

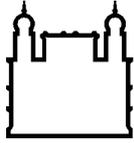
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

CARACTERIZAÇÃO DE LINFÓCITOS T REGULADORES FOXP3⁺ DE
SANGUE E DE PELE DE PACIENTES COM HANSENÍASE

NATASHA CABRAL

Rio de Janeiro
Agosto de 2022



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Natasha Cabral

Caracterização de linfócitos T reguladores FOXP3+ de sangue e de pele de pacientes com hanseníase

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Parasitária

Orientador (es): Prof. Dr. Geraldo Moura Batista Pereira

RIO DE JANEIRO

Agosto de 2022

Cabral, Natasha .

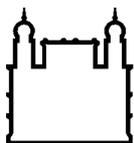
Caracterização de linfócitos T reguladores FOXP3+ de sangue e de pele de pacientes com hanseníase / Natasha Cabral. - Rio de Janeiro, 2022.
133 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2022.

Orientador: Geraldo Moura Batista Pereira.

Bibliografia: f. 85-97

1. Hanseníase. 2. Resposta imune. 3. Linfócitos T reguladores. 4. Linfócitos T efetores. 5. Linfócitos T antígeno-específicos. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: NATASHA CABRAL

**Caracterização de linfócitos T reguladores FOXP3⁺ de sangue e de pele de
pacientes com hanseníase**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Geraldo Moura Batista Pereira

Aprovada em: 03/08/2022

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Veronica Schmitz Pereira (Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ) - Presidente

Prof. Dr. Vinícius Cotta de Almeida (Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ)

Prof. Dr. Marcelo Távora Mira (Escola de Medicina - PUCPR)

SUPLENTES:

Prof. Dra. Elzinandes Leal de Azeredo (Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ)

Prof. Dra. Luciana Silva Rodrigues (Faculdade de Ciências Médicas - UERJ)

Rio de Janeiro, 03 de agosto de 2022.



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado acadêmico em Biologia Parasitária de **Natasha Cabral**, sob orientação do Dr. Geraldo Moura Batista Pereira. Ao terceiro dia do mês de agosto de dois mil e vinte e dois, realizou-se às nove horas e trinta minutos, de forma síncrona remota, o exame da tese de doutorado acadêmico intitulada: **“Caracterização de linfócitos T reguladores FOXP3+ de sangue e de pele de pacientes com hanseníase”**, no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Imunologia e Patogenia, na linha de pesquisa: Imunologia e Patogênese de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Veronica Schmitz Pereira – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Vinícius Cotta de Almeida – IOC/FIOCRUZ, Dr. Marcelo Távora Mira – PUCPR/PR, e como suplentes: Dr^a. Elzinandes Leal de Azeredo- IOC/FIOCRUZ e Dr^a. Luciana Silva Rodrigues - UERJ/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 tese de doutorado acadêmico. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Presidente da Banca atesta a decisão e a participação da aluna e de todos os membros da banca de forma síncrona remota. O Coordenador do Programa Dr. André Luiz Rodrigues Roque, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 3 de agosto de 2022.

Dr^a. Veronica Schmitz Pereira (Presidente da Banca):

Dr. André Luiz Rodrigues Roque (Coordenador do Programa):

Dedico esta tese a todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação científica.

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo suporte e incentivo durante toda a minha vida.

Ao Dr. Geraldo Pereira pela orientação durante minha formação científica. Obrigada pela oportunidade e pelos ensinamentos neste período.

À Dra. Mariana Gandini e a Dra. Thataba Duque pelas discussões científicas e suporte em citometria de fluxo. Obrigada por todo o apoio e incentivo durante o desenvolvimento da tese.

A todos que passaram pelo Laboratório de Microbiologia Celular (Sala 16) e que de alguma forma contribuíram com a tese: Vilma, Otto, Suelen, Carol, Fernanda, Rychelle e Cíntia. Obrigada pela colaboração e apoio.

Ao Dr. Flávio Lara por todo o auxílio na etapa de microscopia de imunofluorescência. À Dra. Cristiana de Macedo, Dra. Letícia Lery e Dra. Maria Cristina Pessolani pela parceria na publicação da revisão.

À toda equipe do Ambulatório Sousa Araújo e do departamento de dermatologia do Hospital Federal de Bonsucesso (Em especial, ao Dr. Egon Daxbacher). Muito obrigada por toda a contribuição.

À equipe de processamento de amostras de sangue periférico do Pavilhão de Hanseníase. Muito obrigada pela parceria.

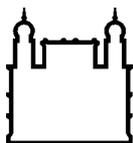
Aos pacientes e doadores saudáveis que aceitaram participar deste estudo. Obrigada por contribuir para o desenvolvimento científico do nosso país.

Aos membros da banca examinadora por terem aceitado nosso convite. Muito obrigada.

Aos amigos da vida e da Biologia Parasitária por estarem sempre presentes e me incentivando a continuar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e FIOCRUZ pelas bolsas de estudos. Ao Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas (NIAID/NIH) pelo financiamento do projeto.

Ao programa de desenvolvimento Tecnológico em insumos para saúde (PDTIS) pelo acesso a plataforma de citometria de fluxo.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

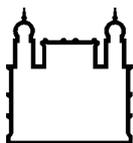
CARACTERIZAÇÃO DE LINFÓCITOS T REGULADORES FOXP3⁺ DE SANGUE E DE PELE DE PACIENTES DE HANSENÍASE

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Natasha Cabral

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica em que o nível de resposta imune do hospedeiro contra o agente etiológico, *Mycobacterium leprae*, determina a manifestação clínica da doença. Os linfócitos T reguladores (Tregs) suprimem a resposta efetora para prevenir danos teciduais, ação que pode contribuir para persistência de patógenos como o *M. leprae*. Apesar do provável envolvimento da modulação negativa da resposta imune na patogênese da hanseníase, os mecanismos envolvidos nessa regulação ainda não estão claros. Por isso, nosso objetivo foi caracterizar fenotipicamente linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺, incluindo Tregs e linfócitos T efetores (Tefs) de pacientes paucibacilares (PB) e multibacilares (MB) de hanseníase, assim como doadores saudáveis de área endêmica (SAE). Avaliamos as células mononucleares sanguíneas totais (*ex vivo*) e após estimulação de 7h com sonicação de *M. leprae* para identificação de linfócitos T específicos para antígenos de *M. leprae*. A investigação da razão de Tregs/Tefs mostrou que o grupo MB apresenta alteração no balanço entre essas subpopulações tanto em contexto *ex vivo* quanto antígeno-específico. Na análise *ex vivo*, observamos aumento da razão no grupo MB quando comparado com o grupo SAE tanto em relação às células de memória totais quanto subpopulações CXCR3⁺. Isto sugere que mesmo em condições imunes não específicas, o balanço entre essas subpopulações tende em direção aos Tregs nestes pacientes. Na análise antígeno-específica, detectamos aumento da frequência de Tregs antígeno-específicos (AgTregs) no grupo PB e redução da frequência de Tefs antígeno-específicos (AgTefs) no grupo MB. A avaliação da razão de AgTregs/AgTefs mostrou aumento progressivo da razão do grupo SAE para o grupo PB, culminando com o grupo MB. Os doadores SAE apresentaram predominância de resposta celular efetora, enquanto os pacientes PB apresentaram equilíbrio entre essas duas subpopulações. Por outro lado, os pacientes MB apresentaram resposta tolerogênica dominante contra o bacilo, isto é, o número de AgTregs excede o de AgTefs, o que é compatível com a imunossupressão da resposta efetora contra o *M. leprae*. Além disso, identificamos que os AgTregs de pacientes expressaram moléculas inibidoras associadas a vias de supressão dos Tregs, sugerindo mecanismos de supressão ativos na hanseníase. A avaliação dos linfócitos T CD8⁺ também mostrou menor frequência de linfócitos T CD8⁺CXCR3⁺ totais, assim como linfócitos CD8⁺ respondedoras ao bacilo nos pacientes MB, sugerindo que a resposta CD8⁺ está debilitada nesses pacientes. Por fim, padronizamos a metodologia para obtenção de linfócitos T viáveis de pele humana e identificamos Tregs provenientes de lesões de pele por citometria de fluxo e imunofluorescência.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CHARACTERIZATION OF REGULATORY T CELLS FOXP3⁺ FROM BLOOD AND SKIN OF LEPROSY PATIENTS

ABSTRACT

PHD THESIS IN PARASITE BIOLOGY

Natasha Cabral

Leprosy is a chronic infectious disease in which the level of the host's immune response against the etiologic agent, *Mycobacterium leprae*, determines the clinical manifestation of the disease. Regulatory T cells (Tregs) suppress the effector response to prevent tissue damage, an action that may contribute to the persistence of pathogens such as *M. leprae*. Despite the likely involvement of negative modulation of the immune response in the pathogenesis of leprosy, the mechanisms involved in this regulation are still unclear. Therefore, our main was to phenotypically characterize CD8⁺ and CD4⁺ T cells, including Tregs and effector T cells (Teffs) from paucibacillary (PB) and multibacillary (MB) leprosy patients, as well as healthy donors from an endemic area (HD). We evaluated the total blood mononuclear cells (*ex vivo*) and after 7h stimulation with *M. leprae* sonicate to identify T cells specific for *M. leprae* antigens. The investigation of the Tregs/Teffs ratio showed that the MB group presents alterations in the balance between these subpopulations both in *ex vivo* and antigen-specific contexts. In the *ex vivo* analysis, we observed an increase in the ratio in the MB group when compared to the HD group, both relation to total memory cells and CXCR3⁺ subpopulations. This suggests that even under non-specific immune conditions, the balance between these subpopulations tends towards Tregs in these patients. In the antigen-specific analysis, we detected an increase in the frequency of antigen-specific Tregs (AgTregs) in the PB group and a reduction in the frequency of antigen-specific Tefs (AgTeffs) in the MB group. The evaluation of the AgTregs/AgTeffs ratio showed a progressive increase in the ratio from the SAE group to the PB group, culminating in the MB group. HD showed a predominance of effector response, while PB patients showed balance between these two subpopulations. On the other hand, MB patients showed a dominant tolerogenic response against the bacillus, that is, the number of AgTregs exceeds that of AgTeffs, which is compatible with the immunosuppression of the effector response against *M. leprae*. Furthermore, we identified that AgTregs from patients expressed inhibitory molecules associated with Treg suppression pathways, suggesting active suppression mechanisms in leprosy. The evaluation of CD8⁺ T cells also showed a lower frequency of total CD8⁺CXCR3⁺ T cells, as well as CD8⁺ T cells responding to the bacillus in MB patients, suggesting that the CD8⁺ response is impaired in these patients. Finally, we standardized the methodology for obtaining viable T lymphocytes from human skin and identified Tregs from skin lesions by flow cytometry and immunofluorescence.

ÍNDICE

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Hanseníase	17
1.1.1 Considerações gerais	17
1.1.2 Diagnóstico e tratamento	18
1.1.3 Epidemiologia	19
1.1.4 <i>Mycobacterium leprae</i>	20
1.1.5 Formas clínicas.....	21
1.2 Resposta imune contra o <i>M. leprae</i>	24
1.2.1 Linfócitos T CD8 ⁺	27
1.2.2 Linfócitos T CD4 ⁺	29
1.3 Linfócitos T reguladores	34
1.3.1 Fator de transcrição FOXP3	35
1.3.2 Mecanismos de supressão de Tregs	36
1.3.3 Linfócitos T reguladores na hanseníase	39
1.4 Hipótese	40
2 OBJETIVOS	42
2.1 Objetivo Geral	42
2.2 Objetivos Específicos	42
3 MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 Considerações éticas de amostras humanas	43
3.2 População estudada	43
3.3 Material e reagentes	44
3.3.1 Reagentes	44
3.3.2 Meio de cultura, suplementos e estímulos.....	45
3.3.3 Anticorpos.....	45
3.3.4 Soluções	46
3.4 Isolamento de células mononucleares sanguíneas (CMS)	46
3.5 Estimulação <i>in vitro</i> de CMS com antígenos de <i>M. leprae</i>	47
3.6 Identificação de linfócitos T antígeno-específicos	48
3.7 Citometria de fluxo	48

3.8	Dissociação de fragmento de tecido de pele.....	49
3.9	Imunofluorescência.....	50
3.10	Análise de dados.....	50
4	RESULTADOS	51
4.1	Controles saudáveis e pacientes com hanseníase multibacilar mostram diferenças em proporções de Tregs virgens e nas razões de subpopulações de Tregs e Tefs circulantes.....	51
4.2	Controles saudáveis e pacientes com hanseníase mostram diferenças em proporções de linfócitos CD8 ⁺ com expressão de CXCR3.....	55
4.3	Proporção de Tregs em relação a Tefs respondedores a <i>M. leprae</i> alcança níveis compatíveis com tolerância dominante em pacientes com hanseníase multibacilar.....	57
4.4	Controles saudáveis e pacientes com hanseníase mostram diferenças na proporção de linfócitos T CD8 ⁺ respondedores por apresentação cruzada.....	60
4.5	Perfil funcional dos Tregs <i>M. leprae</i> -específicos de pacientes com hanseníase.....	62
4.6	Controles saudáveis e pacientes com hanseníase mostram diferenças em proporções de Tregs e Tefs com padrão migratório (CCR4 ⁺) para tecidos periféricos.....	68
4.7	Tregs provenientes de lesão de pele de pacientes com hanseníase.....	69
5	DISCUSSÃO	76
6	CONCLUSÕES	83
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
8	ANEXOS	98
8.1	Anexo 1: Dados epidemiológicos dos doadores recrutados para análise <i>ex vivo</i> de células sanguíneas.....	98
8.2	Anexo 2: Dados epidemiológicos dos doadores recrutados para as análises <i>in vitro</i> de células sanguíneas.....	99
8.3	Anexo 3: Dados epidemiológicos dos doadores recrutados para as análises <i>in vitro</i> de células sanguíneas.....	100
8.4	Anexo 4: Artigos científicos publicados.....	101

8.5 Anexo 5: Termos de consentimento livre e esclarecido..... 118

Figura 1.1 - Distribuição geográfica de novos casos de hanseníase em 2020.	20
Figura 1.2 – Hanseníase tuberculóide polar (TT)	21
Figura 1.3 - Hanseníase lepromatosa polar (LL)	22
Figura 1.4 - Formas Borderlines de hanseníase	23
Figura 1.5 - Modelo para geração de linfócitos T de memória	27
Figura 1.6 - Principais subpopulações de linfócitos T CD4⁺	29
Figura 1.7 - Modelo de resposta imune na hanseníase	34
Figura 1.8 - Mecanismos de supressão de linfócitos T reguladores (Tregs)	37
Figura 4.1 - Caracterização de subpopulações de Tregs e Tconvs circulantes de pacientes com hanseníase e doadores saudáveis	52
Figura 4.2 – Subpopulações de Tregs e Tefs circulantes com expressão de receptores de quimiocinas em pacientes com hanseníase e doadores saudáveis	54
Figura 4.13 - Caracterização fenotípica de linfócitos T CD8⁺ totais circulantes	56
Figura 4.4 – Caracterização de Tregs e Tefs antígeno-específicos em culturas de curta duração com antígenos de <i>M. leprae</i>	58
Figura 4.14 – Caracterização de linfócitos CD8⁺ ativadas por apresentação cruzada em culturas de curta duração com antígenos de <i>M. leprae</i>	61
Figura 4.7 – Caracterização de moléculas inibidoras expressas em Tregs antígeno-específicos em culturas de 18 horas com antígenos de <i>M. leprae</i>	65
Figura 4.8 – Perfil multifuncional dos Tregs antígeno-específicos em culturas de 18 horas com antígenos de <i>M. leprae</i>	67
Figura 4.3 - Caracterização de Tregs e Tefs com padrão migratório (CCR4⁺) para tecidos periféricos em pacientes com hanseníase e doadores saudáveis	69
Figura 4.9 – Caracterização de Tregs provenientes de lesão de pele de pacientes multibacilares	70
Figura 4.10 - Padronização da técnica de dissociação de pele humana	72
Figura 4.11 – Caracterização de Tregs provenientes de pele humana clinicamente normal e lesão de pacientes com hanseníase	74
Figura 4.12 – Células CD4⁺FOXP3⁺ em lesões de pele de pacientes multibacilares por imunofluorescência	75
Figura 5.1 – Mudança no balanço entre Tregs e Tefs <i>M. leprae</i>-específicos em culturas de curta duração	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais dos doadores recrutados no estudo.....	43
--	-----------

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AgTefs	Linfócitos T efetores antígeno-específicos
AgTregs	Linfócitos T reguladores antígeno-específicos
AMP	Monofosfato de adenosina
APCs	Células apresentadoras de antígeno
ATP	Trifosfato de adenosina
BB	Borderline-borderline
BL	Borderline-lepromatoso
BT	Borderline-tuberculóide
CCR	Receptor de quimiocina de motivo C-C
CMS	Células Mononucleares sanguíneas
CNS	Elementos conservados não codificantes
CRTH2	Receptor 2 de prostaglandina D ₂
CTLA-4	Proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos
CXCR3	Receptor de quimiocina C-X-C do tipo 3
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DCs	Células dendríticas
Fc	Fragmento cristalizado
FOXP3	Forkhead box protein 3
FSC-A	Dispersão frontal medida pela área do pulso
GITR	Gene relacionado à família TNFR induzido por glicocorticóides
HLA	Moléculas do complexo antígeno leucocitário humano
IB	Índice Baciloscópio
IDO-1	Indoleamina 2,3-dioxigenase 1
IFN- γ	Interferon γ
IL	Interleucina
iTregs	Linfócitos T reguladores induzidos <i>in vitro</i>
LAG-3	Gene de ativação de linfócitos 3
LCs	Células de Langerhans
LL	Polo lepromatoso
MB	Multibacilares
MFI	Mediana de intensidade de fluorescência
NGF	Fator de crescimento nervoso
NO	Óxido nítrico

OMS	Organização mundial de saúde
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PB	Paucibacilares
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGL-I	Glicolipídio fenólico I
PQT	Poliquimioterapia
pTregs	Linfócitos T reguladores periféricos
RRPs	Receptores de reconhecimento de padrões
SAE	Doadores saudáveis de área endêmica
SSC-A	Dispersão lateral medida pela área do pulso
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Tconvs	Linfócitos T convencionais
Tconvs _{mem}	Tconvs de memória
TCR	Receptores de linfócitos T
T _{EDT}	Linfócitos T efetores diferenciados terminais
Tefs	Linfócitos T efetores
TGF- β	Fator de crescimento transformante beta
TH1	Linfócitos T “helper” 1
TH1/17	Linfócitos T “helper” 1/17
TH17	Linfócitos T “helper” 17
TH2	Linfócitos T “helper” 2
TH9	Linfócitos T “helper” 9
TIGIT	Imunorreceptor de linfócitos T com domínios Ig e ITIM
TLRs	Receptores do tipo toll
T _{MC}	Linfócitos T de memória central
T _{ME}	Linfócitos T de memória efetora
TNF	Fator de necrose tumoral
Tregs	Linfócitos T reguladores
Tregs _{mem}	Tregs de memória
TSDR	Região desmetilada específica de Tregs
TSLP	Linfopoietina estromal tímica
TT	Polo tuberculóide
tTregs	Linfócitos T reguladores tímicos
T _v	Linfócitos T virgens

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hanseníase

1.1.1 Considerações gerais

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica que afeta a humanidade há milhares de anos. A evidência científica mais antiga é um esqueleto humano de quatro mil anos na Índia com características patológicas associadas à hanseníase lepromatosa (2). Em 1869, o médico norueguês Gerhard Hansen elaborou uma audaciosa hipótese a partir de suas observações epidemiológicas e propôs que a hanseníase era causada por um organismo. Em 1873, Hansen identificou bacilos em amostras de pele de pacientes e descreveu pela primeira vez o principal microrganismo causador da hanseníase, o *Mycobacterium leprae* (3).

A hanseníase causa danos na pele e nervos periféricos, manifestando-se em um espectro de formas clínicas que estão associadas à resposta imune do hospedeiro contra o bacilo. Após um longo período de incubação, surgem os sinais clínicos da doença, como lesões de pele com perda de sensibilidade e neuropatia periférica (5). O *M. leprae* também pode afetar olhos, mucosas e órgão internos. Casos mais avançados e sem tratamento provocam grande estigma social devido às alterações na face como nódulos, infiltrações difusas e perda de pelos, assim como deformidades físicas debilitantes (6).

Até recentemente, acreditava-se que o único agente etiológico da hanseníase fosse o *M. leprae*. Contudo, uma segunda espécie, *Mycobacterium lepromatosis*, foi descoberta no México em 2008 (7). Embora ambas as bactérias possuam aspectos microbiológicos assim como características clínicas e histopatológicas semelhantes, a distribuição geográfica dos casos é bastante diferente (6). Enquanto os casos da doença causado pelo *M. leprae* são diagnosticados pelo mundo todo, os casos de *M. lepromatosis* são raros e concentrados principalmente no México e regiões do Caribe (8). No Brasil, a infecção por *M. lepromatosis* já foi identificada em amostras de tecido de pacientes com a forma lepromatosa difusa, entretanto, o *M. leprae* é o agente causador predominante da hanseníase no país (9).

A dificuldade de identificação da fonte de infecção devido ao longo período de incubação da doença e a impossibilidade de cultivo *in vitro* do *M. leprae* em condições axênicas são obstáculos para o completo esclarecimento da cadeia de transmissão

do bacilo (10). É amplamente aceito que a transmissão do *M. leprae* ocorre quando uma pessoa susceptível inala aerossóis, gotículas e secreções nasais expelidas por pacientes (11-15). O envolvimento da mucosa nasal na disseminação da doença é evidenciado por estudos que mostram que pacientes multibacilares são capazes de expelir pelas vias aéreas superiores uma grande quantidade de bacilo viável diariamente (16).

Além disso, há indícios que a genética do hospedeiro pode influenciar na susceptibilidade ou proteção desses indivíduos contra a doença, assim como no desenvolvimento das formas clínicas (17). A carga bacilar e a duração da exposição também podem impactar no adoecimento (18). Outras rotas possíveis de transmissão incluem contato direto com a pele de pacientes, fontes ambientais e transmissão zoonótica, incluindo tatus de nove bandas, chipanzés e esquilos vermelhos (14, 19, 20).

1.1.2 Diagnóstico e tratamento

A hanseníase é diagnosticada por avaliação clínica, com anamnese para o levantamento do histórico do paciente e avaliação dermatológica e neurológica para identificar lesões de pele e de nervos periféricos em qualquer parte do corpo. O profissional de saúde também observa se existem sinais de estados reacionais da doença (21). A baciloscopia é o exame complementar mais comum utilizado na prática clínica. Ela consiste na análise microscópica do bacilo em raspados de pele de regiões específicas do corpo, como lesões, cotovelos ou lóbulos auriculares. É importante destacar que a baciloscopia negativa não exclui o diagnóstico da doença (21).

Um caso suspeito de hanseníase é confirmado quando o indivíduo apresenta um ou mais dos sinais a seguir: lesões com perda de sensibilidade, espessamento dos nervos periféricos e/ou baciloscopia positiva para o bacilo ácido-álcool resistente (22). Outros exames complementares incluem histologia de amostras de pele ou nervo, teste intradérmico, teste sorológico e reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação de material genético do bacilo em amostras biológicas (23).

Para fins terapêuticos, a doença é dividida em hanseníase paucibacilar (PB) e multibacilar (MB). Os casos PB incluem os pacientes com até cinco lesões de pele, enquanto os casos MB incluem pacientes com mais de cinco lesões de pele (21).

Atualmente, a poliquimioterapia única (PQT-U) para hanseníase é o tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde e consiste na administração combinada de rifampicina, dapsona e clofazimina (22, 24). A duração do esquema terapêutico é de

seis meses para as formas PB e doze meses para as formas MB. Os pacientes precisam comparecer mensalmente ao centro de saúde para acompanhamento clínico e medicação supervisionada. O esquema terapêutico para crianças inclui os mesmos medicamentos, porém com doses com concentração reduzidas (21). Em caso de intolerância às drogas citadas anteriormente, antibióticos alternativos como minociclina, ofloxacina e claritromicina podem ser utilizados em um esquema terapêutico especial (22). O Ministério da Saúde também recomenda a aplicação de duas doses da vacina BCG em todos os contatos intradomiciliares dos casos de hanseníase como forma de prevenção da doença (21).

1.1.3 Epidemiologia

Em 1982, a OMS implementou uma estratégia global para o controle da hanseníase que consistiu na detecção de novos casos e tratamento com poliquimioterapia (PQT). A estratégia surtiu efeito e por volta dos anos 2000 a prevalência mundial da doença caiu significativamente, porém em alguns países como o Brasil, a doença persiste como problema de saúde pública. Entre os anos de 2019 e 2020, a prevalência e o número de novos casos globais diminuíram 27,7% e 37,1%, respectivamente. A redução nestas taxas deve refletir o impacto da pandemia de COVID-19 e não uma possível mudança epidemiológica da doença. A distribuição geográfica de novos casos (Fig. 1.1) evidencia que Brasil, Índia e Indonésia continuam sendo os países com maiores números de novos casos da doença em 2020, isto é, acima de 1 caso por 10 mil habitantes (1).

O diagnóstico e o acompanhamento de casos de hanseníase no Brasil também foram influenciados pela pandemia de COVID-19. Em 2019 foram reportados 27.863 novos casos da doença, enquanto em 2020 este número caiu para apenas 17.979 novos casos. Do total de casos reportados em 2020, aproximadamente 5% são diagnósticos em crianças menores de 15 anos, indicando que a doença não está controlada em nosso país, e que a transmissão da infecção na comunidade continua ocorrendo. Além disso, o Brasil é o país com o segundo maior número de casos com grau dois de incapacidade física, grau mais alto da escala e indicador de diagnóstico tardio. Assim, a hanseníase continua sendo um problema de saúde pública preocupante em território nacional (25).

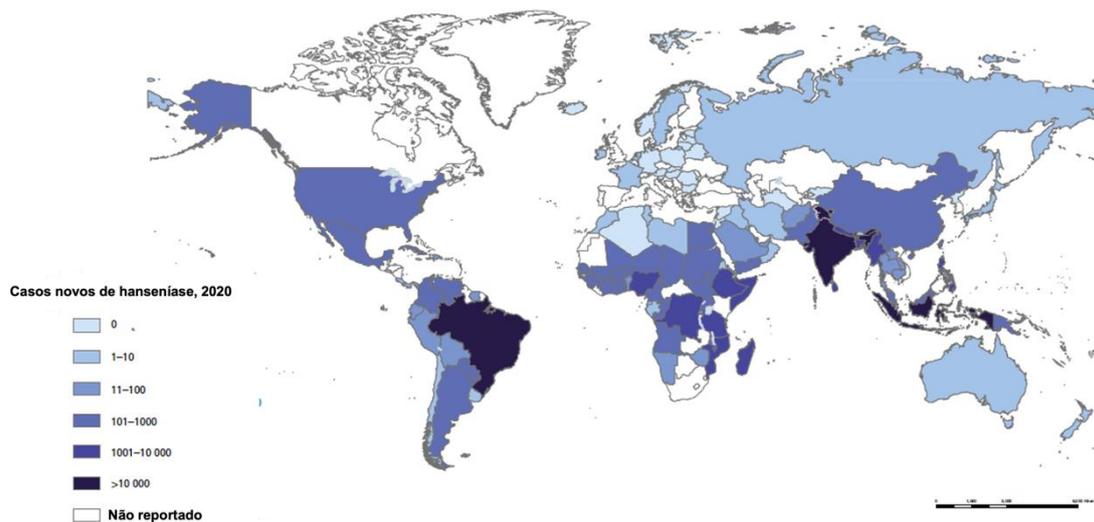


Figura 1.1 - Distribuição geográfica de novos casos de hanseníase em 2020.

Os países foram coloridos de acordo com o número de novos casos da doença reportados para Organização mundial de Saúde. Adaptado de (1)

1.1.4 *Mycobacterium leprae*

O *M. leprae* possui um genoma substancialmente menor que os de outras micobactérias (26). Alguns microrganismos se adaptam a condições específicas, como a vida intracelular obrigatória e mantem apenas o mínimo de genes necessários para sua sobrevivência no hospedeiro (27). Esta evolução redutiva sofrida pelo bacilo inclui genes associados ao metabolismo, podendo ser este o motivo pelo qual o bacilo não é cultivado *in vitro* em meios axênicos. Sua replicação por divisão binária é extremamente lenta e o período de incubação da infecção é longa (5, 28). O *M. leprae* possui tropismo por macrófagos e células de Schwann, tipos celulares presentes em regiões do corpo com temperaturas mais baixas, isto é, pele e nervos periféricos, respectivamente (28). A temperatura ideal para a atividade metabólica e crescimento do bacilo é de aproximadamente 33°C (29).

O *M. leprae* é um bacilo reto ou levemente curvado medindo de 1,5 a 8 micra de comprimento por 0,2 a 0,5 micra de diâmetro (6). Os reservatórios naturais conhecidos do bacilo incluem os seres humanos, tatus de nove faixas, alguns primatas não humanos e esquilos vermelhos (30). Embora diversos animais, incluindo coelhos, galinhas, peixes, porcos entre outros tenham sido testados como modelos para hanseníase desde a identificação do agente etiológico, entretanto, os únicos animais que até hoje são utilizados como meio de propagação do *M. leprae* para fins de pesquisa são os camundongos e tatus de nove bandas (6).

A ultraestrutura do bacilo é similar à de outras micobactérias, e é composta de citoplasma, membrana plasmática, parede celular e cápsula (31). A cápsula é rica em lipídeos, principalmente o glicolípido fenólico I (PGL-I), encontrado apenas no *M. leprae*, conferindo especificidade imunológica ao bacilo (6).

1.1.5 Formas clínicas

A hanseníase é uma doença que se manifesta em um espectro de formas clínicas que são determinadas pelo nível de resposta imune do hospedeiro contra o *M. leprae*. Em 1966, Ridley e Jopling observaram que as características clínicas, histológicas e bacteriológicas da doença se correlacionavam com o grau de imunidade protetora do hospedeiro. Assim, eles classificaram a doença em cinco formas clínicas, incluindo duas formas polares e três formas intermediárias (32).

O polo tuberculóide (TT) compreende os indivíduos que possuem resposta celular pró-inflamatória contra o *M. leprae*. A imunidade destes pacientes pode ser demonstrada tanto na pele através reação intradérmica com antígenos do bacilo quanto em ensaios *in vitro* de produção de IFN- γ por células sanguíneas (33-35). Os sinais clínicos incluem frequentemente uma única placa eritematosa bem delimitada de bordas elevadas (Fig. 1.2, A). A lesão de pele apresenta perda significativa de sensibilidade e sua superfície é áspera, seca, sem pelos e frequentemente escamosa. Geralmente ocorre espessamento do nervo cutâneo próximo à lesão (32).

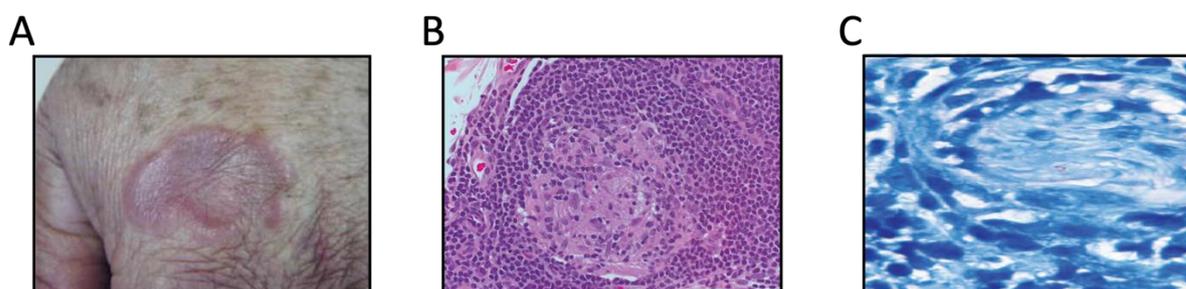


Figura 1.2 – Hanseníase tuberculóide polar (TT).

(A) Placa eritematosa bem definida sem pelo no dorso da mão. (B) Granuloma bem organizado formado de macrófagos epitelióides no manto cercado por linfócitos T na periferia. Hematoxilina e eosina (aumento de 400x). Adaptado de (38). (C) Bacilos álcool-ácido resistentes em lesão de pele de paciente TT. Foi necessário a avaliação de 50 campos para detectar os dois bacilos no nervo cutâneo. Marcação Fite (aumento de 1000x). Adaptado de (6).

As características histopatológicas incluem a rara presença do bacilo e a formação de um infiltrado inflamatório granulomatoso bem-organizado que pode invadir a epiderme (Fig. 1.2, B e C). O granuloma é composto de macrófagos epitelióides maduros, células de dendríticas (DCs) e uma densa camada de linfócitos T na periferia do infiltrado (36). O granuloma pode invadir ou envolver os fascículos

nervosos e dependendo da intensidade da inflamação pode ocorrer a destruição total de nervos cutâneos (37).

O polo lepromatoso (LL), engloba os pacientes com falha da resposta pró-inflamatória contra o bacilo. A infecção disseminada provoca múltiplas lesões de pele e dos nervos periféricos (Fig. 1.3, A). As primeiras lesões observadas costumam ser pápulas ou máculas eritematosas brilhantes sem perda de sensibilidade distribuídas simetricamente pela região do corpo afetada. Com a progressão da doença surgem novas lesões e as antigas formam placas ou nódulos que podem ou não apresentar perda de sensibilidade. Diversos nervos periféricos são comprometidos e dormência nos membros superiores e inferiores é comum. Em estados mais avançados da doença pode ocorrer espessamento difuso no rosto, nariz e orelhas (Fig. 1.3, A; direita). Pode ocorrer também perda de pelos da face, ulceração da mucosa nasal, deformidade nasal, perda de dente, inflamação ocular, acometimento de órgãos internos, alterações ósseas nos pés e mãos (32).

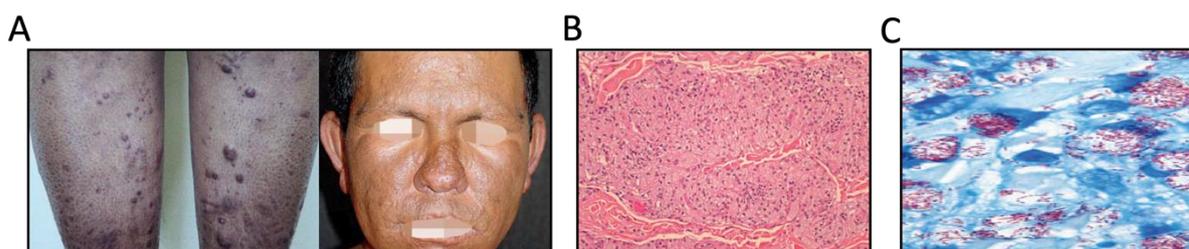


Figura 1.3 - Hanseníase lepromatosa polar (LL).

(A) Lesões com aspecto ictiosiforme em pele da perna com a presença de lepromas e infiltrado facial com perda de cílios. **(B)** Granuloma altamente desorganizado formado de macrófagos espumosos com poucos linfócitos dispersos difusamente. Hematoxilina e eosina (aumento de 400x). Adaptado de (38). **(C)** Alta carga bacilar ácido-resistente em lesão de pele de paciente LL. Marcação Fite (aumento de 1000x). Adaptado de (6).

A análise histológica da lesão LL mostra a formação de granuloma desorganizado composto de muitos macrófagos espumosos e poucos linfócitos T distribuídos difusamente pelo infiltrado (Fig. 1.3, B). Existe uma grande carga bacilar (Fig. 1.3, C), inclusive com formação de globias tanto nos macrófagos quanto nas células de Schwann (36). Os nervos periféricos comprometidos podem apresentar aparência hialina ou fibrosa devido à extensa redução da densidade de fibras nervosas e aumento de colágeno intraneural, respectivamente (39).

Entre os dois polos do espectro existem formas clinicamente instáveis com níveis variados de imunidade, sendo elas: Borderline-tuberculóide (BT), Borderline-borderline (BB) e Borderline-lepromatosa (BL). O grupo borderline é caracterizado pela diminuição progressiva da resposta celular pró-inflamatória contra o bacilo, assim como aumento do número de lesões (Fig. 1.4, A), desorganização dos granulomas

(Fig. 1.4, B) e carga bacilar (Fig. 1.4, C) à medida que a forma clínica se aproxima do polo LL da doença (5, 33). Os indivíduos BT apresentam lesões de pele com aparência e perda de sensibilidade similares às do grupo TT, porém as lesões são menores e em maior quantidade (32).

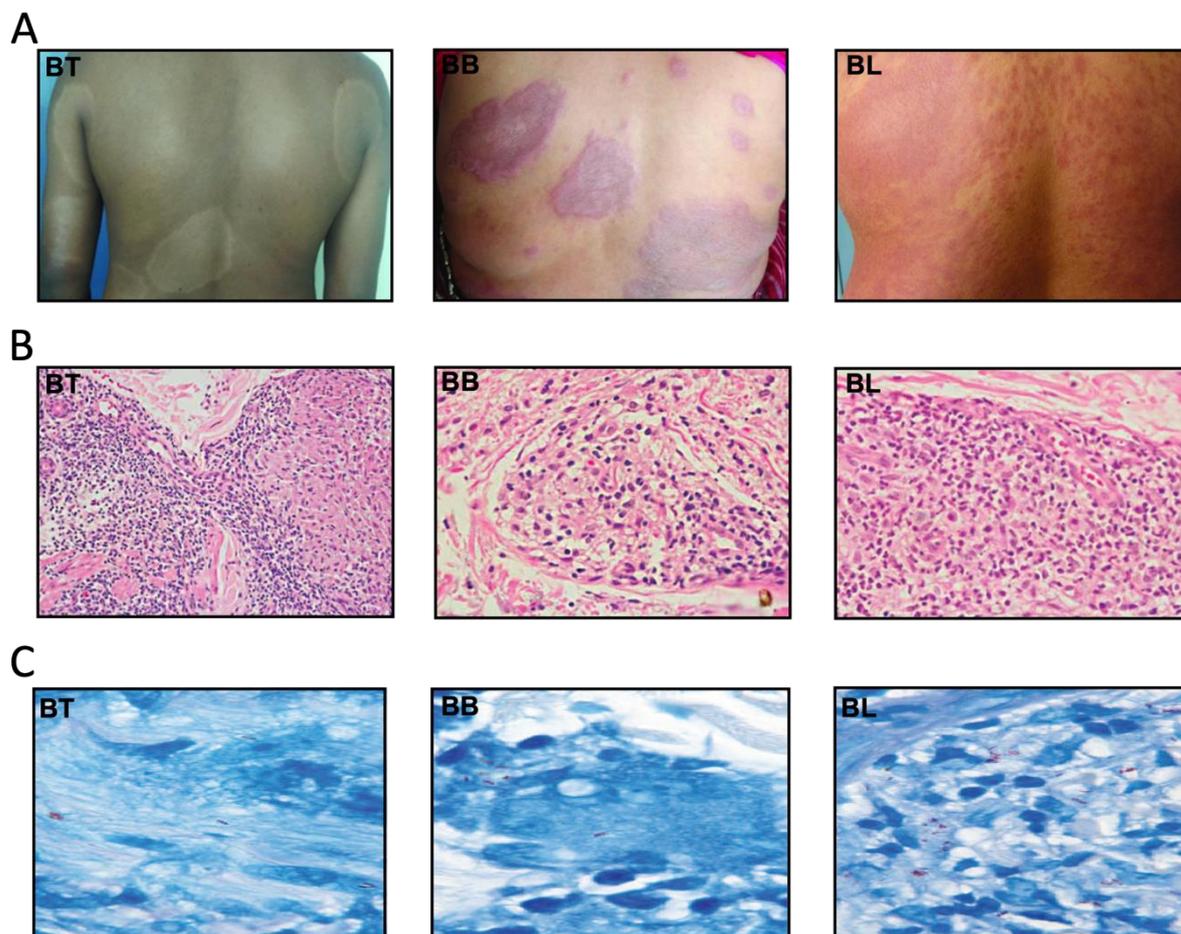


Figura 1.4 - Formas Borderlines de hanseníase.

(A) Paciente BT com placas hipopigmentadas com aspecto seco e com perda de pelo (esquerda). Paciente BB com múltiplas placas eritematosas com aspecto seco, tendo algumas lesões morfologia anular, onde as bordas externas são imprecisas e as bordas internas nítidas, evidenciando um aspecto de “queijo suíço”. A presença de lesões bem definidas sugere a mudança para o espectro tuberculóide (centro). Paciente BL com múltiplas placas/máculas eritematosas mal definidas com tendência a simetria em sua distribuição (direita). Hematoxilina e eosina (aumento de 400x). Adaptado de (40). **(B)** Granulomas com crescente desorganização à medida que a forma Borderline se aproxima do polo lepromatoso. Adaptado de (23). **(C)** Aumento da carga bacilar à medida que a forma Borderline se aproxima do polo lepromatoso. Marcação Fite (aumento de 1000x). Adaptado de (6).

As lesões dos indivíduos BB possuem características como tamanho e número intermediárias em relação às formas polares. As lesões desse grupo costumam ser placas eritematosas de centro oval hipopigmentado com bordas internas definidas e externas esmaecidas (28). Os sinais clínicos das lesões BL são similares às lesões LL, com exceção da distribuição assimétrica, brilho moderado e anestesia parcial das lesões. O acometimento neural é observado através do aumento simétrico dos nervos periféricos e ocorre logo após o surgimento de lesões (32).

As formas clínicas TT e BT constituem ao grupo PB, enquanto as formas clínicas BB, BL e LL constituem o grupo MB (28).

1.2 Resposta imune contra o *M. leprae*

Enquanto o sistema imune inato responde de forma rápida e inespecífica contra agentes infecciosos, a subsequente ativação da resposta adaptativa é indispensável para a geração de uma resposta imune efetiva contra esses patógenos (41). O sistema imune adaptativo é composto da imunidade humoral mediada por linfócitos B e imunidade celular mediada por linfócitos T (42). Neste estudo focaremos nas populações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺.

As células do sistema imune inato reconhecem agentes invasores através da detecção de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), isto é, moléculas comuns a diversos microrganismos, mas que estão ausentes no hospedeiro. Os PAMPs são identificados por receptores de reconhecimento de padrões (RRPs) expressos pelas células inatas (43). Diversas moléculas constituintes do *M. leprae* já foram descritas como ligantes de RRP. A ativação destes receptores, incluindo receptores do tipo toll (TLRs), é fundamental para a geração de uma resposta imune contra patógenos. Os macrófagos e as células de Schwann são os principais alvos da infecção pelo bacilo na pele (44).

As células dendríticas (DCs) possuem um papel fundamental na geração de linfócitos T de memória ao apresentarem antígenos de agentes invasores para linfócitos T virgens (T_v) nos gânglios linfáticos (45). As DCs podem residir tanto na epiderme como células de Langerhans (LCs) quanto na derme como DCs dérmicas (44). Os macrófagos assim como as DCs são células apresentadoras de antígenos (APCs) profissionais do sistema inato e podem apresentar antígenos do *M. leprae* para linfócitos T nos tecidos periféricos (46, 47).

Após o reconhecimento de patógenos, as APCs se tornam altamente eficazes na apresentação antigênica. Este processo consiste no aumento da expressão de moléculas do complexo de antígenos leucocitários humano (HLA) contendo peptídeos antigênicos, expressão de moléculas coestimuladoras como CD80, CD86 e CD40, e secreção de citocinas imunomoduladoras (45).

Os sinais recebidos durante a ativação das APCs nos tecidos periféricos induzem a produção de citocinas que por sua vez vão influenciar a diferenciação de linfócitos T_v em linfócitos T efetores e linfócitos T reguladores (Tregs). Por exemplo,

prostaglandina E₂ (PGE₂) estimula a secreção de citocinas indutoras de linfócitos TH2 pelas DCs, enquanto a presença de IFN- γ e interferons do tipo I estimulam a secreção de citocinas indutoras de linfócitos TH1. Já as citocinas TGF- β e IL-10 podem polarizar as APCs para induzir a diferenciação de linfócitos T em Tregs (48). As citocinas anti-inflamatórias e eicosanóides são detectados em altos níveis em lesões de pacientes MB, enquanto as citocinas pró-inflamatórias são detectadas em lesões de pacientes PB (49, 50). Assim, o microambiente da pele pode influenciar na diferenciação de linfócitos T a partir da polarização de APCs.

Estudos *in situ* de lesões cutâneas demonstram que pacientes PB apresentam maior abundância de DCs com alta expressão de CD1, molécula relacionada a apresentação antigênica de lipídios (51-53). Por outro lado, as DCs de lesões de pacientes MB são escassas e expressam receptores e moléculas inibidoras, reduzindo assim, a sua capacidade de maturação e apresentação antigênica (54-56). Além disso, os transcritos de moléculas coestimuladoras como CD80/CD86 estão presentes em maiores níveis em amostras de lesões de pele de pacientes PB que de pacientes MB (57). As DCs infectadas *in vitro* pelo *M. leprae* exibem baixos níveis de HLA e expressam PGL-I em sua superfície. O bloqueio destas células com anticorpos anti-PLG-I induz a proliferação e produção de IFN- γ pelas linfócitos T, sugerindo que a expressão de PGL-I em células infectadas pode inibir a resposta celular (58). Além disso, as DCs derivadas de monócitos de pacientes MB produzem baixos níveis de IL-12, citocina necessária para a diferenciação de linfócitos TH1, após estimulação *in vitro* com antígenos de *M. leprae*, sugerindo que a baixa produção desta citocina pode contribuir para a fraca resposta celular do tipo TH1 observada nestes pacientes (59).

As APCs apresentam antígenos de peptídeos exógenos para linfócitos T CD4⁺ através de HLA de classe II (60). Os linfócitos B após estimulação antigênica também podem processar e apresentar antígenos para linfócitos T CD4⁺ (61). Embora os linfócitos T CD8⁺ sejam estimulados majoritariamente por antígenos endógenos através de moléculas HLA de classe I, eles também podem reconhecer antígenos exógenos a partir de apresentação cruzada, mecanismo presente em DCs especializadas que capturam antígenos extracelulares e apresentam para linfócitos T CD8⁺ (62). Os linfócitos T reconhecem o complexo HLA-peptídeo cognato por meio de receptores de linfócitos T (TCR) presentes em sua superfície. A ativação do TCR aliada a sinais coestimuladores, como CD28 e citocinas imunomoduladoras fornecem os três sinais necessários para a ativação, expansão clonal e diferenciação de linfócitos T (63).

Durante uma resposta imune são gerados linfócitos T de curta duração e células de memória que persistem. A população de curta duração é de células efetoras diferenciadas terminais (T_{EDT}) que sofrem apoptose após a eliminação do agente infeccioso. Estes linfócitos T são caracterizados pela expressão de CD45RA e ausência de receptores de migração para órgãos linfoides (CD62L e CCR7), possuindo alta atividade efetora e baixa capacidade proliferativa (64). Já os linfócitos T de memória são caracterizados pela expressão de CD45RO e ausência de CD45RA, persistindo após a fase de contração linfocitária. Em uma segunda exposição, os linfócitos de memória são capazes de responder rapidamente contra o patógeno (65).

A população de memória pode ser dividida em três subpopulações, sendo elas: linfócitos T de memória central (T_{MC}), linfócitos T de memória efetora (T_{ME}) e linfócitos T de memória residentes em tecido (T_{MRT}). Embora seja difícil determinar a relação entre as subpopulações de linfócitos T de memória humanas, é proposto que linfócitos T_V ativados possam se diferenciar progressivamente em linfócitos T_{MC} e T_{ME} , sendo estes precursores de linfócitos T_{EDT} . Linfócitos T_{MRT} provavelmente também são linfócitos diferenciados derivados de linfócitos T_{ME} e T_{EDT} que migram para os tecidos e ficam retidos nestes locais. Não é possível excluir a possibilidade de que linfócitos T_{MC} também sejam capazes de gerar linfócitos T_{MRT} , assim como linfócitos T_{EDT} possam gerar linfócitos T_{ME} (Fig.1.5).

Os linfócitos T_{MC} expressam CCR7 e CD62L, circulando entre sangue e órgãos linfoides. Estas células possuem alta capacidade proliferativa e quando ativadas podem rapidamente gerar novas células. Por outro lado, os linfócitos T_{ME} regulam negativamente moléculas de migração para órgãos linfoides e expressam receptores de quimiocinas associados a tecidos específicos. Deste modo, os T_{ME} circulam entre sangue e órgãos periféricos, respondendo rapidamente com funções efetoras em caso de reativação (64).

Os linfócitos T_{MRT} são células com função efetora e já foram considerados células não circulantes com residência permanente em tecidos periféricos. Entretanto, um estudo recente demonstrou que estas células podem sair dos tecidos periféricos e mediar inflamação TH2 sistêmica (66). Classicamente, os linfócitos T_{MRT} da pele são caracterizados pela expressão de CD69 e algumas subpopulações também expressam as integrinas CD103 e CCR8 (67).

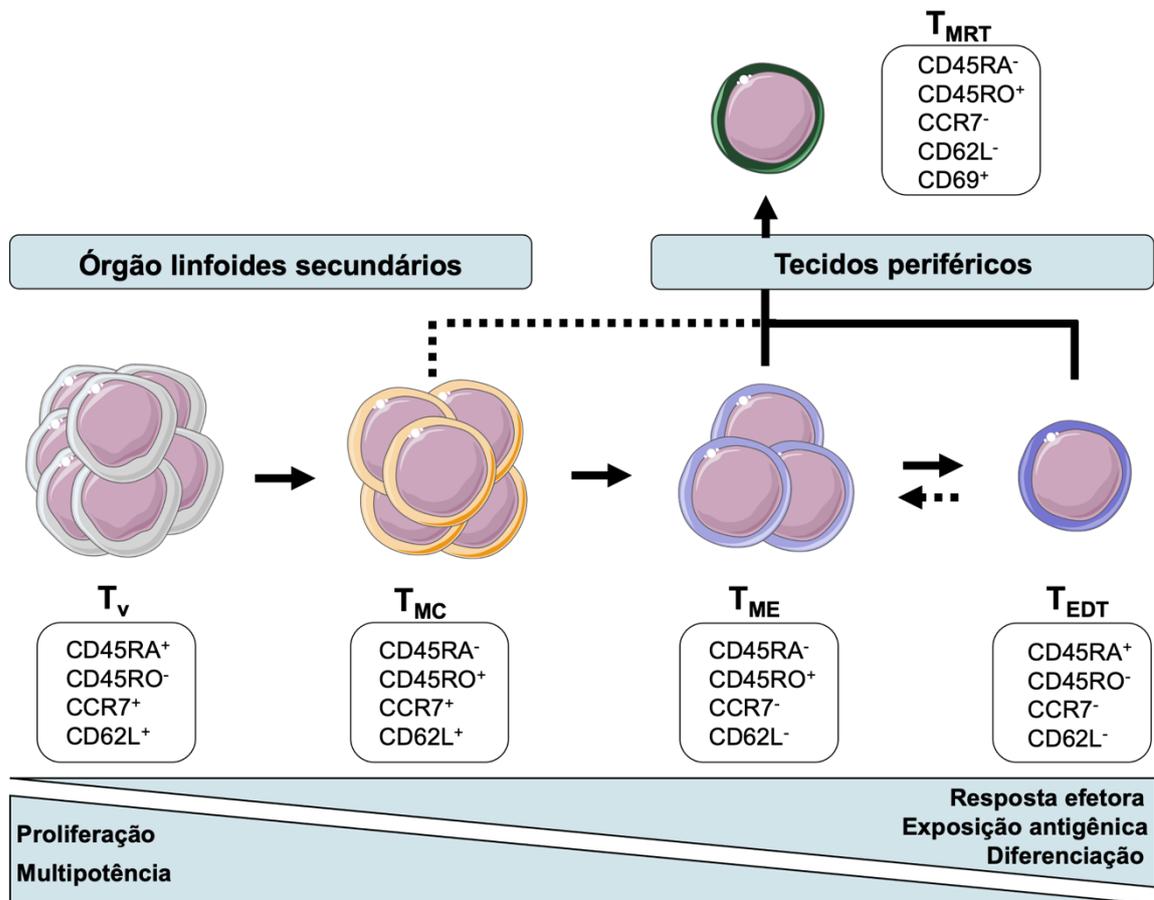


Figura 1.5 - Modelo para geração de linfócitos T de memória.

