

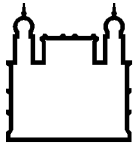
**MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**PARTICIPAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T NA
FISIOPATOLOGIA DA HANSENÍASE LEPROMATOSA E NA GÊNESE
DO *ERYTHEMA NODOSUM LEPROSUM* (ENL)**

PEDRO HENRIQUE LOPES DA SILVA

Rio de Janeiro
Março de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

PEDRO HENRIQUE LOPES DA SILVA

Participação de subpopulações de linfócitos T na fisiopatologia da hanseníase lepromatosa e na gênese do *Erythema Nodosum Leprosum* (ENL)

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientadores: Prof. Dra. Euzenir Nunes Sarno
Prof. Dra. Danuza de Almeida Esquenazi

RIO DE JANEIRO

Março de 2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

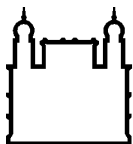
S586 Silva, Pedro Henrique Lopes da

Participação de subpopulações de linfócitos T na fisiopatologia da hanseníase lepromatosa e na gênese do *Erythema Nodosum Leprosum* (ENL) / Pedro Henrique Lopes da Silva. – Rio de Janeiro, 2016.
vi, 75 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2016.
Bibliografia: f. 60-75

1. Hanseníase. 2. Erythema Nodosum Leprosum. 3. Linfócitos T. I. Título.

CDD 616.998



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: PEDRO HENRIQUE LOPES DA SILVA

PARTICIPAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T NA FISIOPATOLOGIA DA HANSENÍASE LEPROMATOSA E NA GÊNESE DO *ERYTHEMA NODOSUM LEPROSUM (ENL)*

**ORIENTADORES: Prof. Dra. Euzenir Nunes Sarno
Prof. Dra. Danuza de Almeida Esquenazi**

Aprovada em: 11 de março de 2016.

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Alda Maria da Cruz – Presidente e Titular
Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas / IOC - FIOCRUZ

Prof. Dra. Alessandra Matos Saliba - Titular
Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – Faculdade de Ciências Médicas / UERJ

Prof. Dra. Mariana Gandini - Titular
Laboratório de Microbiologia Celular / IOC - FIOCRUZ

Prof. Dra. Verônica Schimitz Pereira – 1ª suplente
Laboratório de Biologia das Interações / IOC - FIOCRUZ

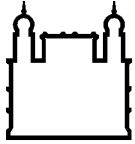
Prof. Dra. Lilian de Oliveira Moreira – 2ª suplente
Laboratório de bacteriologia e imunologia clínica– Faculdade de Farmácia / UFRJ

Rio de Janeiro, 11 de março de 2016

Agradecimentos

A fim de não ser injusto, queria agradecer, sem citar nomes, a todos os professores, orientadores, amigos e colegas de laboratório e turma pela contribuição dada a minha formação científica até o presente momento.

Um agradecimento especial deve ser feito à estimada professora Dra. Danuza Esquenazi que, há 5 anos, me introduziu no meio científico e desde então tem dedicado parte do seu tempo na minha educação.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

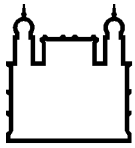
PARTICIPAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T NA FISIOPATOLOGIA DA HANSENÍASE LEPROMATOSA E NA GÊNESE DO *ERYTHEMA NODOSUM LEPROSUM* (ENL)

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Pedro Henrique Lopes da Silva

O *Erythema Nodosum Leprosum* (ENL) é um quadro de inflamação aguda súbita que afeta predominantemente pacientes do polo lepromatoso (LL) da hanseníase, podendo ocorrer antes, durante ou após a poliquimioterapia, sendo responsável por grande parte das incapacidades físicas associadas à doença. Não está totalmente esclarecido quais fatores são responsáveis desencadeamento do ENL. Alguns dados mostram que no ENL ocorre aumento da mobilização de neutrófilos para as lesões de pele, ativação de macrófagos e linfócitos T, juntamente com o aumento na secreção dos níveis séricos de TNF e IL-1 β . Com o intuito de aprofundar os conhecimentos em torno da participação dos linfócitos T na patogênese na hanseníase lepromatosa e do ENL, no presente trabalho realizamos a caracterização *ex vivo* e *in vitro* em resposta ao estímulo com *M. leprae* de subpopulações de linfócitos T obtidas do sangue periférico de pacientes LL com ou sem ENL, bem como a avaliação da ação funcional destas subpopulações mediante a análise da frequência destas células produtoras das citocinas IFN- γ , TNF e IL-10, por citometria de fluxo multiparamétrica. Ademais, fizemos análise da expressão de genes que codificam os fatores de transcrição críticos para a diferenciação de linfócitos T por meio da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Voluntários sadios de área endêmica para a hanseníase foram incluídos em nosso estudo. Dentre os resultados obtidos, destacamos o aumento significativo na frequência de linfócitos T CD8+ de memória efetora produtores de TNF no grupo de pacientes que apresentou ENL. Esse mesmo grupo também apresentou aumento significativo de linfócitos T CD4+ e CD8+ produtores de IL-10, especialmente em resposta ao antígeno. Contudo, esse fato ocorreu apenas nas subpopulações naïve e de memória central. Além disso, o grupo ENL apresentou redução na frequência de linfócitos T CD4+ e CD8+ produtores de IFN- γ , assim como uma significativa redução na expressão dos fatores de transcrição *STAT4* e *TBX21*. Por fim, observamos uma forte correlação positiva e altamente significativa entre o índice bacilar (IB) dos pacientes com ENL e a frequência de linfócitos T CD4+/TNF+. No mesmo grupo de pacientes, também observamos uma significativa correlação negativa entre o IB e a frequência de células CD4+ produtoras de IL-10. Nossos resultados corroboram outros achados sobre o desequilíbrio da resposta imune na gênese do ENL, e demonstram associação entre o IB e a frequência de células produtoras das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF. Em suma, os dados obtidos e discutidos neste trabalho sugerem a contribuição precípua dos linfócitos T de memória, especificamente os CD8+ de memória efetora para a alteração transitória da resposta imune ao *M. leprae*, característica marcante no ENL.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

PARTICIPATION OF T CELL SUBPOPULATIONS IN THE PATHOPHYSIOLOGY OF LEPROMATOUS LEPROSY AND GENESIS OF *ERYTHEMA NODOSUM LEPROSUM* (ENL)

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION

Pedro Henrique Lopes da Silva

Erythema nodosum leprosum (ENL), a sudden episode of acute inflammation predominantly affecting lepromatous leprosy patients (LL), can occur before, during or after multidrug therapy, accounting for much of the physical disabilities associated with the disease. It is not clear which are the triggering factors for ENL. Some data from ENL patients show an increased migration of neutrophils into skin lesions, activation of macrophages and T lymphocytes, together with an increased secretion of TNF and IL-1 β serum levels. For a better understanding on the involvement of T lymphocytes in the pathogenesis in lepromatous leprosy and ENL, this study performed *ex vivo* and *in vitro* characterization of T cell subpopulations from blood in response to *M. leprae* from LL patients with or without ENL, as well as the evaluation of functional activity of these subpopulations, by analyzing the frequency of these cells producing IFN- γ , TNF and IL-10 by multiparametric flow cytometry. Furthermore, we analyzed the expression of genes encoding transcription factors, which are critical for the differentiation of T lymphocytes by quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Healthy volunteers from endemic area for leprosy were included in our study. Among the results, we highlighted the significantly increased frequency of CD8+/TNF+ T effector memory cells among ENL patients. This group also showed a significantly increased frequency of CD4+ and CD8+ IL-10+ producing T lymphocytes, particularly in response to antigen. However, this finding was only observed in naïve and central memory T cell subpopulations. Moreover, ENL group showed a reduced frequency of CD4+ and CD8+ IFN- γ producing cells, and a significantly reduced expression of *STAT4* and *TBX21* transcription factors. Finally, we observed positive and significant strong correlation between bacillary index (BI) of ENL patients and CD4+/TNF+ cells frequency. The same group also presented a significant negative correlation between IB and the frequency of CD4+/IL-10+ T cells. Our results corroborate other findings about the imbalanced immune response in ENL genesis, and show an association between IB and the frequency of T cells producing pro-inflammatory cytokines IFN- γ and TNF. Briefly, the data obtained and discussed in this work suggest the major contribution of memory T cells, specifically CD8+ effector memory cells, to transient alteration in the immune response to *M. leprae*, a hallmark of ENL.

ÍNDICE

RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos gerais da doença	1
1.2 Epidemiologia	3
1.3 Agente etiológico	4
1.4 Mecanismos de transmissão	5
1.5 Diagnóstico	6
1.6 Formas clínicas e estratégia terapêutica	7
1.7 Aspectos gerais dos episódios reacionais da hanseníase	11
1.7.1 Aspectos gerais da reação reversa (RR)	12
1.7.2 Aspectos gerais do Erythema Nodosum Leprosum (ENL)	13
1.8 Mecanismos gerais da resposta imune adaptativa com ênfase na hanseníase	15
2 JUSTIFICATIVA	23
3 OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo Geral	25
3.2 Objetivos específicos	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 População de Estudo, Biossegurança e Considerações Éticas	26
4.2 Separação de células mononucleares do sangue periférico	27
4.3 Cultivo de células mononucleares e ensaios de estimulação <i>in vitro</i>	27
4.4 Análise de moléculas de superfície de membrana celular e de citocinas intracelulares por citometria de fluxo	28
4.5 Metodologia de análise das subpopulações linfocitárias por citometria de fluxo	29
4.6 Extração do RNA	30
4.7 Quantificação e pureza do RNA	31
4.8 Síntese de cDNA	32
4.9 Quantificação da expressão gênica de fatores transcricionais por PCR quantitativo em tempo real	32
4.10 Análise estatística	33
5 RESULTADOS	34

5.1 Características clínicas e demográficas dos pacientes e doadores saudáveis	34
5.2 - Determinação de subpopulações de linfócitos T de pacientes LL com e sem ENL	36
5.2.1 - <i>Análise fenotípica ex vivo das subpopulações de linfócitos T de pacientes LL com e sem ENL</i>	36
5.2.2 - <i>Análise fenotípica in vitro das subpopulações de linfócitos T de pacientes LL com e sem ENL em resposta ao M. leprae</i>	39
5.3 Frequência de subpopulações de linfócitos T produtores de IFNγ, TNF e IL-10 em resposta ao <i>Mycobacterium leprae</i>	41
5.4 – Avaliação da expressão dos genes de fatores de transcrição associados à diferenciação dos linfócitos T virgens.	46
5.5 - Correlação entre a frequência entre os linfócitos T produtores de citocinas e o índice baciloscópico dos pacientes.	47
6 DISCUSSÃO	49
7 CONCLUSÕES	59
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Máscara originária da Nigéria representando alterações faciais decorrentes da hanseníase	1
Figura 2 - Taxas de prevalência mundial da hanseníase reportadas à OMS, no ano de 2013, referentes ao ano anterior	4
Figura 3 - Espectro bacteriológico e imunológico segundo a classificação de Ridley & Jopling	9
Figura 4 - Características macro e microscópicas das lesões das formas polares da hanseníase	10
Figura 5 - Tratamento poliquimioterápico da hanseníase	11
Figura 6 - Reações hansênicas: aspectos micro e macroscópicos	15
Figura 7 - Estratégia de análise dos dados obtidos por citometria de fluxo multiparamétrica	30
Figura 8 - Frequência de linfócitos T CD3+/CD4+ e CD3+/TCD8+ totais ex vivo de pacientes LL com ou sem ENL e voluntários sadios.	36
Figura 9 - Frequência ex vivo de subpopulações de linfócitos T CD4+ e T CD8+	38
Figura 10 - Frequência de linfócitos T CD4+ e TCD8+ totais em culturas estimuladas ou não (NE) com <i>M. leprae</i> (ML)	39
Figura 11 - Frequência de subpopulações de linfócitos T CD4+ e T CD8+ em culturas estimuladas ou não com <i>M. leprae</i>	41
Figura 12 - Análise funcional das diferentes subpopulações de linfócitos T frente ao <i>Mycobacterium leprae</i> – IL-10	43
Figura 13 - Análise funcional das diferentes subpopulações de linfócitos T frente ao <i>Mycobacterium leprae</i> – IFN- γ	44
Figura 14 - Análise funcional das diferentes subpopulações de linfócitos T frente ao <i>Mycobacterium leprae</i> – TNF	45
Figura 15. Avaliação da expressão de genes de fatores de transcrição que induzem a diferenciação de linfócitos T	47
Figura 16. Correlação o índice baciloscópico e a frequência de linfócitos T CD4+ produtores das citocinas IL-10, TNF e IFN- γ	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização das subpopulações de linfócitos T de memória	19
Tabela 2 – Descrição dos anticorpos usados na citometria de fluxo	29
Tabela 2 - Caracterização clínica e demográfica dos indivíduos estudados	35

Lista de Siglas e Abreviaturas

- APC – do inglês, célula apresentadora de antígeno
- ASA - Ambulatório Sousa Araújo
- BAAR – Bacilo Álcool-Ácido Resistente
- BB – forma clínica Borderline Borderline
- BCG- Bacilo Calmette-Guérin
- BL – forma clínica Borderline Lepromatosa
- BT – forma clínica Borderline Tuberculóide
- cDNA – Ácido Desoxiribonucléico complementar
- DC – do inglês, célula dendrítica
- EDTA – do inglês, Ácido Etilenodiaminotetracético
- ENL – *Erythema Nodosum Leprosum*
- FITC – do inglês, Isotiocianato de Fluoresceína
- GM-CSF - do inglês, Fator Estimulador de Colônia de Macrófagos e Granulócitos
- HLA-DR – do inglês, Antígeno Leucocitário Humano de classe II, alelo DR
- IB – Índice Bacteriológico
- IL - Interleucina
- LAHAN - Laboratório de Hanseníase (IOC/FIOCRUZ)
- LL – forma clínica Lepromatosa Lepromatosa
- LPS – Lipopolissacarídeo
- MB – forma clínica multibacilar
- M-CSF- do inglês, Fator Estimulador de Colônia de Macrófago
- MCP-1- do inglês, Proteína Quimiotática de Monócito 1
- MAPK - proteína quinase ativada por mitógeno
- MDT – do inglês, Multidrogaoterapia
- ML- *Mycobacterium leprae*
- mRNA – Ácido Ribonucléico mensageiro
- miRNA – micro Ácido Ribonucléico
- NF- κ B – do inglês, Fator Nuclear kappa B
- NK- do inglês, Natural Killer
- NO – do inglês, Óxido Nítrico
- NOD – do inglês, proteína contendo domínio de oligomerização nucleotídica
- OMS – Organização Mundial da Saúde

PAMP – padrões moleculares associados aos patógenos.
PB – forma clínica Paucibacilar
PBMC – do inglês, células mononucleares de sangue periférico
PBS – do inglês, Tampão Salina Fosfato
PCR – do inglês, Reação de Polimerase em Cadeia
PGL1 – do inglês, Glicolípido fenólico-1
PQT – poliquimioterapia
RF – livre de RNase do inglês “RNAase free”
RR – Reação Reversa
SEB – do inglês, Enterotoxina tipo B de *Staphylococcus aureus*
SFB – Soro Fetal Bovino
TLR – do inglês, receptores do tipo Toll like
TT – forma clínica Tuberculóide Tuberculóide
xg – velocidade de sedimentação em unidade gravitacional

INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da hanseníase

A hanseníase é doença infectocontagiosa crônica já descrita há milhares de anos nos textos bíblicos como lepra, havendo textos que descrevem a doença há cerca de 1400 aC na Índia (Trautman, 1984). Acredita-se que a palavra lepra tenha derivado da tradução da palavra hebraica *tsaraath*, presente no livro do Levítico da bíblia, que em grego se tornou lepra (Trautman, 1984). Entretanto, aqui no Brasil, o uso da palavra lepra em documentos oficiais foi proibido pela Lei nº 9.010, de 29 de março de 1995, sancionada pelo então presidente Fernando Henrique Cardoso.

A doença é causada pelo *Mycobacterium leprae*, bacilo intracelular obrigatório, que tem predileção por macrófagos e células de Schwann (Scollard et al., 2006). Este tropismo do bacilo, somado à resposta imune do hospedeiro, pode provocar danos teciduais na pele e em nervos periféricos, o que pode levar às lesões de pele hipossensíveis nos membros, atrofias, paresias, desfiguração facial e até cegueira (Lockwood et al., 2005). Por sua vez, estas manifestações estão associadas ao estigma da doença. A figura abaixo mostra a imagem de uma máscara nigeriana alusiva à desfiguração causada pela hanseníase.



Figura 1. Máscara originária da Nigéria representando alterações faciais supostamente decorrentes da hanseníase. Acervo do Museu Nacional de Saúde e Medicina, Paquistão. Crédito: foto de Charles Davis.

Atualmente, o estigma relacionado aos pacientes hansênicos é velado, porém, há séculos atrás o cenário era diferente. A hanseníase foi endêmica na Europa na Idade Média (entre os anos de 1000 e 1400), onde era feito a retirada dos pacientes do convívio social para seu confinamento nos leprosários, na justificativa de evitar a cadeia de transmissão da doença. Entretanto, um dos principais motivos para este confinamento era o religioso, pois, segundo Pinto, as deformidades físicas geradas pela hanseníase assustavam o homem medieval, afinal, para este, o corpo nada mais era que o reflexo do espírito. Por falta de conhecimento específico, a doença foi associada a diversos fatores como má alimentação, falta de higiene, hereditariedade, pecado, insetos vetores, perturbações psíquicas, entre outros (Pinto, 1985).

A “lepra”, como era chamada a hanseníase há algumas décadas atrás, foi a primeira doença associada a um micro-organismo patogênico pelo médico norueguês Gerhard Armauer Hansen, que descreveu em 1841 a existência de pequenos corpúsculos em forma de bastonete, que denominou *Bacillus leprae*, isolado das lesões de pele dos pacientes (Benchimol et al., 2004). Entretanto, um impasse foi gerado, pois não se obteve êxito na cultura e inoculação deste bacilo em modelos animais, dificultando a conexão feita por Hansen entre a lepra e o bacilo.

Apenas em 1897, no Primeiro Congresso Internacional de Lepra, realizado em Berlim, foi legitimada sua etiologia, superando a ideia de que a doença era hereditária ou uma maldição. Convencionou-se que a hanseníase deveria ter notificação obrigatória, vigilância e isolamento compulsório dos leprosos, a fim de se evitar a transmissão às outras pessoas (Rosen, 1994).

No caso do continente americano, admite-se que os índios eram livres de hanseníase, e que a doença tenha chegado ao continente por meio dos colonizadores, não só pelos portugueses, mas também por outros povos europeus, sendo o tráfico de escravos o maior fator de disseminação do bacilo (Monteiro, 1987; Monot, 2005). No nosso país, os primeiros casos da doença teriam sido identificados no início do século XVII, mais especificamente na cidade do Rio de Janeiro (Yamanouchi, 1993), onde, anos mais tarde, seria criado o primeiro local destinado ao confinamento dos doentes. Contudo, na década de 1940, com o início do uso da sulfona em doses supervisionadas para o tratamento da hanseníase, o controle da doença passa a ser feito de forma ambulatorial, sendo assim, cai em desuso os hospitais-colônias, bem como a segregação dos

pacientes hansênicos nos lazaretos – comunidades que abrigavam os doentes (Avelleira et al., 1998).

1.2 Epidemiologia

A Organização Mundial da Saúde (OMS) definiu um grupo de 17 enfermidades que acometem o homem como doenças negligenciadas, entre estas doenças está a hanseníase. O conceito de doenças negligenciadas é novo e polêmico, ele foi proposto inicialmente na década de 1970, por um programa da Fundação Rockefeller como *The Great Neglected Diseases*, coordenado por Kenneth Warren. A definição básica é que estas são doenças que prevalecem na pobreza e contribuem para a manutenção das desigualdades atuais, no que diz respeito essencialmente ao acesso aos serviços de saúde de qualidade (WHO, 2013^a).

Trata-se então, de doenças transmitidas por agentes parasitários e infecciosos como vírus, bactérias, protozoários e helmintos que atingem principalmente a população de baixa renda, o que acaba aumentando os riscos de marginalização dos mesmos. Tendo isso em vista, não é de se admirar que o maior número de casos de hanseníase esteja concentrado em países com maior vulnerabilidade socioeconômica, sendo os sete principais: Brasil, Índia, Madagascar, Moçambique, Mianmar, Nepal e República Unida da Tanzânia. A Índia é responsável pela maior parte dos casos novos detectados em todo o mundo (WHO, 2004). No ano de 2000 foi alcançada a eliminação da hanseníase a nível mundial, definiu-se que a eliminação estaria atrelada a uma taxa de prevalência inferior a 1 caso para cada 10.000 pessoas (Lockwood & Suneetha, 2005), entretanto ela ainda permanece endêmica em certos países, como os citados anteriormente.

Com a introdução e a implementação da poliquimioterapia (PQT) pela OMS em 1980, ocorreu uma drástica diminuição na prevalência da hanseníase no mundo, entretanto, a partir de 2005 a queda da prevalência da doença ocorre de forma muito discreta nos países endêmicos. Ainda em 2012 foram notificados 232.857 novos casos da doença no mundo (Figura 2), sendo a Índia, Brasil e Indonésia responsáveis por 76% destes casos (WHO, 2013^b).

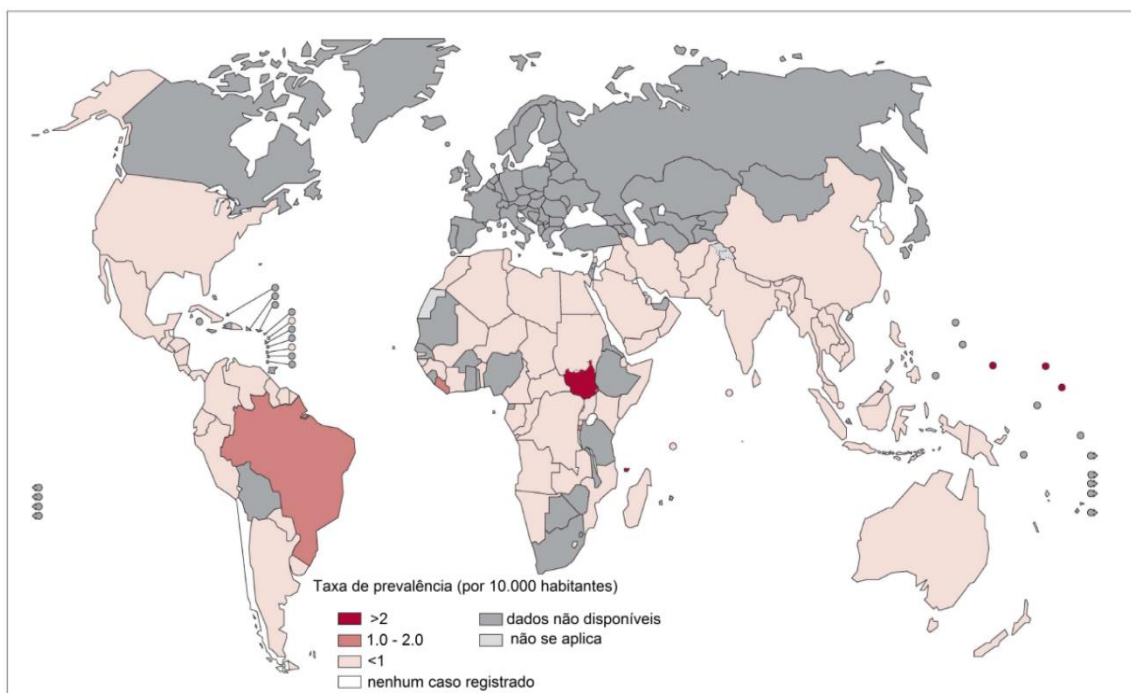


Figura 2. Taxas de prevalência mundial da hanseníase reportadas à OMS, no ano de 2013, referentes ao ano anterior. As taxas correspondem a uma razão para cada 10.000 habitantes de um país, o Brasil encontra-se na faixa entre 1 e 2 casos para 10.000 habitantes. (Adaptado de WHO, 2013).

Países anteriormente endêmicos têm conseguido diminuir o número de novos casos detectados, e alguns, já conseguiram eliminar a doença (Walker & Lockwood, 2007). No Brasil, a doença ainda é endêmica e, em 2014 houve cerca de 31 mil novos casos. Em nosso país, o coeficiente de prevalência é considerado médio, com 1,27 pacientes para cada 10.000 habitantes em 2014, a distribuição de casos pelo território nacional é bastante heterogêneo, sendo o estado de Mato Grosso o de maior prevalência com 10,19 casos para cada 10.000 habitantes (MS, 2014). O Brasil deve continuar altamente comprometido com a sua erradicação e com a conscientização da população sobre os mecanismos de transmissão, tratamento e profilaxia da doença.

1.3 Agente etiológico

O *M. leprae* foi a primeira bactéria associada a uma doença humana. É uma bactéria intracelular obrigatória, desprovida de especializações locomotoras, que não forma esporos, de crescimento lento – cerca de 14 dias, é gram-positiva e observada ao microscópio ótico, tem forma de bastonete (Scollard et al., 2006). A superfície da bactéria é formada por uma membrana celular, uma parede celular composta basicamente por peptidoglicano e ácidos micólicos, além da

cápsula rica em glicolípido fenólico 1 (PGL-1). Tal molécula confere especificidade imunológica à bactéria (Spencer et al., 2011), além disso, o PGL-1 está envolvido na interação entre o bacilo e a célula de schwann (Ng et al., 2000). O *M. leprae* é comumente denominado de BAAR (Bacilo Álcool Ácido Resistente), pois cora-se em vermelho pela fucsina e não se descora pela lavagem com ácidos e álcoois quando corado pelo método de Ziehl-Neelsen (Scollard et al., 2006).

