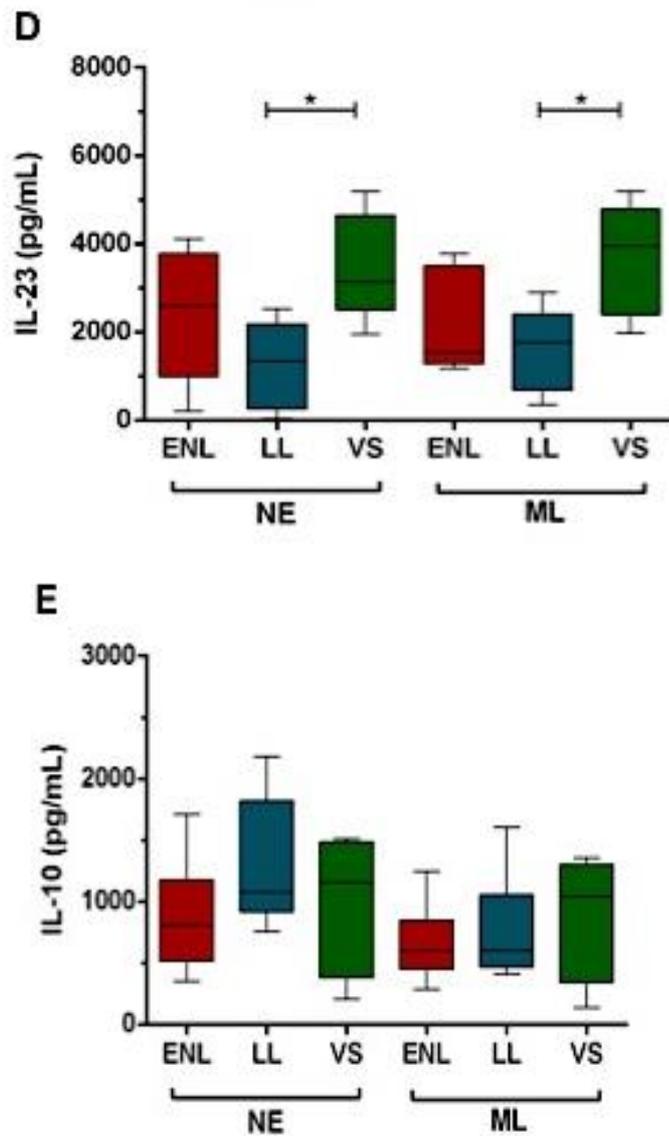


Figura 18.



**Figura 18: Produção de citocinas por PBMC, após culturas de 72h frente ao *M. leprae*. A: IL-6, B: IFN- $\gamma$ , C: IL-17, D: IL-23 e E: IL-10. Na representação gráfica mostrada nesta figura, cada "box plot" representa um grupo de participantes. A linha horizontal dentro das caixas representa a mediana de cada grupo e as linhas verticais abaixo e acima das caixas representam os valores mínimos e máximos respectivamente. LL: pacientes lepromatosos polares, ENL: pacientes com Eritema Nodoso Leproso, VS: voluntários sadios, NE: não estimulado, ML: estimulado com ML. Os testes Mann-Whitney e Wilcoxon foram utilizados para análise estatística, sendo \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,0001$ .**

## 6. DISCUSSÃO

Os episódios reacionais da hanseníase são exacerbações inflamatórias agudas e, por vezes graves, promovidas por um desbalanço entre a resposta imune do hospedeiro e o patógeno, que ocorrem em cerca de 30 a 50% dos pacientes com a doença (Fischer, 2017). A reação tipo 2 ou ENL gera muita dor, sofrimento e prejuízo ao doente, sendo a maior causa das internações na hanseníase, podendo levar ao óbito (Walker et al., 2015). Por isso, diversos estudos visam à investigação de mecanismos imunológicos e a identificação de biomarcadores, que possam explicar, prever e controlar os eventos subsequentes à abertura do ENL.

Visando contribuir para o entendimento dos fatores associados ao ENL, esse trabalho avaliou 20 pacientes lepromatosos polares (LL), doze deles na abertura do ENL, moradores do Rio de Janeiro e acompanhados no Ambulatório de Hanseníase da Fiocruz, além de 10 indivíduos sadios de área endêmica para a doença, também moradores do Rio de Janeiro.

Diversas são as hipóteses associadas ao desenvolvimento do ENL e, entre elas, há quase duas décadas, um trabalho apontou o IB inicial alto (>4) como um fator de risco para a reação (Manandhar et al., 1999). Outros trabalhos abordaram o assunto e ratificaram essa hipótese (Vieira et al., 1996; Voorend & Post, 2013). Com efeito, a média do IB dos pacientes previamente ao desenvolvimento do ENL era maior do que 4, enquanto que, no momento da reação a média foi de 3,4. Dessa forma, no que tange a relação IB elevado e propensão ao ENL, os dados do presente estudo estão de acordo com anteriormente observado em dados na literatura.

A ativação da resposta imune celular é classicamente associada à gênese e às complicações relacionadas ao ENL e, na medida em que novas subpopulações de linfócitos T vêm sendo descritas, a comunidade científica vem dispensando esforços para a compreensão sobre a sua participação na imunopatogenia da hanseníase e seus estados reacionais (Nath et al., 2015; Polycarpou, Walker, Lockwood, 2017; Saini et al., 2017). Entretanto, os dados divergentes são observados e, apesar de muitos anos de pesquisas, as bases para a hiporesponsividade imunológica na forma lepromatosa da hanseníase até o momento não é consensual, embora a hipótese da existência de linfócitos T supressores, amplamente considerada na década de 1980, tenha sido descartada, já que os resultados gerados por diferentes grupos não foram suficientes para a caracterização da participação dessa célula na hanseníase (Kaplan,

1988; Bloom et al., 1992). Assim, admite-se que a ausência de resposta não seja devida à tolerância central de linfócitos T supressores *M. leprae*-específicos, mas a outras subpopulações e mediadores periféricos. Também não se pode descartar que, componentes do próprio patógeno, dentre os quais destaca-se o PGL-1, exerçam regulação negativa na resposta imune celular, como mostrado por Prasad e colaboradores (1987).

Com a descoberta dos linfócitos Treg e de inúmeros estudos sobre o desenvolvimento, diferenciação e funções atribuídas a essa subpopulação (Josefowicz & Rudensky, 2012), essas células foram identificadas como sendo as populações de linfócitos T supressores antigas, responsáveis pela hiporresponsividade antígeno-específica observada na forma LL da hanseníase.

Inicialmente, a frequência de linfócitos T sanguíneos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> totais foi avaliada a fim de caracterizar o perfil geral dessas subpopulações. Os dados não mostraram ausência de variação na mediana das frequências dessas células entre os grupos estudados. Apesar de serem alvo de estudos há tempos, os dados também divergem, tanto em populações do sangue periférico, quanto de lesões cutâneas, principalmente quando são considerados participantes de origens diferentes, por consequência da genética populacional (Misch et al., 2010).

