

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

**Doutorado em Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em
Biologia Parasitária**

**INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO GÊNICA,
ESTRESSE OXIDATIVO, PARÂMETROS DE IMUNOSENESCÊNCIA E
A PATOGÊNESE DA HANSENÍASE EM IDOSOS**

PEDRO HENRIQUE LOPES DA SILVA

RIO DE JANEIRO

Junho de 2021



INSTITUTO OSWALDO CRUZ

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

PEDRO HENRIQUE LOPES DA SILVA

Investigação da associação entre expressão gênica, estresse oxidativo, parâmetros de imunosenescência e a patogênese da Hanseníase em idosos

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

Orientadora: Dra. Danuza de Almeida Esquenazi

RIO DE JANEIRO

2021

Lopes da Silva, Pedro Henrique.

Investigação da associação entre expressão gênica, estresse oxidativo, parâmetros de imunosenescência e a patogênese da hanseníase em idosos / Pedro Henrique Lopes da Silva. - Rio de Janeiro, 2021.

124 f.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2021.

Orientadora: Danuza de Almeida Esquenazi.

Bibliografia: f. 97-112

1. hanseníase. 2. imunosenescência. 3. estresse oxidativo. 4. envelhecimento. 5. patogênese. I. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Mangueiras/Icict/Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Igor Falce Dias de Lima - CRB-7/6930.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

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

AUTOR: PEDRO HENRIQUE LOPES DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO GÊNICA, ESTRESSE
OXIDATIVO, PARÂMETROS DE IMUNOSENESCÊNCIA E A PATOGÊNESE DA
HANSENÍASE EM IDOSOS**

ORIENTADORA: Dra. Danuza de Almeida Esquenazi

Aprovada em: _____ / ____ / _____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Alda Maria da Cruz

Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas
Instituto Oswaldo Cruz/IOC – Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

Prof. Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto

Laboratório de Imunofarmacologia
Instituto Oswaldo Cruz/IOC – Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

Prof. Dr. Herbert Leonel de Matos Guedes

Laboratório de Imunofarmacologia
Centro de Ciências da Saúde/ CCS - Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ

Profa. Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto

Laboratório de Imunologia Viral
Instituto Oswaldo Cruz/IOC - Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ

Prof. Dr. Marcus Fernandes Oliveira

Laboratório de Bioquímica de Resposta ao Estresse
Centro de Ciências da Saúde/ CCS - Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ

Rio de Janeiro, 25 de junho de 2021

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Danuza Esquenazi pelos ensinamentos, parcerias e dedicação a minha vida acadêmica;

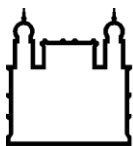
Aos meus amigos do laboratório: Katherine, Mylena, Júlia e Mayara pela grande ajuda no desenvolvimento dos experimentos e companheirismo;

Aos voluntários (pacientes e indivíduos sadios) pelo consentimento e colaboração neste projeto;

À Pós-graduação em Biologia Parasitária do IOC;

À Banca Examinadora pelo tempo dedicado à avaliação deste trabalho;

Às agências de fomento CNPq e CAPES e ao IOC/FIOCRUZ que tornaram esse trabalho possível.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

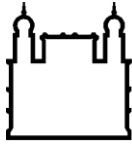
INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO GÊNICA, ESTRESSE OXIDATIVO, PARÂMETROS DE IMUNOSENESCÊNCIA E A PATOGÊNESE DA HANSENÍASE EM IDOSOS

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Pedro Henrique Lopes da Silva

A hanseníase é uma doença crônica infecciosa e negligenciada que permanece endêmica em muitos países em desenvolvimento, onde cerca de 200.000 novos casos são notificados anualmente. Neste sentido, a hanseníase multibacilar (MB), que engloba as formas clínicas responsáveis pela manutenção da cadeia de transmissão da doença, tem sido detectada em taxas cada vez maiores entre os idosos brasileiros. Parte do declínio da função fisiológica durante o envelhecimento é devido ao aumento do dano oxidativo e às mudanças nas subpopulações de linfócitos T, característica do processo de imunosenescência, relacionado ao aumento da suscetibilidade às doenças infecciosas, autoimunes e câncer. O objetivo deste estudo foi investigar possíveis alterações, relacionadas à idade, da resposta imune dos pacientes idosos com hanseníase, bem como verificar se estes pacientes apresentavam maior dano oxidativo, e, como esses aspectos poderiam influenciar na patogênese da doença. Desta forma, foram incluídos neste estudo 87 indivíduos, 62 pacientes com hanseníase, recém- diagnosticados e não tratados, distribuídos de acordo com a faixa etária e as formas clínicas da doença, além de 25 voluntários não-hansenianos. Amostras de sangue periférico e lesão de pele dos pacientes foram coletadas para as análises pertinentes. Os resultados dessas análises mostraram que a concentração sérica de proteínas carboniladas foi significativamente maior em pacientes idosos em comparação aos pacientes jovens. Um ano após a alta da poliquimioterapia (PQT) e durante o processo de eliminação do *Mycobacterium leprae*, o dano oxidativo aumentou em pacientes MB jovens, mas não em idosos MB. Os pacientes paucibacilares (PB) e MB idosos apresentaram maior quantidade de 4-HNE em lesões cutâneas do que os pacientes jovens, principalmente ao redor e no interior dos linfócitos T CD8⁺ de memória. Além disso, jovens MB demonstraram maior capacidade de neutralizar espécies reativas de oxigênio (EROs) em comparação aos pacientes idosos MB, que apresentaram menor expressão gênica de enzimas antioxidantes, principalmente glutathiona peroxidase. Também foi verificado um acúmulo de linfócitos T CD8⁺ de memória, bem como redução da expressão de células com o fenótipo CD8⁺CD28⁺ em lesões de pele de pacientes idosos, quando comparados aos pacientes jovens. Não obstante, observamos alterações na expressão dos genes LAG3 e PDCD1 em lesões cutâneas de pacientes MB jovens, quando comparados a pacientes MB idosos. Esses dados sugerem que as alterações relacionadas à idade nas subpopulações de linfócitos T e o aumento do dano oxidativo podem influenciar a imunopatogênese da doença, além de facilitar o aparecimento da hanseníase em pacientes idosos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

INVESTIGATING THE ASSOCIATION BETWEEN GENE EXPRESSION, OXIDATIVE STRESS, IMMUNOSENESCENCE PARAMETERS AND THE PATHOGENESIS OF LEPROSY IN ELDERLY

ABSTRACT

PHD THESIS IN PARASITE BIOLOGY

Pedro Henrique Lopes da Silva

Leprosy is a chronic infectious and neglected disease that remains endemic in many developing countries, where about 200,000 new cases are reported annually. Multibacillary leprosy (MB), which encompasses the clinical forms responsible for maintaining the chain of transmission of the disease, has been detected at increasing rates among elderly people in Brazil. Part of the decline in physiological function during aging is due to increased oxidative damage and changes in T cell subpopulations, characteristic of the immunosenescence, related to increased susceptibility to infectious, autoimmune diseases and cancer. The purpose of this study was to investigate possible changes, related to age, to the immune response in elderly patients with leprosy, as well as to verify whether these patients had greater oxidative damage and how these aspects could influence the pathogenesis of the disease. Thus, 87 individuals were included in this study, 62 patients newly diagnosed with leprosy and not treated, distributed according to the age group and the clinical forms of the disease; in addition to 25 non-leprosy volunteers. Samples of peripheral blood and skin lesions from the patients were collected for the analyzes. The results of these analyzes showed that the serum concentration of carbonylated proteins was significantly higher in elderly patients compared to young patients. One year after discharge from multidrug therapy (MDT) and during the process of eliminating *Mycobacterium leprae*, oxidative damage increased in young MB patients, but not in elderly MB patients. Paucibacillary (PB) and MB elderly patients had a higher amount of 4-HNE in skin lesions than young patients, mainly around and inside the memory CD8⁺ T lymphocytes. In addition, young MB patients showed greater ability to neutralize reactive oxygen species (ROS) compared to elderly MB patients, who showed lower gene expression of antioxidant enzymes, especially glutathione peroxidase. There was also an accumulation of memory CD8⁺ T lymphocytes, as well as reduced expression of CD8⁺CD28⁺ cells in skin lesions of elderly patients, when compared to young patients. Nevertheless, we observed changes in the expression of the LAG3 and PDCD1 genes from the skin of young MB patients, when compared to elderly MB patients. These data suggest that age-related changes in subpopulations of T cells and increased oxidative damage may influence the immunopathogenesis of the disease, in addition to facilitating the onset of leprosy in elderly patients.

Sumário

1 Introdução.....	13
1.1 Hanseníase: aspectos históricos e culturais	13
1.2 Epidemiologia.....	16
1.3 Agente etiológico e mecanismos de transmissão	19
1.4 Espectro clínico da Hanseníase	22
1.5 Mecanismos da resposta imune na Hanseníase	26
1.6 Suscetibilidade à infecção por <i>Mycobacterium leprae</i> e desenvolvimento da Hanseníase.....	31
1.7 Estresse Oxidativo.....	33
1.8 Imunosenescência	39
1.9 <i>Inflammaging</i>	44
2 Justificativa	47
3 Objetivos	49
4 Resultados	51
5 Discussão	87
6 Conclusões	95
Referências.....	97
Anexos.....	113

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustrações de lesões faciais (esquerda) e disseminadas pelo corpo (direita) do livro <i>Om Spedalskhed</i>	16
Figura 2 - Distribuição geográfica dos novos casos de Hanseníase ao redor do mundo	17
Figura 3 - Taxa de detecção de novos casos de Hanseníase em função da unidade de federação e capital de residência no ano de 2019.....	19
Figura 4 - Detecção de novos casos de Hanseníase no Brasil em 2019.....	19
Figura 5 - Comparação do material genético do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> com <i>Mycobacterium leprae</i>	22
Figura 6 - Perfil da resposta imune do hospedeiro no polo tuberculóide <i>versus</i> lepromatoso na Hanseníase.....	31
Figura 7 - Síntese do radical ânion superóxido.....	35
Figura 8 - Neutralização do ânion superóxido produzido na cadeia transportadora de elétrons (ETC).....	36
Figura 9 - Fatores extrínsecos e intrínsecos ligados à produção de EROs e algumas consequências ao organismo.....	39
Figura 10 - Representação da involução do timo dependente da idade.....	42
Figura 11 - Fatores relacionados à geração de células do fenótipo SASP.....	43
Figura 12 - Marcadores de Imunosenescência.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quadro comparativo das formas clínicas da Hanseníase conforme classificação de Ridley e Jopling.....	24
Tabela 2 - Resultados característicos do teste de Lepromina e Índice Baciloscópico (IB) de cada forma clínica.	25

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

4-HNE	4-hidroxi-2,3-nonenal
aC	antes de Cristo
ASA	Ambulatório Sousa Araújo
BB	forma clínica <i>borderline borderline</i>
BL	forma clínica <i>borderline</i> lepromatosa
BT	forma clínica <i>borderline</i> tuberculoide
CAT	catalase
CD	cluster de diferenciação
CMV	citomegalovírus
CRP	proteína C reativa
ENH	Eritema Nodoso Hansênico
ERO	espécie reativa de oxigênio
ETC	cadeia transportadora de elétrons (mitocôndria)
GI	grau de incapacidade física
GR	glutathione redutase
GSH	glutathione reduzida
GSHPx	glutathione peroxidase
GSSH	glutathione oxidada
IB	índice baciloscópico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN- γ	Interferon-gama
IL	interleucina

LAMA2	laminina 2
LL	forma clínica polar lepromatosa
LT- α	linfotoxina-alfa
MB	multibacilar
MDA	malondialdeído
MDSC	células mielóides supressoras
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADP	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF- κ B	fator nuclear kappa B
NK	células natural killer
NP	forma clínica neural pura
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMP	padrões moleculares associados a patógenos
PB	paucibacilar
PD-1	proteína de morte celular programada
PGL-1	glicolipídio fenólico 1
PQT	poliquimioterapia
RR	reação reversa
SASP	fenótipo secretor associado ao estado senescente
SNP	polimorfismo de base única
SOD	superóxido dismutase
TB	tuberculose
TCR	receptor de células T

TGF- β	fator de crescimento de transformação beta
TLR	receptor semelhante a Toll
TNF	fator de necrose tumoral
T _{reg}	linfócito T regulador
TT	forma clínica polar tuberculoide
UV	ultravioleta
VDR	receptor de vitamina D

1 – INTRODUÇÃO

1.1 - Hanseníase: aspectos históricos e culturais

A Hanseníase é uma doença infectocontagiosa crônica, de notificação compulsória em todo território nacional, causada pelo *Mycobacterium leprae*, associada a um grande estigma social com registros que datam de mais de dois mil anos. A doença afeta majoritariamente a pele e os nervos periféricos com capacidade de ocasionar lesões neurais. Por esse motivo, ao longo do curso da infecção, os doentes podem desenvolver lesões com falta de sensibilidade, deformidades e alto poder incapacitante, principal responsável pelo estigma e discriminação às pessoas acometidas pela doença. As sequelas podem ser por vezes permanentes, comprometerem a vida do paciente e sua inserção ou manutenção no mercado de trabalho (Scollard *et al.*, 2006; Brasil, 2021).

Não há um consenso sobre o local de origem da doença, embora acredite-se que ela possa ter surgido em territórios que hoje pertencem à Índia. Escritos antigos, com descrições clínicas similares à Hanseníase, datam de 600 aC até 1400 aC na Índia. Já na China, há registros de cerca de 500 aC que mencionam lesões na pele, dormência e madarose (perda de sobrancelhas e/ou cílios), que também devem estar relacionados à Hanseníase. Soldados gregos, retornando das campanhas de Alexandre o Grande, na Índia, teriam levado a doença para as nações banhadas pelo mar Mediterrâneo. Por conseguinte, exércitos romanos teriam introduzido a doença na Europa Ocidental, nas colônias criadas na Espanha, Gália e Inglaterra. E a propagação pode ter se intensificado durante as cruzadas (Bennett *et al.*, 2008). Posteriormente, por meio do colonialismo e tráfico de escravos africanos, a doença teria chegado às Américas e outras regiões da África (Monot *et al.*, 2005).

Há uma longa história marcada por medo, estigma e repulsa em relação aos pacientes portadores de Hanseníase devido às deformidades nos membros e desfiguração facial causada pela doença não tratada. Registros de algumas civilizações orientais da Antiguidade mostram que os pacientes estavam sujeitos a rituais de purificação e quarentena, e, certas vezes, a serem enterrados vivos para impedir a propagação da doença. Acreditava-se que a doença era contraída como

uma forma de punição divina ou ligada à personificação de forças malignas (Brown, 2006, Bennett *et al.*, 2008).

Na Idade Média, portadores da doença foram banidos do convívio familiar e da Igreja, além de serem forçados a usar roupas distintas e anunciar sua presença com sinos (Trautman, 1984). Ademais, na visão ocidental, grande parte do estigma pode estar relacionado à tradução incorreta de passagens bíblicas no livro de Levítico, como descrito por estudiosos de Alexandria por volta de 3 aC. O termo hebraico *tsara'ath* que significava atos ou condições impuras ou desfigurantes, foi traduzido para lepra, palavra usada pelos médicos gregos para uma condição patológica da pele (Bennett *et al.*, 2008).

Embora a etiologia da doença já esteja bem descrita, ainda hoje existe uma hostilidade legalizada pela qual passam os pacientes. Alguns países ainda possuem legislação que permite discriminação e segregação dos pacientes. Essas leis vão desde a retirada do paciente do convívio social até a falta de oferta de tratamento pelo poder público (Zamparoni, 2017; WHO, 2019).

A descrição da etiologia da Hanseníase tornou-se bastante urgente durante uma epidemia que ocorreu na Europa no século XIX. Em 1847, uma investigação detalhada das características da doença, feita pelos médicos Daniel Danielssen e Carl Boeck, resultou na publicação de um livro inovador, *Om Spedalskhed* (On Lepra). O livro é reconhecido como a primeira publicação que distingue a Hanseníase de outras doenças infecciosas que afetam a pele, como a sífilis e psoríase. Mais tarde, em 1873, Gerhard Armauer Hansen foi o primeiro a identificar o patógeno causador da Hanseníase, o *M. leprae*, ao verificar a existência de bacilos em lesões de pele (Trautman, 1984).