O bacilo de Hansen não se desenvolve em meios de cultura artificiais, o que inviabiliza certos testes com a bactéria. Porém, com o intuito de se obter bacilos viáveis para pesquisa científica, Shepard e colaboradores demonstraram em 1960 a possibilidade de multiplicação da bactéria em coxim plantar de camundongos (Shepard, 1960). Anos mais tarde, surgiu um modelo mais adequado, o tatú de nove bandas, *Dasyus novencintus*, modelo animal em que, diferente dos camundongos, o bacilo pode ser mais facilmente recuperado e em maiores quantidades nos gânglios linfáticos, baço e fígado do animal (Scollard et al., 2006).

No ano de 2001 foi finalizada a análise do genoma do *M. leprae*, originalmente obtido a partir de lesões de pele de uma paciente multibacilar indiana (Cole et al., 2001). Comparações entre o *M. leprae* e o *M. tuberculosis* revelaram que o primeiro teria sofrido redução evolutiva, devido a presença de um genoma de apenas 3.3 Mb, em contraste com o *M. tuberculosis* que apresenta 4.4Mb, além da redução do conteúdo Guanina + Citosina - 58% no *M. leprae* e 66% no *M. tuberculosis*. No genoma do *M. leprae* há 2770 genes, sendo que apenas 49% codificam proteínas. Acredita-se que redução do genoma bacteriano acabou provocando a eliminação de vias metabólicas importantes, o que posteriormente foi traduzido na sua incapacidade de cultivo *in vitro* e em seu habitat intracelular (Cole et al., 2001).

1.4 Mecanismos de transmissão

A transmissão do *M. leprae* ocorre de um indivíduo infectado para um indivíduo não-infectado ou de indivíduo infectado ao ambiente e, posteriormente, para indivíduo não-infectado; a transmissão interpessoal, mais aceita pela comunidade científica, depende de um contato prolongado com pacientes multibacilares não tratados (Walker & Lockwood, 2007). No entanto, não se exclui

a participação dos indivíduos com infecção subclínica na cadeia de transmissão, pelo fato de que eles também são portadores do patógeno (Martinez et al., 2011).

Atualmente, a forma de transmissão mais aceita é a via respiratória, pois, há evidências de bactérias viáveis associadas à mucosa das vias aéreas superiores, transmitidas via aerossóis liberados pelo indivíduo infectado (Fine, 1992). É possível ainda detectar a presença do bacilo no tecido da mucosa respiratória em contatos de pacientes multibacilares, mesmo antes do surgimento das lesões (Suneetha et al., 1998).

Além disso, existem também outras possibilidades, como a transmissão por meio de insetos vetores, bem como por meio da ingestão de carne de tatus de nove bandas infectados, como relatado em um estudo realizado no estado do Espírito Santo (Deps et al., 2008). Apesar do bacilo apresentar alta infectividade, sua patogenicidade é baixa, portanto, uma pequena parte das pessoas que tem contato com o bacilo realmente desenvolverá a doença (Scollard et al., 2006).

1.5 Diagnóstico

O diagnóstico da doença é essencialmente clínico, por meio da sintomatologia clássica da doença que envolve a manifestação de lesões de pele com ausência ou diminuição da sensibilidade, bem como as lesões em nervos periféricos, que são responsáveis pelo comprometimento neurológico que pode evoluir para incapacidades físicas. Outras ferramentas podem ser usadas para auxiliar no diagnóstico clínico, como a baciloscopia e a análise histopatológica de fragmento de lesões de pele e nervos periféricos obtidos por meio de biópsia (Saunderson & Groenen, 2000).

O exame baciloscópico do raspado intradérmico (baciloscopia) é o método complementar mais utilizado por ser pouco invasivo, de baixo custo e de fácil execução. A baciloscopia é usada com os objetivos de se verificar: a classificação do paciente quanto ao espectro clínico, os casos de recidiva e também para o diagnóstico diferencial de outras doenças dermatoneurológicas (MS, 2010).

A baciloscopia negativa não exclui o diagnóstico da doença, sendo os pacientes com baciloscopia negativa classificados como paucibacilares (PB) e os de baciloscopia positiva como multibacilares (MB). Esta classificação operacional, proposta pela OMS, é utilizada pelo clínico para definir o esquema terapêutico a ser utilizado. Além disso, na impossibilidade da realização da baciloscopia, os

pacientes com até 5 lesões de pele são classificados como PB e os que apresentam mais de 5 lesões como MB (MS, 2010).

Utilizando-se o método da hematoxilina e eosina – H&E, é realizada a análise histopatológica de lesões de pele de pacientes, para evidenciar alterações morfológicas características da resposta imune ao bacilo, como a presença do infiltrado inflamatório e de granulomas, além do envolvimento de nervos cutâneos e da presença de bacilos corados pelo método Ziehl-Neelsen (Scollard et al., 2006). Ademais, há a possibilidade de detecção do bacilo por testes sorológicos, a fim de se identificar anticorpos anti-PGL-1. As dificuldades deste método envolvem o baixo título de anticorpos em pacientes paucibacilares, o tempo de exposição do indivíduo ao bacilo e ainda o custo e a necessidade de mão-de-obra especializada (Buhner-Sekula, 2008).

Por fim, ainda há a possibilidade do diagnóstico molecular do *M. leprae* em amostras clínicas por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). A detecção ocorre mediante a amplificação de regiões específicas do DNA da bactéria, obtido a partir de diversas amostras biológicas, como esfregaços da mucosa da boca e nariz, lesões de pele, fragmento de pele fixado extraído por biopsia, sangue, nervos e até mesmo em lesões na íris (Scollard et al., 2006; Banerjee et al., 2011; Rosa et al., 2013). Por mais que o método molecular seja de alto custo e exija pessoal especializado, ele pode contribuir de forma significativa no diagnóstico de pacientes paucibacilares (em que a baciloscopia é negativa), a histopatologia é inconclusiva e, ainda, nos casos de hanseníase neural pura (Martinez et al., 2011).

1.6 Formas clínicas e estratégia terapêutica

A hanseníase pode se manifestar sob um amplo espectro clínico, de acordo com a relação parasito-hospedeiro, ou seja, determinado pela resposta imune do paciente ao *M. leprae*. Mais de 90% das pessoas que tem contato com o bacilo não desenvolvem a doença (Moraes et al., 2006). Uma vez infectado, um indivíduo permanece numa forma clínica denominada indeterminada (I) que, na maioria das vezes, evolui para cura espontânea. Entretanto, indivíduos susceptíveis desenvolverão sinais e sintomas clínicos, que, como já mencionado, variam de acordo com a resposta imune celular do hospedeiro (Pfaltzgraff & Bryceson, 1985).

Atualmente, a classificação mais aceita pelo mundo científico é a de Ridley e Jopling, proposta em 1966 (Ridley & Jopling, 1966). Anteriormente, em 1953, no Congresso Internacional de Madrid, foi proposta uma classificação que dividia o espectro clínico da doença em duas formas: a tuberculóide, que envolve lesões localizadas e baciloscopia negativa, e a virchowiana, em que as lesões encontram-se disseminadas e a baciloscopia é positiva. Anos mais tarde, com as novas descobertas acerca da ação dos linfócitos T e B, a classificação proposta por Ridley e Jopling passou a ser a mais usada, especialmente por grupos de pesquisa. Nesta, o espectro clínico da hanseníase é dividido em cinco formas, sendo duas polares e três intermediárias, também chamadas de formas *borderline*. Em um dos extremos encontra-se o polo Tuberculóide (TT), caracterizado por um alto grau de resposta imune mediada por células e pequeno número de lesões de pele. Na análise histopatológica podem ser observados granulomas, infiltrado linfocitário e, raramente, são observados bacilos. Além disso, o teste cutâneo da lepromina (reação de Mitsuda) costuma ser positivo nos pacientes TT (>5 mm), porém, no polo lepromatoso (LL), o teste costuma ser negativo, devido à baixa resposta imune celular ao patógeno, característica deste polo. Os pacientes LL apresentam lesões de pele nodulares, disseminadas pelo corpo, com alta carga bacilar e na análise histopatológica observa-se na derme inúmeros macrófagos ricos em bacilos, além da ausência de granulomas (Ridley & Jopling, 1966).

A maioria dos pacientes hansenianos é classificada nas chamadas formas *borderline* (Scollard et al., 2006). Elas são subdivididas em BT (*borderline-tuberculóide*), BB (*borderline-borderline*) e BL (*borderline-lepromatoso*). É importante destacar que as formas *borderline* seguem o padrão espectral da doença, no que concerne à carga bacilar e à capacidade de responder ao patógeno (Ridley & Jopling, 1966).

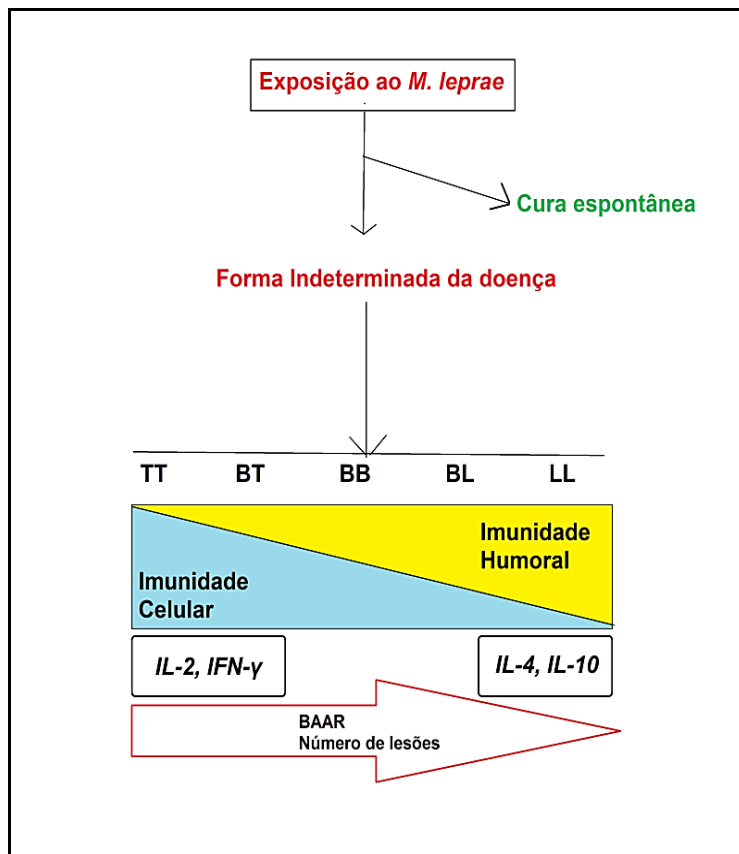


Figura 3: Espectro bacteriológico e imunológico segundo a classificação de Ridley & Jopling. Sendo TT: tuberculóide-tuberculóide, BT: *borderline*-tuberculóide, BB: *borderline*-*borderline*, BL: *borderline*-lepromatoso e LL: lepromatoso-lepromatoso. (Esquema feito pelo autor - Pedro Henrique Lopes da Silva).

Outra classificação foi adotada mais recentemente pelo Ministério da Saúde do Brasil para se definir a estratégia terapêutica dos pacientes, dividindo-os em dois grupos: multibacilares e paucibacilares. Os pacientes BB, BL e LL, com índice bacilar maior ou igual a 2, são classificados como multibacilares (MB), enquanto os pacientes TT e BT, com índice bacilar menor do que 2, são classificados como paucibacilares (PB) (MS, 2013).

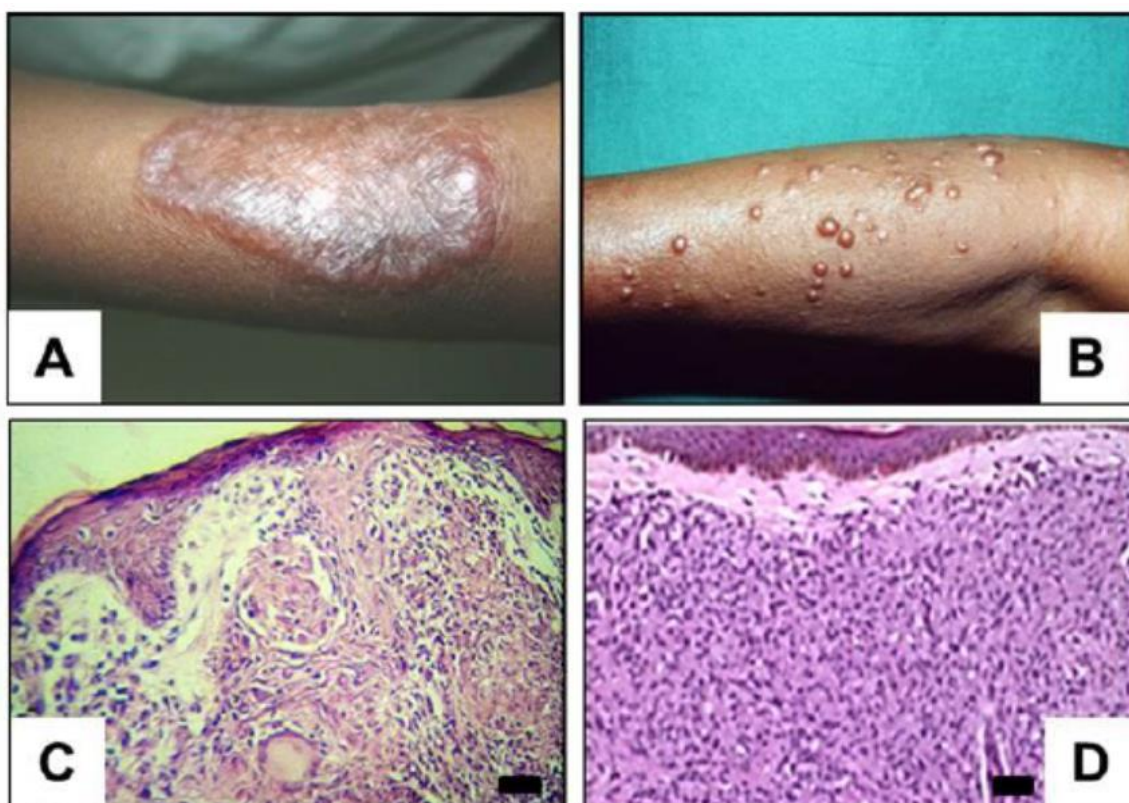


Figura 4. Características macro e microscópicas das lesões das formas polares da hanseníase. Lesão em placa no antebraço de paciente tuberculóide (A) e nódulos disseminados em paciente lepromatoso (B). Características histológicas típicas de fragmento de lesão cutânea de paciente com a forma tuberculóide mostrando granuloma e célula epitelióide (C) e de lesão lepromatosa com infiltrado mononuclear difuso e inespecífico (D); coloração de Hematoxilina e eosina, HE 200X (Fonte: ASA/LAHAN).

No ano de 1981 a Organização Mundial da Saúde definiu uma estratégia terapêutica que envolve a combinação de três fármacos – poliquimioterapia (PQT) – em detrimento da monoterapia com a dapsona usada até então. A PQT auxilia na quebra da cadeia da transmissão, ao passo impede a transmissão logo após o início do tratamento tornando-se um importante controle epidemiológico da doença. No caso dos pacientes multibacilares, o tratamento dura cerca de um ano e são utilizados rifampicina (600 mg, uma dose mensal), clofazimina (300 mg, uma dose mensal e 50 mg/dia) e dapsona (100 mg/dia), no total de 12 doses. Já para os paucibacilares, o tratamento dura cerca de 6 meses, utilizando-se a rifampicina (600 mg, uma dose mensal) e dapsona (100 mg/dia), empregados em 6 doses (Gallo et al., 2005).

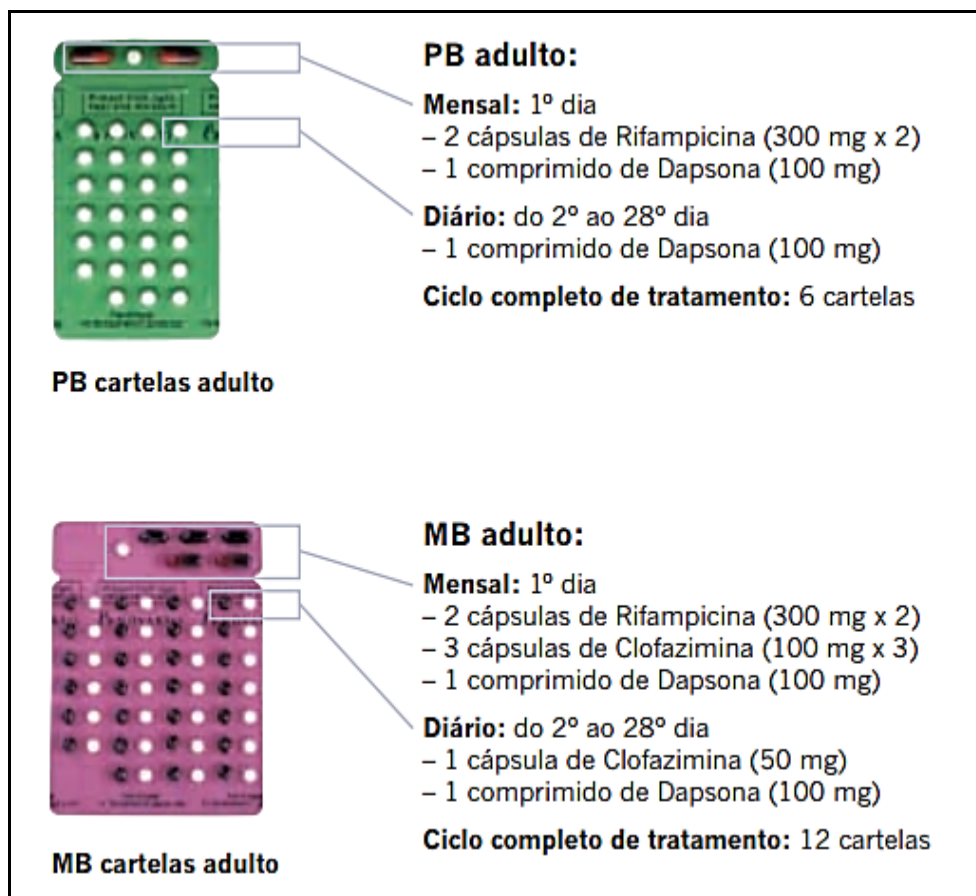


Figura 5. Tratamento poliquimioterápico da hanseníase: cartelas com doses supervisionadas ou auto-administradas para as formas PB e MB (adulto). Extraída do Guia para controle da hanseníase, 2002.

1.7 Aspectos gerais dos episódios reacionais da hanseníase

Durante o curso clínico da hanseníase, seja antes, durante ou após a PQT, cerca de 50% dos pacientes apresentam episódios de resposta inflamatória aguda, denominados de reações (Nery et al., 1998). Nas reações, o paciente apresenta uma exacerbação súbita do quadro clínico, com o surgimento de novas lesões de pele, reativação de lesões antigas e agravamento dos danos neurológicos, que, muitas vezes, gera sequelas que retiram o paciente do mercado de trabalho. O diagnóstico precoce da reação, bem como manejo terapêutico adequado, podem contribuir na redução das incapacidades geradas por esses episódios (Scollard et al., 2006; Pocaterra et al., 2006).

As reações podem se apresentar sob duas formas principais, estando associadas ao espectro clínico do paciente. Geralmente, pacientes com reação tipo 1, também chamada de Reação Reversa (RR), são aqueles que foram diagnosticados na forma *borderline* da doença (BT, BB e BL). Já os pacientes que

desenvolvem o quadro da reação do tipo 2 ou *Erythema Nodosum Leprosum* (ENL) são os classificados com as formas BL ou LL (Pocaterra et al., 2006; Andrade et al., 2015).

É sabido que situações que interferem diretamente na homeostasia do sistema imunológico, dentre elas a vacinação, a quimioterapia e a gravidez, são fatores facilitadores dos episódios reacionais (Meyerson, 1996). Desfeita a homeostasia, a produção de citocinas pró-inflamatórias, especialmente TNF, IL-1 β e IL-6, contribuem para a exacerbação da resposta imune e, por consequência, para o surgimento das lesões graves, reativação de lesões antigas e do mal estar geral, características dos episódios reacionais (Gallo et al., 2005; Sarno & Sampaio, 1999). Ainda não está totalmente esclarecido quais subpopulações celulares estão envolvidas na geração do desequilíbrio nos níveis destas citocinas durante os episódios reacionais. Além disso, outros mediadores de resposta inflamatória podem participar da patogênese das reações hansênicas.

1.7.1 – Aspectos gerais da Reação Reversa (RR)

A RR envolve principalmente mecanismos imunológicos mediados por células ou de hipersensibilidade tardia. O processo inflamatório costuma ser localizado, envolvendo a pele e nervos infectados pelo patógeno. Os danos neurais podem ocorrer durante o curso da doença, entretanto, a neurite é intensificada na RR, podendo resultar em incapacidades motoras irreversíveis. Com maior frequência, há o envolvimento dos nervos ulnar e tibial posterior, sendo a perda da função sensitivo-motor uma das consequências mais graves deste tipo reacional (Van Brakel & Khawas, 1994; Andrade et al., 2015).

No tratamento da RR, utiliza-se comumente corticosteroides, sendo a prednisona na dose de 1 a 2mg/Kg (dose diária) o esquema terapêutico preconizado pelo Ministério da Saúde. A PQT não é suspensa durante o tratamento das reações (Naafs, 1996). Quanto mais cedo o diagnóstico e início do tratamento da RR, menores serão as sequelas geradas pelas neuropatias durante a reação, devido também à redução da resposta imune mediada por células provocada pela ação dos corticosteróides.

1.7.2 – Aspectos gerais do *Erythema Nodosum Leprosum*

O ENL, um episódio súbito de inflamação aguda sistêmica, acomete essencialmente pacientes das formas clínicas BL e LL, sendo mais frequente nos LL (Kumar et al., 2004). Um estudo envolvendo a análise demográfica de pacientes em ENL ao redor do mundo revelou que a grande maioria são homens jovens com índice baciloscópico alto (>4) (Walker et al., 2015). Os pacientes com ENL apresentam febre, mal-estar geral e nódulos eritematosos na pele extremamente dolorosos. Além disso, a inflamação costuma envolver outros sistemas, causando: artrite, neurite, irite, linfadenite, miosite nefrite, orquite, entre outros (Sarno et al., 1991; Walker et al., 2015).

A imunopatologia do ENL ainda não está totalmente clara, porém, já foi relatada a presença de imunocomplexos nas lesões de pele, bem como em vasos sanguíneos e linfáticos, com posterior ativação do sistema complemento em sua gênese (Wemambu, 1969). Entretanto, trabalhos mais recentes demonstraram que pacientes LL em ENL apresentam menores níveis de IgG e IgM anti-PGL-1 comparados a pacientes LL não reacionais com índice bacilar semelhante (Levis et al., 1986; Schwerer et al., 1984; Rao & Rao, 1988). Outros processos também já foram descritos, como o aumento da mobilização de neutrófilos para os sítios inflamatórios, ativação de macrófagos e linfócitos T juntamente com o aumento da produção sérica de TNF (Sarno et al., 1991). Também já foi mostrado o aumento da expressão dos genes do TNF e IL-12 em linfócitos T e macrófagos nas lesões de pacientes com ENL (Moraes et al., 1999).

As lesões de pele do ENL são caracterizadas por nódulos e/ou pápulas eritematosas que, na ocorrência de episódios graves, podem se tornar ulceradas e necróticas (Kahawita & Lockwood, 2008). A análise histopatológica das lesões do ENL mostra a redução local da carga bacilar com a presença de numerosos bacilos fragmentados e granulados, além de um denso infiltrado inflamatório neutrofílico na derme superficial e/ou profunda, e/ou no tecido subcutâneo. Normalmente, o intenso influxo de neutrófilos forma microabscessos, sendo a vasculite uma das complicações mais frequentes do ENL (Hussain et al., 1995). Em contrapartida, em lesões crônicas (9 dias a partir do início da sintomatologia da reação) foi observado infiltrado rico em linfócitos, em detrimento do infiltrado neutrofílico, o que demonstra uma transição entre a fase aguda e a regressão do episódio reacional (Kahawita & Lockwood, 2008). Além disso, estudos

demonstram uma alteração na razão linfócitos T CD4+:CD8+ em lesões cutâneas no desencadeamento do ENL; pacientes LL não reacionais apresentam esta razão CD4:CD8 de 1:2, enquanto durante o ENL esta razão é alterada para 2:1, sugestivo da participação dos linfócitos T na patogênese deste episódio reacional (Modlin et al., 1983, 1985; Narayanan et al., 1984; Rao & Rao, 1986).