Entretanto, com relação às subpopulações de sangue periférico, nos ensaios *ex vivo*, uma razão CD4/CD8 de 2:1 foi encontrada em média, entre os dois grupos de pacientes avaliados, estando de acordo com o trabalho de Negera e colaboradores (Negera et al., 2017). É importante frisar que os voluntários sadios incluídos em no presente trabalho não possuíam doenças autoimunes, infecções recentes, não estavam em uso de anti-inflamatórios ou antialérgicos, e os pacientes não possuíam outras comorbidades imunológicas. Assim, a razão frente ao estímulo do *M. leprae* foi também avaliada para observar de fato o papel do antígeno na modulação da frequência dos linfócitos T. Com base no resultado obtido, é possível sugerir que o aumento da razão CD4/CD8 nos pacientes reacionais possa estar relacionada à inflamação aguda, associada à quebra da tolerância antígeno-específica, classicamente observada nessa forma lepromatosa da hanseníase.

Nesse contexto, também é possível que as frequências elevadas de linfócitos Treg CD4<sup>+</sup>, observadas *ex vivo* e em resposta ao *M. leprae*, para o grupo de pacientes LL, esteja associada à baixa responsividade e replicação bacilar. Em contrapartida, a diminuída frequência de Treg CD4<sup>+</sup> analisada nos pacientes ENL possivelmente está

atrelada a reativação celular, combate ao patógeno, culminando na abertura do episódio reacional. A fragmentação do bacilo, sobretudo após o início da PQT, pode desencadear uma resposta inflamatória aguda pela liberação de antígenos, promovendo a redução na frequência de linfócitos Treg CD4<sup>+</sup> e o aumento de IL-6 e IL-23, contribuindo assim para a abertura do ENL. Esse conjunto de dados são corroborados pelos estudos de vários autores, dentre os quais, Attia e colaboradores (2010 e 2014), Saini e colaboradores (2016), Vieira e colaboradores (2016) e Negera e colaboradores (2017). O grupo de Negera foi além e investigou a frequência das células Treg sobre a influência da prednisona, quando do tratamento de pacientes com ENL, na Etiópia (Negera et al., 2017). Os resultados revelaram que as Treg CD4<sup>+</sup> estavam em baixa frequência nos pacientes ENL e, a partir da administração da droga imunossupressora para tratamento da reação, houve a recuperação e a manutenção dessas células no sangue periférico. Assim, os autores defendem que a redução na frequência das Treg observada no ENL pode estar diretamente associada ao desenvolvimento do episódio reacional (Negera et al., 2017). Esses dados foram observados em outras doenças, como dermatite atópica (Ma et al., 2013), tuberculose (Li et al., 2015) e também descritos em pacientes com sepse (Hiraki et al., 2012).

Dentre as subpopulações de Treg, as CD8<sup>+</sup>, foram as primeiras a serem descritas. Entretanto, por muito tempo o papel dessas células não foi esclarecido. Hoje sabe-se que as funções das células Treg CD8<sup>+</sup> estão associadas ao controle da autoimunidade, especialmente em sítios de privilégio imunológico, como os olhos (Wang & Alexander, 2009). Além disso, Li e colaboradores (2014) identificaram linfócitos Treg CD8<sup>+</sup>/CD122<sup>+</sup> produtores de PD-1 com atividade funcional semelhante a células de memória central e mais potentes do que as Treg CD8<sup>+</sup>/CD122<sup>+</sup>/PD-1<sup>-</sup> em suprimir a resposta de linfócitos T efetores (Li et al., 2014). Na hanseníase, também já foram identificados linfócitos Treg CD8<sup>+</sup> em crianças abaixo de 15 anos com as formas multibacilares da doença (Fernandes et al., 2013) e em maior frequência no sangue e lesão de pele de pacientes adultos com a forma LL, quando comparados a pacientes BT (Bobosha et al., 2014). Neste trabalho a frequência das Treg CD8<sup>+</sup> foram mais baixas no grupo de pacientes LL, em comparação ao grupo ENL. Em um trabalho recente, Negera e colaboradores também observaram o mesmo fenômeno (Negera et al., 2017). No mesmo estudo, avaliando a influência da prednisona (única droga imunossupressora usada na Etiópia para o tratamento das reações hansênicas) em pacientes LL que haviam passado por episódio de ENL, os autores observaram a

manutenção da frequência das Treg CD8<sup>+</sup> semelhantes aos pacientes lepromatosos. Assim, baseado nas observações do presente estudo e outros já descritos, sugere-se que as Treg CD8<sup>+</sup> não influenciam na abertura do ENL. De forma semelhante, em um trabalho com pacientes com psoríase, foi detectada uma frequência diminuída de Treg CD8<sup>+</sup> no sangue periférico, em comparação a indivíduos saudáveis. Entretanto, nesse trabalho foi observado que a redução ocorreu devido à migração dessas células para o sítio da lesão. Além disso, os autores concluíram que a estimulação *in vitro* de linfócitos T CD8<sup>+</sup> com o ácido retinóico *in situ* promovia sua mudança para Treg CD8<sup>+</sup> com grande poder supressor (Fleissner et al., 2011). Tomando como base os trabalhos do grupo de Negera e de Fleissner, um estudo longitudinal de acompanhamento de pacientes LL, no momento do diagnóstico e na abertura do ENL, com avaliação das frequências de Treg nesses indivíduos, pode ser importante para avaliar a ocorrência desses fenômenos nos pacientes do nosso serviço. Além disso, em nosso país, e mais especificamente em nosso ambulatório, a droga de escolha para o tratamento da reação tipo 2 ou ENL é a talidomida e, até o momento, não é de nosso conhecimento a existência de trabalhos comparando o uso desta medicação no ENL e o comportamento das Tregs. Os dados são escassos, e em apenas um trabalho recente foi discutido o papel da talidomida sobre as células Treg, mas com foco estrito em doenças autoimunes (Sakkas et al., 2017).

Visando a avaliação funcional das Treg *ex vivo*, moléculas com papel conhecido na atividade dessas, dentre as quais o CTLA-4, também foram investigadas. A frequência de Treg CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> positivas para a expressão de CTLA-4 na superfície celular, apresentou-se de forma extremamente reduzida em todos os grupos do estudo. Esse resultado é semelhante ao estudo de Vieira e colaboradores (2016), que investigaram a presença de CTLA-4 na superfície de células Treg CD4<sup>+</sup> *ex vivo* de pacientes com reação tipo 1 em comparação a pacientes com reação tipo 2 e, do mesmo modo, encontraram frequência de Treg CTLA-4<sup>+</sup> muito baixa nos grupos estudados. Esses dados também estão de acordo com o trabalho de Li e colaboradores que analisaram pacientes com tuberculose multirresistente (MDR) e observaram frequência diminuída de Treg expressando CTLA-4 na superfície celular, em torno de 0,5% (Li et al., 2015). A molécula CTLA-4 é constitutiva das Treg, porém, a expressão na superfície da membrana citoplasmática ocorre apenas após estímulo e sua ativação (Morikawa & Sakaguchi, 2014). Como a análise dessa subpopulação foi conduzida no sangue periférico, pode ser que outros mecanismos de supressão

participem desse ambiente, de modo a englobar e expandir o controle da resposta imune.