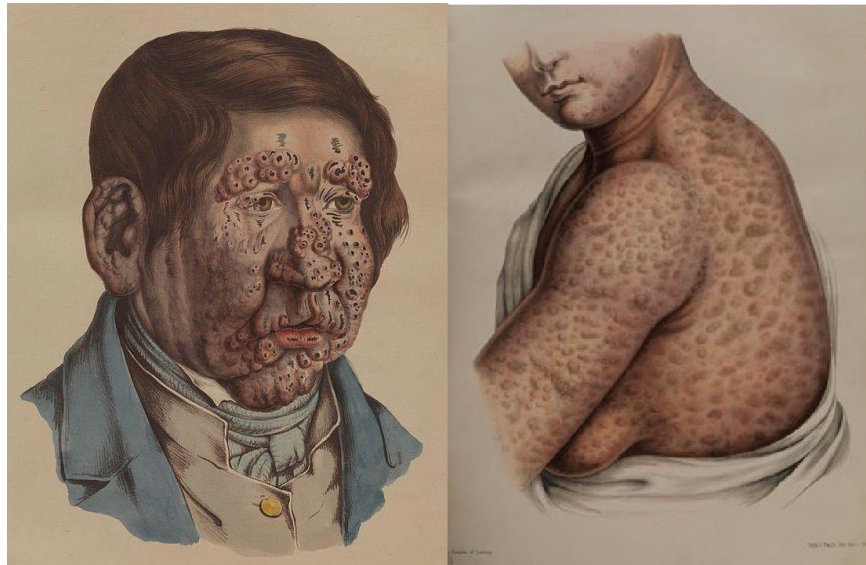


Figura 1 - Ilustrações de lesões faciais (esquerda) e disseminadas pelo corpo (direita) do livro Om Spedalskhed. Disponível em: https://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Om_Spedalskhed#/media/File:20_year_old_woman_with_severe_leprosy_Wellcome_L00748
Acesso em 12 de março de 2021.

Até 1940, a Hanseníase era tratada com o óleo de chaulmoogra, que é extraído das sementes da espécie de *Hydnocarpus wightiana*, cujo uso originou-se na sociedade hindu. A partir de então, introduziu-se o uso das sulfonas para o tratamento da doença. As sulfonas são compostos orgânicos derivados dos ácidos sulfônicos pela substituição da hidroxila por um radical alcoíla ou arila. O sucesso do uso das sulfonas durou até a década de 70, quando muitos casos de resistência foram relatados devido ao tratamento inadequado. Além disso, uma elevada taxa de recidiva após a cura com a monoterapia sulfônica e a persistência de bacilos viáveis, mesmo após 10 a 12 anos de tratamento, fez com que a OMS incentivasse a busca por novos fármacos. Em 1976, a OMS financiou o Programa Especial de Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais, com o objetivo de investigar a resistência às sulfonas e novas abordagens terapêuticas. Por fim, em 1982, a OMS recomendou um protocolo de tratamento denominado poliquimioterapia (PQT) que combinava rifampicina, clofazamina e dapsona (WHO, 1982).

Os pacientes agrupados com as formas paucibacilares (PB) deveriam ser tratados por 6 meses e os pacientes agrupados como multibacilares (MB), por 12 a 24 meses. A resposta ao tratamento com a PQT foi bastante satisfatória. Reduções significativas na detecção de novos casos da doença passaram ocorrer ano após ano,

com conseqüente eliminação da doença em muitos países. Em conjunto, mais de 14,5 milhões de pacientes foram curados pelo uso da PQT e cerca de 2 milhões de pacientes não chegaram a desenvolver incapacidades físicas (Bennett *et al.*, 2008; WHO, 2019).

1.2 – Epidemiologia

Mesmo após a implementação da PQT, a Hanseníase ainda é endêmica em muitos países, sobretudo nas áreas mais pobres do globo. Em 2019, mais de 200 mil novos casos da doença foram notificados mundialmente. Nos últimos dez anos, houve uma redução de 15% na detecção de novos casos, sendo este decréscimo mais acentuado em certas regiões onde as políticas públicas de assistência à saúde já estavam mais bem definidas. Entretanto, em certos países, houve um aumento da detecção da doença, fato que está associado às campanhas ativas de detecção e, principalmente, à triagem aprimorada de contatos domiciliares de pacientes. Na última década, mais da metade dos casos ao redor do mundo ficaram concentrados no sudoeste asiático. Entretanto, a situação crítica da Hanseníase também é detectada no nosso país. Índia, Indonésia e Brasil são responsáveis por quase 80% dos casos da doença no mundo. Ainda em relação aos novos casos registrados no ano de 2018, o Brasil é responsável por 93% dos casos das Américas (WHO, 2019; WHO, 2020).

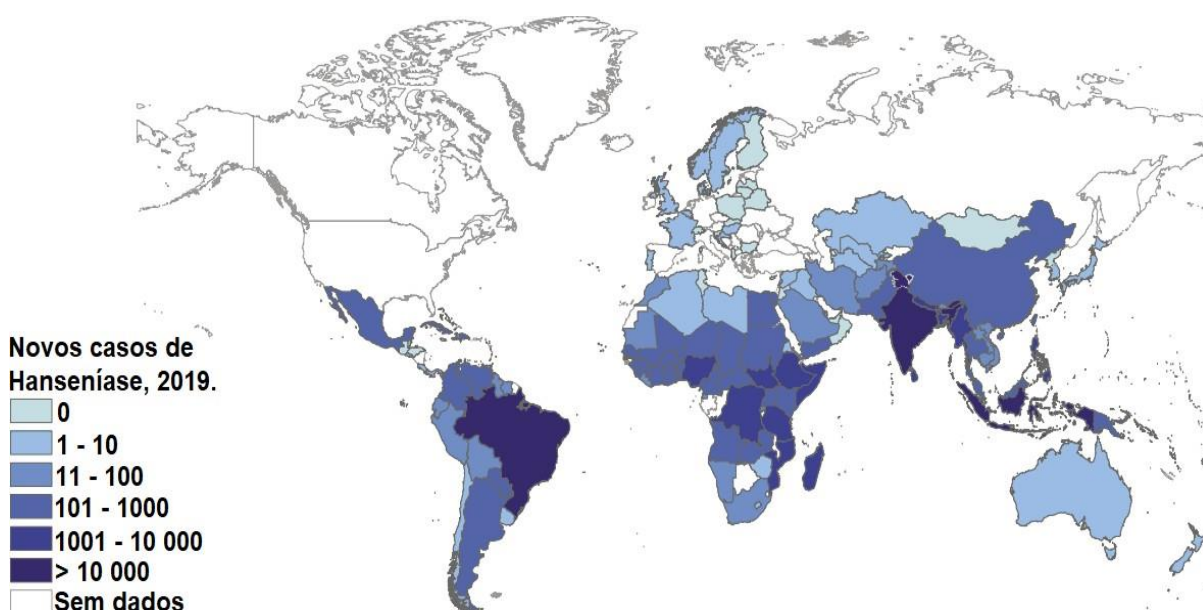


Figura 2 - Distribuição geográfica dos novos casos de Hanseníase ao redor do mundo. O Brasil e a Índia são os países que apresentam as maiores taxas de detecção de novos casos. Fonte: WHO, 2020.

Outra questão que preocupa, e foi definida como meta global de eliminação da doença até 2020 pela OMS, é a alta frequência de casos em que o paciente desenvolve o grau de incapacidade física 2 (GI2), numa escala que varia de 0 a 2. Um estudo recente com pacientes indianos mostrou que o atraso no diagnóstico é um fator de risco bastante relevante para o desenvolvimento do GI 1 ou 2, o que evidencia não só a dificuldade de acesso ao serviço de saúde pelos pacientes, como a necessidade de capacitação periódica dos profissionais de saúde para realizarem o diagnóstico correto e rápido. Embora a demora para o diagnóstico seja um fator de risco preponderante para o desenvolvimento das incapacidades, a idade também está associada. Pacientes com mais de 60 anos apresentam duas vezes mais chances de apresentar GI2/GI1 em comparação com os pacientes com menos de 30 anos. Além disso, pacientes MB têm nove vezes mais chances de apresentar GI2/GI1 no momento do diagnóstico em comparação aos PB (Srinivas *et al.*, 2019; WHO, 2019.)

Outro desafio global relacionado à hanseníase diz respeito à hostilidade legalizada pela qual passam os pacientes, muitas vezes fundamentada em lei (WHO, 2019). Neste contexto, no Brasil, a Estratégia Nacional para Enfrentamento da Hanseníase 2019-2022, elaborada pelo Ministério da Saúde, teve como objetivo a implantação de canais para registro de práticas discriminatórias às pessoas acometidas pela doença e seus familiares (Ministério da Saúde, 2020).

Em 2019, foram reportados à Organização Mundial da Saúde (OMS) 202.185 casos novos da doença no mundo. Desses, 27.863 casos foram notificados no Brasil, uma taxa de detecção de novos casos de 13,68 para cada 100 mil habitantes (WHO, 2020). A distribuição dos casos da doença no Brasil é bastante heterogênea. Na figura 3 é possível verificar a taxa de detecção de novos casos de acordo com os estados e suas respectivas capitais. As regiões Sul e Sudeste têm as menores taxas de detecção, enquanto o Centro-Oeste e o Nordeste são as regiões mais afetadas. Essas regiões passaram a apresentar reduções robustas nas taxas de detecção com a descentralização do atendimento e tratamento, assim como a política de saúde pública que se tornou mais vigorosa a partir dos anos 2000 (Penna *et al.*, 2013).

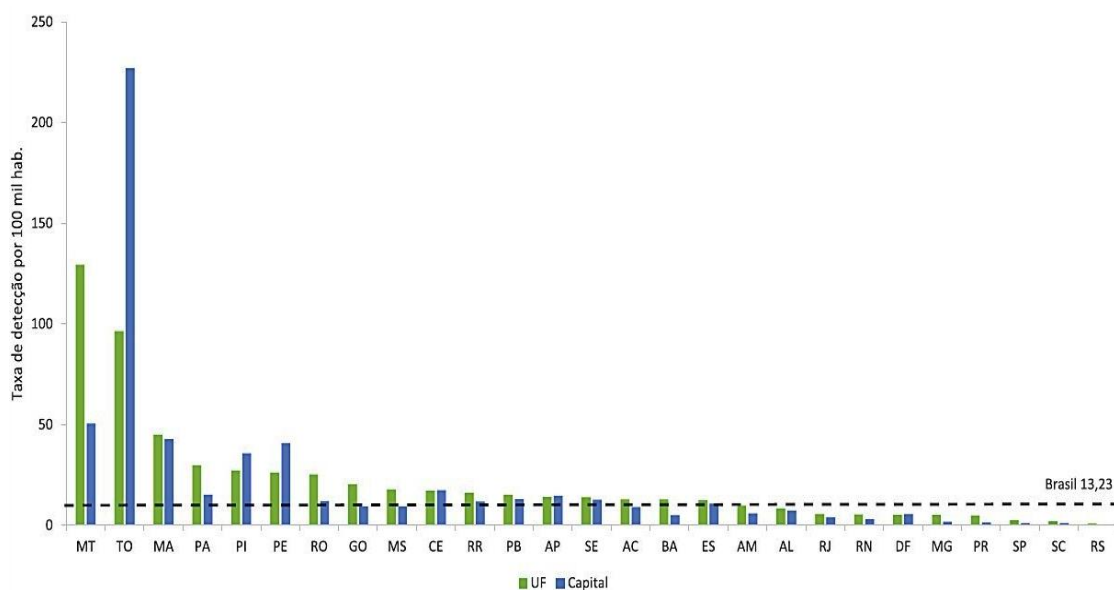


Figura 3 - Taxa de detecção de novos casos de Hanseníase em função da unidade de federação e capital de residência no ano de 2019. Número de casos novos por 100 mil habitantes. Fonte: Brasil,2021 (Sinan/SVS-MS).

Desde 2014, nota-se uma predominância da doença no sexo masculino no Brasil. Um total de 55,2% dos novos casos a partir desse ano foram detectados em indivíduos deste gênero. Além disso, as maiores taxas de detecção da Hanseníase em homens ocorreram nos idosos, sobretudo na faixa etária de 70 a 79 anos, perfazendo 60,7% dos casos (Ministério da Saúde, 2020).

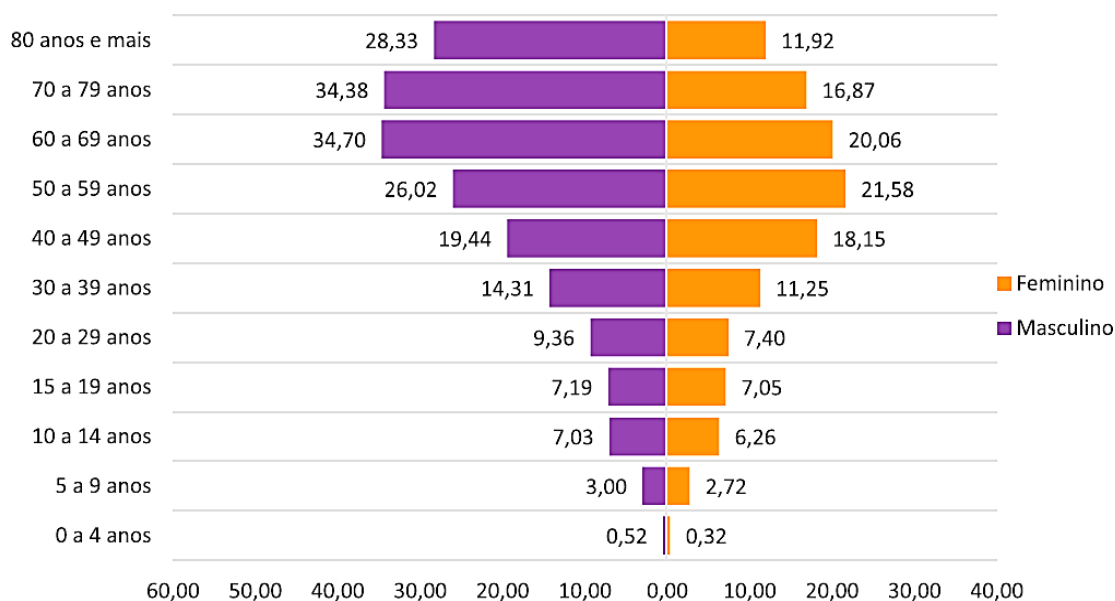


Figura 4 - Detecção de novos casos de Hanseníase no Brasil em 2019. Novos casos por 100 mil habitantes segundo o sexo e faixa etária. Fonte: Brasil, 2021 (Sinan/SVS-MS).

Assim como outros países em desenvolvimento, o Brasil passou por um processo de transição demográfica resultante de uma redução das taxas de mortalidade e fertilidade, e aumento da expectativa de vida, com ampliação da população acima dos sessenta anos (IBGE, 2015). Desde então, tanto a OMS quanto o Ministério da Saúde revelaram preocupação com a ocorrência da hanseníase em idosos, tendo em vista a menor competência imunológica, que está relacionada à imunosenescência, e ao potencial incapacitante da doença (WHO, 2019; Brasil, 2021).

Um elegante estudo brasileiro demonstrou que há uma associação significativa entre os casos MB e idade acima de 59 de anos em todas as áreas do país (Nobre *et al.*, 2017). Da mesma forma, estudos epidemiológicos brasileiros mostraram a alta suscetibilidade de homens idosos pardos e negros, com baixo nível de escolaridade, a desenvolver a Hanseníase MB e apresentar algum grau de incapacidade física já no momento do diagnóstico (Nobre *et al.*, 2017; Amorim de Souza *et al.*, 2018; Matos *et al.*, 2019). Os estudos divergem em relação à possível explicação para a referida suscetibilidade masculina. Enquanto uns se referem ao fato de o homem demorar mais a procurar ajuda médica e de se expor mais aos agentes infecciosos, o chamado comportamento de risco (Moore & Wilson, 2002; Zuk & McKean, 1996), outros mostram que existem diferenças fisiológicas, especialmente em relação aos hormônios sexuais, que influenciam na progressão da infecção (Guerra-Silveira & Abad-Franch, 2013).

Os vertebrados machos sexualmente maduros são frequentemente mais suscetíveis às infecções, pois a testosterona está associada a uma redução da resposta imune do tipo T_H1. Enquanto as mulheres produzem respostas imunológicas humorais e celulares mais equilibradas, são mais resistentes a certas infecções, como as bacterianas e sofrem maior incidência de doenças autoimunes em comparação aos homens (Klein, 2004; Bouman *et al.*, 2005).