No Brasil, o tratamento do ENL é feito essencialmente com o uso da talidomida, porém este fármaco é proibido em certos países, como a Etiópia e Filipinas, onde o tratamento do ENL é feito basicamente com a prednisona. A talidomida foi sintetizada na Alemanha em 1954, a partir do ácido glutâmico, sendo indicada para tratamento das náuseas do primeiro trimestre da gravidez, além de ter também efeito sedativo e hipnótico. Entretanto, a droga foi retirada do mercado em 1960 quando se percebeu seus graves efeitos teratogênicos (Ito & Handa, 2012). A eficácia da talidomida está associada à inibição da produção de TNF e da mobilização de neutrófilos para os sítios inflamatórios, além de reduzir os níveis de outras citocinas pró-inflamatórias (Matsuki et al., 2014).

A análise epidemiológica do ENL demonstra uma variação étnica na frequência do episódio reacional, sendo alta (25 - 49%) no sudeste asiático e no Brasil (Schreuder, 1998; Nery et al., 1998; Pocaterra et al., 2006), e baixa frequência (5%) na África (Becx-Bleumink & Berhe, 1992; Saunderson et al., 2000). Segundo o estudo de Messias e colaboradores, isto ocorre devido à falta de expressão do alelo C4B. Pacientes brasileiros homozigotos recessivos para o alelo C4B incluídos neste estudo desenvolveram ENL, mostrando que a ausência da expressão deste gene predispõe a deposição de imunocomplexos (de Messias et al., 1993).

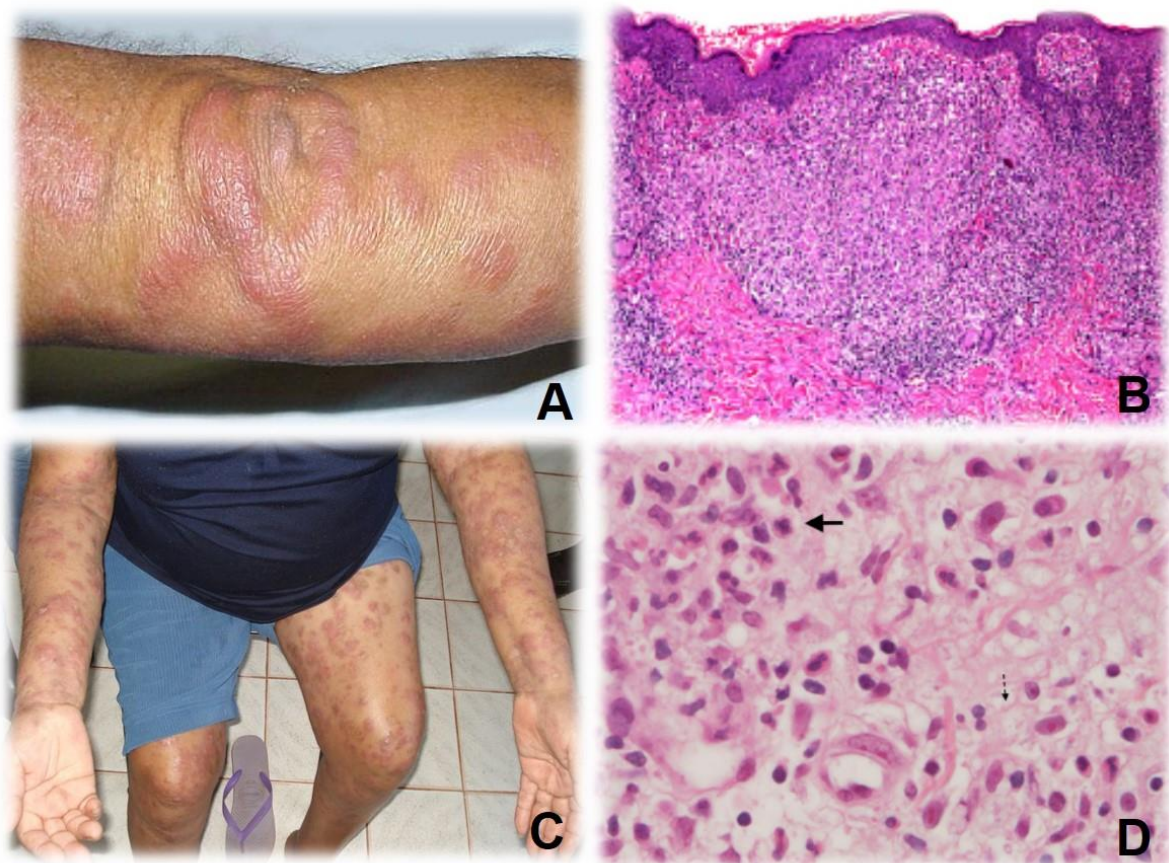


Figura 6. Reações hansênicas. Lesão em placas infiltradas e eritematosas em membro superior de paciente com reação do tipo I ou Reação Reversa (A). Característica histológica de fragmento de lesão de pele de paciente com RR mostrando infiltrado de células mononucleares e granuloma atingindo a derme superficial, H&E 200X (B). Lesões cutâneas nodulares disseminadas em membros superiores e inferiores de paciente lepromatoso apresentando ENL (C). Imagem histopatológica de fragmento cutâneo de ENL com infiltrado inflamatório difuso rico em polimorfos nucleares (seta). H&E 400X (D) (Fonte: ASA/LAHAN).

1.8 Mecanismos gerais da resposta imune adaptativa com ênfase na hanseníase.

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa do hospedeiro, seus mecanismos já existem mesmo antes da exposição ao parasita por reconhecerem padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), os quais não são compartilhados com as células dos mamíferos (Janeway & Medzhitov, 2002; Medzhitov, 2010). Quando a atividade da imunidade inata não consegue conter uma infecção e a multiplicação dos parasitas, o desenvolvimento de uma resposta imune específica pode passar a desempenhar este papel. Entretanto, esses dois tipos de imunidade não devem ser vistos separadamente, afinal, as moléculas produzidas durante as respostas imunes inatas estimulam a imunidade adaptativa e influenciam a natureza desta resposta.

Durante a resposta imune adaptativa pode-se observar diferentes etapas: reconhecimento de antígenos, ativação dos linfócitos T específicos, fase efetora e retorno à homeostase com apoptose de clones efetores e manutenção de células de memória. Logo após a ativação, os linfócitos T produzem IL-2, além de aumentarem a expressão de IL-2R na membrana, citocina esta que estimula a proliferação, resultando na expansão acentuada de clones específicos aos antígenos. Os linfócitos T CD4+ auxiliares podem se diferenciar em certos perfis de linfócitos efetores em função do tipo de parasita e das citocinas liberadas no microambiente em que a ativação ocorre, sendo os perfis mais estudados: T_H1, T_H2 e T_H17 (Mahnke et al., 2013).

Para que ocorra o desenvolvimento das células T_H1, a IL-12 produzida pelas APC, especialmente células dendríticas (DC) e macrófagos, além do IFN- γ produzido pelas células *Natural Killer* (NK), ativam os fatores de transcrição *T-bet* e *STAT4*, que por sua vez, estimulam a diferenciação do linfócito T CD4+ virgem ao subtipo T_H1. O IFN- γ produzido pelas T_H1 amplifica esta diferenciação, estimula a digestão intracelular de patógenos nos macrófagos e inibe o desenvolvimento de células T_H2 e T_H17. Dessa forma, a diferenciação do fenótipo T_H1 é induzida principalmente por IL-12 e IFN- γ e ocorre em resposta, principalmente, aos patógenos intracelulares, por meio da ativação de DCs, macrófagos e células NK (Brombacher et al., 2003; Zhu & Paul, 2010).

As DCs não somente estimulam os linfócitos T virgens, mas também influenciam a diferenciação para T_H1, T_H2, T_H3 ou linfócitos T reguladores (Treg). Isto ocorre através de um sinal polarizante (sinal 3) composto por citocinas e outras moléculas (Aiba, 2007).

No caso das células T_H2, a IL-4 produzida pelos próprios linfócitos T CD4+ ativados, eosinófilos ou mastócitos, ativa os fatores de transcrição *GATA3* e *STAT6*, promovendo a diferenciação das células T virgem em efetoras do perfil T_H2. Novamente, a IL-4 produzida pelas próprias células T_H2 amplificam este processo de diferenciação e inibição de respostas T_H1 e T_H17 (Hwang et al., 2005). Estudos recentes mostram que quando *GATA3* é expresso, a resposta T_H1 é suprimida e isto se deve essencialmente pela inibição da expressão da cadeia β 2 do receptor da IL-12, citocina chave para a ativação de *STAT4* e *T-bet*. Sendo assim, a expressão do *GATA3* é fundamental para a diferenciação T_H1/T_H2 (Zhu et al., 2001; Tindemans et al., 2014).

A diferenciação das células T virgem ao perfil T_H17 está associada basicamente à infecções por bactérias extracelulares e fungos e, para que isso ocorra, há a ativação dos fatores de transcrição *RORC* e *STAT3* devido a produção de IL-1 e IL-6 pelas APCs, além do TGF- β produzido por vários tipos celulares. As células T_H17 já diferenciadas produzem a citocina IL-21 que amplifica este processo de diferenciação (Gu et al., 2013).

Há uma relação direta entre as células T_H17 e Treg, pois o TGF- β também participa da diferenciação dos linfócitos T virgem em Treg, sendo capaz de converter TCD4+FOXP3- em células TCD4+FOXP3+ (Campbell & Koch, 2011). No entanto, na presença de IL-6, TGF- β induz a secreção de IL-17 e, concomitantemente, inibe a diferenciação de linfócitos Treg, gerando as células $Th17$ (Tran, 2012). As células Treg tem função contrastante em relação às $Th17$, pois suprimem a ativação das células T_H1 , assim como a ação das funções das células T efetoras, promovendo um balanço entre a eliminação do parasita e as lesões teciduais provocadas pela resposta inflamatória exacerbada (Noack & Miossec, 2014).

O desenvolvimento e a sobrevivência das Treg exigem a presença de IL-2, bem como a ativação do fator de transcrição *forkhead box P3* (*FOXP3*) (Fontenot et al., 2003). Os marcadores de superfície que caracterizam células Treg são CD25^{high}, CTLA-4 e CD127^{low}, e a ação destas moléculas de superfície está associada, de um modo geral, ao controle das respostas aos antígenos próprios em tecidos periféricos e da resposta imune durante as infecções (Corthay, 2009; Lin et al., 2013).

Em uma resposta imune adaptativa efetiva, após a ativação e diferenciação dos linfócitos T, ocorre a eliminação do patógeno, seguido pela morte dos clones das células expandidas e, desta forma, a homeostasia é restaurada. Além disso, a ativação inicial dos linfócitos T gera células de memória específicas de vida longa, que podem sobreviver anos após a infecção, ou até pela vida inteira do hospedeiro, pois expressam níveis elevados de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 e Bcl-X_L, devido a ação da citocina IL-7. As células de memória respondem mais rapidamente e com maior eficiência ao micro-organismo que causou a infecção em posteriores contatos, quando comparadas aos linfócitos virgens (Surh, 2006).

Os linfócitos T de memória são divididos em células de memória central (T_{CM}) ou de memória efetora (T_{EM}). A identificação dessas subpopulações é

definida pela combinação de moléculas de superfície específicas: moléculas associadas à migração celular (CCR7 e CD62L) e coestimulação (CD27 e CD28), juntamente com isoformas da molécula CD45 (CD45RA e CD45RO), e definem importantes marcadores funcionais de linfócitos T virgens ($T_{NAÏVE}$), de memória, ou efetora. As células T_{CM} expressam CCR7 que as direcionam para os órgãos linfóides secundários, onde encontram os ligantes do CCR7: CCL19 e CCL21. Essas células são consideradas linfócitos T de memória de longa duração, não necessitando de novas exposições a antígenos específicos para garantir sua viabilidade por muito tempo, desde que na presença de IL-7. Ao contrário das células T_{CM} , as T_{EM} requerem um contínuo estímulo com antígeno específico para sua manutenção. Os T_{EM} são linfócitos que, sob novo estímulo específico, rapidamente diferenciam-se em células efectoras. Estas células ao serem ativadas sofrem modificações funcionais e estruturais, passando a apresentar novos receptores na superfície como CD25, CD69, integrinas e moléculas efectoras, como por exemplo, perforina e granzima B. Além disso, a resposta imediata destas células pode contribuir para o controle de novas infecções através da secreção de citocinas de ação microbidas como o IFN- γ e TNF, bem como pela eliminação das células infectadas via ação de perforina (Mueller et al., 2013).

Dentre outros, dois receptores de superfície, CCR7 e CD45RA, são utilizados para a classificação fenotípica das células de memória, visto que estas subpopulações são bastante heterogêneas. Sendo assim, linfócitos $T_{NAÏVE}$ apresentam fenótipo CCR7+/CD45RA+, os T_{CM} são CCR7+/CD45RA-, os T_{EM} são CCR7-/CD45RA- e os T efetores (T_{EF}) são CCR7-/CD45RA+. As principais características das subpopulações de memória, incluindo os linfócitos T de memória residente, estão mostradas na tabela 1 (Mueller et al., 2013). O CCR7 é um receptor de quimiocina, também conhecido como CD197, que se liga ao CCL19 e CCL21. Essas quimiocinas possuem grande semelhança na sequência de seus aminoácidos e estão distribuídas essencialmente nas células endoteliais dos vasos linfáticos e em gânglios linfáticos (Charo & Ransohoff, 2006). A interação entre o CCR7 e seus ligantes promove a migração de diversas células do sistema imune para os órgãos linfóides secundários, como macrófagos, DCs, linfócitos T e B (Charo & Ransohoff, 2006; Forster et al., 2008). O CD45 é uma molécula expressa na membrana de todos os leucócitos, exibindo diversas isoformas, produzidas via splicing alternativo, que apresentam diferenças no domínio extracelular da molécula (Altin & Sloan, 1997). Os linfócitos T CD45RO+

respondem rapidamente ao antígeno e se dividem com maior frequência que os linfócitos T CD45RO- (Akbar et al., 1991; Michie et al., 1992). Sendo assim, linfócitos T de memória expressam a isoforma CD45RO, enquanto linfócitos T naíve ou efetores expressam CD45RA e são CD45RO negativo (Sallusto et al., 2004).

Tabela 1 - Caracterização das subpopulações de linfócitos T de memória.

Subpopulação	Fenótipo	Localização
T_{CM}	CD44 ^{high} , CD62L+, CCR7+, CD127+, CD45RA-.	Gânglios linfáticos, baço (polpa branca > polpa vermelha), sangue e medula óssea.
T_{EM}	CD44 ^{high} , CD62L-, CCR7-, CD127+, CD45RA-.	Gânglios linfáticos (raras), baço (polpa branca < polpa vermelha), sangue, pulmões, fígado, trato intestinal e reprodutor, rins, coração e tecido adiposo.
T_{RM}	CD44 ^{high} , CD62L-, CCR7-, CD11 ^{high} , CD45RA-.	CD8: pele, intestino, vagina, glândulas salivares, vias aéreas, cérebro e gânglios nervosos. CD4: parênquima pulmonar

TCM - linfócito T de memória central, TEM - linfócito T de memória efetora, TRM - linfócito T de memória residente. (Adaptada de Mueller et al., 2013).

Algumas citocinas são cruciais na resposta imune adaptativa, especialmente aos patógenos intracelulares, como o *M. leprae*. Nesse aspecto, destaca-se o IFN- γ , cuja produção é controlada por citocinas secretadas pelas APCs, principalmente IL-12 e IL-18. A IL-12 também promove a secreção de IFN- γ pelas células NK, sendo ele o principal produto do fenótipo T_{H1} e tem papel relevante na inibição da diferenciação de linfócitos T CD4+ com perfil T_{H2}. O IFN- γ também regula a expressão de MHC I e II e a apresentação de antígenos, induz a interação de leucócitos com células epiteliais aumentando a expressão de inúmeras moléculas de adesão. Juntamente com o CD40, o IFN- γ , por meio da ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e a proteína de ativação 1 (AP-1), promove a ativação de macrófagos, potencializando a morte microbiana (Lighvani et al., 2001; Xu & Song, 2004; Rutishauser & Kaech, 2010).

Apesar de ser também produzido por linfócitos T_{H1}, as principais fontes de TNF são os macrófagos e as DCs. O TNF provoca efeitos locais e sistêmicos, como aumento de moléculas de adesão endotelial, aumento da permeabilidade vascular, recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório, febre, produção de

proteínas hepáticas de fase aguda, estimula a produção de leucócitos na medula óssea, resistência à insulina, diminuição do débito cardíaco e trombose (Beutler & Cerami, 1989). Os neutrófilos estimulados com *M. leprae* liberam altos níveis de TNF e IL-8, o que, no contexto da hanseníase, intensifica o recrutamento de leucócitos sanguíneos e a lesão tecidual (Oliveira et al., 1999). Em conjunto com o IFN- γ , o TNF induz a formação e maturação de granulomas em micobacterioses. Na hanseníase, especialmente em pacientes tuberculóides, o TNF produzido por macrófagos oriundos das lesões cutâneas, não só tem papel relevante na manutenção do granuloma, como na ativação da resposta antígeno-específica (Kaplan et al, 1989; Lima et al., 2000).

Em humanos, a IL-10 é produzida principalmente por monócitos, linfócitos T (principalmente Treg e T_H2) e B, macrófagos e DCs (Nagalakshmi et al., 2004). Ela está envolvida no controle da imunidade inata e imunidade mediada por células, agindo em diversos momentos, como na supressão da ativação dos macrófagos pela inibição da produção de IL-12 e, por consequência, na redução da disponibilidade de IFN- γ . Ademais, reduz a expressão de moléculas co-estimuladoras e de MHC, extremamente importantes para a ativação dos linfócitos T. As células T_H1 também são capazes de produzir IL-10, que age essencialmente na inibição de DCs e macrófagos, suprimindo a ativação de células T_H1, evitando uma resposta inflamatória exacerbada. Este mecanismo atua como um *feedback* negativo na resposta imunológica mediada por células (Abbas, 2012). No contexto da hanseníase, já foi verificado predomínio de mRNA de IL-4 e IL-10 nas lesões de pacientes lepromatosos quando comparado com lesões de tuberculóides. O mesmo achado foi demonstrado em estudo *in vitro* com leucócitos sanguíneos de pacientes com as formas polares da hanseníase (Sieling et al., 1993). Assim como o TNF, o fato da IL-10 estar aumentada na circulação de pacientes lepromatosos faz dessas citocinas participantes importantes da regulação imunológica da hanseníase (Lima et al., 2000).

Na forma tuberculóide da hanseníase observa-se que os pacientes possuem uma maior capacidade de eliminação dos bacilos quando comparados aos pacientes LL. Nesses pacientes, os linfócitos T CD8+ atuam no *clearance* do *M. leprae*. Da mesma forma, a produção IFN- γ pelas NK e linfócitos T, por meio do estímulo da IL-12, é de extrema importância na ativação de macrófagos infectados e na produção de perforina e granzima B por linfócitos T CD8+,

possibilitando que na lesão destes pacientes sejam encontrados raros bacilos (Walker & Lockwood, 2006).

Em contrapartida, no polo lepromatoso, se observa uma maior produção de IL-4, que acaba sendo traduzida na diferenciação de linfócitos T_H2 e plasmócitos produtores de anticorpos anti-PGL-1. Por consequência, verifica-se o predomínio da IL-10 inibindo a produção de IFN- γ e, posteriormente, dificultando a eliminação dos bacilos, visto a alta carga bacilar destes pacientes (Nogueira et al., 1983; Kaplan et al., 1989). Já foi mostrado que injeções intradérmicas de IFN- γ recombinante promoviam o aumento da ação microbicida de macrófagos de lesão cutânea de lepromatosos. Entretanto, esses estudos não prosseguiram, pois os pacientes envolvidos no estudo desenvolveram quadros de reação inflamatória aguda, como o ENL (Kaplan et al., 1989; Sampaio et al., 1992).

Um trabalho de Palermo e colaboradores demonstrou que as Tregs desempenham um importante papel na interação parasito-hospedeiro na hanseníase, indicando que há uma maior frequência das Tregs no sangue periférico e em lesões de pele de pacientes lepromatosos, quando comparados a pacientes BT/TT. Além disso, um aumento da expressão de IL-10 e CTLA-4 foi também observado nos pacientes LL, o que sugere que as Tregs contribuam para a manutenção do bacilo nesses pacientes, em função da inibição da diferenciação dos linfócitos T virgens em células do perfil T_H1 (Palermo et al., 2012).

Em relação à reação do tipo 2, a presença do gene *FOXP3* em lesões cutâneas de pacientes apontam para uma atividade reguladora de linfócitos Treg nesses processos (Haslett et al., 2005). Utilizando a metodologia do microarranjo, foi verificado que ocorre, exclusivamente no ENL, a redução da expressão dos mRNAs que codificam IL-10 e CTLA-4 em PBMC, quando comparados aos pacientes LL não reacionais. Os autores sugerem que este fato possa refletir na emergência transitória da resposta imune ao *M. leprae* no polo lepromatoso da doença (Dupnik et al., 2014).

Em outro estudo foi demonstrado que a expressão TGF- β encontra-se aumentada nas lesões de pacientes lepromatosos, quando comparadas às lesões de pacientes tuberculóides (Kiszewski et al., 2003). Goulart e colaboradores mostraram que os níveis séricos de TGF- β de pacientes com ENL são maiores do que nos pacientes LL não reacionais e em pacientes com RR (Goulart et al., 2000). O TGF- β destaca-se na regulação negativa de monócitos e linfócitos T, inibindo a produção de IFN- γ e favorecendo a secreção de IL-10 (Ludviksson et

al., 2000). A IL-4, cuja produção na forma lepromatosa é reconhecidamente alta, pode induzir a produção de TGF- β , contribuindo para a ativação das células Treg. Também não se pode descartar a possibilidade da participação das células T_H17 na imunopatologia da hanseníase, devido à coexistência do TGF- β e IL-6 nas lesões, mediadores envolvidos na diferenciação de linfócitos T_H17. Em pacientes com hanseníase, tanto com a forma clássica do ENL, quanto com a grave e incomum reação do tipo 2, foram observados níveis séricos aumentados de IL-6 (Esquenazi et al., 2008). Esses dados sugerem que as células T_H17 possam estar envolvidas neste tipo de resposta inflamatória. Um fato complicador desta questão emergiu de um trabalho recente com pacientes com artrite reumatoide que demonstrou plasticidade das Treg, pois elas passaram a exibir uma ação funcional de T_H17 mediante a presença de IL-6 (Komatsu et al., 2014). O aumento da IL-6 em pacientes LL pode levar as Treg, frequentes neste polo, a transitarem para o fenótipo de T_H17, contribuindo para a patogênese do ENL. Sendo assim, como já dito anteriormente, a imunopatologia da hanseníase mostra-se bastante complexa, indo além da tradicional dicotomia envolvendo as células T_H1 e T_H2.

2 JUSTIFICATIVA

A ocorrência do ENL tem grande influência social, ao passo que pode levar a lesões graves nos nervos, gerando deformidades e incapacidades muitas vezes irreversíveis e que retiram o paciente, na maioria das vezes, do mercado de trabalho (Voorend et al., 2013). O presente trabalho tem por objetivo investigar parâmetros da resposta imune celular, especialmente o envolvimento de subpopulações de linfócitos T produtores de citocinas (IFN- γ , TNF e IL-10) na fisiopatologia da hanseníase lepromatosa polar (pacientes LL) e na gênese do ENL.

Há algumas décadas, nos anos 1960, Wemambu e colaboradores demonstraram a participação de imunocomplexos e ativação do complemento na gênese do ENL (Wemambu et al., 1969). Assim, por muitos anos, pensou-se que o principal mecanismo para o desencadeamento da reação estava esclarecido.

Contudo, com o passar do tempo, outros autores detectaram a presença de leucócitos, tanto em lesão, quanto em sangue de pacientes com a reação. Modlin e colaboradores mostraram modificações nas proporções de linfócitos T CD4+ e CD8+ comparando lesão cutânea de pacientes lepromatosos com e sem ENL. Porém, o papel destas células na lesão do ENL não foi determinado (Modlin et al., 1985). Mais recentemente, outros estudos em torno do ENL também demonstraram a participação dos neutrófilos na imunopatologia do processo reacional e indicaram essas células como importantes na produção de TNF em lesões iniciais da reação (Lee et al., 2010).

Faz-se necessário analisar os mecanismos responsáveis pelo aparecimento de respostas imunes transitórias em pacientes lepromatosos, especialmente os responsáveis pelo desencadeamento do ENL. Sridevi e colaboradores reportaram que a hiporresponsividade ao *M. leprae* - segundo os autores “uma característica marcante dos pacientes lepromatosos” - avança durante o curso da doença, mostrando o aumento progressivo de CTLA-4 em pacientes LL (Sridevi et al., 2003). Mais recentemente, Kumar e colaboradores demonstraram que, no polo lepromatoso, ocorre um defeito na via de sinalização de Lck–ZAP-70–ITAMs, contribuindo para a falha na resposta antígeno-específica em pacientes BL e LL. Além disso, os autores mostraram também a interrupção da formação de jangadas lipídicas na associação com o complexo HLA-DR em

macrófagos de pacientes com hanseníase, mais especificamente nos lepromatosos. Como nas jangadas lipídicas ocorre a associação das diferentes moléculas envolvidas na transdução de sinais necessários à sinapse imunológica e consequente ativação do linfócito T, esses dados reforçam a diminuição progressiva da resposta imune celular com a multiplicação do *M. leprae* (Kumar et al., 2011).