Analisando a frequência das Treg CD8<sup>+</sup>/CTLA-4<sup>+</sup> foi possível observar que houve um aumento dessas células em relação às Treg CD4<sup>+</sup>, todavia, nenhuma diferença estatística foi observada entre os indivíduos estudados. Até o momento, apenas um estudo avaliou as Treg CD8<sup>+</sup> associadas à expressão de CTLA-4. Segundo os seus autores, a ativação das células por peptídeos próprios pode ter levado ao aumento da expressão de CTLA-4 de superfície, inibindo assim as respostas inflamatórias locais via competição com CD28 (Jarvis et al., 2008). Logo, a atuação de outros mediadores celulares como PD1, ICOS e CD95 podem estar relacionados às Treg, além da produção de citocinas por essas células.

Como a molécula CTLA-4 não parece ser crucial à atuação das Treg nos participantes avaliados, um melhor entendimento do mecanismo de supressão por essas células se fez necessário. Assim, foi investigada a frequência de linfócitos Treg produtores de TGF- $\beta$  e IL-10, através da análise *in vitro* em resposta ao *M. leprae* e de co-estímulos (anti-CD28 e anti-CD49d). Foi observado que as células Treg CD4<sup>+</sup> produtoras de IL-10 encontravam-se em menor frequência do que as Treg CD4<sup>+</sup> produtoras de TGF- $\beta$  nos dois grupos clínicos estudados e nos voluntários sadios. Esse dado também foi observado por Tarique e colaboradores (2017), comparando pacientes pauci- e multibacilares de hanseníase, com frequência de 40% de Treg CD4<sup>+</sup> produtoras de TGF- $\beta$  e 10% de Treg CD4<sup>+</sup> produtoras de IL-10 nos MB (Tarique et al., 2017). O resultado obtido por esse grupo reforça os observados no presente trabalho e sugere que as Treg CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> exclusivamente produtoras de IL-10 podem não ser cruciais para a manutenção da resposta ao *M. leprae* em pacientes LL.

O TGF- $\beta$  é uma citocina pleiotrópica, atuando na regulação da resposta imune celular, proliferação e diferenciação de linfócitos Th17, Th9 e Treg (Wan & Flavel 2009). Neste estudo, as células Treg produtoras de TGF- $\beta$  prevaleceram na forma LL, mas não no grupo ENL. Esse dado demonstra que essas células atuam no controle negativo da resposta Th1 nos pacientes LL e sua baixa frequência no ENL pode estar associada ao desbalanço e na transitoriedade da resposta imune no quadro reacional. Um trabalho do grupo de Saini e colaboradores (2014) também observou frequência aumentada de Treg CD4<sup>+</sup> produtoras de TGF- $\beta$  nos pacientes LL, quando as formas

clínicas não reacionais da hanseníase foram estudadas e comparadas (Saini et al., 2014). Em outro trabalho do mesmo grupo observou-se que as frequências de Treg CD4<sup>+</sup> produtoras de TGF- $\beta$  estão mais elevadas nos pacientes LL do que nos ENL. Ademais, as Treg CD8<sup>+</sup> produtoras de TGF- $\beta$  foram encontradas em frequência maior do que as Treg CD4<sup>+</sup>, embora a distribuição dos fenótipos celulares entre os grupos estudados tenha sido semelhante (Saini et al., 2016).

Dando continuidade aos estudos com as Treg na hanseníase e, mais especificamente no ENL, alguns trabalhos avaliaram o perfil celular, assim como a produção de mediadores de resposta imune preponderantes nesse tipo reacional. Um estudo observou o aumento de IL-23A e IL-17 no sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes com ENL comparado com pacientes LL (Saini et al 2016). Já Tarique e colaboradores (2017) realizando estudos *in vitro* demonstraram que as Treg CD4<sup>+</sup> podem sofrer uma mudança e serem polarizadas para o perfil Th1 ou Th17, a partir do manejo das culturas com a adição ou a subtração de IL-12 e IL-23, levando à ativação de *STAT4* e *STAT3* e, conseqüentemente, à produção de IFN- $\gamma$  e IL-17, respectivamente. Os autores sugeriram que a replicação elevada do bacilo pode promover o descontrole imunológico, elevando os níveis das citocinas inflamatórias IL-17 e IL-23 (Tarique et al., 2017). Porém, com base nos resultados obtidos pelos autores, essas moléculas não apresentaram variações entre as formas clínicas BT/TT e BL/LL, um dado de certa forma inesperado. Tomando como base esses achados, é possível sugerir que, em presença de IL-17 e IL-23, possa ocorrer a polarização das Treg CD4<sup>+</sup> para o perfil celular Th17 e, dessa forma, desencadear a agudização da resposta inflamatória pela fragmentação do patógeno e liberação maciça de antígenos, compatível com os episódios reacionais.

Com base nas análises realizadas nos sobrenadantes das culturas, a IL-6 apresentou indícios de maior atuação no ENL. De fato, a análise de lesão cutânea de pacientes indianos com ENL corroboram com esse achado (Belgaumkar et al., 2007). Avaliações genéticas demonstraram que polimorfismos no gene da IL-6 podem atuar como fator preditivo para o ENL e, ser inclusive um fator de risco para o desenvolvimento da reação (Sousa et al., 2012, Sales-Marques et al., 2017). Na psoríase, doença com características semelhantes ao episódio reacional, a IL-6 atua diminuindo a atividade das Treg, reduzindo a supressão da resposta imune e, ainda, estimulando a fosforilação de *STAT3* em linfócitos T (Goodman et al., 2009). Em outro

trabalho foi mostrado que, na presença de TGF- $\beta$ , as citocinas IL-6, IL17 e IL-23, induzem a diferenciação de linfócitos T “naïve” em células Th17, a partir da fosforilação de *STAT3* e *RORC* (Jin & Dong, 2013). As Th17 desempenham papel fundamental no combate a doenças autoimunes, através da produção de IL-17 e IL-22. O balanço entre Treg e Th17 está cada vez mais em voga no estudo de doenças inflamatórias. Entretanto, não há consenso quanto a esse balanço na hanseníase. Para investigar a presença de células Th17 nos pacientes e, na impossibilidade de caracterizá-las fenotipicamente no presente estudo, a estratégia utilizada foi avaliar a produção de IL-17 nos sobrenadantes de cultura de PBMC, frente aos antígenos de *M. leprae*. Embora tenha sido encontrada uma produção aumentada dessa citocina no grupo ENL em comparação com o grupo não reacional, as diferenças não foram significativas, talvez em decorrência do número de pacientes analisados. Assim, na coorte aqui estudada a IL-17 não parece estar envolvida na gênese do ENL. Em acordo com os resultados desse estudo, trabalho de mestrado realizado recentemente em nosso laboratório e atualmente submetido à publicação, avaliou a expressão gênica dos fatores de transcrição *STAT3* e *RORC* em grupos de pacientes LL não reacionais e em ENL. Os resultados obtidos não diferiram significativamente entre os grupos (Silva, PHL; 2016).