1.3 - Agente etiológico e mecanismos de transmissão

O *Mycobacterium leprae* é uma bactéria intracelular obrigatória que apresenta tropismo por células de Schwann, macrófagos e o endotélio vascular. Apresenta-se como um bacilo reto ou levemente curvado, variando de 1 a 8 µm de comprimento e 0,2 a 0,5 µm de diâmetro. O bacilo não é móvel, não forma esporos, divide-se por bipartição e o tempo de geração varia, em média, de 12 a 14 dias, o mais longo já

relatado entre as bactérias. Além disso, a temperatura ideal para o crescimento do *M. leprae* é entre 27 e 33°C, o que explica sua predileção pelas áreas mais frias do corpo, como a pele e os nervos periféricos, onde ele se estabelece e se multiplica (Scollard *et al.*, 2006). A entrada do *M. leprae* no interior dos macrófagos é mediada pelos receptores CR1, CR3 e CR4 do Sistema Complemento, que auxiliam na fagocitose do patógeno. Na ausência de uma resposta imune efetiva, o *M. leprae* prolifera no interior dos macrófagos (Schlesinger & Horwitz, 1991). Nas células de Schwann, a entrada do bacilo é mediada pela proteína de ligação à laminina 21 (LBP21) e pelo glicolípido fenólico 1 (PGL-1) expresso em sua parede celular e ambos se ligam à laminina 2 (LAMA2) expressa na membrana das células de Schwann (Shimoji *et al.*, 1999; Rambukkana, 2001). A colonização destas células pelo bacilo produz alterações patológicas como degeneração axonal e desmielinização, que estão ligadas à perda de sensibilidade característica da doença (Rambukkana, 2004).

Um obstáculo às análises experimentais para o melhor entendimento do seu mecanismo fisiológico reside no fato do bacilo não ser cultivável em meios artificiais, com crescimento restrito a poucos modelos animais. Baixas taxas de crescimento do bacilo podem ser obtidas em patas de camundongos, entretanto, em tatus de nove bandas (*Dasypus novemcinctus*) o crescimento do *M. leprae* é mais acelerado. Nestes animais, a inoculação intravenosa com 10^8 a 10^9 bacilos resulta em um aumento de 10^3 vezes no número inicial em um período de 18 meses, especialmente no fígado e no baço. O fígado de um tatu infectado concentra cerca de 10^9 bacilos/grama de tecido, o que disponibiliza uma quantidade considerável de *M. leprae* para os ensaios laboratoriais, que fazem desses animais os hospedeiros de escolha para a propagação *in vivo* do patógeno (Scollard *et al.*, 2006).

Para prosperar como organismo intracelular obrigatório, patógenos bacterianos, como o *M. leprae*, sofreram processos de desintegração e deleções de genes, resultando na redução do seu genoma. Enquanto as bactérias com estágios de vida livre, como a *Escherichia coli*, normalmente codificam 1500 a 6000 proteínas, as bactérias intracelulares obrigatórias codificam apenas de 500 a 1000 proteínas. Essa redução do genoma implica na limitação das vias metabólicas e maior dependência da célula hospedeira, que, no caso do *M. leprae*, estão envolvidas no metabolismo lipídico e na respiração anaeróbica (Moran, 2002). Mesmo dentre as micobactérias, o *M. leprae* possui um genoma bastante reduzido, a sequência completa do genoma do patógeno (cepa TN – Índia) contém 3.268.203 pares de bases

(pb) e um conteúdo médio G+C de 57,8%. Esses valores são inferiores aos relatados para o genoma do

M. tuberculosis, que compreende 4000 genes, 4.411.532 pb e 65,6% de conteúdo G+C. (Cole *et al.*, 2001).

Outro fato que chama a atenção é que 36,5% do genoma do *M. leprae* é constituído por pseudogenes, o maior conteúdo de pseudogenes descrito até hoje entre bactérias ou outros agentes patogênicos (Liu *et al.*, 2004). Até o momento, quatro cepas diferentes de *M. leprae* foram sequenciadas: TN (Índia), Tahi-53 (Tailândia), NHDP63 (EUA) e Br4923 (Brasil). As comparações genômicas mostram que essas cepas têm 99,995% de identidade e parecem derivar de um clone comum (Liu *et al.*, 2004; Singh & Cole, 2011).

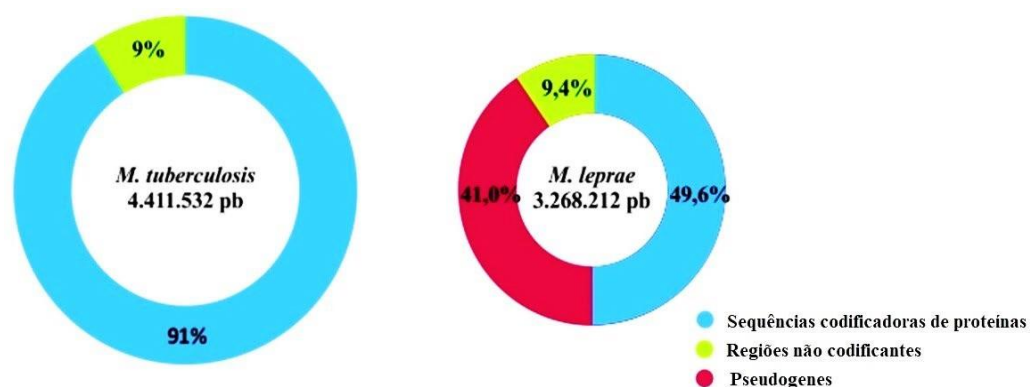


Figura 5 - Comparação do material genético do *Mycobacterium tuberculosis* com o *M. leprae*. Adaptado de Chavarro-Portillo *et al.*, 2019.

O mecanismo de transmissão do *M. leprae* permanece incerto, todavia acredita-se que ocorra através do contato interpessoal por meio das vias aéreas superiores, como ocorre na tuberculose (Abraham *et al.*, 1998; Alter *et al.*, 2008). Por mais que o bacilo apresente alta infectividade, isto é, infecta um grande número de pessoas, poucos adoecem. A natureza desta suscetibilidade é modulada pela resposta imune do hospedeiro ao bacilo e pela frequência de contato com pacientes não-tratados. Portanto, a família do paciente com hanseníase tem maior risco de infecção (Fischer *et al.*, 2010; Scollard *et al.*, 2006).

Assim, a OMS preconiza o rastreamento rigoroso dos contatos dos pacientes com Hanseníase para interromper a cadeia de transmissão. Todo contato identificado deve receber informações acerca da doença e ser examinado quanto aos sinais e

sintomas clínicos. Os contatos sintomáticos devem receber a PQT e os assintomáticos devem receber quimioprofilaxia – uma dose única de rifampicina (Dos Santos *et al.*, 2018). Há evidências de que essa profilaxia pós-exposição possa reduzir as taxas de detecção de novos casos e, conseqüentemente, a transmissão da doença. Entretanto, há indícios que essa proteção mediada pela quimioprofilaxia dure apenas por dois anos (Smith *et al.*, 2014). Após um longo follow-up (33 anos) em uma coorte de cerca de 9 mil contatos de pacientes com Hanseníase, Hacker e colaboradores sugeriram que uma série de medidas no rastreamento desses indivíduos, como exames neurodermatológicos e moleculares periódicos, juntamente com a aplicação de duas doses da vacina BCG são medidas importantes de proteção contra a doença (Hacker *et al.*, 2021).

Uma possível transmissão zoonótica da Hanseníase foi verificada em indivíduos das regiões Sul e Sudeste dos Estados Unidos, que tiveram amplo contato com tatus de nove bandas e não tiveram contato com outros humanos infectados. Análises moleculares apontaram que os tatus dessa região estavam infectados com a mesma cepa do *M. leprae* presente nos pacientes, o que reforça a hipótese da transmissão zoonótica (Truman *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2015). Acredita-se ainda que a transmissão entre o tatu e o homem possa ocorrer através de insetos vetores, como *Aedes aegypti*, *Culex fatigans* e *Rhodnius prolixus* (Kirchheimer, 1976; Neumann *et al.*, 2016).

1.4 - Espectro clínico da Hanseníase

1.4.1 – Classificação das formas clínicas

A Hanseníase apresenta-se sob um amplo espectro de formas clínicas, que são definidas de acordo com a resposta imune do hospedeiro ao *M. leprae*. De um modo geral, intensa resposta imune celular e baixa resposta humoral está associada à contenção do bacilo e ao desenvolvimento da forma tuberculoide da doença. Por outro lado, a presença de linfócitos T hiporresponsivos e resposta humoral acentuada está associada à intensa proliferação do patógeno e, conseqüentemente, com a forma lepromatosa (Scollard *et al.*, 2006).

Desde 1930, diversas classificações das formas clínicas da doença foram sugeridas, sempre levando em consideração os dois polos. Clinicamente, o polo

tuberculoide é caracterizado por poucas lesões de pele, frequentemente apenas uma, de superfície elevada, localizada geralmente na face ou nos membros; e o polo lepromatoso, caracterizado por lesões eritematosas múltiplas, de superfície lisa e brilhante, espalhadas por todo o corpo (Lockwood *et al.*, 2007). Em 1953, baseada nos aspectos clínicos citados acima, foi publicada a classificação de Madrid, que incluía, além das formas polares tuberculoide (TT) e lepromatosa (LL), uma forma *borderline* e a forma inicial indeterminada (I), com posterior progressão para um dos polos (Davison *et al.*, 1960).

Em 1966, foi publicada a classificação do espectro clínico em cinco grupos idealizada pelos médicos ingleses Ridley e Jopling. Este modelo é bastante completo, pois une critérios clínicos, patológicos, baciloscópicos e imunológicos, sendo, portanto, o mais usado como modelo para estudos científicos da Hanseníase. A classificação de Ridley e Jopling, além das formas polares - TT e LL, inclui também mais três formas *borderline* entre os polos: *borderline* tuberculoide (BT), *borderline borderline* (BB), e *borderline* lepromatosa (BL) (Ridley & Jopling, 1966). A descrição clínica e histopatológica das formas clínicas definidas por Ridley e Jopling encontra-se na tabela abaixo.

Tabela 1 - Quadro comparativo das formas clínicas da Hanseníase conforme classificação de Ridley e Jopling.

Formas Clínicas	Aspectos Clínicos/ Lesões Cutâneas	Análise Histopatológica da lesão cutânea
TT	Poucas ou uma lesão apenas, com borda elevada e anestésica.	Denso infiltrado de linfócitos e células epitelioides bem formadas ² .
BT	Semelhantes às lesões TT, porém, mais numerosas e apresentam bordas menos evidentes.	Granuloma semelhante ao da forma TT, difere-se de BL devido a presença de numerosas células de Langhans ³ .
BB	Placas eritematosas de formato irregular, com centro geralmente ovalado e hipopigmentado.	Células epitelioides difusas no granuloma e menores que nas formas BT e TT.
BL	Numerosas lesões, distribuição bilateral difusa. As placas tendem a ser muito grandes e anestésicas.	Linfócitos escassos e granuloma rico em histiócitos ⁴ e não em células epitelioides.
LL	Múltiplas lesões, eritematosas e distribuídas lateral e simetricamente. Edema nos membros inferiores e facies leonina ¹ .	Infiltrado inespecífico composto por histiócitos e presença de células espumosas ⁵ .

¹caracterizada pelo aprofundamento das linhas na testa, nariz e orelhas devido ao edema; ²macrófagos ativados, grandes e achatados presentes nos granulomas; ³produzida a partir da fusão de células epitelioides; ⁴macrófago inativo caracterizado por seu formato ovoide em função da retração dos

pseudópodes. ⁵macrófago inativo repleto de bacilos. Adaptado de Ridley & Jopling, 1966.

Além da avaliação clínica e da análise histopatológica da lesão, a classificação de Ridley e Jopling também leva em consideração o chamado teste intradérmico da Lepromina. Este teste fornece uma medida da capacidade de resposta específica do indivíduo frente à injeção intradérmica de antígenos - suspensão de *M. leprae* autoclavado. A análise da resposta é feita entre 3 e 4 semanas após a injeção e é denominada de reação de Mitsuda. A resposta negativa ao teste da lepromina está associada à forma lepromatosa da doença, ou seja, incapacidade de responder ao *M. leprae* e eliminar os bacilos. Um teste positivo, com resposta dérmica maior ou igual a 5mm, está associado à capacidade de desenvolver resposta granulomatosa e possível eliminação do patógeno (Ridley & Jopling, 1966; Scollard *et al.*, 2006).

Outro exame complementar é a baciloscopia do raspado intradérmico. A amostra é coletada em quatro pontos, em ambos os lóbulos auriculares e nos cotovelos. Posteriormente, é feita a coloração dos bacilos pelo Método de Ziehl-Neelsen e a subsequente análise ao microscópio. Em função da quantidade de bacilos verificados nos campos, é feito um cálculo a fim de se obter o índice baciloscópico (IB) do paciente, que se baseia em uma escala logarítmica com variação entre 0 a 6 (Ministério da Saúde, 2010).

Tabela 2 - Resultados característicos do teste de Leprominae Índice Baciloscópico (IB) de cada forma clínica.

Forma clínica	Teste de Lepromina	Índice Bacilar
TT	Positivo	0
BT	Positivo	0 a 2
BB	Negativo	2 a 5
BL	Negativo	4 a 5
LL	Negativo	5 a 6
Indeterminada	positivo ou negativo	0 a 1

Adaptado de Ridley & Jopling, 1966.

Em 2000, visando tornar a classificação da Hanseníase mais simplificada, principalmente em locais de poucos recursos, o Ministério da Saúde adotou critérios que se baseavam no número de lesões de pele, de nervos acometidos e no IB. Eram considerados PB pacientes com menos de 5 lesões, sem acometimento neurológico ou apenas 1 nervo acometido e com IB negativo. Os pacientes MB apresentavam mais

de 5 lesões cutâneas, acometimento de mais de 1 nervo periférico com IB positivo ou negativo. Entretanto, a partir 2002, o Ministério da Saúde passou a adotar uma classificação ainda mais simplificada, especialmente usada nas Unidades Básicas de Saúde, com foco apenas no número de lesões, como já havia sido preconizado em 2000 pela OMS. O exame baciloscópico do raspado intradérmico, sempre que possível, deve ser realizado, sendo que pacientes com IB negativo são classificados como PB e IB positivo como MB, independentemente do número de lesões (MS, 2002).

Além disso, a hanseníase ainda pode ocorrer sob a forma neural pura (NP), sem evidência de lesão cutânea, que foi relatada por autores de países como Índia e Brasil (Jardim *et al.*, 2003; Rao & Suneetha, 2016). As manifestações neurológicas podem preceder, por vários meses, o aparecimento de lesões cutâneas. A queixa inicial de dormência ou formigamento (parestesia) em um trajeto nervoso, pode evoluir com anestesia em determinada área corporal e comprometimento motor (Garbino *et al.*, 2013).

Dependendo da área afetada, as manifestações clínicas variam entre mão em garra, até mal perfurante plantar (Jardim *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2012). O exame histopatológico do nervo periférico acometido gera parâmetros para o estabelecimento de um diagnóstico de certeza, que deve ser analisado em conjunto com dados clínicos, eletroneuromiográficos, laboratoriais e epidemiológicos (Garbino *et al.*, 2013). A forma neural pura é um grave problema de saúde pública, pois mais da metade dos pacientes apresentam GI2 no diagnóstico (Rao & Suneta, 2016).

1.4.2 – Reações Hansênicas

Além da complexa apresentação das formas clínicas da Hanseníase, cerca de 50% dos pacientes apresentam episódios de resposta inflamatória aguda, localizada ou sistêmica, denominados reações, que podem ocorrer antes, durante ou depois da PQT (Nery *et al.*, 1998). Durante as reações, o paciente tem exacerbação súbita do quadro clínico com reativação de lesões antigas e surgimento de lesões novas. Além disso, as reações podem levar a danos permanentes nos nervos, resultando, muitas vezes, em deficiências e deformidades (Scollard *et al.*, 2006). Por isso, o diagnóstico precoce das reações, bem como o manejo terapêutico adequado, contribui para a redução das sequelas geradas por esses episódios (Pocaterra *et al.*, 2006). Ainda não

está claro o que desencadeia as reações, porém, situações que interferem diretamente na homeostasia do sistema imunológico, dentre elas vacinação, quimioterapia e gravidez, são fatores facilitadores desses episódios (Meyerson, 1996). As reações apresentam-se de duas formas: a reação do tipo 1, ou reação reversa (RR), que afeta os pacientes das formas borderline (BT, BB, BL), e é caracterizada por uma inflamação mais localizada. E a reação do tipo 2 ou Eritema Nodoso Hansênico (ENH), que ocorre em cerca de 50% dos pacientes LL e de 5 a 10% dos pacientes BL; este tipo de reação tem efeitos mais sistêmicos (Walker *et al.*, 2015).