Os T virgens (T_v) ativados se diferenciam em populações de células de memória circulantes, sendo elas: linfócitos T de memória central (T_{MC}) e linfócitos T de memória efetora (T_{ME}). Os linfócitos T de memória são precursores de linfócitos T terminalmente diferenciados (T_{EDT}). Linfócitos T_v e T_{MC} circulam entre o sangue e órgãos linfoides secundários, enquanto Linfócitos T_{ME} e T_{EDT} circulam entre sangue e tecidos periféricos. Linfócitos T de memória residentes em tecido (T_{MRT}) estão presentes nos compartimentos periféricos e são provavelmente linfócitos T terminalmente diferenciados. Eles devem ser derivados tanto de linfócitos T_{ME} quanto T_{EDT} que migram para os tecidos periféricos através de receptores de quimiocinas tecido-específicas. Não é possível descartar que os linfócitos T_{MC} também possam gerar linfócitos T_{MRT}, assim como linfócitos T_{EDT} possam gerar T_{ME} (setas pontilhadas). Criado com smart.servier.com

1.2.1 Linfócitos T CD8⁺

Os linfócitos T CD8⁺ possuem um vasto repertório de moléculas efetoras com atividade microbicida. A principal via engloba a morte celular de células infectadas através de citólise direta mediada pela liberação de perforina, granzimas e Fas (62). A maioria das proteínas citotóxicas é pré-sintetizada e o conteúdo só é liberado após o contato com a célula alvo, permitindo uma resposta direcionada e rápida (68). Estes linfócitos citotóxicos também produzem citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF, e quimiocinas que irão atrair células inflamatórias para o local de infecção (62). O receptor de quimiocinas CXCR3 é expresso em linfócitos T CD8⁺ ativados e regula a migração para áreas de inflamação do tipo TH1 (69).

Diversos estudos já demonstraram que os linfócitos T CD8⁺ citotóxicos participam da defesa do organismo contra micobactérias (41). Lalvani e colaboradores demonstraram a presença de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ e com atividade lítica em resposta para *M. tuberculosis* em pacientes com tuberculose (70). A depleção destas células em macacos rhesus imunizados para *M. tuberculosis* culmina na redução significativa da imunidade contra a tuberculose, sugerindo que os linfócitos T CD8⁺ contribuem para o controle da infecção após desafio com o patógeno (71). O IFN- γ aumenta a ativação destes linfócitos e estimula o recrutamento para os locais de inflamação (72, 73).

Nas lesões de pele de pacientes PB, os linfócitos T CD8⁺ citotóxicos produzem IFN- γ e estão presentes na periferia das lesões, com a taxa entre células CD4⁺:CD8⁺ (2:1) semelhante à do sangue. Linfócitos T CD8⁺ são capazes de lisar células de Schwann e macrófagos infectados pelo bacilo *in vitro*, sugerindo que estas células desempenham um papel importante na hanseníase (74, 75). Pacientes PB possuem maior frequência de linfócitos T CD8⁺ com expressão simultânea de granzima B, perforina e granulicina no sangue que pacientes MB (76).

Por outro lado, em lesões de pele de pacientes MB, o número de linfócitos T CD8⁺ supera o número de CD4⁺ (2:1). Estas células apresentam um fenótipo supressor (CD28⁻) com alta produção de IL-4, sugerindo um perfil anti-inflamatório e não citotóxico nestes pacientes (6, 77, 78). A IL-4 induz *in vitro* a expansão de células CD8⁺CD28⁻ de pacientes MB (79). Além disso, estas células não proliferam em resposta a antígenos de *M. leprae* e restringem a proliferação e produção de citocinas *in vitro* por outras células, sugerindo que estas células contribuem para a inibição da resposta efetora nestes pacientes (80).

Recentemente, um estudo avaliou por sequenciamento “single cell” de RNA amostras de pele de pacientes MB e doadores saudáveis. Os autores observaram maior expressão gênica de LAG-3 (gene de ativação de linfócitos 3) e TIGIT (imunorreceptor de linfócitos T com domínios Ig e ITIM) nos linfócitos T CD8⁺ de pacientes MB, sugerindo que estas células apresentam um perfil de exaustão nas lesões (81).

1.2.2 Linfócitos T CD4⁺

As principais subpopulações de linfócitos T CD4⁺ associadas à resposta imune na hanseníase, incluem linfócitos TH1, TH2, TH17, TH9 e Tregs (Fig. 1.6). Essas células expressam fatores de transcrição linhagem-específicos que regulam a sua diferenciação, determinando atividades funcionais e padrões migratórios (45). Assim, os linfócitos T auxiliares podem gerar respostas imunes contra diversos microrganismos, incluindo agentes intracelulares e extracelulares (45).

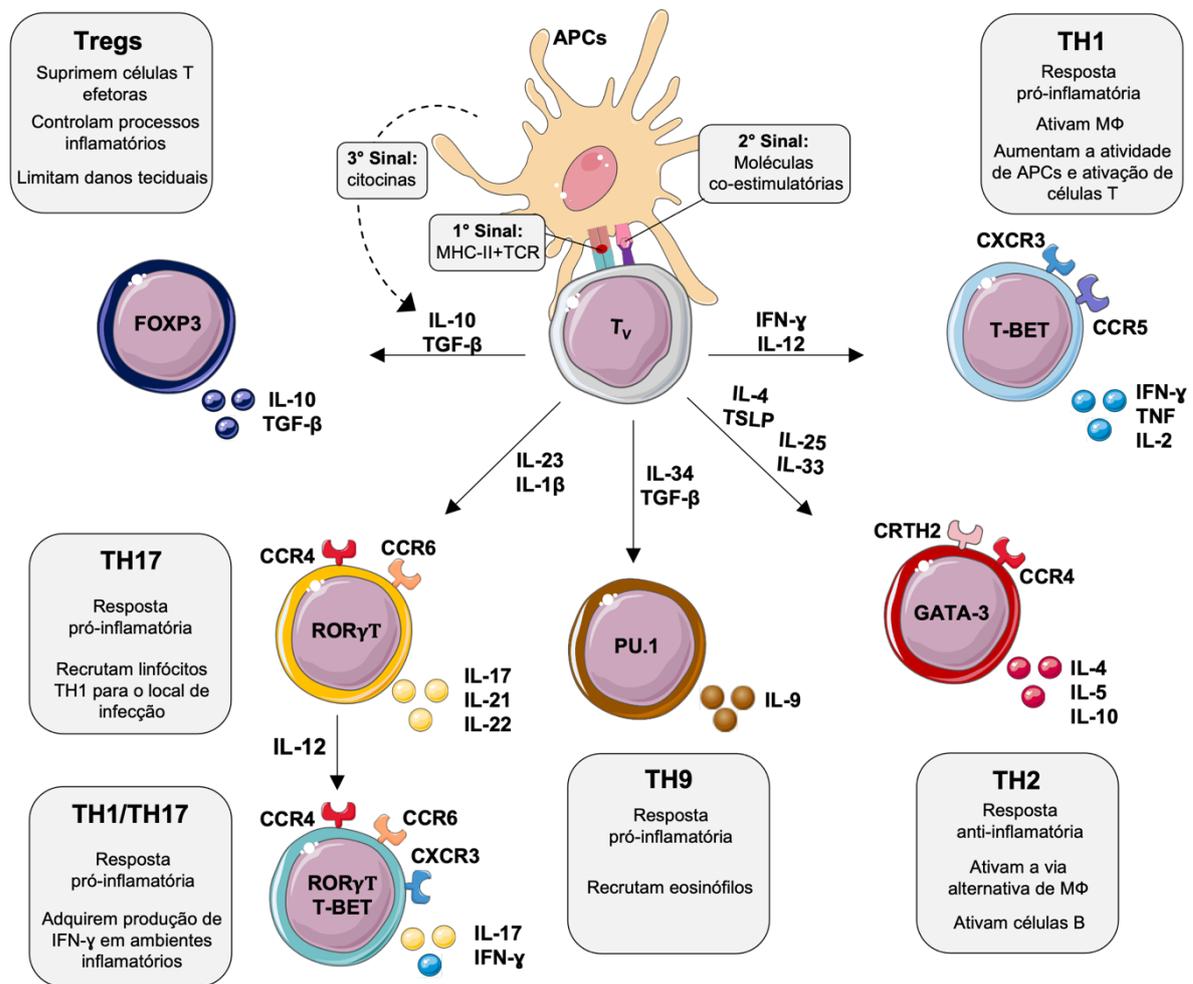


Figura 1.6 - Principais subpopulações de linfócitos T CD4⁺

Os linfócitos T virgens (T_v) necessitam de três sinais para se diferenciarem em linfócitos T auxiliares (TH) ou linfócitos T reguladores (Tregs). O primeiro sinal é emitido pela ativação do receptor de Linfócitos T através da ligação do peptídeo cognato associado a moléculas de HLA de classe II (HLA-II). O segundo e terceiro sinal são mediados pela interação de moléculas coestimuladoras e citocinas imunomoduladoras, respectivamente. Os linfócitos T expressam fatores de transcrição que regulam a sua diferenciação e atividade funcional, incluindo a indução de receptores de quimiocinas que por sua vez vão mediar a migração dessas células para locais de inflamação. As principais subpopulações de linfócitos T auxiliares envolvidas na hanseníase, incluem TH1, TH2, TH17, TH9 e possivelmente TH1/TH17. APCs, células apresentadoras de antígenos; HLA-II, moléculas do complexo principal de histocompatibilidade humano II; TCR, receptor de linfócitos T; TSLP, linfopoiatina estromal tímica; MΦ, macrófagos. Criado com smart.servier.com.

Os linfócitos TH1 são caracterizados pela produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , TNF e IL-2. O fator de transcrição linhagem-específico T-BET regula a diferenciação destas células na presença das citocinas IFN- γ e IL-12. Durante a sua diferenciação, os linfócitos TH1 adquirem a expressão de receptores de quimiocinas, incluindo CXCR3 e CCR5 que medeiam a migração destas células para locais de inflamação (45, 82). O papel das citocinas do tipo TH1 na defesa contra agentes infecciosos foi demonstrado em modelos murinos geneticamente deficientes para IFN- γ , que são mais suscetíveis a patógenos como *M. tuberculosis* e *Leishmania major* (83-86). Além disso, esses animais sobrevivem substancialmente menos que camundongos selvagens após infecção (87).

O IFN- γ induz o aumento da expressão de moléculas HLA de classe II em APCs, estimulando a apresentação antigênica, assim como estimula a produção de TNF e quimiocinas por queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais. Além disso, o IFN- γ induz a retração de células endoteliais e o relaxamento do músculo liso, culminando no acúmulo de sangue em vasos dilatados, favorecendo a passagem de leucócitos (88). Este ambiente pró-inflamatório estimula a ativação da função antimicrobiana dos macrófagos (82).

As citocinas do tipo TH1, incluindo IFN- γ , IL-2 e TNF estão presentes predominantemente nas lesões PB da doença, isto é, indivíduos que conseguem controlar a infecção (82, 89). Martins e colaboradores demonstraram que os níveis de IFN- γ nos sobrenadantes de culturas de células mononucleares sanguíneas (CMS) estimuladas com peptídeos específicos de *M. leprae* caem progressivamente à medida que há aumento de exposição ao bacilo em indivíduos saudáveis ou carga bacilar em pacientes (33). Recentemente, também foi demonstrado *in vitro* que pacientes PB e doadores saudáveis apresentam maiores frequências de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ em resposta a antígenos de *M. leprae* (90).

Os monócitos circulantes atingem o local de infecção e sofrem diferenciação em macrófagos residentes em tecido com fenótipos e funções dependentes dos fatores teciduais presentes no microambiente em que estão (91). A presença de IFN- γ e IL-15 nas lesões de pacientes PB, induz a ativação da via antimicrobiana dependente de vitamina D e, conseqüentemente, diferenciação de macrófagos com fenótipo M1 (92, 93). O IFN- γ também induz a expressão de JAG pelas células endoteliais, e JAG induz a diferenciação de macrófagos pró-inflamatórios (92). Os macrófagos M1 produzem citocinas pró-inflamatórias como TNF, assim como enzimas

que geram a produção de óxido nítrico, induzindo radicais livres que destroem o bacilo (82). O IFN- γ também induz a produção de peptídeos antimicrobianos e autofagia nos macrófagos M1, sugerindo que o *M. leprae* também pode ser eliminado por estas vias moleculares (94, 95).

Em 2005, uma nova subpopulação de linfócitos T auxiliares produtora de IL-17 foi identificada em modelo murino de encefalomielite autoimune (96). Atualmente, sabe-se que a subpopulação TH17 também produz outras citocinas, como IL-21, IL-22 e IL-26 (97). Em seres humanos, as citocinas IL-23 e IL1 β regulam positivamente a expressão do fator de transcrição linhagem-específico ROR γ T que por sua vez orquestra a diferenciação desta linhagem celular (98). Os linfócitos TH17 também expressam os receptores de quimiocinas CCR4 e CCR6 (97).

A linhagem TH17 é principalmente associada à patogênese de diversas doenças autoimunes e inflamatórias, incluindo psoríase, esclerose múltipla, artrite reumatoide, e doença inflamatória intestinal. Essas células contribuem para a inflamação tecidual crônica que é acompanhada pela destruição da matriz extracelular (99). Embora os linfócitos TH17 tenham uma participação discreta contra patógenos intracelulares, diversos estudos demonstram a contribuição destas células na proteção contra *Mycobacteria sp.*, *Leishmania sp.*, *Listeria sp.*, e *Salmonella sp* (100, 101).

Ainda, células CD4⁺IL-17⁺ presentes nos pulmões de camundongos imunizados para *M. tuberculosis* produzem rapidamente quimiocinas após desafio, recrutando linfócitos TH1 para o local de infecção. A depleção de linfócitos TH17 resulta na diminuição do número de linfócitos TH1 nos pulmões destes animais, sugerindo que a população TH17 também contribui para a proteção do tipo TH1 contra a infecção (102). A linhagem TH17 é sensível à IL-12 e, em condições inflamatórias do tipo TH1, podem expressar T-BET, se tornando células TH1/TH17. A regulação positiva de T-BET nestas células induz a produção de IFN- γ e a expressão de CXCR3 (103-109).

O envolvimento da subpopulação TH17 na resposta pró-inflamatória contra o *M. leprae* já foi demonstrado em alguns estudos. Os níveis de IL-17 no soro são significativamente menores em pacientes com hanseníase quando comparados com controles saudáveis, tendo os pacientes MB a menor produção desta citocina. Isto sugere que assim como o IFN- γ , a diminuição da produção de IL-17 pode estar associada ao desenvolvimento da doença, assim como progressão das formas clínicas da hanseníase (110).

Além disso, pacientes com as formas PB apresentam maiores frequências de células CD4⁺ produtoras de IL-17, e maior expressão de fatores de transcrição RORC *in vitro* em resposta a antígenos de *M. leprae* (111, 112). As lesões destes pacientes também exibem maior expressão de IL17A e ROR γ T, e maior presença de células CD4⁺IL-17⁺ (112, 113). Dang e colaboradores também observaram maiores níveis de IL-26 nessas lesões cutâneas. Além disso, os autores demonstraram *in vitro* que a IL-26 é capaz de entrar em células infectadas e reduzir a viabilidade da bactéria, sugerindo que esta citocina produzida por linfócitos TH17 contribui para a defesa do hospedeiro contra bactérias intracelulares (114).

A IL-17 também já foi associada ao processo de desmielinização inflamatória do nervo periférico na hanseníase. Esta citocina regula negativamente a produção do fator de crescimento do nervo (NGF) e de seu receptor nos pacientes PB, contribuindo para o dano neural nestes pacientes (115). Assim, os linfócitos TH17 podem ter participação na geração de lesões dos nervos periféricos.

Recentemente, os linfócitos TH9, produtores de IL-9, foram descritos em seres humanos (116). Estas células se diferenciam na presença de IL-4 e TGF- β , estando o fator de transcrição PU.1 envolvido neste processo (117). Além disso, estes linfócitos já foram associados à resposta imune contra vários patógenos, incluindo helmintos, *C. albicans* e *M. tuberculosis* (118-123). A maioria dos linfócitos TH9 que expressam CCR3 também expressa CXCR3 e CCR6. Assim, estes receptores de quimiocinas podem ser usados para identificá-los (124).

Em pacientes PB, a IL-9 neutraliza os efeitos negativos das citocinas anti-inflamatórias do tipo TH2 induzida pelo *M. leprae* (125). Análises quantitativas de IL-9 em lesões de pele revelaram diferenças nos níveis desta citocina, tendo os pacientes PB predominância de IL-9 quando comparados com pacientes MB. Além disso, as citocinas IL-4, IL-10 e TGF- β tendem a ser negativamente correlacionadas com a expressão de IL-9, indicando uma possível atividade antagônica nas lesões de pele de pacientes (126).

A resposta do tipo TH2 é principalmente induzida contra patógenos extracelulares e reações alérgicas. Durante o seu processo de diferenciação, coordenado pelo fator de transcrição GATA-3, os linfócitos TH2 regulam positivamente a expressão de CCR4 e CRTH2 (82). Embora a IL-4 seja essencial para a diferenciação *in vitro* e *in vivo* desta subpopulação, outras vias de sinalização como GATA-3 e citocinas, incluindo linfopietina estromal tímica (TSLP), IL-25 e IL-33 também tem participação na indução de linfócitos TH2 *in vivo* (127).

As citocinas do tipo TH2 induzem a ativação, maturação e proliferação de células B, assim como produção de anticorpos e mudança de classe de imunoglobulinas (128-131). A inflamação mediada por estas citocinas é caracterizada pela infiltração de eosinófilos, basófilos e degranulação de mastócitos, processo que é dependente de imunoglobulina IgE (88). Stager e colaboradores mostraram que a vacinação de camundongos selvagens com a proteína recombinante HASPB-1 induz linfócitos T CD8⁺ específicos e gera proteção após infecção com *L. donovani*. Entretanto, em camundongos deficientes para IL-4 e para o receptor de IL-4, a proteção é ineficaz, sugerindo que a sinalização desta citocina é necessária para a geração de uma resposta protetora eficaz (132).

As lesões de pele de pacientes MB são caracterizadas pela predominância de citocinas anti-inflamatórias do tipo TH2 como IL-4, IL-10 e IL-5 (89). Estes pacientes apresentam maiores frequências *in vitro* de células CD4⁺IL-4⁺ em resposta a antígenos de *M. leprae* (90). Além disso, já foi demonstrado que a IL-5 aumenta a produção de IgM pelas células B de pacientes em ensaios *in vitro*, sugerindo o envolvimento dos linfócitos TH2 na resposta humoral na doença (133).

A IL-10 induz a via alternativa de macrófagos nos pacientes MB, gerando células altamente fagocíticas com baixa atividade antimicrobiana (93, 134). Macrófagos M2 expressam altos níveis de CD163, receptor associado à internalização e sobrevivência do *M. leprae* (135). Estes macrófagos também produzem citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, IL-13, IL-27, TGF- β e FGF- β , assim como expressam enzimas associadas a mecanismos imunossupressores e de reparo, incluindo indoleamina 2,3-dioxigenase 1 (IDO-1) e arginase 1 (56, 136). A infecção pelo *M. leprae* também altera o citoplasma das células hospedeiras metabolicamente para um fenótipo lipogênico, com acumulação de corpúsculos lipídicos derivados de ácidos graxos, fosfolipídios, fosfolipídios oxidados e colesterol. Estas alterações culminam no aspecto espumoso característico dos macrófagos com perfil M2 (137-142).

Desta forma, linfócitos TH1, TH17, TH1/TH17 e TH9, assim como linfócitos T CD8⁺ citotóxicos podem mediar as respostas pró-inflamatórias nas formas PB da doença, isto é, indivíduos com certa resistência a proliferação do bacilo. O recrutamento destas subpopulações para as áreas de infecção deve contribuir para a manutenção da inflamação crônica nestes pacientes (82). Por outro lado, respostas anti-inflamatórias induzidas por linfócitos TH2, Tregs e CD8⁺ supressores podem gerar um ambiente permissivo para a proliferação e disseminação do bacilo em indivíduos com falha na resposta efetora, isto é, MB (Fig. 1.7).

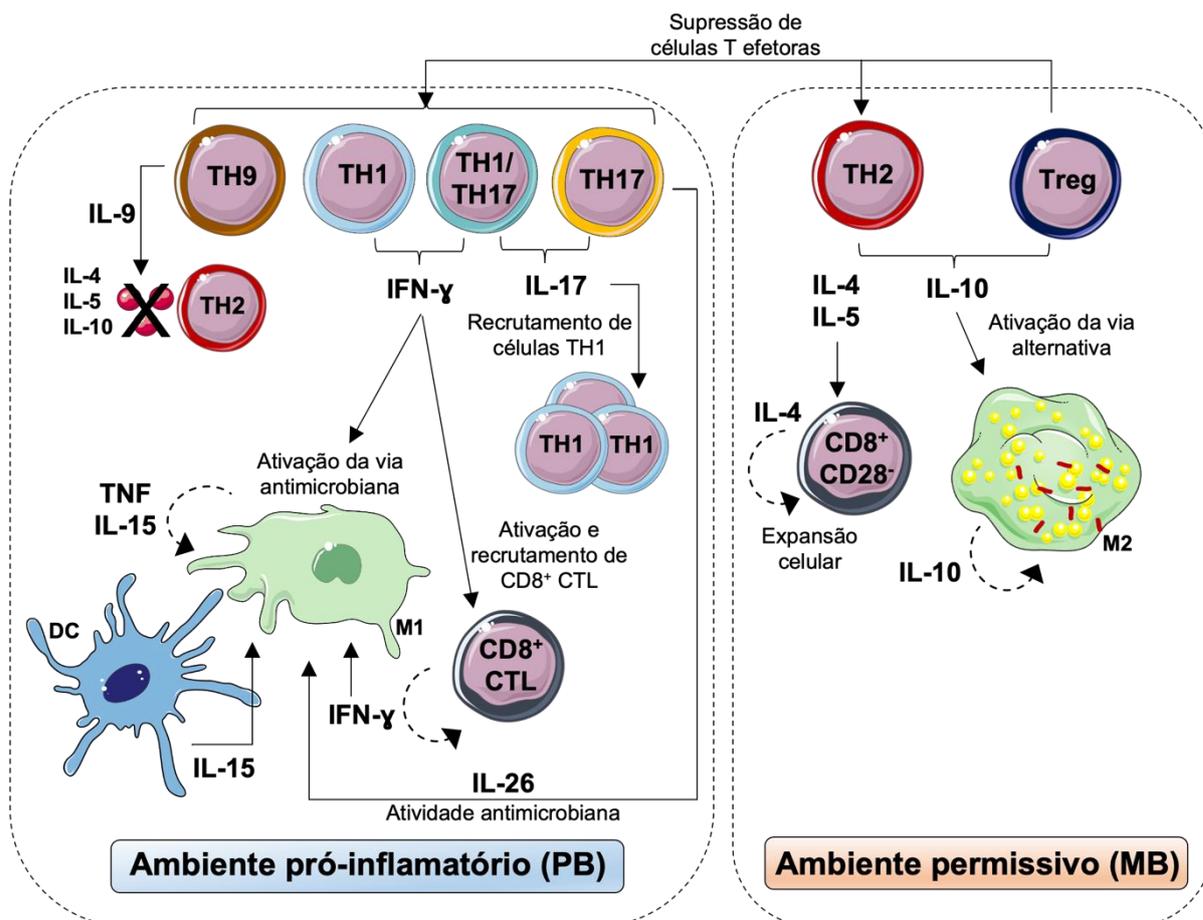


Figura 1.7 - Modelo de resposta imune na hanseníase.

Pacientes paucibacilares (PB) apresentam resposta imune pró-inflamatória quase efetiva contra o *M. leprae*. Essa resposta é possivelmente mediada por linfócitos T CD4⁺ auxiliares, incluindo TH1, TH17, TH1/TH17 e TH9, assim como linfócitos T CD8⁺ citotóxicas (CTL). O IFN- γ produzido por essas células e IL-15 produzida pelas células inatas ativam a via antimicrobiana dos macrófagos, resultando em macrófagos com perfil M1 que matam o bacilo. A IL-17 recruta Linfócitos TH1 para o local de inflamação, enquanto a IL-26 possui atividade antimicrobiana que resulta na diminuição da viabilidade do *M. leprae* em células infectadas. A citocina IL-9 neutraliza os efeitos das citocinas do tipo TH2 nestes pacientes. Em contraste, pacientes multibacilares (MB) exibem resposta anti-inflamatória mediada por linfócitos TH2, Tregs e CD8⁺CD28⁻ (perfil supressor), resultando em um ambiente permissivo para o bacilo. A IL-10 ativa a via alternativa dos macrófagos, aumentando sua capacidade fagocítica sem ativação da via antimicrobiana. As células CD8⁺ supressoras produzem altos níveis de IL-4 que por sua vez estimula a expansão destas células. Os Tregs podem induzir a supressão da resposta efetora contra o bacilo nestes pacientes através de diversos mecanismos moleculares. Criado com smart.servier.com.

1.3 Linfócitos T reguladores

Os linfócitos T com papel crítico na tolerância imune contra antígenos próprios e exógenos são os Tregs (143-145). Estas células controlam processos inflamatórios, limitando danos teciduais, ação que pode beneficiar agentes infecciosos, como o *M. leprae* (146). Belkaid e colaboradores demonstraram em modelo murino para Leishmaniose que os Tregs (CD4⁺CD25⁺) se acumulam na derme dos animais durante infecção por *L. major* e contribuem para a persistência do parasita ao suprimir a resposta efetora no local de infecção (147).

Os Tregs são linfócitos T CD4⁺ caracterizados fenotipicamente pela expressão estável do fator de transcrição linhagem-específico “Forkhead box protein 3” (FOXP3) e pela alta expressão de CD25, cadeia alfa do receptor de IL-2 (148). A sinalização de IL-2 é indispensável para a indução, manutenção, proliferação e atividade supressora dos Tregs. Embora os Tregs expressem CD25, eles não são capazes de produzir IL-2, dependendo da citocina produzida por linfócitos T convencionais (Tconvs) ativados (149).

Atualmente, os Tregs FOXP3⁺ são nomeados de acordo com o seu local de diferenciação, isto é, Tregs tímicos (tTregs), Tregs periféricos (pTregs) e Tregs induzidos *in vitro* (iTregs). Esta nomenclatura fornece uma indicação clara da origem das diversas subpopulações de Tregs (150). Os tTregs possuem papel essencial na tolerância natural a antígenos próprios e prevenção de doenças autoimunes. Eles são gerados durante os estágios iniciais do desenvolvimento fetal e neonatal. A diferenciação dos tTregs ocorre através da seleção positiva de timócitos CD4⁺ com afinidade intermediária/alta por complexos de HLA de classe II e peptídeos próprios no timo. Após sua diferenciação, os tTregs migram para tecidos periféricos, onde atuam inibindo a ativação de outros linfócitos T auto-reativos (151, 152).

Os pTregs são gerados nos tecidos periféricos a partir da diferenciação de linfócitos T_V sob condições imunológicas específicas, como baixas doses de antígenos e na presença de IL-2 e TGF- β . Acredita-se que a diferenciação seja induzida em resposta a antígenos não-próprios, incluindo alérgenos, microbiotas comensais e patógenos (148). Por fim, iTregs são gerados *in vitro* também na presença de IL-2 e TGF- β . Entretanto, estas células perdem tanto a expressão de FOXP3 quanto a atividade supressora na ausência de TGF- β . Os tTregs e pTregs expressam estávelmente FOXP3, enquanto os iTregs expressam de forma instável (153).

1.3.1 Fator de transcrição FOXP3

A importância da expressão de FOXP3 pelos Tregs é evidenciada em camundongos e seres humanos que apresentam mutações no gene deste fator de transcrição. A ausência da expressão de FOXP3 e conseqüentemente Tregs funcionais acarreta em doenças autoimunes linfoproliferativas (154). Este regulador mestre da linhagem é crítico tanto para desenvolvimento quanto para manutenção e atividade supressora dos Tregs. Além disso, FOXP3 inibe genes associados a outras subpopulações de linfócitos T e amplifica a expressão de moléculas associadas ao

fenótipo regulador como CD25, CTLA-4 (proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos) e GITR (proteína relacionada ao TNFR induzida por glicocorticóide) (155-157).

O estabelecimento da linhagem só é alcançado através da combinação da expressão de FOXP3 com o desenvolvimento de alterações epigenéticas que levam a um padrão de hipometilação específico de Tregs. Esses dois processos independentes são imprescindíveis para que os Tregs FOXP3⁺ adquiram todo o perfil transcricional, estabilidade e características funcionais desta subpopulação (158).

Além do promotor do gene FOXP3, três elementos conservados não codificantes (CNS-1 a 3) são reguladores chaves da indução e estabilização da expressão deste fator de transcrição. Essas regiões são reguladas epigeneticamente, ou seja, apresentam padrões reguladores que não alteram a sequência básica do DNA. Os Tregs apresentam demetilações nas ilhas CpGs, assim como histonas mais acetiladas nas regiões reguladoras que Tconvs, permitindo a ligação de diversos fatores de transcrição nestas regiões (153).

A região CNS-1 é crítica para a diferenciação de pTregs, pois contém o elemento sensível a TGF- β . A região CNS-2 é responsável pela estabilidade da expressão de FOXP3, sendo também conhecida como região desmetilada específica de Tregs (TSDR). Tanto os tTregs quanto os pTregs apresentam esta região altamente desmetilada (143, 158-160). Em contraste, a região TSDR é hipermetilada em Tconvs e parcialmente metilada em iTregs, resultando em expressão instável de FOXP3 (159). Devido às diferenças nos perfis de metilação entre Tregs e Tconvs, a identidade de um Treg pode ser confirmada em nível molecular e epigenético através da detecção do padrão de hipometilação da região TSDR (143).

Por fim, a região CNS-3 desempenha um papel no limiar de estímulos de TCR necessários para a expressão de FOXP3 (161). Além disso, apresenta tanto acetilações quanto metilações de histonas, resultando em cromatina permissiva (162).

1.3.2 Mecanismos de supressão de Tregs

Os Tregs precisam de estimulação via TCR para adquirirem sua função supressora. Entretanto, uma vez ativados, os Tregs podem suprimir células efectoras independentemente do antígeno, isto é, sua função supressora não é sempre antígeno-específica (163). Estas células podem suprimir os Tefs através de mecanismos metabólicos, modulação de APCs, produção de citocinas anti-

inflamatórias e indução de apoptose (Figura 1.8). Essas vias possivelmente dependem de múltiplos fatores, incluindo tipo de célula alvo, status de ativação, localização e citocinas (164, 165).

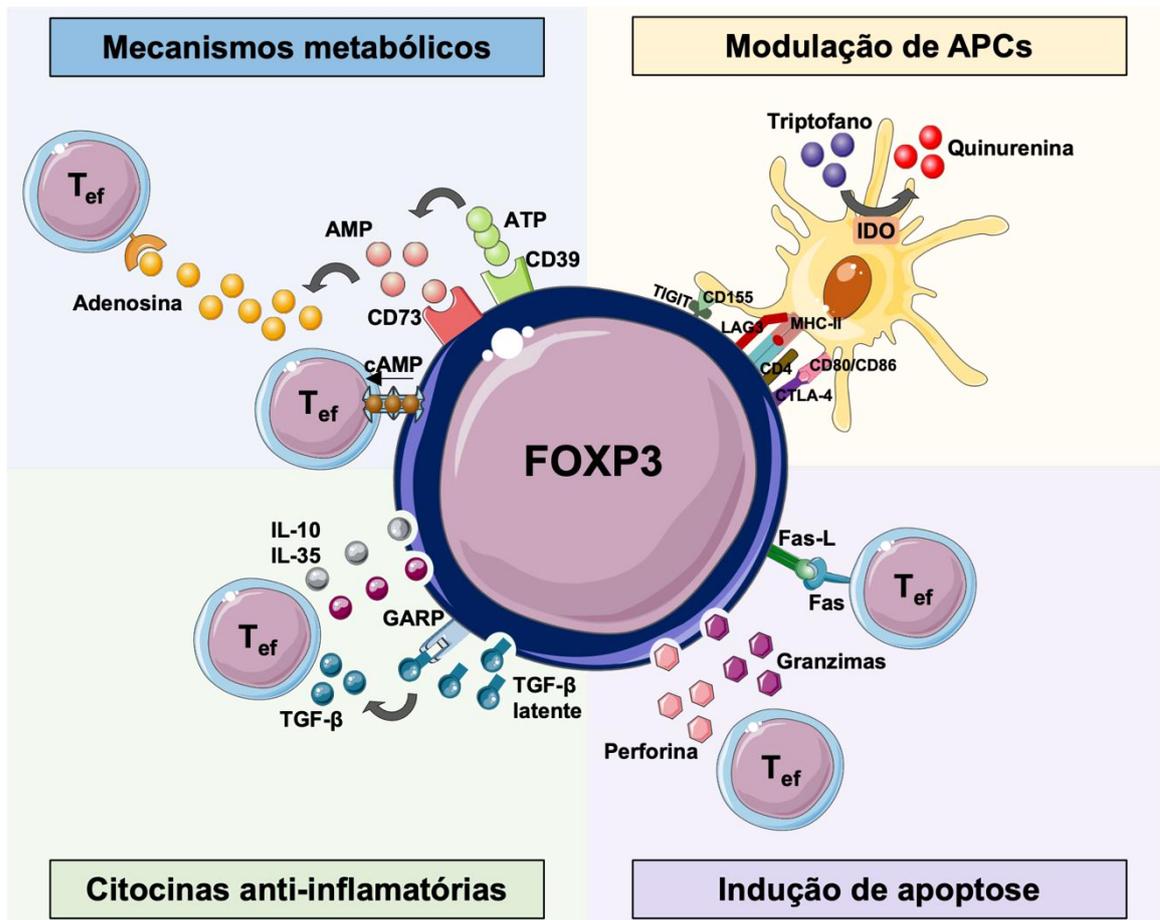


Figura 1.8 - Mecanismos de supressão de linfócitos T reguladores (Tregs).

Os Tregs suprimem os linfócitos T efetores por diversas vias moleculares. **Mecanismos metabólicos:** os Tregs expressam as ectoenzimas CD39 e CD73 que em conjunto convertem ADP em adenosina, um potente imunorregulador. Os Tregs também expressam um alto nível de AMPc intracelular e são capazes de transferir via junções comunicantes para células efectoras, inibindo a produção de IL-2. **Mecanismos de modulação de células apresentadoras de antígenos (APCs):** Os Tregs expressam em sua superfície moléculas inibidoras, incluindo TIGIT, LAG-3 e CTLA-4 que geram sinais inibidores para as APCs, resultando na supressão da sua maturação e capacidade de apresentação antigênica. CTLA-4 também induz a expressão da enzima IDO que cataboliza o triptofano em quinurenina, privando as células efectoras deste aminoácido essencial. **Citocinas anti-inflamatórias:** Os Tregs produzem citocinas, como IL-10, IL-35 e TGF- β . A proteína GARP é expressa na superfície dos Tregs após ativação e converte TGF- β latente na sua forma ativa. **Indução de apoptose:** Os Tregs podem produzir moléculas como granzimas, perforinas e Fas ligante, induzindo apoptose das células efectoras. Criado com smart.servier.com.

Os mecanismos de distúrbio de vias metabólicas de Tefs, incluem a produção de adenosina e monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). Os Tregs podem expressar duas ectoenzimas em sua superfície que em conjunto geram e liberam nucleosídeos de adenosina, um potente mediador anti-inflamatório. Primeiro, a ectoenzima CD39 hidrolisa trifosfato de adenosina (ATP) extracelular em monofosfato de adenosina (AMP). Em seguida, a ectoenzima CD73 degrada AMP em adenosina (166). Em

camundongos, os Tregs exibem co-expressão de CD39 e CD73 (167). A mesma observação já foi descrita em carcinomas de células pavimentosas da pele (168). Entretanto, os Tregs humanos circulantes expressando ambas as ectoenzimas são raros e compreendem de 1% a 7% da população reguladora (169, 170). Enquanto CD39 é expresso por aproximadamente 50% dos Tregs humanos ativados, CD73 é expresso pela maioria dos linfócitos T (164, 171). A ativação de receptores de adenosina presentes nas APCs e linfócitos T modula negativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias por estas células (171). Os Tregs também produzem altos níveis de AMPc intracelular e podem transferir o AMPc para os Tefs através de junções comunicantes, aumentando o conteúdo deste segundo mensageiro e suprimindo a proliferação e síntese de IL-2 nestas células (172).

Os mecanismos de modulação funcional de APCs são mediados pela expressão de moléculas inibidoras dependentes de contato célula a célula, incluindo CTLA-4, LAG-3 e TIGIT. CTLA-4 foi a molécula mais induzida pelos AgTregs após ativação e possivelmente é uma das principais vias de supressão dos Tregs contra o *M. leprae*. A interação entre CTLA-4 e seus ligantes CD80/CD86 na superfície das APCs induz sinais inibidores que modulam negativamente a expressão dessas moléculas coestimuladoras, gerando anergia de células T devido à ausência de segundo sinal. Além disso, CTLA-4 induz o aumento da expressão deIDO pelas DCs, aumentando a degradação de triptofano e privando os Tefs deste aminoácido essencial (164). A proteína GARP (do inglês, “Glycoprotein A repetitions predominant”) é expressa na superfície de Tregs ativados e converte o TGF- β latente em sua forma ativa (173). LAG-3 exibe alta afinidade por moléculas de HLA de classe II e a interação entre essas duas moléculas culmina em sinais inibidores nas DCs, incluindo supressão da maturação e capacidade imunoestimuladora (174). Essas moléculas induzem sinais inibidores para as APCs, modulando negativamente a capacidade imunoestimuladora destas células (164, 174). Por fim, TIGIT se liga com alta afinidade ao receptor CD155 presente na superfície das DCs. A ligação de TIGIT induz a produção de citocinas imunomoduladoras como IL-10 e TGF- β pelas DCs, suprimindo assim a ativação de linfócitos T através dessas citocinas anti-inflamatórias (175). Além disso, TIGIT pode inibir diretamente a ativação, proliferação e produção de citocinas de linfócitos T (176).

Os Tregs também podem secretar as citocinas IL-10, TGF- β e IL-35 no microambiente tecidual (164). Tanto IL-10 quanto TGF- β são citocinas imunomoduladoras de DCs, prevenindo a sua maturação e ativação. Já a citocina IL-

35 é capaz de inibir diretamente a proliferação de linfócitos T (177). As Tregs ativadas também podem induzir a apoptose de células efetoras através da expressão de granzimas, perforinas e Fas ligante (146).

1.3.3 Linfócitos T reguladores na hanseníase

Tregs FOXP3⁺ já foram descritos tanto no sangue quanto nas lesões cutâneas de pacientes com hanseníase (178-182). Devido à complexidade de análise e ausência de um marcador exclusivo de Tregs a caracterização fenotípica e estratégia de análise dessas células varia de estudo para estudo, o que dificulta a comparação entre os trabalhos. Além disso, descobertas recentes sobre a biologia dos Tregs precisam ser levadas em consideração para a melhor caracterização destas células em amostras biológicas (183).

Attia e colaboradores detectaram maiores frequências de Tregs circulantes em condições *ex vivo* (CD4⁺CD25^{alto}) em pacientes TT (181, 182), enquanto outros grupos detectaram maiores frequências de Tregs (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) em pacientes MB (184, 185). Outros estudos avaliaram os Tregs (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) do sangue periférico *in vitro* em resposta a antígenos de *M. leprae* e demonstraram que pacientes MB apresentaram maiores frequências que pacientes PB (178-180).

Bobosha e colaboradores demonstraram que células CD4⁺CD25⁺ (população enriquecida para Tregs) podem estar envolvidas na supressão da resposta do tipo TH1 na hanseníase. A depleção de células CD4⁺CD25⁺ do total de CMS separa os pacientes MB em dois grupos. Na ausência dessas células, aproximadamente 38,8% dos pacientes recuperam a capacidade de produção *in vitro* de IFN- γ em resposta a antígenos de *M. leprae*, sugerindo que as células CD4⁺CD25⁺ contribuem para a regulação negativa da resposta imune, mas que outras vias de supressão também estão envolvidas (180).

Kumar e colaboradores investigaram quais os possíveis mecanismos moleculares envolvidos na indução de FOXP3 em células CD4⁺CD25⁺ de pacientes com hanseníase. Os autores demonstraram que as células de pacientes apresentam desmetilação nas ilhas CpG do promotor de FOXP3. Ainda, as células de pacientes MB apresentam um alto índice de acetilação de FOXP3 quando comparadas com células de doadores saudáveis, o que deve contribuir para uma maior expressão do fator de transcrição (185).

A avaliação dos Tregs de lesões de pele é feita basicamente por imunohistoquímica. Alguns estudos detectaram maior número de células FOXP3⁺ nas lesões cutâneas de pacientes MB (178-180), enquanto outros não mostraram diferenças estatísticas entre pacientes PB e MB (186, 187). Os estudos de Tregs em pele humana são principalmente estudos de imunohistoquímica. Massone e colaboradores detectaram células FOXP3⁺ em baixas densidades em lesões de pele de pacientes com hanseníase e nenhuma diferença estatística na expressão do fator de transcrição foi observada entre as formas PB e MB. Em pacientes com baixa carga bacilar, as células FOXP3⁺ se localizavam tanto no interior quanto na periferia dos granulomas, enquanto em pacientes com alta carga bacilar, as células FOXP3⁺ estavam distribuídas de forma aleatória no infiltrado difuso de macrófagos espumosos (186).

Um segundo estudo com coorte maior foi realizado pelo mesmo grupo de pesquisa e resultados similares foram observados (187). Por outro lado, outros estudos detectaram números elevados de células FOXP3⁺ em amostras de pacientes MB quando comparados com pacientes PB (179, 180). Palermo e colaboradores observaram maiores números de células CD25⁺FOXP3⁺ em pacientes MB (178)

A grande limitação desta técnica é o baixo número de parâmetros analisados simultaneamente, dificultando a caracterização fenotípica detalhada de populações celulares mais complexas como os Tregs. Torna-se indispensável o uso de novas abordagens multiparamétricas para a caracterização destas células nos sítios de infecção pelo *M. leprae*.

1.4 Hipótese

Apesar da modulação negativa da resposta celular ser crítica para a patogênese da doença, os mecanismos envolvidos nesta regulação não são completamente esclarecidos. As vias aéreas são consideradas a principal via de entrada do *M. leprae* no corpo humano e já foi demonstrado que o bacilo infecta *in vitro* células epiteliais alveolares e nasais humanas. Além disso, a inoculação do bacilo no septo nasal de camundongos resulta em infecção de macrófagos e células epiteliais no tecido pulmonar destes animais (188).

A inalação de partículas transportadas pelo ar, como ácaros e esporos de fungos, é capaz de induzir pTregs específicos para estes aeroantígenos (143). Os Tregs controlam processos inflamatórios para garantir a integridade tecidual e podem

contribuir para a persistência de agentes infecciosos, como o *M. leprae* (147). É possível que a infecção pelo patógeno crie condições favoráveis à diferenciação de pTregs (189). Assim, as vias aéreas são um local particularmente promissor para a geração de pTregs específicos para antígenos do *M. leprae*. Além disso, a anergia celular observada no polo MB da doença é específica para o bacilo, uma vez que estes pacientes frequentemente respondem ao teste tuberculínico (190). Desta forma, nossa hipótese é que Tregs *M.leprae*-específicos podem contribuir para a regulação negativa da resposta celular efetora contra o bacilo, fornecendo condições para o estabelecimento da infecção crônica. A caracterização detalhada de Tregs no sangue e pele de pacientes com hanseníase podem fornecer subsídios tanto para possíveis intervenções terapêuticas quanto para a maior compreensão dos mecanismos de regulação imune humana.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar os linfócitos T de sangue e pele de pacientes com hanseníase e indivíduos saudáveis de área endêmica para hanseníase.

2.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar fenotipicamente linfócitos T CD4⁺ (*ex vivo*) e específicos para antígenos de *M. leprae* (*in vitro*) de pacientes com hanseníase e indivíduos saudáveis de área endêmica para hanseníase.
2. Caracterizar fenotipicamente linfócitos T CD8⁺ (*ex vivo*) e específicos para antígenos de *M. leprae* (*in vitro*) de pacientes com hanseníase e indivíduos saudáveis de área endêmica para hanseníase.
3. Investigar vias moleculares inibidoras que podem estar envolvidas na imunossupressão mediada por Tregs *M. leprae*-específicos na hanseníase.
4. Padronizar a metodologia para obtenção de linfócitos T viáveis de pele humana.
5. Caracterizar fenotipicamente Tregs provenientes de lesões de pele de pacientes com hanseníase.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Considerações éticas de amostras humanas

A coleta de amostras biológicas de pacientes e doadores saudáveis foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC). Voluntários saudáveis e pacientes de 19 a 65 anos (CAAE 30621514.4.1001.5248) e de 66 a 78 anos (CAAE 09519019.7.0000.5248) foram informados dos procedimentos do estudo e preencheram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para coleta das amostras de sangue e/ou pele. Doadores saudáveis submetidos a cirurgia plástica para remoção de pele autorizaram a coleta de amostras (CAAE 12155019.2.0000.5248) e preencheram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.2 População estudada

Pacientes com até três meses de tratamento foram recrutados do Ambulatório Souza Araújo da Fiocruz e Hospital Federal de Bonsucesso. Neste estudo, separamos os pacientes em PB (BT, TT; n=11) e MB (BB, BL, LL; n=27), e controles saudáveis de área endêmica (SAE; n=14). O grupo SAE engloba indivíduos residentes do estado do Rio de Janeiro sem contato conhecido com pacientes. Os dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais de todos os doadores deste estudo são mostrados na tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais dos doadores recrutados no estudo.

Características	Paucibacilares			Multibacilares				Saudáveis
	TT (n=1)	BT (n=10)	Total (n=11)	BB (n=1)	BL (n=8)	LL (n=18)	Total (n=27)	SAE (n=14)
Sexo (F:M)	(1:0)	(6:4)	(7:4)	(0:1)	(1:7)	(6:12)	(7:20)	(11:3)
Idade (mediana/ 25-75%)	65	56/38-61	56/44-65	52	48/30-57	39/28-54	45/28-53	37/28-50
Índice bacilar (mediana/desvio padrão)	0	0	0	NI	3,6/2,3-4,8	5/4,3-5,5	4,75/3,6-5	NA
Indivíduos em tratamento (até 3 meses) %	100% (n=1)	20% (n=2)	27,3% (n=3)	0%	12,5% (n=1)	33,3% (n=6)	25,9% (n=7)	NA

Abreviações: IB, índice bacilar; F, feminino; M, masculino; PB, paucibacilar; BT, borderline tuberculóide; BB, borderline-borderline; BL, borderline-lepromatoso; LL, lepromatoso polar; NA, não se aplica. NI, não informado.

O diagnóstico dos pacientes de hanseníase foi realizado conforme os critérios de classificação estabelecidos por Ridley e Jopling (191). Amostras de sangue (35 mL) e/ou fragmento de pele por biópsia de “punch” (6 mm) foram coletados por profissionais de saúde. Além dos pacientes, sangue de doadores saudáveis de área endêmica (SAE) também foram coletados. Pele clinicamente normal foi obtida após mamoplastia e abdominoplastia de doadoras. Todos os voluntários não apresentavam história recente de uso de drogas imunossupressoras ou anti-inflamatórias e doenças autoimunes. Entre os três grupos, não houve diferenças estatísticas significantes entre as idades, mas é necessário mencionar que o grupo SAE apresenta uma menor mediana de idade que os demais grupos. Também observamos diferenças na proporção do sexo entre os grupos estudados. A maioria dos doadores SAE e PB recrutados no estudo são mulheres, enquanto o grupo MB são majoritariamente homens.

3.3 Material e reagentes

3.3.1 Reagentes

Produto	Código	Fabricante
Ficoll-Paque Plus	17-1440-03	GE Healthcare
FOXP3 perm buffer	421002	Biolegend
“LIVE/DEAD Near-IR”	L10119	Invitrogen
Soro Normal de cabra	PCN5000	Gibco
Tampão HBSS	14175-095	Gibco
Tampão PBS 10x	70013-032	Gibco
Tampão PBS 1x	20012-027	Gibco
Paraformaldeído	P-6148	Sigma-Aldrich
Tampão EDTA 0,5 M	AM9261	Ambion
Albumina de soro bovino	A8022	Sigma-Aldrich
“ProLong Gold Antifade”	P10144	Molecular Probes
DAPI	62247	Thermo Scientific
Meio Entellan	100869	Merck
Lâminas “Countess” para contagem de células com azul de Tripán 0,4%	C10228	Invitrogen
Colagenase do tipo 4 - 225 u/mg CLS 4	LS004188	Worthington
Solução estabilizada de penicilina-streptomomicina	P4333	Sigma-Aldrich

Desoxirribonuclease I de pâncreas Bovino	DN25	Sigma-Aldrich
--	------	---------------

3.3.2 Meio de cultura, suplementos e estímulos

Produto	Código	Fabricante
Meio RPMI 1640	11875093	Gibco
GlutaMAX	35050-061	Gibco
Soro AB humano inativado	H4522-100ML	Siga-Aldrich
HEPES (1M)	15630080	Gibco
Soro Fetal Bovino	12657-029	Gibco
Anti-CD3 Purificado (clone HIT3a)	555336	BD Biosciences
Anti-CD40 Purificado (clone 5C3)	555586	BD Biosciences
Anti-CD28 Purificado (clone 15E8)	130-093-375	Miltenyi Biotec
Sonicado de <i>M. leprae</i> irradiado	NR-19329	BEI Resources
Proteína ML1419c	-	NIH/NIAID "Leprosy Research Support"

3.3.3 Anticorpos

Citometria de Fluxo					
Anticorpo	Fluorocromo	Marcação	Clone	Código	Fabricante
CD4	ALEXA FLUOR 700	Extracelular	RPA-T4	557922	BD Biosciences
CD8	PERCP	Extracelular	SK1	347314	BD Biosciences
CXCR3	PE	Extracelular	1C6/CXCR3	557185	BD Biosciences
CCR4	PECY7	Extracelular	1G1	557864	BD Biosciences
CCR6	APC	Extracelular	11A9	560466	BD Biosciences
CD25	BV421	Extracelular	M-A251	562442	BD Biosciences
CCR7	BV510	Extracelular	3D12	563449	BD Biosciences
CD45RA	BV650	Extracelular	HI100	563963	BD Biosciences
CD69	PECF594	Extracelular	FN50	562884	BD Biosciences
CD154	PECY7	Extracelular	SC8	130-096-793	Miltenyi Biotec
CD137	APC	Extracelular	4B4-1	8061835	BD Biosciences
LAG-3	PE	Extracelular	T47-530	565616	BD Biosciences
GARP	PECF594	Extracelular	7B11	562503	BD Biosciences
CD39	PERCPCY5.5	Extracelular	TU66	564899	BD Biosciences
CD73	BV510	Extracelular	AD2	563198	BD Biosciences
CD45RO	PECY7	Extracelular	UCHL1	560608	BD Biosciences
CD45	APC	Extracelular	HI30	555485	BD Biosciences
CD3	BV510	Extracelular	HIT3a	564713	BD Biosciences
CD127	PERCPCY55	Extracelular	eBioRDR5	45-1278-42	eBiosciences
CD8	BV650	Extracelular	RPA-T8	563821	BD Biosciences
FOXP3	ALEXA FLUOR 488	Intracelular	PCH101	53-4776-42	eBiosciences

CTLA-4	PECY7	Intracelular	14D3	25-1529-42	eBiosciences
--------	-------	--------------	------	------------	--------------

Imunofluorescência					
Anticorpo primário	Fluorocromo	Origem	Clone	Código	Fabricante
FOXP3	purificado	Rato	PCH101	14-4776-82	eBioscience
CD4	purificado	Camundongo	CA-4	ab82252	Abcam
CD8	purificado	Coelho	policlonal	ab4055	Abcam
Anticorpo Secundário	Fluorocromo	Origem	Clone	Código	Fabricante
Anti-IgG2a-Rato	ALEXA FLUOR 647	camundongo	2A8F4	ab172333	Abcam
Anti-IgG1 Camundongo	ALEXA FLUOR 488	Cabra	Policlonal	A32723	Invitrogen
Anti-IgG-Coelho	ALEXA FLUOR 555	Cabra	Policlonal	ab150077	Abcam

3.3.4 Soluções

PBS 1x	1 parte de PBS concentrado 10x mais 9 partes de água deionizada, pH 7,2
Solução de lavagem	1% p/v de BSA, 1mM de EDTA em PBS 1x q.s.p.
Solução de permeabilização para FOXP3	1 parte de FOXP3 Perm Buffer concentrado 10x mais 9 partes de PBS 1x, pH 7,2
Solução enzimática	0,8 mg/mL de colagenase do tipo 4, 0,02 mg/mL DNase I, 10% de soro fetal bovino, 1% de HEPES e 1% de estreptomicina/penicilina em meio RPMI 1640
Solução de permeabilização para imunofluorescência	10% de SFB, 0,01% de triton em PBS 1x,pH 7,2

3.4 Isolamento de células mononucleares sanguíneas (CMS)

Após coleta de sangue periférico por punção venosa em tubos heparinizados (BD Biosciences, EUA), o sangue foi diluído em solução salina tamponada (PBS 1x; Gibco, EUA), e depositado sobre uma camada de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, EUA). Após centrifugação a 400xg, em temperatura ambiente, por 30 minutos, a nuvem contendo as CMS foi coletada cuidadosamente com pipeta sorológica. As CMS foram lavadas, por centrifugação, duas vezes com PBS 1x gelado por 10 minutos a 4°C. A primeira lavagem é realizada a 200xg para remoção de plaquetas, enquanto a segunda lavagem é realizada a 300xg. As CMS foram mantidas em solução salina tamponada de Hanks (HBSS, EUA) a 4°C até o início da estimulação *in vitro*. A

avaliação de viabilidade e contagem do número de células foi feita em suspensões coradas com Azul de Tripán 0,4% (Sigma-Aldrich, EUA), utilizando o contador automático Countess II (Thermo Fisher Scientific, EUA).