O IFN- $\gamma$  é uma molécula classicamente descrita por atuar conferindo contenção do patógeno aos pacientes do polo tuberculoide (Nery et al., 2015). Porém, já foi demonstrado que essa citocina encontra-se elevada na abertura dos episódios reacionais e que, ainda, associada à IL-12, modula negativamente a IL-10 (Sreenivasan et al., 1998). No presente estudo foram observados resultados semelhantes aos descritos anteriormente. No entanto, chama atenção níveis elevados de IFN- $\gamma$  detectados nos voluntários sadios. Esse resultado pode ser atribuído a atuação das moléculas co-estimuladoras CD49d e, principalmente, o CD28, utilizadas nos ensaios *in vitro*. Esses dados já foram observados e associados à presença de moléculas coestimuladoras em artrite reumatoide (Verhoe et al., 1999) e na infecção por *Trypanosoma cruzi* (Martins et al., 2004).

A IL-10 é um citocina fundamental no controle das respostas inflamatórias e na proteção contra danos aos tecidos (Ouyang et al., 2010), além de participar da hiporresponsividade antígeno-específica característica dos pacientes lepromatosos (Azevedo et al., 2017). Como observado nos resultados obtidos neste trabalho,

quando avaliamos a frequência de Treg CD4<sup>+</sup> produtoras de IL-10, esta não variou significativamente entre os grupos de pacientes. Dessa forma, os níveis aumentados de IL-10 observados nos sobrenadantes de PBMC de pacientes LL devem ser produto da atividade funcional de outros fenótipos celulares.

Os achados do presente trabalho devem ser considerados em conjunto com os de outros autores e algumas observações merecem destaque. O *M. leprae* é um patógeno que sofreu distribuição mundial e a partir da genotipagem da bactéria foram detectados 16 SNPs que caracterizam as diferentes cepas do patógeno. Essa diversidade é atribuída principalmente a associações geográficas que estão intimamente relacionadas com processos de migração e adaptação do bacilo (Monot et al., 2009). Assim, as variações no perfil das citocinas analisadas nesse trabalho, com pacientes que foram infectados principalmente pela cepa SNP2, não devem ser comparadas diretamente com trabalhos que estudaram pacientes indianos ou africanos, pois, como já mencionado devem existir variações fenotípicas atreladas às variações entre as cepas do ML prevalente em cada região e ainda à variações epigenéticas.

Tomados em conjunto, os dados do presente estudo sugerem que, na forma lepromatosa polar da hanseníase, em um ambiente onde se destaca a presença de IL-10, os linfócitos Treg são as células cruciais para suprimir a resposta imune celular do tipo Th1. Ademais, em algum momento do curso clínico da doença, ocorre um desbalanço da resposta imune, quando as Treg são moduladas negativamente, tornando o micro-ambiente do hospedeiro permissível ao desencadeamento do ENL. Enquanto dados consistentes com ativação funcional de subpopulações Th1 e produção de citocinas pró-inflamatórias como o IFN- $\gamma$  são descritos por vários grupos, para explicar o desencadeamento da reação tipo 1 ou reação reversa, tanto na forma PB quanto em pacientes BL (Andrade et al., 2015; DosSantos et al., 2016), o mecanismo preciso envolvido na imunopatogênese da reação tipo 2 (ENL) permanece como um tema instigante a ser esclarecido.

## 7. CONCLUSÕES

- Na abertura da reação tipo 2 (ENL), a frequência reduzida dos linfócitos T reguladores (Treg) CD4<sup>+</sup>, junto à frequência elevada dessas células nos pacientes lepromatosos polares (LL) sugere que, essa subpopulação esteja envolvida na gênese do processo reacional. Em contraposição, as frequências inalteradas das Treg CD8<sup>+</sup> sugerem que esta subpopulação não participe desse processo;
- A baixa expressão de CTLA-4<sup>+</sup> na superfície das Treg nos pacientes dos grupos ENL e LL sugere que essa molécula não seja fundamental para atuação supressora dessas células nesses grupos;
- A frequência significativamente menor de linfócitos Treg CD4<sup>+</sup> produtores de TGF- $\beta$ , observada no grupo ENL em comparação ao grupo LL, em nosso modelo de estudo, sugere que essa subpopulação seja regulada negativamente no ENL;
- Entre as citocinas analisadas, a IL-6 aparenta ser aquela com maior atuação na gênese do ENL. Com base nos resultados obtidos para IL-17 e IL-23, a diferenciação para o padrão Th17 parece não ocorrer, reforçando a importância da participação das Treg CD4<sup>+</sup> na manutenção da regulação da resposta imune na forma LL não reacional da hanseníase.

## 8. REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. 8<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015.

Adams LB, Pena MT, Sharma R, Hagge DA, Schurr E, Truman RW. Insights from animal models on the immunogenetics of leprosy: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107 Suppl 1:197-208.

Alter A, Alcais A, Abel L, Schurr E. Leprosy as a genetic model for susceptibility to common infectious diseases. *Hum Genet*. 2008;123(3):227-235.

Alter A, de Leseleuc L, Van Thuc N, Thai VH, Huong NT, Ba NN, et al. Genetic and functional analysis of common MRC1 exon 7 polymorphisms in leprosy susceptibility. *Hum Genet*. 2010;127(3):337-348.

Andrade PR, Pinheiro RO, Sales AM, Illarramendi X, Barbosa MG, Moraes MO, et al. Type 1 reaction in leprosy: a model for a better understanding of tissue immunity under an immunopathological condition. *Expert Rev Clin Immunol*. 2015;11(3):391-407.

Areeshi MY, Mandal RK, Dar SA, Jawed A, Wahid M, Lohani M, et al. Impact of TNF - 308 G>A (rs1800629) gene polymorphism in modulation of leprosy risk: a reappraise meta-analysis of 14 case-control studies. *Biosci Rep*. 2017;37(5):1-7.

Attia EA, Abdallah M, Saad AA, Afifi A, El Tabbakh A, El-Shennawy D, et al. Circulating CD4+ CD25 high FoxP3+ T cells vary in different clinical forms of leprosy. *Int J Dermatol*. 2010;49(10):1152-1158.

Attia EA, Abdallah M, El-Khateeb E, Saad AA, Lotfi RA, Abdallah M, et al. Serum Th17 cytokines in leprosy: correlation with circulating CD4(+) CD25 (high) FoxP3 (+) T-regs cells, as well as down regulatory cytokines. *Arch Dermatol Res*. 2014;306(9):793-801.

Avanzi C, Del-Pozo J, Benjak A, Stevenson K, Simpson VR, Busso P, et al. Red squirrels in the British Isles are infected with leprosy bacilli. *Science*. 2016;354(6313):744-747.