O entendimento dos mecanismos imunológicos associados à hiporresponsividade de pacientes lepromatosos e à fisiopatologia do ENL irá indubitavelmente auxiliar no desenvolvimento de metodologias mais seguras e eficazes para a identificação de pacientes com risco potencial de desenvolverem ENL e, até mesmo, auxiliar os clínicos a diagnosticarem precocemente a reação, o que, possivelmente, irá diminuir sua gravidade e até evitar as sequelas ligadas a este processo. Dessa forma, deve haver uma estreita relação entre a gênese do ENL e alterações na frequência e atividade funcional de linfócitos T, especialmente as subpopulações de memória.

3 OBJETIVOS

3.1 Principal:

Analisar os parâmetros de resposta imune celular em pacientes lepromatosos com e sem ENL, por meio da caracterização das subpopulações de linfócitos T, bem como a avaliação de sua atividade funcional e expressão gênica dos seus fatores de transcrição.

3.2 Específicos:

1. Determinar a frequência *ex vivo* de linfócitos T CD4+ e CD8+ (virgens, efetores, de memória central e efetora) em pacientes LL com e sem ENL por citometria de fluxo multiparamétrica.
2. Avaliar a frequência *in vitro* de linfócitos T CD4+ e CD8+ (virgens, efetores, de memória central e efetora) em pacientes LL com e sem ENL em resposta ao *M. leprae* por citometria de fluxo multiparamétrica.
3. Avaliar, por citometria de fluxo multiparamétrica, a frequência de subpopulações linfocitárias de sangue periférico produtoras de citocinas intracelulares após estímulo *in vitro* do *M. leprae*, de acordo com os fenótipos virgens e/ou de memória.
4. Identificar os fatores de transcrição predominantemente envolvidos na diferenciação de linfócitos T *STAT4/TBX21*, *STAT6/GATA3*, *STAT3/FOXP3* e *STAT4/RORC* em sangue total *ex vivo* de pacientes LL com e sem ENL, por PCR quantitativo em tempo real.
5. Correlacionar a frequência de linfócitos T produtores de citocinas e os dados referentes ao índice bacilar dos pacientes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 População de Estudo, Biossegurança e Considerações Éticas.

Um total de 49 indivíduos foi incluído neste estudo sendo: 19 pacientes LL em ENL (imediatamente após o diagnóstico do episódio reacional e sem uso de medicação imunossupressora – usualmente a talidomida), 15 pacientes LL não reacionais, imediatamente após o diagnóstico e antes do início da PQT. Para o estudo foram utilizadas também amostras de sangue de 15 indivíduos sadios, moradores da cidade do Rio de Janeiro, área endêmica para a hanseníase. Os pacientes eram acompanhados no Ambulatório Souza Araújo (ASA), parte do Laboratório de Hanseníase (LAHAN) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ, no Rio de Janeiro e foram diagnosticados segundo a classificação de Ridley e Jopling.

A participação de cada indivíduo no estudo só ocorreu após sua concordância e assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ (Protocolo nº 518/09). Não entraram neste estudo pacientes com comorbidades infecciosas agudas ou crônicas, idade inferior a 15 anos e os que não concordaram em participar do projeto em questão. Para a proteção e o bem estar dos indivíduos incluídos neste estudo, seus nomes não foram divulgados. Os dados clínicos e demográficos dos pacientes foram colhidos na fase diagnóstica e, juntamente com dados dos indivíduos sadios, encontram-se especificados de forma detalhada na Tabela 3.

O sangue coletado por profissional capacitado no ASA foi transportado até o laboratório em caixa isotérmica e manipulado em cabine de segurança biológica NB2, em ambiente estéril, respeitando as normas de biossegurança preconizadas para a manipulação de material biológico.

4.2 Separação de células mononucleares do sangue periférico.

Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram obtidas a partir do sangue periférico de pacientes e doadores saudáveis. O sangue periférico heparinizado foi diluído 1:1 em salina tampão fosfato (PBS) para separação das células por gradiente de densidade em Ficoll Hypaque (GE Healthcare, Suécia). Após centrifugação a 900 xg, por 30 minutos, à temperatura ambiente, as PBMC foram coletadas e lavadas duas vezes com PBS (500 xg, por 10 minutos, a 4°C), ressuspensas em meio AIM V (Gibco Invitrogen Co., EUA). Uma pequena alíquota de 10 µL desta suspensão celular foi diluída em 1:10 em azul de Tripán 0,4% (Bio WHITTAKER, EUA) e contada em câmara de Neubauer para a estimativa da concentração de células viáveis.

4.3 Cultivo de células mononucleares e ensaios de estimulação *in vitro*.

Após a separação as PBMC tiveram suas contagens ajustadas a um número de $1,5 \times 10^6$ células/poço foi utilizada em placa de 96 poços fundo U estéril (BDBiosciense, San José, CA, USA). Foram adicionadas em cada poço a ser estimulado 1µg/mL de CD28 e CD49d (BD Pharmingen, USA). Em seguida, as células foram estimuladas com 1µg/mL de enteroxina B de *Staphylococcus aureus* (SEB, Sigma, USA) ou 20µg/mL de *M. leprae* (ML) irradiado e sonificado proveniente de tatu (fornecido pelo contrato NIH/NIAID N01 AI-25469 da Universidade do Colorado, CO, USA). As culturas foram mantidas a 37°C em estufa com 5% de CO₂ por 6 horas, sendo que nas últimas duas horas de cultura foram acrescentados 10 µg/mL de brefeldina A (proteín transport inhibitor, BD GolgiPlug™, USA). Após o término da cultura, as placas com PBMC foram mantidas na geladeira a 4°C por até 24 horas até o momento da fenotipagem e determinação de citocinas intracelulares por citometria de fluxo. Paralelamente, PBMCs dos indivíduos foram submetidas a um imunofenotipagem *ex vivo* (tempo 0) por citometria de fluxo.

4.4 Análise de moléculas de superfície de membrana celular e de citocinas intracelulares por citometria de fluxo.

As culturas estimuladas por 6 horas e PBMC frescas (tempo 0) foram centrifugadas durante 5 minutos, a 4°C, 600xg sob freio baixo. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e os poços foram ressuspensos com 150 µL de PBS a 4°C. As células foram lavadas novamente por centrifugação por 5 minutos, a 4°C, 600 xg sob freio baixo e o sobrenadante mais uma vez descartado. As células foram ressuspensas com 150 µL de PBS contendo 0,02% de EDTA o sobrenadante foi misturado cuidadosamente em “vortex” por um minuto e a placa foi mantida por 15 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, foram efetuadas mais duas lavagens por centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram coradas com VIVID (Kit Live/Dead, Invitrogen, USA) para separação de células mortas de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, as células foram incubadas por 30 minutos em ambiente protegido da luz, imediatamente lavadas duas vezes por centrifugação e o sobrenadante descartado. As células foram então incubadas com os anticorpos monoclonais de superfície CD3 V500, CD4 ou CD8 APC, CCR7, PerCp e CD45RA FITC e seus respectivos controles de isotipo marcados com os mesmos fluorcromos (Tabela 2). Todos os anticorpos utilizados, assim como os controles isotípicos foram obtidos da Biolegend (USA). Após 30 minutos de incubação a 4°C, as células foram lavadas por centrifugação com 150 µL de PBS 0,1% de azida sódica e 1% de soro fetal bovino (SFB). Em seguida, as células foram ressuspensas em 1% de paraformaldeído (PA) e incubadas por 30 minutos a 4°C em ambiente protegido da luz. Após esse período, as culturas foram mantidas a 4°C em ambiente protegido da luz. As culturas celulares de 6 horas foram lavadas por centrifugação por duas vezes e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, as PBMC foram ressuspensas com 200 µL de tampão de permeabilização 1:10 (PERM- 2; BD Biosciences). As culturas foram homogeneizadas em vortex cuidadosamente por 1 minuto e incubadas à temperatura ambiente em ambiente protegido da luz por 10 minutos. Após esse período, PBMC foram lavadas por centrifugação por duas vezes com 150 µL de PBS 0,1% de azida sódica e 1% de SFB. Em seguida, as células foram coradas com os anticorpos monoclonais para citocinas intracelulares, a saber: IFN- γ PE-Cy7, TNF Alexa700, IL-10 PE e seus respectivos controles de isotipo (Biolegend) durante 30 minutos a 4°C em ambiente protegido

da luz. Nova etapa dupla de centrifugação foi realizada em 150 µL de PBS 0,1% de azida sódica e 1% de SFB. As células foram ressuspensas com 200 µL de paraformaldeído 1%, transferidas para tubos de citometria e analisadas em citômetro de fluxo FACSAria (BD Biosciences). Utilizando o programa Diva (BD), foram adquiridos 50.000 eventos por amostra dentro da região de linfócitos e as análises de citometria foram realizadas no programa Flowjo v. 7.5 (Tree Star Inc., USA).

Tabela 2 – Descrição dos anticorpos utilizados para citometria de fluxo

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Fabricante	Nº. de catálogo	Isotipo
CD4	APC	RPA-T4	Biologend	300154	Mouse IgG1
CD8	APC	HIT8a	Biologend	300912	Mouse IgG1
CD3	Brilliant Violet 510	OKT3	Biologend	317332	Mouse IgG2a
CCR7	PerCP	G043H7	Biologend	353220	Mouse IgG2a
CD45RA	FITC	HI100	Biologend	304106	Mouse IgG2b
IFN-g	PE/Cy7	B27	Biologend	506518	Mouse IgG1
TNF	Alexa Fluor 700	MAB11	Biologend	502928	Mouse IgG1
IL-10	PE	JES3-9D7	Biologend	501404	Rat IgG1
Controle de isotipo	APC	MOPC-21	Biologend	400120	Mouse IgG1
Controle de isotipo	Brilliant Violet 510	MOPC-173	Biologend	400267	Mouse IgG2a
Controle de isotipo	PerCP	MOPC-173	Biologend	400250	Mouse IgG2a
Controle de isotipo	FITC	MPC-11	Biologend	400310	Mouse IgG2b
Controle de isotipo	PE/Cy7	MOPC-21	Biologend	400126	Mouse IgG1
Controle de isotipo	Alexa Fluor 700	MOPC-21	Biologend	400144	Mouse IgG1
Controle de isotipo	PE	RTK2071	Biologend	400408	Rat IgG1

4.5 Metodologia de análise das subpopulações linfocitárias por citometria de fluxo.

As frequências de linfócitos TCD4+ e CD8+ foram avaliadas em PBMC isoladas do sangue periférico recém-obtido (tempo zero, T0) e na identificação das subpopulações de interesse em resposta ao M. leprae e SEB, nas culturas de 6h. Para tal, uma sequência de análises foi realizada, a partir da aquisição em citômetro de fluxo FACSAria. Inicialmente, células mortas foram excluídas com o uso do kit “Live/Dead” (Figura 7A). Em seguida, os parâmetros de complexidade estrutural (SSC-A) e tamanho (FSC-A) foram utilizados para selecionar a região de análise de linfócitos T (Figura 7B). Posteriormente, os grumos de células foram excluídos utilizando os parâmetros de tamanho FSC-A (“Foward Scatter” - área) X FSC-H (“Foward Scarter” – altura; Figura 7C). A região dos linfócitos T

CD3+/CD4+ e CD3+/CD8+ foi determinada utilizando anticorpos monoclonais específicos e controles isotípicos (Figura 7D). A partir da determinação dessas subpopulações, utilizamos a marcação com anticorpos anti-CD45RA e anti-CCR7 para identificar as subpopulações de linfócitos com os fenótipos denominados e, conforme os fluorocromos utilizados foram assim distribuídos: T Naïve, CD45RA+ /CCR7+ (quadrante superior direito); T memória central, CCR7+ /CD45RA- (quadrante superior esquerdo); T memória efetora CD45RA-/CCR7- (quadrante inferior esquerdo) e T efetora, CD45RA+ /CCR7- (quadrante inferior direito) (Figura 7E). Após a obtenção destas quatro subpopulações de linfócitos T CD4+/CD8+ foi feita a quantificação da frequência destas células produtoras das citocinas intracelulares estudadas (Figuras 7F, 7G e 7H).

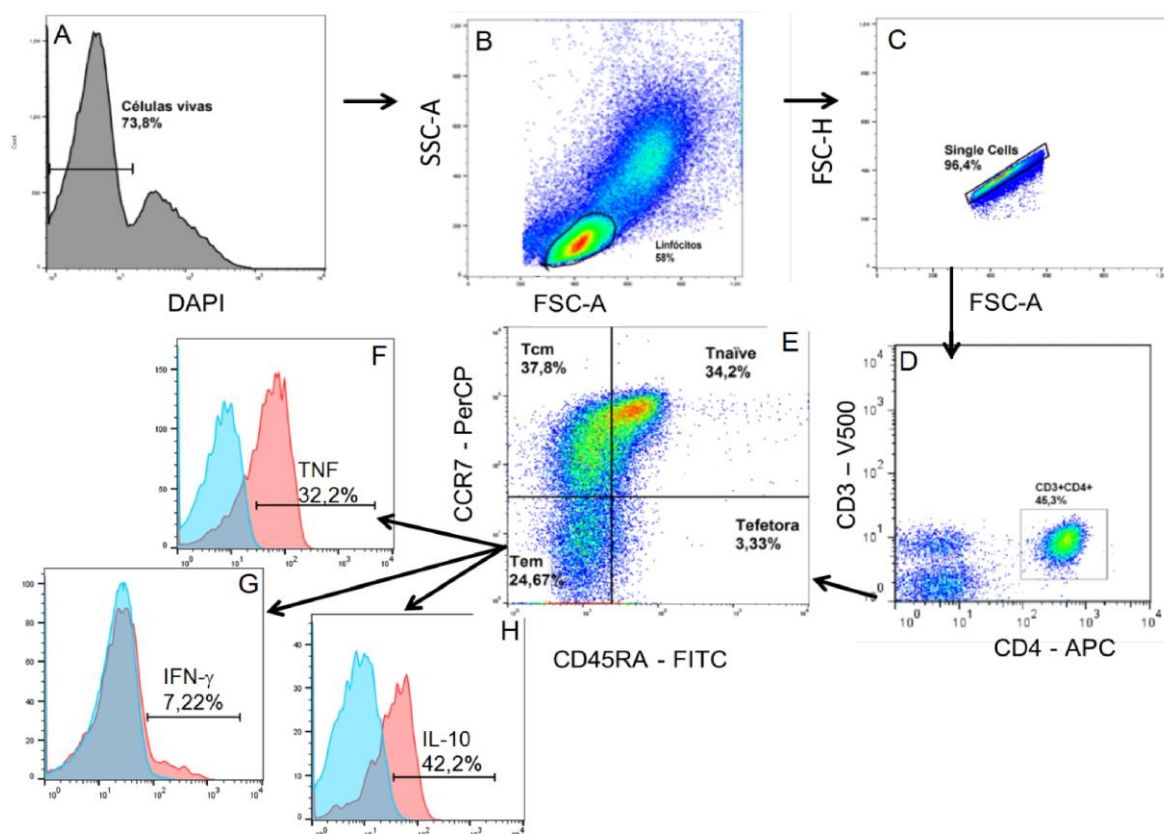


Figura 7. Análise citométrica. Estratégia de análise dos dados obtidos por citometria de fluxo multiparamétrica, utilizando os softwares Diva e FlowJo v10.1. Nas figuras F, G e H, os histogramas vermelhos correspondem as citocinas e os azuis ao controles de isotipo.

4.6 Extração do RNA.

Para extração do RNA proveniente do sangue total estocado em tubos Paxgenes (BD Biosciences) a -70°C por período inferior a seis meses procedeu-se com o descongelamento dos tubos durante 2h, seguido pela centrifugação dos tubos a 3000 xg por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Ao “pellet” foi

adicionado 5 mL de água deionizada livre de RNAase e foi realizado homogeneização em “vortex” por 1 minuto. Em seguida, o pellet foi lavado por 10 minutos a 3000 xg e o sobrenadante foi descartado. O “pellet” foi ressuspensão em 350 µL de Tampão BR1, homogeneizado em vortex e a amostra foi transferida para tubos de poliuretano (Eppendorf, EUA) com 300 µL de tampão BR2 e 40 µL de proteinase K. As amostras foram homogeneizadas em vortex e incubadas por 10 minutos a 55°C em banho seco. Em seguida, as amostras por 10 minutos na velocidade máxima da microcentrífuga. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de poliuretano (Eppendorf) e foi adicionado 350 µL de etanol 100%. O lisado foi transferido para a coluna inserida no tubo coletor e levado à centrifugação a 8000 xg por 60 segundos em microcentrífuga. Em outro tubo, a 2ª coluna foi inserida e o lisado foi ajustado para 750 µL. Após nova etapa de centrifugação (1800 xg por 30 segundos) foi adicionado ao sedimento 350µL de tampão de dissociação e nova centrifugação foi realizada a 8000 gx por 60 segundos. O tampão de DNase (MIX) foi feito imediatamente antes do uso com 70 µL de tampão para rDNase e 10µL de rDNase, ambos homogeneizados com pipeta de forma suave. O MIX (80µL) foi colocado em uma membrana, sendo esta incubada à temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 200µL de tampão para a inativação de rDNase e nova etapa de centrifugação foi realizada (8000 xg por 30 segundos). Esta operação foi repetida por 3 vezes. A partir de então, a membrana seca foi transferida para um tubo de 1,5 mL livre de nucleases. O RNA foi eluído com 80 µL de água deionizada livre de RNAase e o tubo coletor foi centrifugado a 8000 xg por 60 segundos.

4.7 Quantificação e pureza do RNA.

A quantificação e avaliação de pureza do RNA extraído anteriormente foi realizada por espectrofotometria, sendo a leitura feita pelo espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo scientific, USA). Inicialmente foi lido 1µL de água destilada ultrapura, livre de DNase/RNase (Life Technologies, USA) para determinar o “branco”. Em seguida, 1µL de cada amostra de RNA extraído foi lida, a avaliação da pureza foi determinada mediante a razão da absorbância (A) em dois comprimentos de onda: $A_{260/280}$, que indica o grau de contaminação por proteínas; e $A_{260/230}$ que indica o grau de contaminação por compostos orgânicos provenientes dos processos de obtenção e extração do RNA. Levando isso em

consideração, as amostras que obtiveram as razões $A_{260/280}$ e $A_{260/230} > 1,8$ foram consideradas de alto grau de pureza, e, por consequência, aptas à síntese de cDNA.

4.8 Síntese de cDNA.

A conversão do RNA para o cDNA foi feita com o kit HC cDNA reversal transcription (Applied Biosystems, USA). Para a reação de síntese de cDNA foi utilizado o kit SuperScript III® First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, USA) e os procedimentos foram realizados conforme orientação do fabricante. Em um tubo Eppendorf contendo 1µg de RNA, foi adicionado 1µL de oligo(dT)₂₀, 1µL de solução de anelamento e H₂O RF até um volume de 8µL. As amostras foram então incubadas a 65°C por 5min. Em seguida, foram adicionados aos tubos 12 µL de 2X First-Strand Reaction Mix e 2µL de supercript-III, já contendo RNaseOUT. As amostras foram então centrifugadas e incubadas a 50°C por 50min seguido de incubação a 85°C por 5min, a fim de inativar a enzima. Por fim, as amostras foram mantidas em gelo por 1 minuto e armazenadas a -20° C até o uso.

4.9 Quantificação da expressão gênica de fatores transcrpcionais por PCR quantitativo em tempo real (RTqPCR).

Para a amplificação de material genômico por PCR em tempo real, as amostras de cDNA foram utilizadas na quantidade de 10ng por reação em volume final de 10µl (já contendo o cDNA). Foi utilizado o sistema Taqman de RT-PCR em tempo real com o ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) para contínuo monitoramento da fluorescência em cada poço (ABI Prismopticalplates, Applied Biosystems). Foram adicionados 1 µL de cada cDNA, 3,5 µL de água destilada ultrapura, livre de DNase / RNase (Life Technologies, USA) e 5 µL de TaqMan®Fast Universal PCR MasterMix (2x) (Applied Biosystems). Para cada amostra foram amplificados o gene de referência gliceral-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) e os genes de interesse (*STAT3*, *STAT4*, *STAT6*, *TBX21*, *RORC*, *FOXP3* e *GATA3*).

As amostras de cDNA foram então amplificadas utilizando o equipamento de PCR em tempo real StepOne Plus® (Applied Biosystems, USA), submetendo-

as a ciclos de 95° C por 20 segundos, 40 ciclos de 95° C por 1 segundo e 60° C por 20 segundos.

A análise da expressão gênica relativa foi realizada utilizando-se o método $2^{-\Delta C_T}$ (Livak e Schmittgen, 2001). A variação nos níveis de expressão dos genes de interesse foi calculada a partir da variação entre os valores de C_T dos genes de interesse e do GAPDH. Os valores de ΔC_T foram calculados segundo a fórmula abaixo, de modo a gerar resultados que refletissem a expressão dos genes de interesse em relação à expressão do GAPDH: $\Delta C_T = C_T \text{ gene de interesse} - C_T \text{ GAPDH}$.

4.10 Análise estatística.

Os resultados foram expressos em mediana e intervalo (mínimo-máximo). Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas com os testes não paramétricos Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e/ou Wilcoxon. O método de Spearman foi utilizado para a obtenção do coeficiente de correlação (r) entre dois resultados de uma mesma amostra. O programa Prisma versão 6 foi utilizado para a análise estatística e gráfica (Graph Prism, USA). Os valores com $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), e $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****) foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Características clínicas e demográficas dos pacientes e doadores sadios.

Este foi um estudo do tipo transversal, com 49 indivíduos estudados no total. Destes, estudamos 19 pacientes LL em reação do tipo II (ENL), 15 pacientes LL não reacionais (LL) e 15 voluntários sadios de área endêmica para a hanseníase (VS). A média de idade do grupo ENL foi de $43,2 \pm 16,7$ anos, do grupo LL de $36 \pm 9,7$ anos e do grupo VS de $31,4 \pm 10,2$ anos. Quanto ao gênero, no grupo ENL, 26,3% eram do sexo feminino e 73,7% do masculino; já no grupo LL, 73,7% dos pacientes eram homens e 26,7% em mulheres. Dentre os voluntários sadios, 33,3% eram do sexo masculino e 66,6% do feminino.

Durante o ENL, a baciloscopia foi positiva em todos os pacientes estudados, com carga bacilar média de 3,89 (variando de 1,75 a 5,75). No momento do diagnóstico, os mesmos pacientes apresentavam IB médio de 4,72. No grupo LL, o IB médio foi de 5,1 (variando de 4,75 a 5,75). O teste de lepromina (reação de Mitsuda) foi negativo em todos os pacientes.

A avaliação do grau de incapacidade (GI) funcional foi realizada em 15 dos 19 pacientes do grupo ENL e revelou que cerca de 47% destes pacientes já apresentava perda de sensibilidade ou incapacidades decorrentes da doença. No grupo LL, 11 pacientes foram avaliados e, desses, 4 também já apresentavam algum comprometimento. Todos os pacientes receberam o tratamento poliquimioterápico (PQT) como preconizado pelo Ministério da Saúde. Além disso, durante o ENL os pacientes foram tratados, usualmente, com talidomida ou prednisona em doses e duração prescritas pela equipe médica.

A coleta de sangue para a avaliação imunológica ocorreu imediatamente antes do início do tratamento do episódio reacional. As características clínicas e demográficas dos indivíduos avaliados nesse estudo encontram-se detalhadas na Tabela 2.

Tabela 3 – Caracterização clínica e demográfica dos indivíduos estudados.

ID	Forma Clínica	Sexo	Idade	IB inicial	IB na reação	Dose da PQT na reação	GI
ENL01	LL/ENL	F	23	4,5	4	6ª dose	0
ENL02	LL/ENL	M	74	4,75	4	Pós-tratamento	2
ENL03	LL/ENL	M	42	NR	4,5	Não tratado	1
ENL04	LL/ENL	M	64	3,5	2,5	Pós-tratamento	NR
ENL05	LL/ENL	M	32	4	2,5	Pós-tratamento	0
ENL06	LL/ENL	M	54	4,25	4	Pós-tratamento	1
ENL07	LL/ENL	M	66	4,25	3,75	Pós-tratamento	0
ENL08	LL/ENL	M	60	5	1,75	Pós-tratamento	2
ENL09	LL/ENL	M	18	4,75	3,75	Pós-tratamento	2
ENL10	LL/ENL	F	38	4,75	5,75	Pós-tratamento	1
ENL11	LL/ENL	F	57	5,75	4,5	Pós-tratamento	1
ENL12	LL/ENL	F	33	5,5	3,5	Pós-tratamento	0
ENL13	LL/ENL	M	26	NR	3,5	Não tratado	0
ENL14	LL/ENL	M	32	NR	4,5	Não tratado	NR
ENL15	LL/ENL	M	45	5	2,5	12ª dose	0
ENL16	LL/ENL	M	62	NR	4,5	Não tratado	0
ENL17	LL/ENL	M	33	4,75	4,5	6ª dose	NR
ENL18	LL/ENL	M	35	5,75	4,75	Pós-tratamento	0
ENL19	LL/ENL	F	27	4,25	5	12ª dose	NR
HLL01	LL	M	26	5	-	-	2
HLL02	LL	M	32	5	4,75	6ª dose	0
HLL03	LL	M	33	4,75	5,75	4ª dose	NR
HLL04	LL	M	39	5	-	-	0
HLL05	LL	F	31	5	-	-	NR
HLL06	LL	F	31	4,75	3,5	Pós-tratamento	0
HLL07	LL	M	32	5,75	4	7ª dose	0
HLL08	LL	M	24	5	-	-	2
HLL09	LL	F	27	5,5	-	-	1
HLL10	LL	M	38	5,5	-	-	NR
HLL11	LL	M	37	5,5	-	-	0
HLL12	LL	F	40	5	-	-	1
HLL13	LL	M	65	4,75	-	-	0
HLL14	LL	M	37	5	-	-	NR
HLL15	LL	M	48	5	-	-	0
VSA01	VS	M	22	-	-	-	-
VSA02	VS	F	28	-	-	-	-
VSA03	VS	F	50	-	-	-	-
VSA04	VS	F	23	-	-	-	-
VSA05	VS	F	26	-	-	-	-
VSA06	VS	F	22	-	-	-	-
VSA07	VS	F	40	-	-	-	-
VSA08	VS	M	35	-	-	-	-
VSA09	VS	M	40	-	-	-	-
VSA10	VS	M	45	-	-	-	-

VSA11	VS	F	22	-	-	-	-
VSA12	VS	F	21	-	-	-	-
VSA13	VS	F	27	-	-	-	-
VSA14	VS	M	48	-	-	-	-
VSA15	VS	F	22	-	-	-	-

ID, código do sujeito em estudo; VS, voluntário saudável de área endêmica; LL/ENL, forma clínica LL em ENL; LL, forma clínica lepromatosa polar; NR, não realizado; NT, não tratado; GI, grau de incapacidade; M, masculino; F, feminino; IB, índice bacilos cópico.