3.5 Estimulação *in vitro* de CMS com antígenos de *M. leprae*

Após o isolamento, as CMS foram ressuspensas a 10×10^6 células/mL em meio RPMI suplementado com 25 nM de HEPES, 1% de GlutaMAX e 5% de soro humano AB inativado. Em placas de cultura de 96 poços de fundo em U (Corning, EUA), 1×10^6 de CMS foram plaqueadas por poço. As CMS foram estimuladas com anticorpo monoclonal anti-CD3 purificado (0,1 $\mu\text{g/mL}$; controle positivo), sonificado de *M. leprae* irradiado (20 $\mu\text{g/mL}$) e proteína recombinante ML1419c de *M. leprae* (1 $\mu\text{g/mL}$). Anticorpo monoclonal anti-CD28 purificado (1 $\mu\text{g/mL}$) foi adicionado nas culturas de 7 e 18 horas para fornecer sinais coestimuladores, enquanto o anticorpo monoclonal anti-CD40 purificado (1 $\mu\text{g/mL}$) foi adicionado no início das culturas de 7 horas para permitir a detecção de CD154. As culturas de células de 7 horas foram realizadas em banho programado (Eppendorf, ALE) com aquecimento a 37°C por 7 horas e resfriamento a 4°C até o início da citometria de fluxo (Eppendorf, ALE). As culturas de células de 18 horas foram realizadas em estufa (Thermo Fisher Scientific, EUA) a 37°C e 5% de CO₂. Após o término das estimulações, as células foram analisadas por citometria de fluxo para caracterização fenotípica.

Escolhemos usar a proteína ML1419c, que é uma diguanilato-ciclase A expressa pelo *M. leprae*. Ela sintetiza o mensageiro secundário monofosfato cíclico de guanosina dimérico, metabólito associado à transdução de sinal de diversas bactérias, estando envolvido na sobrevivência, diferenciação celular, virulência e formação de biofilme bacteriano (202). Além disso, já foi demonstrado que a ML1419c gera resposta de linfócitos T em pacientes PB e contatos de pacientes MB, indicando seu possível uso para avaliação de resposta imune a antígenos expressos pelo *M. leprae* (203). Anticorpo monoclonal anti-CD3 foi usado como controle positivo para ativação *in vitro* de linfócitos T.

3.6 Identificação de linfócitos T antígeno-específicos

Durante culturas de curta duração (7 horas), Tregs e Tefs expressam diferencialmente CD137 (4-1BB) e CD154 (CD40L), duas moléculas indutíveis de ativação precoce. A expressão de CD154 é altamente específica para Tefs após ativação do TCR, sendo induzido transitoriamente durante o curso de ativação destas células, e permitindo a identificação de Tefs antígeno-específicos (AgTefs). Uma limitação do uso deste marcador é a sua internalização e degradação após a interação com CD40 expresso pelas APCs. A adição de anticorpos bloqueadores anti-CD40 durante cultura de células de curta duração impede essa interação, e consequentemente, permite a marcação extracelular de CD154 (204).

Por outro lado, CD137 foi descrito como um dos genes-alvo do fator de transcrição FOXP3. A expressão de CD137 em culturas de curta duração permite a detecção de pTregs com características de tTregs, isto é, células com região TSDR desmetilada, ausência de expressão de CD127 e de produção de citocinas efetoras. Assim, o fenótipo CD137⁺ permite a identificação de Tregs antígeno-específicos (AgTregs) com expressão estável de FOXP3 (205).

CD69 é um dos primeiros antígenos expressos na superfície de linfócitos T após ativação. Embora não seja específico, ele é amplamente utilizado como marcador de ativação linfocitária recente (212). Deste modo, usamos a marcação de CD69 para identificar linfócitos T CD8⁺ respondedores durante as culturas de curta duração.

As frequências de células respondedoras em culturas contendo apenas coestímulo (anticorpo monoclonal anti-CD28 purificado) foram descontadas das frequências de culturas estimuladas para determinação da frequência induzida pelos estímulos de *M. leprae*.

3.7 Citometria de fluxo

As CMS estimuladas ou células de pele foram transferidas para tubos de microdiluição de 1,1 mL (Axygen Scientific, EUA). Os tubos contendo as amostras foram centrifugados (300xg por 10 minutos a 4°C) e o sobrenadante descartado. As células diluídas em 1mL de PBS 1x, marcadas com o marcador de viabilidade e incubadas a 4°C protegido da luz por 30 minutos. Após incubação, as células foram lavadas novamente em PBS 1x. A parte de marcação de viabilidade citada

anteriormente não foi realizada para fenotipagem *ex vivo*. As células *ex vivo*, células estimuladas *in vitro* e provenientes de tecido foram lavadas em solução de lavagem. As células provenientes de pele foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente com bloqueador de receptores Fc humano (BD Biosciences, EUA). Um coquetel de anticorpos extracelulares para detecção de proteínas humanas é adicionado aos cerca de 50 µL de suspensão celular em solução de lavagem que permaneceram em cada tubo após o descarte por inversão. As células foram incubadas protegidas da luz por 30 min a 4°C. Ao fim do período de incubação, as células foram lavadas e fixadas com paraformaldeído a 2% (20 minutos a 4°C).

Após essa etapa, as células podem ser armazenadas em solução de lavagem para continuação da marcação intracelular no dia seguinte. Para marcação intracelular as células foram lavadas com solução de permeabilização para FOXP3 e depois incubadas com esta solução por 15 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado de modo que restassem aproximadamente 50 µL de solução de permeabilização dentro do tubo. As células foram marcadas com os anticorpos intracelulares por 30 minutos protegidas da luz à temperatura ambiente. Por fim, as células foram lavadas e analisadas em citômetro de fluxo FACSAria IIu (BD Biosciences, EUA). Foram analisadas 100 mil células da região de linfócitos definida por espalhamento luminoso em cada amostra.

3.8 Dissociação de fragmento de tecido de pele

O fragmento de pele de lesão de pele foi obtido por biópsia de “punch” (6 mm). O pedaço de tecido foi mantido em meio RPMI à 4°C até o momento da dissociação. O método consistiu em dissociação mecânica manual, semiautomática e digestão enzimática. Com o auxílio de um bisturi, a gordura subcutânea foi removida e o tecido fragmentado em pequenos pedaços. Em seguida, o tecido fragmentado foi incubado por 18 horas a 37°C com agitação de 300 rpm em banho programado com a solução enzimática (192). Após o término da digestão enzimática, os fragmentos de tecido foram transferidos para tubo GentleMACS C (Miltenyi Biotec, ALE) e submetidos ao dissociador semiautomático (Miltenyi Biotec, ALE) com os seguintes programas: h_Tumor_01 + h_Tumor_02 + h_Tumor_03.

Após a dissociação semiautomática, o tubo foi centrifugado (300xg por 2 minutos a 4°C) o sedimento celular ressuspenso em PBS 1x e o conteúdo passado por filtro com poros de 70 µm (BD Biosciences, EUA). Em seguida, as células

dissociadas foram centrifugadas e lavadas em PBS 1x com 2mM de EDTA. Por fim, as células foram contadas em suspensões coradas com Azul de Tripán 0,4%, utilizando o contador automático Countess II (Thermo Fisher Scientific, EUA). Após a dissociação da pele, as células foram avaliadas por citometria de fluxo.

3.9 Imunofluorescência

Amostras de pele congeladas foram processadas em micrótomo criostato para obtenção de cortes histológicos com 5 µM de espessura aderidos a lâminas. O tecido foi lavado 3 vezes, por 5 minutos, com PBS 1x. A lavagem consiste em depositar PBS 1x sobre o corte histológico durante 5 minutos e descartar o líquido após a incubação. Em seguida, a solução de permeabilização para imunofluorescência era depositada sobre o corte histológico por 30 minutos. A marcação com anticorpos primários foi realizada em câmara úmida por 18 horas.

Após o término da incubação, os cortes histológicos foram lavados por 5 vezes com solução de permeabilização. A marcação com anticorpos secundários foi realizada por 2 horas protegida da luz. O corante DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol) foi usado para marcar os núcleos. Por fim, os cortes histológicos foram lavados novamente por 5 vezes e a lâmina montada com o reagente “prolong gold antifade” e selada com o meio para montagem de lâmina Entellan. Por fim, o tecido corado foi analisado em microscópio de fluorescência ZEISS Colibri Observer Z1 (Zeiss, ALE).

3.10 Análise de dados

Os dados de citometria de fluxo foram avaliados com o software FlowJo v10.8.1. Gráficos e análise de dados foram realizados com o software GraphPad Prism e comparações entre grupos foram realizadas com valor de $p < 0,05$ aceito como significativo. O teste estatístico Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn foi utilizado para comparações entre três grupos, enquanto o teste Mann-Whitney foi utilizado para comparações entre dois grupos.

4 RESULTADOS

4.1 Controles saudáveis e pacientes com hanseníase multibacilar mostram diferenças em proporções de Tregs virgens e nas razões de subpopulações de Tregs e Tefs circulantes.

Logo após o isolamento, as CMS dos voluntários foram fenotipadas *ex vivo* por citometria de fluxo e as subpopulações de Tregs e Tconvs avaliadas. O número de doadores recrutados para esta análise, assim como a mediana de idade estão mostrados na tabela do anexo 1. Optou-se por analisar células frescas com intuito de reduzir o impacto do congelamento na expressão de marcadores de superfície e na frequência de linfócitos T.

A estratégia de análise para a identificação das células de interesse consistiu em quatro passos sequenciais: (i) seleção de células individuais utilizando os parâmetros de dispersão frontal medida pela área (FSC-A) e pela altura (FSC-H) do pulso; (ii) seleção da região de linfócitos através dos parâmetros FSC-A e dispersão lateral medida pela área (SSC-A) do pulso; (iii) seleção de células CD4⁺ CD8⁻; (iv) identificação de Tregs pelo fenótipo CD4⁺CD25^{alto}FOXP3⁺ (Fig. 4.1, A). Os Tconvs foram definidos a partir de uma ferramenta do programa de análise que cria regiões booleanas. Utilizamos a opção “make not gate” de Tregs para detectar a população de Tconvs (CD4⁺Tregs⁻), isto é, células CD4⁺ não Tregs.

Para definir a população de Tregs, usamos as células CD8⁺ como controle para identificar os limites de alta expressão de CD25 e positividade para FOXP3 (Fig. 4.1, B). O uso das células CD8⁺ como parâmetro para definir a população de Tregs foi descrito como uma estratégia mais confiável do que o uso de controle fluorescência menos uma (FMO) ou anticorpos de isotipo. Além disso, Santegoets e colaboradores definiram que os marcadores CD3, CD4, CD127 e FOXP3 como requisitos básicos para a identificação de Tregs em amostras clínicas (183). Embora não tenhamos usado anticorpos anti-CD3 e anti-CD127 em nossa fenotipagem de Tregs, nós confirmamos em cinco voluntários que a estratégia de Tregs deste estudo (CD4⁺CD25^{alto}FOXP3⁺) inclui majoritariamente células CD127⁻ e CD3⁺ conforme o representativo da Fig. 4.1, C.

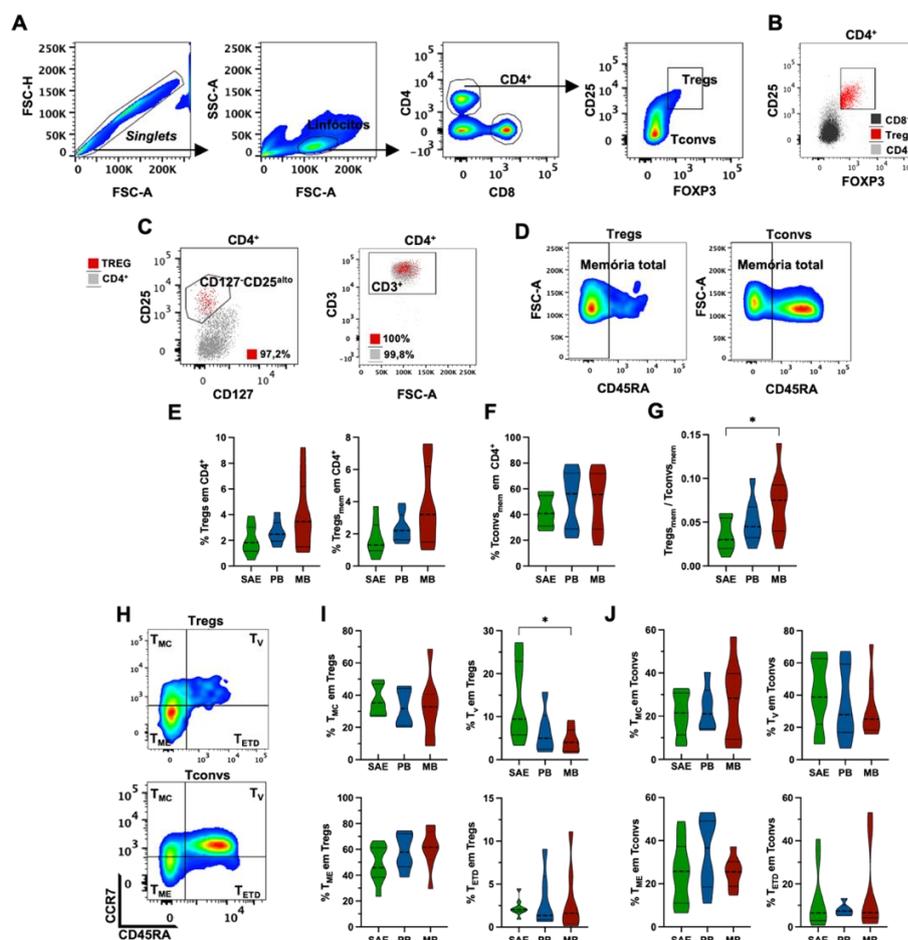


Figura 4.1 - Caracterização de subpopulações de Tregs e Tconv circulantes de pacientes com hanseníase e doadores saudáveis.

Células mononucleares do sangue periférico foram separadas por gradiente de centrifugação e submetidas a citometria de fluxo para fenotipagem. **(A)** Gráficos representativos da estratégia de citometria de fluxo para identificação de Tregs ($CD4^+CD25^{alto}FOXP3^+$) e Tconv ($CD4^+Tregs^-$). **(B)** Gráficos representativos da estratégia de citometria de fluxo para definir a população de Tregs. **(C)** Os Tregs são majoritariamente células $CD127^-$ e $CD3^+$. **(D)** Gráficos representativos da identificação de Tregs e Tconv de memória ($CD45RA^+$). **(E)** Frequência de Tregs totais ($CD4^+CD25^{alto}FOXP3^+$) e Tregs de memória ($CD4^+CD25^{alto}FOXP3^+CD45RA^+$) dentre as células $CD4^+$. **(F)** Frequência de Tconv de memória dentre as células $CD4^+$. **(G)** Proporção de Tregs e Tconv de memória **(H)** Gráficos representativos da análise para detecção de Tregs e Tconv com fenótipo de células T virgens (T_V ; $CD45RA^+CCR7^+$), células T de memória central (T_{MC} ; $CD45RA^+CCR7^+$), células T de memória efetora (T_{ME} ; $CD45RA^+CCR7^-$) e células T efetoras terminantemente diferenciadas (T_{ETD} ; $CD45RA^+CCR7^-$). Frequências de células com fenótipo T_V , T_{MC} , T_{ME} , T_{METD} dentre os Tregs **(I)** e Tconv **(J)**. As barras acima da mediana representam os quartis superiores, enquanto as barras abaixo representam os quartis inferiores. Verde: Doadores saudáveis de área endêmica (SAE). Azul: pacientes paucibacilares (PB). Vermelho: pacientes multibacilares (MB). E e F: SAE (n= 9), PB (n= 8) e MB (n=10). H e I: SAE (n= 9), PB (n= 6) e MB (n=8). As frequências foram submetidas ao teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn em que * $p < 0,05$.

A hanseníase é uma doença com um longo período assintomático, com alterações de resposta imune centradas no *M. leprae*, assim, as células de memória, isto é, populações que já foram expostas ao antígeno cognato, devem estar envolvidas na patologia da doença. Além disso, Miyara e colaboradores demonstraram que Tregs com fenótipo $CD45RA^-FOXP3^{alto}$ possuem capacidade supressora *in vitro* (193). Desta forma, investigamos tanto as frequências de Tregs circulantes totais quanto Tregs com fenótipo de memória (Fig. 4.1, D) em voluntários

SAE, PB e MB. Não detectamos diferenças entre as frequências de Tregs totais e Tregs de memória (Tregs_{mem}; Fig. 4.1, E), assim como Tconvs de memória (Tconvs_{mem}; Fig. 4.2, F) nos três grupos avaliados.

Para avaliar a resposta imune dos doadores torna-se indispensável a determinação da abundância relativa entre Tregs e Tconvs (194). Por isso, investigamos a razão entre essas subpopulações de memória circulantes. Observamos uma maior razão de Tregs_{mem} para Tconvs_{mem} circulantes nos pacientes MB quando comparados com doadores SAE (SAE: 0,03; MB: 0,07; $p < 0,05$).

Os linfócitos T podem ser separados em quatro subpopulações baseados na expressão de CD45RA e CCR7 (Fig. 4.1, H). Desta maneira, imunofenotipamos mais detalhadamente os Tregs e Tconvs, identificando células com fenótipo de linfócitos T virgens (T_V; CD45RA⁺CCR7⁺), linfócitos T de memória central (T_{MC}; CD45RA⁻CCR7⁺), linfócitos T de memória efetora (T_{ME}; CD45RA⁻CCR7⁻) e linfócitos T efetores diferenciados terminais (T_{EDT}; CD45RA⁺CCR7⁻). Investigamos a frequência destas subpopulações dentre os Tregs e Tconvs circulantes. Observamos que as frequências de Tregs com fenótipo T_V estão significativamente maiores no grupo SAE que no grupo MB (SAE: 9,4%; MB: 4%; $p < 0,05$). Em relação aos Tconvs (Fig. 4.1, J), não detectamos diferenças estatísticas nas subpopulações entre os grupos estudados.

Os Tefs podem expressar diferentes receptores de quimiocinas como parte de sua especialização funcional, mediando sua migração para tecidos específicos e locais de inflamação. Duhon e colaboradores demonstraram que os Tregs FOXP3⁺ também podem expressar estes receptores de quimiocinas (195). A regulação positiva dos receptores começa com a ativação de Tregs CD45RA⁺ nos órgãos linfoides e é completada após sua diferenciação em Tregs com fenótipo de memória, isto é, CD45RO⁺ (196). O compartilhamento dos receptores de quimiocinas pode gerar co-localização apropriada destas subpopulações nos tecidos periféricos (197).

A partir da expressão dos receptores de quimiocinas CCR4, CCR6 e CXCR3, nós identificamos as subpopulações TH1, TH2, TH17, TH9, CXCR3⁺TH17 e CXCR3⁺TH2 circulantes (Fig. 4.2). Para isso, escolhemos analisar primeiro a expressão das quimiocinas em todas as células CD4⁺ e depois subdividir as células em fenótipo Tregs ou Tconvs.

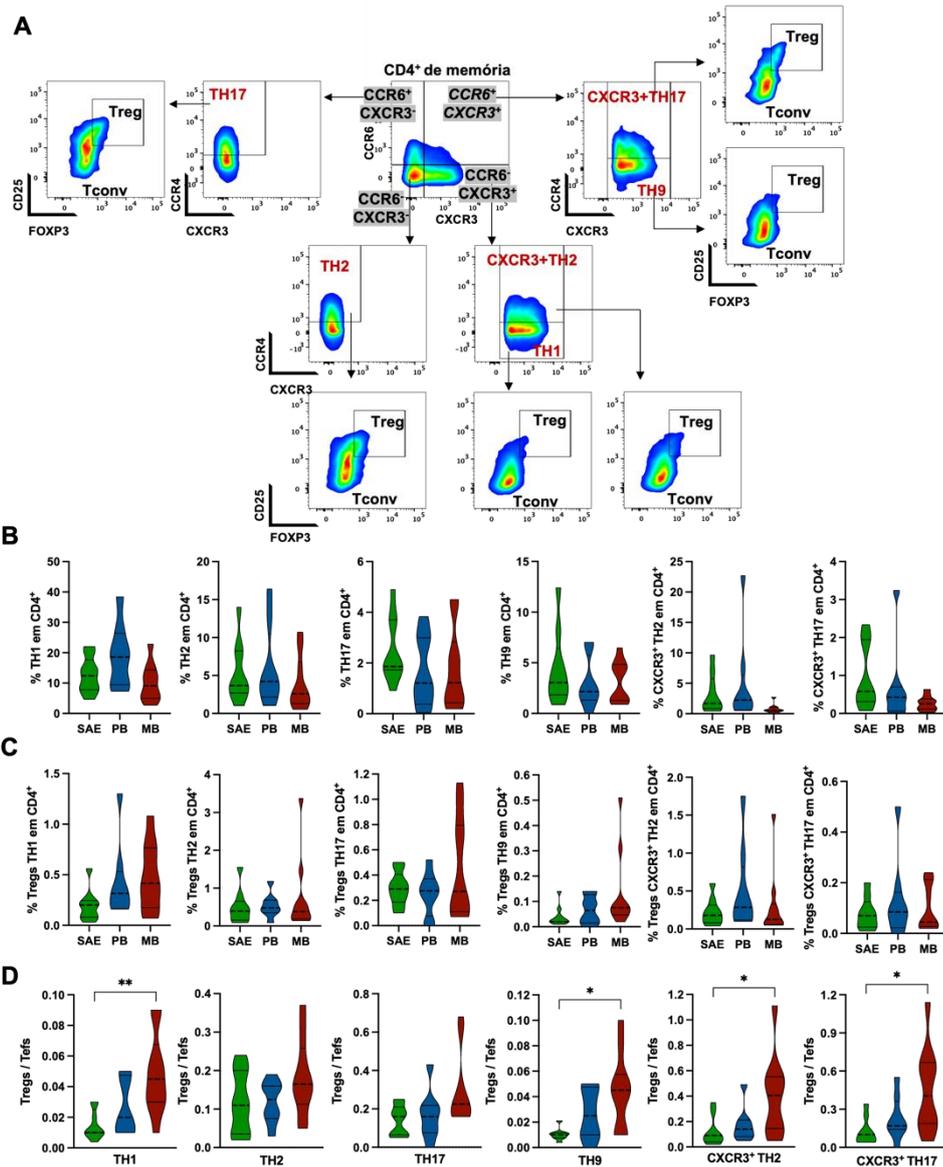


Figura 4.2 – Subpopulações de Tregs e Tefs circulantes com expressão de receptores de quimiocinas em pacientes com hanseníase e doadores saudáveis.

(A) Gráficos representativos da estratégia de análise para identificação de Tregs (CD4⁺CD25^{alto}FOXP3⁺) e Tconvs (CD4⁺Tregs⁻) com fenótipo do tipo TH1 (CD45RA⁻CXCR3⁺CCR4⁺CCR6⁻), TH2 (CD45RA⁻CXCR3⁺CCR4⁺CCR6⁻), TH17 (CD45RA⁻CXCR3⁺CCR4⁺CCR6⁺), TH9 (CD45RA⁻CXCR3⁺CCR4⁺CCR6⁺), CXCR3⁺TH2 (CD45RA⁻CXCR3⁺CCR4⁺CCR6⁻) e CXCR3⁺TH17 (CD45RA⁻CXCR3⁺CCR4⁺CCR6⁺). Frequências de Tefs **(B)** e Tregs **(C)** do tipo TH1, TH2, TH17, TH9, CXCR3⁺TH2 e CXCR3⁺TH17 dentro as células CD4⁺. **(D)** Proporção entre as subpopulações de Tregs e Tefs do tipo TH1, TH2, TH17, TH9, CXCR3⁺TH2 e CXCR3⁺TH17. As barras pontilhadas representam as medianas das frequências. As barras acima da mediana representam os quartis superiores, enquanto as barras abaixo representam os quartis inferiores. Verde: Doadores saudáveis de área endêmica (SAE; n=9). Azul: pacientes paucibacilares (PB; n=8). Vermelho: pacientes multibacilares (MB; n=10). As frequências foram submetidas ao teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn em que * p<0,05 e ** p<0,05.

Assim, as células CD4⁺ foram identificadas de forma similar à demonstrada na Fig 4.1, A. Em seguida, a estratégia de análise para a identificação das subpopulações consistiu nas seguintes etapas (Fig. 4.2, A): (i) seleção de células de memória (CD45RA⁻) através dos parâmetros FSC-A do pulso e CD45RA; (ii) identificação das quatro subpopulações baseadas na expressão de CCR6 e CXCR3; (iii) definição das células TH1, TH2, TH17, TH9, CXCR3⁺TH17 e CXCR3⁺ TH2 a partir da expressão ou

não de CCR4; (iv) identificação de Tregs e Tconv. Assim, os fenótipos das Tregs (CD4⁺CD25^{alto}FOXP3⁺) e Tconv (CD4⁺Treg⁻), são: TH1 (CD45RA⁻CCR6⁻CXCR3⁺CCR4⁻), TH2 (CD45RA⁻CCR6⁻CXCR3⁻CCR4⁺), TH17 (CD45RA⁻CCR6⁺CXCR3⁻CCR4⁺), TH9 (CD45RA⁻CCR6⁺CXCR3⁺CCR4⁻), CXCR3⁺TH17 (CD45RA⁻CCR6⁺CXCR3⁺CCR4⁺) e CXCR3⁺TH2 (CD45RA⁻CCR6⁻CXCR3⁺CCR4⁺). A população TH1/TH17 é tradicionalmente caracterizada como CXCR3⁺CCR6⁺ (198), porém os linfócitos TH9 também apresentam o mesmo fenótipo CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁻ (124). Por isso, consideramos linfócitos CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁻ como TH9 e células CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁺ como CXCR3⁺TH17.

Não detectamos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tanto para as subpopulações de Tefs (Fig. 4.2, B) quanto para Tregs (Fig. 4.2, C), quando analisamos a expressão de receptores de quimiocinas. Porém, ao determinar a razão entre as duas subpopulações, isto é, entre Tregs e Tefs (Fig. 4.2, D), observamos aumento significativo nos pacientes MB em comparação com doadores SAE em relação a respostas do tipo TH1 (SAE: 0,01; MB: 0,05; p = 0,004), TH9 (SAE: 0,01; MB: 0,05; p=0,02), CXCR3⁺TH2 (SAE: 0,1; MB: 0,4; p=0,02) e CXCR3⁺TH17 (SAE: 0,1; MB: 0,4; p=0,01). Não vimos diferenças nas razões para TH2 e TH17.

Como detectamos diferenças nas razões entre subpopulações CXCR3⁺, e este receptor de quimiocinas também é altamente expresso por linfócitos T CD8⁺, avaliamos a expressão de CXCR3 nesta população linfocitária nos voluntários recrutados.

4.2 Controles saudáveis e pacientes com hanseníase mostram diferenças em proporções de linfócitos CD8⁺ com expressão de CXCR3.

Primeiro, investigamos os fenótipos dos linfócitos T CD8⁺ nos grupos estudados. O número de doadores para esta análise, assim como a média de idade estão mostrados na tabela do anexo 3. Para isso, identificamos as quatro subpopulações de linfócitos T, isto é, T_V, T_{MC}, T_{ME} e T_{EDT} dentro da região de células CD8⁺. Não podemos descartar a presença de células NK dentro dessa região, mas a população de células CD8⁺ *ex vivo* são predominantemente de células CD3⁺ (Fig. 4.3, A). Observamos diferenças significantes apenas na frequência de células CD8⁺ com fenótipo T_{ME} (PB: 52,9%; MB: 32,2%; p=0,04) entre pacientes PB e MB (Fig. 4.3, B).

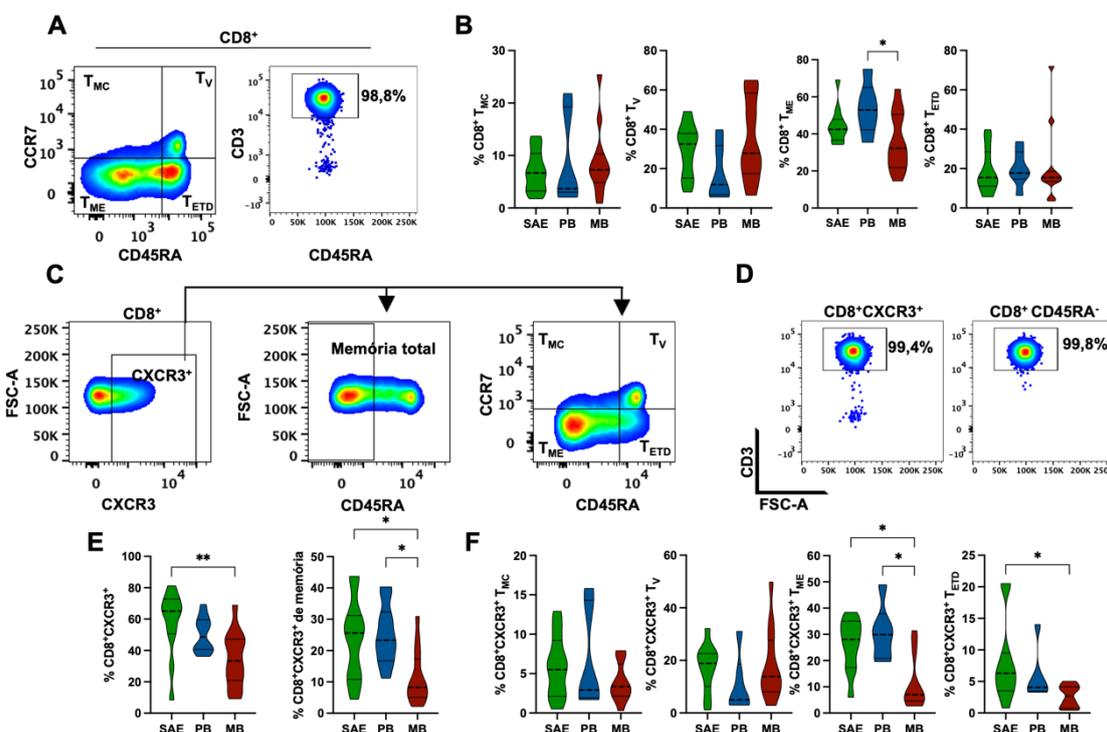


Figura 4.3 - Caracterização fenotípica de linfócitos T CD8⁺ totais circulantes.

Células mononucleares do sangue periférico foram separadas por gradiente de centrifugação e submetidas a citometria de fluxo para fenotipagem. **(A)** Gráficos representativos da estratégia de análise para identificação de linfócitos CD8⁺ com fenótipo linfócitos T virgens (T_V; CD45RA⁺CCR7⁺), linfócitos T de memória central (T_{MC}; CD45RA⁻CCR7⁺), linfócitos T de memória efetora (T_{ME}; CD45RA⁻CCR7⁻) e linfócitos T efetores terminantemente diferenciados (T_{EDT}; CD45RA⁺CCR7⁻). **(B)** Frequência de células CD8⁺ com fenótipo T_V, T_{MC}, T_{ME} e T_{EDT}. **(C)** Representativo da estratégia de citometria de fluxo para identificação de células CD8⁺CXCR3⁺ com fenótipo de T_V, T_{MC}, T_{ME} e T_{EDT}. **(D)** Os linfócitos CD8⁺CXCR3⁺ e CD8⁺CXCR3⁺CD45RA⁻ são majoritariamente linfócitos T (CD3⁺). **(E)** Frequências de linfócitos CD8⁺CXCR3⁺ e CD8⁺CXCR3⁺ de memória. **(F)** Frequências de células CD8⁺CXCR3⁺ com fenótipo T_V, T_{MC}, T_{ME}, T_{EDT}. As frequências foram normalizadas pelo número de linfócitos CD8⁺. As barras pontilhadas representam as medianas das frequências. As barras acima da mediana representam os quartis superiores, enquanto as barras abaixo representam os quartis inferiores. Verde: Doadores saudáveis de área endêmica (SAE). Azul: pacientes paucibacilares (PB). Vermelho: pacientes multibacilares (MB). C e D: SAE (n=11), PB (n=11) e MB (n=14). E: SAE (n=11), PB (n=5) e MB (n=12). As frequências foram submetidas ao teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn em que * p<0,05, ** p<0,005.

Em seguida, avaliamos a expressão de CXCR3 pelas células CD8⁺. Realizamos duas análises, uma considerando apenas células de memória totais, isto é, células CD45RA⁻ e uma segunda considerando as subpopulações T_V, T_{MC}, T_{ME} e T_{EDT} (Fig. 4.3, C). Novamente, não podemos descartar a presença de células NK dentro das subpopulações avaliadas, mas elas compreendem majoritariamente linfócitos T (Fig. 4.3, D). As frequências foram normalizadas pelo número de células CD8⁺. Os pacientes MB (Fig. 4.3, E) apresentaram menores frequências de linfócitos CD8⁺CXCR3⁺ que doadores saudáveis (SAE: 65%; MB: 33,4%; p=0,008). Já em relação aos linfócitos CD8⁺CXCR3⁺ de memória, o grupo MB (8,3%) possui frequência desta população significativamente menor que os doadores SAE (25,6%; p=0,02) e pacientes PB (23,3%; p=0,01).

A investigação mais detalhada das subpopulações de linfócitos CD8⁺CXCR3⁺ (Fig. 4.3, E) mostrou que doadores SAE apresentaram maiores frequências de

linfócitos com fenótipo T_{EDT} que pacientes MB (SAE: 6,3%; MB: 2,7; p=0,02). Os doadores MB (7%) possuíram menores frequências de linfócitos com fenótipo T_{ME} que doadores SAE (28%; p=0,02) e pacientes PB (29,9%; p=0,02). Não observamos diferenças entre os grupos para linfócitos T_{MC} e T_V.

4.3 Proporção de Tregs em relação a Tefs respondedores a *M. leprae* alcança níveis compatíveis com tolerância dominante em pacientes com hanseníase multibacilar.

Após a investigação da composição *ex vivo* de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ nos voluntários recrutados, caracterizamos os linfócitos T antígeno-específicos através de um modelo *in vitro*. Primeiro, avaliamos as frequências de Tregs e Tefs *M. leprae*-específicos de doadores SAE e pacientes com hanseníase PB e MB. As frequências de linfócitos antígeno-específicos foram normalizadas pela frequência de células CD4⁺.

Devido à baixa frequência de células antígeno-específicas no sangue, utilizamos um marcador de células mortas para reduzir elementos geradores de artefatos. A estratégia de análise de citometria de fluxo consistiu dos seguintes passos sequenciais (Fig. 4.4, A): (i) detecção da região de células individuais “singlets” pelos parâmetros FSC-A e FSC-H do pulso; (ii) seleção da região de linfócitos pelos parâmetros FSC-A e SSC-A do pulso; (iii) exclusão de células mortas (células positivas para o reagente “LIVE/DEAD”); (iv) seleção das células CD4⁺CD8⁻; (v) seleção de células de memória (CD45RA⁻); (vi) seleção de Tregs (CD25^{alto}FOXP3⁺) e criação de região booleana de Tconvs (Tregs⁻). Nós utilizamos novamente os linfócitos CD8⁺ para delimitar a região de Tregs pela alta expressão de CD25 e positividade para FOXP3 conforme mostrado na figura 4.1, B.

Por fim, os AgTregs foram identificados pelo fenótipo CD137⁺CD154⁻, enquanto os AgTefs pelo fenótipo CD154⁺CD137⁻. Outra vez, não utilizamos o marcador anti-CD3 nas análises, mas confirmamos que os AgTregs (CD4⁺CD45RA⁻CD25^{alto}FOXP3⁺CD137⁺CD154⁻) e AgTefs (CD4⁺CD45RA⁻Tregs⁻CD137⁻CD154⁺) fenotipados neste estudo são linfócitos T, isto é, células CD3⁺ (Fig. 4.4, B).

Em resposta ao sonicado de *M. leprae*, identificamos aumento significativo (Fig. 4.4, C) na frequência de AgTregs em pacientes PB (0,58%) quando comparados com doadores SAE (0,16%; p=0,04) e pacientes MB (0,15%; p=0,02). Também detectamos diferenças nas medianas dos grupos em relação aos AgTefs, tendo os pacientes MB

(0,1%) menores frequências que pacientes PB (0,8%; $p=0,002$) e SAE (0,5%; $p=0,01$). Não detectamos diferenças estatísticas nas frequências de AgTregs e AgTefs em resposta a proteína ML1419c (Fig. 4.4, D).

Para determinar a resposta imune específica, correspondente aos estados de tolerância dominante ou imunidade dos doadores, avaliamos a abundância relativa das subpopulações *M. leprae*-específicas através da determinação da razão entre essas subpopulações (Fig. 4.4, E). Razão AgTregs/AgTefs superior a 1 indica predominância de resposta tolerogênica, isto é, quando a frequência de Tregs excede a frequência de Tefs (143). Detectamos aumento significativo da razão de AgTregs para AgTefs nos MB em comparação com o grupo controle SAE tanto em resposta ao sonicado (SAE:0,4; MB: 2,5; $p=0,008$) quanto ML1419c (SAE: 0,3; MB: 3,1; $p=0,02$). Os pacientes PB apresentaram medianas intermediárias de 1 e 0,9 em resposta ao sonicado e ML1419c, respectivamente.

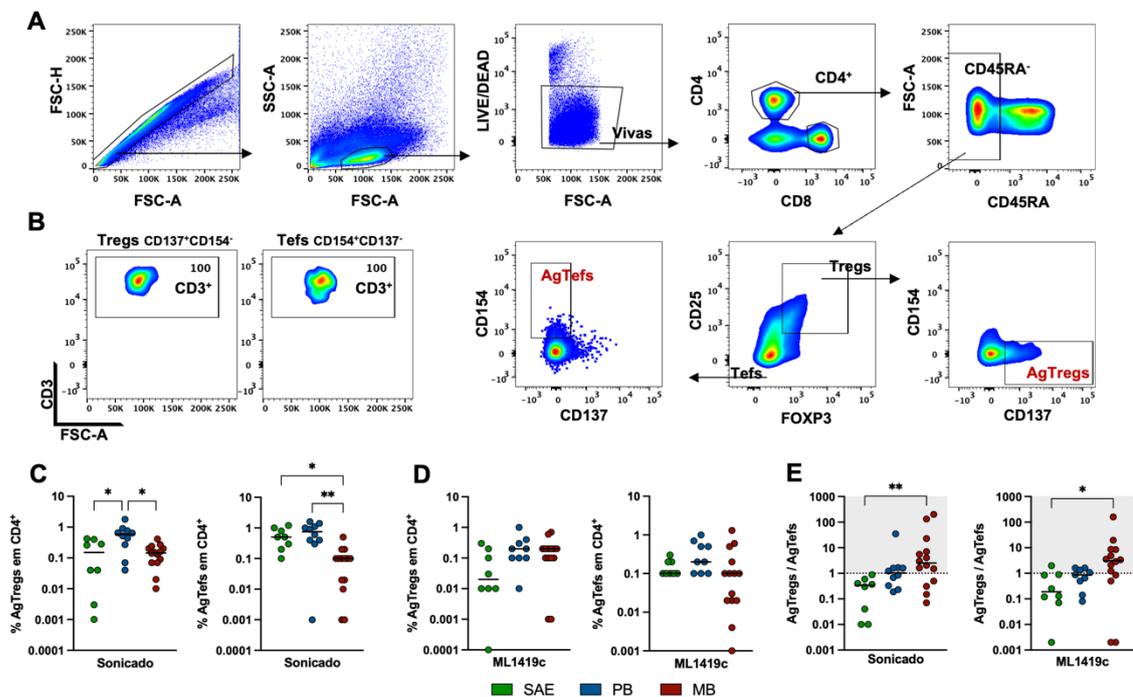


Figura 4.4 – Caracterização de Tregs e Tefs antígeno-específicos em culturas de curta duração com antígenos de *M. leprae*.

Células mononucleares do sangue periférico foram isoladas e estimuladas com sonicado de *M. leprae* ou ML1419c na presença de anti-CD28 e anti-CD40 por 7 horas. Após a cultura, as células foram fenotipadas por citometria de fluxo para detecção das subpopulações celulares de interesse. **(A)** Gráficos representativos da estratégia de análise para detecção de Tregs antígeno-específicas (AgTregs; $CD4^+CD45RA^+CD25^{alt}FOXP3^+CD137^+CD154^+$) e Tefs antígeno-específicos (AgTefs; $CD4^+CD45RA^+Tregs^-CD137^+CD154^+$). **(B)** Gráficos representativos mostrando que os AgTregs e AgTefs são majoritariamente linfócitos T ($CD3^+$). **(C)** Frequências de AgTregs e AgTefs em resposta ao sonicado. **(D)** Frequências de AgTregs e AgTefs em resposta a proteína ML1419c. **(E)** Proporção entre AgTregs e AgTefs em culturas estimuladas com sonicado e ML1419c. As frequências de células específicas foram normalizadas pela frequência de células $CD4^+$ e as porcentagens das culturas contendo apenas anti-CD28 são subtraídas das frequências de culturas estimuladas para identificação de células antígeno-específicas. As barras representam medianas. Cada ponto representa um doador. Verde: Doadores saudáveis de área endêmica. Azul: pacientes paucibacilares. Vermelho: pacientes multibacilares. As frequências e a razão (AgTregs/AgTefs) foram submetidas ao teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn em que * $p<0,05$ e ** $p<0,005$. Gráficos em escala logarítmica.

Investigamos o fenótipo de memória dos linfócitos T *M. leprae*-específicos nas culturas de curta duração, isto é, memória central e efetora. Para isso, determinamos dentro das populações de interesse as populações CCR7⁺ e CCR7⁻ para a identificação de linfócitos T_{MC} e T_{ME}, respectivamente (Fig. 4.5, A).

Observamos que os AgTregs (Fig. 4.5, B) de doadores SAE (T_{MC}: 32,6%; T_{ME}: 67,4%; p=0,001), assim como pacientes PB (T_{MC}: 28,4%; T_{ME}: 71,6%; p=0,002) e MB (T_{MC}: 24,8%; T_{ME}: 75,2%; p=0,0002) apresentam majoritariamente fenótipo de linfócitos T_{ME} em resposta ao sonicado. Isso também foi observado para os AgTregs em resposta a ML1419c para pacientes PB (T_{MC}: 26,7%; T_{ME}: 73,3%; p< 0,02) e MB (T_{MC}: 31,8%; T_{ME}: 68,2%; p<0,008).

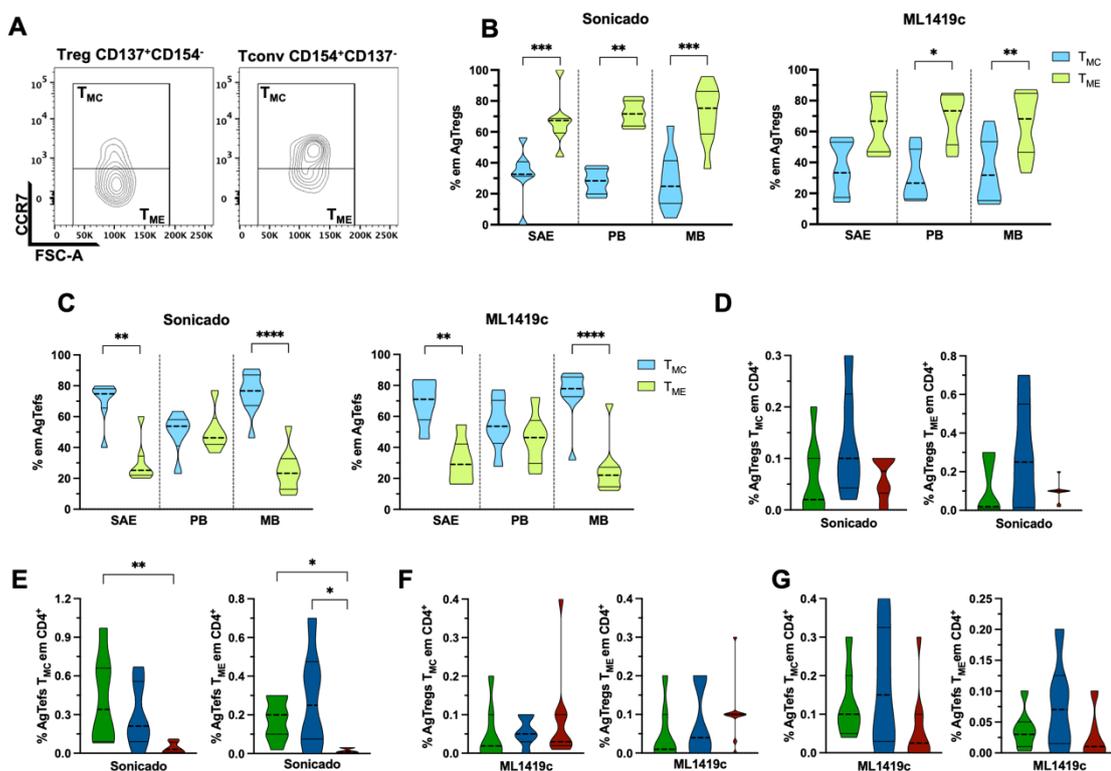


Figura 4.5 - Caracterização do fenótipo de memória dos linfócitos T reguladores e T efetores *M. leprae*-específicos em culturas de curta duração.

Células mononucleares do sangue periférico foram isoladas e estimuladas com sonicado de *M. leprae* ou ML1419c na presença de anti-CD28 e anti-CD40 por 7 horas. Após a cultura, as células foram fenotipadas por citometria de fluxo para detecção das subpopulações celulares de interesse. **(A)** Gráficos representativos da estratégia de análise para detecção de AgTregs e AgTefs com fenótipo de células de memória central (T_{MC}) e memória efetora (T_{ME}). **(B)** Perfil de linfócitos T_{MC} e T_{ME} dentre os AgTregs em resposta ao sonicado e ML1419c. **(C)** Perfil de linfócitos T_{MC} e T_{ME} dentre os AgTefs em resposta ao sonicado e ML1419c. **(D)** Frequências de AgTregs com fenótipo T_{MC} e T_{ME} dentre as células CD4⁺ em resposta ao sonicado. **(E)** Frequências de AgTefs com fenótipo T_{MC} e T_{ME} dentre as células CD4⁺ em resposta ao sonicado. **(F)** Frequências de AgTregs com fenótipo T_{MC} e T_{ME} dentre as células CD4⁺ em resposta a ML1419c. **(G)** Frequências de AgTefs com fenótipo T_{MC} e T_{ME} dentre as células CD4⁺ em resposta a ML1419c. As frequências **(D -G)** foram normalizadas pela frequência de células CD4⁺ e as porcentagens das culturas contendo apenas anti-CD28 foram subtraídas das frequências de culturas estimuladas para identificação de células antígeno-específicas. As barras pontilhadas representam as medianas das frequências. As barras acima da mediana representam os quartis superiores, enquanto as barras abaixo representam os quartis inferiores. Verde: Doadores saudáveis de área endêmica (SAE; n=7). Azul: pacientes paucibacilares (PB; n=6). Vermelho: pacientes multibacilares (MB; n=10). As frequências foram submetidas ao teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn em que * p<0,05, ** p<0,005, *** p<0,0005 e **** p<0,0001.

Em resposta ao sonicado (Fig. 4.5, D), identificamos que os AgTefs de doadores saudáveis (T_{MC} : 74,8%; T_{ME} : 25,2%; $p=0,001$) e pacientes MB (T_{MC} : 76,7%; T_{ME} : 23,3%; $p<0,0001$) são majoritariamente linfócitos T_{MC} , enquanto nos pacientes PB há um balanço entre as subpopulações T_{MC} e T_{ME} . Detectamos um perfil similar em resposta à proteína ML1419c, em que doadores SAE (T_{MC} : 71,0%; T_{ME} : 29,0%; $p=0,001$) e MB (T_{MC} : 77,9%; T_{ME} : 22,1%; $p<0,0001$) apresentam diferenças estatísticas na proporção de linfócitos T_{MC} e T_{ME} .

Para quantificar os AgTregs e AgTefs com fenótipo T_{MC} e T_{ME} , normalizamos as frequências destas subpopulações pelo número de células $CD4^+$. Não detectamos diferenças estatísticas entre os AgTregs em resposta ao sonicado (Fig. 4.5, D) e ML1419c (Fig. 4.5, F) com fenótipo T_{MC} e T_{ME} entre os três grupos avaliados.

Em relação aos AgTefs, observamos diferenças apenas nas culturas estimuladas com sonicado (Fig. 4.5, E). Os pacientes MB apresentam uma redução significativa na frequência de AgTefs com fenótipo T_{MC} quando comparados com doadores SAE (SAE: 0,25%; MB: 0,03%; $p=0,009$). AgTefs com fenótipo T_{ME} foram detectados em menores frequências nos pacientes MB (MB: 0,01%) que PB (PB: 0,3%; $p=0,02$) e SAE (SAE: 0,2%; $p=0,01$). Para a proteína ML1419c (Fig. 4.5, G), não observamos diferenças estatísticas nas frequências das subpopulações de AgTefs entre os grupos estudados.

4.4 Controles saudáveis e pacientes com hanseníase mostram diferenças na proporção de linfócitos T $CD8^+$ respondedores por apresentação cruzada

Os linfócitos T $CD8^+$ participam da resposta imune contra patógenos intracelulares como o *M. leprae*. Após a caracterização de Tregs e Tefs, avaliamos os linfócitos T $CD8^+$ recentemente ativados por sonicado de *M. leprae* ou ML1419c. Os estímulos utilizados neste estudo permitem a ativação de células $CD8^+$ apenas por apresentação cruzada (211). A estratégia de citometria de fluxo consistiu na seleção de células $CD69^+$ dentro da região de células $CD8^+$ seguido da identificação de células com fenótipo de memória ($CD45RA^-$) ou fenótipo T_{MC} , T_{ME} , T_V e T_{EDT} baseado na expressão de $CD45RA$ e $CCR7$ (Fig. 4.6, A). Observamos que o fenótipo $CD8^+CD69^+CD45RA^-$ compreende majoritariamente linfócitos T ($CD3^+$), enquanto o fenótipo $CD8^+CD69^+$ inclui uma população de células $CD3^-$ (Fig. 4.6, B). Normalizamos as frequências de linfócitos T $CD8^+$ respondedores pelo número de $CD8^+$.

Em resposta ao sonicação de *M. leprae* (Fig. 4.6, C), os pacientes MB apresentaram menores frequências de linfócitos CD8⁺CD69⁺ (1,1%) que doadores SAE (3,8%; p=0,008) e pacientes PB (4,4%; p=0,007). Os pacientes MB também apresentaram menores frequências de linfócitos CD8⁺CD69⁺CD45RA⁻ (0,4%) que os doadores SAE (1,8%; p=0,01) e PB (2%; p=0,005). Já em relação a proteína ML1419c (Fig. 4.6, D), não identificamos diferenças entre os grupos estudados tanto para CD8⁺ ativadas totais quanto de memória.

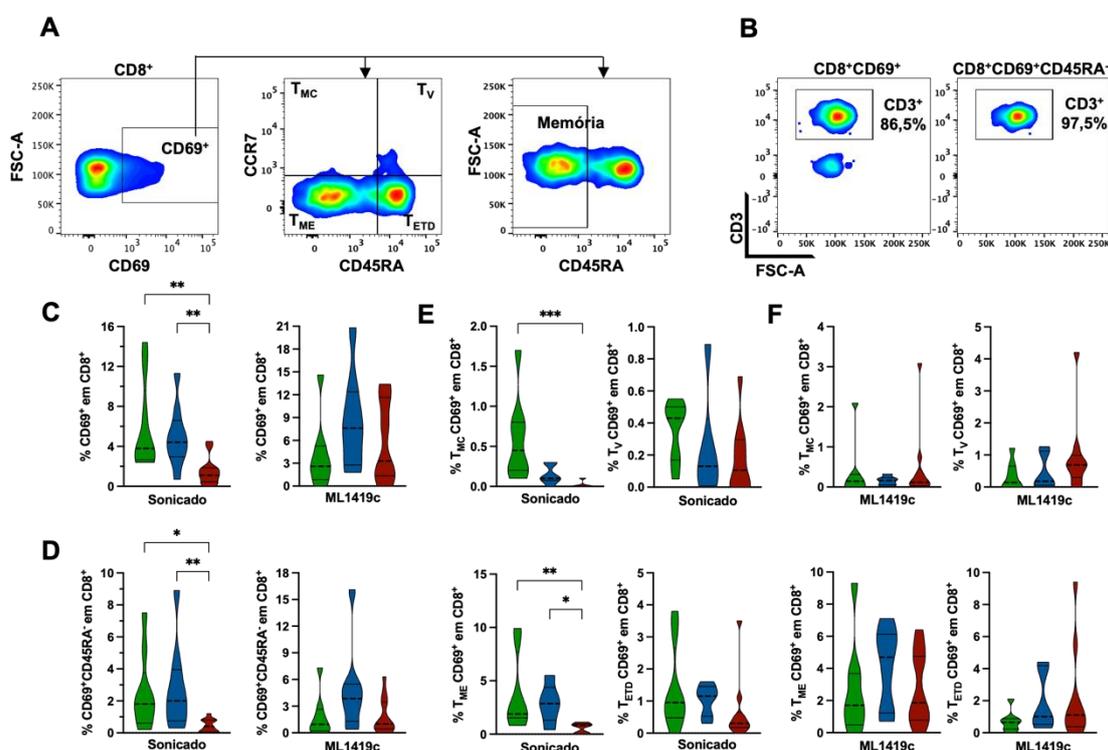


Figura 4.6 – Caracterização de linfócitos CD8⁺ ativadas por apresentação cruzada em culturas de curta duração com antígenos de *M. leprae*.