Avelleira JCR, Bernardes Filho F, Quaresma MV, Vianna FR. History of leprosy in Rio de Janeiro. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2014;89(3):515-518.

Azevedo MCS, Marques H, Binelli LS, Malange MSV, Devides AC, Silva EA, 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*. 2017;206(6):429-439.

Barreto JG, Guimaraes Lde S, Leao MR, Ferreira DV, Lima RA, Salgado CG. Anti-PGL-I seroepidemiology in leprosy cases: household contacts and school children from a hyperendemic municipality of the Brazilian Amazon. *Lepr Rev*. 2011;82(4):358-70.

Beiguelman B, Quagliato R. Sobre a Reação de Mitsuda. Rev Bras Leprol. 1964;32 (1): 39-46.

Belgaumkar VA, Gokhale NR, Mahajan PM, Bharadwaj R, Pandit DP, Deshpande S. Circulating cytokine profiles in leprosy patients. Lepr Rev. 2007;78(3):223-30.

Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. Nat Immunol 2005; 6:353-360.

Berrington WR, Macdonald M, Khadge S, Sapkota BR, Janer M, Hagge DA, et al. Common polymorphisms in the NOD2 gene region are associated with leprosy and its reactive states. J Infect Dis. 2010;201(9):1422-1435.

Bloom BR, Modlin RL, Salgame P. Stigma variations: observations on suppressor T cells and leprosy. Annu Rev Immunol, 1992; 10:453-488.

Bobosha K, Wilson L, van Meijgaarden KE, Bekele Y, Zewdie M, van der Ploeg-van Schip JJ, et al. T-cell regulation in lepromatous leprosy. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(4):1-8.

Brasil. Lei nº. 11.520, de 18 de setembro de 2007. Dispõe sobre a concessão de pensão especial às pessoas atingidas pela hanseníase que foram submetidas a isolamento e internação compulsórios. Diário Oficial da União 19 set 2007, Página 1.

Brasil. Lei nº. 9.010, de 29 de março de 1995. Dispõe sobre a terminologia oficial relativa à hanseníase e dá outras providências. Diário Oficial da União. Seção 1 - 30/3/1995, Página 4509.

Browne SG. Some aspects of the history of leprosy: the leprosie of yesterday. Proc R Soc Med. 1975;68(8):485-493.

Cambier CJ, O'Leary SM, O'Sullivan MP, Keane J, Ramakrishnan L. Phenolic Glycolipid Facilitates Mycobacterial Escape from Microbicidal Tissue-Resident Macrophages. Immunity. 2017;47(3):552-565.

Campbell DJ, Koch MA. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. Nat Rev Immunol. 2011;11(2):119-130.

Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Dias-Baptista IM, Maniero VC, Venturini J, et al. IFNG +874 T>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians. Hum Genet. 2010;128(5):481-490.

Cardoso CC, Pereira AC, de Sales Marques C, Moraes MO. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. Future Microbiol. 2011;6(5):533-549a.

Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Duraes SM, Ribeiro-Alves M, Nery JA, et al. TNF -308G>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians: a genetic epidemiology assessment, meta-analysis, and functional study. J Infect Dis. 2011;204(8):1256-1263b.

Chaudhry A, Rudensky AY. Control of inflammation by integration of environmental cues by regulatory T cells. *J Clin Invest*. 2013;123(3):939-944.

Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*. 2001;409(6823):1007-1011.

Corthay A. How do regulatory T cells work? *Scand J Immunol*. 2009;70(4):326-336.

Couto DSRG, Franca K, Castillo D, AlHarbi M, Lotti T, Fioranelli M, et al. A synopsis of the history of Hansen's disease. *Wien Med Wochenschr*. 2017;167(Suppl 1):27-30.

Cruz D, Watson AD, Miller CS, Montoya D, Ochoa MT, Sieling PA, et al. Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy. *J Clin Invest*. 2008;118(8):2917-2928.

Cunha C, Pedrosa VL, Dias LC, Braga A, Chrusciak-Talhari A, Santos M, et al. A historical overview of leprosy epidemiology and control activities in Amazonas, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48 Suppl 1:55-62.

de Freitas MR, Said G. Leprous neuropathy. *Handb Clin Neurol*. 2013;115:499-514.

de Sousa JR, Sotto MN, Simoes Quaresma JA. Leprosy As a Complex Infection: Breakdown of the Th1 and Th2 Immune Paradigm in the Immunopathogenesis of the Disease. *Front Immunol*. 2017;8(1635):1-8.

Diório SM. Aspectos microbiológicos e moleculares do *Mycobacterium leprae*. Em: Hanseníase avanços e desafios, Brasília. 2014; p. p.67-79.

Domozych R, Kim E, Hart S, Greenwald J. Increasing incidence of leprosy and transmission from armadillos in Central Florida: A case series. *JAAD Case Rep*. 2016;2(3):189-192.

Dos Santos LN, da Silva PH, Alvim IM, Nery JA, Lara FA, Sarno EN, et al. Role of T EFFECTOR/MEMORY Cells, TBX21 Gene Expression and T-Cell Homing Receptor on Type 1 Reaction in Borderline Lepromatous Leprosy Patients. *PLoS One*. 2016;11(10):1-19.

Duppre NC, Camacho LA, Sales AM, Illarramendi X, Nery JA, Sampaio EP, et al. Impact of PGL-I seropositivity on the protective effect of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(6):1-8.

Fernandes C, Goncalves HS, Cabral PB, Pinto HC, Pinto MI, Camara LM. Increased frequency of CD4 and CD8 regulatory T cells in individuals under 15 years with multibacillary leprosy. *PLoS One*. 2013;8(11):1-9.

Fischer M. Leprosy - an overview of clinical features, diagnosis, and treatment. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2017;15(8):801-827.

Fleissner D, Loser K, Hansen W, Dissemond J, Korber A, Beissert S, et al. In vitro induced CD8+ regulatory T cells inhibit skin inflammation. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. 2011;1(3):208-214.

Flynn MJ, Hartley JA. The emerging role of anti-CD25 directed therapies as both immune modulators and targeted agents in cancer. *Br J Haematol*. 2017;179(1):20-35.

Fonseca AB, Simon MD, Cazzaniga RA, de Moura TR, de Almeida RP, Duthie MS, et al. The influence of innate and adaptative immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy. *Infect Dis Poverty*. 2017;6(5):1-8.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4(4):330-336.

Frota CC, Lima LN, Rocha Ada S, Suffys PN, Rolim BN, Rodrigues LC, et al. *Mycobacterium leprae* in six-banded (*Euphractus sexcinctus*) and nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in Northeast Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(Suppl 1):209-213.

Gallo MEN, Sampaio EP, Nery JAC, Moraes MO, Antunes SLG, Pessolani MCV, Sarno EN. Hanseníase: Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Imunológicos. Em: Coura, JR (ed.) *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*, Rio de Janeiro, RJ. Ed. Guanabara Koogan. 2013; p.1383-1394.

Garcia P, Alencar D, Pinto P, Santos N, Salgado C, Sortica VA, et al. Haplotypes of the IL10 gene as potential protection factors in leprosy patients. *Clin Vaccine Immunol*. 2013;20(10):1599-1603.