Durante a RR, ocorre aumento do processo inflamatório em lesões cutâneas prévias, e, certas vezes, surgimento de lesões novas. Foi descrito aumento na frequência de macrófagos, células epitelioides e células dendríticas nas lesões cutâneas (Andrade *et al.*, 2015). No sangue, o aumento da frequência de linfócitos T efetores produtores de IFN- γ , sugere que a resposta do tipo T_H1 seja chave na abertura da RR (Dos Santos *et al.*, 2016).

Clinicamente, os pacientes com ENH apresentam nódulos eritematosos dolorosos e desenvolvem febre, linfadenopatia, neuropatia, mal-estar geral e falta de apetite (Meyerson, 1996). Intenso infiltrado inflamatório constituído especialmente por neutrófilos e linfócitos foi observado nas lesões cutâneas, também já foi descrita a deposição de imunocomplexos neste episódio reacional (Kahawita & Lockwood, 2008). Diversos trabalhos mostraram que o TNF é a citocina chave na abertura do ENH, no qual foi observado não somente o aumento dos níveis séricos, mas também da expressão gênica dessa citocina em sua abertura (Sarno *et al.*, 1991; Moraes *et al.*, 1999; Bath *et al.*, 2020). Além disso, há também aumento da frequência de linfócitos T CD8⁺ de memória efetora produtores de TNF na patogênese do ENH (Silva *et al.*, 2019).

1.5 – Mecanismos da resposta imune na Hanseníase

A função do sistema imunológico está atrelada à resposta contra micro-organismos infecciosos, embora até mesmo partículas não infecciosas também possam gerar resposta imune. Essa resposta contra os agentes infecciosos é mediada por reações iniciais da resposta inata, que incluem células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, entre outras células. A resposta inata é geneticamente programada para detectar características invariantes dos agentes patogênicos, estruturas conhecidas como PAMPs, padrões moleculares associados a patógenos, porém, os PAMPs não

são exclusivos de patógenos (Iwasaki & Medzhitov, 2010). Em contraste, a resposta adaptativa, constituída pelos linfócitos T e B, utiliza receptores de antígeno que não são codificados na linhagem germinativa e assim, são altamente específicos (Iwasaki & Medzhitov, 2015). Após a ativação, mediada pelo receptor de células T (TCR), as células T CD4 *naïve* podem se diferenciar em várias subpopulações, como: T_{H1}, T_{H2}, T_{H9}, T_{H17} e T_{reg}, que participam de diferentes tipos de respostas imunes, em função da natureza do patógeno. Além disso, diferentes citocinas e fatores de transcrição são fundamentais para determinar a linhagem para a qual os linfócitos T CD4 *naïve* se diferenciarão (Zhu & Paul, 2010).

A resposta inata é crítica na definição do curso da infecção pelo *M. leprae*. Os bacilos são reconhecidos por vários receptores imunes inatos, incluindo receptores semelhantes a Toll (TLR). O bacilo é reconhecido predominantemente pelo heterodímero TLR2/1 expresso na membrana de macrófagos. Esse reconhecimento leva à ativação de vias celulares para iniciar a morte do *M. leprae*, como já citado acima e demonstrado por Krutzik e colaboradores (Krutzik *et al.*, 2003). Os autores mostraram que TLR1 e TLR2 são mais expressos em lesões da forma TT em comparação com lesões da forma LL (Krutzik *et al.*, 2003). Além dos macrófagos, já foi mostrado que as células de Schwann também podem expressar TLR2 e sua ativação contribui para o dano neurológico na Hanseníase (Oliveira *et al.*, 2003).

Já nos pacientes LL a alta produção de IL-4 reduz a expressão de TLR2/1 e inibe a síntese de citocinas induzida pelo reconhecimento do patógeno mediado por TLR2/1, fazendo com que os macrófagos, além de não desempenharem função microbicida, também secretem citocinas que estão ligadas à resposta do tipo T_{H2}, que não é efetiva para patógenos intracelulares, como o *M. leprae* (Krutzik *et al.*, 2003). Montoya e colaboradores demonstraram que nos pacientes TT, o IFN- γ produzido é capaz de ativar a ação microbicida dos macrófagos, e, num mecanismo dependente do receptor de vitamina D, sintetizar citocinas associadas ao recrutamento da resposta do perfil T_{H1}, essencial para a eliminação de patógenos intracelulares, além de peptídeos que ativam a ação microbicida dessas células, como a catelicidina (Montoya *et al.*, 2009). Essa dicotomização da ação dos macrófagos está ligada à determinação das formas clínicas da doença, já tendo sido demonstrada uma predisposição genética para tal (Gaschignard *et al.*, 2016).

Estudo em modelo experimental, demonstrou que a Galectina-3 aumenta a secreção de IL-10 em monócitos, além de diminuir a diferenciação de monócitos para

células dendríticas e, posteriormente, realizar a apresentação de antígenos aos linfócitos T (Chung *et al.*, 2013). A alta expressão de Galectina-3 em macrófagos encontrados em lesões de pele de pacientes LL foi demonstrada por análises imunohistoquímicas. Entretanto, a expressão dessa molécula é quase indetectável em lesões TT. Assim, o aumento da Galectina-3 nos macrófagos do infiltrado inflamatório em lesão cutânea de pacientes LL também contribui para a redução da ativação dos linfócitos T (Chung *et al.*, 2013; Pinheiro *et al.*, 2018).

Em relação às células dendríticas, diferentes estudos já mostraram que há maior expressão das moléculas que caracterizam essas células, tanto na derme quanto na epiderme em lesões de pacientes TT, quando comparadas aos pacientes LL (Hirai *et al.*, 2016). Essas células são CD1⁺ e exercem uma função importante na apresentação de antígenos lipídicos/glicolipídicos não proteicos aos linfócitos T, desempenhando importante papel na ativação da resposta adaptativa na Hanseníase (Sieling *et al.*, 1999). Não obstante, os monócitos de pacientes LL não se diferenciam em CD1⁺, isto é, desempenham função de apresentação de antígenos, após a ativação do TLR (Krutzik *et al.*, 2005).

A determinação das formas clínicas da Hanseníase foi atribuída à polarização da resposta mediada pelos linfócitos T_{H1} e T_{H2} (Fonseca *et al.*, 2017). Tradicionalmente, a resposta imune de pacientes TT é caracterizada por citocinas do perfil T_{H1}, como IL-2, IL-12 e IFN- γ , que garantem resposta imune mediada por células contra os antígenos derivados do patógeno, além da contenção dos bacilos em granulomas (Modlin, 2002; Fonseca *et al.*, 2017). Nas lesões cutâneas desses pacientes, os macrófagos encontram-se ativados, e nos granulomas são identificadas células epitelioides, sendo os linfócitos T CD4⁺ o tipo celular predominante (Bahia *et al.*, 2017). Há pouca evidência de imunidade humoral específica para o *M. leprae* na doença tuberculoide (Cho *et al.*, 2001).

Ao contrário, a resposta imune dos pacientes LL é caracterizada predominantemente pelo perfil T_{H2}, com produção de IL-4 e IL-10, e consequente ativação de linfócitos T_{reg}, produção de anticorpos anti-*M. leprae*, que, entretanto, falham em restringir o crescimento do bacilo (Cho *et al.*, 2001; Sadhu & Mitra, 2018). Comparadas ao polo TT, as lesões de pacientes LL são relativamente deficientes em linfócitos T CD4⁺, e possuem numerosos macrófagos infectados com bacilos que desenvolvem uma aparência espumosa característica (Salgame *et al.*, 1992). Além disso, há uma frequência maior de linfócitos T_{reg} e maior expressão de IL-10 e CTLA-

4 nessas lesões (Palermo *et al.*, 2012).

Outras subpopulações celulares, menos numerosas, também desempenham papel importante na patogênese da Hanseníase. Os linfócitos T_H17 secretam diversas citocinas associadas à ampliação da resposta inflamatória, sobretudo a IL-17, que induz reações inflamatórias ricas em neutrófilos, por meio do aumento da secreção de quimiocinas e TNF, além de aumentar a síntese de defensinas, importantes peptídeos antimicrobianos (Kuwabara *et al.*, 2017). Já foi demonstrado que pacientes TT/BT possuem maiores frequências sanguíneas de linfócitos T_H17 do que pacientes BL/LL. Além disso, dentre esses pacientes, maior resposta T_H17 está relacionada a menor produção de IL-10. Os autores sugerem que a ação conjunta de IL-10 e TGF- β inibe a diferenciação para o perfil T_H17, o que contribui para reduzida produção de IFN- γ em pacientes BL/LL (Sadhu *et al.*, 2016).

Uma outra subpopulação celular menos numerosa, que parece exercer importante influência na patogênese da Hanseníase, são os linfócitos T $\gamma\delta$. Diferente dos linfócitos T $\alpha\beta$, essas células dispensam o reconhecimento de antígenos proteicos apresentados via MHC para sua ativação. Assim, os linfócitos T $\gamma\delta$ são importantes no reconhecimento de lipídios da parede celular do *M. leprae* e podem secretar citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e IL-17 (Saini *et al.*, 2018). Diversos estudos já demonstraram importante participação dessa subpopulação na abertura das reações hansênicas, tendo em vista que a frequência de linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IL-17 e IFN- γ está aumentada nestes episódios (Verhagen *et al.*, 1997; Esquenazi *et al.*, 2008; Saini *et al.*, 2018).

Em relação aos linfócitos T_{reg}, já foi demonstrado que o bloqueio da ativação dessas células é capaz de restaurar a resposta T_H17 em pacientes MB (Sadhu *et al.*, 2016). Os linfócitos T_{reg}, encontram-se em maior frequência nas lesões de pele de pacientes MB, atuam restringindo a resposta imune mediada por células e contribuem para a sobrevivência e multiplicação descontrolada do *M. leprae*. Essas células desempenham um papel patogênico na doença MB, com função supressora, caracterizadas pela alta expressão de CD25 (receptor de IL-2) e FOXP3, além de secretarem citocinas como IL-10 e TGF- β (Palermo *et al.*, 2012).

Como revisto por Sakaguki e colaboradores, os mecanismos de supressão dos linfócitos T_{reg} são bastante diversos e envolvem, por exemplo, a expressão de CTLA-4, que interage com o CD80/86 reduzindo sua ativação e capacidade de proliferação.

Além disso, a secreção de TGF- β e IL-10 induzem perfil supressor em linfócitos T convencionais, pelo aumento da expressão de FOXP3, além de inibirem a síntese de IFN- γ e a diferenciação para o perfil Th1. Por fim, a alta expressão de CD25 na membrana dos linfócitos T_{reg}, privam linfócitos T convencionais de IL-2, o que compromete a capacidade proliferativa dessas células (Sakaguchi *et al.*, 2010).

Outra via de supressão da resposta imune bastante descrita nas infecções crônicas é a PD-1/PDL-1. A interação de PD-1 (proteína de morte celular programada 1) e seus ligantes, PD-L1 ou PD-L2, pode inibir as funções efetoras, como proliferação, produção de citocinas e sobrevivência dos linfócitos T convencionais. A expressão de PD-1 pode ocorrer, após estímulo, em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, células NKT, linfócitos B, monócitos e células dendríticas, enquanto em linfócitos T_{reg} sua expressão é constitutiva (Francisco *et al.*, 2010). Um estudo recente mostrou expressão elevada de PD-1 em linfócitos T, células NKT, T_{reg} e seu ligante PD-L1 em células apresentadoras de antígenos em pacientes BL/LL em comparação com pacientes BT/TT. Os autores mostraram também que o bloqueio da via PD-1/PD-L1 nos pacientes BL/LL promoveu aumento da expressão de IFN- γ nas formas MB (Sadhu *et al.*, 2016). Em outro trabalho, o aumento da produção de IFN- γ após o bloqueio de PD-1 também foi verificado em pacientes com tuberculose pulmonar ativa (Jurado *et al.*, 2008).

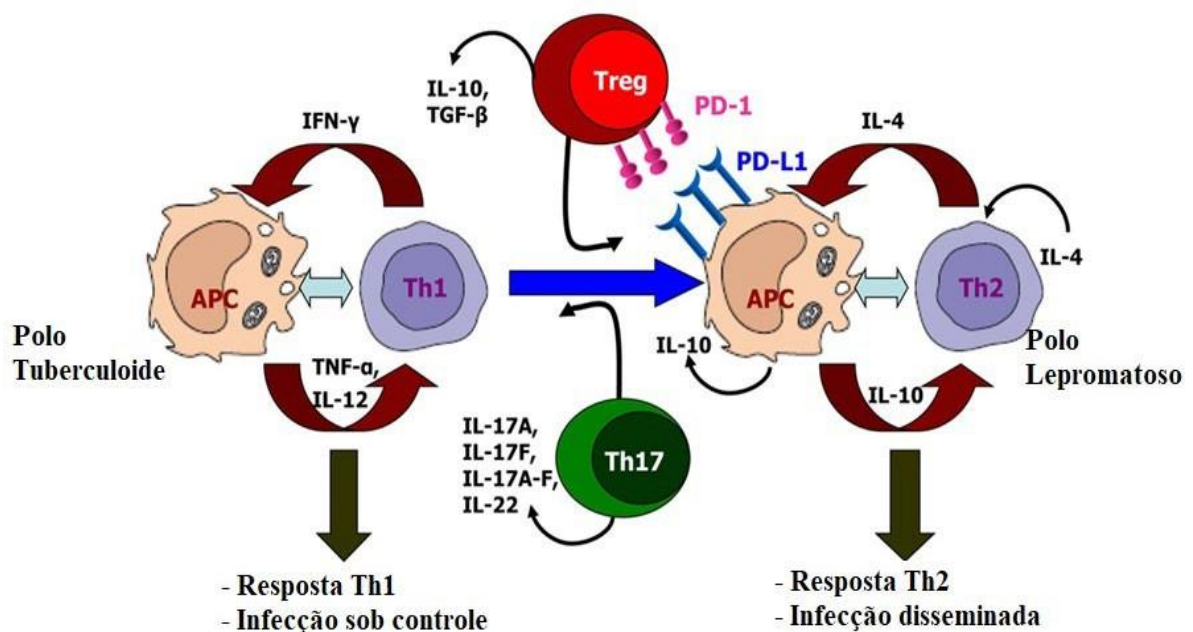


Figura 6 - Perfil da resposta imune do hospedeiro no polo tuberculoide versus lepromatoso na Hanseníase. Células e citocinas envolvidas na resposta imunológica característica dos polos da doença. Adaptado de Sadhu & Mitra, 2018.

1.6 – Suscetibilidade à infecção por *Mycobacterium leprae* e desenvolvimento de Hanseníase

Mesmo após um contato prolongado com pacientes das formas BL/LL da doença, poucos indivíduos realmente vão desenvolver sinais clínicos da Hanseníase. Além disso, tendo em vista muitos casos agregados nas mesmas famílias, passou-se a considerar a possibilidade do envolvimento de fatores genéticos na predisposição à doença e na diferenciação das formas clínicas, observações que foram confirmadas com estudos genéticos. Entre gêmeos monozigóticos, quando um indivíduo apresenta a Hanseníase, a chance de o outro gêmeo adoecer é de 60 a 85%. Entre os gêmeos dizigóticos, a chance é de 15 a 25% (Scollard, 2005; Gaschignard *et al.*, 2013; Sauer *et al.*, 2015).

Assim, a resistência à Hanseníase parece estar ligada a um forte fator genético, principalmente no que diz respeito às variantes genômicas relacionadas à resposta imune. Dentre eles, destacam-se os genes PRKN (anteriormente PARK2), IL10 e LTA, TLR1, SLC11A1 (anteriormente NRAMP1) e VDR (Fava *et al.*, 2019). A parkina, proteína codificada pelo gene PRKN, está associada à produção de IL-6 e CCL2 em macrófagos infectados pelo *M. leprae* (de Léséleuc *et al.*, 2013). Da mesma forma, o VDR (receptor de vitamina D) aumenta a ação microbicida de macrófagos infectados pelo patógeno (Kim *et al.*, 2018).