Células mononucleares do sangue periférico foram separadas por gradiente de centrifugação e estimuladas *in vitro* com sonicação de *M. leprae* e ML1419c (proteína recombinante de *M. leprae*) na presença de anti-CD28 por 7 horas. Após a cultura de curta duração, fenotipamos as células por citometria de fluxo. (A) Gráficos representativos da análise de células CD8⁺CD69⁺ totais, e células com fenótipo de memória (CD45RA⁻) e linfócitos T virgens (T_V; CD45RA⁺CCR7⁺), linfócitos T de memória central (T_{MC}; CD45RA⁻CCR7⁺), linfócitos T de memória efetora (T_{ME}; CD45RA⁻CCR7⁺) e linfócitos T efetores terminantemente diferenciadas (T_{EDT}; CD45RA⁺CCR7⁺). (B) Representativo de marcação com anti-CD3 mostrando que aproximadamente 15% das células CD8⁺CD69⁺ não são linfócitos T, enquanto as células CD8⁺CD45RA⁻ são majoritariamente células CD3⁺. Frequências de células CD8⁺CD69⁺ totais e de memória em resposta ao sonicação de *M. leprae* (C) e ML1419c (D). Frequências de células CD8⁺CD69⁺ com fenótipo T_V, T_{MC}, T_{ME} em culturas estimuladas com sonicação (E) e ML1419c (F). As frequências de células ativadas foram normalizadas pela frequência de células CD8⁺ e as porcentagens das culturas contendo apenas anti-CD28 são subtraídas das frequências de culturas estimuladas para identificação de células respondedoras aos antígenos. As barras pontilhadas representam as medianas das frequências. As barras acima da mediana representam os quartis superiores, enquanto as barras abaixo representam os quartis inferiores. Verde: Doadores saudáveis de área endêmica (SAE). Azul: pacientes paucibacilares (PB). Vermelho: pacientes multibacilares (MB). C e D: SAE (n= 9), PB (n= 9) e MB (n=13). E e F: SAE (n= 8), PB (n= 6) e MB (n=10). As frequências foram submetidas ao teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn em que * p<0,05, ** p<0,005 e *** p<0,0005.

A avaliação das subpopulações T_{MC}, T_{ME}, T_V e T_{EDT} evidenciou que os pacientes MB (T_{MC}: 0; T_{ME}: 0,8%) apresentaram uma redução significativa na mediana das frequências de linfócitos T CD8⁺ respondedores com fenótipo T_{MC} (p=0,0003) e T_{ME} (p=0,006) que doadores SAE (T_{MC}: 0,5%; T_{ME}: 1,9%) em resposta ao sonicação

(Fig. 4.6, E). Os pacientes MB também apresentaram menores frequências de linfócitos T CD8⁺ respondedores com fenótipo T_{ME} que pacientes PB (PB:2,9%; MB: 0,8%; p=0,02). Não detectamos diferenças nas frequências de linfócitos T CD8⁺ respondedores com fenótipo T_V e T_{EDT} entre os grupos em resposta ao sonicado. Em relação a proteína ML1419c, não vimos diferenças nas frequências das subpopulações de linfócitos T CD8⁺ (Fig. 4.6, F).

4.5 Perfil funcional dos Tregs *M. leprae*-específicos de pacientes com hanseníase.

Também caracterizamos fenotipicamente os Tregs em culturas de 18 horas estimuladas com sonicado de *M. leprae* ou ML1419c. Esta cinética de maior duração foi escolhida para detectar moléculas associadas à função supressora de Tregs. Como mencionado anteriormente, CD154 é expresso transitoriamente no curso de ativação de Tefs, sendo usado como marcador apenas em estimulações antigênicas de curta duração. Por isso, devido a ausência deste marcador nas culturas de 18 horas, optamos por identificar Tconvs ativadas usando a expressão alta para CD25 e negativa para FOXP3 (aTconvs; CD4⁺CD45RA⁻CD25^{alto}FOXP3⁻), enquanto os Tregs específicos para antígenos de *M. leprae* foram caracterizados como CD4⁺CD45RA⁻CD25^{alto}FOXP3⁺CD137⁺. Os Tregs foram identificados usando as células CD4⁻ como controle para delimitar a população (Fig. 4.7, A).

Primeiro, para confirmar que a ausência de CD154 não influencia na frequência de AgTregs, comparamos as porcentagens de AgTregs (CD4⁺CD45RA⁻CD25^{alto}FOXP3⁺CD137⁺CD154⁻) e Tregs CD137⁺ (CD4⁺CD45RA⁻CD25^{alto}FOXP3⁺CD137⁺) de todos os voluntários recrutados, isto é, doadores saudáveis e pacientes nas culturas de curta duração. Podemos observar que não houve diferenças nas medianas de frequências de Tregs tanto para o sonicado quanto para a ML1419c (Fig. 4.7, B). Por isso, continuaremos chamando os Tregs CD137⁺ nas culturas de 18 horas de AgTregs.

Comparamos as frequências de AgTregs entre pacientes PB e MB de hanseníase nas culturas de 18 horas (Fig. 4.7, C). Em resposta ao sonicado, detectamos maiores frequências nos pacientes PB que MB (PB: 1,2%; MB: 0,5%; p=0,003). Já em relação a proteína ML1419c, observamos frequências similares entre os dois grupos (0,3%). Em relação aos aTconvs, os pacientes PB (PB: 5,8%; MB: 0,3%; p=0,0002) apresentam um aumento significativo na frequência desta população

quando comparados com pacientes MB (Fig. 4.7, D). Em relação à proteína ML1419c, não observamos diferença estatísticas entre os pacientes PB e MB.

Por fim, avaliamos a razão entre AgTregs e aTconvs nas culturas de 18 horas (Fig. 4.7, E). Identificamos maior razão nos pacientes MB quando comparados com pacientes PB em resposta ao sonicado de *M. leprae*, resultado compatível com a resposta tolerogênica nestes pacientes (PB: 0,3%; MB: 2,2%; $p=0,0002$). O uso de marcador de ativação não específico (CD25) para Tconvs evidenciou que nestas condições os pacientes PB apresentam predominância de resposta efetora contra os antígenos do bacilo (razão < 1). Não detectamos diferenças estatísticas para a proteína ML1419c.

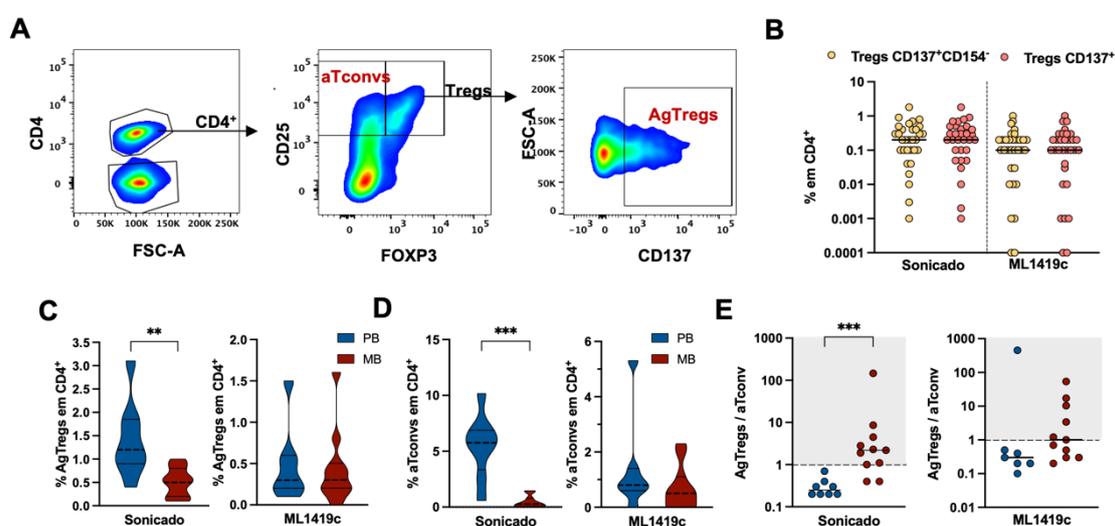


Figura 4.7 – Caracterização de Tregs *M. leprae*-específicos e Tconvs ativados de pacientes com hanseníase em culturas de 18 horas.

Células mononucleares do sangue periférico foram isoladas e estimuladas com sonicado de *M. leprae* ou ML1419c na presença de anti-CD28 por 18 horas. Após a cultura, as células foram fenotipadas por citometria de fluxo para detecção das subpopulações celulares de interesse. **(A)** Gráficos representativos da análise de AgTregs ($CD4^+CD25^{alt}FOXP3^+CD137^+$) e T convencionais ativados (aTconv; $CD4^+CD25^{alt}FOXP3^+$) em culturas de 18 horas. **(B)** Frequências de Tregs com fenótipo $CD137^+CD154^-$ e $CD137^+$ em culturas de 7 horas estimuladas com sonicado e ML1419c. **(C)** Frequência de AgTregs ($CD137^+$) em culturas de 18 horas em resposta ao sonicado e ML1419c. **(D)** Frequência de aTconv em culturas de 18 horas em resposta ao sonicado e ML1419c. **(E)** Proporção entre AgTregs e aTconv em culturas estimuladas com sonicado e ML1419c por 18 horas. As frequências foram normalizadas pelo número de $CD4^+$. As porcentagens das culturas contendo apenas anti-CD28 foram subtraídas das frequências de culturas estimuladas. As barras pontilhadas representam as medianas das frequências. As barras acima da mediana representam os quartis superiores, enquanto as barras abaixo representam os quartis inferiores. Azul: pacientes paucibacilares (PB; $n=8$). Vermelho: pacientes multibacilares (MB; $n=11$). As frequências e a razão (AgTregs/AgTefs) foram submetidas ao teste de Mann-Whitney em que $** p<0,05$ e $*** p<0,0005$.

Os Tregs possuem um vasto repertório de vias moleculares que geram a supressão de Tefs (146). Por isso, fomos investigar a expressão de moléculas inibidoras nos AgTregs para inferir possíveis mecanismos de supressão desempenhados por estas células em pacientes de hanseníase. Comparamos a expressão de CD39, CD73, CTLA-4, GARP e LAG-3 em AgTregs e Tregs não ativados (Tregs $CD137^-$) em culturas de 18 horas estimuladas com sonicado ou ML1419c.

Dentro da região de Tregs, selecionamos os AgTregs (CD137⁺) e criamos uma região booleana "not gate" de linfócitos CD137⁻, isto é, Tregs não ativados (Tregs CD137⁻). Dentro das duas subpopulações de Tregs, identificamos as células positivas para os marcadores avaliados (Fig. 4.8, A). As frequências de AgTregs e Tregs CD137⁻ positivas para as moléculas inibidoras foram normalizadas pelo número de Tregs totais. As porcentagens das culturas contendo apenas anti-CD28 foram descontadas das frequências das culturas estimuladas para detecção da expressão de CD39, CD73, CTLA-4, GARP e LAG-3 induzida pelos estímulos utilizados.

Detectamos maior expressão de CD39 (Fig. 4.8, B) em AgTregs quando comparados com Tregs CD137⁻ tanto de pacientes PB (AgTregs: 15,7%; Tregs CD137⁻: 0; $p < 0,0001$) quanto MB (AgTregs: 5,7%; Tregs CD137⁻: 0; $p < 0,0001$) em resposta ao sonicado. Embora com frequências menores, observamos resultados similares (AgTregs: 5%; Tregs CD137⁻: 0) nas culturas estimuladas com proteína ML1419c para pacientes PB ($p = 0,0002$) e MB ($p = 0,0004$). Observamos maior expressão de CD73 (Fig. 4.8, C) apenas nos AgTregs de pacientes PB em resposta ao sonicado (AgTregs: 1,7%; Tregs CD137⁻: 0; $p = 0,003$).

O sonicado induziu maior expressão de CTLA-4 (Fig. 4.8, D) em AgTregs de pacientes PB (22,5%; $p < 0,0001$) e MB (14%; $p < 0,0001$) quando comparados com os Tregs CD137⁻ (AgTregs: 0). Os AgTregs de pacientes PB (AgTregs: 7,9%; Tregs CD137⁻: 1,2%; $p = 0,001$) e MB (AgTregs: 13,2 %; Tregs CD137⁻: 0; $p = 0,0005$) também expressaram mais CTLA-4 que Tregs CD137⁻ em resposta a ML1419c. Em resposta ao sonicado, os AgTregs de pacientes PB (AgTregs: 5,7%; Tregs CD137⁻: 1,4%; $p = 0,007$) e MB (AgTregs: 2%; Tregs CD137⁻: 0; $p < 0,0009$) expressaram mais GARP (Fig. 4.8, E) que os Tregs CD137⁻. Não observamos diferenças entre as subpopulações dos grupos PB e MB em relação a ML1419c. Por fim, só detectamos aumento na indução da expressão de LAG-3 (Fig. 4.8, F) pelas AgTregs do grupo MB em resposta ao sonicado (AgTregs: 0,9%; Tregs CD137⁻: 0; $p = 0,03$).

CD73 também é expresso por linfócitos T CD4⁺ (169). Por isso, investigamos qual subpopulação expressa mais este marcador (Fig. 4.8, G). Em resposta ao sonicado, identificamos que os Tconvs (9,5%) de pacientes PB expressam mais CD73 que os Tregs (0,2%; $p < 0,04$) e os AgTregs (0,1%; $p < 0,0001$). Os Tconvs (11,9%) de pacientes MB também expressam mais CD73 que Tregs (0,2%; $p = 0,01$) e AgTregs (0,04%; $p < 0,0001$). Nós também detectamos diferenças na expressão de CD73 entre Tregs e AgTregs ($p = 0,04$) em pacientes MB. Já foi demonstrado que a adenosina pode ser produzida em microambientes contendo células CD4⁺CD73⁺ e Tregs CD39⁺

a partir do contato entre essas duas subpopulações (169). Assim, esta via pode estar envolvida na imunossupressão da hanseníase, já que ambas as subpopulações foram detectadas no sangue periférico dos pacientes.

Quanto às culturas estimuladas com ML1419c, observamos que os Tconvs (11%) de pacientes PB apresentam maior expressão de CD73 que os AgTregs (0,02%; $p=0,0001$). Para pacientes MB detectamos maior expressão de CD73 tanto pelos Tconvs (11,4%) em relação aos Tregs (0,3%; $p=0,03$) quanto AgTregs (0,03% $p<0,0001$). Também detectamos diferenças entre Tregs e AgTregs ($p=0,04$). Assim, os AgTregs de pacientes com hanseníase expressam moléculas inibidoras associadas a atividade supressora destes linfócitos T.

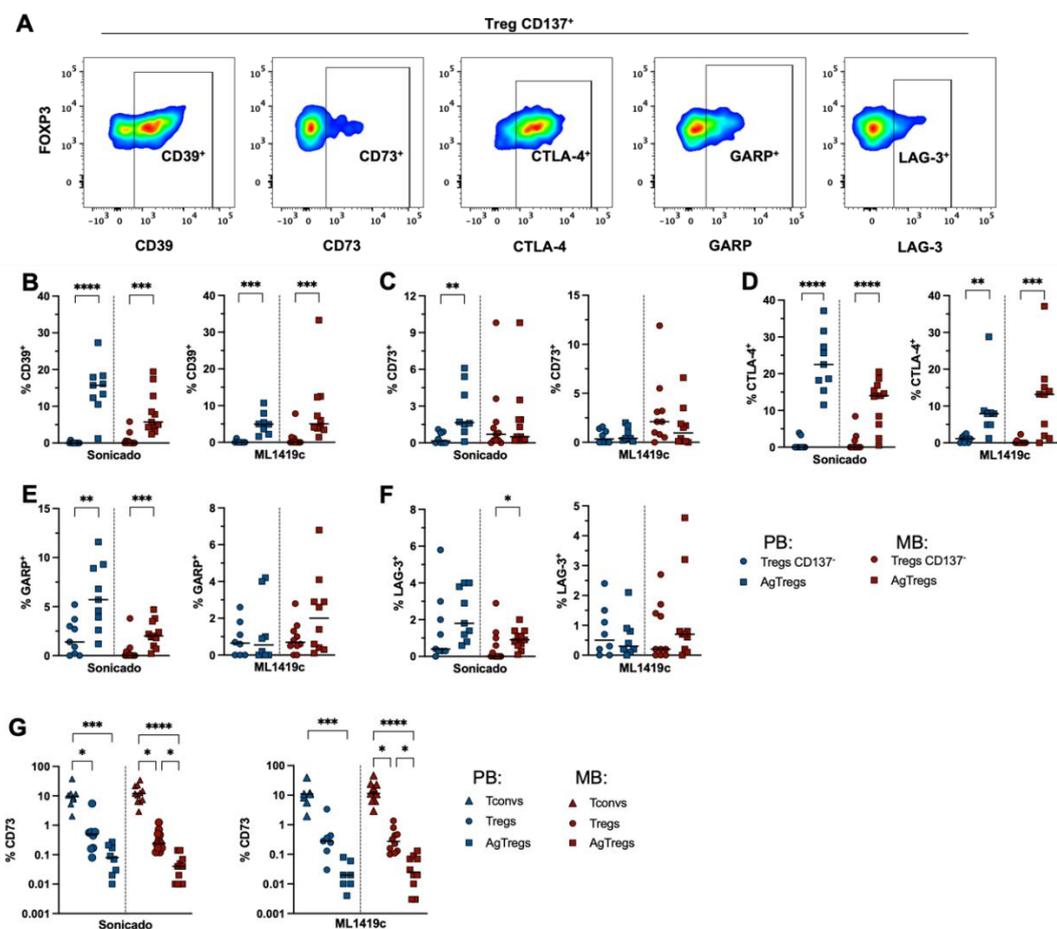


Figura 4.8 – Caracterização de moléculas inibidoras expressas em Tregs antígeno-específicos em culturas de 18 horas com antígenos de *M. leprae*.

Células mononucleares do sangue periférico foram isoladas e estimuladas com sonicado de *M. leprae* ou ML1419c na presença de anti-CD28 por 18 horas. Após a cultura, as células foram fenotipadas por citometria de fluxo para detecção das subpopulações celulares de interesse. (A) Gráficos representativos da estratégia de análise para detecção da expressão de CD39, CD73, CTLA4, GARP e LAG3 pelos linfócitos T reguladores (Tregs). Frequência de AgTregs e Tregs CD137⁺ expressando CD39 (B), CD73 (C), CTLA-4 (D), GARP (E), LAG-3 (F) em resposta ao sonicado e proteína ML1419c. (G) Expressão de CD73 pelas linfócitos Tconvs, Tregs totais e AgTregs em culturas estimuladas com sonicado e ML1419c. (B-F) As frequências foram normalizadas pelo número de Tregs totais e as frequências das culturas com apenas anti-CD28 foram subtraídas das porcentagens de culturas estimuladas para detecção da expressão das moléculas inibidoras induzidas pelos antígenos de *M. leprae*. As barras representam medianas. Azul: pacientes paucibacilares (PB). Vermelho: pacientes multibacilares (MB). Cada ponto representa um paciente. As frequências foram submetidas ao teste de Mann-Whitney em que * $p<0,05$, ** $p<0,005$, *** $p<0,0005$ e **** $p<0,0001$.

Em seguida avaliamos o perfil multifuncional dos AgTregs, isto é, a capacidade dos AgTregs de expressar uma ou mais de duas vias de supressão simultaneamente. Para isso, utilizamos o recurso de regiões booleanas do programa de análise para criar as combinações possíveis de expressão dos marcadores CD39, CD73, CTLA-4, GARP e LAG-3 pelos AgTregs. Desta forma, selecionamos as populações CD39⁺, CD73⁺, CTLA4⁺, GARP⁺ e LAG3⁺ dentro da região de AgTregs ou Tregs CD137⁻ e criamos as regiões através da função. A subpopulação CD39⁺CD73⁺CTLA4⁺GARP⁺LAG3⁺ gerada pelo programa identifica os Tregs com as 5 vias de supressão. As porcentagens das demais subpopulações criadas (com positividade para 1, 2, 3 ou 4 marcadores) foram somadas para demonstrar o percentual de AgTregs com expressão de 1, 2, 3 ou 4 vias de supressão.

Primeiro, avaliamos a média da distribuição do número de vias de supressão dentro da região de AgTregs. Em resposta ao sonicado de *M. leprae* (Fig. 4.9, A), os AgTregs de pacientes expressaram majoritariamente pelo menos uma das vias de supressão avaliadas. Além disso, os AgTregs compreenderam principalmente linfócitos T expressando de 1 a 3 vias de supressão. Em relação à proteína ML1419c (Fig. 4.9, B), os AgTregs dos pacientes MB apresentaram perfil bastante similar ao dos linfócitos T estimulados pelo sonicado. Já os AgTregs de pacientes PB apresentaram um pequeno aumento na proporção da subpopulação que expressa 2 vias de supressão quando comparado com o sonicado.

Em seguida, quantificamos os AgTregs expressando de 1 ou de 2 a 4 vias de supressão. Normalizamos as frequências pelo número de Tregs e subtraímos as frequências das culturas contendo apenas anti-CD28 das porcentagens das culturas estimuladas para identificar apenas as células ativadas pelo sonicado e ML1419c. Os AgTregs de pacientes PB (5,1%; p=0,0002) e MB (3,4%; p<0,0001) apresentaram maiores frequências de células com 1 via de supressão (Fig. 4.9, C) quando comparados com Tregs não ativados em resposta ao sonicado. Observamos resultados similares nas culturas estimuladas com ML1419c, tendo os pacientes as seguintes frequências: PB (2,5%; p=0,0006) e MB (3,3%; p<0,0001).

Em relação as células com 2 vias de supressão, observamos frequências significativamente maiores em AgTregs de pacientes PB (11,9%; p=0,0002) e MB (6,2%; p=0,009) quando comparados com Tregs CD137⁻ em resposta ao sonicado (Fig. 4.9, D). Detectamos resultados similares em resposta a proteína ML1419c para PB (3,5%; p=0,006) e MB (4,8%; p=0,002).

Detectamos maiores frequências de AgTregs com 3 vias de supressão (Fig. 4.9, E) apenas em resposta ao sonicado de *M. leprae* tanto para o grupo PB (AgTregs: 5,2%; Tregs CD137⁻: 1,1%; p<0,004) quanto para o MB (AgTregs: 1,6%; p=0,02). Já para células com 4 vias de supressão (Fig. 4.9, F), observamos diferenças apenas no grupo MB em resposta ao sonicado (AgTregs: 0,4%; Tregs CD137⁻: 0; p=0,002).

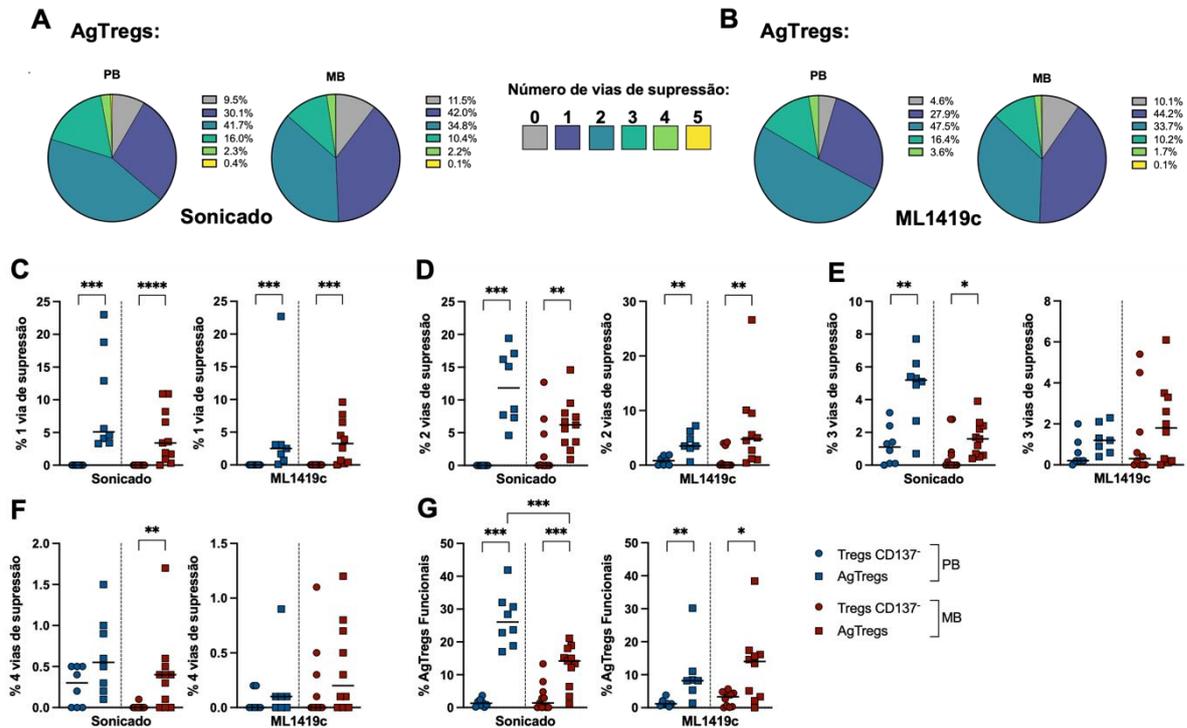


Figura 4.9 – Perfil multifuncional dos Tregs antígeno-específicos em culturas de 18 horas com antígenos de *M. leprae*.

Células mononucleares do sangue periférico foram isoladas e estimuladas com sonicado de *M. leprae* ou ML1419c na presença de anti-CD28 por 18 horas. Após a cultura, as células foram fenotipadas por citometria de fluxo para identificação das subpopulações de interesse. Usamos a ferramenta de “gates” booleanos do programa de análise para criar as combinações possíveis de subpopulações baseadas na expressão de CD39, CD73, CTLA4, GARP e LAG3. Assim, separamos os AgTregs e Tregs CD137⁻ de acordo com o número de vias de supressão expressas por uma única célula, ou seja, células expressando de 1 a 5 vias de supressão. (A-B) Gráficos de pizza exibindo o perfil funcional das AgTregs de pacientes PB e MB em resposta ao sonicado de *M. leprae* e ML1419c. (A-F) Frequência de AgTregs e Tregs CD137⁻ expressando de 1 a 4 vias de supressão em resposta ao sonicado e proteína ML1419c. (F) Frequências de AgTregs e Tregs CD137⁻ funcionais, isto é, células expressando pelo menos 1 via de supressão. (A-B) As porcentagens referem-se as médias das frequências de cada grupo. (C-G) As frequências foram normalizadas pelo número de Tregs totais e as frequências das culturas com apenas anti-CD28 foram subtraídas das porcentagens de culturas estimuladas para detecção da expressão das moléculas inibidoras induzidas pelos antígenos de *M. leprae*. As barras pontilhadas representam as medianas. Cada ponto representa um paciente. As frequências foram submetidas ao teste de Mann-Whitney em que *p<0,05, ** p<0,005, *** p<0,0005 e **** p<0,0001.

Por fim, avaliamos as frequências de Tregs funcionais, isto é, Tregs expressando pelo menos uma das moléculas inibidoras (Fig. 4.9, G). Para isso, somamos as frequências de AgTregs de 1 a 5 funções. Detectamos que os AgTregs de pacientes PB (26,1%; p=0,0002) e MB (14,2%; p=0,0007) apresentaram aumento significativo da expressão de moléculas funcionais quando comparados com Tregs não ativados em resposta ao sonicado.

Comparando pacientes PB e MB, detectamos maior frequência de AgTregs funcionais em pacientes PB ($p=0,0007$). Também observamos maior frequência de AgTregs funcionais quando comparados com Tregs não ativados para a proteína ML1419c em pacientes PB (8,2%; $p=0,002$) e MB (14%; $p=0,03$).

4.6 Controles saudáveis e pacientes com hanseníase mostram diferenças em proporções de Tregs e Tefs com padrão migratório (CCR4⁺) para tecidos periféricos.

O receptor CCR4 está envolvido na migração de linfócitos T para tecidos periféricos, incluindo a pele. Este receptor pode ser expresso tanto pelos Tregs quanto linfócitos T CD4⁺ de memória independentemente da polarização TH1 e TH2 (199, 200). Halim e colaboradores usaram uma estratégia de análise baseada na expressão de CXCR3 e CCR6 pelas células CCR4⁺ que permite a identificação de Tregs e Tconvs do tipo TH1, TH2, TH17 e TH1/17 com padrões migratórios (CCR4⁺) para tecidos periféricos (201).

Desta forma, investigamos essas quatro populações circulantes nos pacientes de hanseníase e doadores SAE em condições *ex vivo*. A estratégia de análise por citometria de fluxo consistiu em selecionar Tregs e Tconvs e em seguida, selecionar em cada subpopulação as células CD45RA⁻CCR4⁺, para posteriormente analisar a expressão de CXCR3 e CCR6 (Figura 4.10, A). Os valores de frequência encontrados foram normalizados para demonstrar a proporção das subpopulações dentre todos os Tregs ou todos os Tconvs.

Detectamos diferenças significativas para Tregs do tipo TH1 (PB:17,1%; MB: 7,3%; $p=0,006$) quando o grupo MB foi comparado com pacientes PB e TH1/TH17 (SAE: 3,3%; MB: 0,2%; $p=0,04$) e TH17 (SAE: 15,3%; MB: 1,5%; $p=0,02$) quando comparado com o grupo SAE (Fig. 4.10, B). Pacientes MB também apresentaram redução significativa nas frequências de Tconvs (Fig. 4.10, C) com perfil TH1 (PB: 3,4%; MB: 1,1%; $p=0,02$), TH1/TH17 (SAE: 1,9%; MB: 0,3%; $p=0,02$) e TH17 (SAE: 0,4%; MB: 0,01%; $p=0,03$). A distribuição das subpopulações do tipo TH1, TH2, TH17, TH1/17 é similar para Tregs ou Tconvs, quando a análise é feita dentro de cada grupo de doadores (Fig. 4.10, D). É necessário mencionar que a subpopulação CXCR3⁺TH2 é fenotipicamente semelhante à subpopulação TH1 com padrões migratórios para tecidos periféricos (CD4⁺CD45RA⁻CCR4⁺CXCR3⁺CCR6⁻).

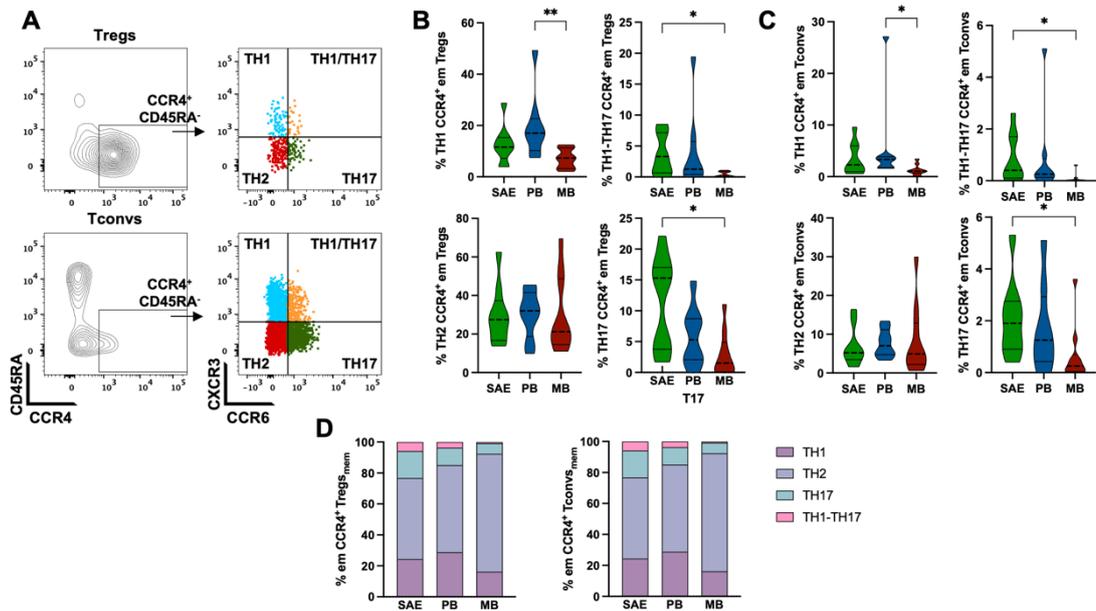


Figura 4.10 - Caracterização de Tregs e Tefs com padrão migratório (CCR4⁺) para tecidos periféricos em pacientes com hanseníase e doadores saudáveis.

Células mononucleares do sangue periférico foram separadas por gradiente de centrifugação e submetidas a citometria de fluxo para fenotipagem. **(A)** Gráficos representativos da estratégia de citometria de fluxo para identificação de e Tconvs com padrões migratórios para tecidos periféricos (CCR4⁺). Fenótipos do tipo TH1 (CD45RA-CCR4⁺CXCR3⁺ CCR6⁻), TH2 (CD45RA-CCR4⁺CXCR3⁺CCR6⁻), TH17 (CD45RA-CCR4⁺CXCR3⁺CCR6⁺) e TH1/TH17 (CD45RA-CCR4⁺CXCR3⁺ CCR6⁻). **(B)** Frequências Tregs do tipo TH1, TH2, TH17, TH1/TH17. **(C)** Frequências Tconvs do tipo TH1, TH2, TH17, TH1/TH17. **(D)** Proporção das subpopulações do tipo TH1, TH2, TH17, TH1/TH17 (média) dentre os Tregs e Tefs CCR4⁺ de memória. **(B-C)** As frequências foram normalizadas pelo número de Tregs e Tefs. As barras pontilhadas representam as medianas das frequências. As barras acima da mediana representam os quartis superiores, enquanto as barras abaixo representam os quartis inferiores. Verde: Doadores saudáveis de área endêmica (SAE; n=9). Azul: pacientes paucibacilares (PB; n=8). Vermelho: pacientes multibacilares (MB; n=10). As frequências foram submetidas ao teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn em que * p<0,05 e ** p<0,005.

4.7 Tregs provenientes de lesão de pele de pacientes com hanseníase

Este estudo também teve como objetivo caracterizar os Tregs provenientes de fragmentos de lesão de pele por citometria de fluxo. Inicialmente, dissociamos quatro amostras de pele de 6 mm de pacientes MB (Fig. 4.9). Devido ao baixo rendimento de células, neste momento, optamos por pular a etapa de marcação para exclusão de células mortas. Assim, a análise por citometria de fluxo para detecção de Tregs foi a seguinte: (i) identificação de células individuais pelos parâmetros FSC-A e FSC-H do pulso; (ii) identificação da região de linfócitos; (iii) seleção de células CD4⁺; (iv) detecção de Tregs pela alta expressão de CD25 e positividade para FOXP3 (Fig. 4.11, A).

Para investigar a influência da solução enzimática nas células, avaliamos as marcações em CMS sem e com tratamento enzimático. Primeiro, avaliamos as marcações de CD4 e CD8 (Fig. 4.11, B). Observamos que o tratamento reduz a mediana de intensidade de fluorescência (MFI) de CD4, entretanto, ainda é possível

separar ambas as populações positiva e negativa. Não detectamos diferenças no MFI de CD8, assim como no MFI de CD25 e FOXP3 (Fig. 4.11, C). Dentro da região de Tregs, observamos que os linfócitos são na sua maioria de memória (CD45RO⁺), ou seja, linfócitos que já entraram em contato com o antígeno cognato (Fig. 4.11, D).

Normalizamos as frequências de Tregs de memória (CD25^{alto}FOXP3⁺CD45RO⁺) pelo número de células CD4⁺ para quantificar esta população nas amostras avaliadas (Fig. 4.11, E). Observamos maiores medianas de frequências de Tregs de memória nas lesões de pele (6,2%; p=0,03) que no sangue (1,7%) dos pacientes MB. Além disso, avaliamos a razão de Tregs_{mem} para Tconv_{mem} nas amostras e observamos maior razão na pele (0,15) que no sangue (0,05) dos pacientes (Fig. 4.11, F).

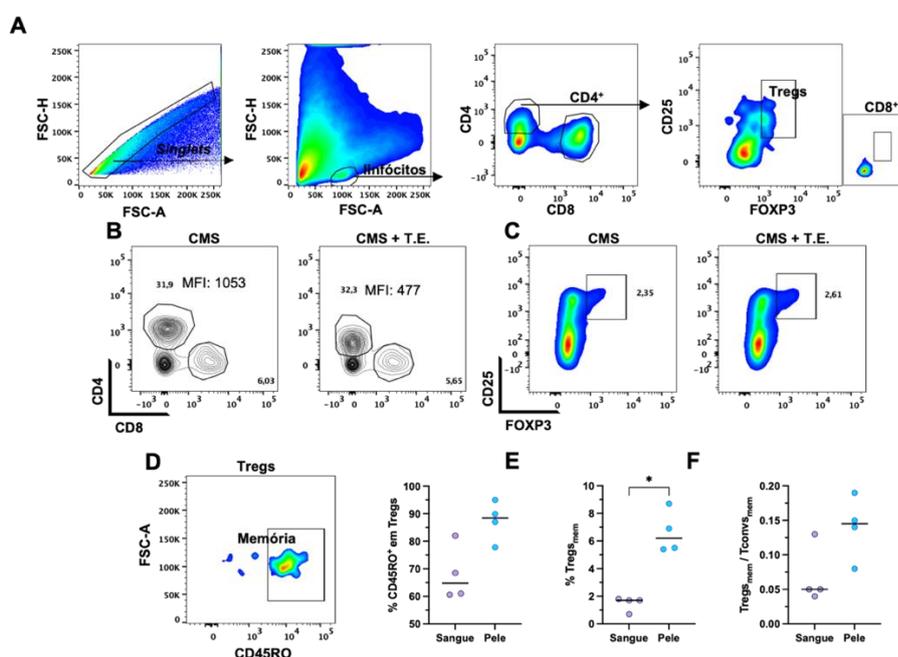


Figura 4.11 – Caracterização de Tregs provenientes de lesão de pele de pacientes multibacilares.

Fragmentos de pele obtidos por biópsia de “punch” de 6mm foram submetidos a dissociação mecânica com auxílio de bisturi, seguido de dissociação enzimática por 18 horas a 37°C com 5% de CO₂. Após a incubação, os fragmentos foram passados em filtros de 70 µm e as células fenotipadas por citometria de fluxo. **(A)** Estratégia de citometria de fluxo para análise de Tregs em amostras de pele e sangue. **(B)** Avaliação da influência da solução enzimática na marcação de CD25 e FOXP3. **(C)** Avaliação da influência da solução enzimática na marcação de CD25 e FOXP3. **(D)** Fenótipo de memória dos Tregs de lesão. **(E)** Frequência de Tregs de memória (CD25^{alto}FOXP3⁺CD45RO⁺) em amostras de pele e sangue. **(F)** Proporção de Tregs por Tconv de memória em lesões de pele e sangue. As frequências foram normalizadas pelo número de CD4⁺. Cada ponto representa um paciente MB. As barras representam as medianas. As frequências foram submetidas ao teste de Mann-Whitney em que * p<0,05.

Aproveitamos o acesso à pele clinicamente normal para realizar alterações na metodologia de dissociação de pele para aumentar o rendimento celular destas amostras. Implementamos o uso de dissociador semiautomático (GentleMACS) para tornar a técnica o mais reprodutível possível. O dissociador possui programas pré-estabelecidos para diversos tecidos, escolhemos os programas fígado, pele, baço e

tumor para serem testados (Fig. 4.12, A). Além disso, avaliamos dois tempos de dissociação enzimática para avaliar a melhor condição de rendimento e viabilidade celular das amostras. Desta forma, extraímos quatro fragmentos de pele (6 mm) de pele da região da mama por condição testada.

Desta vez, fenotipamos mais detalhadamente as células para ter certeza de estar avaliando linfócitos T viáveis nas amostras de pele. Primeiro, identificamos as células individuais, e em seguida a região de leucócitos, isto é, células CD45⁺ (Fig. 4.12, B). Depois, selecionamos a região de linfócitos pelos parâmetros FSC-A e FSC-H do pulso seguido da identificação de linfócitos T (CD3⁺) vivos (células negativas para “LIVE/DEAD”). Por fim, as células CD4⁺ e CD8⁺ foram detectadas tanto nas amostras com dissociação enzimática por 18 horas (Fig. 4.12, C) quanto 3 horas (Fig. 4.12, D). Comparando os dois tempos de dissociação enzimática avaliados, ficou evidente que o maior tempo de ação da enzima (18 horas) gera maior rendimento de linfócitos T. Já, comparando os diversos programas do dissociador e o método original, observamos que o uso do dissociador e do programa para tumores gerou um maior rendimento de linfócitos T CD3⁺, assim como células CD4⁺ e CD8⁺ (Fig. 4.12, E).

Comparando com o método original, nossa técnica com o dissociador e programa para tecidos tumorais resultou na recuperação de quase 2 vezes mais células CD3⁺ vivas que o método original. Quanto à porcentagem de linfócitos T CD4⁺, observamos que o nosso método resultou numa maior frequência de células CD4⁺ (62,5%) que o método original (43,8%). Já a porcentagem de células CD8⁺ foi maior no método original (27,1%) que na nova técnica com o programa tumor (18,1%). Entretanto, não observamos diferenças nos números absolutos de linfócitos T CD8⁺ entre os dois métodos (Original: 1141 células; Tumor: 1418 células). Assim, essa alteração na proporção de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ foi provavelmente devido à maior recuperação de células CD4⁺ utilizando a nova técnica (4895 células) quando comparada com o método original (1841 células).

Realizamos uma segunda alteração para avaliar se a agitação da amostra durante o período de incubação poderia aumentar ainda mais o rendimento celular. Assim, dissociamos dois fragmentos de tecido da região abdominal por biópsia de “punch” de 6 mm (Fig. 4.12, F). Embora tenhamos um rendimento menor que o anterior, observamos um maior número de linfócitos T CD3⁺ totais e células CD4⁺ e CD8⁺ com a implementação da agitação (Fig. 4.12, G). Assim, alteramos o método de dissociação original estabelecido por Sanchez-Rodrigues e incluímos a etapa de

dissociação mecânica semiautomática com o programa para tecidos tumorais após dissociação enzimática por 18 horas com agitação.

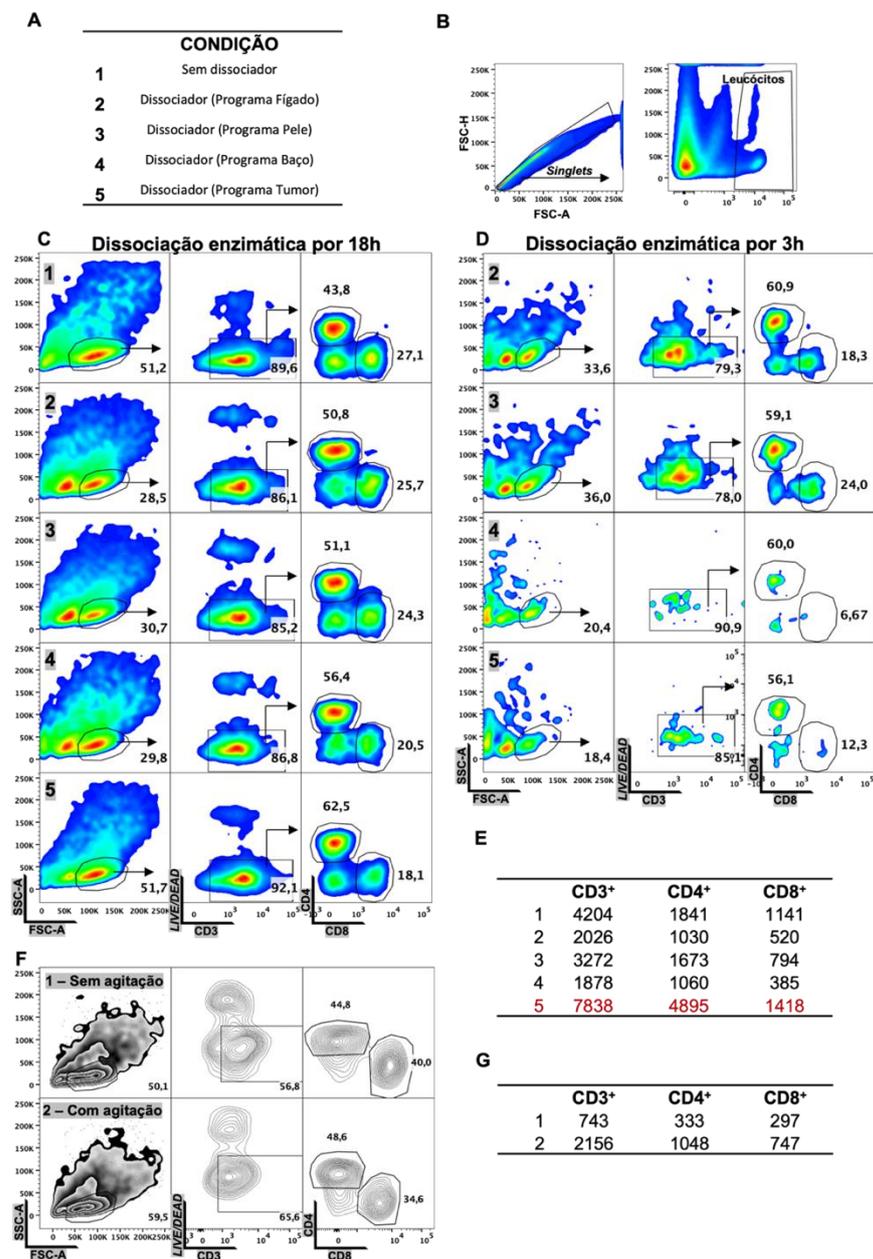


Figura 4.12 - Padronização da técnica de dissociação de pele humana.

Fragmentos de pele obtidos por biópsia de “punch” de 6 mm de tecido clinicamente normal descartado de cirurgia plástica foram submetidos a dissociação sob diversas condições. As células dissociadas foram fenotipadas por citometria de fluxo. **(A)** Condições experimentais avaliadas, incluindo o método original (sem dissociador) e com dissociação semiautomática com os programas pré-estabelecidos do equipamento para tecido de fígado, pele, baço e tumor. **(B)** Estratégia de análise para detecção de leucócitos (CD45⁺) provenientes de pele. Estratégia de citometria de fluxo para avaliação de linfócitos T CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ vivos provenientes de pele nas diversas condições testadas incubadas por 18 horas **(C)** ou 3 horas **(D)** na solução enzimática. **(E)** Número absoluto de linfócitos T CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ nas diversas condições testadas. **(F)** Dissociação sem ou com agitação no período da incubação com solução enzimática por 18 horas. **(G)** Número absoluto de linfócitos T CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ sem ou com agitação na incubação com solução enzimática por 18h seguido de dissociação semiautomática com o programa tumor.

Após o estabelecimento do método de dissociação, conseguimos avaliar os Tregs de quatro doadores, incluindo uma pele normal e três fragmentos de lesões de pele de pacientes (BT, BB e LL). Com exceção da doadora SAE em que foram obtidos

dois fragmentos de pele por biópsia de “punch” de 6 mm, nos demais doadores avaliamos apenas um fragmento de pele da área de lesão de pele. A estratégia de citometria de fluxo utilizada consistiu nas seguintes etapas: (i) identificação de células individuais; (ii) seleção de leucócitos (CD45⁺); (iii) detecção da região de linfócitos pelos parâmetros SSC-A e FSC-A do pulso; (iv) identificação de células CD3⁺ viáveis (negativas para “LIVE/DEAD”); (v) seleção da região de células CD4⁺CD8⁻; (vi) identificação de Tregs pela alta expressão de CD25 e positividade de FOXP3⁺; (vii) detecção do fenótipo de memória dos Tregs. As células CD8⁺ foram utilizadas como controle para a definição da região de Tregs (Fig. 4.13, A).

Aproximadamente 97% dos Tregs de pele expressam CD45RO, enquanto 70% a 95% dos Tregs circulantes expressam este marcador (Fig. 4.13, B). Normalizamos as frequências de Tregs de memória dos doadores pelo número de linfócitos T CD4⁺ para quantificação da população nas amostras. Os resultados a seguir são descritivos já que temos apenas um voluntário de cada grupo.

Avaliamos a frequência de Tregs de memória no sangue comparada com o tecido e observamos maiores frequências na pele (Fig. 4.13, C). Quanto à razão entre Treg_{mem} e Tconv_{mem}, também detectamos maior razão na pele que no sangue (Fig. 4.13, D). Observamos uma maior frequência de Tregs de memória no paciente BT e no paciente LL. O paciente BB e a doadora SAE apresentaram frequências semelhantes (Fig. 13, E).

Observamos uma tendência similar em relação a razão de Treg_{mem} e Tconv_{mem}, tendo os pacientes BT e LL maiores razões (Fig. 13, F). Investigamos também o MFI de FOXP3 nos Tregs de pele para avaliar o nível de expressão do fator de transcrição. Normalizamos os valores através da subtração do MFI de Tconv_{mem} da população de Tregs. O paciente LL apresentou um maior nível de expressão que os demais doadores (Fig. 4.13, G). Por fim, avaliamos a expressão de CD69, marcador de residência tecidual, assim como CD39 e CTLA-4 na lesão do paciente MB (Fig. 4.13, H). Detectamos que os Tregs da pele do paciente são majoritariamente CD69⁺ e expressam as moléculas inibidoras CTLA-4 e CD39.

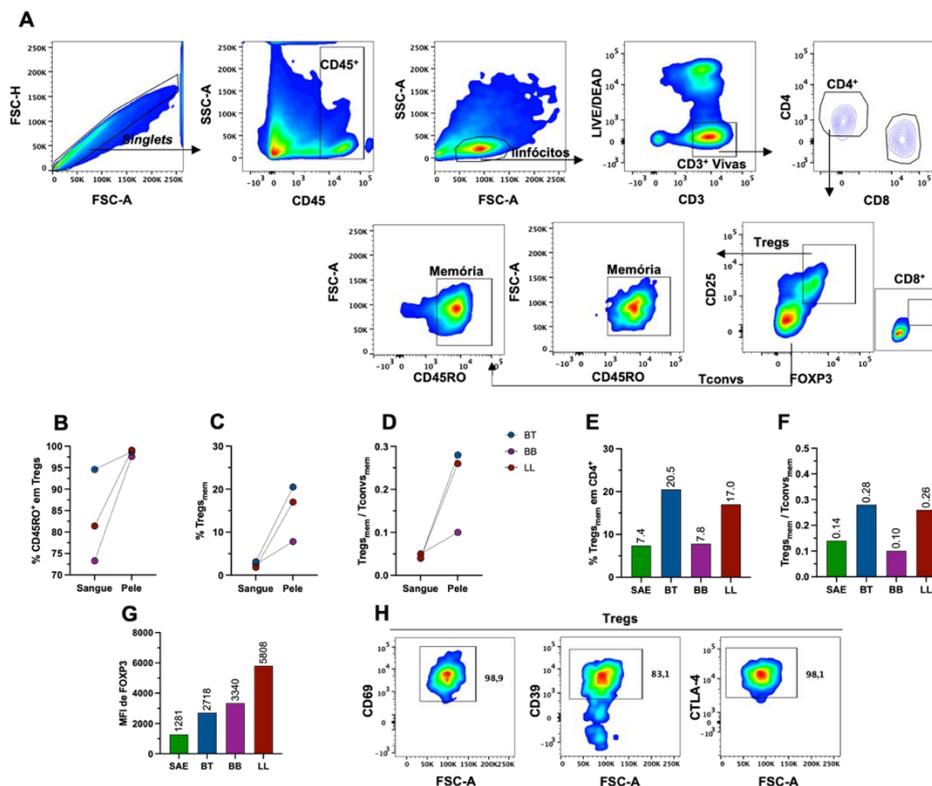


Figura 4.13 – Caracterização de Tregs provenientes de pele humana clinicamente normal e lesão de pacientes com hanseníase.

Fragments de pele clinicamente normal e de áreas de lesões de pacientes de hanseníase foram dissociados mecanicamente e enzimaticamente para obtenção de células em suspensão. **(A)** Gráficos representativos da estratégia de citometria de fluxo para determinação dos Tregs provenientes de pele humana. **(B)** Fenótipo de memória dos Tregs de sangue e pele. **(C)** Frequência de Tregs de memória de sangue e pele. **(D)** Proporção de Tregs e Tconv_{mem} de memória no sangue e pele. **(E)** Frequência de Tregs de memória na pele humana. **(F)** Proporção de Tregs e Tconv_{mem} de memória de pele humana. **(G)** Mediana de intensidade de fluorescência (MFI) de FOXP3 de Tregs de pele humana. Normalizamos os valores do MFI de Tregs através da subtração do MFI da população de Tconv_{mem}. **(H)** Expressão de CD69, CD39 e CTLA-4 pelos Tregs de pele de paciente LL. As frequências foram normalizadas pelo número de CD4⁺. Cada ponto e barra representa um paciente.