Garín MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollon E, Wait R, Lechler RI. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood*. 2007;109(5):2058-2065.

Gaschignard J, Grant AV, Thuc NV, Orlova M, Cobat A, Huong NT, et al. Pauci- and Multibacillary Leprosy: Two Distinct, Genetically Neglected Diseases. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(5):1-20.

Goldberg AC, Rizzo LV. MHC structure and function - antigen presentation. Part 1. *Einstein (Sao Paulo)*. 2015;13(1):153-156a.

Goldberg AC, Rizzo LV. MHC structure and function - antigen presentation. Part 2. *Einstein (Sao Paulo)*. 2015;13(1):157-162b.

Goodman WA, Levine AD, Massari JV, Sugiyama H, McCormick TS, Cooper KD. IL-6 signaling in psoriasis prevents immune suppression by regulatory T cells. *J Immunol*. 2009;183(5):3170-3176.

Hamilton HK, Levis WR, Martiniuk F, Cabrera A, Wolf J. The role of the armadillo and sooty mangabey monkey in human leprosy. *Int J Dermatol*. 2008;47(6):545-550.

Hart BE, Tapping RI. Genetic Diversity of Toll-Like Receptors and Immunity to *M. leprae* Infection. *J Trop Med*. 2012;2012(415057):1-12.

Hiraki S, Ono S, Tsujimoto H, Kinoshita M, Takahata R, Miyazaki H, et al. Neutralization of interleukin-10 or transforming growth factor-beta decreases the

percentages of CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in septic mice, thereby leading to an improved survival. *Surgery*. 2012;151(2):313-322.

Hunter SW, Brennan PJ. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. *J Bacteriol*. 1981;147(3):728-735.

Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol*. 2015;16(4):343-353.

Jarvis LB, Goodall JC, Gaston JS. Human leukocyte antigen class I-restricted immunosuppression by human CD8+ regulatory T cells requires CTLA-4-mediated interaction with dendritic cells. *Hum Immunol*. 2008;69(11):687-695.

Jin W, Dong C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerg Microbes Infect*. 2013;2(9):1-5.

Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:531-564.

Kamath S, Vaccaro SA, Rea TH, Ochoa MT. Recognizing and managing the immunologic reactions in leprosy. *J Am Acad Dermatol*. 2014;71(4):795-803.

Kaplan G. The efficacy of a cell-mediated reaction in the disposal of *M. leprae* in human skin. *Immunol Lett*, 1988; 19(3):223-227.

Kaplan G, Cohn ZA. Leprosy and cell-mediated immunity. *Curr Opin Immunol*. 1991;3(1):91-96.

Kirchheimer WF. The role of arthropods in the transmission of leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1976;44(1-2):104-107.

Kiszewski CA, Becerril E, Baquera J, Aguilar LD, Hernandez-Pando R. Expression of transforming growth factor-beta isoforms and their receptors in lepromatous and tuberculoid leprosy. *Scand J Immunol*. 2003;57(3):279-285.

Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med*. 2003;9(5):525-532.

Lastória JC, Abreu MAMM. Hanseníase: diagnóstico e tratamento. *Diagn Tratamento*. 2012;17(4):173-179.

Li N, Xie WP, Kong H, Min R, Hu CM, Zhou XB, et al. Enrichment of regulatory T-cells in blood of patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2015;19(10):1230-1238.

Li S, Xie Q, Zeng Y, Zou C, Liu X, Wu S, et al. A naturally occurring CD8(+) CD122(+) T-cell subset as a memory-like Treg family. *Cell Mol Immunol*. 2014;11(4):326-331.

Lima MC, Pereira GM, Rumjanek FD, Gomes HM, Duppre N, Sampaio EP, et al. Immunological cytokine correlates of protective immunity and pathogenesis in leprosy. *Scand J Immunol.* 2000;51(4):419-428.

Lu L, Barbi J, Pan F. The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(11):703-717.

Ludviksson BR, Seegers D, Resnick AS, Strober W. The effect of TGF-beta1 on immune responses of naive versus memory CD4+ Th1/Th2 T cells. *Eur J Immunol.* 2000;30(7):2101-2111.

Ma L, Xue HB, Guan XH, Shu CM, Wang F, Zhang JH, et al. The Imbalance of Th17 cells and CD4(+) CD25(high) Foxp3(+) Treg cells in patients with atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2014;28(8):1079-1086.

Maciel LR, Ferreira IN. A presença da hanseníase no Brasil – Alguns aspectos relevantes nessa trajetória. Em: *Hanseníase avanços e desafios, Brasília.* 2014; p.19-40.

Madigan CA, Cambier CJ, Kelly-Scumpia KM, Scumpia PO, Cheng TY, Zailaa J, et al. A Macrophage Response to *Mycobacterium leprae* Phenolic Glycolipid Initiates Nerve Damage in Leprosy. *Cell.* 2017;170(5):973-85.

Manandhar R, LeMaster JW, Roche PW. Risk factors for erythema nodosum leprosum. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1999;67(3):270-278.

Manzanillo PS, Ayres JS, Watson RO, Collins AC, Souza G, Rae CS, et al. The ubiquitin ligase parkin mediates resistance to intracellular pathogens. *Nature.* 2013;501(7468):512-516.

Marques MA, Ant nio VL, Sarno EN, Brennan PJ, Pessolani MC. Binding of alpha2-laminins by pathogenic and non-pathogenic mycobacteria and adherence to Schwann cells. *J Med Microbiol.* 2001;50(1):23-28.

Martinez AN, Talhari C, Moraes MO, Talhari S. PCR-based techniques for leprosy diagnosis: from the laboratory to the clinic. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(4):1-8.

Martins G, Campanelli A, Silva R, Tadokoro C, Russo M, Cunha F, et al. CD28 is required for T cell activation and IFN-gamma production by CD4 and CD8 T cells in response to infection. *Microbes and Infection.* 2004;6(13):1133-1144.

McBride JM, Jung T, de Vries JE, Aversa G. IL-10 alters DC function via modulation of cell surface molecules resulting in impaired T-cell responses. *Cell Immunol.* 2002; 215(2):162-172.

Meredith A, Del Pozo J, Smith S, Milne E, Stevenson K, McLuckie J. Leprosy in red squirrels in Scotland. *Vet Rec.* 2014;175(11):285-286.

Mills KH. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol*. 2004;4(11):841-855.

Ministério Da Saúde. Guia para o Controle da Hanseníase. Brasília: Ministério da saúde; 2002.

Ministério da Saúde. Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase. Brasília: Ministério da Saúde; 2010.

Ministério Da Saúde. Boletim Epidemiológico. Brasília: Ministério da Saúde; 2016.

Misch EA, Berrington WR, Vary JC, Jr., Hawn TR. Leprosy and the human genome. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010;74(4):589-620.

Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med*. 2009;361(9):888-898.