Alguns polimorfismos no gene que codifica a IL-10 foram associados à suscetibilidade à doença, sendo que essa citocina é produzida essencialmente por linfócitos e monócitos, e tem como função reduzir a inflamação e a secreção de anticorpos (Cyktor & Turner, 2011). A alta produção de IL-10 compromete a ação microbicida de macrófagos e permite a proliferação *M. leprae* no interior dessas células (Moura *et al.*, 2012). Outra citocina, com efeito proinflamatório, que foi associada à suscetibilidade à Hanseníase é a linfotóxina-alfa (LT- α) (Alcaïs *et al.*, 2007). A baixa produção da LT- α compromete a resposta granulomatosa, e, portanto, facilita a progressão da Hanseníase. Junto com o TNF, a LT- α é essencial para indução da secreção de outras citocinas e quimiocinas relacionadas à estabilização do granuloma (Hagge *et al.*, 2009). Certos polimorfismos no gene do TNF foram associados à forma tuberculoide da doença (Santos *et al.*, 2002). Além disso, variações no gene do TNF também foram associadas ao desenvolvimento da RR (Fava *et al.*, 2017). Além do TNF, polimorfismos no gene do TLR2 também foram

associados à ocorrência da RR (Bochud *et al.*, 2008).

O reconhecimento de lipoproteínas micobacterianas também é realizado pelo TLR1, além do TLR2. Após este reconhecimento, TLR1 e 2 ativam a via de sinalização de NF- κ B, que induz a síntese de citocinas que ativam a imunidade adaptativa (Thoma-Uszynski *et al.*, 2001). Estudos em diferentes regiões do planeta também demonstraram que polimorfismos no gene do TLR1 estão associados com o aumento da suscetibilidade à Hanseníase *per se* (Marques *et al.*, 2013). Outra proteína também bastante expressa em macrófagos que está associada à suscetibilidade à Hanseníase é a SLC11A1, denominada anteriormente como NRAMP1 (proteína de macrófago associada à resistência natural). Essa proteína regula várias funções nos macrófagos, entre elas a capacidade de privar patógenos fagocitados de certos metais, como ferro e manganês. Além disso, regula a síntese de óxido nítrico, que também está ligado à morte de patógenos (Wessling-Resnick *et al.*, 2015). Não só em relação à Hanseníase, polimorfismos no gene que codifica a SLC11A1 também estão envolvidos na suscetibilidade à tuberculose (Abel *et al.*, 1998).

Ainda em relação aos macrófagos, polimorfismos no éxon 7 do gene MRC1, que codifica o receptor de manose (CD206) expresso nessas células, foram ligados à suscetibilidade à Hanseníase (Alter *et al.*, 2010). Evidências indicam que o receptor de manose participa da identificação e fagocitose de micobactérias por macrófagos (Kang *et al.*, 2005). Portanto, o mal funcionamento desse receptor poderia comprometer a identificação e eliminação do *M. leprae*.

Em relação à imunidade adaptativa, recente estudo envolvendo pacientes brasileiros mostrou que polimorfismos relacionados aos genes que codificam CD25 e TGF- β estão associados com o espectro clínico da doença, respectivamente para o risco de desenvolver as formas PB e MB (Camargo *et al.*, 2018). Os linfócitos T_{reg} utilizam o CD25 para captar a IL-2, privando os linfócitos T efetores desta citocina, o que impede a proliferação deles. Já o TGF- β tem ação anti-inflamatória, ao passo que suprime a ativação dos macrófagos (Chinen *et al.*, 2016). De fato, altas concentrações séricas de TGF- β foram encontradas em pacientes MB quando comparados aos pacientes PB. O grupo associou o fenômeno à anergia da Hanseníase lepromatosa (Saini *et al.*, 2014). Outra citocina secretada por linfócitos T que está ligada à suscetibilidade à Hanseníase é o IFN- γ . Um estudo na população brasileira mostrou que o SNP (do inglês single-nucleotide polymorphism) +874T>A no gene que codifica o IFN- γ tem efeito protetor contra a doença (Cardoso *et al.*, 2010). O alelo +874T já foi

associado à proteção de outras doenças infecciosas causadas por patógenos intracelulares, como por exemplo, em células sanguíneas estimuladas com a proteína purificada derivada de *M. tuberculosis* (López-Maderuelo *et al.*, 2003).

Por mais que os aspectos genéticos permaneçam preponderantes para a suscetibilidade à Hanseníase, outras condições têm sido relatadas como fatores de risco, como baixa renda, baixo nível de escolarização e restrição alimentar (Kerr-Pontes *et al.*, 2006; Feenstra *et al.*, 2011). Até mesmo o contato com água não tratada, seja pra banho, lavagem de roupa e/ou louças é um fator de risco, visto que a água pode ser considerada um reservatório do bacilo (Sterne *et al.*, 1995; Kerr-Pontes *et al.*, 2006). Sabe-se que a baixa renda está atrelada não só com dificuldade de acesso e permanência nas unidades escolares, mas também com a qualidade e/ou disponibilidade de alimentos. Entretanto, é difícil precisar a forma com a qual a pobreza afeta a suscetibilidade à doença, sobretudo quando se considera o período entre o contato com o patógeno e o aparecimento dos sinais clínicos, que é longo e variável entre os indivíduos (Van Beers *et al.*, 1999; Kerr-Pontes *et al.*, 2006).

Já é bem aceito que a nutrição inadequada compromete a resposta imune contra agentes patogênicos, como o *M. leprae* (Schaible *et al.*, 2007; Dwivedi *et al.*, 2019). Vários estudos já correlacionaram a deficiência de certas vitaminas e sais minerais com o comprometimento da resposta imune. Por exemplo, a suplementação de vitamina C aumenta a fagocitose e atividade microbicida de macrófagos (Wintergerst *et al.*, 2006). Além disso, a vitamina D induz a síntese de peptídeos em macrófagos infectados como defensinas e catelicidinas, que contribuem para a morte de micobactérias fagocitadas (Rivas-Santiago *et al.*, 2007). Neste contexto, um estudo demonstrou que os níveis de catelicidina são menores em pacientes com Hanseníase que em indivíduos saudáveis (Matzner *et al.*, 2011). Tomados em conjunto, pode-se afirmar que somados aos fatores genéticos, fatores referentes ao ambiente e estilo de vida dos indivíduos influenciam no risco de apresentar sinais e sintomas da Hanseníase *per se*.

1.7 – Estresse Oxidativo

O metabolismo aeróbio possibilita melhor utilização dos nutrientes, ao passo que otimiza o fornecimento de energia por essas moléculas. Entretanto, os organismos aeróbicos precisam lidar com substâncias altamente reativas produzidas

por esse tipo de metabolismo, as quais são conhecidas como espécies reativas de oxigênio (EROs), como o radical superóxido, peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila. As EROs ligam-se com diversas moléculas nas células, como ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas, causando severos danos, cumulativos com o tempo, nas organelas e em outras estruturas celulares. Essa deterioração gradual resulta no declínio das funções celulares e é conhecida como envelhecimento (Lane, 2003).

A maior fonte de EROs na célula é a mitocôndria, que os produz na cadeia transportadora de elétrons (Nohl *et al.*, 2005), momento em que o gás oxigênio recebe elétrons transportados até a membrana interna desta organela pelas moléculas de NADH, essencialmente derivadas do ciclo do ácido cítrico que ocorre na matriz mitocondrial. Já foi demonstrado que mesmo em condições fisiológicas, entre 1 e 5% do gás oxigênio consumido pelas mitocôndrias é transformado em EROs (Trounce *et al.*, 1989). O produto direto da redução do O₂ é o radical ânion superóxido que é convertido pela enzima superóxido dismutase em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Liochev & Fridovich, 2007). Por sua vez o H₂O₂ pode sofrer a chamada Reação de Fenton e ser convertido em radical hidroxila na presença de certos íons metálicos, como o Fe²⁺ (Henle *et al.*, 1996).

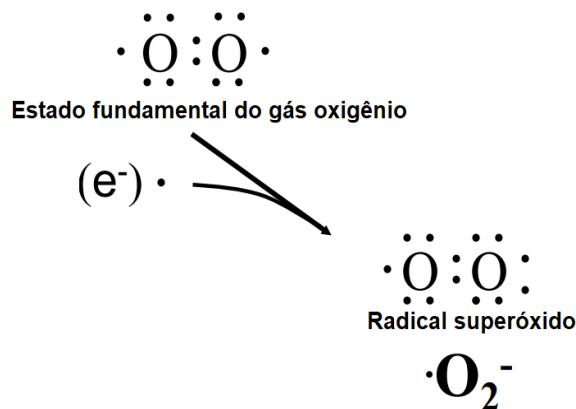


Figura 7 - Síntese do radical ânion superóxido. O radical superóxido pode ser formado pela adição de um elétron a uma molécula de gás oxigênio. Os pontos representam os elétrons (e⁻). Adaptado de Kammeyer & Luiten, 2015.

Normalmente as EROs são produzidas pela cadeia transportadora de elétrons e eliminadas pelos sistemas antioxidantes mitocondriais e citosólicos. Portanto, desde que as células tenham níveis normais de antioxidantes, as EROs produzidas não devem resultar em danos oxidativos significativos aos componentes celulares (St-

Pierre *et al.*, 2002).

O sistema celular antioxidante possui componentes enzimáticos e não enzimáticos, como as vitaminas C e E, o selênio e o β -caroteno. Os antioxidantes enzimáticos de maior importância são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutatona peroxidase (GSHPx) e a glutatona redutase (GR) (Sies, 1997). A enzima SOD apresenta-se sob três isoformas, duas intracelulares – SOD1 (Cu,Zn-SOD) e SOD2 (Mn-SOD) - e uma extracelular – SOD3 (Cu, Zn-SOD). Essas isoformas catalisam a conversão do radical superóxido em peróxido de hidrogênio (Fridovich, 1997; Perry *et al.*, 2010). As enzimas do ciclo redutor da glutatona, além de catalisarem as reações de decomposição do peróxido de hidrogênio, também realizam a decomposição de lipídios peroxidados. A enzima glutatona peroxidase (GPX) reduz o peróxido de hidrogênio em água e os elétrons necessários para essa redução são derivados da glutatona reduzida (GSH), que passa ao seu estado oxidado. Por fim, a glutatona oxidada (GSSH) volta a sua forma reduzida pela ação da enzima glutatona redutase (GR), que obtém elétrons a partir da oxidação do NADPH em NADP⁺ (Kinnula, 2005; Jones, 2006).

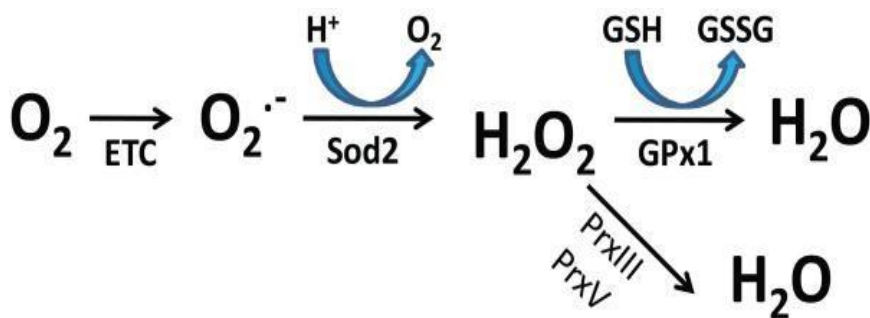


Figura 8 - Neutralização do ânion superóxido produzido na cadeia transportadora de elétrons (ETC). O superóxido é convertido em peróxido de hidrogênio pela enzima superóxido dismutase (SOD2). O peróxido de hidrogênio é então convertido em água pela enzima glutatona peroxidase ou pela enzima peroxirredoxina (Prx). Adaptado de Alexeyev, 2009.

Outra fonte de EROs nas células são as enzimas da família NADPH oxidase (Nox). Essas enzimas transferem elétrons derivados do NADPH ao oxigênio, dando origem ao radical superóxido. Todas as enzimas desta família são proteínas transmembranas que transportam elétrons entre as membranas biológicas, configurando assim seu papel biológico na geração de EROs (Bedard *et al.*, 2007).

Enzimas da família NADPH oxidase são expressas em células fagocitárias, a principal defesa contra a infecção microbiana como revisto por Bedard e Krause (Bedard and Krause, 2007). Os macrófagos infectados aumentam o consumo de oxigênio, associado à produção de EROs, como os radicais ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. Entretanto, essas EROs, além de matar as bactérias, também danificam os tecidos hospedeiros (Yu, 1994).

1.7.1 - Estresse oxidativo e envelhecimento

Como já abordado, grande parte do declínio das funções fisiológicas durante o envelhecimento está ligado ao desbalanço entre a produção de EROs e o sistema antioxidante (López-Otín *et al.*, 2013). Uma fração importante deste declínio é provocada pela perda da integridade celular devido à peroxidação de lipídios de membrana, que causa alterações na sua fluidez, permeabilidade, transporte de íons e supressão de processos metabólicos (Nigam & Schewe, 2000). Não só a perda da função biológica das membranas, mas também a peroxidação desses lipídios leva à formação de aldeídos tóxicos que amplificam o dano mediado pelo estresse oxidativo. Entre esses aldeídos, destacam-se o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxi-2,3-nonenal (4-HNE). Ao contrário dos radicais livres, os aldeídos são relativamente estáveis e, portanto, capazes de se difundir dentro ou fora da célula e atacar alvos distantes do local dos eventos iniciados pelas EROs (Meagher & FitzGerald, 2000). O 4-HNE pode gerar uma inflamação basal persistente por meio da ativação de NF-KB (Meyer *et al.*, 1994).

Outra parte dos efeitos negativos da ação das EROs está associado a oxidação de aminoácidos, uma modificação pós-traducional irreversível e irreparável que gera as chamadas proteínas carboniladas. Essas proteínas modificadas se acumulam durante a vida de todos os organismos e têm maior impacto durante o envelhecimento (Cai & Yan, 2013). Existem dois mecanismos de carbonilação de proteínas, um primário e um secundário. O mecanismo primário envolve a oxidação catalisada por metais de cadeias laterais de aminoácidos, especialmente prolina, arginina, lisina e treonina. Já os mecanismos secundários envolvem mecanismos de carbonilação, nos quais lipídios peroxidados, como 4-HNE e o malondialdeído, promovem a oxidação dos aminoácidos, especialmente lisina, cisteína e histidina (Adams *et al.*, 2001). Embora as proteínas carboniladas possam ser degradadas pelo sistema

proteassomal, elas também têm a capacidade de evitar a degradação e criar agregados citotóxicos (Pickering & Davies, 2012). Muitos estudos destacaram a relação entre um aumento do conteúdo de proteínas carboniladas e vários distúrbios relacionados ao envelhecimento, como diabetes, Mal de Parkinson, doença de Alzheimer, doença de Huntington, esclerose lateral amiotrófica, câncer e síndrome de Werner (Rudzińska *et al.*, 2020).

A exposição à radiação ultravioleta solar (UV) moderada gera benefícios, como a produção cutânea de vitamina D e os efeitos cardioprotetores por meio da síntese de óxido nítrico. Entretanto, é uma fonte extrínseca de EROs, que se destaca no envelhecimento devido ao seu efeito cumulativo durante a vida. Em trabalho de revisão de Watson e colaboradores, após a absorção de fótons derivados da radiação UV, as moléculas passam para um estado energético excitado que vai gerar uma reação subsequente, que consiste na transferência de elétrons ou transferência de energia para outras moléculas, e tem como efeito a produção de EROs (Watson *et al.*, 2014).

As EROs geradas na pele pela ação da radiação UV podem oxidar aminoácidos de proteínas estruturais, como o colágeno e a elastina, as quais se formam proteínas carboniladas. Essas proteínas modificadas comprometem a função mecanoprotetora da pele, podendo provocar flacidez, ressecamento, perda de elasticidade e textura áspera (Kammeyer & Luiten, 2015). Além disso, as EROs são capazes de aumentar a síntese e ativação das metaloproteinases, que promovem a degradação da matriz extracelular e das membranas basais (Sbardella *et al.*, 2012).