5.2 - Determinação de subpopulações de linfócitos T de pacientes LL com e sem ENL.

5.2.1 - Análise fenotípica *ex vivo* das subpopulações de linfócitos T de pacientes LL com e sem ENL.

As subpopulações sanguíneas de linfócitos T CD3+/CD4+ e CD3+/CD8+ de pacientes LL com e sem ENL, assim como de voluntários sadios, foram analisadas no que chamamos de tempo zero (T0) a fim de caracterizar as populações linfocitárias *ex vivo* predominantes nos grupos. Os pacientes LL com ou sem reação apresentaram uma razão de linfócitos T CD4/CD8 de aproximadamente 2:1, enquanto nos voluntários sadios a razão foi cerca de 1:1 (Figura 8).

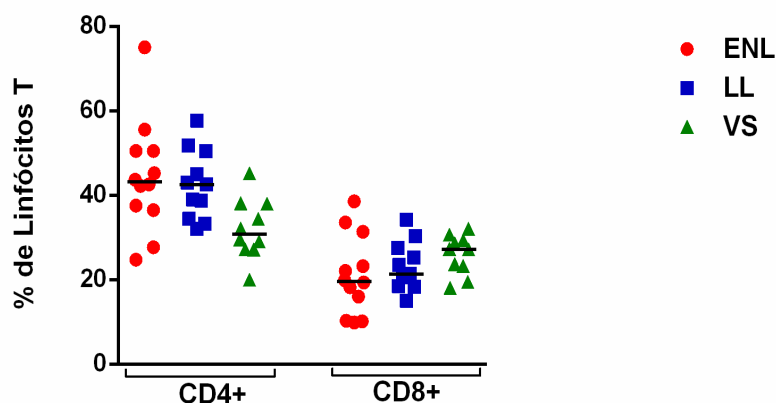


Figura 8. Frequência de linfócitos T CD3+/CD4+ e CD3+/CD8+ totais *ex vivo* de pacientes LL com ou sem ENL e voluntários sadios (VS). Análise por citometria de fluxo de linfócitos T a partir de PBMC. As barras horizontais representam a mediana do grupo e os símbolos representam o resultado cada indivíduo e a mediana do grupo, sendo: 12 ENL, 11 LL e 10 VS.

Com relação aos linfócitos $T_{NAÍVE}$, os pacientes com ENL apresentaram diminuição no percentual das CD3+/CD4+ em comparação aos não reacionais e aos indivíduos sadios, sendo significativa a diferença entre os grupos ENL e LL ($p=0,003$) (Figura 9). Diminuição significativa também foi observada nas $T_{NAÍVE}$ CD3+/CD8+ no grupo ENL em comparação ao grupo de pacientes LL ($p=0,0004$) e ao grupo de sadios ($p=0,0002$). Enquanto os pacientes LL em ENL apresentaram menor frequência de células $T_{NAÍVE}$, foi verificado que eles apresentam maior frequência de linfócitos T de memória, tanto central quanto efetora, como mostrado na figura 9. Os pacientes em ENL apresentaram aumento na frequência de linfócitos T de memória tanto CD4+ quanto CD8+ quando comparados aos pacientes que não estavam em reação e aos voluntários sadios. A diferença entre as frequências de linfócitos T de memória foi estatisticamente significativa para todas as comparações feitas com o grupo dos pacientes ENL (Figura 9). No caso dos linfócitos T CD4+ de memória central (T_{MC}), o valor de p foi inferior a 0,0001 quando comparados os grupos LL e ENL, enquanto $p=0,0006$ para a comparação entre ENL e os voluntários sadios. Em relação aos linfócitos T CD8+ de memória central, os valores de p foram 0,0001 e inferior a 0,0001 respectivamente, para as comparações entre ENL e LL e ENL e VS. Com respeito aos linfócitos T de memória efetora também foi observado uma diferença significativa entre o grupo dos pacientes ENL e os demais grupos, sendo a diferença mais acentuada para os linfócitos T CD8+, com $p=0,0002$ na comparação entre ENL e LL e $p=0,0004$ na comparação entre ENL e VS. Já para os linfócitos T CD4+, a diferença para as células de memória efetora foi menos acentuada na comparação entre ENL e VS ($p=0,002$) e entre ENL e LL ($p=0,007$). Foi identificada uma diminuição na frequência linfócitos T efetores no grupo dos pacientes LL reacionais, sendo a diferença estatisticamente significativa apenas para os Linfócitos T CD4+, quando comparados LL e ENL ($p=0,007$), e também entre ENL e VS ($p=0,0001$). Portanto, constatou-se um aumento acentuado na frequência dos linfócitos T CD4+ ou CD8+ de memória em ENL em comparação aos linfócitos $T_{NAÍVE}$ (Figura 9).

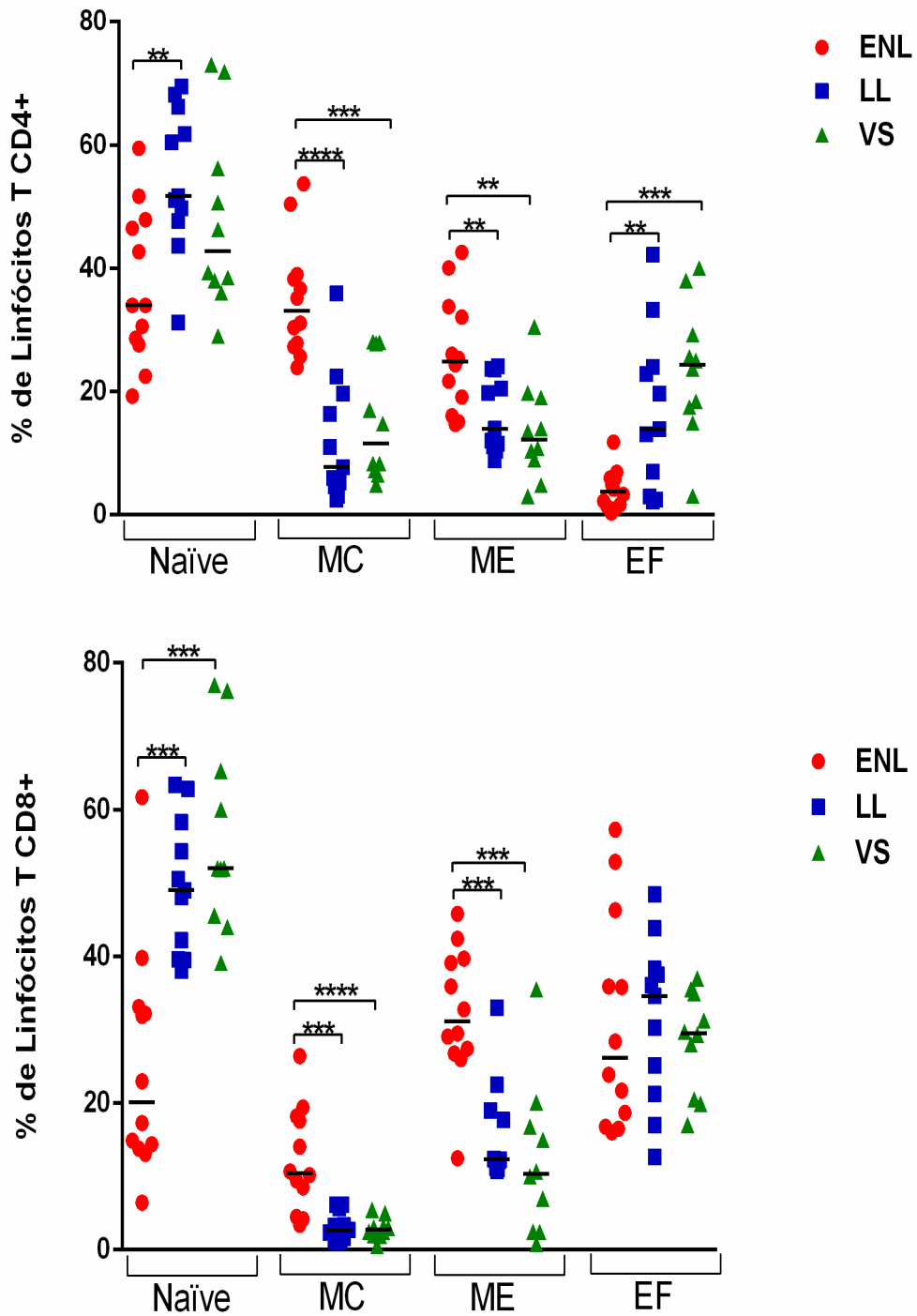


Figura 9. Frequência ex vivo de subpopulações de linfócitos T CD4+ (gráfico superior) e T CD8+ (gráfico inferior). Análise por citometria de fluxo de linfócitos T provenientes de PBMC. Nos dois gráficos os símbolos representam o resultado percentual de cada indivíduo e as barras horizontais a mediana do grupo em experimentos isolados com 12 ENL, 11 LL e 10 VS. MC – memória central, ME – memória efetora e EF – efetora. O teste Mann-Whitney foi usado para análise estatística, sendo: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

5.2.2 - Análise fenotípica *in vitro* das subpopulações de linfócitos T de pacientes LL com e sem ENL em resposta ao *M. leprae*.

A fim de caracterizar as principais subpopulações que participam da resposta antígeno-específica de pacientes LL no desencadeamento do ENL, realizou-se o protocolo de marcação citado na metodologia e a análise mostrada na Figura 7, sendo que os resultados encontrados estão descritos nas Figuras 10 e 11 a seguir. Não houve alteração significativa na frequência das subpopulações de linfócitos T CD4+ ou CD8+ totais ou em suas respectivas subpopulações nos pacientes estudados nas situações com ou sem estímulo do *M. leprae*. Observamos apenas um aumento significativo dos linfócitos T totais CD4+ ($p=0,0098$) e CD8+ ($p=0,002$) após o estímulo pelo ML em voluntários sadios. Além disso, foi verificada maior frequência de linfócitos T de memória no grupo de pacientes ENL em relação aos demais grupos estudados, como visto anteriormente no teste *ex vivo* (Figura 11).

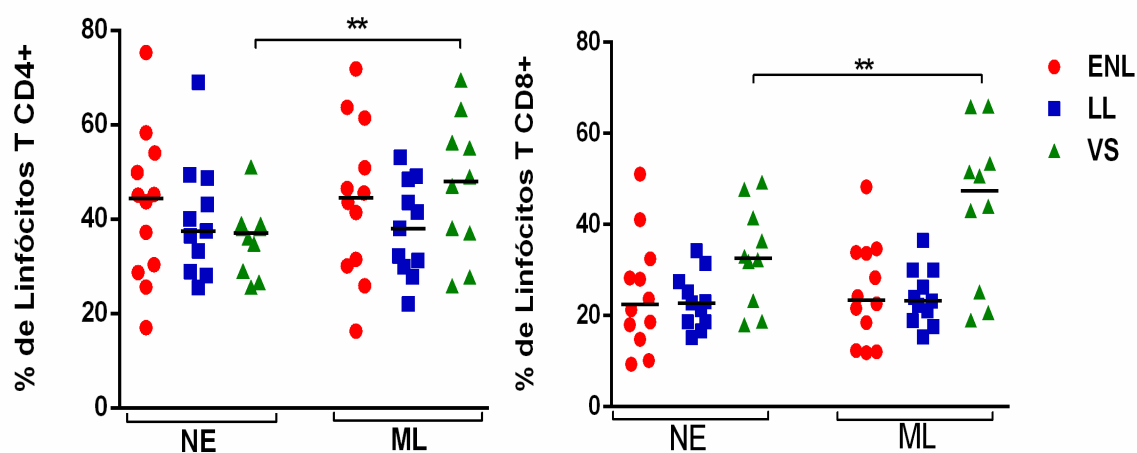


Figura 10. Frequência de linfócitos T CD4+ (gráfico à esquerda) e TCD8+ (gráfico à direita) totais em culturas estimuladas ou não (NE) com *M. leprae* (ML). Análise de linfócitos T obtidos a partir de PBMC por citometria de fluxo. Os símbolos representam o resultado percentual de testes isolados de cada indivíduo e as barras horizontais a mediana do grupo, sendo: 12 ENL, 11 LL e 10 VS. O teste *Wilcoxon* foi usado para análise estatística, com * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$.

Novamente, os pacientes LL apresentaram uma maior frequência de linfócitos T_{NAÏVE}, sendo significativa a diferença no caso das células CD4+, nas situações com ou sem estímulo com *M. leprae*, quando comparados ao ENL ($p=0,0044$) e também para a comparação entre LL e VS ($p=0,012$) (Figura 11). Os

pacientes LL, com ou sem ENL, apresentaram maior frequência de linfócitos T CD4+ de memória central quando comparados aos sadios, sendo $p < 0,0001$ na comparação entre ENL e VS e $p = 0,022$ na comparação entre LL e VS. Em relação às células de memória, assim como na fenotipagem *ex vivo* (T0) (Figura 9), obteve-se uma maior frequência de células de memória nos pacientes em ENL tanto nos linfócitos T CD4+ quanto nos CD8+ em cultura de 6 horas na presença ou não do estímulo do *M. leprae* (Figura 11). A diferença entre a frequência de linfócitos T de memória, quando comparamos pacientes LL sem reação com os reacionais, foi maior no que concerne aos linfócitos T CD8+ de memória central, sendo $p = 0,0085$ na situação sem estímulo e $p = 0,0055$ com o estímulo do *M. leprae*. As células T_{ME} apresentaram-se em maior frequência no ENL também, sendo $p = 0,0205$ quando comparadas à porcentagem de linfócitos T CD8+ de memória efetora entre LL e ENL. Surpreendentemente, o grupo de voluntários sadios de área endêmica (VS) apresentou maior frequência de linfócitos T efetores quando comparados aos grupos de pacientes hansênicos, com ou sem reação, especialmente no caso dos linfócitos T CD4+ estimulados pelo *M. leprae*, cujas comparações entre VS e ENL ($p < 0,0001$) e VS e LL ($p = 0,001$) foram significativas.

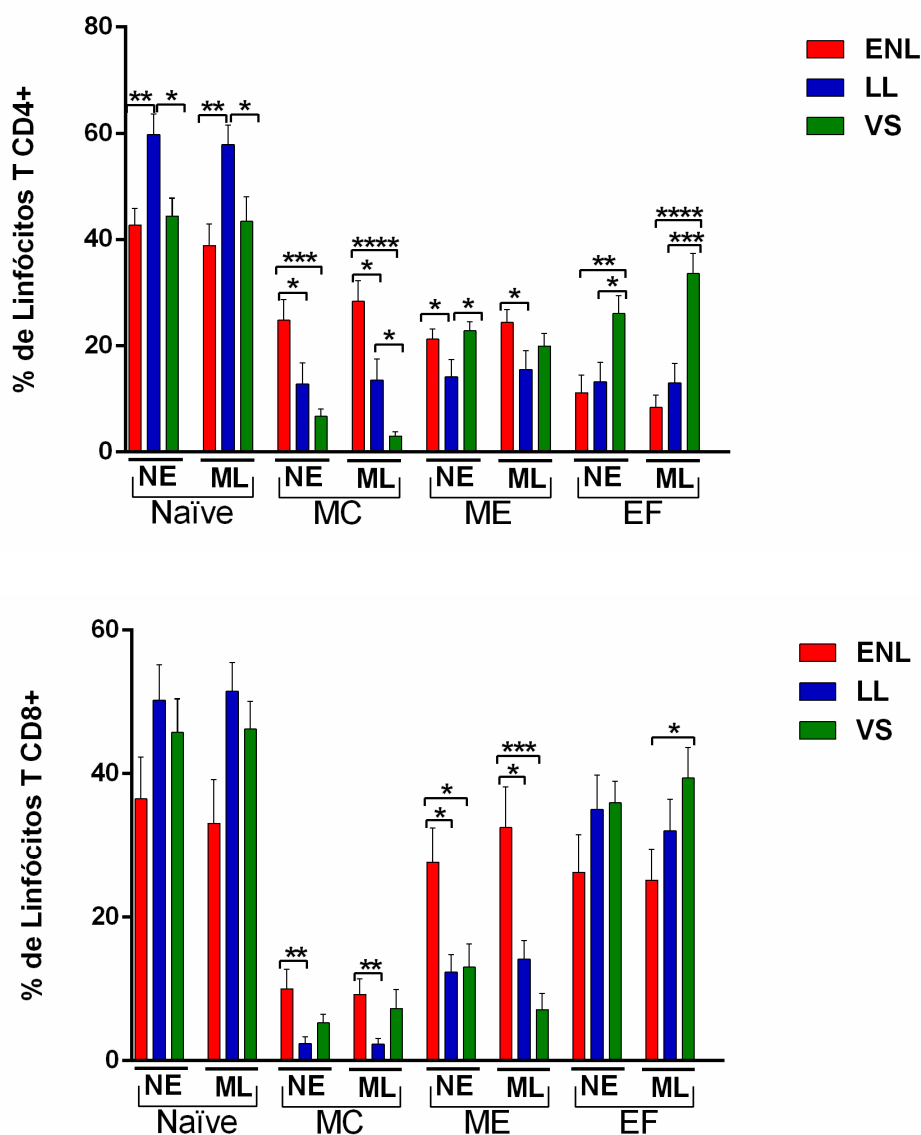


Figura 11. Frequência de subpopulações de linfócitos T CD4+ (gráfico superior) e T CD8+ (gráfico inferior) em culturas estimuladas ou não com *M. leprae* (NE, não estimulado; ML, estimulado com *M. leprae*). Análise de linfócitos T obtidos a partir de PBMC por citometria de fluxo. As barras verticais representam a média do grupo e acima delas o erro padrão de experimentos isolados de 12 pacientes LL em reação do tipo II (ENL), 11 pacientes LL não-reacionais (LL) e 10 voluntários sadios (VS). O teste Mann-Whitney foi usado para análise estatística, sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

5.3 Frequência de subpopulações de linfócitos T produtores de IFN- γ , TNF e IL-10 em resposta ao *Mycobacterium leprae*.

Após a avaliação das subpopulações de linfócitos T partícipes do desencadeamento do ENL, foi feita a análise funcional a partir da mensuração da frequência destas subpopulações produtoras das citocinas IFN- γ , TNF e IL-10 em culturas estimuladas ou não com *M. leprae*, por meio da citometria de fluxo

multiparamétrica. Com relação aos linfócitos T CD4+ (Figuras 12, 13 e 14), foi observado que o grupo ENL apresentou maior frequência de células produtoras de IL-10 quando comparado aos LL não reacionais e aos voluntários sadios, especialmente no que diz respeito às células T_{NAÏVE}, T_{CM} e T_{EF} (Figura 12). Não houve diferença significativa em relação aos linfócitos T CD4+ de memória efetora, pois os três grupos apresentaram frequência de células produtoras de IL-10 semelhante. Células T CD4+ _{NAÏVE} produtoras de IL-10 de pacientes LL não reacionais apresentaram uma leve tendência de aumento em sua frequência após estímulo com ML, o que não ocorreu com os outros grupos estudados. Entretanto, essas diferenças também não foram significativas. Com relação aos linfócitos T CD8+, as diferenças entre os pacientes lepromatosos nos cenários não reacional e em ENL foram mais marcantes. Assim como os linfócitos T CD4+, os CD8+ produtores de IL-10 do grupo ENL foram mais frequentes, nas T_{NAÏVE} e T_{CM}, sendo quando comparados os grupos LL e ENL em culturas não estimuladas, com $p=0,041$ e $p=0,012$ com o estímulo do ML. Ao contrário do que foi observado com linfócitos T CD4+, as células T CD8+ _{naïve} produtoras de IL-10 dos pacientes LL não reacionais não apresentavam frequências mais altas frente ao estímulo do ML. Além disso, como já mencionado acima, as células T_{CM} CD8+ produtoras de IL-10 do grupo ENL apresentavam maior frequência quando comparadas com o grupo LL, tanto no estado não estimulado ($p=0,036$), quanto frente ao ML ($p=0,0079$).

De acordo com a análise feita, em consonância com a metodologia adotada descrita na Figura 6, na abertura do ENL os pacientes apresentam uma queda na frequência dos linfócitos T CD8+ produtores de IFN- γ em todas as subpopulações estudadas (Figura 13), sendo que, novamente, o estímulo *in vitro* do ML não foi capaz de alterar significativamente a frequência destas células produtoras da citocina em questão. Ademais, com referência à frequência de linfócitos T CD8+ produtores de TNF, em nosso estudo obtivemos resultados significativos apenas nas subpopulações T_{EM} e T_{EF} nas culturas não estimuladas quando comparamos os grupos ENL e LL, sendo o valor de $p=0,0289$ e $p=0,02$ respectivamente (Figura 14).

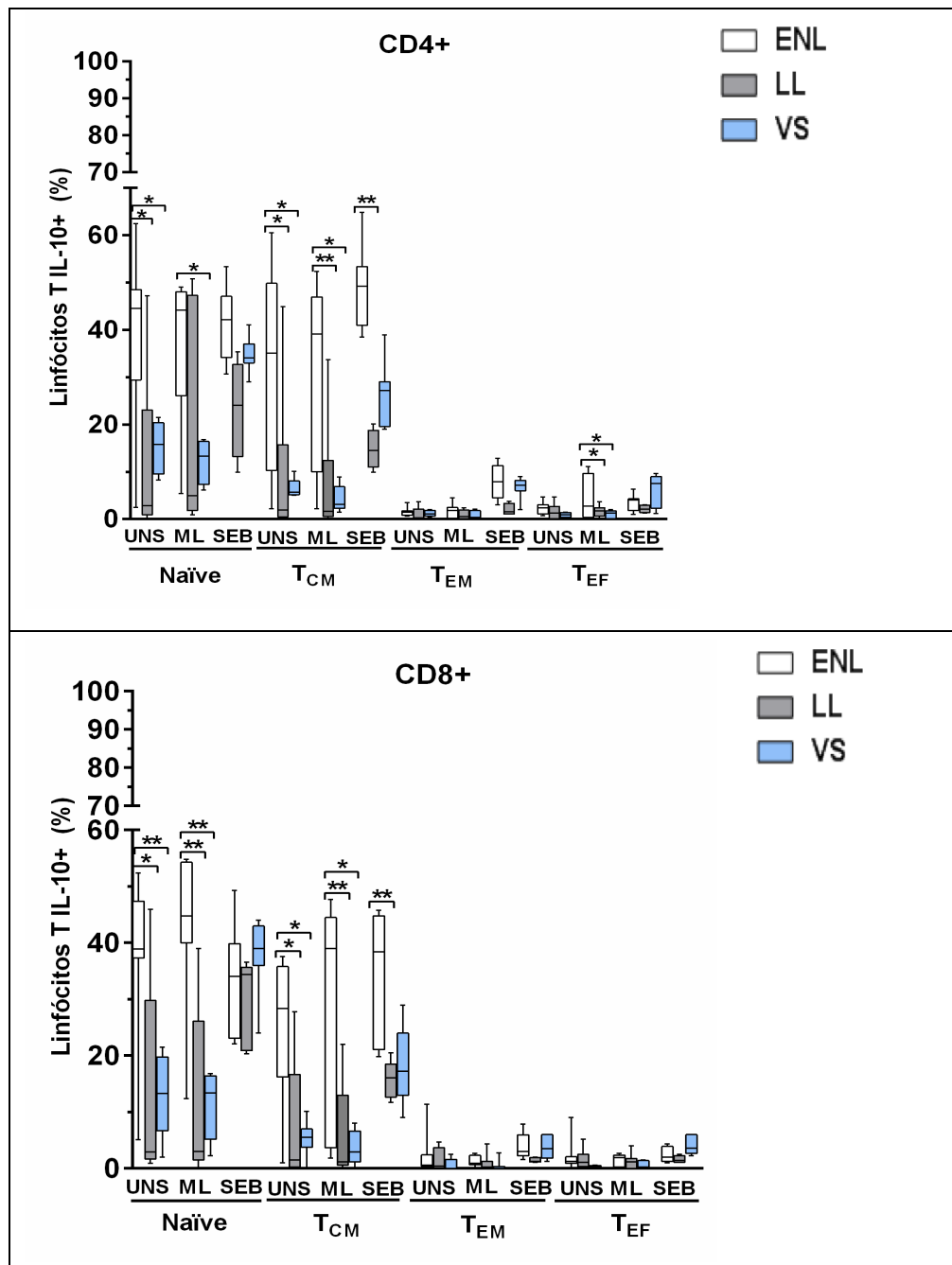


Figura 12. Análise funcional das diferentes subpopulações de linfócitos T frente ao *Mycobacterium leprae* (ML). Linfócitos T CD4+ (gráfico superior) e CD8+ (gráfico inferior) naïve (T_{NAÏVE}), efetores (T_{EF}), de memória central (T_{CM}) e de memória efetora (T_{EM}) produtores de IL-10 em PBMC de pacientes e voluntários sadios (VS) em culturas não estimuladas (UNS), estimuladas por *M. leprae* (ML) e estimuladas com enterotoxina de *Staphylococcus aureus* (SEB). Análises feitas por citometria de fluxo. Os experimentos foram realizados nos grupos ENL (n=10), LL (n=10) e VS (n=10). O teste Mann-Whitney foi usado para análise estatística, onde * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. As caixas, a linha horizontal e as barras verticais representam a mediana das frequências e a distribuição dos intervalos de cada grupo avaliado.