Mira MT, Alcáiz A, di Pietrantonio T, Thuc NV, Phuong MC, Abel L, et al. Segregation of HLA/TNF region is linked to leprosy clinical spectrum in families displaying mixed leprosy subtypes. *Genes Immun*. 2003;4(1):67-73.

Modlin RL, Hofman FM, Taylor CR, Rea TH. In situ characterization of T lymphocyte subsets in leprosy granulomas. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1982;50(3):361-362.

Modlin RL, Hofman FM, Taylor CR, Rea TH. T lymphocyte subsets in the skin lesions of patients with leprosy. *J Am Acad Dermatol*. 1983;8(2):182-189.

Modlin RL. The innate immune response in leprosy. *Curr Opin Immunol*. 2010;22(1):48-54.

Moet FJ, Meima A, Oskam L, Richardus JH. Risk factors for the development of clinical leprosy among contacts, and their relevance for targeted interventions. *Lepr Rev*. 2004;75(4):310-326.

Monot M, Honore N, Garnier T, Araoz R, Coppee JY, Lacroix C, et al. On the origin of leprosy. *Science*. 2005;308(5724):1040-1042.

Monot M, Honore N, Garnier T, Zidane N, Sherafi D, Paniz-Mondolfi A, et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nat Genet*. 2009;41(12):1282-1289.

Montoya D, Cruz D, Teles RM, Lee DJ, Ochoa MT, Krutzik SR, et al. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. *Cell Host Microbe*. 2009;6(4):343-353.

Morikawa H, Sakaguchi S. Genetic and epigenetic basis of Treg cell development and function: from a FoxP3-centered view to an epigenome-defined view of natural Treg cells. *Immunol Rev*. 2014 May;259(1):192-205.

Nath I, Saini C, Valluri VL. Immunology of leprosy and diagnostic challenges. Clin Dermatol. 2015;33(1):90-98.

Negera E, Walker SL, Bobosha K, Howe R, Aseffa A, Dockrell HM, et al. T-cell regulation in Erythema Nodosum Leprosum. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(10):1-23.

Nery JA, Vieira LM, de Matos HJ, Gallo ME, Sarno EN. Reactional states in multibacillary Hansen disease patients during multidrug therapy. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1998;40(6):363-370.

Nery JA, Bernardes Filho F, Quintanilha J, Machado AM, Oliveira Sde S, Sales AM. Understanding the type 1 reactional state for early diagnosis and treatment: a way to avoid disability in leprosy. An Bras Dermatol. 2013;88(5):787-792.

Nery JA, Sousa MDG, Esquenazi D. Lepra. In: Ocampo J & Lupi O. Dermatologia: guías de actualización clínica. 1st Edition ed. Brazil: GEN & AC Farmaceutica, 2015. p. 892.

Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. Annu Rev Immunol. 2011;29:71-109.

Palermo ML, Pagliari C, Trindade MA, Yamashitafuji TM, Duarte AJ, Cacere CR, et al. Increased expression of regulatory T cells and down-regulatory molecules in lepromatous leprosy. Am J Trop Med Hyg. 2012;86(5):878-883.

Penna GO, Martelli CMT, Stefani MMA, Macedo VO, Maroja MF, Chaul A. Talidomida no tratamento do eritema nodoso hansênico: revisão sistemática dos ensaios clínicos e perspectivas de novas investigações. An. Bras. Dermatol. 2005;80(5): 511-522.

Piccirillo CA, Shevach EM. Naturally-occurring CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: central players in the arena of peripheral tolerance. Semin Immunol. 2004;16(2):81-88.

Pinheiro RO, de Souza Salles J, Sarno EN, Sampaio EP. *Mycobacterium leprae*-host-cell interactions and genetic determinants in leprosy: an overview. Future Microbiol. 2011;6(2):217-230.

Pinto PGHR. O estigma do pecado: a lepra durante a Idade Média. *PHYSIS – Revista de Saúde Coletiva*. 1995; 5(1):131-144.

Polycarpou A, Walker SL, Lockwood DN. A Systematic Review of Immunological Studies of Erythema Nodosum Leprosum. Front Immunol. 2017;8(233): 1-41

Prasad HK, Mishra RS, Nath I. Phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae* induces general suppression of in vitro concanavalin A responses unrelated to leprosy type. J Exp Med. 1987;165:239-244.

Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 1966;34(3):255-273.

Roy S, Frodsham A, Saha B, Hazra SK, Mascie-Taylor CG, Hill AV. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *J Infect Dis.* 1999;179(1):187-191.

Saini C, Ramesh V, Nath I. CD4<sup>+</sup> Th17 cells discriminate clinical types and constitute a third subset of non Th1, Non Th2 T cells in human leprosy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(7):1-13.

Saini C, Ramesh V, Nath I. Increase in TGF-beta secreting CD4(+)CD25(+) FOXP3(+) T regulatory cells in anergic lepromatous leprosy patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(1):1-14.

Saini C, Siddiqui A, Ramesh V, Nath I. Leprosy Reactions Show Increased Th17 Cell Activity and Reduced FOXP3<sup>+</sup> Tregs with Concomitant Decrease in TGF-beta and Increase in IL-6. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(4):1-21.

Saini C, Tarique M, Rai R, Siddiqui A, Khanna N, Sharma A. T helper cells in leprosy: An update. *Immunol Lett.* 2017;184:61-66.

Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(7):490-500.

Sakkas LI, Mavropoulos A, Bogdanos DP. Phosphodiesterase 4 Inhibitors in Immune-mediated Diseases: Mode of Action, Clinical Applications, Current and Future Perspectives. *Curr Med Chem.* 2017;24(28):3054-3067.

Sales AM, Ponce de Leon A, Duppre NC, Hacker MA, Nery JA, Sarno EN, et al. Leprosy among patient contacts: a multilevel study of risk factors. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(3):1-6.

Sales-Marques C, Cardoso CC, Alvarado-Arnez LE, Illaramendi X, Sales AM, Hacker MA, et al. Genetic polymorphisms of the IL6 and NOD2 genes are risk factors for inflammatory reactions in leprosy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(7):1-16.

Sampaio EP, Hernandez MO, Carvalho DS, Sarno EN. Management of erythema nodosum leprosum by thalidomide: thalidomide analogues inhibit M. leprae-induced TNFalpha production in vitro. *Biomed Pharmacother.* 2002;56(1):13-19.

Santos FSD, Souza LPA, Siani AC. O óleo de chaulmoogra como conhecimento científico: a construção de uma terapêutica antileprótica. *Hist. cienc. saude-Manguinho.* 2008; 15 (1):29-49.

Santos MB, de Oliveira DT, Cazzaniga RA, Varjao CS, Dos Santos PL, Santos MLB, et al. Distinct Roles of Th17 and Th1 Cells in Inflammatory Responses Associated with the Presentation of Paucibacillary Leprosy and Leprosy Reactions. *Scand J Immunol.* 2017;86(1):40-49.

Sauer ME, Salomao H, Ramos GB, D'Espindula HR, Rodrigues RS, Macedo WC, et al. Genetics of leprosy: expected and unexpected developments and perspectives. *Clin Dermatol.* 2015;33(1):99-107.