Por fim, o estresse oxidativo pode agravar, de outra forma, o envelhecimento, ao passo que acelera a involução tímica. Trabalhos recentes utilizando modelos experimentais mostraram que o uso de substâncias antioxidantes desacelera a involução tímica, enquanto o aumento na produção de EROs acelera este fenômeno (Singh *et al.*, 2013; Uchio *et al.*, 2015). As células epiteliais tímicas são deficientes na síntese de catalase, portanto, são mais sensíveis às EROs, visto que contam com menos uma enzima no seu sistema antioxidante (Griffith *et al.*, 2015). Portanto, o acúmulo de peróxido de hidrogênio, em função da deficiência de catalase, acelera o processo de senescência das células epiteliais tímicas e reduz a produção de linfócitos T *naïve* pelo timo, o que compromete a capacidade do indivíduo responder a novos antígenos (Barbouti *et al.*, 2020).

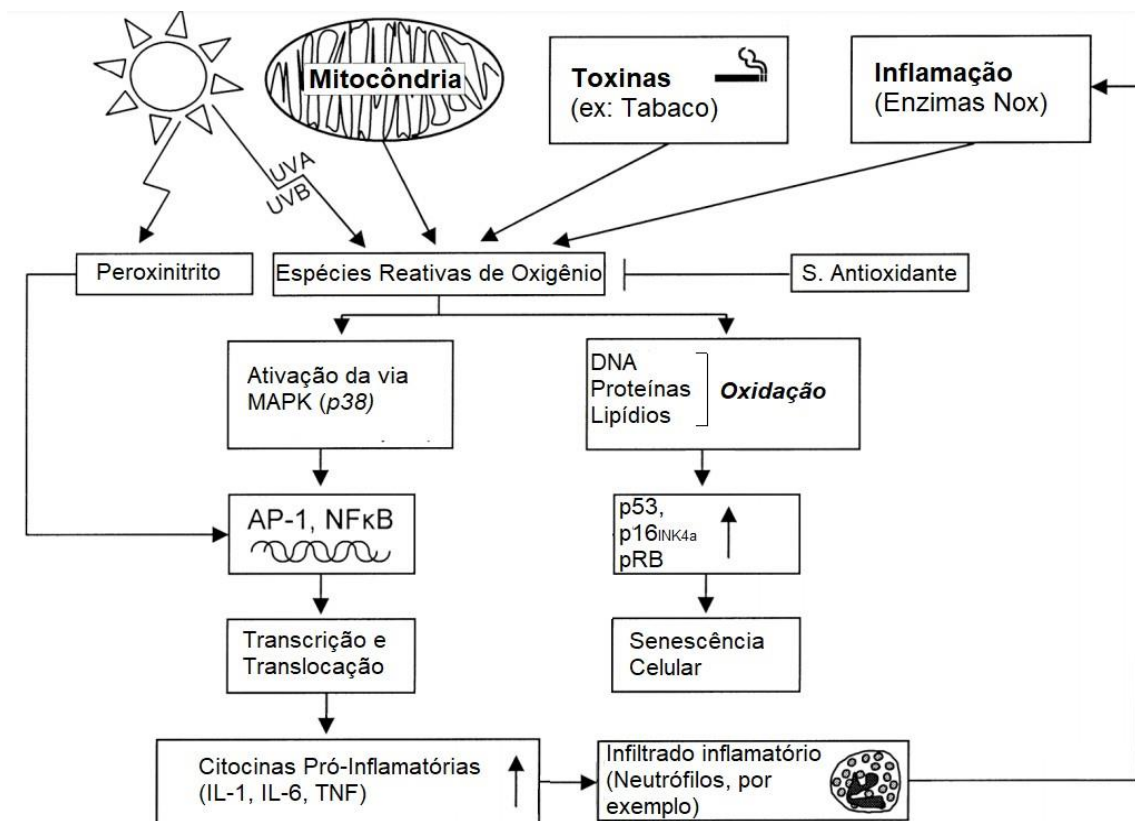


Figura 9 - Fatores extrínsecos e intrínsecos ligados à produção de EROs e algumas consequências ao organismo. EROs são produzidas pelas mitocôndrias e fatores extrínsecos, como radiação ultravioleta e fumaça de tabaco. Além de oxidarem biomoléculas, os EROs também induzem a via MAPK, promovendo a liberação de citocinas pró-inflamatórias que ativam ainda mais a produção de EROs. Adaptado de Kammeyer & Luiten, 2015.

1.7.2 – Estresse oxidativo na Hanseníase

A maior parte dos estudos acerca do estresse oxidativo na hanseníase gira em torno da influência do tratamento, seja a PQT ou o tratamento para as reações, na produção de EROs e enzimas antioxidantes. Pouco se sabe em relação ao estresse oxidativo na patogênese ou sua influência na suscetibilidade à doença.

Considerando que a dapsona causa um desbalanço entre a produção de EROs e a síntese de agentes antioxidantes, um estudo mostrou que há um aumento progressivo na síntese de enzimas antioxidantes, como catalase e GSH, em resposta ao aumento do estresse oxidativo durante a PQT. Entretanto, não foi verificada mudanças nos níveis de peroxidação lipídica entre os pacientes antes do tratamento nem após o início da terapêutica (Schalcher *et al.*, 2014). Outro grupo mostrou que quando a PQT está associada ao tratamento da reação tipo 1, realizada com anti-

inflamatórios esteroides e não esteroides por 4 semanas, há aumento do estresse oxidativo, especificamente da peroxidação lipídica, juntamente com a redução da produção de GSH (Chhabra *et al.*, 2015).

Em relação às formas clínicas da doença, foi mostrado que pacientes MB apresentam aumento da peroxidação lipídica e redução da expressão da superóxido dismutase quando comparados aos voluntários sadios e aos casos PB. Os autores sugerem que haja uma estreita relação entre a carga bacilar e o estresse oxidativo (Swathi & Tagore, 2015).

Além das EROs, as espécies reativas de nitrogênio, como o peroxinitrito, estão também associadas a eliminação do bacilo e ao dano tecidual, incluindo os nervos. Já foi demonstrado que a concentração de óxido nítrico no soro dos pacientes com Hanseníase é superior ao de indivíduos saudáveis (Schalcher *et al.*, 2013). Outro trabalho mostrou o aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em células da lesão de pele de pacientes *borderline* (Schön *et al.*, 2001).

Levando em consideração o aumento do estresse oxidativo que está relacionado ao tratamento da hanseníase *per se*, uma revisão sobre o tema abordou que a maior ingestão de alimentos que contenham nutrientes com ação antioxidante pode contrabalancear os efeitos do estresse oxidativo, e contribuir para melhor prognóstico e tratamento da doença. Dentre esses nutrientes com ação antioxidante estão o selênio, e as vitaminas A, C, D e E (Passos Vázquez *et al.*, 2014).

1.8 – Imunosenescência

Durante o envelhecimento, diversas alterações ocorrem no sistema imunológico que provocam um declínio da sua funcionalidade, fato evidenciado pelo aumento da frequência de doenças degenerativas, cardiovasculares, infecciosas, autoimunes e cânceres nessa faixa etária. Este declínio está ligado às alterações nas diferentes subpopulações celulares do sistema imunológico, sobretudo nos linfócitos T, e ao meio no qual essas células estão inseridas. Variações na proporção e na atividade funcional dessas células são as mudanças que causam o referido declínio (Makinodan, 1980; Pawelec, 2017).

Um dos mais conhecidos marcadores da Imunosenescência, é o acúmulo de linfócitos T CD8⁺ de memória juntamente com uma frequência muito baixa de linfócitos T CD8⁺ *naïve* (Pawelec, 2017). Diversos estudos mostraram que essa modulação nas

subpopulações de linfócitos T CD8⁺ está associada à infecção pelo citomegalovírus (CMV), mesmo que assintomática (Derhovanessian *et al.*, 2011; Strindhall *et al.*, 2017). O CMV é um vírus herpes persistente presente em cerca de 60 a 90% da população adulta, e normalmente é assintomático em hospedeiros imunocompetentes (Hengel *et al.*, 1998). Não está esclarecido se é somente um efeito da idade ou se é devido ao vírus que ocorre este aumento na frequência de célula T de memória, já tendo sido proposto que haja uma ação sinérgica entre esses dois fatores (Sansoni *et al.*, 2014).

Além disso, como revisto por Pawelec e colaboradores, os idosos apresentam reduzida expressão do receptor CD28, que tem efeito coestimulador na ativação dos linfócitos T, prejudicando a proliferação dessas células e impactando negativamente na resposta vacinal, mesmo aos antígenos já conhecidos (Pawelec *et al.*, 2001; Larbi & Fulop, 2014).

O grupo de Teteloshvili e colaboradores considera que as células CD8⁺CD28⁻ sejam um marcador da imunossenescência (Teteloshvili *et al.*, 2018). De fato, à medida que envelhecemos, a proporção das células com esse fenótipo torna-se cada vez maior, elas não só são hiporespondedoras, como também podem exibir atividade supressora (Liu *et al.*, 1998). Evidências indicam que as células CD8⁺CD28⁻ podem impedir a ativação e proliferação de linfócitos T, além de induzirem apoptose nessas células *in vitro* (Chen *et al.*, 2018). Seus mecanismos imunossupressores são diversos, incluindo secreção de citocinas anti-inflamatórias e expressão aumentada da PD-1 e seus ligantes (Liu *et al.*, 2014; Reiser *et al.*, 2016).

Outro aspecto comum ao envelhecimento que compromete a disponibilidade de linfócitos T *naïve* é a involução tímica. A produção dessa subpopulação no timo está ligada às dimensões do tecido epitelial no órgão, que durante a vida adulta é progressivamente substituído por tecido adiposo. A consequência desta substituição é um declínio na proporção e ação funcional dos linfócitos T *naïve* que migram para o compartimento vascular e para outros tecidos (Aw & Palmer, 2011). Já foi demonstrado que um dos fatores preponderantes para a involução tímica está ligado às interações com os hormônios esteroides. Estudos experimentais apontam que a administração de hormônios esteroides e a castração agem, respectivamente, contribuindo e inibindo a involução tímica (Majumdar & Nandi, 2017; Cepeda & Griffith, 2018).

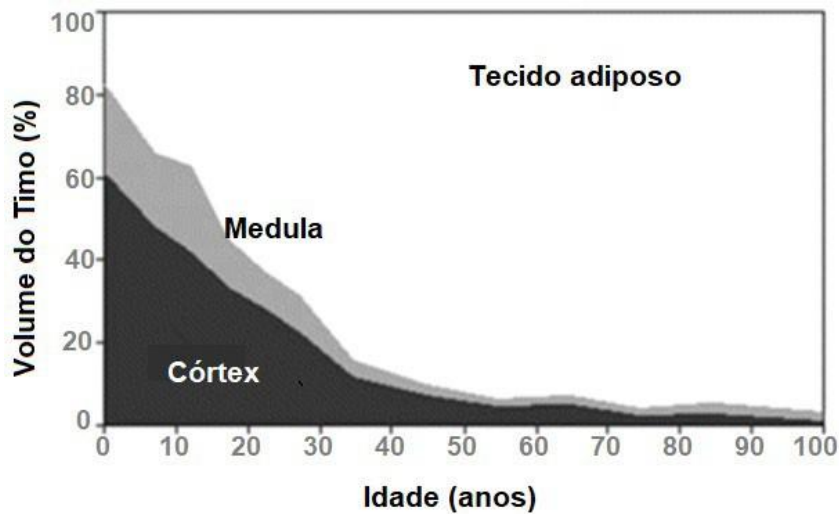


Figura 10 - Representação da involução do timo dependente da idade. O volume do tecido tímico funcional (córteX e medula) diminui progressivamente com o envelhecimento e é substituído por tecido adiposo. Adaptado de Weinberger *et al.*, 2008.

A redução da liberação tímica de linfócitos T *naïve*, juntamente com a resposta imune contra agentes patogênicos, especialmente aqueles que provocam infecções crônicas, como o CMV leva ao acúmulo de linfócitos T de memória nos tecidos e sangue periférico. Tanto os linfócitos T *naïve*, quanto os de memória, nesses indivíduos, mantêm suas subpopulações por meio da proliferação homeostática, que, por consequência, tem como efeito o encurtamento dos telômeros, levando à senescência replicativa dessas células (Barbouti *et al.*, 2020).

O encurtamento dos telômeros, que leva à senescência replicativa, a princípio, é vantajoso, tendo em vista que pode evitar a progressão de um tumor (He & Sharpless, 2017). Entretanto, a senescência celular não está apenas atrelada à paralisação do ciclo celular, essas células senescentes desempenham uma ação pró-inflamatória que está associada à ocorrência de doenças degenerativas e metabólicas. Em revisão sobre o tema, Coppé e colaboradores destacaram o papel principal dessa subpopulação senescente, conhecida como SASP - *senescence-associated secretory phenotype*, ou célula com fenótipo secretor associado à senescência. As células SASP secretam quantidades aumentadas de IL-6, IL-1 β e metaloproteinases (Coppé *et al.*, 2010). Além disso, essas células têm período de vida bastante longo, mesmo após exibirem fenótipo senescente, pois possuem expressão

aumentada de proteínas antiapoptóticas, como a BCL-2, demonstrado em elegante trabalho *in vitro* com células humanas (Sanders *et al.*, 2013).

Os danos ao material genético, acumulados durante a vida, alteram o padrão de expressão gênica da célula, ao passo que induzem maior expressão de proteínas tradicionalmente conhecidas como supressoras de tumor, como p53, p16INK4a e pRB (proteína de retinoblastoma) (Ben-Porath & Weinberg, 2005). Assim, com a síntese dessas proteínas, a célula tende a passar para o estágio senescente. Qualquer célula somática com capacidade de divisão pode se tornar senescente a depender da ação de fatores de estresse celular que provocam os referidos danos celulares. Dentre estes fatores, podem ser citados alguns intrínsecos, como o estresse oxidativo e o encurtamento dos telômeros, causado pela exaustão replicativa; e extrínsecos, como quimioterapia, radioterapia, radiação ultravioleta, entre outros (Schmitt, 2003; Ben-Porath & Weinberg, 2005).

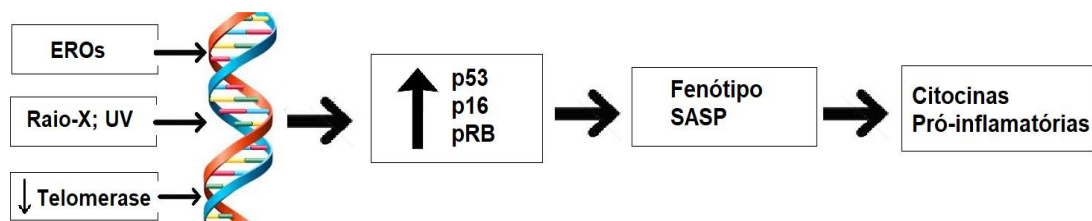


Figura 11 - Fatores relacionados à geração de células do fenótipo SASP. Danos causados ao DNA, promovidos, por exemplo, pelo estresse oxidativo, radiação ultravioleta(UV) e o encurtamento dos telômeros estão associados ao fenótipo SASP. Fonte: o próprio autor.

Como já foi dito, somada à senescência celular, a involução tímica está relacionada a uma redução da resposta vacinal em idosos, tendo em vista que nestes indivíduos há menor repertório de linfócitos T *naïve* circulantes capazes de responder à novos antígenos, além da reduzida capacidade proliferativa dos linfócitos T de memória. Não só em relação à resposta imune adaptativa, a resposta vacinal em idosos também é prejudicada por modificações nas células da imunidade inata, como menor expressão do MHC de classe II e de TLR em macrófagos (Renshaw *et al.*, 2002), além da menor capacidade de apresentação de antígenos por células dendríticas (Grewe, 2001). Uma excelente revisão do grupo de Beatrix Grubeck-Loebenstein apresentou um conjunto de evidências sobre como o comprometimento da resposta imune inata pode dificultar a resposta vacinal em idosos pela limitação da captação de antígeno no local da injeção/administração, por defeitos no

processamento e apresentação de antígenos pelas células dendríticas e macrófagos, com consequente minimização da ativação dos linfócitos T e B (Weinberger *et al.*, 2008).

A redução da resposta vacinal em idosos vem sendo amplamente estudada no contexto da imunização contra o vírus influenza, seja para H1N1, H2N3 ou Influenza B. Estudos nessa área mostraram que a baixa razão de linfócitos T CD4:CD8 é um fator de risco para a queda na resposta humoral aos antígenos da vacina. Outro fator de risco seria a existência de altos títulos de anticorpos relacionados às vacinas prévias, que formariam um complexo com o antígeno da vacina, limitando assim a resposta imune (Strindhall *et al.*, 2016).