Confirmamos a presença de células CD4⁺FOXP3⁺ em lesões de pele através de imunofluorescência de cortes histológicos congelados de quatro pacientes MB. As células CD4⁺FOXP3⁺ foram identificadas por anticorpos específicos para CD4 (amarelo) e FOXP3 (vermelho). Os núcleos das células em azul através da marcação com DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol). Podemos observar a presença de células CD4⁺FOXP3⁺ (seta amarela) no infiltrado inflamatório (Fig. 4.14, A). Na figura 4.14, B podemos identificar duas células CD4⁺FOXP3⁺ (seta amarela) próximas a células CD8⁺ (verde), incluindo uma célula CD8⁺ possivelmente expressando FOXP3 (seta verde).

Desta forma, conseguimos isolar e identificar Tregs provenientes de pele humana por citometria de fluxo e confirmamos a presença de células CD4⁺FOXP3⁺ por microscopia de imunofluorescência.

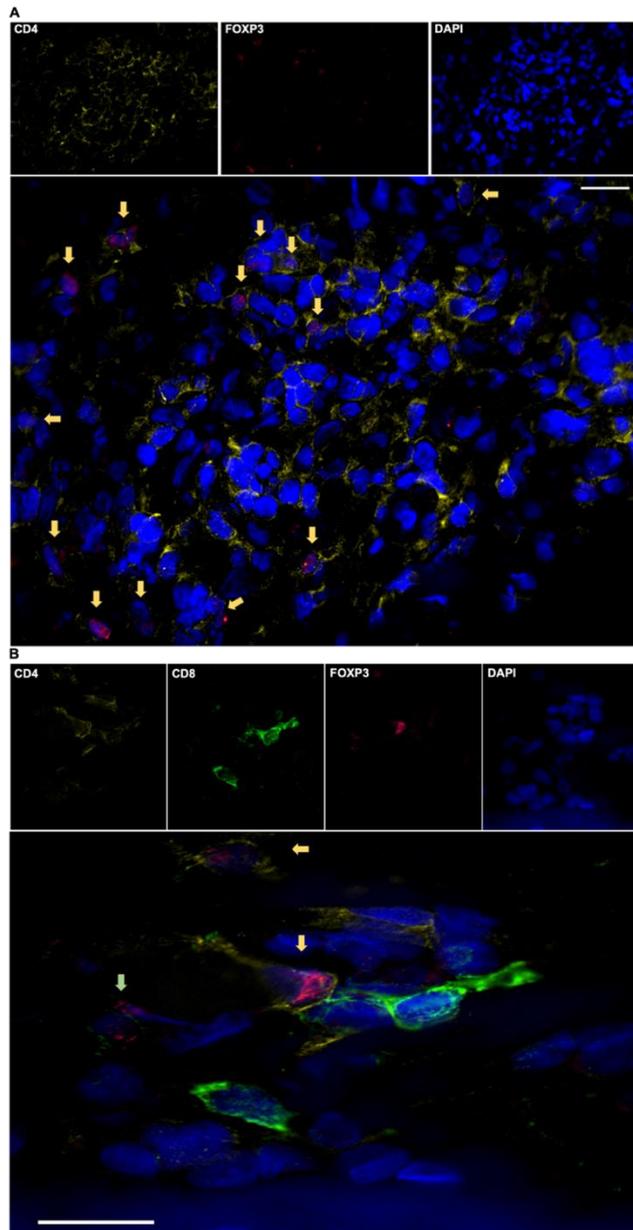


Figura 4.4 – Células CD4⁺FOXP3⁺ em lesões de pele de pacientes multibacilares por imunofluorescência. Cortes histológicos foram marcados com anticorpos específicos para detecção de células CD4⁺FOXP3⁺. **(A)** Marcação individual para CD4 (amarelo), FOXP3 (vermelho) e DAPI (azul). Células CD4⁺FOXP3⁺ (setas) em infiltrado celular de lesão de pele. **(B)** Marcação individual para CD4 (amarelo), CD8 (verde), FOXP3 (vermelho) e DAPI (azul). Células CD4⁺FOXP3⁺ (seta amarela) e células CD8⁺FOXP3⁺ (seta verde) em lesão de pele. Aumento de 630x. Imagens representativas de dois pacientes MB. Barra de escala representa 10 μm.

5 DISCUSSÃO

A anergia celular antígeno-específica é crítica na hanseníase MB e é sugerido que contribua para a doença crônica (179). A baixa atividade dos Tregs pode resultar em imunopatologia e autoimunidade. Por outro lado, sua atividade excessiva pode ser prejudicial para o hospedeiro ao induzir a persistência de patógenos, e consequentemente estabelecimento de infecção crônica (213). Os Tregs já foram associados com infecção crônica de agentes infecciosos como *M. tuberculosis*, *L. major* e vírus da hepatite C (147, 214, 215). Por isso, nós caracterizamos os Tregs totais e *M. leprae*-específicos para esclarecer o papel destas subpopulações na hanseníase. Análise por citometria de fluxo mostrou que a abundância relativa das subpopulações circulantes de Tregs e Tefs tanto em contexto *ex vivo* quanto *M. leprae*-específico está aumentada nos pacientes MB.

Em relação ao compartimento antígeno-específico, foi observado aumento progressivo da razão Tregs / Tefs a partir de doadores SAE até pacientes PB e MB (Fig. 5.1). O grupo SAE apresentou predominância de função efetora em resposta a antígenos de *M. leprae* (razão < 1), enquanto o grupo PB apresentou equilíbrio entre ambas as subpopulações (razão = 1). Por outro lado, o grupo MB apresentou resposta tolerogênica dominante contra o bacilo (razão > 1), isto é, quando a frequência de AgTregs excede a de AgTefs.

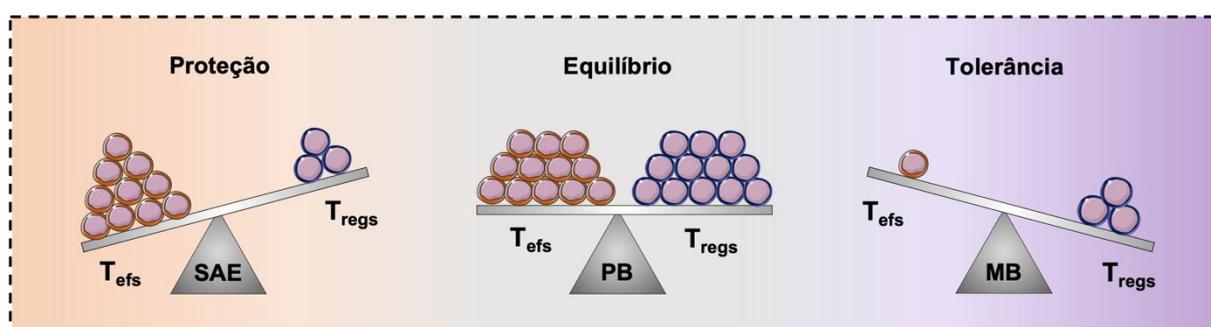


Figura 5.1 – Mudança no balanço entre Tregs e Tefs *M. leprae*-específicos em culturas de curta duração.

A exposição a antígenos exógenos pode afetar o balanço entre Tregs e Tefs antígenos-específicos. O grupo SAE apresenta predomínio de respostas efetoras contra os antígenos do bacilo ($AgTefs / AgTregs < 1$), possivelmente contribuindo para a proteção destes indivíduos contra o *M. leprae*. Por outro lado, nos pacientes com hanseníase ocorrem mudanças no balanço entre as subpopulações antígeno-específicas em direção aos Tregs. O grupo PB apresenta equilíbrio entre as respostas de ambas as subpopulações ($AgTregs / AgTefs = 1$), enquanto o grupo MB apresenta resposta tolerogênica dominante contra os antígenos do bacilo ($AgTregs / AgTefs > 1$) em culturas de curta duração. Tregs, linfócitos T reguladores; Tefs, linfócitos T efetores; SAE, doadores saudáveis de área endêmica; PB, pacientes paucibacilares; MB, pacientes multibacilares.

Su e colaboradores demonstraram que o repertório circulante de Tregs é dinâmico e pode ser alterado pela exposição a antígenos exógenos. Além disso,

mudanças dentro do compartimento de subpopulações antígeno-específicas afetam os níveis de resposta efetora e cronicidade de infecção tanto em modelo murino quanto em seres humanos (216). Desta forma, é possível que mudanças no balanço entre Tregs e Tefs *M. leprae*-específicos em favor dos Tregs como demonstrado neste estudo possa contribuir para a regulação negativa da resposta imune celular específica contra o bacilo, fornecendo condições para o estabelecimento da infecção crônica. É necessário destacar que todos os voluntários do grupo SAE já foram vacinados com BCG, portanto, podem responder aos antígenos do bacilo já que o *M. leprae* compartilha diversos antígenos com alto grau de homologia com o *M. bovis* BCG (206).

Marcadores como CD25 carecem de especificidade e podem ser induzidos independente da ligação de TCR (204). Nestas condições, o grupo PB apresentou predominância de resposta celular efetora após estimulação com sonicado (AgTregs / agTconv < 1). Embora a resposta antígeno-específica nestes pacientes tenda para o equilíbrio entre Tregs e Tefs, outras subpopulações celulares podem ser ativadas (CD4⁺CD25⁺) nestes pacientes e contribuir para a resposta pró-inflamatória contra o bacilo.

Nossos resultados *in vitro* de Tregs divergem de outros estudos em que esta população celular foi detectada em maiores frequências em culturas de CMS provenientes de pacientes MB. Até o momento, os estudos de Tregs na hanseníase focaram nos Tregs totais, incluindo linfócitos que reconhecem diversos antígenos tais como outros patógenos, microbiota, alérgenos, e antígenos próprios (217). Além disso, os autores não incluem marcadores de ativação celular nas análises de citometria de fluxo e utilizam longos períodos de cultura em que proliferação *in vitro* altera proporções previamente existentes (178-180).

Neste estudo, foi observado que a frequência de AgTregs está aumentada nos pacientes PB, o que sugere a expansão de Tregs *M. leprae*-específicos durante a infecção pelo *M. leprae* nestes pacientes. A maioria dos AgTregs apresentaram fenótipo de memória efetora, sugerindo que são linfócitos com capacidade migratória para tecidos periféricos. Em modelo murino de infecção pulmonar, os Tregs influenza-específicos sofrem expansão clonal que reflete de perto a expansão da população de Tefs de memória tanto em relação à cinética quanto à magnitude após um segundo desafio viral, sugerindo que os pTregs de memória são gerados para regular respostas efetoras robustas (218). Em seres humanos, já foi descrito que pacientes com tuberculose ativa apresentam aumento de Tregs antígeno-específicos circulantes. Os

autores propõem que o *M. tuberculosis* além de induzir a inflamação, também induz expansão de Tregs nos pacientes. Além disso, a frequência de Tregs é gradualmente reduzida durante o tratamento com quimioterapia, e está associada a aumento da produção de IFN- γ nestes pacientes (219). Tendo em vista o atual interesse na modulação funcional de Tregs e seu uso terapêutico, seria interessante avaliar se o tratamento com a PQT para hanseníase nestes pacientes reestabelece a frequência de AgTregs circulantes para níveis similares aos de doadores SAE (220). Redução na razão AgTregs / Ag tefs após PQT em pacientes com hanseníase se verificada pode indicar necessidade da presença de *M. leprae* viável no organismo para expansão preferencial da população de AgTregs específicos para antígenos expressos em *M. leprae*.

A baixa frequência de AgTregs no grupo MB pode sugerir retenção tecidual nos locais de infecção na pele, que pode refletir na redução destes linfócitos no sangue destes pacientes. Outras duas possibilidades incluem a dependência dos Tregs pela sinalização de IL-2 (149). A IL-2 é crítica para a geração e manutenção desta população nos tecidos periféricos. Esta citocina é produzida em baixos níveis por CMS de pacientes MB em resposta a antígenos de *M. leprae* (77, 221, 222). Além disso, os Tregs também possuem alta sensibilidade à apoptose e a deficiência de IL-2 reduz a proporção de Tregs na periferia (223, 224). Assim, a baixa produção de IL-2 por linfócitos *M. leprae*-específicos também pode interferir na expansão ou induzir apoptose dos AgTregs nos pacientes MB, reduzindo o número desta população a níveis basais similares ao grupo SAE, porém ainda superiores ao número de AgTefs.

Nós investigamos a função supressora dos AgTregs dos pacientes através da detecção de moléculas inibidoras expressas por Tregs. Embora nosso estudo não tenha estabelecido que os AgTregs exerçam supressão *in vitro* à proliferação de Tefs, os Tregs *M. leprae*-específicos dos pacientes apresentaram fenótipo de células ativadas, expressando moléculas inibidoras associadas com a atividade reguladora. Nossos resultados mostraram que as vias de supressão, principalmente CD39 e CTLA-4 podem estar envolvidas na imunossupressão da resposta celular ao *M. leprae* nestes pacientes. Além disso, os AgTregs apresentaram perfil multifuncional, podendo expressar simultaneamente moléculas associadas a mais de uma via de supressão. Já foi descrito em modelo murino para tuberculose que a transferência adoptiva de um pequeno número de Tregs antígeno-específicos é capaz de prejudicar a proteção imune ao retardar o ativação de Tefs nos gânglios linfáticos pulmonares e seu subsequente acúmulo no pulmão, local primário da infecção (225). Assim, mesmo em

menores números, os AgTregs de pacientes MB podem contribuir para a supressão de Tefs na doença.

As nossas análises por citometria de fluxo também evidenciaram que a resposta efetora mediada por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ foi reduzida nos pacientes MB. Nossos resultados são corroborados por diversos estudos que demonstram que pacientes MB possuem baixa função efetora em ensaios *in vitro* e *in vivo* (32, 33, 35, 226). Os Tefs de doadores SAE e pacientes MB apresentaram principalmente fenótipo de memória central, enquanto pacientes PB apresentaram uma proporção similar entre linfócitos com fenótipo de memória central e efetora. A mudança na proporção de T_{MC} e T_{ME} pode indicar que os linfócitos T_{MC} respondedores aos antígenos de *M. leprae* estão se diferenciando mais frequentemente em células T_{ME}. Outra possibilidade é a expansão de linfócitos T_{ME}, o que resultaria na alteração da proporção entre as duas subpopulações.

Quanto à resposta efetora mediada por linfócitos T CD8⁺ respondedores, o grupo MB também apresentou menor capacidade de ativação por apresentação cruzada. Carvalho e colaboradores demonstraram que contatos de pacientes com hanseníase apresentam aumento significativo das frequências de linfócitos CD8⁺CD69⁺ após o tratamento do caso índice, sugerindo o envolvimento da resposta celular CD8⁺ na proteção destes indivíduos contra a infecção (206). Assim, a resposta mediada por linfócitos CD8⁺ no grupo PB pode contribuir para desviar o balanço entre função efetora e reguladora em direção a resposta imune pró-inflamatória contra o *M. leprae* nestes pacientes.

Recente, foi descrito que Tconvs podem desenvolver resistência à supressão por Tregs. Este fenômeno foi descrito primeiramente em modelos murinos de doenças autoimunes e confirmado recentemente em seres humanos (227, 228). Os Tregs do sangue periférico de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e diabetes do tipo 1 são fenotipicamente e funcionalmente normais, entretanto os Tconvs resistem à supressão por Tregs autólogos e alogênêicos (229, 230). Além disso, a comparação entre pacientes e indivíduos pré-diabéticos em risco evidenciou que apenas os Tconvs de pacientes exibem a resistência aos Tregs, sugerindo que este fenômeno é provavelmente estabelecido em estágios posteriores da patogênese da doença (230). É possível que os Tefs de pacientes PB desenvolvam esta resistência aos Tregs devido ao longo período de evolução da doença.

Para uma avaliação mais geral do estado imune dos doadores, investigamos as subpopulações totais de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ no sangue periférico. O grupo

MB apresentou uma tendência de maior frequência de Tregs e Tregs_{mem} em condições *ex vivo*. Esta observação é corroborada por Chaves e colaboradores que detectaram maiores frequências de Tregs totais (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) no sangue periférico de pacientes MB quando comparadas com controles saudáveis (184). Por outro lado, Attia e colaboradores mostraram maiores frequências de Tregs em pacientes com a forma TT (181, 182). Entretanto, este segundo trabalho caracterizou os Tregs apenas pela alta expressão de CD25 (CD4⁺CD25^{alto}), sendo altamente variável e resultando na superestimação da população já que Tconvs ativados também expressam esta molécula. O uso de FOXP3 como marcador da população reduz esta variação, gerando quantificações mais confiáveis (183).

Diferenças nas subpopulações CD4⁺ (Tregs e Tconvs) com fenótipo T_{MC}, T_{ME}, T_V e T_{EDT} só foram observadas para Tregs com fenótipo T_V entre o grupo SAE e MB. Isto pode ser consequência da diferença de idade entre os dois grupos, ou aumento relativo do compartimento de memória em doenças inflamatórias crônicas. Diversos estudos já mostraram que ocorre diminuição progressiva dos Tregs CD45RA⁺ no sangue periférico com a idade, acompanhada por um aumento recíproco nas células Tregs CD45RO⁺ (231-233). A redução da frequência de linfócitos T CD8⁺ com fenótipo T_{ME} apresentada pelo grupo MB pode indicar alterações na composição *ex vivo* de linfócitos CD8⁺ associadas com a infecção pelo *M. leprae*.

Nós também investigamos as subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ acordo com a expressão de receptores de quimiocinas (CXCR3, CCR4 e CCR6). Embora não tenham sido observadas diferenças entre as frequências de Tregs e Tconvs de memória totais e do tipo TH1, TH9, CXCR3⁺TH2 e CXCR3⁺TH17, o grupo MB apresentou aumento da razão de Tregs / Tefs para essas subpopulações. Isto demonstra que o balanço entre as subpopulações circulantes totais já tende em direção aos Tregs no grupo MB. De maneira interessante, este aumento foi relacionado às subpopulações que expressam CXCR3. Desta forma, nossos resultados sugerem a relevância da avaliação da abundância relativa das subpopulações de Tregs e Tefs para o estudo de regulação imune humana.

Um estudo *in vivo* de resposta de memória cutânea após teste tuberculínico na pele mostrou que assim como os Tregs do sangue periférico, os Tregs recuperados da pele também apresentam altos níveis de CCR4, sugerindo que estas células podem ser recrutadas do sangue para a pele (236). Por isso, também analisamos as frequências das subpopulações TH1, TH2, TH17 e TH1/TH17 com padrões migratórios (CCR4⁺) para tecidos periféricos dentre todos os Tregs ou todos os Tefs.

Koch e colaboradores demonstraram que o fator de transcrição T-BET é induzido em Tregs pelo IFN- γ durante inflamação do tipo TH1 em modelo murino para tuberculose. Essa expressão resulta em um enriquecimento de Tregs T-BET⁺CXCR3⁺ no tecido que é necessária para o controle das respostas de linfócitos TH1 durante a infecção pelo *M. tuberculosis* (237). As subpopulações não clássicas CXCR3⁺TH2 e CXCR3⁺TH17 foram recentemente descritas no sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide (108). Tregs do tipo TH2 estão mais presentes em tumores da pele e do cólon que na circulação (201). Além disso, pacientes com artrite reumatoide também possuem maiores proporções de linfócitos TH1 e CXCR3⁺TH2 no fluido sinovial que no sangue (109). Assim, a redução das subpopulações CXCR3⁺CCR4⁺ dentre os Tregs e Tconvs pode ser reflexo da migração destas subpopulações para os sítios de infecção pelo *M. leprae*.

Neste estudo investigamos a composição *ex vivo* da população circulante de linfócitos T CD8⁺ com padrões migratórios para sítios de inflamação do tipo TH1 (CXCR3⁺). Embora outras populações celulares, incluindo células NK possam expressar CD8 (238), é provável que as células fenotipadas neste trabalho sejam majoritariamente linfócitos T. A expressão de CXCR3 é associada a linfócitos T citotóxicos e produtores de IFN- γ (207, 208). Além disso, é sugerido que este receptor possa ser usado como marcador para prever eficácia de respostas de linfócitos T CD8⁺ de memória, visto que é expresso em altos níveis mesmo após a resolução da resposta inflamatória (209).

Embora as frequências de linfócitos T CD8⁺ circulantes sejam similares nos pacientes de hanseníase, o grupo MB apresenta células disfuncionais com fenótipo supressor e produção de citocinas anti-inflamatórias nas lesões de pele e *in vitro* após estimulação de CMS com antígenos de *M. leprae* (77, 239). Além disso, sabe-se que os linfócitos T CD8⁺ de lesões de pele de pacientes MB possuem perfil transcricional associado a exaustão (81). A perda de expressão de CXCR3 é associada a linfócitos T CD8⁺ exaustos tanto durante modelos de infecção viral crônica quanto após múltiplos desafios antigênicos *in vitro* (240, 241). Assim, é possível que a baixa expressão de CXCR3 detectada no grupo MB seja um indicador de que as células CD8⁺ nestes pacientes estejam exaustas devido à infecção crônica pelo *M. leprae* (64, 77).

A diversidade de subpopulações de linfócitos T de memória no sangue periférico mostra apenas uma pequena fração da complexidade total da distribuição dessas células em todo o corpo. Estima-se que o número de linfócitos T nos tecidos

humanos sejam de 2×10^{10} na pele, 1×10^{10} nos pulmões, 3×10^{10} no intestino e 20×10^{10} em tecidos linfoides. Deste modo, o sangue representa apenas de 2 a 2,5% do total de linfócitos T do indivíduo (64). Como os principais eventos da regulação imune contra o *M. leprae* ocorrem na pele, torna-se indispensável a caracterização dos Tregs presentes nas lesões de pele de pacientes para esclarecer a participação destas células na supressão da resposta efetora na doença. Devido à dificuldade em se obter amostras de tecidos e número adequado de células viáveis de tecido em seres humanos, os estudos de Tregs em lesões de peles de pacientes são predominantemente trabalhos de imuno-histoquímica (178).

Identificamos e caracterizamos Tregs viáveis de pele humana por citometria de fluxo após a padronização da técnica. Observamos que os Tregs das áreas de lesão apresentaram fenótipo de memória, ou seja, linfócitos com experiência antigênica. Também detectamos maior frequência e razão $Treg_{mem}/Tconv_{mem}$ no tecido que no sangue periférico. A avaliação do MFI de FOXP3 evidenciou aumento progressivo do nível de expressão deste fator de transcrição com o aumento da carga bacilar dos pacientes. Já foi descrito em modelo murino que o nível de expressão de FOXP3 está diretamente associado ao potencial das Tregs em prevenir a rejeição de aloenxertos e suprimir da ativação de Tefs (242). Assim, continuaremos com o recrutamento de doadores para esclarecer o papel dos Tregs nas lesões de pele de pacientes com hanseníase.

6 CONCLUSÕES

Este estudo teve como objetivo a caracterização de Tregs e Tefs de pacientes com diferentes formas clínicas de hanseníase. Avaliamos tanto as células sanguíneas em condições *ex vivo* para uma visão imunológica mais geral dos doadores, assim como *in vitro* após estimulação com antígenos de *M. leprae* para determinar o estado imune específico contra o bacilo. A atividade supressora dos Tregs foi avaliada a partir da expressão de moléculas inibidoras sabidamente expressas por Tregs com fenótipo ativado. Esperamos que este trabalho contribua tanto para o maior entendimento de mecanismos de regulação da resposta imune humana quanto para o esclarecimento do papel dos Tregs na patogênese e evolução da hanseníase.

1. Demonstramos que a abundância relativa das subpopulações circulantes de Tregs e Tefs antígeno-específicas está aumentada nos pacientes MB de hanseníase, sendo compatível com resposta tolerogênica dominante contra o bacilo ($\text{AgTregs} / \text{AgTefs} > 1$).
2. O grupo PB apresentou maior frequência de AgTregs, sugerindo que estes linfócitos T se expandem em resposta à infecção pelo *M. leprae* nestes pacientes. Os AgTregs apresentaram majoritariamente um perfil de memória efetora.
3. A resposta efetora CD4^+ , medida pela frequência de AgTefs, foi reduzida nos pacientes MB. As frequências das subpopulações de AgTefs com fenótipos T_{ME} e T_{MC} também foram menores em pacientes MB.
4. O uso de marcador de ativação não específico (CD25) para T_{conv} s evidenciou que nestas condições os pacientes PB apresentam predominância de resposta celular efetora contra o sonicado de *M. leprae* (razão < 1).
5. Os AgTregs de pacientes PB e MB expressaram moléculas inibidoras associadas a função supressora de Tregs, sugerindo possíveis vias para a função supressora destas células. CTLA-4 e CD39 foram os marcadores mais expressos pelos AgTregs. Além disso, os AgTregs podem apresentar perfil

multifuncional, isto é, expressar simultaneamente marcadores de mais de uma via de supressão.

6. Detectamos aumento *ex vivo* da razão de Tregs / Tefs do tipo TH1, TH9, CXCR3⁺TH2 e CXCR3⁺TH17 circulantes nos pacientes MB, sugerindo uma mudança no padrão de resposta destes pacientes.
7. O grupo MB apresentou redução de subpopulações TH1, TH17 e TH1/TH17 com padrões migratórios para tecidos periféricos (CCR4⁺) dentre todos os Tregs ou todos os Tconvs.
8. A resposta efetora CD8⁺, medida pela frequência de linfócitos T CD8⁺ respondedores, foi reduzida no grupo MB, sugerindo menor apresentação cruzada e ativação nestes pacientes.
9. Identificamos Tregs com fenótipo de memória em lesões de pele de pacientes por citometria de fluxo. Além disso, confirmamos a presença de células CD4⁺FOXP3⁺ na pele por microscopia de imunofluorescência.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization = Organisation mondiale de la S. Weekly Epidemiological Record, 2021, vol. 96, 36 [full issue]. Weekly Epidemiological Record = Relevé épidémiologique hebdomadaire. 2021;96(36):421-44.
2. Robbins G, Tripathy VM, Misra VN, Mohanty RK, Shinde VS, Gray KM, et al. Ancient skeletal evidence for leprosy in India (2000 B.C.). PLoS One. 2009;4(5):e5669.
3. Ghosh S, Chaudhuri S. Chronicles of Gerhard-Henrik Armauer Hansen's Life and Work. Indian J Dermatol. 2015;60(3):219-21.
4. Lázaro FP, Werneck RI, Mackert CC, Cobat A, Prevedello FC, Pimentel RP, et al. A major gene controls leprosy susceptibility in a hyperendemic isolated population from north of Brazil. J Infect Dis. 2010;201(10):1598-605.
5. Britton WJ, Lockwood DN. Leprosy. Lancet. 2004;363(9416):1209-19.
6. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. Clin Microbiol Rev. 2006;19(2):338-81.
7. Han XY, Sizer KC, Thompson EJ, Kabanja J, Li J, Hu P, et al. Comparative sequence analysis of Mycobacterium leprae and the new leprosy-causing Mycobacterium lepromatosis. J Bacteriol. 2009;191(19):6067-74.
8. Han XY, Zhang J, Li L. Leprosy Agents Mycobacterium lepromatosis and Mycobacterium leprae in Mexico: a Clarification. J Clin Microbiol. 2015;53(10):3387-8.
9. Han XY, Aung FM, Choon SE, Werner B. Analysis of the leprosy agents Mycobacterium leprae and Mycobacterium lepromatosis in four countries. Am J Clin Pathol. 2014;142(4):524-32.
10. Smith WC, van Brakel W, Gillis T, Saunderson P, Richardus JH. The missing millions: a threat to the elimination of leprosy. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9(4):e0003658.
11. Patrocínio LG, Goulart IM, Goulart LR, Patrocínio JA, Ferreira FR, Fleury RN. Detection of Mycobacterium leprae in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. FEMS Immunol Med Microbiol. 2005;44(3):311-6.
12. de Wit MY, Douglas JT, McFadden J, Klatser PR. Polymerase chain reaction for detection of Mycobacterium leprae in nasal swab specimens. J Clin Microbiol. 1993;31(3):502-6.
13. McDougall AC, Rees RJ, Weddell AG, Kanan MW. The histopathology of lepromatous leprosy in the nose. J Pathol. 1975;115(4):215-26.
14. Job CK, Jayakumar J, Kearney M, Gillis TP. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. Am J Trop Med Hyg. 2008;78(3):518-21.
15. Araujo S, Freitas LO, Goulart LR, Goulart IM. Molecular Evidence for the Aerial Route of Infection of Mycobacterium leprae and the Role of Asymptomatic Carriers in the Persistence of Leprosy. Clin Infect Dis. 2016;63(11):1412-20.
16. Davey TF, Rees RJ. The nasal discharge in leprosy: clinical and bacteriological aspects. Lepr Rev. 1974;45(2):121-34.
17. Alter A, Alcaïs A, Abel L, Schurr E. Leprosy as a genetic model for susceptibility to common infectious diseases. Hum Genet. 2008;123(3):227-35.
18. 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):310-26.
19. Truman R, Fine PE. 'Environmental' sources of Mycobacterium leprae: issues and evidence. Lepr Rev. 2010;81(2):89-95.
20. Ploemacher T, Faber WR, Menke H, Rutten V, Pieters T. Reservoirs and transmission routes of leprosy; A systematic review. PLoS Negl Trop Dis. 2020;14(4):e0008276.

21. Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde, Departamento de Atenção Básica. Guia para o Controle da Hanseníase. Biblioteca Virtual em Saúde MS2002. Available from: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_de_hanseniase.pdf.
22. Leprosy WHOECO, World Health O. WHO Expert Committee on Leprosy : seventh report. Geneva: World Health Organization; 1998.
23. Lastória JC, Abreu MA. Leprosy: a review of laboratory and therapeutic aspects--part 2. An Bras Dermatol. 2014;89(3):389-401.
24. Ministério da Saúde. SUS avança no tratamento de pessoas com hanseníase. www.gov.br/2021.
25. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico Especial de Hanseníase. In: Saúde SdVe, editor. <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/especiais/2021/boletim-hanseniase--25-01.pdf/view2021>.
26. 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):1007-11.
27. Chavarro-Portillo B, Soto CY, Guerrero MI. Mycobacterium leprae's evolution and environmental adaptation. Acta Trop. 2019;197:105041.
28. Lastória JC, Abreu MA. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - part 1. An Bras Dermatol. 2014;89(2):205-18.
29. Truman RW, Krahenbuhl JL. Viable M. leprae as a research reagent. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 2001;69(1):1-12.
30. Walsh GP, Meyers WM, Binford CH, Gormus BJ, Baskin GB, Wolf RH, et al. Leprosy as a zoonosis: an update. Acta Leprol. 1988;6(1):51-60.
31. Vissa VD, Brennan PJ. The genome of Mycobacterium leprae: a minimal mycobacterial gene set. Genome Biol. 2001;2(8):Reviews1023.
32. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association. 1966;34(3):255-73.
33. Martins MV, Guimarães MM, Spencer JS, Hacker MA, Costa LS, Carvalho FM, et al. Pathogen-specific epitopes as epidemiological tools for defining the magnitude of Mycobacterium leprae transmission in areas endemic for leprosy. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(4):e1616.
34. Dharmendra. The lepromin test; a review. Lepr Rev. 1947;18(4):92-126.
35. Nogueira N, Kaplan G, Levy E, Sarno EN, Kushner P, Granelli-Piperno A, et al. Defective gamma interferon production in leprosy. Reversal with antigen and interleukin 2. J Exp Med. 1983;158(6):2165-70.
36. Massone C, Belachew WA, Schettini A. Histopathology of the lepromatous skin biopsy. Clin Dermatol. 2015;33(1):38-45.
37. Shetty VP, Rambhia KD, Khopkar US. Descriptive Pathology of Nerves in Leprosy. 2017. International Textbook of Leprosy. Available from: <https://internationaltextbookofleprosy.org/chapter/descriptive-pathology-nerves-leprosy>.
38. Lastória JC, Abreu MAMMd. Leprosy: a review of laboratory and therapeutic aspects--part 2. Anais brasileiros de dermatologia. 2014;89(3):389-401.
39. Shetty VP, Rambhia KD, Khopkar US. International Textbook of Leprosy. International Textbook of Leprosy: American Leprosy Missions; 2019. Available from: <https://internationaltextbookofleprosy.org/chapter/descriptive-pathology-nerves-leprosy>.
40. Kumar DP, Uprety S, Dogra S. Clinical Diagnosis of Leprosy . 2017. International Textbook of Leprosy. Available from: <https://internationaltextbookofleprosy.org/chapter/diagnosis-leprosy>.
41. Weiss DI, Do TH, de Andrade Silva BJ, Teles RMB, Andrade PR, Ochoa MT, et al. Adaptive immune response in leprosy. 2020. International textbook of leprosy. Available from: <https://internationaltextbookofleprosy.org/chapter/adaptive-immunity>.

42. Pennock ND, White JT, Cross EW, Cheney EE, Tamburini BA, Kedl RM. T cell responses: naive to memory and everything in between. *Adv Physiol Educ.* 2013;37(4):273-83.
43. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol.* 2011;30(1):16-34.
44. Pinheiro RO, Schmitz V, Silva BJA, Dias AA, de Souza BJ, de Mattos Barbosa MG, et al. Innate Immune Responses in Leprosy. *Front Immunol.* 2018;9:518.
45. van Panhuys N. TCR Signal Strength Alters T–DC Activation and Interaction Times and Directs the Outcome of Differentiation. *Front Immunol.* 2016;7.
46. Hunger RE, Sieling PA, Ochoa MT, Sugaya M, Burdick AE, Rea TH, et al. Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells. *J Clin Invest.* 2004;113(5):701-8.
47. Yang D, Shui T, Miranda JW, Gilson DJ, Song Z, Chen J, et al. Mycobacterium leprae-Infected Macrophages Preferentially Primed Regulatory T Cell Responses and Was Associated with Lepromatous Leprosy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(1):e0004335.
48. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(12):984-93.
49. Sieling PA, Modlin RL. T cell and cytokine patterns in leprosy skin lesions. *Springer Semin Immunopathol.* 1992;13(3-4):413-26.
50. Kiszewski AE, Becerril E, Baquera J, Ruiz-Maldonado R, Hernández Pando R. Expression of cyclooxygenase type 2 in lepromatous and tuberculoid leprosy lesions. *Br J Dermatol.* 2003;148(4):795-8.
51. Sieling PA, Jullien D, Dahlem M, Tedder TF, Rea TH, Modlin RL, et al. CD1 expression by dendritic cells in human leprosy lesions: correlation with effective host immunity. *J Immunol.* 1999;162(3):1851-8.
52. Hirai KE, Aarão TL, Silva LM, de Sousa JR, de Souza J, Dias LB, Jr., et al. Langerhans cells (CD1a and CD207), dermal dendrocytes (FXIIIa) and plasmacytoid dendritic cells (CD123) in skin lesions of leprosy patients. *Microb Pathog.* 2016;91:18-25.
53. Fachin LR, Soares CT, Belone AF, Trombone AP, Rosa PS, Guidella CC, et al. Immunohistochemical assessment of cell populations in leprosy-spectrum lesions and reactional forms. *Histol Histopathol.* 2017;32(4):385-96.
54. Bleharski JR, Li H, Meinken C, Graeber TG, Ochoa MT, Yamamura M, et al. Use of genetic profiling in leprosy to discriminate clinical forms of the disease. *Science.* 2003;301(5639):1527-30.
55. Lee DJ, Sieling PA, Ochoa MT, Krutzik SR, Guo B, Hernandez M, et al. LILRA2 activation inhibits dendritic cell differentiation and antigen presentation to T cells. *J Immunol.* 2007;179(12):8128-36.
56. de Souza Sales J, Lara FA, Amadeu TP, de Oliveira Fulco T, da Costa Nery JA, Sampaio EP, et al. The role of indoleamine 2, 3-dioxygenase in lepromatous leprosy immunosuppression. *Clin Exp Immunol.* 2011;165(2):251-63.
57. Schlienger K, Uyemura K, Jullien D, Sieling PA, Rea TH, Linsley PS, et al. B7-1, but not CD28, is crucial for the maintenance of the CD4+ T cell responses in human leprosy. *J Immunol.* 1998;161(5):2407-13.
58. Hashimoto K, Maeda Y, Kimura H, Suzuki K, Masuda A, Matsuoka M, et al. Mycobacterium leprae infection in monocyte-derived dendritic cells and its influence on antigen-presenting function. *Infection and immunity.* 2002;70(9):5167-76.
59. Braga AF, Moretto DF, Gigliotti P, Peruchi M, Vilani-Moreno FR, Campanelli AP, et al. Activation and cytokine profile of monocyte derived dendritic cells in leprosy: in vitro stimulation by sonicated Mycobacterium leprae induces decreased level of IL-12p70 in lepromatous leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110(5):655-61.
60. de Winde CM, Munday C, Acton SE. Molecular mechanisms of dendritic cell migration in immunity and cancer. *Med Microbiol Immunol.* 2020;209(4):515-29.

61. Batista FD, Harwood NE. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(1):15-27.
62. Wong P, Pamer EG. CD8 T cell responses to infectious pathogens. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:29-70.
63. Reis e Sousa C. Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin Immunol.* 2004;16(1):27-34.
64. Farber DL, Yudanin NA, Restifo NP. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(1):24-35.
65. Masopust D, Schenkel JM. The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(5):309-20.
66. Strobl J, Gail LM, Kleissl L, Pandey RV, Smejkal V, Huber J, et al. Human resident memory T cells exit the skin and mediate systemic Th2-driven inflammation. *J Exp Med.* 2021;218(11).
67. Szabo PA, Miron M, Farber DL. Location, location, location: Tissue resident memory T cells in mice and humans. *Sci Immunol.* 2019;4(34).
68. Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P, Becker JC. Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol.* 2006;126(1):32-41.
69. Groom JR, Luster AD. CXCR3 in T cell function. *Exp Cell Res.* 2011;317(5):620-31.
70. Lalvani A, Brookes R, Wilkinson RJ, Malin AS, Pathan AA, Andersen P, et al. Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8+ T lymphocytes specific for Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(1):270-5.
71. Chen CY, Huang D, Wang RC, Shen L, Zeng G, Yao S, et al. A critical role for CD8 T cells in a nonhuman primate model of tuberculosis. *PLoS pathogens.* 2009;5(4):e1000392-e.
72. Bhat P, Leggatt G, Waterhouse N, Frazer IH. Interferon- γ derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity. *Cell Death Dis.* 2017;8(6):e2836.
73. Siegel JP. Effects of interferon-gamma on the activation of human T lymphocytes. *Cell Immunol.* 1988;111(2):461-72.
74. Steinhoff U, Kaufmann SH. Specific lysis by CD8+ T cells of Schwann cells expressing Mycobacterium leprae antigens. *Eur J Immunol.* 1988;18(6):969-72.
75. Kimura H, Maeda Y, Takeshita F, Takaoka LE, Matsuoka M, Makino M. Upregulation of T-cell-stimulating activity of mycobacteria-infected macrophages. *Scand J Immunol.* 2004;60(3):278-86.
76. Balin SJ, Pellegrini M, Klechevsky E, Won ST, Weiss DI, Choi AW, et al. Human antimicrobial cytotoxic T lymphocytes, defined by NK receptors and antimicrobial proteins, kill intracellular bacteria. *Sci Immunol.* 2018;3(26).
77. Salgame P, Abrams JS, Clayberger C, Goldstein H, Convit J, Modlin RL, et al. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science.* 1991;254(5029):279-82.
78. Modlin RL, Melancon-Kaplan J, Young SM, Pirmez C, Kino H, Convit J, et al. Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(4):1213-7.
79. Sieling PA, Abrams JS, Yamamura M, Salgame P, Bloom BR, Rea TH, et al. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. In vitro modulation of T cell responses in leprosy. *J Immunol.* 1993;150(12):5501-10.
80. Modlin RL, Mehra V, Wong L, Fujimiya Y, Chang WC, Horwitz DA, et al. Suppressor T lymphocytes from lepromatous leprosy skin lesions. *J Immunol.* 1986;137(9):2831-4.
81. Mi Z, Wang Z, Xue X, Liu T, Wang C, Sun L, et al. The immune-suppressive landscape in lepromatous leprosy revealed by single-cell RNA sequencing. *Cell Discov.* 2022;8(1):2.
82. de Sousa JR, Sotto MN, Simões 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.

83. Green AM, Difazio R, Flynn JL. IFN- γ from CD4 T cells is essential for host survival and enhances CD8 T cell function during Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol.* 2013;190(1):270-7.
84. Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med.* 1993;178(6):2243-7.
85. Wang ZE, Reiner SL, Zheng S, Dalton DK, Locksley RM. CD4⁺ effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma-deficient mice infected with *Leishmania major*. *The Journal of experimental medicine.* 1994;179(4):1367-71.
86. Swihart K, Fruth U, Messmer N, Hug K, Behin R, Huang S, et al. Mice from a genetically resistant background lacking the interferon gamma receptor are susceptible to infection with *Leishmania major* but mount a polarized T helper cell 1-type CD4⁺ T cell response. *J Exp Med.* 1995;181(3):961-71.
87. Mogue T, Goodrich ME, Ryan L, LaCourse R, North RJ. The relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of airborne Mycobacterium tuberculosis infection in mice. *The Journal of experimental medicine.* 2001;193(3):271-80.
88. Spellberg B, Edwards JE, Jr. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis.* 2001;32(1):76-102.
89. Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, et al. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science.* 1991;254(5029):277-9.
90. Upadhyay R, Dua B, Sharma B, Natrajan M, Jain AK, Kithiganahalli Narayanaswamy B, et al. Transcription factors STAT-4, STAT-6 and CREB regulate Th1/Th2 response in leprosy patients: effect of *M. leprae* antigens. *BMC Infect Dis.* 2019;19(1):52.
91. Wynn TA, Chawla A Fau - Pollard JW, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. (1476-4687 (Electronic)).
92. Kibbie J, Teles RM, Wang Z, Hong P, Montoya D, Krutzik S, et al. Jagged1 Instructs Macrophage Differentiation in Leprosy. *PLoS Pathog.* 2016;12(8):e1005808.
93. 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):343-53.
94. Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science.* 2006;311(5768):1770-3.
95. de Toledo-Pinto TG, Ferreira AB, Ribeiro-Alves M, Rodrigues LS, Batista-Silva LR, Silva BJ, et al. STING-Dependent 2'-5' Oligoadenylate Synthetase-Like Production Is Required for Intracellular Mycobacterium leprae Survival. *J Infect Dis.* 2016;214(2):311-20.
96. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine.* 2005;201(2):233-40.
97. Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease. *Immunological reviews.* 2008;223:87-113.
98. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol.* 2007;8(9):950-7.
99. Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat Rev Drug Discov.* 2012;11(10):763-76.
100. Curtis MM, Way SS. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology.* 2009;126(2):177-85.
101. Pitta MGR, Romano A, Cabantous S, Henri S, Hammad A, Kouriba B, et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. *J Clin Invest.* 2009;119(8):2379-87.

102. Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4⁺ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. *Nat Immunol.* 2007;8(4):369-77.
103. Abromson-Leeman S, Bronson RT, Dorf ME. Encephalitogenic T cells that stably express both T-bet and ROR gamma t consistently produce IFN γ but have a spectrum of IL-17 profiles. *J Neuroimmunol.* 2009;215(1-2):10-24.
104. Shi G, Cox CA, Vistica BP, Tan C, Wawrousek EF, Gery I. Phenotype switching by inflammation-inducing polarized Th17 cells, but not by Th1 cells. *J Immunol.* 2008;181(10):7205-13.
105. Boniface K, Blumenschein WM, Brovont-Porth K, McGeachy MJ, Basham B, Desai B, et al. Human Th17 cells comprise heterogeneous subsets including IFN- γ -producing cells with distinct properties from the Th1 lineage. *J Immunol.* 2010;185(1):679-87.
106. Paulissen SM, van Hamburg JP, Davelaar N, Vroman H, Hazes JM, de Jong PH, et al. CCR6(+) Th cell populations distinguish ACPA positive from ACPA negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2015;17:344.
107. Mony JT, Khoroshi R, Owens T. Chemokine receptor expression by inflammatory T cells in EAE. *Frontiers in Cellular Neuroscience.* 2014;8.
108. Pandya JM, Lundell AC, Hallström M, Andersson K, Nordström I, Rudin A. Circulating T helper and T regulatory subsets in untreated early rheumatoid arthritis and healthy control subjects. *J Leukoc Biol.* 2016;100(4):823-33.
109. Aldridge J, Ekwall AH, Mark L, Bergström B, Andersson K, Gjertsson I, et al. T helper cells in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis primarily have a Th1 and a CXCR3(+)/Th2 phenotype. *Arthritis Res Ther.* 2020;22(1):245.
110. Abdallah M, Emam H, Attia E, Hussein J, Mohamed N. Estimation of serum level of interleukin-17 and interleukin-4 in leprosy, towards more understanding of leprosy immunopathogenesis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2013;79(6):772-6.
111. Sadhu S, Khaitan BK, Joshi B, Sengupta U, Nautiyal AK, Mitra DK. Reciprocity between Regulatory T Cells and Th17 Cells: Relevance to Polarized Immunity in Leprosy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(1):e0004338.
112. Saini C, Ramesh V, Nath I. CD4⁺ Th17 cells discriminate clinical types and constitute a third subset of non Th1, Non Th2 T cells in human leprosy. *PLoS neglected tropical diseases.* 2013;7(7):e2338-e.
113. Santos MB, de Oliveira DT, Cazzaniga RA, Varjão 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):40-9.
114. Dang AT, Teles RM, Weiss DI, Parvatiyar K, Sarno EN, Ochoa MT, et al. IL-26 contributes to host defense against intracellular bacteria. *J Clin Invest.* 2019;129(5):1926-39.
115. Aarão TL, de Sousa JR, Botelho BS, Fuzii HT, Quaresma JA. Correlation between nerve growth factor and tissue expression of IL-17 in leprosy. *Microb Pathog.* 2016;90:64-8.
116. Chen J, Guan L, Tang L, Liu S, Zhou Y, Chen C, et al. T Helper 9 Cells: A New Player in Immune-Related Diseases. *DNA Cell Biol.* 2019;38(10):1040-7.
117. Malik S, Awasthi A. Transcriptional Control of Th9 Cells: Role of Foxo1 in Interleukin-9 Induction. *Front Immunol.* 2018;9.
118. Anuradha R, Munisankar S, Bhootra Y, Jagannathan J, Dolla C, Kumaran P, et al. IL-10- and TGF β -mediated Th9 Responses in a Human Helminth Infection. *PLoS neglected tropical diseases.* 2016;10(1):e0004317-e.
119. Licona-Limón P, Henao-Mejia J, Temann AU, Gagliani N, Licona-Limón I, Ishigame H, et al. Th9 Cells Drive Host Immunity against Gastrointestinal Worm Infection. *Immunity.* 2013;39(4):744-57.

120. Zhan T, Zhang T, Wang Y, Wang X, Lin C, Ma H, et al. Dynamics of Th9 cells and their potential role in immunopathogenesis of murine schistosomiasis. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):305.
121. Ye ZJ, Yuan ML, Zhou Q, Du RH, Yang WB, Xiong XZ, et al. Differentiation and recruitment of Th9 cells stimulated by pleural mesothelial cells in human *Mycobacterium tuberculosis* infection. *PLoS One*. 2012;7(2):e31710.
122. Roofchayee ND, Adcock IM, Marjani M, Dezfuli NK, Varahram M, Garssen J, et al. T Helper Cell Subsets in the Pleural Fluid of Tuberculous Patients Differentiate Patients With Non-Tuberculous Pleural Effusions. *Front Immunol*. 2021;12:780453.
123. Schlapbach C, Gehad A, Yang C, Watanabe R, Guenova E, Teague JE, et al. Human TH9 cells are skin-tropic and have autocrine and paracrine proinflammatory capacity. *Sci Transl Med*. 2014;6(219):219ra8.
124. Kara EE, Comerford I, Bastow CR, Fenix KA, Litchfield W, Handel TM, et al. Distinct chemokine receptor axes regulate Th9 cell trafficking to allergic and autoimmune inflammatory sites. *J Immunol*. 2013;191(3):1110-7.
125. Finiasz MR, Franco MC, de la Barrera S, Rutitzky L, Pizzariello G, del Carmen Sasiain M, et al. IL-9 promotes anti-*Mycobacterium leprae* cytotoxicity: involvement of IFN γ . *Clinical and experimental immunology*. 2007;147(1):139-47.
126. de Sousa JR, Pagliari C, de Almeida DSM, Barros LFL, Carneiro FRO, Dias LB, Jr., et al. Th9 cytokines response and its possible implications in the immunopathogenesis of leprosy. *J Clin Pathol*. 2017;70(6):521-7.
127. Yoshimoto T. The Hunt for the Source of Primary Interleukin-4: How We Discovered That Natural Killer T Cells and Basophils Determine T Helper Type 2 Cell Differentiation In Vivo. *Front Immunol*. 2018;9.
128. Punnonen J, de Vries JE. IL-13 induces proliferation, Ig isotype switching, and Ig synthesis by immature human fetal B cells. *J Immunol*. 1994;152(3):1094-102.
129. Lundgren M, Persson U, Larsson P, Magnusson C, Smith CI, Hammarström L, et al. Interleukin 4 induces synthesis of IgE and IgG4 in human B cells. *Eur J Immunol*. 1989;19(7):1311-5.
130. Horikawa K, Takatsu K. Interleukin-5 regulates genes involved in B-cell terminal maturation. *Immunology*. 2006;118(4):497-508.
131. Stark JM, Tibbitt CA, Coquet JM. The Metabolic Requirements of Th2 Cell Differentiation. *Front Immunol*. 2019;10.
132. Stäger S, Alexander J, Kirby AC, Botto M, Rooijen NV, Smith DF, et al. Natural antibodies and complement are endogenous adjuvants for vaccine-induced CD8+ T-cell responses. *Nat Med*. 2003;9(10):1287-92.
133. Ochoa MT, Teles R, Haas BE, Zaghi D, Li H, Sarno EN, et al. A role for interleukin-5 in promoting increased immunoglobulin M at the site of disease in leprosy. *Immunology*. 2010;131(3):405-14.
134. Mattos KA, Oliveira VC, Berrêdo-Pinho M, Amaral JJ, Antunes LC, Melo RC, et al. *Mycobacterium leprae* intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected macrophages: a potential target for new drugs for leprosy treatment. *Cell Microbiol*. 2014;16(6):797-815.
135. Moura DF, de Mattos KA, Amadeu TP, Andrade PR, Sales JS, Schmitz V, et al. CD163 favors *Mycobacterium leprae* survival and persistence by promoting anti-inflammatory pathways in lepromatous macrophages. *Eur J Immunol*. 2012;42(11):2925-36.
136. de Sousa JR, de Sousa RP, Aarão TL, Dias LB, Carneiro FR, Fuzii HT, et al. In situ expression of M2 macrophage subpopulation in leprosy skin lesions. *Acta Trop*. 2016;157:108-14.
137. de Macedo CS, Anderson DM, Pascarelli BM, Spraggins JM, Sarno EN, Schey KL, et al. MALDI imaging reveals lipid changes in the skin of leprosy patients before and after multidrug therapy (MDT). *J Mass Spectrom*. 2015;50(12):1374-85.

138. Amaral JJ, Antunes LC, de Macedo CS, Mattos KA, Han J, Pan J, et al. Metabonomics reveals drastic changes in anti-inflammatory/pro-resolving polyunsaturated fatty acids-derived lipid mediators in leprosy disease. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013;7(8):e2381.
139. 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. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(8):2917-28.
140. Mattos KA, Lara FA, Oliveira VG, Rodrigues LS, D'Avila H, Melo RC, et al. Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. *Cell Microbiol*. 2011;13(2):259-73.
141. Mattos KA, D'Avila H, Rodrigues LS, Oliveira VG, Sarno EN, Atella GC, et al. Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *J Leukoc Biol*. 2010;87(3):371-84.
142. Sakurai I, Skinsnes OK. Lipids in leprosy. 2. Histochemistry of lipids in human leprosy. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association*. 1970;38(4):389-403.
143. Bacher P, Heinrich F, Stervbo U, Nienen M, Vahldieck M, Iwert C, et al. Regulatory T Cell Specificity Directs Tolerance versus Allergy against Aeroantigens in Humans. *Cell*. 2016;167(4):1067-78.e16.
144. Bacher P, Kniemeyer O, Schönbrunn A, Sawitzki B, Assenmacher M, Rietschel E, et al. Antigen-specific expansion of human regulatory T cells as a major tolerance mechanism against mucosal fungi. *Mucosal Immunol*. 2014;7(4):916-28.
145. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995;155(3):1151-64.
146. Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN. Regulatory T cells and human disease. *Clin Dev Immunol*. 2007;2007:89195.
147. Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*. 2002;420(6915):502-7.
148. Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:531-64.
149. Malek TR, Bayer AL. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(9):665-74.
150. Abbas AK, Benoist C, Bluestone JA, Campbell DJ, Ghosh S, Hori S, et al. Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nat Immunol*. 2013;14(4):307-8.
151. Dhamne C, Chung Y, Alousi A, Cooper L, Tran D. Peripheral and Thymic Foxp3+ Regulatory T Cells in Search of Origin, Distinction, and Function. *Front Immunol*. 2013;4.
152. Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(3):253-7.
153. Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, et al. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol*. 2007;5(2):e38-e.
154. Ziegler SF. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:209-26.
155. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003;299(5609):1057-61.
156. Lin W, Haribhai D, Relland LM, Truong N, Carlson MR, Williams CB, et al. Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nat Immunol*. 2007;8(4):359-68.
157. Williams LM, Rudensky AY. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol*. 2007;8(3):277-84.