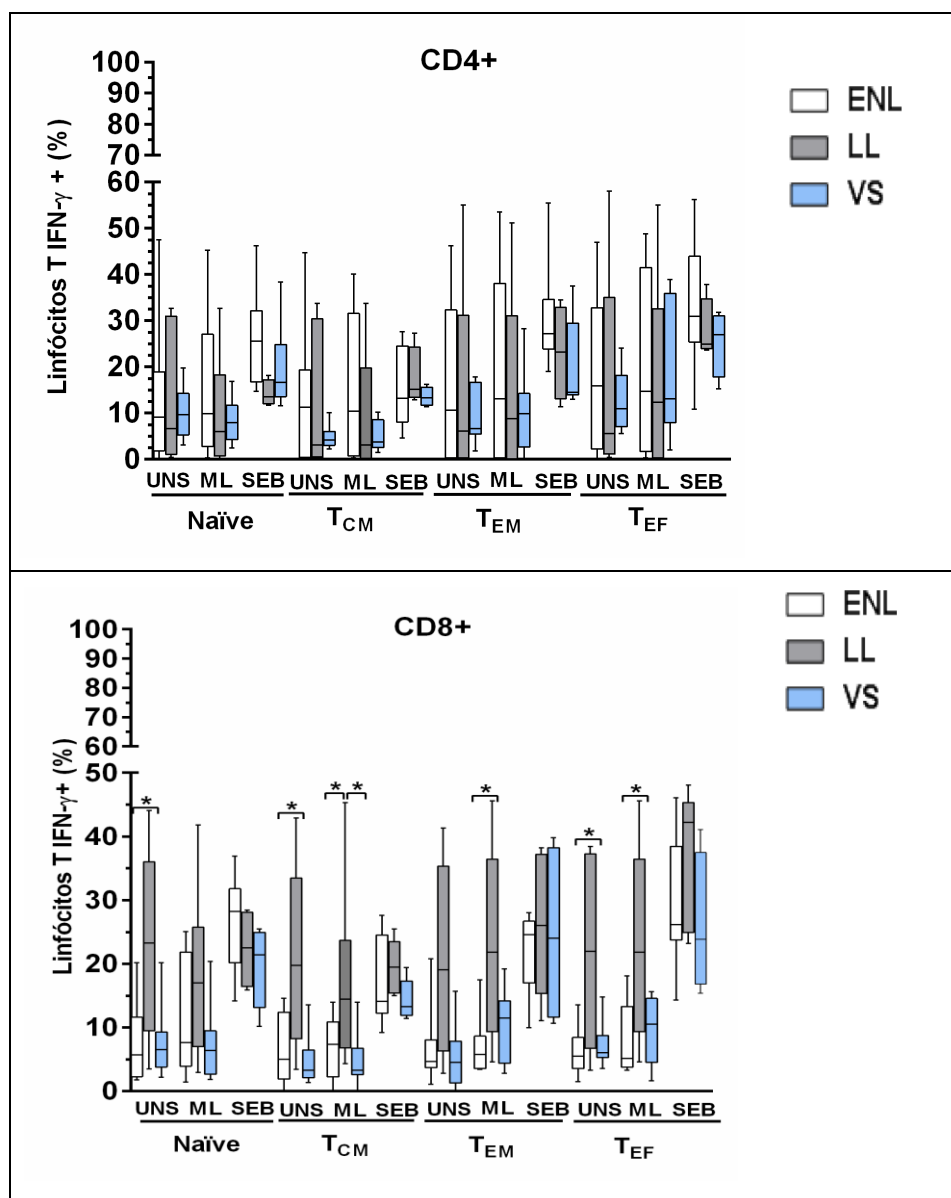


Figura 13. Análise funcional das diferentes subpopulações de linfócitos T frente ao *Mycobacterium leprae* (ML). Frequência de linfócitos T CD4+ (gráfico superior) e CD8+ (gráfico inferior) naïve (T_{NAÏVE}), efetores (T_{EF}), de memória central (T_{CM}) e de memória efetora (T_{EM}) produtores de IFN- γ em PBMC de pacientes e voluntários sadios (VS) em culturas não estimuladas (UNS), estimuladas por *M. leprae* (ML) e estimuladas com enterotoxina de *Staphylococcus aureus* (SEB). Análises feitas por citometria de fluxo. Os experimentos foram realizados nos grupos ENL (n=10), LL (n=10) e VS (n=10). O teste Mann-Whitney foi usado para análise estatística, onde * p <0.05, ** p <0.01 e *** p <0,001. Nas caixas, a linha horizontal e as barras verticais representam a mediana das frequências e a distribuição dos intervalos de cada grupo avaliado.

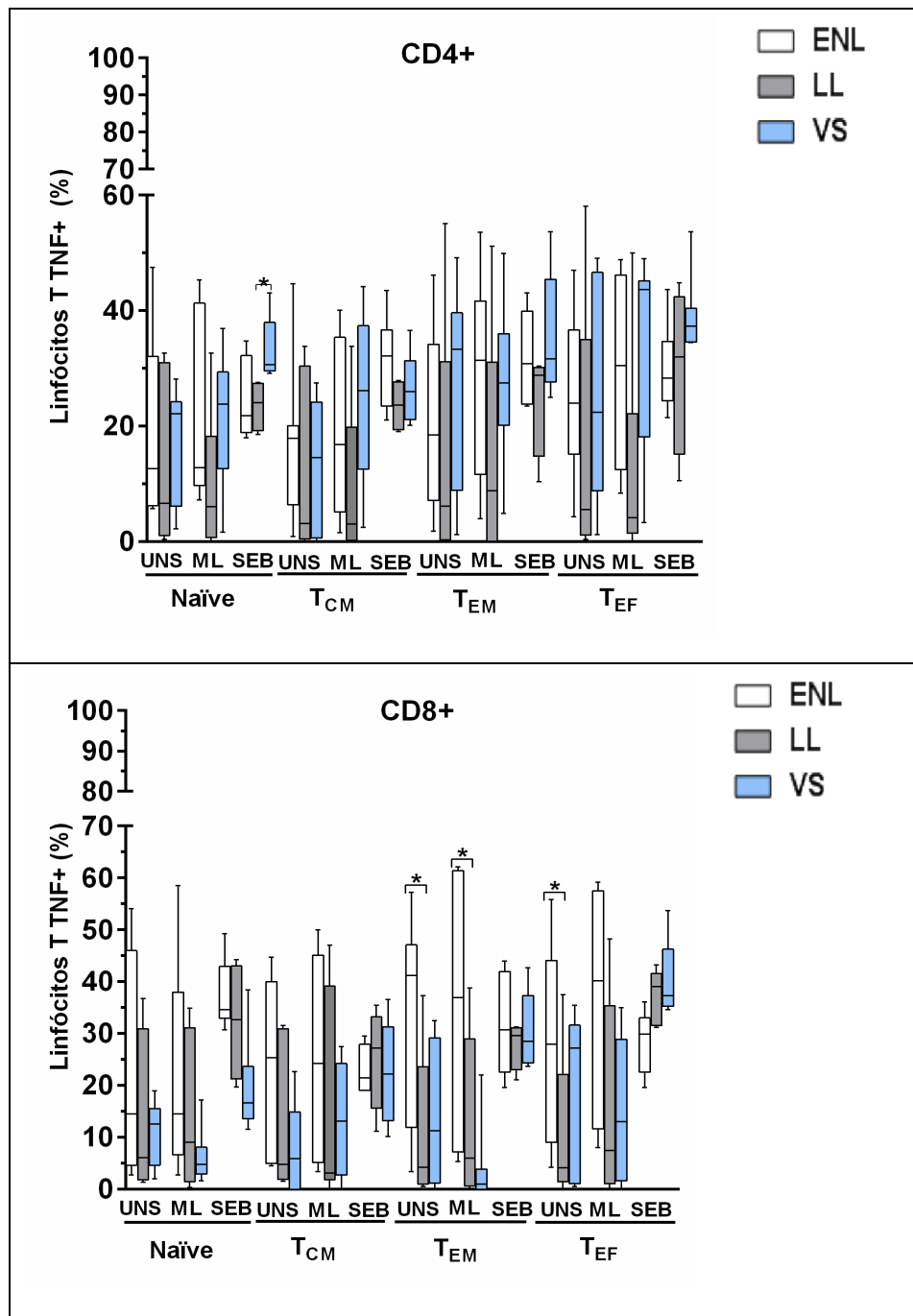


Figura 14. Análise funcional das diferentes subpopulações de linfócitos T frente ao *Mycobacterium leprae* (ML). Linfócitos T CD4+ (gráfico superior) e CD8+ (gráfico inferior) naïve (T_{NAÏVE}), efetores (T_{EF}), de memória central (T_{CM}) e de memória efetora (T_{EM}) produtores de TNF em PBMC de pacientes e voluntários sadios (VS) em culturas não estimuladas (UNS), estimuladas por *M. leprae* (ML) e estimuladas com enterotoxina de *Staphylococcus aureus* (SEB). Análises feitas por citometria de fluxo. Os experimentos foram realizados nos grupos ENL (n=10), LL (n=10) e VS (n=10). O teste Mann-Whitney foi usado para análise estatística, onde * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0,001$. As caixas, a linha horizontal e as barras verticais representam a mediana das frequências e a distribuição dos intervalos de cada grupo avaliado.

5.4 – Avaliação da expressão dos genes de fatores de transcrição associados à diferenciação dos Linfócitos T virgens.

Para avaliar a expressão dos genes dos fatores de transcrição responsáveis pela diferenciação de linfócitos T (*STAT3*, *STAT4*, *STAT6*, *TBX21*, *RORC*, *FOXP3* e *GATA3*) foi realizado PCR quantitativo em tempo real a partir de cDNA obtido a partir de mRNA extraído do sangue periférico dos indivíduos. Utilizamos a dupla de genes *STAT4/TBX21* para identificar o perfil Th1, *STAT6/GATA3* para Th2, *STAT3/RORC* para Th17 e *STAT3/FOXP3* para Treg.

Como se pode observar na Figura 15, a expressão do gene *TBX21* encontra-se significativamente diminuída no grupo ENL em comparação com os pacientes LL não reacionais ($p=0,0015$) e os voluntários sadios ($p<0,0001$). Em conjunto com a expressão do *TBX21*, foi avaliada a expressão de *STAT4*, foram observados resultados similares aos do *TBX21*; novamente, os pacientes em ENL apresentaram menor expressão deste gene quando comparado aos demais grupos, a saber, LL não reacionais ($p=0,0457$) e voluntários sadios de área endêmica ($p=0,0204$). Estes resultados corroboram com nossos achados que indicam uma menor frequência de linfócitos T CD8+ produtores de IFN- γ nos pacientes em ENL, uma vez que *Tbet*, a proteína codificada pelo gene *TBX21*, induz a transcrição do gene do IFN- γ .

Os outros conjuntos de fatores de transcrição relacionados à diferenciação dos linfócitos T não se mostraram significativamente diferentes nos pacientes lepromatosos reacionais ou não. De forma geral, a expressão dos genes *RORC* e *FOXP3* foi baixa em todos os grupos estudados, com diferença significativa entre a expressão do gene *RORC* entre o grupo ENL e voluntários sadios, no qual o grupo de pacientes apresentou menor expressão deste gene, sendo $p=0,0228$ para esta comparação.

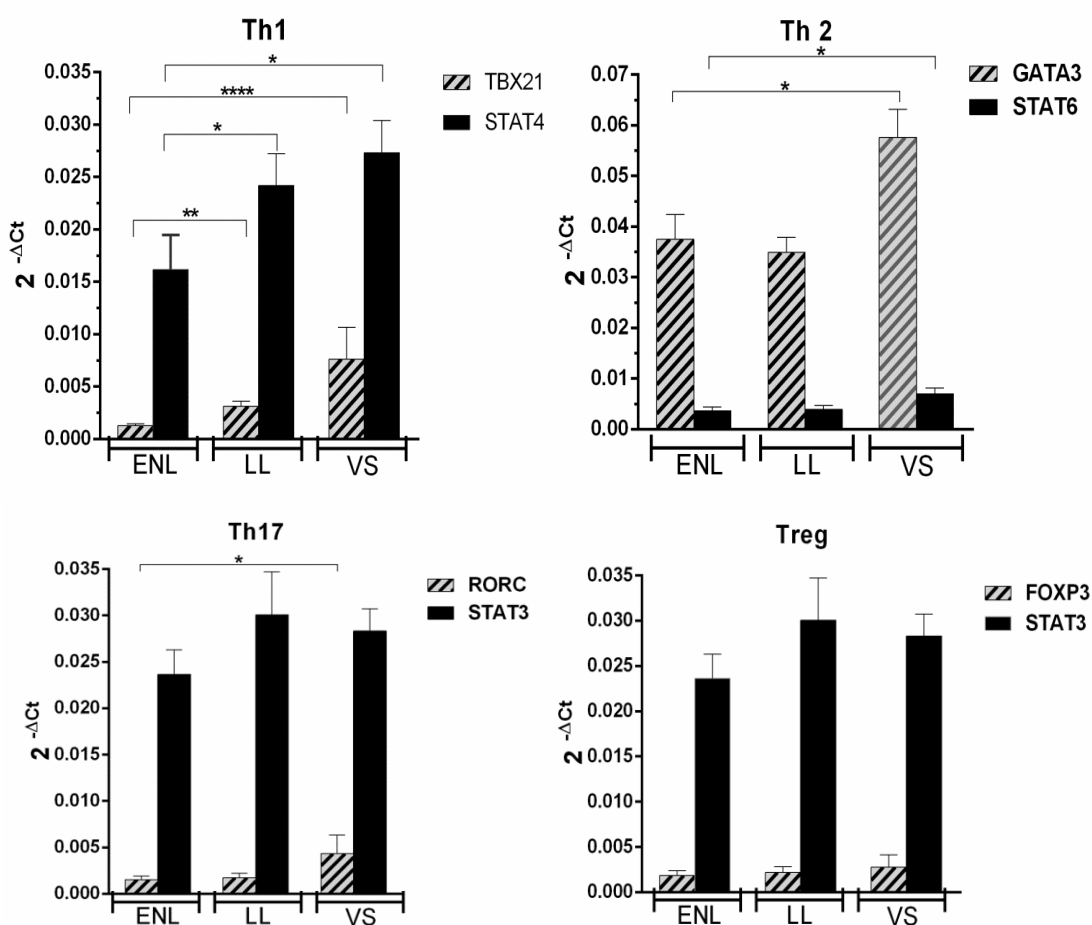


Figura 15. Avaliação da expressão de genes de fatores de transcrição que induzem a diferenciação de linfócitos T nos grupos de pacientes LL com e sem ENL, e voluntários sadios de área endêmica (VS) por qRT-PCR. (A) STAT4/TBX21, (B) STAT6/GATA3, (C) STAT3/RORC, e (D) STAT3/FOXP3. Os resultados estão representados por $2^{-\Delta Ct}$ (sendo ΔCt a diferença entre o Ct do gene constitutivo e o gene de interesse) de experimentos independentes de 15 pacientes ENL, 12 pacientes LL e 10 VS, em que * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ (teste Mann-Whitney).**

5.5 - Correlação entre a frequência entre os linfócitos T produtores de citocinas e o índice baciloscópico dos pacientes LL em ENL.

A fim de correlacionar os dados clínicos com os achados deste projeto, procuramos associações entre o índice bacilar dos pacientes e nossos resultados acerca dos linfócitos T. A frequência de células produtoras de citocinas pelas subpopulações de linfócitos T (anteriormente mostradas nas figuras 12, 13 e 14) foi correlacionada com o IB dos pacientes (descritos na tabela 1). Foi observada uma correlação significativa entre a frequência de linfócitos T CD4+ produtores de IFN- γ , TNF e IL-10 e o índice baciloscópico (IB) dos pacientes LL em ENL.

Observamos coeficiente de correlação positivo ($r>0$) entre a frequência de linfócitos T CD3+/CD4+/IFN- γ +, bem como CD3+/CD4+/TNF+, e o índice baciloscópico dos pacientes ENL, ou seja, à medida que o IB aumenta, também se observa um aumento na frequência destas células produtoras de citocinas (Figura 16). Em contraste, foi verificado um coeficiente de correlação negativo ($r<0$) entre a frequência linfócitos T CD3+/CD4+/IL-10+ e o IB no grupo ENL. Neste caso, quanto maior o IB do paciente, menor foi a frequência de linfócitos T CD4+ produtores de IL-10 ($r = -0,817$, $p=0,005$) (Figura 16). O mesmo não foi observado entre a frequência das diferentes subpopulações de CD8+ produtores de citocinas e o IB dos pacientes ENL estudados (dados não mostrados).

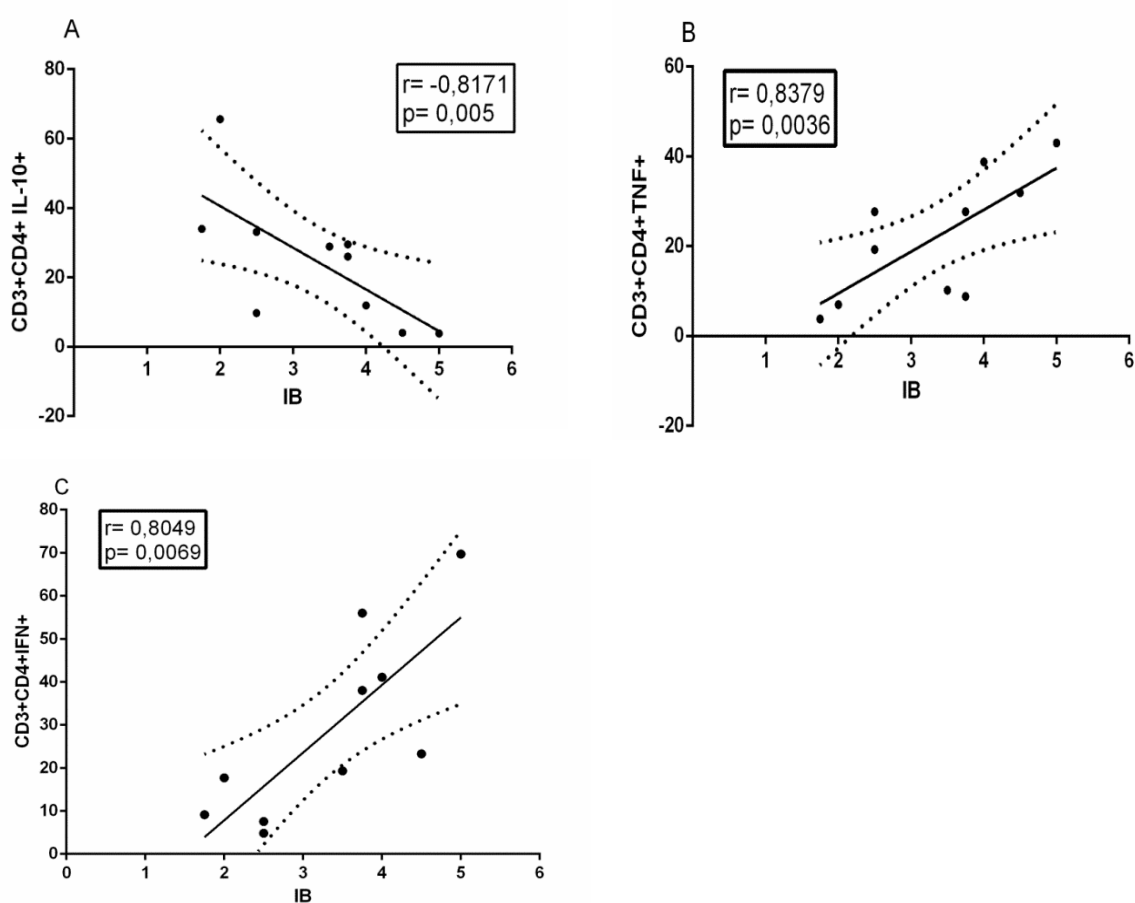


Figura 16. Correlação o índice baciloscópico e a frequência de linfócitos T CD4+ produtores das citocinas IL-10 (A), TNF (B) e IFN- γ (C) em pacientes LL reacionais. Dados pareados de 10 pacientes LL em ENL e cada ponto representa um indivíduo. As linhas tracejadas mostram os intervalos de confiança em 95% e os coeficientes de correlação são mostrados nas retas (valores de r) e o nível de significância também é mostrado (valores de p). Análise realizada pelo método de *Spearman*.

6 DISCUSSÃO

As reações fogem aos padrões das formas clínicas da hanseníase, e o entendimento de todos os seus aspectos continua sendo um desafio. Provavelmente, a partir de variações genéticas em pacientes reacionais a modulação funcional de linfócitos T desencadeada pelos componentes do *M. leprae* - principalmente após o início do tratamento poliquimioterápico e destruição maciça de bacilos - pode provocar liberação de antígenos e desencadear um *shift* na resposta imune celular dos pacientes, determinando o tipo e a intensidade dos episódios reacionais (Moraes et al., 2006; Schuring et al., 2009; Berrington et al., 2010; Sauer et al., 2016; Oliveira et al., 2016).

Nesse contexto, destaca-se o ENL, que é a complicação mais frequente da hanseníase lepromatosa – cerca de metade dos pacientes desta forma da doença desenvolve esta reação e causa de sequelas importantes, uma vez que sua manifestação é sistêmica e pode provocar lesões em vários órgãos, como por exemplo, distúrbios de coagulação e insuficiência renal, podendo levar o paciente à óbito (Nery et al., 1998). Assim como a reação reversa, o ENL é causado por uma alteração transitória da resposta imune do hospedeiro ao *M. leprae* (Cuevas et al., 2007). Ademais, uma parte dos pacientes lepromatosos desenvolve mais de um episódio de ENL, exigindo o uso de fármacos imunossupressores potentes, dentre os quais a prednisona e a talidomida. Entretanto, esta droga apresenta um desafio, que é a geração de efeitos teratogênicos já bastante discutidos na literatura e, por essa razão, evita-se administrá-la em mulheres em idade fértil (Sampaio et al., 1993). Ainda não se sabe exatamente o impacto econômico gerado pelo ENL, contudo, este deve ser bastante considerável, pois, a reação inflamatória aguda que caracteriza o ENL leva a lesões graves nos nervos periféricos, provocando incapacidades que, muitas vezes, são irreversíveis (White & Franco-Paredes, 2015; Kaur & Van-Brakel, 2002). Sendo assim, estudos como este, em torno dos mecanismos imunológicos que precedem o desencadeamento do ENL, fazem-se imprescindíveis, pois podem contribuir na detecção de moléculas biomarcadoras da reação e posterior manejo clínico adequado, o que pode diminuir a morbidade deste episódio reacional.

Dessa forma, este estudo, que envolveu uma coorte de 49 indivíduos, aprofundou os conhecimentos acerca da participação dos linfócitos T e suas

subpopulações na imunopatologia do ENL. Não há ainda uma evidência conclusiva sobre quais alterações fisiológicas desencadeiam o ENL, entretanto, há indícios que alterações hormonais, como lactação, gravidez, menopausa e puberdade podem estar relacionadas, além de outros fatores relacionados ao sistema imune do indivíduo, como coinfeções e vacinação (Pfaltzgraff & Ramu, 1994). Não há indicativos também que o sexo influencie o desenvolvimento do ENL ou da hanseníase propriamente dita. Entretanto, é digno de nota que cerca de três-quartos dos pacientes estudados neste trabalho eram homens e a mesma proporção apresentou ENL.