Durante o envelhecimento as mesmas alterações responsáveis pela diminuição da capacidade de gerar respostas imunes protetoras também contribuem para o aumento do risco de autoimunidade. Já foi demonstrado que existe uma associação entre a proliferação homeostática acelerada de linfócitos e a ocorrência de doenças autoimunes, como a artrite reumatoide. Acredita-se que essa proliferação, que compensa a involução tímica, possa selecionar linfócitos T autorreativos e, portanto, aumentar a incidência de doenças autoimunes nessa faixa etária (Goronzy & Weyand, 2001; Goronzy *et al.*, 2013). Além disso, o microambiente de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-6, gerado pelas células senescentes, que exibem o fenótipo SASP, contribuem para a ativação dos linfócitos autorreativos e agravam a inflamação associada à doença autoimune (Rodier *et al.*, 2009; Shao *et al.*, 2009).

Outra alteração no sistema imune durante o envelhecimento é o acúmulo das chamadas células mieloides supressoras (MDSC – do inglês myeloid-derived suppressor cells). Essa subpopulação celular envolve monócitos, macrófagos, granulócitos e células dendríticas em estados iniciais de maturação que tem a capacidade de reduzir a ação funcional e proliferação de linfócitos T, além de produzir citocinas pró-inflamatórias, como recentemente revisto por Pawelec e colaboradores (Pawelec *et al.*, 2019). Essas populações foram descritas como CD11b⁺ e, da mesma forma, foi mostrado que se dividem em células monocíticas (CD14⁺) e granulocíticas (CD15⁺) (Kotsakis *et al.*, 2012). Nos seres humanos adultos, em condições fisiológicas normais, a subpopulação CD11b⁺ não costuma ultrapassar 0,5% das células mononucleares do sangue, entretanto, durante o envelhecimento e em certas condições patológicas, como câncer e doenças autoimunes, essa frequência aumenta consideravelmente (Gabrilovich & Nagaraj, 2009).

No contexto das doenças autoimunes, as MDSC, quando estão com a frequência aumentada, podem ter um importante papel anti-inflamatório, ao passo que inibem a ativação de linfócitos T autorreativos. Embora a ação dessas células esteja bem descrita, ela não é suficiente para conter a inflamação gerada pela autoimunidade (Ioannou *et al.*, 2012; Kurkó *et al.*, 2014). Um outro efeito relativo à ação dos linfócitos T está no fato das MDSC reduzirem a expressão de CD62L, uma L-selectina essencial para a entrada de linfócitos nos linfonodos, e, por consequência, ativação da imunidade adaptativa nos linfócitos T *naïve* (Hanson *et al.*, 2009). Por fim, um estudo verificou que a alta frequência das MDSC está também ligada ao câncer, pois idosos com histórico de câncer (mesmo após a remissão completa ou parcial do tumor), possuem frequência aumentada dessas células quando comparados aos que não apresentavam o mesmo histórico (Verschoor *et al.*, 2013). O esquema abaixo resume as principais alterações no sistema imunológico que estão associadas ao envelhecimento:

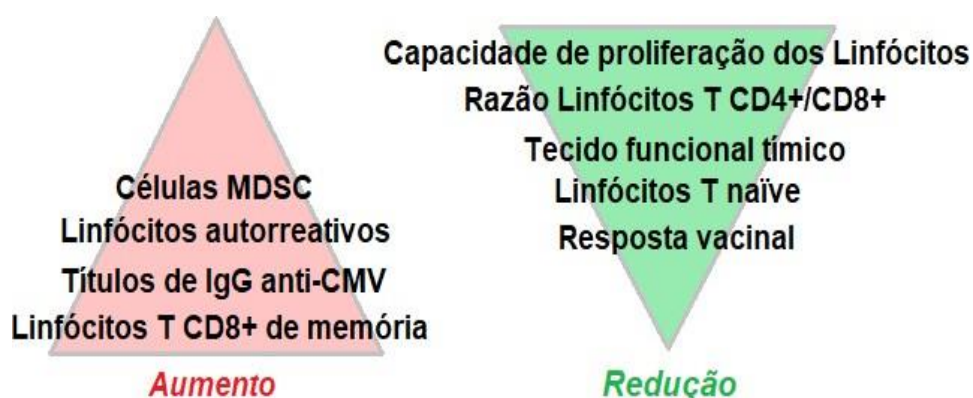


Figura 12 - Marcadores de Imunosenescência. Alguns parâmetros relacionados ao sistema imune que sofrem aumento ou redução em função da idade. Fonte: o próprio autor.

1.9 – *Inflammaging*

Por mais que o envelhecimento seja marcado por um declínio da resposta imune adaptativa, de forma concomitante, há um estado inflamatório crônico de baixo grau, denominado *inflammaging*, que é caracterizado por níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. A concentração destes mediadores inflamatórios é um forte preditor de mortalidade e comorbidades em idosos, pois, este estado crônico de inflamação está relacionado com a patogênese de várias doenças inflamatórias relacionadas ao envelhecimento, como aterosclerose, diabetes, câncer, Alzheimer, entre outras (Ershler & Keller, 2000; Candore *et al.*, 2010).

O termo *inflammaging* foi introduzido por Franceschi e colaboradores em 2000, como um fenômeno resultante da ativação crônica de macrófagos em função do envelhecimento. A ativação destes macrófagos, segundo Franceschi, estaria ligada à fatores como infecções crônicas, estresse, desbalanços hormonais, estresse oxidativo, entre outros (Franceschi *et al.*, 2000). Mais tarde, o *inflammaging* foi descrito como uma inflamação caracterizada por ser crônica, controlada, assintomática, de baixo grau e sistêmica (Giunta, 2006). Além do aumento da concentração de citocinas pró-inflamatórias, o *inflammaging* também está ligado à redução da concentração sérica de albumina, e ao aumento da concentração da proteína C reativa (CRP) (Reuben *et al.*, 2002). Por outro lado, análises genéticas relacionadas à expressão de citocinas apontam que polimorfismos que geram expressão diminuída de IL-6 e aumentada de IL-10 estão ligadas com envelhecimento saudável e longevidade (Pes *et al.*, 2004).

Elevadas concentrações de IL-6 e TNF em idosos, além de estarem ligadas com a maior frequência de doenças, também estão ligadas à sarcopenia, que diz respeito à perda de massa e força muscular. A ação dessas citocinas não estaria ligada apenas à redução da síntese proteica nas células musculares, como também com a apoptose dessas células (Greiwe *et al.*, 2001; Roubenoff, 2003). Um estudo recente mostrou que idosos que praticaram exercícios físicos aeróbicos com regularidade tem reduzida concentração sérica das citocinas pró-inflamatórias associadas ao *inflammaging*, como IL-1 β , TNF e IL-6, quando comparados a idosos sedentários (Nilsson *et al.*, 2019). Entretanto, a prática de exercícios físicos parece não influenciar a resposta imune adaptativa em idosos no que diz respeito ao balanço entre as citocinas do perfil T_H1 e T_H2 (Ogawa *et al.*, 2003).

Além disso, condições associadas à síndrome metabólica, como adiposidade abdominal, hipertrigliceridemia, hiperlipidemia, hipertensão arterial, e hiperglicemia em jejum, agravam o quadro do *inflammaging*. Isso ocorre, pois, indivíduos que apresentam uma ou mais condições ligadas à síndrome metabólica possuem expressão aumentada de citocinas pró-inflamatórias, sobretudo, IL-6 e TNF (Mohammadi *et al.*, 2017). Não obstante, a produção regular de insulina pode reduzir a produção de EROs, ao passo que inativa enzimas da família NADPH oxidase, além de reduzir a síntese de mediadores inflamatórios, pois também inibe a ativação do NF κ B (Aljada *et al.*, 2002; Dandona *et al.*, 2004). Neste contexto, estudos em modelo animal revelaram que as alterações na expressão gênica relacionadas à idade podem

ser revertidas por restrição calórica, essa restrição tem vários efeitos nos níveis hormonais, bem como na regulação metabólica e imunológica (Lee *et al.*, 2000; Weindruch *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2011).

O *inflammaging* também está associado com o aumento da suscetibilidade ou pior prognóstico para doenças infecciosas. Um estudo mostrou a relação que há entre a maior suscetibilidade de idosos desenvolverem a forma ativa da tuberculose pulmonar (TB) com o *inflammaging*. Diferente do que era esperado, os idosos que desenvolveram a TB ativa não apresentavam variações na atividade funcional dos linfócitos T, mas sim em relação à imunidade inata. Nesses indivíduos, a maior frequência de monócitos não clássicos (CD14⁻) foi associada ao maior risco de desenvolver a TB ativa (Ault *et al.*, 2018).

Diversos fatores contribuem para a ativação da via do NFκB na regulação do *inflammaging*, como o estresse oxidativo, a senescência celular, a resposta às lesões no DNA, entre outros, agindo conjuntamente com o envelhecimento (Xia *et al.*, 2016). O NFκB é um importante regulador da imunidade inata e sua ativação resulta na expressão de genes que codificam proteínas de fase aguda, na produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1β, IL-6 e IL-8, entre outros efeitos (Alcaín *et al.*, 2009).

Por fim, o balanço entre a expressão de NFκB e SIRT1, gene que codifica a enzima sirtuína 1, é apontado como importante para um envelhecimento saudável. Isso ocorre, pois, SIRT1 liga-se ao NFκB, especificamente desacetilando a porção p65 do complexo NFκB, ligação que inibe a atividade transcricional desencadeada pelo NFκB (Salminen *et al.*, 2008).

2 - JUSTIFICATIVA

O número de novos casos de Hanseníase está aumentando na população maior de 60 anos em taxa maior do que o aumento da longevidade populacional, como já descrito anteriormente. Dados epidemiológicos do Ambulatório Souza Araújo, parte integrante do laboratório de Hanseníase da FIOCRUZ, evidenciam um aumento de 5,5% na taxa de diagnóstico da doença nesta faixa etária, quando comparada a atual década com a década passada. Se é bem estabelecido que o tempo de incubação do *M. leprae* é entre 2 e 10 anos e que a maior taxa de adoecimento ocorre entre 20 e 40 anos e, ainda, que a maior parte dos indivíduos vive em área endêmica para a doença por toda a vida, faz-se necessário entender que fatores estão associados ao desencadeamento da doença somente na terceira idade.

Tendo em vista que o envelhecimento está associado ao aumento do estresse oxidativo, além do que o *M. leprae*, por si só, também reduz a expressão de enzimas antioxidantes, é possível que o aumento da concentração das EROs em conjunto com a imunosenescência se sobreponham à determinação da suscetibilidade genética à doença e/ou aos polimorfismos dos vários genes associados com a resposta imune no indivíduo, determinando o aparecimento dos sinais e sintomas da doença apenas numa fase tardia da vida. As projeções demográficas indicam um expressivo aumento na proporção de idosos na população e estudos acerca da saúde nesta etapa da vida tem se tornado cada vez mais importantes para garantir a qualidade de vida nesta etapa.

Assim, a presente tese analisou 87 pacientes com hanseníase e 25 indivíduos não-hansênicos, subdivididos em grupos de acordo com a forma da doença e faixa etária. Os dados dos voluntários (pacientes ou não) foram compilados em dois artigos científicos. O primeiro (artigo 1) dedicou-se a verificar como ocorre a evolução da hanseníase em idosos de acordo com o dano causado pelo estresse oxidativo e a carga bacilar. O segundo (artigo 2) investigou se as alterações relacionadas com o envelhecimento, no que diz respeito aos aspectos da imunosenescência, na evolução da hanseníase influenciavam na patogênese da doença.

Dessa forma, os resultados alcançados neste trabalho podem auxiliar na prevenção e/ou no diagnóstico precoce da doença em idosos das áreas endêmicas para a Hanseníase e impactar positivamente na diminuição do número de casos nessa

faixa etária da população brasileira, contribuindo para manutenção da longevidade com qualidade de vida.

3 - OBJETIVOS

3.1 – Objetivo Geral:

Avaliar, em idosos portadores de Hanseníase ou não, a possível associação entre a expressão de genes relacionados à suscetibilidade à doença, a participação do estresse oxidativo e parâmetros de imunosenescência no desenvolvimento da doença nessa faixa etária.

3.2 – Objetivos específicos:

- Determinar se o estresse oxidativo é mais intenso nos pacientes idosos em relação aos jovens, e se o fato do paciente ser acometido pela forma clínica PB ou MB influencia este mecanismo, por meio da quantificação do HNE em lesões de pele; de proteínas carboniladas e do óxido nítrico em amostras de soro; e a expressão gênica de enzimas antioxidantes em sangue periférico e de lesão cutânea;
- Correlacionar a influência da eliminação do bacilo frente ao tratamento com o estresse oxidativo em pacientes multibacilares jovens e idosos;
- Avaliar a presença de indicadores de imunosenescência tais como: anticorpos anti-CMV no soro por análise de quimioluminescência, bem como a frequência da subpopulação de linfócitos T *naïve* e memória em fragmentos de lesões de pele por meio de imunofluorescência;
- Avaliar a hiporresponsividade de linfócitos T pela análise da expressão de CD28 em fragmentos de lesões de pele por meio de imunofluorescência;
- Analisar a expressão de genes previamente associados a suscetibilidade à hanseníase por meio de qPCR em tempo real;
- Associar os dados relacionados à imunosenescência aos dados referentes ao estresse oxidativo;

- Correlacionar os achados laboratoriais com o índice baciloscópico e dados demográficos dos pacientes no diagnóstico da Hanseníase.

4 - RESULTADOS:

4.1 - ARTIGO 1

Notification of Formal Acceptance

From: PLOS Neglected Tropical Diseases

em.pntd.0.71bae8.e12a9adb@editorialmanager

To: Danuza Esquenazi

Date: 03/03/2021 - 11:06AM

Dear Dr. Esquenazi,

We are delighted to inform you that your manuscript, "Increased oxidative stress in elderly leprosy patients is related to age but not to bacillary load," has been formally accepted for publication in PLOS Neglected Tropical Diseases.

We have now passed your article onto the PLOS Production Department who will complete the rest of the publication process. All authors will receive a confirmation email upon publication.

The corresponding author will soon be receiving a typeset proof for review, to ensure errors have not been introduced during production. Please review the PDF proof of your manuscript carefully, as this is the last chance to correct any scientific or type-setting errors. Please note that major changes, or those which affect the scientific understanding of the work, will likely cause delays to the publication date of your manuscript. Note: Proofs for Front Matter articles (Editorial, Viewpoint, Symposium, Review, etc...) are generated on a different schedule and may not be made available as quickly.

Soon after your final files are uploaded, the early version of your manuscript will be published online unless you opted out of this process. The date of the early version will be your article's publication date. The final article will be published to the same URL, and all versions of the paper will be accessible to readers.

Thank you again for supporting open-access publishing; we are looking forward to publishing your work in PLOS Neglected Tropical Diseases.

Best regards,

Shaden Kamhawi and Paul Brindley
Co-Editors-in-Chief
PLOS Neglected Tropical Diseases

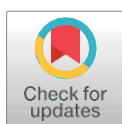
RESEARCH ARTICLE

Increased oxidative stress in elderly leprosy patients is related to age but not to bacillary load

Pedro Henrique Lopes da Silva¹, Katherine Kelda Gomes de Castro¹, Mayara Abud Mendes¹, Thyago Leal Calvo¹, Júlia Monteiro Pereira Leal¹, Mariana de Andréa Vilas-Boas Hacker¹, José Augusto da Costa Nery¹, Euzenir Nunes Sarno¹, Roberto Alves Lourenço², Milton Ozório Moraes¹, Flávio Alves Lara³, Danuza Esquenazi^{1,4*}

1 Laboratório de Hanseníase, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, **2** Laboratório de Envelhecimento Humano, GeronLab, Policlínica Piquet Carneiro, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Laboratório de Microbiologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, **4** Disciplina de Patologia Geral, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

 These authors contributed equally to this work.
* danuza@ioc.fiocruz.br



 OPEN ACCESS

Citation: da Silva PHL, de Castro KKG, Mendes MA, Calvo TL, Leal JMP, Hacker MdAV-B, et al. (2021) Increased oxidative stress in elderly leprosy patients is related to age but not to bacillary load. *PLoS Negl Trop Dis* 15(3): e0009214. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009214>

Editor: Vinicius M. Fava, McGill University, CANADA

Received: November 6, 2020

Accepted: February 6, 2021

Published: March 9, 2021

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009214>

Copyright: © 2021 da Silva et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its [Supporting Information](#) files.