158. Ohkura N, Hamaguchi M, Morikawa H, Sugimura K, Tanaka A, Ito Y, et al. T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development. *Immunity*. 2012;37(5):785-99.
159. Zheng Y, Josefowicz S, Chaudhry A, Peng XP, Forbush K, Rudensky AY. Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature*. 2010;463(7282):808-12.
160. Polansky JK, Kretschmer K, Freyer J, Floess S, Garbe A, Baron U, et al. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur J Immunol*. 2008;38(6):1654-63.
161. Feng Y, van der Veecken J, Shugay M, Putintseva EV, Osmanbeyoglu HU, Dikiy S, et al. A mechanism for expansion of regulatory T-cell repertoire and its role in self-tolerance. *Nature*. 2015;528(7580):132-6.
162. Povoleri GAM, Scottà C, Nova-Lamperti EA, John S, Lombardi G, Afzali B. Thymic versus induced regulatory T cells - who regulates the regulators? *Front Immunol*. 2013;4:169-.
163. Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol*. 2000;164(1):183-90.
164. Schmidt A, Oberle N, Krammer P. Molecular Mechanisms of Treg-Mediated T Cell Suppression. *Frontiers in Immunology*. 2012;3.
165. Safinia N, Scotta C, Vaikunthanathan T, Lechler RI, Lombardi G. Regulatory T Cells: Serious Contenders in the Promise for Immunological Tolerance in Transplantation. *Front Immunol*. 2015;6:438.
166. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. 2007;110(4):1225-32.
167. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*. 2007;204(6):1257-65.
168. Clark RA, Huang SJ, Murphy GF, Mollet IG, Hijnen D, Muthukuru M, et al. Human squamous cell carcinomas evade the immune response by down-regulation of vascular E-selectin and recruitment of regulatory T cells. *J Exp Med*. 2008;205(10):2221-34.
169. Schuler PJ, Saze Z, Hong CS, Muller L, Gillespie DG, Cheng D, et al. Human CD4+CD39+ regulatory T cells produce adenosine upon co-expression of surface CD73 or contact with CD73+ exosomes or CD73+ cells. *Clinical and experimental immunology*. 2014;177(2):531-43.
170. Mandapathil M, Hilldorfer B, Szczepanski MJ, Czystowska M, Szajnik M, Ren J, et al. Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *J Biol Chem*. 2010;285(10):7176-86.
171. Ernst PB, Garrison JC, Thompson LF. Much ado about adenosine: adenosine synthesis and function in regulatory T cell biology. *J Immunol*. 2010;185(4):1993-8.
172. Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmetshofer A, Serfling E, et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med*. 2007;204(6):1303-10.
173. Tran DQ, Andersson J, Wang R, Ramsey H, Unutmaz D, Shevach EM. GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF-beta on platelets and activated FOXP3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(32):13445-50.
174. Liang B, Workman C, Lee J, Chew C, Dale BM, Colonna L, et al. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol*. 2008;180(9):5916-26.
175. Yu X, Harden K, Gonzalez LC, Francesco M, Chiang E, Irving B, et al. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat Immunol*. 2009;10(1):48-57.
176. Lozano E, Dominguez-Villar M, Kuchroo V, Hafler DA. The TIGIT/CD226 axis regulates human T cell function. *J Immunol*. 2012;188(8):3869-75.

177. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*. 2007;450(7169):566-9.
178. 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):878-83.
179. Saini C, Ramesh V, Nath I. Increase in TGF- β secreting CD4⁺CD25⁺ FOXP3⁺ T regulatory cells in anergic lepromatous leprosy patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(1):e2639.
180. 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 neglected tropical diseases*. 2014;8(4):e2773.
181. 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):1152-8.
182. 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. *Archives of dermatological research*. 2014;306(9):793-801.
183. Santegoets SJAM, Dijkgraaf EM, Battaglia A, Beckhove P, Britten CM, Gallimore A, et al. Monitoring regulatory T cells in clinical samples: consensus on an essential marker set and gating strategy for regulatory T cell analysis by flow cytometry. *Cancer Immunol Immunother*. 2015;64(10):1271-86.
184. Chaves AT, Ribeiro-Junior AF, Lyon S, Medeiros NI, Cassirer-Costa F, Paula KS, et al. Regulatory T cells: Friends or foe in human *Mycobacterium leprae* infection? *Immunobiology*. 2018;223(4-5):397-404.
185. Kumar S, Naqvi RA, Ali R, Rani R, Khanna N, Rao DN. CD4⁺CD25⁺ T regs with acetylated FoxP3 are associated with immune suppression in human leprosy. *Mol Immunol*. 2013;56(4):513-20.
186. Massone C, Nunzi E, Ribeiro-Rodrigues R, Talhari C, Talhari S, Schettini APM, et al. T regulatory cells and plasmacytoid dendritic cells in hansen disease: a new insight into pathogenesis? *The American Journal of dermatopathology*. 2010;32(3):251-6.
187. Parente JN, Talhari C, Schettini AP, Massone C. T regulatory cells (TREG)(TCD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) distribution in the different clinical forms of leprosy and reactional states. *An Bras Dermatol*. 2015;90(1):41-7.
188. Silva CA, Danelishvili L, McNamara M, Berredo-Pinho M, Bildfell R, Biet F, et al. Interaction of *Mycobacterium leprae* with human airway epithelial cells: adherence, entry, survival, and identification of potential adhesins by surface proteome analysis. *Infect Immun*. 2013;81(7):2645-59.
189. de Macedo CS, Lara FA, Pinheiro RO, Schmitz V, de Berredo-Pinho M, Pereira GM, et al. New insights into the pathogenesis of leprosy: contribution of subversion of host cell metabolism to bacterial persistence, disease progression, and transmission. *F1000Res*. 2020;9.
190. Bloom BR, Mehra V. Immunological unresponsiveness in leprosy. *Immunol Rev*. 1984;80:5-28.
191. RIDLEY DS, JOPLING WH. A classification of leprosy for research purposes. *Lepr Rev*. 1962;33:119-28.
192. Sanchez Rodriguez R, Pauli ML, Neuhaus IM, Yu SS, Arron ST, Harris HW, et al. Memory regulatory T cells reside in human skin. *J Clin Invest*. 2014;124(3):1027-36.
193. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*. 2009;30(6):899-911.

194. Yang X, Scott MD. Biological Modulation of the Treg:Teff Ratio: From Immunosuppression to Immunoactivation. 2020. In: Immunosuppression [Internet]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/71759>.
195. Duhén T, Duhén R, Lanzavecchia A, Sallusto F, Campbell DJ. Functionally distinct subsets of human FOXP3⁺ Treg cells that phenotypically mirror effector Th cells. *Blood*. 2012;119(19):4430-40.
196. Lim HW, Broxmeyer HE, Kim CH. Regulation of trafficking receptor expression in human forkhead box P3⁺ regulatory T cells. *J Immunol*. 2006;177(2):840-51.
197. Botafogo V, Pérez-Andrés M, Jara-Acevedo M, Bárcena P, Grigore G, Hernández-Delgado A, et al. Age Distribution of Multiple Functionally Relevant Subsets of CD4⁺ T Cells in Human Blood Using a Standardized and Validated 14-Color EuroFlow Immune Monitoring Tube. *Front Immunol*. 2020;11.
198. Acosta-Rodríguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol*. 2007;8(6):639-46.
199. Andrew DP, Ruffing N, Kim CH, Miao W, Heath H, Li Y, et al. C-C chemokine receptor 4 expression defines a major subset of circulating nonintestinal memory T cells of both Th1 and Th2 potential. *J Immunol*. 2001;166(1):103-11.
200. Hirahara K, Liu L, Clark RA, Yamanaka K, Fuhlbrigge RC, Kupper TS. The majority of human peripheral blood CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ regulatory T cells bear functional skin-homing receptors. *J Immunol*. 2006;177(7):4488-94.
201. Halim L, Romano M, McGregor R, Correa I, Pavlidis P, Grageda N, et al. An Atlas of Human Regulatory T Helper-like Cells Reveals Features of Th2-like Tregs that Support a Tumorigenic Environment. *Cell Rep*. 2017;20(3):757-70.
202. Rotcheewaphan S, Belisle JT, Webb KJ, Kim HJ, Spencer JS, Borlee BR. Diguanilate cyclase activity of the *Mycobacterium leprae* T cell antigen ML1419c. *Microbiology (Reading)*. 2016;162(9):1651-61.
203. Spencer JS, Dockrell HM, Kim HJ, Marques MA, Williams DL, Martins MV, et al. Identification of specific proteins and peptides in *Mycobacterium leprae* suitable for the selective diagnosis of leprosy. *J Immunol*. 2005;175(12):7930-8.
204. Frentsch M, Arbach O, Kirchhoff D, Moewes B, Worm M, Rothe M, et al. Direct access to CD4⁺ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nat Med*. 2005;11(10):1118-24.
205. Nowak A, Lock D, Bacher P, Hohnstein T, Vogt K, Gottfreund J, et al. CD137⁺CD154⁻ Expression As a Regulatory T Cell (Treg)-Specific Activation Signature for Identification and Sorting of Stable Human Tregs from In Vitro Expansion Cultures. *Front Immunol*. 2018;9.
206. de Carvalho FM, Rodrigues LS, Duppre NC, Alvim IMP, Ribeiro-Alves M, Pinheiro RO, et al. Interruption of persistent exposure to leprosy combined or not with recent BCG vaccination enhances the response to *Mycobacterium leprae* specific antigens. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(5):e0005560.
207. Hikono H, Kohlmeier JE, Takamura S, Wittmer ST, Roberts AD, Woodland DL. Activation phenotype, rather than central- or effector-memory phenotype, predicts the recall efficacy of memory CD8⁺ T cells. *J Exp Med*. 2007;204(7):1625-36.
208. Cui W, Kaech SM. Generation of effector CD8⁺ T cells and their conversion to memory T cells. *Immunological reviews*. 2010;236:151-66.
209. Kohlmeier JE, Miller SC, Smith J, Lu B, Gerard C, Cookenham T, et al. The chemokine receptor CCR5 plays a key role in the early memory CD8⁺ T cell response to respiratory virus infections. *Immunity*. 2008;29(1):101-13.
210. 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):431-9.

211. Embgenbroich M, Burgdorf S. Current Concepts of Antigen Cross-Presentation. *Front Immunol.* 2018;9.
212. Cibrián D, Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *European journal of immunology.* 2017;47(6):946-53.
213. Smigiel KS, Srivastava S, Stolley JM, Campbell DJ. Regulatory T-cell homeostasis: steady-state maintenance and modulation during inflammation. *Immunological reviews.* 2014;259(1):40-59.
214. Guyot-Revol V, Innes JA, Hackforth S, Hinks T, Lalvani A. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173(7):803-10.
215. Bolacchi F, Sinistro A, Ciaprini C, Demin F, Capozzi M, Carducci FC, et al. Increased hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes and reduced HCV-specific CD4+ T cell response in HCV-infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels. *Clin Exp Immunol.* 2006;144(2):188-96.
216. Su LF, Del Alcazar D, Stelekati E, Wherry EJ, Davis MM. Antigen exposure shapes the ratio between antigen-specific Tregs and conventional T cells in human peripheral blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(41):E6192-e8.
217. Corthay A. How do Regulatory T Cells Work? *Scandinavian Journal of Immunology.* 2009;70(4):326-36.
218. Sanchez AM, Zhu J, Huang X, Yang Y. The development and function of memory regulatory T cells after acute viral infections. *J Immunol.* 2012;189(6):2805-14.
219. Singh A, Dey AB, Mohan A, Sharma PK, Mitra DK. Foxp3+ regulatory T cells among tuberculosis patients: impact on prognosis and restoration of antigen specific IFN- γ producing T cells. *PLoS One.* 2012;7(9):e44728.
220. Bayati F, Mohammadi M, Valadi M, Jamshidi S, Foma AM, Sharif-Paghaleh E. The Therapeutic Potential of Regulatory T Cells: Challenges and Opportunities. *Front Immunol.* 2021;11.
221. Haregewoin A, Longley J, Bjune G, Mustafa AS, Godal T. The role of interleukin-2 (IL-2) in the specific unresponsiveness of lepromatous leprosy to *Mycobacterium leprae*: studies in vitro and in vivo. *Immunol Lett.* 1985;11(3-4):249-52.
222. Modlin RL, Hofman FM, Horwitz DA, Husmann LA, Gillis S, Taylor CR, et al. In situ identification of cells in human leprosy granulomas with monoclonal antibodies to interleukin 2 and its receptor. *J Immunol.* 1984;132(6):3085-90.
223. Plaza-Sirvent C, Schuster M, Neumann Y, Heise U, Pils MC, Schulze-Osthoff K, et al. c-FLIP Expression in Foxp3-Expressing Cells Is Essential for Survival of Regulatory T Cells and Prevention of Autoimmunity. *Cell Rep.* 2017;18(1):12-22.
224. Barron L, Dooms H, Hoyer KK, Kuswanto W, Hofmann J, O'Gorman WE, et al. Cutting edge: mechanisms of IL-2-dependent maintenance of functional regulatory T cells. *J Immunol.* 2010;185(11):6426-30.
225. Shafiani S, Tucker-Heard G, Kariyone A, Takatsu K, Urdahl KB. Pathogen-specific regulatory T cells delay the arrival of effector T cells in the lung during early tuberculosis. *J Exp Med.* 2010;207(7):1409-20.
226. Manandhar R, LeMaster JW, Butlin CR, Brennan PJ, Roche PW. Interferon-gamma responses to candidate leprosy skin-test reagents detect exposure to leprosy in an endemic population. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2000;68(1):40-8.
227. You S, Belghith M, Cobbold S, Alyanakian MA, Gouarin C, Barriot S, et al. Autoimmune diabetes onset results from qualitative rather than quantitative age-dependent changes in pathogenic T-cells. *Diabetes.* 2005;54(5):1415-22.
228. Monk CR, Spachidou M, Rovis F, Leung E, Botto M, Lechler RI, et al. MRL/Mp CD4+,CD25- T cells show reduced sensitivity to suppression by CD4+,CD25+ regulatory T cells in vitro: a novel defect of T cell regulation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2005;52(4):1180-4.

229. Schneider A, Rieck M, Sanda S, Pihoker C, Greenbaum C, Buckner JH. The effector T cells of diabetic subjects are resistant to regulation via CD4⁺ FOXP3⁺ regulatory T cells. *J Immunol.* 2008;181(10):7350-5.
230. Ihantola EL, Viisanen T, Gazali AM, Näntö-Salonen K, Juutilainen A, Moilanen L, et al. Effector T Cell Resistance to Suppression and STAT3 Signaling during the Development of Human Type 1 Diabetes. *J Immunol.* 2018;201(4):1144-53.
231. Booth NJ, McQuaid AJ, Sobande T, Kissane S, Agius E, Jackson SE, et al. Different proliferative potential and migratory characteristics of human CD4⁺ regulatory T cells that express either CD45RA or CD45RO. *J Immunol.* 2010;184(8):4317-26.
232. Seddiki N, Santner-Nanan B, Tangye SG, Alexander SI, Solomon M, Lee S, et al. Persistence of naive CD45RA⁺ regulatory T cells in adult life. *Blood.* 2006;107(7):2830-8.
233. van der Geest KS, Abdulahad WH, Tete SM, Lorencetti PG, Horst G, Bos NA, et al. Aging disturbs the balance between effector and regulatory CD4⁺ T cells. *Exp Gerontol.* 2014;60:190-6.
234. Kryczek I, Wu K, Zhao E, Wei S, Vatan L, Szeliga W, et al. IL-17⁺ regulatory T cells in the microenvironments of chronic inflammation and cancer. *J Immunol.* 2011;186(7):4388-95.
235. Beriou G, Costantino CM, Ashley CW, Yang L, Kuchroo VK, Baecher-Allan C, et al. IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood.* 2009;113(18):4240-9.
236. Vukmanovic-Stejic M, Agius E, Booth N, Dunne PJ, Lacy KE, Reed JR, et al. The kinetics of CD4⁺Foxp3⁺ T cell accumulation during a human cutaneous antigen-specific memory response in vivo. *J Clin Invest.* 2008;118(11):3639-50.
237. Koch MA, Tucker-Heard Gs, Perdue NR, Killebrew JR, Urdahl KB, Campbell DJ. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nature immunology.* 2009;10(6):595-602.
238. Ohkawa T, Seki S, Dobashi H, Koike Y, Habu Y, Ami K, et al. Systematic characterization of human CD8⁺ T cells with natural killer cell markers in comparison with natural killer cells and normal CD8⁺ T cells. *Immunology.* 2001;103(3):281-90.
239. Carvalho JC, Araújo MG, Coelho-Dos-Reis JGA, Peruhype-Magalhães V, Alvares CC, Moreira ML, et al. Phenotypic and functional features of innate and adaptive immunity as putative biomarkers for clinical status and leprosy reactions. *Microb Pathog.* 2018;125:230-9.
240. Wherry EJ, Ha SJ, Kaech SM, Haining WN, Sarkar S, Kalia V, et al. Molecular signature of CD8⁺ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity.* 2007;27(4):670-84.
241. Wirth TC, Xue HH, Rai D, Sabel JT, Bair T, Harty JT, et al. Repetitive antigen stimulation induces stepwise transcriptome diversification but preserves a core signature of memory CD8(+) T cell differentiation. *Immunity.* 2010;33(1):128-40.
242. Chauhan SK, Saban DR, Lee HK, Dana R. Levels of Foxp3 in regulatory T cells reflect their functional status in transplantation. *J Immunol.* 2009;182(1):148-53.

8 ANEXOS

8.1 Anexo 1: Dados epidemiológicos dos doadores recrutados para análise *ex vivo* de células sanguíneas

<i>Ex vivo</i>	Características	Paucibacilares	Multibacilares	Saudáveis
Tregs e Tconvs totais (Fig. 4.1, E-G)	Número de indivíduos	8	10	9
	Sexo: F/M	6/2	3/7	7/2
	Idade: mediana/ 25-75%	57/25-52	48/39-65	35/28-52
Tregs e Tconvs com fenótipo de Linfócitos T_v, T_{MC}, T_{ME} e T_{EDT}. (Fig. 4.1, I - J)	Número de indivíduos	6	8	9
	Sexo: F/M	5/1	2/6	7/2
	Idade: mediana/ 25-75%	57/19-65	47/37-63	35/28-52
Receptores de quimiocinas (Fig. 4.2) (Fig. 4.3)	Número de indivíduos	8	10	9
	Sexo: F/M	6/2	3/7	7/2
	Idade: mediana/ 25-75%	57/25-52	48/39-65	35/28-52

Abreviações: Tregs, linfócitos T reguladores; Tconvs, linfócitos T convencionais; T_v, Linfócitos T virgens; T_{MC}, Linfócitos T de memória central; T_{ME}, Linfócitos T de memória efetora; T_{EDT}, Linfócitos T efetores terminantemente diferenciadas. F, feminino; M, masculino;

8.2 Anexo 2: Dados epidemiológicos dos doadores recrutados para as análises *in vitro* de células sanguíneas.

IN VITRO	Características	Paucibacilares	Multibacilares	Saudáveis
Culturas de 7 horas AgTregs e AgTefs (Fig.4.4)	Número de indivíduos	10	14	8
	Sexo: F/M	7/3	4/10	6/2
	Idade: mediana/ 25-75%	57/41-65	45/37-60	42/33-59
Culturas de 7 horas Fenótipo (T_v, T_{MC}, T_{ME} e T_{EDT}). (Fig.4.5)	Número de indivíduos	6	10	7
	Sexo: F/M	5/1	3/7	5/2
	Idade: mediana/ 25-75%	57/19-65	42/33-50	45/31-62
Culturas de 18 horas AgTregs e aTconvs	Número de indivíduos	8	11	NA
	Sexo: F/M	6/2	4/7	NA
	Idade: mediana/ 25-75%	42/33-59	47/36-65	NA

Abreviações: AgTregs, linfócitos T reguladores antígeno-específicos; AgTefs, linfócitos T efetores antígeno-específicos; T_v, linfócitos T virgens; T_{MC}, linfócitos T de memória central; T_{ME}, linfócitos T de memória efetora; T_{EDT}, linfócitos T efetores diferenciados terminais. F, feminino; M, masculino; aTconvs, linfócitos T convencionais ativados (CD25^{alto}); NA, não se aplica.

8.3 Anexo 3: Dados epidemiológicos dos doadores recrutados para as análises *in vitro* de células sanguíneas.

CD8	Características	Paucibacilares	Multibacilares	Saudáveis
<i>Ex vivo</i> (Fig. 4.13)	Número de indivíduos	10	14	11
	Sexo: F/M	6/4	4/10	9/2
	Idade: mediana/ 25-75%	57/38-65	47/33-61	35/28-45
<i>In vitro</i> (Fig. 4.14)	Número de indivíduos	9	13	9
	Sexo: F/M	6/3	4/9	6/3
	Idade: mediana/ 25-75%	59/34-66	47/38-62	39/33-56

Abreviações: F, feminino; M, masculino;

8.4 Anexo 4: Artigos científicos publicados



Modulation of the Response to *Mycobacterium leprae* and Pathogenesis of Leprosy

Natasha Cabral¹, Vilma de Figueiredo¹, Mariana Gandini¹, Cintia Fernandes de Souza¹, Rychelle Affonso Medeiros¹, Leticia Miranda Santos Lery¹, Flávio Alves Lara¹, Cristiana Santos de Macedo², Maria Cristina Vidal Pessolani¹ and Geraldo Moura Batista Pereira^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Axel Cloeckaert,
Institut National de recherche pour
l'agriculture, l'alimentation et
l'environnement (INRAE), France

Reviewed by:

Carla Pagliari,
University of São Paulo, Brazil
John S. Spencer,
Colorado State University,
United States
Tarun Narang,
Postgraduate Institute of Medical
Education and Research, India

*Correspondence:

Geraldo Moura Batista Pereira
geraldo@ioc.fiocruz.br

Specialty section:

This article was submitted to
Infectious Agents and Disease,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 11 April 2022

Accepted: 16 May 2022

Published: 02 June 2022

Citation:

Cabral N, de Figueiredo V, Gandini M,
de Souza CF, Medeiros RA,
Lery LMS, Lara FA, de Macedo CS,
Pessolani MCV and
Pereira GMB (2022) Modulation of
the Response to *Mycobacterium*
leprae and Pathogenesis of Leprosy.
Front. Microbiol. 13:918009.
doi: 10.3389/fmicb.2022.918009

¹Laboratory of Cellular Microbiology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil,
²Center for Technological Development in Health (CDTS), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil

The initial infection by the obligate intracellular bacillus *Mycobacterium leprae* evolves to leprosy in a small subset of the infected individuals. Transmission is believed to occur mainly by exposure to bacilli present in aerosols expelled by infected individuals with high bacillary load. *Mycobacterium leprae*-specific DNA has been detected in the blood of asymptomatic household contacts of leprosy patients years before active disease onset, suggesting that, following infection, the bacterium reaches the lymphatic drainage and the blood of at least some individuals. The lower temperature and availability of protected microenvironments may provide the initial conditions for the survival of the bacillus in the airways and skin. A subset of skin-resident macrophages and the Schwann cells of peripheral nerves, two *M. leprae* permissive cells, may protect *M. leprae* from effector cells in the initial phase of the infection. The interaction of *M. leprae* with these cells induces metabolic changes, including the formation of lipid droplets, that are associated with macrophage M2 phenotype and the production of mediators that facilitate the differentiation of specific T cells for *M. leprae*-expressed antigens to a memory regulatory phenotype. Here, we discuss the possible initial steps of *M. leprae* infection that may lead to active disease onset, mainly focusing on events prior to the manifestation of the established clinical forms of leprosy. We hypothesize that the progressive differentiation of T cells to the Tregs phenotype inhibits effector function against the bacillus, allowing an increase in the bacillary load and evolution of the infection to active disease. Epigenetic and metabolic mechanisms described in other chronic inflammatory diseases are evaluated for potential application to the understanding of leprosy pathogenesis. A potential role for post-exposure prophylaxis of leprosy in reducing *M. leprae*-induced anti-inflammatory mediators and, in consequence, Treg/T effector ratios is proposed.

Keywords: leprosy pathogenesis, memory T cells, regulatory T cells, lipid droplets, polyunsaturated fatty acid metabolites, interferon- γ , FOXP-3

INTRODUCTION

Leprosy is a chronic infectious disease that mainly affects the skin and the peripheral nerves. *Mycobacterium leprae*, an obligate intracellular pathogen with tropism for macrophages and Schwann cells, is the causative agent of the disease (Scollard et al., 2006). Recently, *Mycobacterium lepromatosis*, a bacterium phylogenetically very close to *M. leprae*, was identified as the causative agent of diffuse lepromatous leprosy with Lucio's phenomenon (Rea and Jerskey, 2005; Han et al., 2008; Han and Quintanilla, 2015).

Indeterminate leprosy is an initial manifestation of the disease, and frequently it presents as single or multiple, hypopigmented, or faintly erythematous macules with loss of thermal sensation. The hair growth and sweating are unaffected (Talhari et al., 2015). These early cutaneous lesions are characterized by mild and non-specific inflammatory infiltrates, mainly lymphocytes and macrophages (Sehgal and Srivastava, 1987). Alterations in the peripheral nerves such as dermal nerve infiltration around the perineurium and within nerve bundles, hyperplasia of Schwann cells, and perineural fibrosis are also seen (Liu et al., 1982). At this point of the disease, the host immune responses did not take a defined turn towards granuloma formation or tolerance (Talhari et al., 2015). This indeterminate phase may remain for a long period and spontaneously regress if the infection is efficiently controlled, or *M. leprae* continues to grow and the disease progresses to pauci (PB) or multibacillary (MB) clinical forms depending on the host immune responses and possibly genetic factors (Sehgal and Srivastava, 1987; Cambri and Mira, 2018). The local innate immune response, including the differentiation of monocytes to classically (M1) or alternatively (M2) activated macrophages, as well as the specific T cell response, may be key determinants in driving the different clinical manifestations of the disease (de Sousa et al., 2017b; Pinheiro et al., 2018).

Leprosy is divided into a wide spectrum of forms. The tuberculoid and lepromatous poles represent the extremes between bacterial control and disseminated infection, respectively. In the tuberculoid pole (TT), there is an almost effective TH1 response, M1 macrophages are predominant, and rare bacilli are seen in the few observed skin lesions (Moura et al., 2012). However, in the lepromatous pole (LL) there is loss of the TH1 response, and M2 macrophages predominate in multiple skin lesions with increased bacillary load (Ridley and Jopling, 1966; Martins et al., 2012; Moura et al., 2012). It has been shown that in tuberculoid skin lesions there is a predominance of pro-inflammatory cytokines, including IFN- γ , IL-2, IL-15, and TNF- α (Modlin et al., 1988; Salgame et al., 1991). Furthermore, CD4⁺ T cells are distributed throughout the skin lesions and predominantly exhibit a memory phenotype. Although the CD4⁺ T cells predominate, cytotoxic CD8⁺ T are also seen in elevated numbers at the periphery in TT lesions (Sieling and Modlin, 1992). In contrast, the lepromatous skin lesions exhibit a predominance of anti-inflammatory cytokines, such as IL-4, IL-10, and IL-5 (Yamamura et al., 1991). CD8⁺ T cells are distributed throughout the lesion and outnumber CD4⁺ T cells. CD8⁺ T cells present in these cutaneous lesions produce

high amounts of IL-4, showing an anti-inflammatory and non-cytotoxic functional profile (Modlin et al., 1988; Salgame et al., 1991).

Approximately 10% of the leprosy patients are diagnosed with pure neural leprosy (PNL). This clinical form is characterized by peripheral neuropathy without inflammatory skin lesions (Rabello et al., 1953). The diagnosis is quite delicate, and analysis of clinical features, electroneuromyography, nerve biopsy histopathology and *M. leprae*-specific DNA investigation in the affected nerves may be necessary for an accurate conclusion (Jardim et al., 2003). Neurological disorders occur mainly in the nerve trunks and may initially evolve silently, but progress to the deterioration of peripheral nerves. Muscle weakness followed by motor deficit, nerve pain or thickening, paresthesia, and sensitivity changes are the most common symptoms. In endemic countries, peripheral neuropathy is most likely observed in leprosy, but it also occurs in other pathologies (Jardim et al., 2003; Antunes et al., 2012). Described as an inflammatory process that affects several compartments of the peripheral nerve in the initial stages, a predominance of neuropathies in the small fibers can be observed in leprosy. The most frequently affected nerves are the ulnar, median, posterior auricular, superficial radial, common fibular, superficial fibular and posterior tibial nerves (Jardim et al., 2003). The nerve thickening may occur due to the inflammatory process, which can occur in the epineurium, perineurium and endoneurium, altering the morphology of myelinated nerves (Garbino et al., 2011, 2013).

Here, we discuss pathways for the initial infection by *M. leprae*, how the bacillus survives in the host, and how in some individuals this infection evolves to the different forms of leprosy. We hypothesize that a microenvironment that protects the bacillus from the TH1 response in the nasal mucosa and in the skin allows this bacillus to survive and expand despite the TH1 effector mechanisms. Mediators produced by tissue-resident macrophages and Schwann cells (SCs) following infection can inhibit effector function against *M. leprae* and facilitate the expansion of regulatory T cells (Tregs) specific for *M. leprae*-expressed antigens. The negative modulation of the effector response against *M. leprae* will allow the increase in bacillary load and onset of active disease. Epigenetic features already present in the tissue-resident leukocytes or induced by *M. leprae* might protect the bacillus from effector mechanisms and contribute to microenvironmental changes that will bias the differentiation of memory T cells toward a Treg phenotype.

Transmission of *Mycobacterium leprae* Infection and the Upper Respiratory Tract Mucosa

Mycobacterium leprae exhibits a slow replication rate, long incubation period and is uncultivable *in vitro* under axenic conditions (Scollard et al., 2006). Despite several attempts, leprosy transmission pathways have not been completely understood (Bratschi et al., 2015). It is widely accepted that the transmission occurs when a susceptible person inhales *M. leprae* in aerosols, droplets and nasal secretions expelled by heavily infected individuals (Araujo et al., 2016).

This transmission route is supported by the demonstration that lepromatous patients can shed large numbers of viable bacteria through their nasal passages (Davey and Rees, 1974). On the other hand, a growing number of studies indicates that leprosy can also be a zoonosis, transmitted by the armadillos, as observed in the rural south of the United States (Sharma et al., 2015). The number of animals able to act as a reservoir for the disease is continuously growing, from mangabey monkeys to red squirrels, and more recently chimpanzees (Meyers et al., 1985; Schilling et al., 2019; Hockings et al., 2021). The potential of leprosy transmission from these animals to humans by hematophagous arthropods such as kissing bugs and ticks was also demonstrated (Ferreira et al., 2018), being the skin the probable primary site of infection (Job et al., 2008).

The hypothesis of the upper respiratory tract mucosa as the main primary site of *M. leprae* infection is reinforced by the presence of leprosy histological alterations in these areas before the appearance of skin lesions and nerve damage (Chacko et al., 1979; Suneetha et al., 1998). Furthermore, surface expression of adhesins involved in mycobacterial adherence to epithelial cells such as histone-like protein and heparin-binding hemagglutinin has been shown in *M. leprae* (de Lima et al., 2009). Most individuals develop an efficient immune response to *M. leprae* after exposure. However, in a small number of exposed individuals, the infection may not be controlled at the mucosal sites, favoring *M. leprae* growth in the host cells and spreading (Lázaro et al., 2010; Oliveira et al., 2021). Following an increase in the bacillary load, the pathogen may disseminate *via* bloodstream to other body parts. Indeed, histopathological analysis of the nasal mucosa from lepromatous patients shows massive numbers of *M. leprae*, mostly within macrophages adjacent to blood vessels (McDougall et al., 1975; Fokkens et al., 1998). Moreover, the presence of *M. leprae* DNA in blood samples of household contacts of leprosy patients implies not only that the circulation is likely a migration path during infection, but also indicates a higher risk of progression to disease in these contacts (Reis et al., 2014). In addition, serology of *M. leprae*-specific molecules such as phenolic glycolipid I (PGL-I) and leprosy IDRI diagnostic-1 (LID-1), as well as lipid mediators (reviewed by Silva and Belisle, 2018), may also be used as tools for detection of people at greater risk of developing the disease (Figure 1; Moura et al., 2008; Amorim et al., 2016).

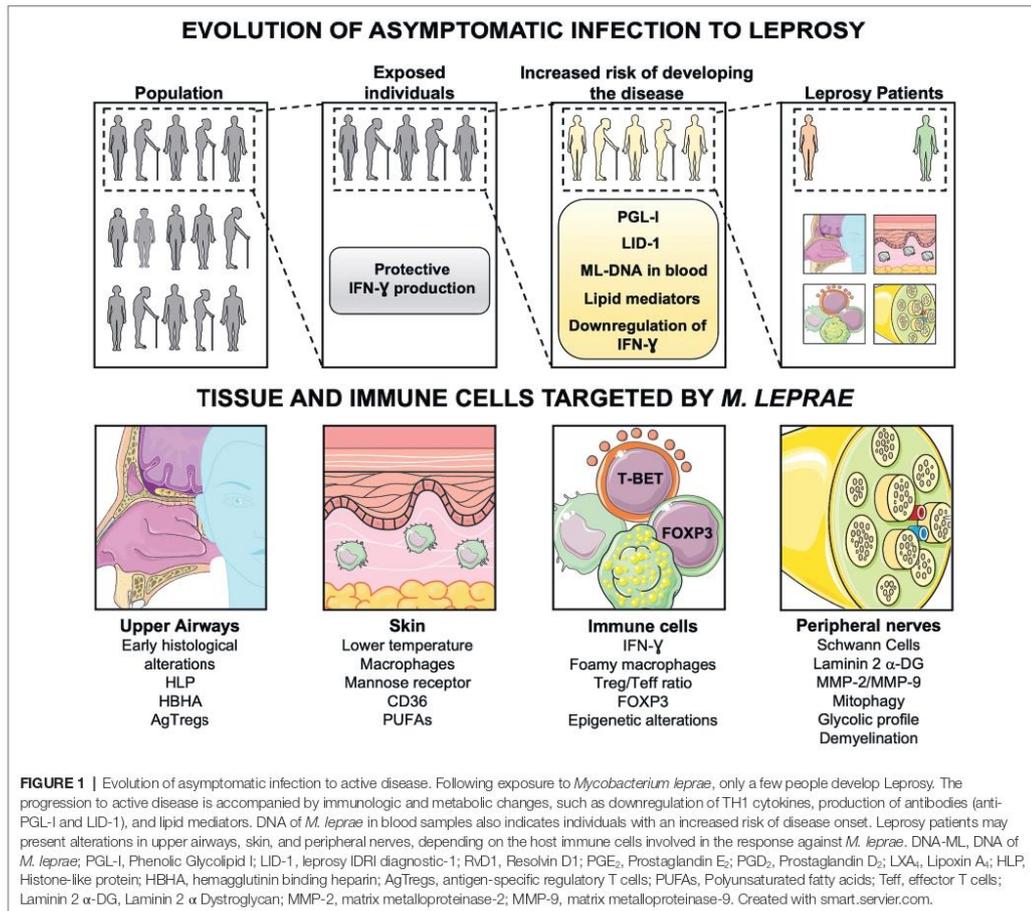
Cellular Immunity and *Mycobacterium leprae* Survival in the Infection Sites

T cell-mediated immunity plays a pivotal role in leprosy pathogenesis, and it is well recognized that the production of proinflammatory cytokines is critical for triggering an efficient response against *M. leprae* in the nasal mucosa and skin (Modlin et al., 1988). Since leprosy is preceded by a long asymptomatic period, the memory pool may be the main T cell population involved in leprosy pathogenesis (Scollard et al., 2006). Memory T cells are divided into effector memory T cells (T_{EM}) and central memory T cells (T_{CM}). T_{EM} cells display immediate effector function, whereas T_{CM} cells have little or no effector

function but exhibit higher proliferative capacity and upon reactivation can rapidly proliferate and develop into effector cells. T_{EM} cells can be discriminated into distinct subsets, including TH1, TH2, TH17, TH9, TH22, and Tregs (Sallusto et al., 2004). TH1 cells and IFN- γ play a pivotal role in the control of the infection by intracellular pathogens such as *M. leprae* (Salgame et al., 1991). More recently, other T cells such as TH17 and TH9 cells have also been associated with pro-inflammatory responses against this bacillus. These cells are involved in the maintenance of chronic inflammation (Finiasz et al., 2007; Attia et al., 2014; Saini et al., 2016; de Sousa et al., 2017a; Santos et al., 2017). TH22 cells and IL-22 have been linked to inactivation of the lytic response of macrophages, thereby, favoring *M. leprae* dissemination and evasion. In addition, these cells are also related to tissue remodeling (de Lima et al., 2015). Tregs produce IL-10 and TGF- β and are key players in the suppression of effector T cells to limit tissue damage due exacerbated immune response and are also associated with leprosy in both blood leukocytes and skin lesions (Bobosha et al., 2014).

The lung may be a particularly promising site for the induction of peripheral Tregs specific for *M. leprae*-expressed antigens (Abbas et al., 2013). This possibility is supported by the recent finding that the inhalation of airborne particles such as house dust mites and fungal spores leads to Treg-mediated tolerance against these aeroantigens (Bacher et al., 2016). Indeed, *M. leprae* can invade primary human nasal mucosa cells and most notably alveolar epithelial cells and survive for at least 10 days following infection. Moreover, mice challenged intranasally with live bacilli developed lung infection (Silva et al., 2013). Thus, the continuous *M. leprae* nasal shedding by patients may induce pathogen-specific Tregs in the airways mucosa of healthy individuals, reducing effector T cell responses against *M. leprae*, and, in consequence, promoting an increase in bacillary loads (Davey and Rees, 1974; Martins et al., 2012). Therefore, the negative modulation of effector T cell function in the mucosa of the airways by Tregs may facilitate the bacillus survival and dissemination from the airways to other permissive areas in the organism.

Mycobacterium leprae requires a temperature range of 30–33°C for growth, thereby, the lower temperature of the skin provides a particularly favorable environment for the bacillus replication (Pinheiro et al., 2018). The blood vessels may participate in the immune response against *M. leprae* since the pathogen more likely reaches the skin through the circulation. Type 1 cytokines such as IFN- γ can induce the expression of adhesive molecules and production of inflammatory mediators, including proinflammatory cytokines and growth factors by endothelial cells. These mediators secreted by the activated endothelium can also be detected in the blood before clinical manifestations of infectious diseases, thereby, may be targeted as predictive biomarkers (Page and Liles, 2013). The activation of the endothelium facilitates the diapedesis of leukocytes into the infected sites such as skin (Spellberg and Edwards, 2001). In addition, Kibbie et al. (2016) have shown that the unstimulated endothelium can induce M2 macrophages, whereas endothelial cells activated by IFN- γ elicit the M1 differentiation program



in monocytes through the expression of the protein JAG1. Therefore, the endothelium can play an important role in the immunopathogenesis of the disease.

Two lineages of tissue-resident macrophages (TRM) with distinct gene expression profiles and phenotypes coexist at specific niches in the skin. A subset expressing low levels of the major histocompatibility complex II (MHC-II) resides near blood vessels and is associated with restraining inflammation and fibrosis. Moreover, MHC-II^{low} macrophages highly express CD206, a mannose receptor involved in the recognition and uptake of *M. leprae* (Diaz Acosta et al., 2018; Chakarov et al., 2019). Thus, MHC-II^{low} TRMs may be the first target cell of *M. leprae* after it reaches the skin via the bloodstream. In addition, a murine model of leishmaniasis shows that TRMs displaying the M2 phenotype are permissive to *Leishmania major* infection and proliferation even in the presence of a

TH1 response (Lee et al., 2018). The association of low temperature and the macrophage-protected niche may provide a suitable microenvironment for the survival and initial growth of *M. leprae* in the skin even in asymptomatic individuals with strong IFN- γ response (Martins et al., 2012). Following an increase in the bacillary load, *M. leprae* may infect a second TRM subset that resides subjacent to nerve bundles. This TRM lineage exhibits higher MHC-II expression and efficiently presents antigens to CD4⁺ T cells *in vitro*. MHC-II^{high} TRMs may contribute to nerve damage in two ways, either by promoting effector T cells responses and leading to inflammatory infiltrate or by promoting Treg differentiation and favoring *M. leprae* persistence (Chakarov et al., 2019).

Although *M. leprae* binds to both myelinated and unmyelinated SCs, the unmyelinated SCs are the ones preferentially susceptible to infection in the peripheral nervous system (PNS).

The vascular endothelium is a possible entry route for *M. leprae* across the blood-neural barrier, and both macrophages and SCs could transport the pathogen to the nerve, an environment that in the absence of inflammation restricts the entry of immune system cells (Scollard et al., 1999).

Likely, *M. leprae* binds to proteins on the surface of SCs that make connections to the underlying cytoskeleton and initiate a cascade of laminin 2 alpha-dystroglycan complexes, leading to penetration of the bacillus into the cell, thus establishing neural infection (Rambukkana et al., 1998; Brophy, 2002; Scollard et al., 2015). Matrix metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9), enzymes involved in extracellular matrix degradation, are shown in an experimental model of neural damage. Studies suggest that they are involved in changing the permeability of the blood-neural barrier, in demyelination and axonal degeneration, in the presence of fibrosis. In leprosy nerve lesions, an increase in MMPs is also observed, and patients with endoneurial inflammation exhibit the highest levels of these enzymes. Along with MMPs, TNF- α is involved in the pathogenesis of the neural injury in PNL (Pearson and Weddell, 1975; Teles et al., 2007).

In advanced endoneurial lesions, both macrophages and SCs are infected, contributing to demyelination and decreased conduction velocity (Job, 1971). Both demyelination and axonal degeneration are mechanisms of nerve fiber damage in leprosy (Ebenezer and Scollard, 2021). *In vitro* studies identified the Toll-like-6 receptor (TLR-6) as permissive for the internalization of *M. leprae* in SCs. These in turn are also able to present antigens and serve as targets for cytotoxic T cells (Scollard et al., 2015; Andrade et al., 2016). However, additional studies are required to elucidate the various factors involved in the neural lesions of leprosy. Investigation of the pattern of immune and inflammatory responses may provide a better understanding of the mechanisms involved in the pathology of peripheral nerve injuries. The prevention of sequelae and physical disabilities resulting from leprosy depends on the implementation of effective methods for the early detection of the infection.

***Mycobacterium leprae* and the Metabolic Regulation of Immune Response in Infected Individuals**

Due to the evolutionary strategy that involved the reduction in its genome to a minimal set of genes, *M. leprae* became dependent on the host cell metabolism, making it highly susceptible to host-target strategies such as the inhibition of cholesterol synthesis by statins, for example (Cole et al., 2001; Mattos et al., 2011b; Lobato et al., 2014). Medeiros et al. also demonstrated that after infection, *M. leprae* modulates Schwann cell metabolism to a more glycolytic profile, with increased glucose uptake and consumption followed by a reduction in oxidative phosphorylation, which results in mitophagy induction (Oliveira et al., 2021). All these host cell metabolic changes are crucial to the lipid accumulation and foamy aspect of infected cells, a hallmark that is crucial to *M. leprae* infection success.

The drastic reduction in mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$) observed after infection of Schwann cells and macrophages leads to PINK1 deposition, Parkin recruitment and subsequent

mitochondrial ubiquitination, resulting in mitophagy, observed so far only in SCs (Oliveira et al., 2021). Mitophagy may be a relevant *M. leprae* strategy to escape the macrophage-mediated cellular response, acting at three different known levels: (i) elimination of a competitor better adapted to the cytosolic environment, capable of competing with *M. leprae* for sources of host cell carbon (Borah et al., 2019); (ii) inhibition of autophagic processes, due to the deviation/consumption of its components such as RAB, LC3, Parkin, p62/SQST1, optineurin, NBR1, and TBK1 by mitophagy (Gkikas et al., 2018); (iii) inhibition of the activation of innate immune responses from mitochondrial origin, such as the generation of reactive oxygen species (ROS) and the inflammasome system (Oliveira et al., 2021).

Equally important for the differentiation and activation of macrophages is the control of the carbon flux on central metabolism, leading to toxic intermediates such as itaconate, capable of inhibiting bacterial isocitrate lyase (Rodríguez-Prados et al., 2010; Nagy and Haschemi, 2015; O'Neill and Artyomov, 2019). All these metabolic settings, aiming to meet the energetic and anabolic demands of leukocytes during the response against a pathogen, are modulated by the microenvironment of the infected tissue and are ultimately responsible for its modulation as well. Available data allow us to speculate that M2 macrophages present an active Krebs cycle, generating citrate that is continuously converted to acetyl-CoA through citrate lyase, thus feeding the synthesis of lipids, responsible in part for making them foamy macrophages (Llibre et al., 2021). The acetyl-CoA generated by M2 macrophages is consumed not only by the *de novo* lipid synthesis, but also by histone acetyltransferases during gene expression epigenetic modulation by histone acetylation, irreversibly committing these macrophages to an anti-inflammatory phenotype (Allis and Jenuwein, 2016). All these metabolic settings are directly related to the lipid-rich foamy aspect of the *M. leprae*-infected macrophages, a phenotype that is crucial to *M. leprae* survival inside macrophages and dissemination (Rodrigues et al., 2010; Lobato et al., 2014; Mattos et al., 2014).

The foamy aspect of *M. leprae*-infected M2 macrophages is an excellent example of the impact of metabolism modulation on the immunological control of leprosy. After infection, macrophages probably increase lipid uptake through the CD36, and other scavenger receptors expressed at high levels in lepromatous skin lesions (Mattos et al., 2014). This phenomenon is largely responsible for the evolutionary success of *M. leprae*. Part of the captured lipids is responsible for the accumulation of lipid bodies, an important niche for the hiding of the pathogen within the cytosolic space (Mattos et al., 2014; Toledo Pinto et al., 2018). Lipids may also be used directly by the bacillus, either as a carbon source or as a source of reducing potential (Marques et al., 2015). Finally, another part of the lipids will be destined to beta oxidation, thus feeding the Krebs cycle of these cells, generating the necessary intermediates for the upregulation of anti-inflammatory biomarkers through histone acetylation (Allis and Jenuwein, 2016).

Lipids such as fatty acids, phospholipids, oxidized phospholipids, and cholesterol as well as upregulation of the host lipid metabolism are detected at higher levels in the lepromatous than in the tuberculoid skin (Sakurai and Skinsnes,

1970; Cruz et al., 2008; Mattos et al., 2010, 2011a; Amaral et al., 2013; de Macedo et al., 2015). Metabolomic analysis of the tuberculoid and lepromatous skin lesions shows an enhanced presence of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), which are derived from phospholipase A₂ (PLA₂) activity. Cytosolic PLA₂ is activated upon phagocyte-bacteria interaction, leading to the release of PUFAs from the sn-2 position of phospholipids and consequent production of lipid mediators, and, in the case of free arachidonic acid (AA), facilitating phagocytosis (Dabral and van den Bogaart, 2021). Patient's serum samples were also analyzed, and levels of arachidonic acid-derived lipid mediators prostaglandin E₂ (PGE₂) and lipoxin A₄ (LXA₄); and docosahexaenoic acid-derived pro-resolving lipid mediator resolvin D1 (RvD1) were higher in lepromatous than in tuberculoid patients (Bobosha et al., 2014). LXA₄ and RvD1 are known as specialized pro-resolving mediators (SPMs), and it has been observed that M2 macrophages are the main sources of SPMs (Wertz et al., 2018; Werner et al., 2019; Jordan and Wertz, 2021). These lipid mediators are known to induce the M2 macrophage phenotype, as well as FOXP3 expression, Treg differentiation and proliferation (Baratelli et al., 2005; Schwab et al., 2007; Garg et al., 2008; Chiurchiù et al., 2016).

Unfortunately, there is still a lack of information concerning the metabolic control of lymphocytes in leprosy. Naïve T cells have low metabolic activity and can therefore afford slow and extremely efficient biochemical processes such as oxidative phosphorylation and fatty acid oxidation to produce ATP. After TCR activation, cellular reprogramming takes place aiming at proliferation, differentiation and production of cytokines, anabolic processes that are extremely demanding of energy and carbons. Thus, activated T lymphocytes need to change their source of ATP to a faster and less efficient process, the aerobic glycolysis (Pearce et al., 2013). Although less efficient, glycolysis generates intermediates that are important precursors for anabolism, such as nucleotides and amino acids for example. This shift to glucose fermentative metabolism, despite the availability of oxygen, is associated with an inflammatory phenotype, while the opposite, association between oxidative phosphorylation of lipids and anti-inflammatory phenotype is also true (O'Neill and Hardie, 2013).

As mentioned above, *M. leprae* can modulate the host cell metabolism, influencing immune responses and progression to leprosy (de Macedo et al., 2020). In addition, recent studies also suggest that pathogens may induce epigenetic changes in chronically infected individuals, leading to changes in the progression of infections and participation in multi-stage development of cancer (Fischer, 2020). Thus, it is possible that *M. leprae* infection induces changes in the host cell epigenome, favoring its survival and progression of asymptomatic infection to leprosy.

Insights From Other Chronic Inflammatory Diseases With Long Asymptomatic Phases Modulated by Epigenetic Mechanisms

Epigenetic regulation refers to modifications in DNA or DNA-associated components (but not DNA sequence) that are

transferred to daughter cells and are frequently involved in the establishment of stable phenotypes, for instance, cell type differentiation, and trained immunity (Bekkering et al., 2021). Moreover, epigenomic reprogramming partially explains dysregulation and sustained immune responses in chronic inflammatory diseases (CID; Tam and Leung, 2021). Histone modification pattern enriched at immune-related genes has also been related to inflammatory gene expression and chronic inflammation (Cribbs et al., 2018). Recent technological advances make it currently possible to analyze epigenetic profiles with single-cell resolution, depicting cell type heterogeneity in an unsupervised way. Such an approach has been used, for instance, to assess the landscape of open chromatin regions of peripheral blood mononuclear cells from patients with ankylosing spondylitis (Yu et al., 2020). Novel and rare cell populations were identified and characterized, providing mechanistic insights into the pathogenesis of the disease.

In pemphigus vulgaris (PV), an autoimmune disorder, miR-338-3p expression was significantly increased in patients with active PV, whereas it remained unchanged in control individuals. miR-338-3p expression was positively correlated with disease severity. miR-338-3p targets Runt-related transcription factor 1 (RUNX1), which activates FOXP3 transcription. Accordingly, blockage of miR-338-3p increases the expression of RUNX1 and FOXP3. Since FOXP3 levels are decreased in patients with PV because of the abnormal expression of miR-338-3p, and FOXP3 is key to the role of Tregs cells in maintaining the immunological tolerance to self-antigens, this miRNA could play an essential role in the pathogenesis of the Tregs dysregulation observed in these patients (Reolid et al., 2021). Considering those results, it is important to evaluate if miR-338-3p has a role in leprosy.

A single-cell transcriptional atlas of inflammatory skin diseases, such as psoriasis and atopic dermatitis, has provided insights into perturbed and co-opted developmental cellular programs. Epigenetic mechanisms found in several non-tumor dermatological pathologies have also been determined (reviewed by Reolid et al., 2021; Reynolds et al., 2021). In psoriasis, many studies assessed epigenetic markers associated with the severity of the disease and response to therapies. The hypomethylation of p16INK4a, hypermethylation of HLA-C promoter, PDCD5 and tissue inhibitor of metalloproteinases 2 (TIMP2) positively correlate with Psoriasis Area and Severity Index (PASI) scores. Moreover, treatment with the 5-azacitidine methyltransferase inhibitor reversed the hypermethylation of genes encoding phosphatidic acid phosphatase type 2 domain containing 3 (PPAPDC3), tumor protein P73 (TP73), and fibronectin type III and Ankyrin Repeat Domains 1 (FANK1). Significantly reduced levels of acetylated H3 and H4 (modifications commonly associated with transcriptional activation) and increased levels of H3K4 methylation compared with controls. Treatment with HDAC inhibitors seems to lower the production of inflammatory cytokines *in vitro*. Many other studies contributed to advance knowledge on epigenetic regulation in psoriasis pathology. Hopefully, we will soon see comparable advances in the knowledge of leprosy epigenomics.

Despite the expected heterogeneity in the human susceptibility to leprosy, the ability to identify risk-groups/individuals prone to convert upon exposure would help early diagnosis and disease control. A recent study evaluated the DNA methylation profile of pulmonary-resident immune cells in a cohort of medical students with a reported increased risk of *Mycobacterium tuberculosis* exposure. This study identified an altered DNA methylation profile in the individuals that later developed latent TB infection as compared to those who did not. Notably, alterations in the DNA methylation profile were detected in the immune cells before a latent TB infection could be detected by a positive IGRA test. Such alterations were identified mainly in the pentose phosphate pathway genes in alveolar macrophages, and IFN- γ signaling genes in the alveolar T cells. It is not yet clear whether the DNA methylation profile observed in the IGRA converters is an early result of *M. tuberculosis* infection or an epigenomic dysregulation predisposing individuals to convert upon exposure. In both cases, one can imagine future applications such as early diagnostic tools for the identification of individuals that are developing latent TB infection or for identifying individuals who are more prone to convert upon exposure (Karlsson et al., 2021).