Diversos estudos demonstram que o índice baciloscópico é um fator de risco para o ENL, quanto maior o IB maior é a chance do episódio reacional ocorrer. Análise de dados feitas por Manandhar e colaboradores (Manandhar et al., 1999) mostrou que pacientes com $IB \geq 4$ apresentam risco 39% maior de desenvolver o ENL quando comparados a pacientes com IB inferior. Os pacientes analisados por este estudo apresentaram IB médio de 4,9 no momento do diagnóstico, quando ainda não haviam começado a PQT, sendo enquadrados no grupo de alto risco de desenvolver ENL. Houve uma queda de cerca de 18% no IB dos pacientes entre o diagnóstico e o momento em que desenvolveram o ENL, sendo a variação média de 4,78 (após o diagnóstico e imediatamente antes do início da PQT) para 3,93 (no desencadeamento do ENL e imediatamente antes do tratamento específico da reação). Outros estudos já verificaram esta queda, que está associada à eliminação do bacilo durante a PQT. Estudos também mostraram que com a introdução da PQT pela OMS, a incidência de casos do ENL foi reduzida (Voorend & Post, 2013). Em nosso estudo, a maior parte dos pacientes em ENL (58%) já tinham finalizado a PQT quando desenvolveram o ENL e, em alguns casos, mais de um ano depois do fim da PQT. Além disso, alguns pacientes já chegavam ao atendimento ambulatorial com sinais e sintomas clínicos do ENL, o que não é uma surpresa, visto que as reações podem ocorrer mesmo antes do início do tratamento poliquimioterápico (Voorend & Post, 2013).

Com o intuito de avaliar as perdas neurológicas causadas pela hanseníase, o Ministério da Saúde desenvolveu uma escala que varia de 0 a 2 para definir o grau de incapacidade dos pacientes, que acaba sendo agravado durante as reações, como o ENL, fato também observado neste trabalho. Quase metade dos pacientes em ENL aqui estudados já apresentavam perdas neurológicas

importantes, de acordo com avaliação feita quanto ao grau de incapacidade. Uma das possíveis explicações para tal achado pode ser a demora do indivíduo em procurar atendimento médico, uma vez que a doença tem um curso insipiente e dificuldade de diagnóstico precoce. Entretanto, devido às manifestações sistêmicas do ENL, especialmente mal estar geral e febre, os indivíduos acabam por procurar atendimento médico com o ENL já instalado. De acordo com os objetivos de nosso estudo, foram selecionados apenas pacientes cuja sintomatologia reacional havia iniciado em 24 horas ou menos.

Poucos estudos descrevem dados demográficos da população estudada, e muito menos indicam a gravidade do episódio reacional com base na clínica do paciente. Este procedimento realmente é complexo, devido às dificuldades de acesso aos dados clínicos dos pacientes no ambiente ambulatorial (Voorend & Post, 2013) e, também, à característica sistêmica do ENL, em que várias alterações podem acontecer, tornando a manifestação mais grave em alguns casos e menos em outros. Sendo assim, com o auxílio da bioinformática, pode ser construído um algoritmo com base nas manifestações clínicas dos pacientes a fim de se classificar a severidade do quadro de ENL do paciente em questão, fazendo com que os dados imunofisiológicos dos pacientes sejam cruzados com o resultado do algoritmo a fim de se detectar possíveis pré-disposições ou mesmo a origem do grau de severidade do ENL.

O primeiro passo a fim de caracterizar a participação de subpopulações de linfócitos T na patologia do ENL foi avaliar as frequências de linfócitos T CD4+ e CD8+. Os pacientes LL apresentaram uma razão da frequência CD4/CD8 2:1, ou seja, em média havia o dobro de linfócitos TCD4+ em relação aos CD8+ no sangue periférico destes pacientes. Os pacientes LL que entravam em reação não tinham a razão CD4/CD8 2:1 alterada. Contudo, diferente do que observamos nos pacientes, os voluntários sadios apresentaram a razão CD4/CD8 1:1, fato que nos surpreendeu. É importante frisar que neste grupo (VS) não foram incluídos indivíduos com doenças infecciosas ou autoimunes conhecidas ou que faziam uso de fármacos imunomoduladores. Além disso, os VS tiveram a frequência dos linfócitos T totais, tanto CD4+ quanto CD8+, alteradas após o estímulo *in vitro* com *M. leprae*. No grupo em questão, houve o aumento das frequências de linfócitos T CD4+ e CD8+, porém, a razão CD4/CD8 permaneceu a mesma. Já com relação aos pacientes, a presença do *M. leprae* na cultura não gerou

alterações na frequência de linfócitos T totais, sejam os CD4 ou CD8. É possível que este fato se deva a alta carga bacilar que esses pacientes já apresentavam, tornando o estímulo com o antígeno do *M. leprae in vitro* irrelevante.

A análise *ex vivo* das subpopulações de linfócitos T revelou que os pacientes em ENL apresentam uma maior frequência de células de memória, tanto central quanto efetora, seja para os linfócitos T CD4+ ou CD8+. Isto pode ter ocorrido devido à exposição de novos antígenos do *M. leprae*, causado pela intensa fragmentação dos bacilos durante a PQT. Essa hipótese ganha força a partir do fato de que os pacientes LL não reacionais inseridos neste estudo não tinham iniciado o tratamento poliquimioterápico ainda. Em contrapartida, os pacientes LL não reacionais apresentaram uma maior frequência de linfócitos T CD4+ efetores quando comparados aos pacientes em ENL. Nossos dados vão de encontro aos de Axelsson-Robertson e colaboradores que mostraram diminuição progressiva de linfócitos T CD8+ de memória central (CD45RA-/CCR7+) durante o tratamento de pacientes com a forma ativa da tuberculose (Axelsson-Robertson et al., 2015). Além disso, outro estudo mostrou que pacientes com quadros agudizados de tuberculose, apresentavam significativa redução na frequência de linfócitos T CD8+ efetores (CD45RA+/CCR7-) antes ou durante o tratamento, quando comparados aos indivíduos diagnosticados com infecção latente, o que sugere a importância desta subpopulação na resistência ao *M. tuberculosis* (Caccamo et al., 2009).

Na análise *in vitro*, após o estímulo do *M. leprae* em cultura, o padrão da frequência das quatro subpopulações estudadas se manteve e, novamente, o fato marcante foi a alta frequência de células de memória nos pacientes com ENL. Estudo recente mostrou que pacientes com ENL, quando comparados aos pacientes LL não reacionais, apresentam altos níveis séricos de IL-7 (Stefani et al., 2009), citocina, produzida essencialmente por fibroblastos e células do estroma da medula óssea, de grande importância para a sobrevivência dos linfócitos T de memória. Ademais, a IL-7 ativa o fator de transcrição *STAT5* que está relacionado à expressão de moléculas antiapoptóticas, como a Bcl-2 (Surh et al., 2006). Os altos níveis desta citocina durante o ENL revela a importância da homeostase das células de memória durante este episódio reacional. Um importante trabalho utilizando modelo experimental de infecção com vírus do herpes simplex na pele de camundongos revelou que linfócitos T_{EM} são ativados

e, mesmo após a retirada do estímulo antigênico, essas células podem residir permanentemente nos tecidos periféricos (Gebhardt et al., 2009). Este fato pode, em parte, ajudar a explicar a ocorrência do ENL mesmo após o fim do tratamento (mantendo-se em mente que a maior parte dos indivíduos ENL por nós estudados já tinham finalizado a PQT), bem como a incidência de vários episódios sucessivos de ENL. Porém, faz-se necessário ainda compreender que fatores levam a reativação destas células de memória efetora e, para tal, estudos longitudinais com pacientes lepromatosos fazem parte de nossos objetivos futuros.

Ainda em relação às subpopulações de linfócitos T, os voluntários sadios de área endêmica apresentam uma maior frequência de células efetoras quando comparados aos grupos de pacientes hansênicos, especialmente no caso dos linfócitos T CD4+ respondedores ao *M. leprae*. Diferentemente dos pacientes lepromatosos aqui estudados, o grupo VS apresentou maior frequência de células efetoras em resposta ao *M. leprae*. De fato, dados do nosso laboratório, ainda não publicados, revelaram que os voluntários sadios apresentam proliferação de linfócitos T CD4+ e CD8+, medido pela incorporação de CFSE - Carboxifluoresceína succinimidil éster - em cultura de 5 dias, muito superior aos pacientes LL reacionais ou não na presença do estímulo do *M. leprae* (dados não mostrados). Tomados em conjunto, esses achados corroboram a hiporesponsividade ou mesmo a anergia de linfócitos T no polo lepromatoso da doença, já amplamente discutida por vários autores (Lockwood & Suneetha, 2005; Chaduvula et al., 2012).

Tradicionalmente, caracterizava-se o espectro clínico da hanseníase mediante a dicotomia T_H1 versus T_H2 (Modlin, 2002), entretanto, não se pode excluir a participação de outras subpopulações de linfócitos T na imunopatologia da doença. Como exemplo, foi comprovado que a presença de IL-6 e TGF- β direcionam a diferenciação de células T_H17 pela ativação do gene *RORC* (Steinman, 2007), contudo, apesar da grande produção de TGF- β na forma lepromatosa da doença (Bwire & Kawuma, 1993) e ainda, que na patologia do ENL se verificou um aumento da produção de IL-6, nossas análises feitas durante o desenrolar deste projeto não identificaram uma diferença significativa na expressão de *RORC* entre o grupo de pacientes LL e o de pacientes com ENL. Já foi mostrado que o TGF- β é uma citocina multifuncional, e sua ação depende da

relação entre sua concentração e a presença de outras citocinas no mesmo microambiente, podendo apresentar tanto efeitos pró- e anti-inflamatórios (Omer et al., 2000).

É possível que haja uma correlação entre a recuperação do paciente durante o tratamento do ENL, especialmente pelo uso da talidomida e o aumento da produção de IFN- γ . Além de outras citocinas próprias do perfil T_{H1}, outros autores, como Shannon e Haslett, demonstraram a capacidade da talidomida em estimular a diferenciação dos linfócitos T virgem em células T_{H1} (Shannon & Sandoval, 1995; Haslett et al., 1998). Como verificado no nosso trabalho, os pacientes lepromatosos em reação do tipo I com ENL apresentaram uma redução na frequência de linfócitos T produtores de IFN- γ , especialmente os CD8+, em relação aos pacientes LL não reacionais. Possivelmente, a queda da resposta T_{H1}, que já é baixa no polo lepromatoso da doença, esteja associada à patogênese do ENL, visto que um dos prováveis efeitos da talidomida no organismo seja o aumento da produção de citocinas do perfil T_{H1}.

A redução na frequência de linfócitos T produtores de IFN- γ verificada por meio da citometria de fluxo multiparamétrica, foi confirmada pela análise dos fatores de transcrição envolvidos na diferenciação dos linfócitos T virgens, quantificados pela técnica da PCR em tempo real. A análise mostrou que no grupo de pacientes com ENL observamos uma diminuição significativa na expressão de genes associados à diferenciação para o perfil T_{H1}, que são os genes *STAT4* e *TBX21*, estando de acordo com os achados da frequência de subpopulações produtoras de citocina analisadas por citometria. Sendo assim, a contribuição do IFN- γ no desencadeamento do ENL tornou-se mais sólida. Além disso, no grupo de pacientes em ENL, os linfócitos T naïve e de memória central produtores de IL-10, tanto os CD4+ quanto os CD8+, estavam significativamente aumentados, quando comparados com as mesmas subpopulações dos pacientes LL não reacionais. Este achado reforça a tese de que no desencadeamento do ENL haja uma modulação negativa do perfil T_{H1}, verificado pela queda da produção de IFN- γ e da expressão de *STAT4* e *TBX21*. As células produtoras de IL-10, como as T_{H2}, têm a propriedade de suprimir a diferenciação de T_{H1}, pois a expressão de *GATA3* inibe a transcrição do gene *RUNX3*, reduzindo a proporção de células T_{H1}, o que pode acontecer no ENL (Pham et al., 2012).

As novas informações trazidas por este trabalho, acerca da frequência de linfócitos T produtores de IFN- γ na hanseníase lepromatosa, parecem estar em desacordo com os tradicionais dados da literatura que demonstram a escassa produção de IFN- γ por pacientes desse polo da doença, tanto no que concerne aos níveis séricos desta citocina, quanto *in vitro*, em sobrenadantes de cultura de PBMC em resposta ao *M. leprae*. (Nogueira et al., 1983; Madan et al., 2011). Portanto, é imprescindível ressaltar que os dados deste trabalho dizem respeito exclusivamente às subpopulações de linfócitos T estudadas e, sendo assim, pode contribuir efetivamente para os conhecimentos sobre a participação deste conjunto de células não só nos pacientes LL não reacionais, mas também no desencadeamento do ENL.

O aumento da frequência de células produtoras de IL-10 na imunopatologia do ENL necessita de maiores investigações. Uma subpopulação que pode participar do desencadeamento da reação é a de células Treg, que apresentam inúmeros mecanismos de supressão da resposta imune, como a expressão de CTLA-4, ICOS, bem como a produção de IL-10 (Sakaguchi et al., 2010). Entretanto, no presente trabalho, não foi vista diferença significativa na expressão de *FOXP3* no sangue periférico entre os pacientes LL com e sem ENL. Sendo assim, uma maior investigação dos mecanismos de ação das Treg no desencadeamento do ENL se faz necessária e é objeto de projeto de pesquisa em fase inicial em nosso laboratório.

Além disso, é interessante avaliar a participação das células Tr1, que são linfócitos TCD4+ que não expressam *FOXP3*, porém, apresentam atividade funcional reguladora, pelo fato de se serem eficientes na produção de IL-10 (Roncarolo et al., 2006). Uma possibilidade é que as células Tr1 podem ser as principais produtoras de IL-10 no ENL. Chevalier e colaboradores, em um estudo longitudinal prospectivo utilizando PBMC de pacientes infectados pelo HIV identificaram as células Tr1 como as principais produtoras de IL-10 no curso da infecção primária pelo vírus, superando as Treg na produção de IL-10. Assim, segundo os autores, as células Tr1 demonstraram ter um papel benéfico de controle da resposta imune no contexto da infecção primária pelo HIV (Chevalier et al., 2015).

Além do IFN- γ e da IL-10, outra citocina chave na patogênese do ENL é o TNF. Tanto na reação tipo I quanto na do tipo II já foi verificado o aumento desta

citocina (Sarno et al., 1991; Lockwood et al., 2011). Um trabalho do nosso grupo evidenciou o aumento da expressão do mRNA de TNF na lesão de pele de pacientes reacionais (Teles et al., 2002), e em outro foi mostrado a presença aumentada da própria proteína nas lesões de pele de pacientes também em reação (Lockwood et al., 2011). Não obstante, também foi comprovada que a melhora do paciente está relacionada a diminuição da produção de TNF durante o tratamento com a talidomida (Sampaio et al., 1993). Possivelmente, a talidomida apresente outros mecanismos de ação, além da redução dos níveis séricos de TNF, que possam ser relacionados com a melhora clínica do paciente. Em trabalho *in vitro*, Moreira e colaboradores mostraram que a prednisona é mais eficiente na redução dos níveis de TNF que a talidomida, entretanto, os pacientes com ENL tratados com prednisona não apresentam melhora clínica semelhante à talidomida (Moreira et al., 1998). A talidomida age diminuindo a meia-vida do mRNA do TNF, reduzindo o processo de tradução da citocina (Moreira et al., 1993). Sendo, assim, não se pode excluir que a talidomida atue em outras vias imunológicas, como, por exemplo, no aumento da produção de IFN- γ citada anteriormente.

Em nosso estudo foi possível verificar a contribuição dos linfócitos T produtores de TNF durante o ENL e nossos achados mostraram que os linfócitos T CD8+ são mais frequentes quanto à produção de TNF quando comparados aos CD4+. Além disso, os linfócitos T CD8+/TNF+ de memória efetora do grupo com ENL foram mais frequentes, sendo que essa mesma subpopulação foi muito menos frequente nos pacientes LL não reacionais. Somado a isto, os pacientes com ENL apresentam uma frequência bastante elevada de linfócitos T de memória quando comparados aos LL. Este fato pode maximizar a produção de TNF, que, sabidamente, está ligado tanto às lesões teciduais quanto às manifestações sistêmicas do ENL (Sarno et al., 1991). Portanto, o aumento da frequência de linfócitos T CD8+ de memória efetora produtores de TNF pode ser uma das principais alterações imunológicas associadas ao desencadeamento do ENL. Sendo assim, no futuro, a análise da frequência da subpopulação linfócitos T CD8+ de memória efetora produtores de TNF pode contribuir para o diagnóstico precoce do ENL, desde que possamos coletar o sangue periférico do paciente ainda nos pródomos da reação. Dessa forma, poderemos contribuir para a redução da morbidade desta complicação da hanseníase lepromatosa.

Com o propósito de correlacionar dados clínicos dos pacientes com os achados deste trabalho, foram feitas curvas de correlação contrapondo dados laboratoriais e clínicos. Inicialmente, nossas análises mostraram que não houve correlação entre o número de doses da PQT e a frequência das células T de memória produtoras de citocinas pró-inflamatórias no desencadeamento do ENL (dados não mostrados). Entretanto, como já mencionado anteriormente, grande parte dos pacientes com ENL inseridos neste estudo já havia finalizado o tratamento poliquimioterápico. Assim, ao cruzarmos os dados do IB dos pacientes com a frequência de linfócitos T produtores das três citocinas estudadas (TNF, IFN- γ e IL-10), surpreendentemente não houve correlação significativa entre os linfócitos T CD8+ produtores de citocinas e o IB dos pacientes. De fato, quando analisadas por citometria de fluxo multiparamétrica, essas células eram as principais produtoras de citocinas nos pacientes do grupo ENL.

Contudo, a correlação foi estatisticamente significativa quando o IB dos pacientes em ENL foi correlacionado com a frequência de linfócitos T CD4+ produtores de citocinas, indicando que quanto maior o IB do paciente, maior também é a frequência linfócitos T CD4+ produtores de IFN- γ e TNF, sendo a correlação negativa ($r < 0$) para a citocina IL-10, ou seja, os dados do IB são inversamente proporcionais a frequência de linfócitos T CD4+ produtores de IL-10. Estes dados nos levam a hipotetizar que quanto maior o IB do paciente durante o ENL, maiores serão também os níveis das citocinas pró-inflamatórias, o que, possivelmente, pode levar a danos teciduais mais graves, além de gerar incapacidades físicas nos pacientes.

Um trabalho recente do nosso grupo mostrou que há correlação positiva entre o IB e a frequência de linfócitos T de memória em pacientes lepromatosos que recidivaram, indicando que o IB e a frequência de linfócitos T de memória estavam correlacionados com o número de lesões de pele dos pacientes (Esquenazi et al., 2015). Esses dados de Esquenazi e colaboradores corroboram nossa hipótese de que o alto índice bacilar seja um fator de pré-disposição da ocorrência de episódios de ENL mais graves e que necessitem de maior controle, a fim de diminuir possíveis sequelas e incapacidades.

Como foi discutido nesta dissertação, faz-se necessário compreender que alterações no *status* fisiológico dos pacientes estão associadas ao desbalanço imunológico responsável pelo desencadeamento do ENL. Uma alternativa seria a

coexistência de outros micro-organismos patogênicos e vírus infectando os pacientes com hanseníase. Já foi demonstrado que a reativação do herpes vírus (HSV), presente sob forma latente em muitos indivíduos, pode estar correlacionada com a patogênese de outras infecções virais, como as causadas pelo vírus de Epstein-Barr e o citomegalovírus (Prober, 2005; Dreyfus, 2013). Dessa forma, a reativação periódica do HSV, que está em interação constante com o genoma da célula hospedeira, poderia influenciar na resposta inflamatória do paciente lepromatoso, alterando o perfil de citocinas produzidas, por meio da produção de miRNAs e pela modulação de vias de expressão gênica, como a do NF- κ B (Dreyfus, 2013). Sendo assim, a análise da microbiota dos pacientes, pode contribuir na elucidação dos fatores moleculares e celulares que estão associados à imunopatogênese do ENL.

7 CONCLUSÕES

- O desencadeamento do ENL não influencia a razão entre as frequências de linfócitos T CD4+ e CD8+ no sangue periférico, sendo a razão 2:1 mantida em pacientes LL reacionais ou não. Logo, este achado não está associado à gênese do ENL.
- A frequência das subpopulações de linfócitos T estudadas não foi alterada pelo estímulo *in vitro* com *M. leprae*. Contudo, na abertura do ENL ocorreu aumento significativo na frequência das subpopulações de memória dos linfócitos T CD4+ e CD8+. Sendo assim, os linfócitos T de memória podem ser a principal subpopulação de linfócitos T associados à gênese do ENL.
- O aumento da frequência de linfócitos T CD8+ produtores de IL-10 em conjunto com a redução desta mesma subpopulação produtora de IFN- γ no desencadeamento do ENL levando à redução da resposta imune T_H1 neste episódio reacional.
- Os pacientes LL que desenvolveram o ENL apresentaram uma redução na expressão dos fatores de transcrição *STAT4* e *TBX21*, confirmando a redução da resposta T_H1 neste episódio, associado à gênese da reação.
- Os linfócitos T CD8+ de memória efetora compõem a principal subpopulação de linfócitos T produtores de TNF no ENL, podendo exercer um papel crucial nesta reação.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai, S. Cellular and Molecular Immunology. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Science; 2012.

Aiba S. Dendritic cells: importance in allergy. *Allergol Int.* 2007;56(3):201-8.

Akbar AN, Salmon M, Janossy G. The synergy between naive and memory T cells during activation. *Immunol Today.* 1991;12(6):184-8.

Altin JG, Sloan EK. The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. *Immunol Cell Biol.* 1997;75(5):430-45.

Axelsson-Robertson R, Rao M, Loxton AG, Walzl G, Bates M, Zumla A, Maeurer M. Frequency of *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD8+ T-cells in the course of anti-tuberculosis treatment. *Int J Infect Dis.* 2015; 32:23-9

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

Avelleira, JCR, Nery, JA. O tratamento da hanseníase. *Rio Dermatológico*, Rio de Janeiro, 1998; v. 2, n. 3, p. 2-3.

Banerjee S, Biswas N, Kanti Das N, Sil A, Ghosh P, Hasanor Raja AH, Dasgupta S, Kanti Datta P, Bhattacharya B. Diagnosing leprosy: revisiting the role of the slit-skin smear with critical analysis of the applicability of polymerase chain reaction in diagnosis. *Int J Dermatol.* 2011; 50:1522-1527.

Barnett RE, Conklin DJ, Ryan L, Keskey RC, Ramjee V, Sepulveda EA, Srivastava S, Bhatnagar A, Cheadle WG. Anti-inflammatory effects of miR-21 in the macrophage response to peritonitis. *J Leukoc Biol.* 2016; 99(2):361-71

Becx-Bleumink, M., Berhe, D. Occurrence of reactions, their diagnosis and management in leprosy patients treated with multidrug therapy; experience in the leprosy control program of the All Africa Leprosy and Rehabilitation Training Center (ALERT) in Ethiopia. *Int J Lepr Other Mycobact. Dis.* 1992; 60, 173—184.

Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF- α primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:625-55

Benchimol, JL, Sá, MR, orgs. Adolpho Lutz: Hanseníase = Leprosy [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2004. 660 p. Adolpho Lutz Obra Completa, vol. 1, book 2.

Berrington WR, Macdonald M, Khadge S, Sapkota BR, Janer M, Hagge DA, Kaplan G, Hawn TR. Common polymorphisms in the NOD2 gene region are associated with leprosy and its reactive states. *J Infect Dis*, 2010;201(9):1422-35.

Brombacher F, Kastelein RA, Alber G. Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses. *Trends Immunol*. 2003 Apr;24(4):207-12.

Buhrer-Sekula, S. PGL-I leprosy serology. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* [online]. 2008, vol.41, suppl.2, pp. 3-5.

Bwire R, Kawuma HJ. Hospital-based epidemiological study of reactions, Buluba Hospital, 1985–89. *Lepr Ver*. 1993; 64: 325–329

Caccamo N, Guggino G, Meraviglia S, Gelsomino G, Di Carlo P, Titone L, et al. Analysis of Mycobacterium tuberculosis-specific CD8 T-Cells in patients with active tuberculosis and in individuals with latent Infection. *PLoS One*. 2009;4(5):e5528.

Campbell DJ, Koch MA. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(2):119-30.

Chaduvula M, Murtaza A, Misra N, Narayan NP, Ramesh V, Prasad HK, Rani R, Chinnadurai RK, Nath I. Lsr2 peptides of *Mycobacterium leprae* show hierarchical responses in lymphoproliferative assays, with selective recognition by patients with anergic lepromatous leprosy. *Infect Immun*. 2012;80(2):742-52

Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med*. 2006. 9;354(6):610-21.

Chevalier MF, Didier C, Petitjean G, Karmochkine M, Girard PM, Barré-Sinoussi F2, Scott-Algara D2, Weiss L5. Phenotype alterations in regulatory T-cell subsets in primary HIV infection and identification of Tr1-like cells as the main interleukin 10-producing CD4+ T cells. *J Infect Dis*. 2015.1;211(5):769-79

Chung AW, Sieling PA, Schenk M, Teles RM, Krutzik SR, Hsu DK, Liu FT, Sarno EN, Rea TH, Stenger S, Modlin RL, Lee DJ. Galectin-3 regulates the innate immune response of human monocytes. *J Infect Dis.* 2013; 207(6):947-56.

Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, Honoré N, Garnier T, Churcher C, Harris D, Mungall K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies RM, Devlin K, Duthoy S, Feltwell T, Fraser A, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Lacroix C, Maclean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, Rutter S, Seeger K, Simon S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Whitehead S, Woodward JR, Barrell BG. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature.* 2001. 22;409(6823):1007-11.