Schenk M, Mahapatra S, Le P, Kim HJ, Choi AW, Brennan PJ, et al. Human NOD2 Recognizes Structurally Unique Muramyl Dipeptides from *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun*. 2016;84(9):2429-2438.

Schmitz V, Prata RB, Barbosa MG, Mendes MA, Brandao SS, Amadeu TP, et al. Expression of CD64 on Circulating Neutrophils Favoring Systemic Inflammatory Status in Erythema Nodosum Leprosum. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(8):1-18.

Schuenemann VJ, Singh P, Mendum TA, Krause-Kyora B, Jager G, Bos KI, et al. Genome-wide comparison of medieval and modern *Mycobacterium leprae*. *Science*. 2013;341(6142):179-183.

Schuring RP, Hamann L, Faber WR, Pahan D, Richardus JH, Schumann RR, et al. Polymorphism N248S in the human Toll-like receptor 1 gene is related to leprosy and leprosy reactions. *J Infect Dis*. 2009;199(12):1816-1819.

Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(2):338-381.

Scollard DM. *International Textbook of Leprosy*. Pathogenesis and Pathology of Leprosy. National Hansen's Disease Programs, 2016.

Sengupta U. Immunopathology of leprosy--current status. *Indian J Lepr*. 2000;72(3):381-391.

Shepard CC. The Experimental Disease That Follows the Injection of Human Leprosy Bacilli into Foot-Pads of Mice. *J Exp Med*. 1960;112(3):445-454.

Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*. 2009;30(5):636-645.

Sieling PA, Modlin RL. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. *Immunobiology*. 1994;191(4-5):378-387.

Silva CA, Webb K, Andre BG, Marques MA, Carvalho FM, de Macedo CS, et al. Type 1 Reaction in Patients With Leprosy Corresponds to a Decrease in Proresolving Lipid Mediators and an Increase in Proinflammatory Lipid Mediators. *J Infect Dis*. 2017;215(3):431-439.

Silva, PHL. Participação de subpopulações de linfócitos T na fisiopatologia da hanseníase lepromatosa e na gênese do Erythema Nodosum Leprosum (ENL). Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em Biologia Parasitária] – Instituto Oswaldo Cruz; 2016.

Sousa AL, Fava VM, Sampaio LH, Martelli CM, Costa MB, Mira MT, et al. Genetic and immunological evidence implicates interleukin 6 as a susceptibility gene for leprosy type 2 reaction. *J Infect Dis*. 2012;205(9):1417-24.

Sreenivasan P, Misra RS, Wilfred D, Nath I. Lepromatous leprosy patients show T helper 1-like cytokine profile with differential expression of interleukin-10 during type 1 and 2 reactions. *Immunology*. 1998;95(4):529-536.

Stephen-Victor E, Bosschem I, Haesebrouck F, Bayry J. The Yin and Yang of regulatory T cells in infectious diseases and avenues to target them. *Cell Microbiol*. 2017;19(6):1-9.

Suneetha S, Arunthathi S, Job A, Date A, Kurian N, Chacko CJ. Histological studies in primary neuritic leprosy: changes in the nasal mucosa. *Lepr Rev*. 1998;69(4):358-366.

Tai X, Van Laethem F, Pobezinsky L, Guintert T, Sharrow SO, Adams A, et al. Basis of CTLA-4 function in regulatory and conventional CD4(+) T cells. *Blood*. 2012;119(22):5155-5163.

Tarique M, Saini C, Naqvi RA, Khanna N, Rao DN. Increased IL-35 producing Tregs and CD19(+)IL-35(+) cells are associated with disease progression in leprosy patients. *Cytokine*. 2017;91(2017):82-88.

Teles RM, Graeber TG, Krutzik SR, Montoya D, Schenk M, Lee DJ, et al. Type I interferon suppresses type II interferon-triggered human anti-mycobacterial responses. *Science*. 2013;339(6126):1448-1453.

Tran DQ. TGF-beta: the sword, the wand, and the shield of FOXP3(+) regulatory T cells. *J Mol Cell Biol*. 2012;4(1):29-37.

Trautman JR. A brief history of Hansen's disease. *Bull N Y Acad Med*. 1984;60(7):689-695.

Ulrich M, Smith PG, Sampson C, Zuniga M, Centeno M, Garcia V, et al. IgM antibodies to native phenolic glycolipid-I in contacts of leprosy patients in Venezuela: epidemiological observations and a prospective study of the risk of leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1991;59(3):405-415.

van Beers SM, Hatta M, Klatser PR. Patient contact is the major determinant in incident leprosy: implications for future control. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1999;67(2):119-128.

Vieira AP, Trindade MA, Pagliari C, Avancini J, Sakai-Valente NY, Duarte AJ, et al. Development of Type 2, But Not Type 1, Leprosy Reactions is Associated with a Severe Reduction of Circulating and in situ Regulatory T-Cells. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;94(4):721-727.

Vieira LM, Sampaio EP, Nery JA, Duppre NC, Albuquerque EC, Scheinberg MA, Sarno EN. Immunological status of ENL (erythema nodosum leprosum) patients: its relationship to bacterial load and levels of circulating IL-2R. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1996;38(2):103-111.

Voorend CG, Post EB. A systematic review on the epidemiological data of erythema nodosum leprosum, a type 2 leprosy reaction. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(10):1-10.

Walker LS, Sansom DM. Confusing signals: recent progress in CTLA-4 biology. *Trends Immunol.* 2015;36(2):63-70.

Walker SL, Balagon M, Darlong J, Doni SN, Hagge DA, Halwai V, et al. ENLIST 1: An International Multi-centre Cross-sectional Study of the Clinical Features of Erythema Nodosum Leprosum. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(9):1-14.

Walker SL, Lockwood DN. Leprosy type 1 (reversal) reactions and their management. *Lepr Rev.* 2008;79(4):372-386.

Walsh GP, Storrs EE, Meyers W, Binford CH. Naturally acquired leprosy-like disease in the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*): recent epizootiologic findings. *J Reticuloendothel Soc.* 1977;22(4):363-367.

Wan YY, Flavell RA. TGF-beta and regulatory T cell in immunity and autoimmunity. *J Clin Immunol.* 2008;28(6):647-659.

Wang YM, Alexander SI. CD8 regulatory T cells: what's old is now new. *Immunol Cell Biol.* 2009;87(3):192-193.

Wong SH, Gochhait S, Malhotra D, Pettersson FH, Teo YY, Khor CC, et al. Leprosy and the adaptation of human toll-like receptor 1. *PLoS Pathog.* 2010;6 (7):1-9.

World Health Organization (WHO). Weekly epidemiological record: Global leprosy update, 2016: accelerating reduction of disease burden. 2017;92 (35):501-520.

Zhang FR, Huang W, Chen SM, Sun LD, Liu H, Li Y, et al. Genomewide association study of leprosy. *N Engl J Med.* 2009;361(27):2609-2618.