Indeed, epigenetic changes in tuberculosis may help us to understand factors that lead to asymptomatic infection caused by *M. leprae*. The pathway to disease may lie in epigenetic mechanisms for evading the host immune response. Both intracellular pathogens can avoid lysosomal fusion by manipulating host signal transduction. Furthermore, *M. leprae* and *M. tuberculosis* can evade the microbicidal host response translocating from phagolysosomes into the cytosol (Russell, 2003; van der Wel et al., 2007). Leprosy and tuberculosis bacilli translocation occur through a pore-forming toxin recognized as ESAT-6 (van der Wel et al., 2007). In *M. tuberculosis* infection, ESAT-6 induces methylation and decreased acetylation levels of histone H3K4 in the CIITA (class II transactivator gene) gene promoter (Kumar et al., 2012). This epigenetic modulation becomes fundamental for the bacillus evasion from the host response, because CIITA transcription is essential for the expression of major histocompatibility class II (MHC-II) molecules on the surface of an antigen-presenting cell (Bobosha et al., 2014). After all, during the ordinary course of an infection, bacteria are phagocytosed by macrophages; their components get processed via the endocytic pathway and are presented to CD4⁺ T cells in association with MHC-II molecules. Thus, the pathogen silently persists in the host cell. In addition, this epigenetic modulation induces a decrease in inflammatory mediators such as IFN- γ (Casanova and Abel, 2002; Green et al., 2013).

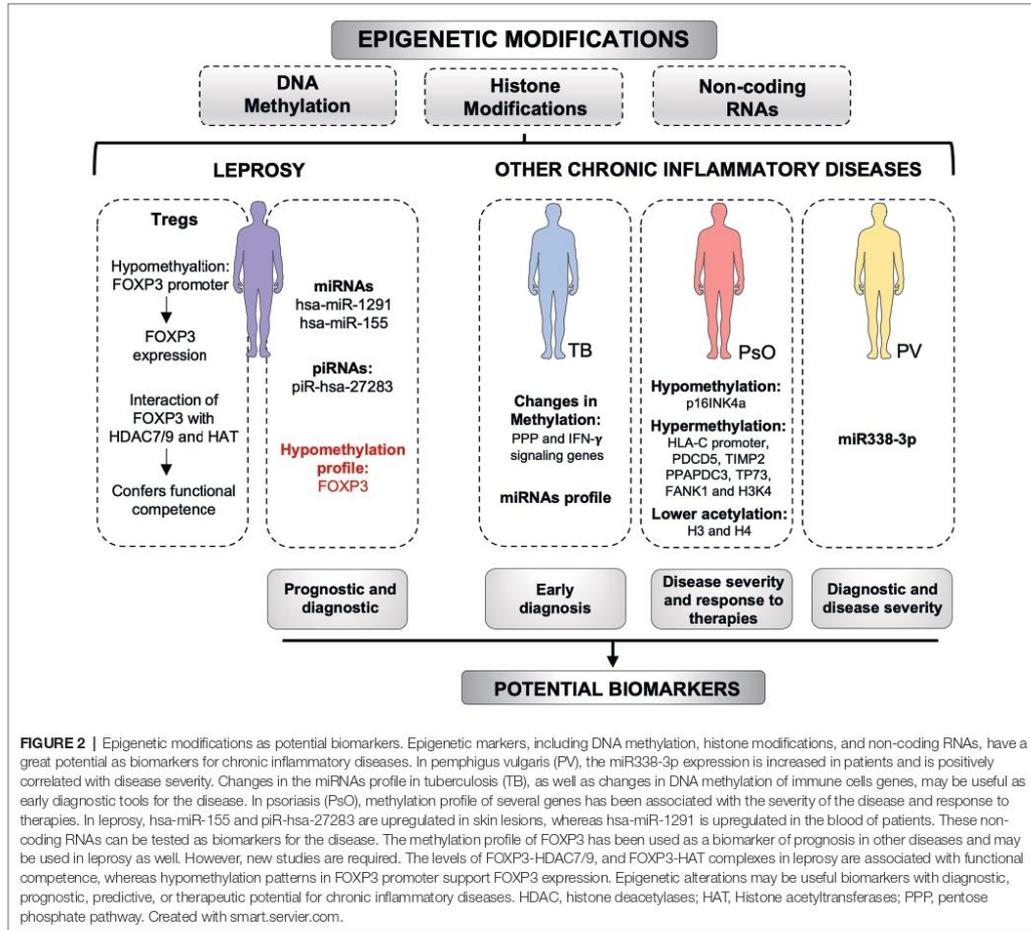
Since only a small fraction of the exposed individuals develops leprosy, it is reasonable to hypothesize that the upper respiratory tract is an efficient barrier to *M. leprae* infection in most of the cases (Pinheiro et al., 2018). Few studies approach the *M. leprae* interaction with the nasal epithelium. So far, we do not know whether there are epigenetic modifications that make individuals more/less susceptible to *M. leprae* infection, nor if *M. leprae* induces epigenetic modifications to create a microenvironment favorable to its persistence. TLR4 activation

in alveolar epithelial lineage cells can promote the expression of H3K9me1/2 demethylase KDM3A. KDM3A binds directly to the FOXP3 promoter, leading to its transcription, thereby inducing the secretion of FOXP3-associated inhibitory cytokines (TGF- β 1, IL-35, and HO-1), ultimately facilitating evasion from effector response (Li et al., 2017). Interestingly, *M. leprae* activates TLR4 in macrophages (Polycarpou et al., 2016), and possibly it also does it in alveolar epithelial cells (Silva et al., 2013). Thus, we hypothesize that epigenetic regulation could contribute to a microenvironment permissive to *M. leprae* at this stage too.

Epigenetic markers that confer specific phenotypes have a great potential as biomarkers for the diagnosis and progression of diseases (Figure 2; Batista et al., 2020; Fatima et al., 2021). Moreover, epigenetic regulation is also a quick response to changes in the environment and may be reversible. Thus, epigenetic modulation of gene expression has also a substantial promise for new therapies (Allis and Jenuwein, 2016; Tam and Leung, 2021; Zhang and Cao, 2021). Potential epigenetic biomarkers have been identified in several types of cancer, such as breast, colorectal cancers, prostate, pancreatic, gastric, and lung cancers (Dumitrescu, 2018). Some of them have been suggested as useful for early diagnosis and prediction of cancer risk. For instance, in prostate cancer, epigenetic markers show more sensitivity and specificity than serum PSA. Thus, it has been proposed that the inclusion of these markers within current screening tools, may improve early diagnosis and diminish the need for repeated biopsies. It is also noteworthy that if detected in biological fluids, epigenetic markers could play an essential role in the noninvasive early detection of diseases (Chen and Fang, 2014). Hopefully, ongoing and future studies on epigenetics of leprosy will contribute to a better understanding on how microenvironment signals modulate the epigenome, as well as how the changed epigenome promotes a signaling and metabolic rewiring of cells involved in the innate and adaptive immunity to *M. leprae*.

Epigenetic Changes in *Mycobacterium leprae* Infection and Leprosy

FOXP3, the transcriptional factor master regulator of Treg cells, is required for differentiation, maintenance and suppressor function of Tregs, as well as for the inhibition of the expression of genes associated with T helper lymphocytes (Curotto de Lafaille et al., 2004; Kretschmer et al., 2005; Josefowicz et al., 2012). FOXP3 expression is regulated by epigenetic mechanisms, such as histone acetylation and methylation and cytosine residue methylation in CpG dinucleotides (Lal and Bromberg, 2009; Alvarez Salazar et al., 2017). Recent studies have shown that the methylation status of enhancers at the *foxp3* gene loci, designated as Conserved Noncoding Sequences (CNSs) 1, 2, and 3, differentially contributes to Treg differentiation and stability. The regulation by the CNS1 region is critical for the induction of FOXP3 in Tregs generated at peripheral sites, primarily in response to the TGF- β signaling pathway (Zheng et al., 2010; Kanamori et al., 2016). The CNS2 hypomethylation, also known as Tregs-specific demethylated region (TSDR), is



required for the stability of FOXP3 expression (Zheng et al., 2010; Schreiber et al., 2014; Alvarez Salazar et al., 2017). The CNS3 region appears crucial to facilitate FOXP3 locus opening and potentially increases the probability of this gene expression during thymic and peripheral differentiation of Treg cells. Furthermore, this region is related to the expansion of these cells (Zheng et al., 2010; Mohr et al., 2018).

Kumar et al. have shown that high levels of TGF-β increase phosphorylation-mediated-nuclear-import of SMAD3 which leads to an increased generation of Tregs during disease progression. The authors also evaluated the methylation status of 5CpG islands of FOXP3 promoter using methylation-specific PCR and detected a high degree of demethylation in circulating Tregs from leprosy patients (Kumar et al., 2013). Although the demethylation pattern in the FOXP3 promoter supports

the expression of this transcription factor, the pattern of hypomethylation in TSDR is a pivotal feature for the stability of FOXP3 expression. Since human Tregs cells are highly heterogeneous and transient expression of FOXP3 occurs in conventional T cells following activation, the demonstration of the TSDR profile is required to confirm the identity of a Tregs at an epigenetic level (Bacher et al., 2016; de Macedo et al., 2020). Different levels of FOXP3 TSDR methylation in Tregs of different leprosy clinical forms may be a marker for prognosis and disease progression (Schreiber, 2007; Palermo et al., 2012; Campos et al., 2015). The epigenetics behind disease progression in leprosy was also investigated in interactions of FOXP3 with histone deacetylases (HDACs) and histone acetyl transferases (HATs) that activate/inactivate transcription by inducing the transfer of an acetyl group to the histone

core. In another work, Kumar et al. determined that FOXP3 acts in a molecular ensemble with HDAC7/9 and HAT to confer functional competence and differentiation to Tregs cells in leprosy (Yang and Seto, 2007; Kumar et al., 2014). These authors hypothesized that FOXP3 may be carrying HDAC7/9 to a gene locus to be repressed under *M. leprae*-induced conditions. In fact, these relevant works are pioneering studies of epigenetic modulations in T cells during disease progression.

miRNAs are involved in the epigenetic mechanisms of regulation of cell development, proliferation, differentiation, apoptosis and even anti-inflammatory and pro-inflammatory stimuli. MiRNAs promote a dual role in *M. tuberculosis* infection, persistence, and host immune system modulation (Batista et al., 2020; Fatima et al., 2021). These molecules have great potential as biomarkers for diagnosis of disease and its progression to disease. Wang et al. (2011) investigated the role of miRNAs in the transition from latent to active TB, looking for candidate biomarkers of this transition. Salgado et al. performed the miRNome of leprosy patients and healthy individuals, using both blood and skin lesion samples from leprosy patients. Expression analysis of blood cells revealed 10 differentially expressed miRNAs, with nine down-regulated and one upregulated (hsa-miR-1291). The miRNA hsa-miR-1291 was the only differentially expressed miRNA in both skin tissue and blood samples. It was predicted to regulate the AQP1 gene which influences the hydration, elasticity, and glycerol permeability of skin (Verkman, 2005; Fábrega et al., 2011; Salgado et al., 2018). Soares et al. evaluated miRNAs on leprosy skin lesions, using microarrays. Among the 10 most up or downregulated microRNAs differentially expressed is the hsa-miR-155, already described as associated with the regulation of the immune response in other diseases (Soares et al., 2017). Further understanding the epigenetic control by miRNAs of the genes expressed in leprosy may provide new insights into the different facets of leprosy, from *M. leprae*-host cell interactions to new therapeutic targets.

Another class of small RNAs involved in epigenetic regulation is the Piwi-interacting RNAs (piRNA). piRNAs are important for gametogenesis, embryogenesis, and stem cell maintenance, among other processes. Pinto et al. (2020), studied the piRNome of human skin lesions of leprosy patients and healthy subjects. A total of 337 differentially expressed piRNAs were identified in leprosy skin lesions. It was demonstrated that, with one exception, all the differentially expressed piRNAs were downregulated in leprosy patients, indicating that targeted genes involved in the regeneration of peripheral nerves infected by *M. leprae* may be silent or expressed at low levels. The only upregulated piRNA on leprosy skin lesions, piR-hsa-27283, may have approximately 3,000 genes as targets, so it is difficult to predict the functional impact of this upregulated piRNA. On the other hand, piR-hsa-27283 could be tested as a biomarker for leprosy (Pinto et al., 2020).

Are Tregs Involved in the Pathogenesis of Leprosy?

Both innate and adaptive mechanisms may be involved in the negative modulation of immune response of leprosy. The

interaction of PGL-I with complement receptor 3 (CR3) expressed by innate immune cells efficiently enhances bacterial invasion and impairs infection-induced inflammatory responses (Tabouret et al., 2010). Moreover, PGL-I triggers the Syk-calcineurin-NFAT signaling via CR3, increasing the production of cytokines, such as IL-1 β , IL-2, and IL-10 by macrophages, dendritic cells and polymorphonuclear neutrophils (PMNs), respectively. Therefore, the pathogen may modulate the cytokine response in host immune cells via PGL-I engagement to CR3. The augmenting production of IL-2 by DCs and IL-10 by PMNs following infection may also sustain and induce Tregs (Doz-Deblauwe et al., 2019).

Progressive reduction and loss of *in vivo* responsiveness to *M. leprae* (lepromin skin test) is mirrored by increase in bacillary load in leprosy patients from the tuberculoid to the lepromatous pole (Ridley and Jopling, 1966). *In vitro* T cell responses, including IFN- γ production, are defective in lepromatous patients (Nogueira et al., 1983). More recently, IFN- γ levels in response to *M. leprae*-specific synthetic peptides were investigated in asymptomatic individuals with different levels of exposure to the bacilli, including household contacts of paucibacillary (HCPB) and multibacillary (HCMB) patients, as well as leprosy patients. These volunteers displayed a progressively lower level of IFN- γ in response to *M. leprae* with increase in exposure to this bacillus or bacillary load among patients. In addition, patients were less responsive to *M. leprae* antigens than the asymptomatic exposed individuals. Taken together, these observations suggest a progressive reduction in TH1 response to *M. leprae* related to level of exposure to the bacillus/bacillary load (Martins et al., 2012).

The interruption of exposure by treating the index cases can improve T cell responses in HCMB by increasing both CD4⁺ T_{EM} and T_{CM} frequencies, as well as production of pro-inflammatory cytokines in response to *M. leprae* antigens (de Carvalho et al., 2017). So, the continuous exposure to live *M. leprae* may allow the progression of the infection to disease in asymptomatic individuals. Then, the level of negative regulation of the effector response toward *M. leprae* may dictate the development of active disease, and the evolution to multibacillary or paucibacillary leprosy, respectively (Scollard et al., 2006).

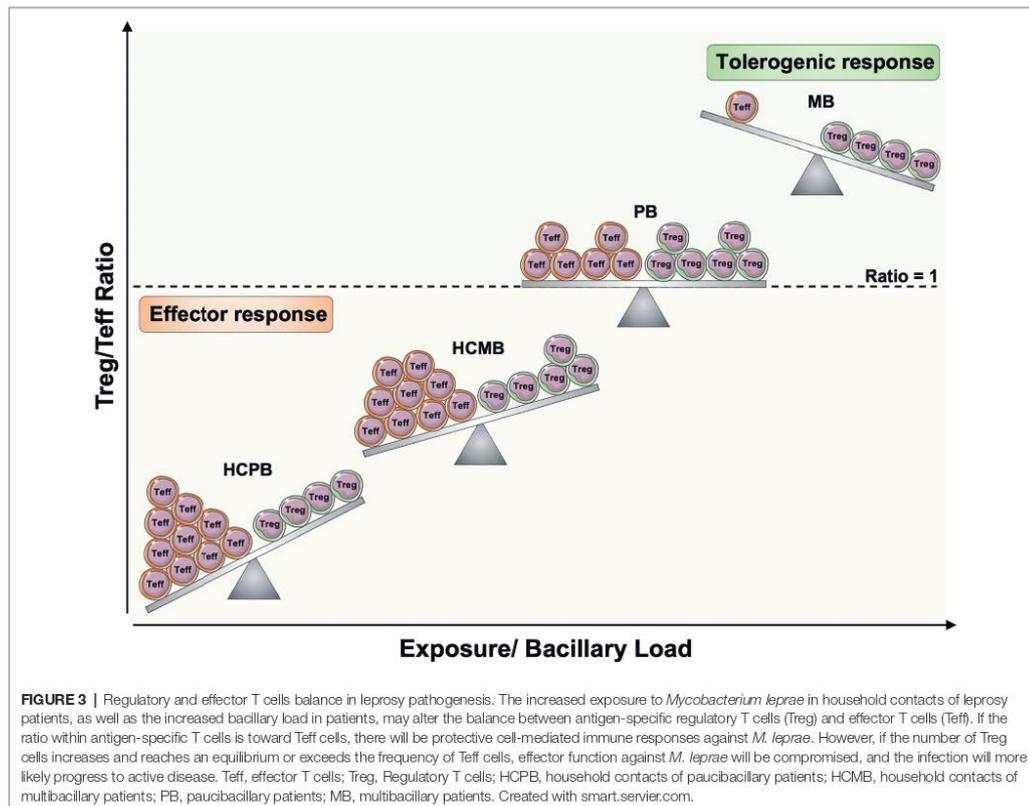
T_{EM} cells stably commit to express specific amounts of cytokines that vary widely between cells, and this intrinsic magnitude is maintained upon immunological rechallenge. In addition, the quantitative production of cytokines such as IFN- γ defines the ability of TH1 cell clones to activate macrophages and bacterial killing (Helmstetter et al., 2015). The exposure to exogenous antigens is a major mechanism influencing the balance between Tregs and effector (Teff) T cells and the ratio change within antigen-specific T cells subsets correlate with the levels of effector response and chronicity of infection (Su et al., 2016). Lastly, the T cell unresponsiveness in lepromatous leprosy is *M. leprae*-specific, and frequently patients exhibit strong responses to the tuberculin skin test (Bloom and Mehra, 1984).

Thus, it is possible to hypothesize that following *M. leprae* survival and growth in host cells of the upper airways mucosa and the skin, leprosy may change the balance between Tregs

and Teff cells in an antigen-specific manner, leading to suppression of Teff cells or generation of selective pressure to memory T cells expressing low amounts of proinflammatory cytokines (Figure 3). So, healthy individuals from endemic areas and HCPB may have the lowest Tregs/Teff ratio, thereby, a strong protective immune response against *M. leprae*. The persistent exposure to the bacilli as observed in HCMB may increase the Tregs numbers, leading to a decrease in Teff and a higher Tregs/Teff ratio (Su et al., 2016). Since the balance is still toward Teff, they maintain a protective response. However, if the numbers of Tregs reach an equilibrium or exceed the numbers of Teff, the individuals progress to PB or MB clinical forms, respectively.

Belkaid et al. (2002) demonstrated that an equilibrium within antigen-specific T cells in sites of chronic infection such as *Leishmania major* may be an indicative of parasite and host survival strategies. Thus, an expansion of Tregs reaching equilibrium with effector function may be happening in PB patients to prevent tissue damage due to the overactivation of immune responses. A point to be considered is that IL-2

is required for the generation, maintenance, proliferation, and suppressive activity of Tregs (Malek and Bayer, 2004). Almeida et al. reported that *il2*^{-/-} mice presented lymphoid hyperplasia due to the lack of Tregs. However, when IL-2 producing cells were reintroduced in IL-2^{-/-} deficient chimeras, CD4⁺CD25⁺ T cells became established and restored the peripheral lymphoid compartments to normal size. Thus, IL-2 is required for establishing a sizable population of Tregs cells (Almeida et al., 2002). Treg cells constitutively express high levels of CD25 (IL-2R α); however, they cannot produce this cytokine; thus, they depend on the IL-2 produced by activated Teff cells (Malek and Bayer, 2004). This dependence on their suppression target for proliferation suggests a feedback loop model of immune regulation (Jung and Seoh, 2009). Since IL-2 is almost absent in lepromatous leprosy cutaneous lesions, this may result in lower numbers of Tregs than in tuberculoid leprosy (Sieling and Modlin, 1992). However, the frequency of *M. leprae*-specific Tregs may still exceed the frequency of Teff in these patients; thereby, a tolerogenic response is achieved (Tregs/Teff ratio > 1; Bacher et al., 2016).



FOXP3⁺ T cells have been described in the blood and skin lesions of leprosy patients; however, there is no consensus in the literature on the role of Tregs in the disease. Attia et al. (2010, 2014) have shown higher frequencies of circulating Tregs (CD4⁺CD25^{high}), expressing FOXP3, as well as Teff (CD4⁺CD25^{low}) in TT than LL patients, indicating accumulation of both T cells subsets in the peripheral blood. On the other hand, increased numbers of Tregs (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) in response to *M. leprae* antigens have been demonstrated in multibacillary patients (Palermo et al., 2012; Bobosha et al., 2014; Saini et al., 2014). A relevant point to be considered in these studies is the absence of Treg identity at the epigenetic level. The evaluation of the hypomethylation pattern in TSDR region is required for the stable expression of FOXP3 and characterization of Tregs (Bacher et al., 2016).

At the site of *M. leprae* infection, some studies detected higher numbers of Tregs in lepromatous leprosy cutaneous lesions (Palermo et al., 2012; Bobosha et al., 2014; Saini et al., 2014), whereas others did not show any statistical differences in the expression of FOXP3 between the clinical forms (Massone et al., 2010; Parente et al., 2015). It is difficult to compare these studies since the methods for quantification, characterization, and experimental designs are different. In addition, the T cell unresponsiveness observed in lepromatous patients is specific for *M. leprae* antigens; thereby, the evaluation of *M. leprae*-specific Tregs is also required (Bloom and Mehra, 1984).

Tregs display multiple immunosuppressive mechanisms, including release of anti-inflammatory cytokines, adenosine nucleosides, perforin and granzymes, as well as co-inhibitory receptors such as CTL-4, LAG-3, and TIGIT (Cools et al., 2007; Lucca and Dominguez-Villar, 2020). Thus, the molecular pathways by which Tregs operate in leprosy should be further elucidated. A recent requirement on the essential markers and gate strategy for the characterization of Tregs in clinical samples by flow cytometry must be considered in leprosy studies. Thus, new standardized approaches may lead us to a better understanding of the role of Tregs in leprosy pathogenesis (Santegoets et al., 2015).

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

After the introduction of multi-drug therapy (MDT) for leprosy the prevalence of this disease had a major initial reduction, but the number of new cases remains stable around 200,000 cases/year, including children, demonstrating that transmission is not interrupted in leprosy endemic countries (Taal et al., 2021). Another important problem is underdiagnosis of this disease. Active search of new cases in a supposedly low endemicity city and among schoolchildren in high endemicity areas in Brazil allowed the detection of many new previously undiagnosed cases (Bernardes Filho et al., 2017). The COVID-19 pandemic can be predicted to have a major negative impact in the control of leprosy and other diseases. There was a 41.4% reduction in the detection of new cases of leprosy in Brazil in 2020, when compared to mean values for the previous

4 years (da Paz et al., 2022). New approaches are required to improve early detection of leprosy new cases and latent infections at high risk of evolution to active disease.

Leprosy and other important chronic inflammatory diseases are preceded by a silent pathogenesis that can last years to decades for crossing the threshold to symptomatic manifestations and diagnosis. Epigenetic markers, pathogen-specific markers and biomarkers induced during early phases of chronic inflammatory diseases provide many potential tools for diagnosis and, when possible, prevention of active disease and sequelae (Figure 1). Many molecules, metabolic and functional steps are common to pathologies involving chronic inflammation. So, the identification of common mechanisms may indicate points that could be targeted for development of new diagnostic and therapeutic tools (Lobato et al., 2014; Rosa et al., 2021).

The interaction of *M. leprae* with the host allows the detection of *M. leprae*-derived as well as host-derived markers of exposure, infection, and disease prognosis. Assessment of antibodies specific for *M. leprae* antigens is a time-tested approach for detection of infection by *M. leprae*, but patients and asymptomatic individuals with low bacillary loads are frequently negative for these antibodies. IgM antibodies specific for the *M. leprae* unique antigen PGL-I reach serum levels that are proportional to the bacillary index in leprosy patients and indicate a higher risk of disease for people living in endemic regions and household contacts of leprosy patients (Meeker et al., 1986; Barreto et al., 2015). *Mycobacterium leprae*-specific recombinant proteins and *M. leprae*-specific synthetic peptides can also be used for detection of exposure to *M. leprae*. These assays are evolving to a point-of-care format combining detection of anti-PGL-I antibodies and cytokine response to *M. leprae* antigens and are potentially important tools for diagnosis of new leprosy cases (Van Hooij et al., 2018). PCR of *M. leprae*-specific DNA in earlobe slit skin smears combined to ELISA for anti-PGL-I antibodies detected the highest proportion of double positive cases among newly diagnosed leprosy patients, with marked reduction following treatment, and 15.5% double-positive individuals among household contacts of leprosy patients in the state of Pará, northern Brazil. These observations suggest this approach as a potential method for diagnosing latent *M. leprae* infection (Da Silva et al., 2021). *Mycobacterium leprae* induces lipid accumulation in the infected macrophages and Schwann cells, in the form of lipid droplets, that give a foamy aspect to the infected cells. The lipid droplets are sites of synthesis of lipid mediators derived from polyunsaturated fatty acids in the infected cells (Mattos et al., 2011b; de Macedo et al., 2020). The serum levels of some of these mediators (PGE₂, LXA₄, RvD1) are increased in multibacillary leprosy patients (Amaral et al., 2013). These mediators and others induced by the presence of *M. leprae* in the infected cells are part of an anti-inflammatory microenvironment, that may be relevant for Treg differentiation in the infected sites (de Macedo et al., 2020). Serum levels of lipid mediators induced by *M. leprae* infection may also be potential biomarkers of latent infection.

Evaluation of IFN- γ response to *M. leprae*-specific peptides shows responsiveness to *M. leprae* only in exposed individuals. However, when groups of volunteers with different levels of

exposure to *M. leprae* are compared, an increase in exposure to *M. leprae* and in bacillary load among patients is associated with progressively lower levels of IFN- γ response to *M. leprae* (Martins et al., 2012). A model for changes in Treg/Teff ratios with increase in bacillary load is shown in Figure 3. The likely requirement of *M. leprae* for this inhibition of effector response suggests that improvement of effector response against *M. leprae* is a likely benefit for post-exposure prophylaxis of leprosy (Taal et al., 2021).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

NC and GP elaborated the concept and design of this review. NC, VF, CS, RM, LL, FL, and GP contributed to writing this review. NC, GP, MG, LL, CM, and MP participated in the editing of the manuscript. NC, GP, and LL elaborated the

figures. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

NC received scholarship from National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). This review was supported by The National Institute of Allergy and Infectious Diseases of the National Institutes of Health under the award number RO1AI129835. The funders had no role in the preparation of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Márcia R. Jardim for her insightful suggestions regarding neural lesions in leprosy.

REFERENCES

- Abbas, A. K., Benoist, C., Bluestone, J. A., Campbell, D. J., Ghosh, S., Hori, S., et al. (2013). Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nat. Immunol.* 14, 307–308. doi: 10.1038/ni.2554
- Allis, C. D., and Jenuwein, T. (2016). The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat. Rev. Genet.* 17, 487–500. doi: 10.1038/nrg.2016.59
- Almeida, A. R., Legrand, N., Papiernik, M., and Freitas, A. A. (2002). Homeostasis of peripheral CD4⁺ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4⁺ T cell numbers. *J. Immunol.* 169, 4850–4860. doi: 10.4049/jimmunol.169.9.4850
- Alvarez Salazar, E. K., Cortés-Hernández, A., Alemán-Muench, G. R., Alberú, J., Rodríguez-Aguilera, J. R., Recillas-Targa, F., et al. (2017). Methylation of FOXP3 TSDR underlies the impaired suppressive function of Tregs from long-term belatacept-treated kidney transplant patients. *Front. Immunol.* 8:219. doi: 10.3389/fimmu.2017.00219
- Amaral, J. J., Antunes, L. C., de Macedo, C. S., Mattos, K. A., Han, J., Pan, J., et al. (2013). Metabonomics reveals drastic changes in anti-inflammatory/pro-resolving polyunsaturated fatty acids-derived lipid metabolism in leprosy disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7:e2381. doi: 10.1371/journal.pntd.0002381
- Amorim, F. M., Nobre, M. L., Ferreira, L. C., Nascimento, L. S., Miranda, A. M., Monteiro, G. R., et al. (2016). Identifying leprosy and those at risk of developing leprosy by detection of antibodies against LID-1 and LID-ND0. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10:e004934. doi: 10.1371/journal.pntd.0004934
- Andrade, P. R., Jardim, M. R., da Silva, A. C., Manhaes, P. S., Antunes, S. L., Vital, R., et al. (2016). Inflammatory cytokines are involved in focal demyelination in leprosy neuritis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 75, 272–283. doi: 10.1093/jnen/nlv027
- Antunes, S. L., Chimelli, L., Jardim, M. R., Vital, R. T., Nery, J. A., Corte-Real, S., et al. (2012). Histopathological examination of nerve samples from pure neural leprosy patients: obtaining maximum information to improve diagnostic efficiency. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107, 246–253. doi: 10.1590/S0074-02762012000200015
- Araujo, S., Freitas, L. O., Goulart, L. R., and Goulart, I. M. (2016). Molecular evidence for the aerial route of infection of *Mycobacterium leprae* and the role of asymptomatic carriers in the persistence of leprosy. *Clin. Infect. Dis.* 63, 1412–1420. doi: 10.1093/cid/ciw570
- Attia, E. A., Abdallah, M., El-Khateeb, E., Saad, A. A., Lotfi, R. A., Abdallah, M., et al. (2014). Serum Th17 cytokines in leprosy: correlation with circulating CD4(+) CD25 (high)FoxP3 (+) T-regs cells, as well as down regulatory cytokines. *Arch. Dermatol. Res.* 306, 793–801. doi: 10.1007/s00403-014-1486-2
- Attia, E. A., Abdallah, M., Saad, A. A., Afifi, A., El Tabbakh, A., El-Shennawy, D., et al. (2010). Circulating CD4⁺ CD25 high FoxP3⁺ T cells vary in different clinical forms of leprosy. *Int. J. Dermatol.* 49, 1152–1158. doi: 10.1111/j.1365-4632.2010.04535.x
- Bacher, P., Heinrich, F., Stervbo, U., Nienen, M., Vahldieck, M., Iwert, C., et al. (2016). Regulatory T cell specificity directs tolerance versus allergy against Aeroantigens in humans. *Cell* 167, 1067.e16–78.e16. doi: 10.1016/j.cell.2016.09.050
- Baratelli, F., Lin, Y., Zhu, L., Yang, S. C., Heuzé-Vourc'h, N., Zeng, G., et al. (2005). Prostaglandin E2 induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4⁺ T cells. *J. Immunol.* 175, 1483–1490. doi: 10.4049/jimmunol.175.3.1483
- Barreto, J. G., Bisanzio, D., Frade, M. A. C., Moraes, T. M. P., Gobbo, A. R., De Souza, G. L., et al. (2015). Spatial epidemiology and serologic cohorts increase the early detection of leprosy. *BMC Infect. Dis.* 15:527. doi: 10.1186/s12879-015-1254-8
- Batista, L. A. F., Silva, K. J. S., da Costa, E. S. L. M., de Moura, Y. F., and Zucchi, F. C. R. (2020). Tuberculosis: a granulomatous disease mediated by epigenetic factors. *Tuberculosis* 123:101943. doi: 10.1016/j.tube.2020.101943
- Bekkering, S., Domínguez-Andrés, J., Joosten, L. A. B., Riksen, N. P., and Netea, M. G. (2021). Trained immunity: reprogramming innate immunity in health and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 39, 667–693. doi: 10.1146/annurev-immunol-102119-073855
- Belkaid, Y., Piccirillo, C. A., Mendez, S., Shevach, E. M., and Sacks, D. L. (2002). CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420, 502–507. doi: 10.1038/nature01152
- Bernardes Filho, F., Paula, N. A. D., Leite, M. N., Abi-Rached, T. L. C., Vernal, S., Silva, M. B. D., et al. (2017). Evidence of hidden leprosy in a supposedly low endemic area of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 112, 822–828. doi: 10.1590/0074-02760170173
- Bloom, B. R., and Mehra, V. (1984). Immunological unresponsiveness in leprosy. *Immunol. Rev.* 80, 5–28. doi: 10.1111/j.1600-065X.1984.tb00493.x
- Bobosha, K., Wilson, L., van Meijgaarden, K. E., Bekele, Y., Zewdie, M., van der Ploeg-van Schip, J. J., et al. (2014). T-cell regulation in lepromatous leprosy. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8:e2773. doi: 10.1371/journal.pntd.0002773
- Borah, K., Girardi, K., Mendum, T. A., Lery, L. M. S., Beste, D. J. V., Lara, F. A., et al. (2019). Intracellular *Mycobacterium leprae* utilizes host glucose as a carbon source in Schwann cells. *MBio* 10, 517–520. doi: 10.1128/mBio.02351-19
- Bratschi, M. W., Steinmann, P., Wickenden, A., and Gillis, T. P. (2015). Current knowledge on *Mycobacterium leprae* transmission: a systematic literature review. *Lepr. Rev.* 86, 142–155. doi: 10.47276/lr.86.2.142
- Brophy, P. J. (2002). Microbiology: Subversion of Schwann cells and the leper's bell. *Science* 296, 862–863. doi: 10.1126/science.1072444
- Cambri, G., and Mira, M. T. (2018). Genetic susceptibility to leprosy—from classic immune-related candidate genes to hypothesis-free, whole genome approaches. *Front. Immunol.* 9:1674. doi: 10.3389/fimmu.2018.01674
- Campos, K., Francisconi, C. F., Okheie, V., de Souza, L. C., Trombone, A. P., Letra, A., et al. (2015). FOXP3 DNA methylation levels as a potential biomarker in the development of periaipical lesions. *J. Endod.* 41, 212–218. doi: 10.1016/j.joen.2014.10.003

- Casanova, J. L., and Abel, L. (2002). Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 581–620. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.081501.125851
- Chacko, C. J., Bhanu, T., Victor, V., Alexander, R., Taylor, P. M., and Job, C. K. (1979). The significance of changes in the nasal mucosa in indeterminate, tuberculoid and borderline leprosy. *Lepr. India* 51, 8–22.
- Chakarov, S., Lim, H. Y., Tan, L., Lim, S. Y., See, P., Lum, J., et al. (2019). Two distinct interstitial macrophage populations coexist across tissues in specific subcellular niches. *Science* 363. doi: 10.1126/science.aau0964
- Chen, H. M., and Fang, J. Y. (2014). Epigenetic biomarkers for the early detection of gastrointestinal cancer. *Gastrointest. Tumors* 1, 201–208. doi: 10.1159/000380784
- Chiurchiù, V., Leuti, A., Dalli, J., Jacobsson, A., Battistini, L., Maccarrone, M., et al. (2016). Proresolving lipid mediators resolvin D1, resolvin D2, and maresin 1 are critical in modulating T cell responses. *Sci. Transl. Med.* 8:353ra111. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf7483
- Cole, S. T., Eglmeier, K., Parkhill, J., James, K. D., Thomson, N. R., Wheeler, P. R., et al. (2001). Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 409, 1007–1011. doi: 10.1038/35059006
- Cools, N., Ponsaerts, P., Van Tendeloo, V. F., and Berneman, Z. N. (2007). Regulatory T cells and human disease. *J. Clin. Immunol.* 2007:89195. doi: 10.1155/2007/89195
- Cribbs, A., Hookway, E. S., Wells, G., Lindow, M., Obad, S., Oerum, H., et al. (2018). Inhibition of histone H3K27 demethylases selectively modulates inflammatory phenotypes of natural killer cells. *J. Biol. Chem.* 293, 2422–2437. doi: 10.1074/jbc.RA117.000698
- Cruz, D., Watson, A. D., Miller, C. S., Montoya, D., Ochoa, M. T., Sieling, P. A., et al. (2008). Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy. *J. Clin. Invest.* 118, 2917–2928. doi: 10.1172/JCI34189
- Curotto de Lafaille, M. A., Lino, A. C., Kutchukhidze, N., and Lafaille, J. J. (2004). CD25- T cells generate CD25+Foxp3+ regulatory T cells by peripheral expansion. *J. Immunol.* 173, 7259–7268. doi: 10.4049/jimmunol.173.12.7259
- da Paz, W. S., Souza, M. D. R., Tavares, D. D. S., de Jesus, A. R., Dos Santos, A. D., do Carmo, R. F., et al. (2022). Impact of the COVID-19 pandemic on the diagnosis of leprosy in Brazil: an ecological and population-based study. *Lancet Reg. Health Am.* 9:100181. doi: 10.1016/j.lana.2021.100181
- Da Silva, M. B., Li, W., Bouth, R. C., Gobbo, A. R., Messias, A. C. C., Moraes, T. M. P., et al. (2021). Latent leprosy infection identified by dual RLEP and anti-PGL-I positivity: implications for new control strategies. *PLoS One* 16:e0251631. doi: 10.1371/journal.pone.0251631
- Dabral, D., and van den Bogaart, G. (2021). The roles of phospholipase A(2) in phagocytes. *Front. Cell Dev. Biol.* 9:673502. doi: 10.3389/fcell.2021.673502
- Davey, T. F., and Rees, R. J. (1974). The nasal discharge in leprosy: clinical and bacteriological aspects. *Lepr. Rev.* 45, 121–134. doi: 10.5935/0305-7518.19740014
- de Carvalho, F. M., Rodrigues, L. S., Duppre, N. C., Alvim, I. M. P., Ribeiro-Alves, M., Pinheiro, R. O., et al. (2017). Interruption of persistent exposure to leprosy combined or not with recent BCG vaccination enhances the response to *Mycobacterium leprae* specific antigens. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11:e0005560. doi: 10.1371/journal.pntd.0005560
- de Lima, S. E., de Sousa, J. R., de Sousa Aarão, T. L., Fuzii, H. T., Dias Junior, L. B., Carneiro, F. R., et al. (2015). New immunologic pathways in the pathogenesis of leprosy: role for Th22 cytokines in the polar forms of the disease. *J. Am. Acad. Dermatol.* 72, 729–730. doi: 10.1016/j.jaad.2014.11.023
- de Lima, C. S., Marques, M. A., Debie, A. S., Almeida, E. C., Silva, C. A., Brennan, P. J., et al. (2009). Heparin-binding hemagglutinin (HBHA) of *Mycobacterium leprae* is expressed during infection and enhances bacterial adherence to epithelial cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 292, 162–169. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01488.x
- de Macedo, C. S., Anderson, D. M., Pascarelli, B. M., Spraggins, J. M., Sarno, E. N., Schey, K. L., et al. (2015). MALDI imaging reveals lipid changes in the skin of leprosy patients before and after multidrug therapy (MDT). *J. Mass Spectrom.* 50, 1374–1385. doi: 10.1002/jms.3708
- de Macedo, C. S., Lara, F. A., Pinheiro, R. O., Schmitz, V., De Berrêdo-Pinho, M., Pereira, G. M., et al. (2020). New insights into the pathogenesis of leprosy: contribution of subversion of host cell metabolism to bacterial persistence, disease progression, and transmission. *F1000Res.* 9:70. doi: 10.12688/f1000research.21383.1
- de Sousa, J. R., Pagliari, C., de Almeida, D. S. M., Barros, L. F. L., Carneiro, F. R. O., Dias, L. B. Jr., et al. (2017a). Th9 cytokines response and its possible implications in the immunopathogenesis of leprosy. *J. Clin. Pathol.* 70, 521–527. doi: 10.1136/jclinpath-2016-204110
- de Sousa, J. R., Sotto, M. N., and Simões Quaresma, J. A. (2017b). Leprosy as a complex infection: breakdown of the Th1 and Th2 immune paradigm in the Immunopathogenesis of the disease. *Front. Immunol.* 8:1635. doi: 10.3389/fimmu.2017.01635
- Diaz Acosta, C. C., Dias, A. A., Rosa, T., Batista-Silva, L. R., Rosa, P. S., Toledo-Pinto, T. G., et al. (2018). PGL I expression in live bacteria allows activation of a CD206/PPAR γ cross-talk that may contribute to successful *Mycobacterium leprae* colonization of peripheral nerves. *PLoS Pathog.* 14:e1007151. doi: 10.1371/journal.ppat.1007151
- Doz-Deblauwe, É., Carreras, F., Arbues, A., Remot, A., Epardaud, M., Malaga, W., et al. (2019). CR3 engaged by PGL-I triggers Syk-Calcineurin-NFATc to rewire the innate immune response in leprosy. *Front. Immunol.* 10:2913. doi: 10.3389/fimmu.2019.02913
- Dumitrescu, R. G. (2018). Early epigenetic markers for precision medicine. *Methods Mol. Biol.* 1856, 3–17. doi: 10.1007/978-1-4939-8751-1_1
- Ebenezer, G. J., and Scollard, D. M. (2021). Treatment and evaluation advances in leprosy neuropathy. *Neurotherapeutics* 18, 2337–2350. doi: 10.1007/s13311-021-01153-z
- Fábrega, E., Berja, A., García-Unzueta, M. T., Guerra-Ruiz, A., Cobo, M., López, M., et al. (2011). Influence of aquaporin-1 gene polymorphism on water retention in liver cirrhosis. *Scand. J. Gastroenterol.* 46, 1267–1274. doi: 10.3109/00365521.2011.603161
- Fatima, S., Kumari, A., Agarwal, M., Pahuja, I., Yadav, V., Dwivedi, V. P., et al. (2021). Epigenetic code during mycobacterial infections: therapeutic implications for tuberculosis. *FEBS J.* doi: 10.1111/febs.16170
- Ferreira, J. D. S., Souza Oliveira, D. A., Santos, J. P., Ribeiro, C., Baêta, B. A., Teixeira, R. C., et al. (2018). Ticks as potential vectors of *Mycobacterium leprae*: use of tick cell lines to culture the bacilli and generate transgenic strains. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12:e0007001. doi: 10.1371/journal.pntd.0007001
- Finiasz, M. R., Franco, M. C., de la Barrera, S., Rutitzky, L., Pizzariello, G., del Carmen, S. M., et al. (2007). IL-9 promotes anti-*Mycobacterium leprae* cytotoxicity: involvement of IFN γ . *Clin. Exp. Immunol.* 147, 139–147. doi: 10.1111/j.1365-2249.2006.03241.x
- Fischer, N. (2020). Infection-induced epigenetic changes and their impact on the pathogenesis of diseases. *Semin. Immunopathol.* 42, 127–130. doi: 10.1007/s00281-020-00793-1
- Fokkens, W. J., Nolst Trenite, G. J., Virmond, M., KleinJan, A., Andrade, V. L., van Baar, N. G., et al. (1998). The nose in leprosy: immunohistology of the nasal mucosa. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 66, 328–339. PMID: 9934359
- Garbino, J. A., Jardim, M. R., and Marques, W. Jr. (2011). *Hanseníase Neural Primária—Revisão Sistemática. Projeto Diretrizes*. Brasília: AMB/CFM.
- Garbino, J. A., Marques, W. Jr., Barreto, J. A., Heise, C. O., Rodrigues, M. M., Antunes, S. L., et al. (2013). Primary neural leprosy: systematic review. *Arq. Neuropsiquiatr.* 71, 397–404. doi: 10.1590/0004-282X20130046
- Garg, A., Barnes, P. F., Roy, S., Quiroga, M. F., Wu, S., Garcia, V. E., et al. (2008). Mannose-capped lipoarabinomannan- and prostaglandin E2-dependent expansion of regulatory T cells in human *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur. J. Immunol.* 38, 459–469. doi: 10.1002/eji.200737268
- Gkikas, I., Palikaras, K., and Tavernarakis, N. (2018). The role of mitophagy in innate immunity. *Front. Immunol.* 9:1283. doi: 10.3389/fimmu.2018.01283
- Green, A. M., Difazio, R., and Flynn, J. L. (2013). IFN- γ from CD4 T cells is essential for host survival and enhances CD8 T cell function during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol.* 190, 270–277. doi: 10.4049/jimmunol.1200061
- Han, X. Y., and Quintanilla, M. (2015). Diffuse Lepromatous leprosy due to *Mycobacterium lepromatosis* in Quintana Roo, Mexico. *J. Clin. Microbiol.* 53, 3695–3698. doi: 10.1128/JCM.01951-15
- Han, X. Y., Seo, Y. H., Sizer, K. C., Schoberle, T., May, G. S., Spencer, J. S., et al. (2008). A new *Mycobacterium* species causing diffuse lepromatous leprosy. *Am. J. Clin. Pathol.* 130, 856–864. doi: 10.1309/AJCPP72FJZZRRVMM
- Helmstetter, C., Flossdorf, M., Peine, M., Kupz, A., Zhu, J., Hegazy, A. N., et al. (2015). Individual T helper cells have a quantitative cytokine memory. *Immunity* 42, 108–122. doi: 10.1016/j.immuni.2014.12.018

- Hockings, K. J., Mubemba, B., Avanzi, C., Pleh, K., Düx, A., Bersacola, E., et al. (2021). Leprosy in wild chimpanzees. *Nature* 598, 652–656. doi: 10.1038/s41586-021-03968-4
- Jardim, M. R., Antunes, S. L., Santos, A. R., Nascimento, O. J., Nery, J. A., Sales, A. M., et al. (2003). Criteria for diagnosis of pure neural leprosy. *J. Neurol.* 250, 806–809. doi: 10.1007/s00415-003-1081-5
- Job, C. K. (1971). Pathology of peripheral nerve lesions in lepromatous leprosy—a light and electron microscopic study. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 39, 251–268.
- Job, C. K., Jayakumar, J., Kearney, M., and Gillis, T. P. (2008). Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78, 518–521. doi: 10.4269/ajtmh.2008.78.518
- Jordan, P. M., and Werz, O. (2021). Specialized pro-resolving mediators: biosynthesis and biological role in bacterial infections. *FEBS J.* 586–588. doi: 10.1111/febs.16266
- Josefowicz, S. Z., Lu, L. F., and Rudensky, A. Y. (2012). Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 531–564. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623
- Jung, Y. J., and Seoh, J. Y. (2009). Feedback loop of immune regulation by CD4+CD25+ Treg. *Immunobiology* 214, 291–302. doi: 10.1016/j.imbio.2008.09.004
- Kanamori, M., Nakatsukasa, H., Okada, M., Lu, Q., and Yoshimura, A. (2016). Induced regulatory T cells: their development, stability, and applications. *Trends Immunol.* 37, 803–811. doi: 10.1016/j.it.2016.08.012
- Karlsson, L., Das, J., Nilsson, M., Tyrén, A., Pehrson, L., Idh, N., et al. (2021). A differential DNA methylome signature of pulmonary immune cells from individuals converting to latent tuberculosis infection. *Sci. Rep.* 11:19418. doi: 10.1038/s41598-021-98542-3
- Kibbie, J., Teles, R. M., Wang, Z., Hong, P., Montoya, D., Krutzik, S., et al. (2016). Jagged1 instructs macrophage differentiation in leprosy. *PLoS Pathog.* 12:e1005808. doi: 10.1371/journal.ppat.1005808
- Kretschmer, K., Apostolou, I., Hawiger, D., Khazaie, K., Nussenzweig, M. C., and von Boehmer, H. (2005). Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat. Immunol.* 6, 1219–1227. doi: 10.1038/ni1265
- Kumar, R., Halder, P., Sahu, S. K., Kumar, M., Kumari, M., Jana, K., et al. (2012). Identification of a novel role of ESAT-6-dependent miR-155 induction during infection of macrophages with *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell. Microbiol.* 14, 1620–1631. doi: 10.1111/j.1462-5822.2012.01827.x
- Kumar, S., Naqvi, R. A., Ali, R., Rani, R., Khanna, N., and Rao, D. N. (2013). CD4+CD25+ T regs with acetylated FoxP3 are associated with immune suppression in human leprosy. *Mol. Immunol.* 56, 513–520. doi: 10.1016/j.molimm.2013.04.015
- Kumar, S., Naqvi, R. A., Ali, R., Rani, R., Khanna, N., and Rao, D. N. (2014). FoxP3 provides competitive fitness to CD4+CD25+ T cells in leprosy patients via transcriptional regulation. *Eur. J. Immunol.* 44, 431–439. doi: 10.1002/eji.201343649
- Lal, G., and Bromberg, J. S. (2009). Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression. *Blood* 114, 3727–3735. doi: 10.1182/blood-2009-05-219584
- Lázaro, F. P., Werneck, R. I., Mackert, C. C., Cobat, A., Prevedello, F. C., Pimentel, R. P., et al. (2010). A major gene controls leprosy susceptibility in a hyperendemic isolated population from north of Brazil. *J. Infect. Dis.* 201, 1598–1605. doi: 10.1086/652007
- Lee, S. H., Charmoy, M., Romano, A., Paun, A., Chaves, M. M., Cope, F. O., et al. (2018). Mannose receptor high, M2 dermal macrophages mediate nonhealing *Leishmania major* infection in a Th1 immune environment. *J. Exp. Med.* 215, 357–375. doi: 10.1084/jem.20171389
- Li, Y., Yang, W., Wu, B., Liu, Y., Li, D., Guo, Y., et al. (2017). KDM3A promotes inhibitory cytokines secretion by participating in TLR4 regulation of Foxp3 transcription in lung adenocarcinoma cells. *Oncol. Lett.* 13, 3529–3537. doi: 10.3892/ol.2017.5949
- Liu, T. C., Yen, L. Z., Ye, G. Y., and Dung, G. J. (1982). Histology of indeterminate leprosy. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 50, 172–176.
- Llibre, A., Dedicat, M., Burel, J. G., Demangel, C., O'Shea, M. K., and Mauro, C. (2021). Host immune-metabolic adaptations Upon mycobacterial infections and associated co-morbidities. *Front. Immunol.* 12:747387. doi: 10.3389/fimmu.2021.747387
- Lobato, L. S., Rosa, P. S., Ferreira, J. D. S., Neumann Ada, S., da Silva, M. G., do Nascimento, D. C., et al. (2014). Statins increase rifampin mycobactericidal effect. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 5766–5774. doi: 10.1128/AAC.01826-13
- Lucca, L. E., and Dominguez-Villar, M. (2020). Modulation of regulatory T cell function and stability by co-inhibitory receptors. *Nat. Rev. Immunol.* 20, 680–693. doi: 10.1038/s41577-020-0296-3
- Malek, T. R., and Bayer, A. L. (2004). Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 665–674. doi: 10.1038/nri1435
- Marques, M. A., Berredo-Pinho, M., Rosa, T. L., Pujari, V., Lemes, R. M., Lery, L. M., et al. (2015). The essential role of cholesterol metabolism in the intracellular survival of *Mycobacterium leprae* is not coupled to central carbon metabolism and energy production. *J. Bacteriol.* 197, 3698–3707. doi: 10.1128/JB.00625-15
- Martins, M. V., Guimarães, M. M., Spencer, J. S., Hacker, M. A., Costa, L. S., Carvalho, F. M., et al. (2012). Pathogen-specific epitopes as epidemiological tools for defining the magnitude of *Mycobacterium leprae* transmission in areas endemic for leprosy. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6:e1616. doi: 10.1371/journal.pntd.0001616
- Massone, C., Nunzi, E., Ribeiro-Rodrigues, R., Talhari, C., Talhari, S., Schettini, A. P. M., et al. (2010). T regulatory cells and plasmacytoid dendritic cells in Hansen disease: a new insight into pathogenesis? *Am. J. Dermatopathol.* 32, 251–256. doi: 10.1097/DAD.0b013e3181b7fc56
- Mattos, K. A., D'Ávila, H., Rodrigues, L. S., Oliveira, V. G., Sarno, E. N., Atella, G. C., et al. (2010). Lipid droplet formation in leprosy: toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *J. Leukoc. Biol.* 87, 371–384. doi: 10.1189/jlb.0609433
- Mattos, K. A., Lara, F. A., Oliveira, V. G., Rodrigues, L. S., D'Ávila, H., Melo, R. C., et al. (2011a). Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. *Cell. Microbiol.* 13, 259–273. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01533.x
- Mattos, K. A., Oliveira, V. C., Berrêdo-Pinho, M., Amaral, J. J., Antunes, L. C., Melo, R. C., et al. (2014). *Mycobacterium leprae* intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected macrophages: a potential target for new drugs for leprosy treatment. *Cell. Microbiol.* 16, 797–815. doi: 10.1111/cmi.12279
- Mattos, K. A., Oliveira, V. G. C., D'Ávila, H., Rodrigues, L. S., Pinheiro, R. O., Sarno, E. N., et al. (2011b). TLR6-driven lipid droplets in *Mycobacterium leprae*-infected Schwann cells: immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence. *J. Immunol.* 187, 2548–2558. doi: 10.4049/jimmunol.1101344
- McDougall, A. C., Rees, R. J., Weddell, A. G., and Kanan, M. W. (1975). The histopathology of lepromatous leprosy in the nose. *J. Pathol.* 115, 215–226. doi: 10.1002/path.1711150406
- Meeker, H. C., Levis, W. R., Sersen, E., Schuller-Levis, G., Brennan, P. J., and Buchanan, T. M. (1986). ELISA detection of IgM antibodies against phenolic glycolipid-I in the management of leprosy: a comparison between laboratories. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 54, 530–539.
- Meyers, W. M., Walsh, G. P., Brown, H. L., Binford, C. H., Imes, G. D. Jr., Hadfield, T. L., et al. (1985). Leprosy in a mangabey monkey—naturally acquired infection. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 53, 1–14.
- Modlin, R. L., Melancon-Kaplan, J., Young, S. M., Pirmez, C., Kino, H., Convit, J., et al. (1988). Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 1213–1217. doi: 10.1073/pnas.85.4.1213
- Mohr, A., Malhotra, R., Mayer, G., Gorochov, G., and Miyara, M. (2018). Human FOXP3(+) T regulatory cell heterogeneity. *Clin. Transl. Immunology* 7:e1005. doi: 10.1002/cti.1005
- Moura, R. S., Calado, K. L., Oliveira, M. L., and Bührer-Sékula, S. (2008). Leprosy serology using PGL-I: a systematic review. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 41(Suppl 2), 11–18. doi: 10.1590/S0037-86822008000700004
- Moura, D. F., de Mattos, K. A., Amadeu, T. P., Andrade, P. R., Sales, J. S., Schmitz, V., et al. (2012). CD163 favors *Mycobacterium leprae* survival and persistence by promoting anti-inflammatory pathways in lepromatous macrophages. *Eur. J. Immunol.* 42, 2925–2936. doi: 10.1002/eji.201142198
- Nagy, C., and Haschemi, A. (2015). Time and demand are two critical dimensions of immunometabolism: the process of macrophage activation and the pentose phosphate pathway. *Front. Immunol.* 6:164. doi: 10.3389/fimmu.2015.00164
- Nogueira, N., Kaplan, G., Levy, E., Sarno, E. N., Kushner, P., Granelli-Piperno, A., et al. (1983). Defective gamma interferon production in leprosy: Reversal with antigen and interleukin 2. *J. Exp. Med.* 158, 2165–2170. doi: 10.1084/jem.158.6.2165