Corthay, A. How do regulatory t cells work? *Nat Rev Immunol.* 2009; 8(7):523-32.

Cuevas J, Rodriguez-Peralto JL, Carrillo R, Contreras F. Erythema nodosum leprosum: reactional leprosy. *Seminars in cutaneous medicine and surgery.* 2007; 26: 126–130.

de Messias IJ, Santamaria J, Brenden M, Reis A, Mauff G. Association of C4B deficiency (C4B*Q0) with erythema nodosum in leprosy. *Clin. Exp. Immunol.* 1993; 92, 284—287.

de Souza Sales J, Lara FA, Amadeu TP, de Oliveira Fulco T, da Costa Nery JA, Sampaio EP, Pinheiro RO, Sarno EN. The role of indoleamine 2, 3-dioxygenase in lepromatous leprosy immunosuppression. *Clin Exp Immunol.* 2011;165(2):251-63.

Deps PD, Alves BL, Gripp CG, Aragao RL, Guedes B, Filho JB, Andreatta MK, Marcari RS, Prates I, Rodrigues LC. Contact with armadillos increases the risk of leprosy in Brazil: a case control study. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2008;74(4):338-42.

Dreyfus DH. Herpes viruses and the microbiome. *J Allergy Clin Immunol.* 2013; 132:1278 –1286.

Dupnik KM, Bair TB, Maia AO, Amorim FM, Costa MR, Keesen TS, Valverde JG, Queiroz Mdo C, Medeiros LL, de Lucena NL, Wilson ME, Nobre ML, Johnson WD Jr, Jeronimo SM. Transcriptional changes that characterize the immune reactions of leprosy. *J Infect Dis.* 2015. 15;211(10):1658-76

Esquenazi D, Moreira AL, Miranda A, Nery JA, Alvarenga FF, Sarno EN, Pereira GM. Clinical, immunological and histological aspects of an uncommon type II reaction in patients with lepromatous leprosy. *Clin Exp Dermatol*. 2008;33(3):294-7.

Esquenazi D, Alvim IM, Pinheiro RO, Oliveira EB, Moreira Lde O, Sarno EN, Nery JA. Correlation between central memory T Cell expression and proinflammatory cytokine production with clinical presentation of multibacillary leprosy relapse. *PLoS One*. 2015; 19:10(5):e0127416

Fine, PEM. Reflections on the elimination of leprosy. *Int J Lep* 1992; 60(1): 71-80.

Frehel C, Rastogi N. *Mycobacterium leprae* surface components intervene in the early phagosome-lysosome fusion inhibition event. *Infect. Immun*. 1987;55(12):2916-21.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4(4):330-6.

Forster R, Davalos-Miszlitz AC, Rot A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat. Rev. Immunol*. 2008. 8: 362–371.

Gallo MEN, Sampaio EP, Nery JAC, Moraes MO, Antunes SLG, Pessolani MCV, Sarno EN. Hanseníase: Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Imunológicos. Em: Coura, JR (ed.) *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*, Rio de Janeiro, RJ. Ed. Guanabara Koogan. 2005; p.1383-94.

García VE, Uyemura K, Sieling PA, Ochoa MT, Morita CT, Okamura H, Kurimoto M, Gatfield J, Pieters J. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science*. 2000;288(5471):1647-50.

Gebhardt T, Wakim L, Eidsmo L, Reading P, Heath W, et al. Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nat. Immunol*. 2009;10:524–30.

Goulart, I.M., Mineo, J.R., Foss, N.T. Production of transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) by blood monocytes from patients with different clinical forms of leprosy. *Clin. Exp. Immunol*. 2000; 122, 330-334.

Gu C, Wu L and Li X. IL-17 family: cytokines, receptors and signaling. *Cytokine* 2013; (64)2:477–485.

Haslett PA, Corral LG, Albert M, Kaplan G. Thalidomide costimulates primary human T lymphocytes, preferentially inducing proliferation, cytokine production, and cytotoxic responses in the CD8+ subset. *J Exp Med.* 1998; 187:1885–1892.

Haslett PA, Roche P, Butlin CR, Macdonald M, Shrestha N, Manandhar R, Lemaster J, Hawksworth R, Shah M, Lubinsky AS, Albert M, Worley J, Kaplan G. Effective treatment of erythema nodosum leprosum with thalidomide is associated with immune stimulation. *J Infect Dis.* 2005;192(12):2045-53

Hernandez MO, Neves I, Sales JS, Carvalho DS, Sarno EN, Sampaio EP. Induction of apoptosis in monocytes by *Mycobacterium leprae* in vitro: a possible role for tumour necrosis factor- α . *Immunology.* 2003;109(1):156-64.

Hussain R, Lucas SB, Kifayet A, Jamil S, Raynes J, Uqaili Z, Dockrell HM, Chiang TJ, McAdam KP. Clinical and histological discrepancies in diagnosis of ENL reactions classified by assessment of acute phase proteins SAA and CRP. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1995;63(2):222-30.

Hwang, E.S., Szabo, S.J., Schwartzberg, P.L. & Glimcher, L.H. T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science.* 2005;307,430–3.

Ito T, Handa H. Deciphering the mystery of thalidomide teratogenicity. *Congenit Anom (Kyoto).* 2012; 52(1):1-7.

Janeway CA, Medzhitov R. Innate immunity recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20:197-216

Jullien D, Sieling PA, Uyemura K, Mar ND, Rea TH, Modlin RL. IL-15, an immunomodulator of T cell responses in intracellular infection. *J Immunol.* 1997;158(2):800-6.

Kahawita IP, Lockwood DN. Towards understanding the pathology of erythema nodosum leprosum. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008;102(4):329-37

Kaur H, Van Brakel W. Dehabilitation of leprosy-affected people-a study on leprosy-affected beggars. *Lepr Rev.* 2002; 73(4):346-55.

- Kaplan G, Mathur NK, Job CK, Nath I, Cohn ZA. Effect of multiple interferon gamma injections on the disposal of *Mycobacterium leprae*. Proc. Natl. Acad. Sci. 1989;86(20):8073-7.
- Kang TJ, Chae GT. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2001;31(1):53-8.
- Kiszewski CA, Becerril E, Baquera J, Aguilar LD, Hernández-Pando R. Expression of transforming growth factor-beta isoforms and their receptors in lepromatous and tuberculoid leprosy. Scand. J. Immunol. 2003;57(3):279-285.
- Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, Nakashima T, Oh-hora M, Kodama T, Tanaka S, Bluestone JA, Takayanagi H. Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. Nat Med. 2014; 20(1):62-8.
- Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. Nat. Med. 2003; 9:525–532.
- Kumar B, Dogra S, Kaur I. Epidemiological characteristics of leprosy reactions: 15 years experience from north India. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 2004; 72(2):125–33
- Kumar S, Naqvi RA, Khanna N, Pathak P, Rao DN. Th3 immune responses in the progression of leprosy via molecular cross-talks of TGF- β , CTLA-4 and Cbl-b. Clin Immunol. 2011;141(2):133-42.
- Lee DJ, Li H, Ochoa MT, Tanaka M, Carbone RJ, Damoiseaux R, Burdick A, Sarno EN, Rea TH, Modlin RL. Integrated pathways for neutrophil recruitment and inflammation in leprosy. J Infect Dis; 2010; 201(4):558-69
- Leprosy Patients Welfare Trust. History of Leprosy. Disponível em <http://www.leprosy/pwt.org.pk/hleprosy.php>. Acessado em 11/02/2016.
- Levis, W.R., Meeker, H.C., Schuller-Levis, G., Sersen, E., Schwerer, B. IgM and IgG antibodies to phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* in leprosy: insight into patient monitoring, erythema nodosum leprosum, and bacillary persistence. J. Invest. Dermatol. 1986; 86, 529—534.

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

Lin X, Chen M, Liu Y, Guo Z, He X, Brand D, Zheng SG. Advances in distinguishing natural from induced Foxp3+ regulatory T cells. *Intern J Clin Exp Pathology.* 2013; 6(2):116-23.

Liu PT, Wheelwright M, Teles R, Komisopoulou E, Edfeldt K, Ferguson B, Mehta MD, Vazirnia A, Rea TH, Sarno EN, Graeber TG, Modlin RL. MicroRNA-21 targets the vitamin D-dependent antimicrobial pathway in leprosy. *Nat Med.* 2012;18(2):267-73.

Lighvani AA, Frucht DM, Jankovic D, Yamane H, Aliberti J, Hissong BD, Nguyen BV, Gadina M, Sher A, Paul WE, O'Shea JJ. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 18;98(26):15137-42.

Lockwood, DN, Suneetha, S. Leprosy: too complex a disease for a simple elimination paradigm. *Bull World Health Organ.* 2005; 83(3):230-5

Lockwood DN, Suneetha L, Sagili KD, Chaduvula MV, Mohammed I, van Brakel W, Smith WC, Nicholls P, Suneetha S. Cytokine and protein markers of leprosy reactions in skin and nerves: baseline results for the North Indian INFIR cohort. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(12):e1327

Ludviksson BR, Seegers D, Resnick AS, Strober W. The effect of TGF-beta1 on immune responses of naïve versus memory CD4+ Th1/Th2 T cells. *Eur. J. Immunol.* 2000;30(7):2101-211.

Madan NK, Agarwal K, Chander R. Serum cytokine profile in leprosy and its correlation with clinico-histopathological profile. *Lepr Rev.* 2011; 82(4):371-82.

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

Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol.* 2013; 43(11):2797-809.

Mantovani A, Sica A, Locati M. New vistas on macrophages differentiation and activation. *Eur J Immunol.* 2007;37(1):14-6.

Matsuki T, Okano Y, Aoki Y, Ishida Y, Hatano K, Kumano K. Effectiveness of thalidomide for erythema nodosum leprosum (ENL): retrospective study of 20 Japanese cases in National Sanatorium Oku-Komyoen. *Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi.* 2014; 83(3):1-6.

Martinez TS, Figueira MM, Costa AV, Gonçalves MA, Goulart LR, Goulart IM. Oral mucosa as a source of *Mycobacterium leprae* infection and transmission, and implications of bacterial DNA detection and the immunological status. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(11):1653-8.

Medzhitov, R. Innate Immunity: quo vadis? *Nature Immunology* 2010; 11(7):551-3.

Meyerson MS. Erythema nodosum leprosum. *Int J Dermatol.* 1996; 35(6):389-92.

Michie CA, McLean A, Alcock C, Beverley PC. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature.* 1992. 19;360(6401):264-5.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. 54 p.

Ministério da Saúde. Indicadores epidemiológicos e operacionais de hanseníase. Brasil 2001 – 2012. Fonte: Portal da Saúde. 2013; Endereço eletrônico: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31200. Acessado em 25/10/2015.

Ministério da Saúde. Hanseníase. Situação Epidemiológica. 2014 - Dados. Disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/705-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/hanseníase/11298-situacao-epidemiologica-dados>. Acessado em 02/03/2016.

Modlin, R.L., Gebhard, J.F., Taylor, C.R., Rea, T.H. In situ characterization of T lymphocyte subsets in the reactional states of leprosy. Clin. Exp. Immunol. 1983; 53, 17-24.

Modlin, RL, Bakke, AC, Vaccaro, SA, Horwitz, DA, Taylor, CR, Rea, TH. Tissue and blood T-lymphocyte subpopulations in erythema nodosum leprosum. Arch. Dermatol. 1985; 121,216—219

Modlin RL. Learning from leprosy: insights into contemporary immunology from an ancient disease. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol. 2002;15(1):1-6

Monot M, Honoré N, Garnier T, Araoz R, Coppée JY, Lacroix C, Sow S, SpencerJS, Truman RW, Williams DL, Gelber R, Virmond M, Flageul B, Cho SN, Ji B, Paniz-Mondolfi A, Convit J, Young S, Fine PE, Rasolofo V, Brennan PJ, Cole ST. On the origin of leprosy. Science. 2005;308(5724):1040-2.

Moreira AL, Kaplan G, Villahermosa LG, Fajardo TJ, Abalos RM, Cellona RV, Balagon MV, Tan EV, Walsh GP. Comparison of Pentoxifylline, Thalidomide and Prednisone in the Treatment of ENL. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 1998;66(1):61-5.

Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinas A, Frindt P, Smith KA, Kaplan G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. J Exp Med. 1993. 1;177(6):1675-80.

Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborcht PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. Lepr Rev. 2006; 77(3):189-202.

Moraes MO, Sarno EN, Almeida AS, Saraiva BC, Nery JA, Martins RC, et al. Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon-gamma and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). Scand J Immunol. 1999; 50(5):541–9

Monteiro, YN. Hanseníase: história e poder no Estado de São Paulo. Hansenologia Internationalis, São Paulo, 1987; v. 12, n.1, p.1-7.

Moura DF, de Mattos KA, Amadeu TP, Andrade PR, Sales JS, Schmitz V, Nery JA, Pinheiro RO, Sarno EN. CD163 favors *Mycobacterium leprae* survival and persistence by promoting anti-inflammatory pathways in lepromatous macrophages. Eur J Immunol. 2012;42(11):2925-36.

Mueller SN, Gebhardt T, Carbone FR, Heath WR. Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:137-61.

Murray RA, Siddiqui MR, Mendillo M, Krahenbuhl J, Kaplan G. *Mycobacterium leprae* inhibits dendritic cell activation and maturation. *J. Immunol.* 2007;178(1):338-44.

Naafs B. Bangkok Workshop on Leprosy Research. Treatment of reactions and nerve damage. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1996;64:S21-8

Nagalakshmi ML, Murphy E, McClanahan T, de Waal Malefyt R. Expression patterns of IL-10 ligand and receptor gene families provide leads for biological characterization. *Int Immunopharmacol.* 2004;4(5):577-92.

Narayanan, R.B., Laal, S., Sharma, A.K., Bhutani, L.K., Nath, I. Differences in predominant T cell phenotypes and distribution pattern in reactional lesions of tuberculoid and lepromatous leprosy. *Clin. Exp. Immunol.* 1984; 55, 623-628.

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

Ng V, Zanazzi G, Timpl R, Talts JF, Salzer JL, Brennan PJ, Rambukkana A. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cell.* 2000; 103:511–529.

Noack M, Miossec P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev.* 2014;13(6):668-77

Nogueira N, Kaplan G, Levy E, Sarno EN, et al. Defective gamma interferon production in leprosy. Reversal with antigen and interleukin 2. *J Exp Med.* 1983;158(6):2165-70.

Oliveira, R.B., Moraes, M.O., Oliveira, E.B., Sarno, E.N., Nery, J.A., Sampaio, E.P. Neutrophils isolated from leprosy patients release TNF-alpha and exhibit accelerated apoptosis in vitro. *J. Leukoc. Biol.* 1999; 65, 364—371.

Oliveira JM, Rêgo JL, de Lima Santana N, Braz M, Jamieson SE, Vieira TS, Magalhães TL, Machado PR, Blackwell JM, Castellucci LC. The -308bp TNF gene

polymorphism influences tumor necrosis factor expression in leprosy patients in Bahia State, Brazil. *Infect Genet Evol.* 2016; 39:147-154.

Omer FM, Kurtzhals JA, Riley EM. Maintaining the immunological balance in parasitic infections: a role for TGF-beta? *Parasitol Today.* 200; 16: 18–23.

Palermo ML, Pagliari C, Trindade MA, Yamashitafuji TM, Duarte AJ, Cacere CR, Benard G. Increased expression of regulatory T cells and down-regulatory molecules in lepromatous leprosy. *Am J Trop Med Hyg.* 2012; 86(5):878-83.

Pham D, Vincentz JW, Firulli AB, Kaplan MH. Twist1 regulates Ifng expression in Th1 cells by interfering with Runx3 function. *J Immunol.* 2012. 15;189(2):832-40

Pinto, PGHR. O estigma do pecado: a lepra durante a idade média. *Revista de saúde coletiva.* 1985; Vol. 5, No.1.

Pocaterra L, Jain S, Reddy R, Muzaffarullah S, Torres O, Suneetha S, Lockwood DN. Clinical course of erythema nodosum leprosum: an 11-year cohort study in Hyderabad, India. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;74(5):868-79.

Pfaltzgraff, RE, Ramu, G. *Clinical Leprosy*, in: Hastings, R.C. (Ed). Edinburgh: Churchill Livingstone. 1994; 290 p

Prabhakaran K, Harris EB, Randhawa B. Regulation by protein kinase of phagocytosis of *Mycobacterium leprae* by macrophages. *J Med Microbiol.* 2000;49:339–42

Prober, C. Sixth disease and the ubiquity of human herpesviruses. *N Engl J Med.* 2005; 352:753–755.

Rao TD, Rao PR. Tr, T mu and B lymphocytes in erythema nodosum leprosum reactions of leprosy. *Indian J. Lepr.* 1986; 58, 601—608.

Rao TD, Rao PR. Serum immune complexes in erythema nodosum leprosum reactions of leprosy. *Indian J. Lepr.* 1988; 60,189-195.

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

Rosa FB, Souza VC, Almeida TA, Nascimento VA, Vásquez FG, Cunha Mda G, Naveca FG. Detection of *Mycobacterium leprae* in saliva and the evaluation of oral sensitivity in patients with leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108(5):572-7.

Rosen, G. Uma história da saúde pública. São Paulo: UNESP, 1994. 423 p.

Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 2006; 212:28–50.

Rutishauser RL, Kaech SM. Generating diversity: transcriptional regulation of effector and memory CD8+ T-cell differentiation,” *Immunological Reviews*, 2010; 235(1):219– 33.

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. 16;8(1):e2639.

Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 2010; 10:490–500.

Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:745-63.

Sampaio, EP, Kaplan, G, Miranda, A., et al. The influence of thalidomide on the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum. *J. Infect. Dis*. 1993; 168(2):408-14.

Sampaio EP, Moreira AL, Sarno EN, Malta AM, Kaplan G. Prolonged treatment with recombinant interferon gamma induces erythema nodosum leprosum in lepromatous leprosy patients. *J Exp Med*. 1992;175(6):1729-37.

Sampaio EP & Sarno EN. Expression and cytokine secretion in the states of immune reactivation in leprosy. *Braz J Med Biol Res*. 1998; 31:69-76.

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

Sarno EN, Sampaio EP. The role of inflammatory cytokines in the tissue injury of leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1996; 64(4 Suppl):S69-73; discussion S73-4

Sarno EN, Grau GE, Vieira LM, Nery JA. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosy reactional states. *Clin Exp Immunol.* 1991;84(1):103-8.

Saunderson P, Groenen G. Which physical signs help most in the diagnosis of leprosy? A proposal based on experience in the AMFES project, ALERT, Ethiopia. *Leprosy Review.* 2000; 71: 34-42.

Saunderson, P., Gebre, S., Byass, P. ENL reactions in the multibacillary cases of the AMFES cohort in central Ethiopia: incidence and risk factors. *Lepr. Rev.* 2000; 71, 318—324.

Sauer ME, Salomão H, Ramos GB, D'Espindula HR, Rodrigues RS, Macedo WC, Sindeaux RH, Mira MT. Genetics of leprosy: Expected-and unexpected-developments and perspectives. *Clin Dermatol.* 2016; 34(1):96-104.

Schenk M, Fabri M, Krutzik SR, Lee DJ, Vu DM, Sieling PA, Montoya D, Liu PT, Modlin RL. Interleukin-1 β triggers the differentiation of macrophages with enhanced capacity to present mycobacterial antigen to T cells. *Immunology.* 2014;141(2):174-80.

Schwerer, B., Meeker, H.C., Sersen, G., Levis, W.R. IgM antibodies against phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* in leprosy sera: relationship to bacterial index and erythema nodosum leprosum. *Acta Leprol.* 1984; 2, 394-402.

Schreuder, P.A. The occurrence of reactions and impairments in leprosy: experience in the leprosy control program of three provinces in northeastern Thailand, 1987—1995 [correction of 1978—1995]. II. Reactions. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 1998; 66,159—169.

Schuring RP, Hamann L, Faber WR, Pahan D, Richardus JH, Schumann RR, Oskam L. Polymorphism N248S in the human Toll-like receptor 1 gene is related to leprosy and leprosy reactions. *J Infect Dis,* 2009; 199(12):1816-9.

Schlesinger LS, Horwitz MA. Phagocytosis of *Mycobacterium leprae* by human monocyte derived macrophages is mediated by complement receptors CR1

(CD35), CR3 (CD11b/CD18), and CR4 (CD11c/CD18) and IFN- γ activation inhibits complement receptor function and phagocytosis of this bacterium. *J Immunol.* 1991;147:1983–94.

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.

Shannon EJ, Sandoval F. Thalidomide increases the synthesis of IL-2 in cultures of human mononuclear cells stimulated with Concanavalin-A, Staphylococcal enterotoxin A, and purified protein derivative. *Immunopharmacology.* 1995; 31:109–116

Shepard CC. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot-pads of mice. *J Exp Med.* 1960;112(3):445-54.

Sieling PA, Modlin RL. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. *Immunobiol.* 1994;191(4-5):378-87.

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.

Spencer JS, Kim HJ, Wheat WH, Chatterjee D, Balagon MV, Cellona RV, Tan EV, Gelber R, Saunderson P, Duthie MS, Reece ST, Burman W, Belknap R, Mac Kenzie WR, Geluk A, Oskam L, Dockrell HM, Brennan PJ; IDEAL Consortium. Analysis of antibody responses to *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I, lipoarabinomannan, and recombinant proteins to define disease subtype-specific antigenic profiles in leprosy. *Clin Vaccine Immunol.* 2011;18(2):260-7.

Sridevi K, Khanna N, Chattree V, Pal PC, Haq W, Rao DN. Reversal of T cell anergy in leprosy patients: in vitro presentation with *Mycobacterium leprae* antigens using murabutide and Trat peptide in liposome delivery. *Int. Immunopharmacol.* 2003; 3, 1589–1600.

Steinman RM. Some interfaces of dendritic cell biology. *APMIS.* 2003;111(7-8):675-97.

Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med.* 2007; 13:139–145

Stefani MM, Guerra JG, Sousa AL, Costa MB, Oliveira ML, Martelli CT, Scollard DM Potential plasma markers of Type 1 and Type 2 leprosy reactions: a preliminary report. *BMC Infect Dis.* 2009. 27;9:75.

Suneetha S, Arunthathi S, Job A, Date A, Kurian N, Chacko CJ. Histological studies in primary neuritic leprosy: changes in the nasal mucosa. *Lepr Rev.* 1998; 69(4):358-66.

Surh CD, Boyman O, Purton JF, Sprent J: Homeostasis of memory T cells. *Immunol Rev.* 2006; 211:154-163.

Teles RM, Moraes MO, Geraldo NT, Salles AM, Sarno EN, Sampaio EP Differential TNF α mRNA regulation detected in the epidermis of leprosy patients. *Arch Dermatol Res.* 2002;294(8):355-62.

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

Trautman, JR. A brief history of hansen's disease. *Bulletin of the New York academy of medicine.* 1984; Vol. 60, No. 7.

Tindemans I, Serafini N, Di Santo JP, Hendriks RW. GATA-3 function in innate and adaptive immunity. *Immunity.* 2014; 21;41(2):191-206.

Van Brakel WH, Khawas IB. Nerve damage in leprosy: an epidemiological and clinical study of 396 patients in west Nepal. Part 1. Definitions, methods and frequencies. *Lepr Rev* 1994; 65:204-21.

Verreck FAW, de Boer T, Langenberg DML, van der Zarden L, Ottehoff THM. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and antiinflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN- γ and CD40L-mediated costimulation. *J Leukoc Biol.* 2006;79(2):285-93

Voorend CG, Post EB. A systematic review on the epidemiological data of erythema nodosum leprosum, a type 2 leprosy reaction. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 3;7(10): e2440.

- Walker SL, Lockwood DN. The clinical and immunological features of leprosy. *Br Med Bull.* 2006; 77-78:103-21.
- Walker SL, Lockwood DN. Leprosy. *Clin Dermatol.* 2007; 25(2):165-72
- Walker SL, Balagon M, Darlong J, et al. ENLIST 1: An International Multi-centre Cross-sectional Study of the Clinical Features of Erythema Nodosum Leprosum. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015; 9(9):e0004065
- Wemambu SN, Turk JL, Waters MF, Rees RJ. Erythema nodosum leprosum: a clinical manifestation of the arthus phenomenon. *Lancet.* 1969; 2(7627):933–5.
- White C, Franco-Paredes C. Leprosy in the 21st century. *Clin Microbiol Rev.* 2015; 28(1):80-94
- World Health Organization. Leprosy Elimination Project: status report 2003–2004. Geneva: WHO; 2004.
- WHO. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: Second WHO report on neglected tropical diseases. Geneva: World Health Organization; 2013.^a
- WHO. Prevalence of leprosy, 2013. Endereço eletrônico: http://www.who.int/lep/situation/Leprosy_PR_2013.pdf. Acessado em 23/01/2013.^b
- Xu Y, Song G. The role of CD40-CD154 interaction in cell immunoregulation. *J Biomed Sci.* 2004;11(4):426-38.
- Yamanouchi, AA, Caron, CR, Shiwaku, DT, et al. Hanseníase e sociedade: um problema sempre atual. In: *Anais Bras. Dermatol.* Rio de Janeiro, 1993; p.396-404.
- Zhu J, Guo L, Watson CJ, Hu-Li J, Paul WE. Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion. *J. Immunol.* 2001;166,7276–81.
- Zhu J, Paul WE. Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol Rev.* 2010; 238:247–2