- Oliveira, M. F., Medeiros, R. C. A., Mietto, B. S., Calvo, T. L., Mendonca, A. P. M., Rosa, T., et al. (2021). Reduction of host cell mitochondrial activity as *Mycobacterium leprae*'s strategy to evade host innate immunity. *Immunol. Rev.* 301, 193–208. doi: 10.1111/immr.12962
- O'Neill, L. A. J., and Artyomov, M. N. (2019). Itaconate: the poster child of metabolic reprogramming in macrophage function. *Nat. Rev. Immunol.* 19, 273–281. doi: 10.1038/s41577-019-0128-5
- O'Neill, L. A., and Hardie, D. G. (2013). Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation. *Nature* 493, 346–355. doi: 10.1038/nature11862
- Page, A. V., and Liles, W. C. (2013). Biomarkers of endothelial activation/dysfunction in infectious diseases. *Virulence* 4, 507–516. doi: 10.4161/viru.24530
- Palermo, M. L., Pagliari, C., Trindade, M. A., Yamashitafuji, T. M., Duarte, A. J., Cacere, C. R., et al. (2012). Increased expression of regulatory T cells and down-regulatory molecules in lepromatous leprosy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 86, 878–883. doi: 10.4269/ajtmh.2012.12-0088
- Parente, J. N., Talhari, C., Schettini, A. P., and Massone, C. (2015). T regulatory cells (TREG)(CD4+CD25+FOXP3+) distribution in the different clinical forms of leprosy and reactional states. *An. Bras. Dermatol.* 90, 41–47. doi: 10.1590/abd1806-4841.20153311
- Pearce, E. L., Poffenberger, M. C., Chang, C. H., and Jones, R. G. (2013). Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. *Science* 342:1242454. doi: 10.1126/science.1242454
- Pearson, J. M., and Weddell, A. G. (1975). Perineurial changes in untreated leprosy. *Lepr. Rev.* 46, 51–67. doi: 10.5935/0305-7518.19750007
- Pinheiro, R. O., Schmitz, V., Silva, B. J. A., Dias, A. A., de Souza, B. J., de Mattos Barbosa, M. G., et al. (2018). Innate Immune Responses in Leprosy. *Front. Immunol.* 9:518. doi: 10.3389/fimmu.2018.00518
- Pinto, P., da Silva, M. B., Moreira, F. C., Bouth, R. C., Gobbo, A. R., Sandoval, T. V., et al. (2020). Leprosy pIRNOME: exploring new possibilities for an old disease. *Sci. Rep.* 10:12648. doi: 10.1038/s41598-020-69355-7
- Polycarpou, A., Holland, M. J., Karageorgiou, I., Eddaoudi, A., Walker, S. L., Wilcocks, S., et al. (2016). *Mycobacterium leprae* activates toll-like receptor-4 signaling and expression on macrophages depending on previous Bacillus Calmette-Guérin vaccination. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6:72. doi: 10.3389/fcimb.2016.00072
- Rabello, F., Bechelli, L., and Rotberg, A. (1953). Propositions of a group of leprologists of Madrid regarding the classification of leprosy. *Actas Dermosifilogr.* 44, 706–708. PMID: 13138376
- Rambukkana, A., Yamada, H., Zanazzi, G., Mathus, T., Salzer, J. L., Yurchenco, P. D., et al. (1998). Role of alpha-dystroglycan as a Schwann cell receptor for *Mycobacterium leprae*. *Science* 282, 2076–2079. doi: 10.1126/science.282.5396.2076
- Rea, T. H., and Jersey, R. S. (2005). Clinical and histologic variations among thirty patients with Lucio's phenomenon and pure and primitive diffuse lepromatosis (Latapi's lepromatosis). *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 73, 169–188.
- Reis, E. M., Araujo, S., Lobato, J., Neves, A. F., Costa, A. V., Goncalves, M. A., et al. (2014). *Mycobacterium leprae* DNA in peripheral blood may indicate a bacilli migration route and high-risk for leprosy onset. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 447–452. doi: 10.1111/1469-0691.12349
- Reolid, A., Muñoz-Aceituno, E., Abad-Santos, F., Ovejero-Benito, M. C., and Daudén, E. (2021). Epigenetics in non-tumor immune-mediated skin diseases. *Mol. Diagn. Ther.* 25, 137–161. doi: 10.1007/s40291-020-00507-1
- Reynolds, G., Vegh, P., Fletcher, J., Poyner, E. F. M., Stephenson, E., Goh, I., et al. (2021). Developmental cell programs are co-opted in inflammatory skin disease. *Science* 371, 661–664. doi: 10.1126/science.aba6500
- Ridley, D. S., and Jopling, W. H. (1966). Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 34, 255–273. PMID: 5950347
- Rodrigues, L. S., da Silva, M. E., Moreira, M. E., Tempone, A. J., Lobato, L. S., Ribeiro-Resende, V. T., et al. (2010). *Mycobacterium leprae* induces insulin-like growth factor and promotes survival of Schwann cells upon serum withdrawal. *Cell. Microbiol.* 12, 42–54. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01377.x
- Rodriguez-Prados, J. C., Través, P. G., Cuenca, J., Rico, D., Aragonés, J., Martín-Sanz, P., et al. (2010). Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation. *J. Immunol.* 185, 605–614. doi: 10.4049/jimmunol.0901698
- Rosa, T., Marques, M. A. M., DeBoard, Z., Hutchins, K., Silva, C. A. A., Montague, C. R., et al. (2021). Reductive power generated by *Mycobacterium leprae* Through cholesterol oxidation contributes to lipid and ATP synthesis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11:765326. doi: 10.3389/fcimb.2021.765326
- Russell, D. G. (2003). Phagosomes, fatty acids and tuberculosis. *Nat. Cell Biol.* 5, 776–778. doi: 10.1038/ncb0903-776
- Saini, C., Ramesh, V., and Nath, I. (2014). Increase in TGF- β secreting CD4⁺CD25⁺ FOXP3⁺ T regulatory cells in anergic lepromatous leprosy patients. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8:e2639. doi: 10.1371/journal.pntd.0002639
- Saini, C., Siddiqui, A., Ramesh, V., and Nath, I. (2016). Leprosy reactions show increased Th17 cell activity and reduced FOXP3⁺ Tregs with concomitant decrease in TGF- β and increase in IL-6. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10:e0004592. doi: 10.1371/journal.pntd.0004592
- Sakurai, I., and Skinsnes, O. K. (1970). Lipids in leprosy. 2. Histochemistry of lipids in human leprosy. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 38, 389–403.
- Salgado, C. G., Pinto, P., Bouth, R. C., Gobbo, A. R., Messias, A. C. C., Sandoval, T. V., et al. (2018). miRNOME expression analysis reveals new players on leprosy immune physiopathology. *Front. Immunol.* 9:463. doi: 10.3389/fimmu.2018.00463
- Salgame, P., Abrams, J. S., Clayberger, C., Goldstein, H., Convit, J., Modlin, R. L., et al. (1991). Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science* 254, 279–282. doi: 10.1126/science.254.5029.279
- Sallusto, F., Geginat, J., and Lanzavecchia, A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 745–763. doi: 10.1146/annurevimmunol.22.012703.104702
- Santegoets, S. J. A. M., Dijkgraaf, E. M., Battaglia, A., Beckhove, P., Britten, C. M., Gallimore, A., et al. (2015). Monitoring regulatory T cells in clinical samples: consensus on an essential marker set and gating strategy for regulatory T cell analysis by flow cytometry. *Cancer Immunol. Immunother.* 64, 1271–1286. doi: 10.1007/s00262-015-1729-x
- Santos, M. B., de Oliveira, D. T., Cazzaniga, R. A., Varjão, C. S., Dos Santos, P. L., Santos, M. L. B., et al. (2017). Distinct roles of Th17 and Th1 cells in inflammatory responses associated with the presentation of Paucibacillary leprosy and leprosy reactions. *Scand. J. Immunol.* 86, 40–49. doi: 10.1111/sji.12558
- Schilling, A. K., Del-Pozo, J., Lurz, P. W. W., Stevenson, K., Avanzi, C., Shuttleworth, C. M., et al. (2019). Leprosy in red squirrels in the UK. *Vet. Rec.* 184:416. doi: 10.1136/vr11385
- Schreiber, T. H. (2007). The use of FoxP3 as a biomarker and prognostic factor for malignant human tumors. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 16, 1931–1934. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-07-0396
- Schreiber, L., Pietzsch, B., Floess, S., Farah, C., Jänsch, L., Schmitz, I., et al. (2014). The Treg-specific demethylated region stabilizes Foxp3 expression independently of NF- κ B signaling. *PLoS One* 9:e88318. doi: 10.1371/journal.pone.0088318
- Schwab, J. M., Chiang, N., Arita, M., and Serhan, C. N. (2007). Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature* 447, 869–874. doi: 10.1038/nature05877
- Scollard, D. M., Adams, L. B., Gillis, T. P., Krahenbuhl, J. L., Truman, R. W., and Williams, D. L. (2006). The continuing challenges of leprosy. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 338–381. doi: 10.1128/CMR.19.2.338-381.2006
- Scollard, D. M., McCormick, G., and Allen, J. L. (1999). Localization of *Mycobacterium leprae* to endothelial cells of epineurial and perineurial blood vessels and lymphatics. *Am. J. Pathol.* 154, 1611–1620. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65414-4
- Scollard, D. M., Truman, R. W., and Ebenezzer, G. J. (2015). Mechanisms of nerve injury in leprosy. *Clin. Dermatol.* 33, 46–54. doi: 10.1016/j.clinidmatol.2014.07.008
- Sehgal, V. N., and Srivastava, G. (1987). Indeterminate leprosy: A passing phase in the evolution of leprosy. *Lepr. Rev.* 58, 291–299. doi: 10.5935/0305-7518.19870032
- Sharma, R., Singh, P., Loughry, W. J., Lockhart, J. M., Inman, W. B., Duthie, M. S., et al. (2015). Zoonotic leprosy in the southeastern United States. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 2127–2134. doi: 10.3201/eid2112.150501
- Sieling, P. A., and Modlin, R. L. (1992). T cell and cytokine patterns in leprosy skin lesions. *Springer Semin. Immunopathol.* 13, 413–426.
- Silva, C. A. M., and Belisle, J. T. (2018). Host lipid mediators in leprosy: the hypothesized contributions to pathogenesis. *Front. Immunol.* 9:134. doi: 10.3389/fimmu.2018.00134

- Silva, C. A., Danelishvili, L., McNamara, M., Berredo-Pinho, M., Bildfell, R., Biet, E., et al. (2013). Interaction of *Mycobacterium leprae* with human airway epithelial cells: adherence, entry, survival, and identification of potential adhesins by surface proteome analysis. *Infect. Immunol.* 81, 2645–2659. doi: 10.1128/IAI00147-13
- Soares, C. T., Trombone, A. P. F., Fachin, L. R. V., Rosa, P. S., Ghidella, C. C., Ramalho, R. F., et al. (2017). Differential expression of MicroRNAs in leprosy skin lesions. *Front. Immunol.* 8:1035. doi: 10.3389/fimmu.2017.01035
- Spellberg, B., and Edwards, J. E. Jr. (2001). Type 1/type 2 immunity in infectious diseases. *Clin. Infect. Dis.* 32, 76–102. doi: 10.1086/317537
- Su, L. F., Del Alcazar, D., Stelekati, E., Wherry, E. J., and Davis, M. M. (2016). Antigen exposure shapes the ratio between antigen-specific Tregs and conventional T cells in human peripheral blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E6192–E6198. doi: 10.1073/pnas.1611723113
- Suneetha, S., Arunthathi, S., Job, A., Date, A., Kurian, N., and Chacko, C. J. (1998). Histological studies in primary neuritic leprosy: changes in the nasal mucosa. *Lepr. Rev.* 69, 358–366. doi: 10.5935/0305-7518.19980036
- Taal, A. T., Blok, D. J., Van Brakel, W. H., De Vlas, S. J., and Richardus, J. H. (2021). Number of people requiring post-exposure prophylaxis to end leprosy: a modeling study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 15:e0009146. doi: 10.1371/journal.pntd.0009146
- Tabouret, G., Astarie-Dequeker, C., Demangel, C., Malaga, W., Constant, P., Ray, A., et al. (2010). *Mycobacterium leprae* phenolglycolipid-1 expressed by engineered *M. bovis* BCG modulates early interaction with human phagocytes. *PLoS Pathog.* 6:e1001159. doi: 10.1371/journal.ppat.1001159
- Talhari, C., Talhari, S., and Penna, G. O. (2015). Clinical aspects of leprosy. *Clin. Dermatol.* 33, 26–37. doi: 10.1016/j.clindermatol.2014.07.002
- Tam, S. K. M., and Leung, D. C. Y. (2021). Epigenomic and transcriptomic analysis of chronic inflammatory diseases. *Genes Genomics* 43, 227–236. doi: 10.1007/s13258-021-01045-8
- Teles, R. M., Antunes, S. L., Jardim, M. R., Oliveira, A. L., Nery, J. A., Sales, A. M., et al. (2007). Expression of metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, and TACE) and TNF-alpha in the nerves of leprosy patients. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 12, 195–204. doi: 10.1111/j.1529-8027.2007.00139.x
- Toledo Pinto, T. G., Batista-Silva, L. R., Medeiros, R. C. A., Lara, F. A., and Moraes, M. O. (2018). Type I interferons, autophagy and host metabolism in leprosy. *Front. Immunol.* 9:806. doi: 10.3389/fimmu.2018.00806
- van der Wel, N., Hava, D., Houben, D., Fluitsma, D., van Zon, M., Pierson, J., et al. (2007). *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell* 129, 1287–1298. doi: 10.1016/j.cell.2007.05.059
- Van Hooij, A., Tjon Kon Fat, E. M., Batista Da Silva, M., Carvalho Bouth, R., Cunha Messias, A. C., Gobbo, A. R., et al. (2018). Evaluation of immunodiagnostic tests for leprosy in Brazil, China and Ethiopia. *Sci. Rep.* 8:17920. doi: 10.1038/s41598-018-36323-1
- Verkman, A. S. (2005). More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J. Cell Sci.* 118(Pt 15), 3225–3232. doi: 10.1242/jcs.02519
- Wang, C., Yang, S., Sun, G., Tang, X., Lu, S., Neyrolles, O., et al. (2011). Comparative miRNA expression profiles in individuals with latent and active tuberculosis. *PLoS One* 6:e25832. doi: 10.1371/journal.pone.0026739
- Werner, M., Jordan, P. M., Romp, E., Czapka, A., Rao, Z., Kretzer, C., et al. (2019). Targeting biosynthetic networks of the proinflammatory and proresolving lipid metabolome. *FASEB J.* 33, 6140–6153. doi: 10.1096/fj.201802509R
- Werz, O., Gerstmeier, J., Libreros, S., De la Rosa, X., Werner, M., Norris, P. C., et al. (2018). Human macrophages differentially produce specific resolvins or leukotriene signals that depend on bacterial pathogenicity. *Nat. Commun.* 9:59. doi: 10.1038/s41467-017-02538-5
- Yamamura, M., Uyemura, K., Deans, R. J., Weinberg, K., Rea, T. H., Bloom, B. R., et al. (1991). Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 254, 277–279. doi: 10.1126/science.254.5029.277
- Yang, X. J., and Seto, E. (2007). HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene* 26, 5310–5318. doi: 10.1038/sj.onc.1210599
- Yu, H., Wu, H., Zheng, F., Zhu, C., Yin, L., Dai, W., et al. (2020). Gene-regulatory network analysis of ankylosing spondylitis with a single-cell chromatin accessible assay. *Sci. Rep.* 10:19411. doi: 10.1038/s41598-020-76574-5
- Zhang, Q., and Cao, X. (2021). Epigenetic remodeling in innate immunity and inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* 39, 279–311. doi: 10.1146/annurev-immunol-093019-123619
- Zheng, Y., Josefowicz, S., Chaudhry, A., Peng, X. P., Forbush, K., and Rudensky, A. Y. (2010). Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature* 463, 808–812. doi: 10.1038/nature08750
- Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.
- Copyright © 2022 Cabral, de Figueiredo, Gandini, de Souza, Medeiros, Lery, Lana, de Macedo, Pessolani and Pereira. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Changes in B Cell Pool of Patients With Multibacillary Leprosy: Diminished Memory B Cell and Enhanced Mature B in Peripheral Blood

Otto Castro Nogueira^{1†}, Mariana Gandini^{1†}, Natasha Cabral¹, Vilma de Figueiredo¹, Rodrigo Nunes Rodrigues-da-Silva², Josué da Costa Lima-Junior², Roberta Olmo Pinheiro³, Geraldo Moura Batista Pereira¹, Maria Cristina Vidal Pessolani¹ and Cristiana Santos de Macedo^{1,4*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Maria Teresa Ochoa,
University of Southern California,
United States

Reviewed by:

Andre Talvani,
Universidade Federal de Ouro Preto,
Brazil
Yean Kong Yong,
Xiamen University, Malaysia

*Correspondence:

Cristiana Santos de Macedo
cristiana.macedo@cdts.fiocruz.br

[†]These authors have contributed
equally to this work and share
first authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 18 June 2021

Accepted: 31 August 2021

Published: 21 September 2021

Citation:

Nogueira OC, Gandini M, Cabral N, de Figueiredo V, Rodrigues-da-Silva RN, Lima-Junior JdC, Pinheiro RO, Pereira GMB, Pessolani MCV and de Macedo CS (2021) Changes in B Cell Pool of Patients With Multibacillary Leprosy: Diminished Memory B Cell and Enhanced Mature B in Peripheral Blood. *Front. Immunol.* 12:727580. doi: 10.3389/fimmu.2021.727580

¹ Cellular Microbiology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil,

² Immunoparasitology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil, ³ Leprosy Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil, ⁴ Center for Technological Development in Health, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

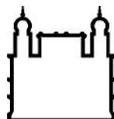
Despite being treatable, leprosy still represents a major public health problem, and many mechanisms that drive leprosy immunopathogenesis still need to be elucidated. B cells play important roles in immune defense, being classified in different subgroups that present distinct roles in the immune response. Here, the profile of B cell subpopulations in peripheral blood of patients with paucibacillary (TT/BT), multibacillary (LL/BL) and erythema nodosum leprosum was analyzed. B cell subpopulations (memory, transition, plasmablasts, and mature B cells) and levels of IgG were analyzed by flow cytometry and ELISA, respectively. It was observed that *Mycobacterium leprae* infection can alter the proportions of B cell subpopulations (increase of mature and decrease of memory B cells) in patients affected by leprosy. This modulation is associated with an increase in total IgG and the patient's clinical condition. Circulating B cells may be acting in the modulation of the immune response in patients with various forms of leprosy, which may reflect the patient's ability to respond to *M. leprae*.

Keywords: *Mycobacterium leprae*, B lymphocytes, B cell differentiation, active immune response, erythema nodosum leprosum

INTRODUCTION

Leprosy is a chronic infectious disease caused by the intracellular pathogen *Mycobacterium leprae*, which is endemic in many countries: in 2019, WHO reported 202,185 new cases worldwide (1, 2). The disease presents a complex clinical and immunopathological spectrum: at one end, tuberculoid leprosy (TT), in which skin lesions are characterized by a classical epithelioid cell granuloma formation, with a strong pro-inflammatory Th1/Th17 cellular immune response and consequent bacterial growth control. On the opposite side, lepromatous leprosy (LL), is characterized by a

8.5 Anexo 5: Termos de consentimento livre e esclarecido



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Laboratório de Microbiologia Celular

IOC/FIOCRUZ

Consentimento Livre e Esclarecimento Para Participação em Projeto

Título do projeto: Caracterização da resposta imune protetora induzida pela vacinação com BCG em contatos de pacientes com hanseníase.

Nome do pesquisador responsável: Dr. Geraldo Moura Batista Pereira.

Nome e telefone de contato para dúvidas e problemas: Dr. Geraldo Moura Batista Pereira. Telefone: 21 2562-1611.

Para esclarecimentos sobre a eticidade do projeto: Comitê de ética em pesquisa - endereço: Av. Brasil 4036, sala 705, campus Expansão - Manguinhos, telefone: 38829011, cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

O presente estudo tem por finalidade realizar um conjunto de análises em indivíduos com hanseníase, seus contatos domiciliares, indivíduos sadios sem contato conhecido com esta doença e pacientes com doenças inflamatórias não causadas pelo *Mycobacterium leprae* que é o agente causador da hanseníase, com o objetivo entender a resposta imune de grupos de indivíduos com maior risco de desenvolver a doença ativa, de forma a contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias no controle da hanseníase.

É importante por isso, que você leia esse documento com atenção e calma para decidir se você quer ser incluído no grupo que vai participar desse estudo. Se você decidir que não quer participar dessa pesquisa, a sua decisão será totalmente respeitada. Da mesma forma, se você aceitar participar e a qualquer momento desistir dessa participação, você pode entrar em contato com o pesquisador responsável (Dr. Geraldo Pereira) e pedir para retirá-lo do estudo. O participante não terá direito à compensação financeira em face de sua

participação no presente projeto. Não haverá também despesa pessoal para o participante em qualquer etapa do estudo.

Nós solicitamos que você participe do estudo porque você não tem hanseníase e desconhece qualquer contato prévio com alguém que tenha tido. Além do exame clínico ao qual você será submetido, pedimos que você nos forneça até 40 mL de sangue.

Esse material será armazenado no Laboratório de Microbiologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz, podendo ser utilizado para outras pesquisas de acordo com a aprovação do Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz, instituição colaboradora do presente projeto. O motivo para que esse material seja armazenado é que os experimentos serão feitos gradativamente e não todos de uma só vez. Além disso, novas perguntas científicas surgem entre os pesquisadores, que necessitam de material adicional dos próprios pacientes para ser esclarecidas. As amostras biológicas já armazenadas serão utilizadas para responder a estas perguntas, quando possível.

Não costumamos contatar o participante para divulgar os resultados da nossa pesquisa, porém se o mesmo assim o desejar, ele poderá entrar em contato com o pesquisador responsável para saber detalhes sobre os resultados.

Para maiores detalhes sobre os riscos, inconveniências, desconfortos e outras informações pertinentes relativas à sua participação neste projeto, veja a seção seguinte.

Procedimento e métodos usados

Coleta de sangue: Uma pessoa bem treinada neste procedimento fará a punção da veia do seu antebraço. O procedimento toma de 5 a 10 minutos, e é idêntico àqueles usados em outros exames laboratoriais.

Desconfortos e riscos: Os possíveis desconfortos e riscos, se ocorrerem, são aqueles relacionados com a retirada de sangue, como dor local e/ou hematoma (rouidão) no local, e infecção (muito raramente). A quantidade de sangue necessária para o estudo é muito pequena, e muito provavelmente não causará nenhuma complicação.

Benefícios: Não há benefício direto, porém esse estudo beneficiará futuramente toda a população, já que a investigação da modulação da resposta imune possui relevância para a prevenção o tratamento de doenças infecciosas como a hanseníase.

Confiabilidade: As pessoas que vão punccionar o seu sangue e os pesquisadores que estão coordenando este estudo irão tratar sua identidade com padrões profissionais de confiabilidade. Nas amostras não constarão o seu nome, e ninguém (exceto os pesquisadores envolvidos no estudo) serão capazes de identificar você como doador desta amostra. As informações obtidas neste estudo talvez sejam publicadas em jornais científicos, mas a sua identidade não será revelada.

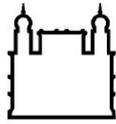
Responsabilidade: A comissão de Ética responsabilizará o coordenador responsável pelo estudo por qualquer transtorno que aconteça durante o estudo. O médico responsável colocou-me a par destas informações, estando à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver novas dúvidas. Também tenho toda liberdade para entrar em contato com o pesquisador responsável: Dr. Geraldo Moura Batista Pereira.

Assinatura do
pesquisador: _____ Data: _____

Participação: Minha participação neste estudo é inteiramente voluntária, e eu sou livre para me recusar a participar no estudo, ou me retirar em qualquer fase da pesquisa. Assinar este documento significa que você leu as informações deste termo de consentimento, datou e recebeu uma via de igual teor a do pesquisador.

Nome _____ Data: _____

Assinatura _____



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Laboratório de Microbiologia Celular

IOC/FIOCRUZ

Consentimento Livre e Esclarecimento Para Participação em Projeto

Título do projeto: Caracterização da resposta imune protetora induzida pela vacinação com BCG em contatos de pacientes com hanseníase.

Nome do pesquisador responsável: Dr. Geraldo Moura Batista Pereira.

Nomes e telefones de contato para questões e problemas: Dr. Geraldo Moura Batista Pereira. 21-2562-1611.

Endereço: Av. Brasil 4036, sala 705, campus Expansão - Manguinhos, telefone: 38829011, cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

O presente estudo tem por finalidade realizar um conjunto de análises em indivíduos com hanseníase, seus contatos domiciliares, indivíduos sadios sem contato conhecido com esta doença e pacientes com doenças inflamatórias não causadas pelo *Mycobacterium leprae* que é o agente causador da hanseníase, com o objetivo entender a resposta imune de grupos de indivíduos com maior risco de desenvolver a doença ativa, de forma a contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias no controle da hanseníase.

É importante por isso, que você leia esse documento com atenção e calma para decidir se você quer ser incluído no grupo que vai participar desse estudo. Se você decidir que não quer participar dessa pesquisa, a sua decisão será totalmente respeitada e o seu tratamento médico acontecerá normalmente como o de todos os pacientes que frequentam esse serviço clínico, não havendo nenhum prejuízo para a sua assistência médica enquanto durar o seu tratamento. Da mesma forma, se você aceitar participar e a qualquer momento desistir dessa participação, a sua assistência médica continuará acontecendo normalmente como a de todos os pacientes deste serviço. O participante não terá direito à compensação financeira em face de sua participação no presente projeto. Não

haverá também despesa pessoal para o participante em qualquer etapa do estudo.

Nós solicitamos que você participe do estudo porque você é um paciente com hanseníase. Além do exame clínico ao qual você será submetido, pedimos que você nos forneça até 40 mL de sangue e um fragmento de pele através de biópsia de uma lesão a ser escolhida pelo médico. Será também coletado material da superfície da sua pele, através de uma pequena placa de sílica que ficará em contato com a sua pele por 1 (um) minuto. Este procedimento é totalmente indolor e não-invasivo.

Esse material será armazenado no Laboratório de Microbiologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz, podendo ser utilizado para outras pesquisas de acordo com a aprovação do Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz, instituição colaboradora do presente projeto. O motivo para que esse material seja armazenado é que os experimentos serão feitos gradativamente e não todos de uma só vez. Além disso, novas perguntas científicas surgem entre os pesquisadores, que necessitam de material adicional dos próprios pacientes para ser esclarecidas. As amostras biológicas já armazenadas serão utilizadas para responder a estas perguntas, quando possível. A placa de sílica será enviada para análise no laboratório Innovare, na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Não costumamos entrar em contato com os participantes para divulgar os resultados da nossa pesquisa, porém se o mesmo assim o desejar, ele poderá entrar em contato com o pesquisador responsável para saber detalhes sobre os resultados. Para maiores detalhes sobre os riscos, inconveniências, desconfortos e outras informações pertinentes relativas à sua participação neste projeto, vejam a seção seguinte.

Procedimento e métodos usados

Coleta de sangue: Uma pessoa bem treinada neste procedimento fará a punção da veia do seu antebraço. O procedimento toma de 5 a 10 minutos, e é idêntico àqueles usados em outros exames laboratoriais.

Desconfortos e riscos: Os possíveis desconfortos e riscos, se ocorrerem, são aqueles relacionados com a retirada de sangue, como dor local e/ou hematoma (rouxidão) no local, e infecção (muito raramente). A quantidade de sangue necessária para o estudo é muito pequena, e provavelmente não causará nenhuma complicação.

Coleta de material da superfície da pele: uma placa de sílica (1 x 1 cm) será colocada sobre a pele, e deixada por 1 (um) minuto.

Desconfortos e riscos: não há.

Biópsia (retirada de um pedaço de pele com mancha ou lesão): Após anestesia local, um pequeno fragmento de pele será retirado pelo médico para auxiliar no diagnóstico da hanseníase e afastar a possibilidade de outras doenças. Desse fragmento, utilizaremos uma pequena parte que será armazenada em nosso laboratório a fim de responder aos questionamentos dos pesquisadores que podem surgir ao longo dos anos.

Desconfortos e riscos: Pode ocorrer uma pequena dor após o efeito da anestesia. Raramente ocorre infecção.

Benefícios: As amostras doadas por você auxiliarão no seu diagnóstico. Além disso, esse estudo beneficiará futuramente toda a população, já que a investigação da modulação da resposta imune possui relevância para a prevenção e o tratamento de doenças infecciosas como a hanseníase.

Confiabilidade: As pessoas que vão punccionar o seu sangue e os pesquisadores que estão coordenando este estudo irão tratar sua identidade com padrões profissionais de confiabilidade. Nas amostras não constarão o seu nome, e ninguém (exceto os pesquisadores envolvidos no estudo) serão capazes de identificar você como doador desta amostra. As informações obtidas neste estudo talvez sejam publicadas em jornais científicos, mas a sua identidade não será revelada.

Responsabilidade: A comissão de Ética responsabilizará o coordenador responsável pelo estudo por qualquer transtorno que aconteça durante o estudo. O médico responsável colocou-me a par destas informações, estando à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver novas dúvidas. Também tenho toda liberdade para entrar em contato com o pesquisador responsável: Dr. Geraldo Moura Batista Pereira.

Assinatura do pesquisador: _____ Data: _____

Participação: Minha participação neste estudo é inteiramente voluntária, e eu sou livre para me recusar a participar no estudo, ou me retirar em qualquer fase da pesquisa. Assinar este documento significa que você leu as informações deste termo de consentimento, datou e recebeu uma via de igual teor a do pesquisador.

Nome _____ Data: _____

Assinatura _____

Consentimento Livre e Esclarecimento Para Participação em Projeto

Título do projeto: Padrão de resposta celular e humoral ao antígeno hemaglutinina ligante de heparina (HBHA) de *Mycobacterium leprae* como potencial ferramenta para o diagnóstico da hanseníase.

Nome do pesquisador responsável: Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani

Nome e telefone de contato para dúvidas e problemas: Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani. Telefone: 21 2562-1553.

Para esclarecimentos sobre a eticidade do projeto: Comitê de ética em pesquisa - endereço: Av. Brasil 4036, sala 705, campus Expansão - Manguinhos, telefone: 38829011, cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Este estudo tem por finalidade ajudar a entender por que as pessoas adoecem de hanseníase. Esta doença é causada pelo *Mycobacterium leprae* e pode causar lesões de pele e danos aos nervos das pessoas. Dessa maneira, será necessário realizar um conjunto de análises em pacientes com hanseníase, seus contatos domiciliares, indivíduos sadios que não conhecem pessoas com hanseníase, pacientes com neuropatias que não estejam com hanseníase e pessoas com tuberculose que é uma doença causada por uma bactéria parecida com a que causa a hanseníase, para entendermos o motivo das pessoas adoecerem e também trabalharmos no desenvolvimento de novas estratégias no controle da hanseníase.

É importante que você leia esse documento com bastante atenção para decidir se aceita ou não participar deste projeto de pesquisa. Se você decidir que não quer participar dessa pesquisa, a sua decisão será totalmente respeitada. Da mesma forma, se você aceitar participar e a qualquer momento desistir dessa participação, a sua assistência médica continuará acontecendo normalmente. O participante não terá direito à compensação financeira em face de sua participação no presente projeto e também não haverá despesa pessoal para o participante em qualquer etapa do estudo. Conforme a Resolução no. 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, Ministério da Saúde (CNS/MS) você tem direito a receber cobertura material para reparação de eventual dano decorrente desta pesquisa.

Nós solicitamos que você participe do estudo porque você não tem hanseníase e não conhece pessoas que adoeceram desta doença. Após a sua consulta de rotina, pedimos que você nos forneça até 40 mL de sangue. Uma parte das amostras coletadas será guardada no Laboratório de Microbiologia Celular da FIOCRUZ, sob responsabilidade da Dra. Maria

Cristina Vidal Pessolani que é a responsável pelo projeto e pesquisadora responsável pelo laboratório de Microbiologia Celular, podendo ser utilizado em pesquisas futuras de acordo com a aprovação do Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz, instituição colaboradora do presente projeto. A decisão de nos autorizar a armazenar as suas amostras para pesquisas futuras é voluntária. Se você decidir não armazenar, nós destruiremos suas amostras ao final do estudo. A qualquer momento você poderá entrar em contato com os pesquisadores e pedir que seu sangue não seja mais usado para pesquisa; neste caso, todas as suas amostras identificáveis, que forem encontradas em nosso laboratório serão destruídas. O motivo para que esse material seja armazenado é que os a pesquisa será feita aos pouquinhos e não tudo de uma vez. Além disso, novas perguntas científicas surgem entre os pesquisadores, e novas análises podem ser necessárias com as amostras já armazenadas para responder a estas perguntas, quando possível.

Não costumamos contatar o participante para divulgar os resultados da nossa pesquisa, porém se o mesmo assim o desejar, ele poderá entrar em contato com o pesquisador responsável para saber detalhes sobre os resultados.

Para maiores detalhes sobre os riscos, inconveniências, desconfortos e outras informações pertinentes relativas à sua participação neste projeto, veja a seção seguinte.

Procedimento e métodos usados

Coleta de sangue: Uma pessoa bem treinada neste procedimento fará a punção da veia do seu antebraço. O procedimento toma de 5 a 10 minutos, e é idêntico àqueles usados em outros exames laboratoriais.

Desconfortos e riscos: Os possíveis desconfortos e riscos, se ocorrerem, são aqueles relacionados com a retirada de sangue, como dor local e/ou hematoma (rouxidão) no local. A quantidade de sangue necessária para o estudo é muito pequena, e muito provavelmente não causará nenhuma complicação.

Benefícios: Esse tipo de estudo beneficiará futuramente toda a população, já que estaremos investigando o motivo pelo qual as pessoas adoecem de hanseníase e o desenvolvimento de estratégias mais eficientes para o controle da doença que permanece até os dias de hoje como problema de saúde pública.

Confidencialidade: As pessoas que vão coletar o seu sangue e os pesquisadores que estão coordenando este estudo irão tratar sua identidade com padrões profissionais de confidencialidade. Nas amostras não constarão o seu nome, e ninguém (exceto os pesquisadores envolvidos no estudo) será capaz de identificar você como doador desta amostra. As informações obtidas neste estudo talvez sejam publicadas em jornais científicos, mas a sua identidade não será revelada.

Responsabilidade: A comissão de Ética responsabilizará a coordenadora responsável pelo estudo por qualquer transtorno que aconteça durante o estudo. O médico responsável colocou-me a par destas informações, estando à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver novas dúvidas. Também tenho toda liberdade para entrar em contato com a pesquisadora responsável: Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani.

Marque abaixo as opções para armazenamento ou não das suas amostras para utilização em pesquisas futuras do Laboratório de Microbiologia Celular.

Aceito participar da pesquisa e armazenar as minhas amostras de sangue para serem utilizadas em pesquisas futuras do Laboratório de Microbiologia Celular

Sim Não

Aceito participar da pesquisa, mas não quero armazenar as minhas amostras de sangue para serem utilizadas em pesquisas futuras do Laboratório de Microbiologia Celular. Assim que essa pesquisa terminar, desejo que as minhas amostras de sangue sejam destruídas.

Sim Não

Participação: Minha participação neste estudo é inteiramente voluntária, e eu sou livre para me recusar a participar no estudo, ou me retirar em qualquer fase da pesquisa. Assinar este documento significa que você leu as informações deste termo de consentimento, datou e recebeu uma via de igual teor a do pesquisador.

Nome _____ Data: _____

Assinatura _____

Nome da pesquisadora responsável:

_____ Data: _____

Assinatura da pesquisadora responsável:

Consentimento Livre e Esclarecimento Para Participação em Projeto

Título do projeto: Padrão de resposta celular e humoral ao antígeno hemaglutinina ligante de heparina (HBHA) de *Mycobacterium leprae* como potencial ferramenta para o diagnóstico da hanseníase.

Nome do pesquisador responsável: Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani

Nome e telefone de contato para dúvidas e problemas: Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani. Telefone: 21 2562-1553.

Para esclarecimentos sobre a eticidade do projeto: Comitê de ética em pesquisa - endereço: Av. Brasil 4036, sala 705, campus Expansão - Manguinhos, telefone: 38829011, cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Este estudo tem por finalidade ajudar a entender por que as pessoas adoecem de hanseníase. Esta doença é causada pelo *Mycobacterium leprae* e pode causar lesões de pele e danos aos nervos das pessoas. Dessa maneira, será necessário realizar um conjunto de análises em pacientes com hanseníase, seus contatos domiciliares, indivíduos sadios que não conhecem pessoas com hanseníase, pacientes com neuropatias que não estejam com hanseníase e pessoas com tuberculose que é uma doença causada por uma bactéria parecida com a que causa a hanseníase, para entendermos o motivo das pessoas adoecerem e também trabalharmos no desenvolvimento de novas estratégias no controle da hanseníase.

É importante que você leia esse documento com bastante atenção para decidir se aceita ou não participar deste projeto de pesquisa. Se você decidir que não quer participar dessa pesquisa, a sua decisão será totalmente respeitada. Da mesma forma, se você aceitar participar e a qualquer momento desistir dessa participação, a sua assistência médica continuará acontecendo normalmente. O participante não terá direito à compensação financeira em face de sua participação no presente projeto e também não haverá despesa pessoal para o participante em qualquer etapa do estudo. Conforme a Resolução no. 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, Ministério da Saúde (CNS/MS) você tem direito a receber cobertura material para reparação de eventual dano decorrente desta pesquisa.

Nós solicitamos que você participe do estudo porque você é um paciente com hanseníase. Além do exame clínico ao qual você será submetido, pedimos que você nos forneça até 40 mL de sangue. Uma parte das amostras coletadas será guardada no Laboratório de Microbiologia Celular da FIOCRUZ, sob responsabilidade da Dra. Maria

Cristina Vidal Pessolani que é a responsável pelo projeto e pesquisadora responsável pelo laboratório de Microbiologia Celular, podendo ser utilizado em pesquisas futuras de acordo com a aprovação do Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz, instituição colaboradora do presente projeto. A decisão de nos autorizar a armazenar as suas amostras para pesquisas futuras é voluntária. Se você decidir não armazenar, nós destruiremos suas amostras ao final do estudo. A qualquer momento você poderá entrar em contato com os pesquisadores e pedir que seu sangue não seja mais usado para pesquisa; neste caso, todas as suas amostras identificáveis, que forem encontradas em nosso laboratório serão destruídas. O motivo para que esse material seja armazenado é que os a pesquisa será feita aos pouquinhos e não tudo de uma vez. Além disso, novas perguntas científicas surgem entre os pesquisadores, e novas análises podem ser necessárias com as amostras já armazenadas para responder a estas perguntas, quando possível.

Não costumamos contatar o participante para divulgar os resultados da nossa pesquisa, porém se o mesmo assim o desejar, ele poderá entrar em contato com o pesquisador responsável para saber detalhes sobre os resultados.

Para maiores detalhes sobre os riscos, inconveniências, desconfortos e outras informações pertinentes relativas à sua participação neste projeto, veja a seção seguinte.

Procedimento e métodos usados

Coleta de sangue: Uma pessoa bem treinada neste procedimento fará a punção da veia do seu antebraço. O procedimento toma de 5 a 10 minutos, e é idêntico àqueles usados em outros exames laboratoriais.

Desconfortos e riscos: Os possíveis desconfortos e riscos, se ocorrerem, são aqueles relacionados com a retirada de sangue, como dor local e/ou hematoma (rouxidão) no local. A quantidade de sangue necessária para o estudo é muito pequena, e muito provavelmente não causará nenhuma complicação.

Benefícios: Esse tipo de estudo beneficiará futuramente toda a população, já que estaremos investigando o motivo pelo qual as pessoas adoecem de hanseníase e o desenvolvimento de estratégias mais eficientes para o controle da doença que permanece até os dias de hoje como problema de saúde pública.

Confidencialidade: As pessoas que vão coletar o seu sangue e os pesquisadores que estão coordenando este estudo irão tratar sua identidade com padrões profissionais de confidencialidade. Nas amostras não constarão o seu nome, e ninguém (exceto os pesquisadores envolvidos no estudo) será capaz de identificar você como doador desta amostra. As informações obtidas neste estudo talvez sejam publicadas em jornais científicos, mas a sua identidade não será revelada.

Responsabilidade: A comissão de Ética responsabilizará a coordenadora responsável pelo estudo por qualquer transtorno que aconteça durante o estudo. O médico responsável colocou-me a par destas informações, estando à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver novas dúvidas. Também tenho toda liberdade para entrar em contato com a pesquisadora responsável: Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani.

Marque abaixo as opções para armazenamento ou não das suas amostras para utilização em pesquisas futuras do Laboratório de Microbiologia Celular.

Aceito participar da pesquisa e armazenar as minhas amostras de sangue para serem utilizadas em pesquisas futuras do Laboratório de Microbiologia Celular

Sim Não

Aceito participar da pesquisa, mas não quero armazenar as minhas amostras de sangue para serem utilizadas em pesquisas futuras do Laboratório de Microbiologia Celular. Assim que essa pesquisa terminar, desejo que as minhas amostras de sangue sejam destruídas.

Sim Não

Participação: Minha participação neste estudo é inteiramente voluntária, e eu sou livre para me recusar a participar no estudo, ou me retirar em qualquer fase da pesquisa. Assinar este documento significa que você leu as informações deste termo de consentimento, datou e recebeu uma via de igual teor a do pesquisador.

Nome _____ Data: _____

Assinatura _____

Nome da pesquisadora responsável:

_____ Data: _____

Assinatura da pesquisadora responsável:



Consentimento Livre e Esclarecimento
para Participação em Projeto

Título do projeto: Caracterização fenotípica e funcional de subpopulações leucocitárias em tecido humano

Nome do Cirurgião Plástico responsável: Dr. Marcos Estephan de Oliveira Gobo
Nome do Pesquisador responsável (Fiocruz): Dr. Geraldo Moura Batista Pereira.

Nome e telefone de contato para dúvidas e problemas sobre o Projeto: Dr. Marcos Estephan de Oliveira Gobo. Telefone: (21) 2239-4529 / Dr. Geraldo Moura Batista Pereira. Telefone: (21) 2562-1611.

Para esclarecimentos sobre a eticidade do projeto Comitê de Ética em Pesquisa - endereço: Av. Brasil, 4036 - sala 705, campus Expansão - Manguinhos, telefone: (21) 3882-9011, cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

O presente estudo tem por finalidade realizar um conjunto de análises em células presentes na pele, com o objetivo de compreendermos melhor as características dessas células de acordo com o histórico de resposta imune de cada indivíduo frente a diversos estímulos, e dessa forma contribuir nos estudos e desenvolvimento de métodos diagnósticos para doenças agudas e crônicas.

É importante por isso, que você leia esse documento com atenção e calma para decidir se você quer ser incluído no grupo que vai participar desse estudo. Se você decidir que não quer participar dessa pesquisa, a sua decisão será totalmente respeitada.

Da mesma forma, se você aceitar participar e a qualquer momento desistir dessa participação, você poderá entrar em contato com o seu cirurgião plástico (Dr. Marcos Gobo) e com o responsável pela Pesquisa na Fiocruz (Dr. Geraldo Pereira) através dos respectivos e-mails (contato@marcosgobbo.com.br / geraldo@ioc.fiocruz.br) e pedir para retirá-lo do estudo. Os Pesquisadores enviarão um e-mail de ciência da sua desistência e darão seguimento aos procedimentos para retirá-lo do estudo.

O participante não terá direito à compensação financeira em face de sua participação no presente projeto. Não haverá também despesa pessoal para o participante em qualquer etapa do estudo, pois você está sendo chamado para a Pesquisa no dia em que passará pelo procedimento cirúrgico. Conforme a Resolução no. 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, Ministério da Saúde (CNS/MS) você tem direito a receber cobertura material para reparação de eventual dano decorrente desta Pesquisa.

rubrica participante	rubrica cirurgião	rubrica pesquisador



Nós solicitamos que você participe do estudo porque você é um indivíduo saudável e que passará por um procedimento cirúrgico estético. Como na sua cirurgia plástica geralmente sobram pedaços de pele que serão descartados, utilizaremos em nossa pesquisa estas células da sua pele, que seriam jogadas no lixo hospitalar.

Durante o seu procedimento cirúrgico, após a retirada do excesso de pele pelo cirurgião plástico de sua confiança, nós coletaremos um pequeno fragmento de pele (desse excesso de pele) que o cirurgião retirou. Não será coletado nada além do que já era previsto pelo Cirurgião Plástico, ficaremos apenas com a pele que sobrar e que teria como destino o lixo hospitalar. Além da pele, coletaremos uma pequena quantidade de sangue (20ml) com o objetivo de analisar as diferenças entre o sangue e a pele. Por fim, faremos algumas perguntas simples para sabermos sobre o seu histórico de infecções, já que estamos avaliando o sistema imunológico da pele e essa é uma informação muito importante para nós.

O fragmento coletado (do excesso de pele retirado durante a cirurgia plástica) será transportado para processamento e armazenamento no Laboratório de microbiologia Celular da FIOCRUZ, sob responsabilidade do Dr. Geraldo Pereira, que é o responsável pelo Projeto e Pesquisador responsável pelo Laboratório de Microbiologia Celular, podendo ser utilizado em pesquisas futuras de acordo com a aprovação do Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz, que é a instância que tem por objetivo defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. Dessa forma, o comitê tem o papel de avaliar e monitorar o andamento do projeto, de modo que a pesquisa respeite os princípios éticos de proteção aos direitos humanos, da dignidade, da autonomia, da não maleficência, da confidencialidade e da privacidade. A decisão de nos autorizar a armazenar suas células para pesquisas futuras é voluntária. Se você decidir não armazenar, nós destruiremos suas amostras ao final do estudo.

A qualquer momento você poderá entrar em contato com os Pesquisadores (contato@marcosgobbo.com.br / geraldo@ioc.fiocruz.br) e pedir que suas células não sejam usadas para Pesquisa. Os Pesquisadores enviarão um e-mail de ciência da sua desistência e darão seguimento aos procedimentos para retirá-lo do Estudo; neste caso todas as suas amostras identificáveis, que forem encontradas em nosso Laboratório serão destruídas. O motivo para que esse material seja armazenado é que a Pesquisa será feita aos pouquinhos e não tudo de uma vez. Além disso, novas perguntas científicas surgem entre os Pesquisadores, que necessitam de material adicional dos próprios pacientes para serem esclarecidas. As amostras biológicas já armazenadas serão utilizadas para responder a estas perguntas, quando possível. Após a leitura deste documento e decisão de participação na pesquisa, será necessário que o participante da pesquisa ou seu representante legal, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo. Além da sua assinatura, o pesquisador responsável também deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo

rubrica participante	rubrica cirurgião	rubrica pesquisador



de Consentimento Livre e Esclarecido, – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Não costumamos entrar em contato com o participante para divulgar os resultados da nossa Pesquisa, porém se você assim desejar, poderá entrar em contato com o Pesquisador responsável para saber detalhes sobre os resultados.

Para maiores detalhes sobre os riscos, inconveniências, desconfortos e outras informações pertinentes relativas à sua participação neste projeto, veja a seção seguinte.

Procedimento e Métodos usados:

Coleta de sangue: Será realizada a coleta de aproximadamente 20ml do seu sangue, pela Equipe do seu Cirurgião Plástico, através do mesmo acesso venoso utilizado nos procedimentos para sua anestesia, necessária para o procedimento cirúrgico.

Desconfortos e riscos: Os possíveis desconfortos e riscos, se ocorrerem, são aqueles relacionados com a retirada de sangue e acesso venoso como: dor local e/ou hematoma (rouxidão) no local, e inflamação (muito raramente). A quantidade de sangue necessária para o estudo é muito pequena, e muito provavelmente não causará nenhuma complicação.

Fragmentos de pele (retirados do excesso de pele removido durante a sua cirurgia plástica e que seria descartado): Após a retirada do excesso de pele que seria descartado no lixo hospitalar ao término da cirurgia plástica, utilizaremos uma pequena parte que será armazenada em nosso Laboratório.

Desconfortos e riscos: O fragmento de pele será retirado do tecido excedente (sobra), que necessariamente já será removido durante a sua cirurgia plástica e descartado após o término do ato cirúrgico. Todos os desconfortos e riscos são inerentes ao procedimento cirúrgico no qual você será submetido. A retirada do fragmento de pele será realizada no material já removido do seu corpo pelo cirurgião plástico e não oferece, portanto, qualquer desconforto ou riscos à sua saúde.

Benefícios: Não há benefício direto, porém, as amostras doadas por você auxiliarão esse estudo que beneficiará futuramente toda a população, já que a investigação da modulação da resposta imune possui relevâncias terapêuticas para o tratamento de doenças infecciosas.

Confidencialidade: Os Profissionais que vão coletar as amostras e os Pesquisadores que estão coordenando este estudo irão tratar sua identidade com padrões profissionais de confidencialidade. Nas amostras não constarão o seu nome, e ninguém (exceto os Pesquisadores envolvidos no estudo) serão capazes de identificar você como doador desta amostra. As informações obtidas neste estudo talvez sejam publicadas em jornais científicos, mas a sua identidade não será revelada.

rubrica participante	rubrica pesquisador	rubrica cirurgião



Responsabilidade: A Comissão de Ética responsabilizará o Coordenador responsável pelo estudo por qualquer transtorno que aconteça durante o estudo.

O Médico responsável colocou-me a par destas informações, estando à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver novas dúvidas. Também tenho toda liberdade para entrar em contato com Cirurgião Plástico: Dr. Marcos Gobo e com o Pesquisador responsável: Dr. Geraldo Moura Batista Pereira.

Marque abaixo as opções para armazenamento ou não das suas amostras para utilização em pesquisas futuras do Laboratório de Microbiologia Celular.

Aceito participar da pesquisa e armazenar as minhas amostras (sangue e fragmento de pele) para serem utilizadas em pesquisas futuras do Laboratório de Microbiologia Celular

Sim Não

Aceito participar da pesquisa, mas NÃO quero armazenar as minhas amostras (sangue e fragmento de pele) para serem utilizadas em pesquisas futuras do Laboratório de Microbiologia Celular. Assim que essa pesquisa terminar, desejo que as minhas amostras (sangue e fragmento de pele) sejam destruídas.

Sim Não

Participação: Minha participação neste estudo é inteiramente voluntária, e eu sou livre para me recusar a participar no estudo, ou me retirar em qualquer fase da pesquisa.

(Assinar este documento significa que você leu as informações deste termo de consentimento, datou e recebeu uma via de igual teor a do pesquisador.)

Nome _____ Data: _____

Assinatura _____

_____ Data: _____

Assinatura do Cirurgião Plástico responsável
Dr. Marcos Estephan de Oliveira Gobo

_____ Data: _____

Assinatura do Pesquisador responsável
Dr. Geraldo Moura Batista Pereira