Abstract

Background

Leprosy continues to be a public health problem in Brazil. Furthermore, detection rates in elderly people have increased, particularly those of multibacillary (L-Lep) patients, who are responsible for transmitting *M. leprae*. Part of the decline in physiological function during aging is due to increased oxidative damage and change in T cell subpopulations, which are critical in defense against the disease. It is not still clear how age-related changes like those related to oxidation affect elderly people with leprosy. The aim of this work was to verify whether the elderly leprosy patients have higher ROS production and how it can impact the evolution of leprosy.

Methodology/Principal findings

87 leprosy patients, grouped according to age range and clinical form of leprosy, and 25 healthy volunteers were analyzed. Gene expression analysis of antioxidant and oxidative burst enzymes were performed in whole blood using Biomark's microfluidic-based qPCR. The same genes were evaluated in skin lesion samples by RT-qPCR. The presence of oxidative damage markers (carbonylated proteins and 4-hydroxynonenal) was analyzed by a DNPH colorimetric assay and immunofluorescence. Carbonylated protein content was significantly higher in elderly compared to young patients. One year after multidrug therapy (MDT) discharge and *M. leprae* clearance, oxidative damage increased in young L-Lep patients but not in elderly ones. Both elderly T and L-Lep patients present higher 4-HNE in cutaneous lesions than the young, mainly surrounding memory CD8⁺ T cells. Furthermore, young L-Lep demonstrated greater ability to neutralize ROS compared to elderly L-Lep patients, who presented lower gene expression of antioxidant enzymes, mainly glutathione peroxidase.

Conclusions/Significance

We conclude that elderly patients present exacerbated oxidative damage both in blood and in skin lesions and that age-related changes can be an important factor in leprosy immuno-pathogenesis. Ultimately, elderly patients could benefit from co-supplementation of antioxidants concomitant to MDT, to avoid worsening of the disease.

Author summary

Leprosy, which has been reported throughout human history since Biblical times, still presents unclear aspects in regards to its pathogeny, and represents a public health concern, particularly in developing countries, where poor sanitary conditions of socially disfavored groups is a relevant contributing factor in maintaining disease dissemination. Although its signs and symptoms are primarily found in young adults, the increasing number of elderly individuals with leprosy is a recent phenomenon that requires clarification. Considering the specific biochemical profile of the elderly, as well as the influence thereof on their immune response to infection, this work demonstrates that elderly leprosy patients present increased levels of oxidative damage in blood and skin lesions when compared to younger patients. Such findings appear to be correlated with low gene expression of antioxidant enzymes, particularly among multibacillary patients. This work intends to contribute to a better understanding on the progress of leprosy in elderly groups.

Introduction

Leprosy is a neglected infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*, which mainly affects skin and peripheral nerves [1]. Although the application of multidrug therapy (MDT) in the 1980s significantly reduced disease prevalence and cured millions of patients, there is a stagnant number of new cases per year which continues to be a public health challenge in tropical countries and Brazil has the second largest number of cases worldwide [2]. Leprosy has different clinical manifestations depending on the host immune response to the bacilli. According to the Ridley and Jopling classification, leprosy is classified into five clinical forms: two polar forms (TT and LL) and three intermediate forms known as borderline forms, that present some features among the polar forms, being classified into borderline-tuberculoid (BT), borderline-borderline (BB) and borderline-lepromatous (BL) [3,4]. In tuberculoid forms (T-Lep), patients present local skin lesions while limited bacillary dissemination is associated with a high cell-mediated immune response. In contrast, in lepromatous forms (L-Lep), patients present disseminated skin lesions with ineffective cell-mediated immunity and intense humoral response, being associated with failure to control bacillary growth and spread among tissues [3–5]. Evidence exists to suggest that genetic factors play a role in the type of host immune response against *M. leprae* [6]. Most people do not develop clinical signs of leprosy, even after sustained exposure to *M. leprae* [7]. Several polymorphisms were associated with leprosy susceptibility, for example, PARK2 and PACRG [8], TLR1 [9–10], TLR2 [11], IFN- γ [12], TNF [13], LTA [14] and IL-10 [15] among other genes [16,17]. Although host genetics is recognized as an important factor for leprosy susceptibility, it is also clear that other biological or environmental factors, such as gender, nutrition, poverty, BCG status and the aging process also contribute to leprosy outcome.

Population aging is a global process observed in both developed and developing countries and is closely related to an increased life expectancy and reduced fertility observed in contemporary history [18]. According to standards used in other developing countries, elderly population in Brazil has been growing since the 90s. The country witnessed 18% growth from 2012 to 2017 and has a registered number of elderly (60 years of age or older) of over 30.2 million people. In 2019, this group represented 13% of the entire population, and, over the upcoming decades, it is expected to grow two-fold. The country is ranked 6th in terms of size of the elderly population worldwide [19].

Two recent Brazilian studies showed that leprosy prevalence has decreased in all age ranges, except among the elderly. In addition, there is a significant increase in the frequency of lepromatous male patients age 59 and older [20,21]. Aging is associated with higher incidence of infectious diseases due to a decline in the adaptive immune response, called immunosenescence [22]. Several studies reported age-related changes in the immune system that increase susceptibility to infectious diseases, for example, accumulation of late-stage memory CD8⁺ T cells, inversion in the CD4:CD8 ratio, thymus involution and increase in oxidative stress [22–24].

According to the free radical hypothesis and mitochondrial theory, aging can be considered a consequence of the accumulation of biomolecule oxidation damage caused by free radicals and reactive oxygen species (ROS), and the mitochondria is recognized as source and target of this process [25,26]. Thus, these changes generate the accumulation of harmful molecules, such as carbonylated proteins, malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-nonenal (4-HNE) [27,28]. Moreover, oxidative damage is linked with immune system dysfunction in the elderly since ROS can induce thymic involution, cellular senescence and impair the activation and proliferation of T lymphocytes [22,29,30].

Thus, we hypothesized that elderly leprosy patients have a distinct biochemical and immunological profile associated with immunosenescence that would require personalized care, treatment and follow-up. Oxidative damage might be higher among elderly patients compared to both young and healthy elderly (non-leprosy) individuals. In this study, we investigate the association between oxidative damage and the antioxidant enzyme system in blood and skin samples using a cohort of 112 subjects between 20–89 years of age, separated into six sub-groups according to age range and clinical form of leprosy, as well as healthy (non-leprosy) volunteers. Significant increase in oxidative damage in both blood and skin lesions was observed in elderly patients. More interestingly, these results are associated with lower levels of antioxidant enzyme gene expression among elderly L-Lep patients.

Methods

Ethics statement

The study was approved by the Institutional Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Foundation/FIOCRUZ (permit protocol number 27052919.0.0000.5248). All leprosy patients and healthy participants signed a written consent form to participate in the study. Biological samples from leprosy patients were obtained at the Leprosy clinic (FIOCRUZ/Rio de Janeiro).

Healthy (non-leprosy) elderly individuals were recruited by the Human Aging Laboratory, GeronLab, Policlínica Piquet Carneiro (UERJ/Rio de Janeiro).

Participants and study design

The leprosy patients involved in the study were classified according to Ridley and Jopling criteria (1966) following confirmation of the diagnosis by clinical examination and histopathological analysis of skin lesions. Blood and skin lesion samples were collected before treatment.

Patients were classified according clinical forms and recruited according to age into two groups: young (Y; ranging from 20 to 40 years of age) and elderly (E; over 60 years of age). All patients and healthy volunteers lived in the metropolitan region of the state of Rio de Janeiro—Brazil, a leprosy endemic area. Exclusion criteria for leprosy patients and healthy elderly volunteers included relapse, pregnancy or breast-feeding women, and co-infections such as tuberculosis, hepatitis B and C, and HIV infection. Hypertensive and diabetic individuals under drug control were included.

Nitric oxide quantification

The quantification of nitric oxide was carried out indirectly through nitrate and nitrite measurement, according to the commercial Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI-USA, #780001) in serum samples from healthy controls and patients. Each serum sample was analyzed in triplicate.

Protein carbonyl group quantification

The carbonyl content of whole serum proteins was measured using the Levine method [31]. A solution of 10 mM 2,4-dinitro-phenylhydrazine (DNPH) was added to serum aliquots and left to react for 1 h in the dark. Thereafter, serum proteins were precipitated with 10% trichloroacetic acid, followed by three washing steps with ethanol/ethyl acetate (1:1 v/v). The pellet was solubilized in 6 M guanidinium hydrochloride at 37°C for 15 min, forming a light-yellow solution. The carbonyl content was determined from the absorbance at 366 nm (molar absorption coefficient, 22,000 M⁻¹/cm) using a SpectraMax 190 Spectrophotometer (Molecular Devices, San Jose, CA-USA).

Immunofluorescence assay

Frozen skin lesion sections assays were performed using a Leica LM3000 cryostat and fixed in paraformaldehyde. Unspecific binding sites were blocked with 10% Fetal Calf Serum (FCS, GIBCO, Life Technologies) in 0.01 M PBS for 1 h at room temperature. Permeabilization was performed by incubation with 0.05% Triton X-100 for 15 min. Rat IgG2b anti-human CD8 (1:50; Abcam, ab60076), mouse IgG2a anti-human CD45RO (1:25; Abcam, ab86080), and rabbit IgG anti-human 4-Hydroxynonenal (1:50; Abcam, ab46545) or their respective isotypes were diluted in 1% Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma-Aldrich) in 0.01 M PBS and incubated at 4°C overnight. Tissue sections were washed 3 times and incubated with Alexa Fluor 594 goat anti-Rat IgG (1:1000, Abcam, ab150164), Alexa Fluor 633 goat anti-mouse IgG1 (1:1000, Thermo Fisher Scientific, A-21126) and Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (1:1000, Abcam, ab150077) secondary antibodies for 1:30 h at room temperature. Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 1:10000, Molecular Probes, D1306), and slides were mounted with VECTASHIELD Mounting Medium (Vector Laboratories, H-1000). Tissues were imaged with an Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) using an EC Plan-Neofluar 20x/0.50 objective and Plan-Apochromat 63x/1.3 oil objective. Images were acquired with an AxioCam HRm digital camera as confocal images by structured illumination using Apotome (Carl Zeiss) and mathematically deconvoluted by AxioVision Rel. 4.6 software (Carl Zeiss). DAPI fluorescence images were maintained as conventional fluorescence for clarity reasons. For quantitative analysis of CD8⁺, CD45RO⁺ and HNE-associated cells, 10 microscopic fields were imaged, and the number of positive cells was counted in each field. The results were obtained from the mean of field counts determined by three independent observers.

Total RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA from whole blood obtained by venous puncture was isolated using the PAXgene™ Blood RNA kit (Qiagen, Hilden, Germany) in accordance with the manufacturer's instructions. In the case of biopsy specimens, skin lesion samples (6 mm³ punch) were mechanically lysed using a Polytron Model PT3100 Homogenizer (Kinematica AG, Lucerne, Switzerland) in 2 mL of TRIzol™ Reagent (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) followed by RNA extraction according to manufacturer's instructions. After isolation, total RNA was treated with TURBO™ DNase (Thermo Fisher Scientific). Subsequently, RNA concentration and quality were evaluated using a NanoDrop ND1000 Spectrophotometer (NanoDrop, Wilmington, USA) and integrity and purity were evaluated by 1.2% agarose gel electrophoresis and observation with a UV Transilluminator (Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA). One microgram of total RNA obtained from whole blood and skin biopsy specimens were reverse transcribed into complementary DNA (cDNA) using SuperScript™ VILO™ Master Mix, according to manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific).

Gene expression analysis by real time RT-qPCR

Quantitative RT-PCR was carried out in a final volume of 10 µL containing 200 nM of each SYBR green designed primers (S1 Table), 1X Fast SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) and 10 ng of cDNA. All reactions were carried out in triplicate and appropriate negative controls (no reverse transcriptase and no template controls) were incorporated into each run. Briefly, reactions were performed on a StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). An initial incubation at 95°C for 20 seconds was followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 3 seconds and annealing and extension at 60°C for 30 seconds. A melt curve stage was performed for each specific amplification analysis (95°C for 15 seconds, 60°C for 1 minute, and 95°C for 15 seconds). The relative expression of the genes of interest was normalized by ribosomal protein L13. Quantitative PCR data analysis was performed by the N₀ method implemented in LinRegPCR v. 2020.0, which considers qPCR mean efficiencies estimated by the window-of-linearity method [32,33]. Briefly, N₀ values were calculated in LinRegPCR using default parameters. Then, N₀ values from each gene of interest (GOI) were normalized by the N₀ of the reference gene (REF) $RPL13a$ (N_{0GOI}/N_{0REF}).

Biomark Fluidigm gene expression analysis

Gene expression from whole blood was measured using Biomark's microfluidic-based qPCR technology. Briefly, cDNA was obtained from RNA as described above and then

1.25 µL of cDNA (from stock concentration of 5 ng/µL) was pre-amplified with a pool of 96 primer pairs (final concentration of 50 nM) with 1X TaqMan PreAmp Master Mix (Applied Biosystems, USA, # 4391128) in a GeneAmp PCR System 9700 thermocycler for 14 cycles. Pre-amplified cDNA was then diluted 1:5 in TE (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA) and stored at -20°C until the following day. The Biomark Fluidigm reaction was performed in 96.96 Gene Expression Dynamic Array chips (Fluidigm BMK-M-96.96GT) using 95 samples (plus one non-template control) and 96 primers pairs, according to manufacturer's instructions. For the Biomark Fluidigm reaction, 1.7 µL of pre-amplified cDNA was combined with 1X TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, USA, #4369016) plus 1.7 µL of each target primer (20 µM), in a final volume of 5.0 µL. Priming, mixing, and cycling procedures were all carried out according to Biomark Fluidigm's protocol. Cycling conditions included an initial incubation at 50°C for 2 min, followed by 70°C for 30 min, followed by a UNG and hot start step: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min. Subsequently, reactions were submitted to 35 PCR cycles of

95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. Finally, a melting curve step was included with temperatures ranging from 60 to 95°C. For data analysis, initial quality control was performed based on melting curve analysis (MCA) using Fluidigm Real-Time PCR Analysis Software v. 4.5.2, where targets with multiple dissociation curve peaks were removed from further analysis. Raw data were then exported and processed with custom R scripts [34]. In brief, foreground data (Eva Green) was adjusted by subtraction of background (Rox) intensity to generate Rn (background-adjusted accumulated fluorescence). Quantitative PCR reaction efficiency was estimated by fitting a four-parameter sigmoid model according to Rutledge & Stewart, using functions from the R package qpcR v. 1.41-1 [35]. Cycle thresholds (Ct) were determined from the maximum of the second derivative of the fitted sigmoid curve. Cts and efficiencies were used to estimate relative expression based on the method proposed by Pfaffl [36]. The normalization factor used in the denominator for relative expression consisted of the geometric mean from *RPS16*, *RPL13* and *RPL35* genes, selected as the most stable by the R version of the geNorm algorithm [37,38].

Statistical analysis

Results were analyzed by Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) V. 10.1 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) and GraphPad Prism V. 8 (San Diego, CA, USA) software. After testing for normality (Shapiro-Wilk normality test), non-normally distributed data were analyzed by non-parametric tests. The Mann/Whitney U-test was used to test the differences between two groups, and comparisons between more than two groups were examined by the Kruskal-Wallis test followed by post-hoc Dunn's correction. Friedman test was used to analyze the effects of bacilli elimination on oxidative stress in L-Lep patients. Normally distributed data were compared using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. General Linear Model (GLM) was used to test the independent effects of age and bacilloscopic index (BI) on protein carbonyl levels in L-Lep groups. In this procedure, the statistical significance of each factor (age/BI) is controlled for the effect of the second factor.

Results

Characteristics of the studied subjects

The present study included 87 leprosy patients and 25 healthy volunteers. Among the patients, 46 (52.9%) were men and 41 (47.1%) were women. Multibacillary leprosy patients (L-Lep) presented two clinical forms: 47.6% (20/42) were borderline lepromatous (BL) and 52.4% (22/42) were polar lepromatous (LL). Among the paucibacillary patients (T-Lep), 13.3% (6/45) were polar tuberculoid (TT) and 86.7% (39/45) were borderline tuberculoid (BT). Patients were stratified according to age (young (Y) or elderly (E)) and clinical forms of leprosy yielding four subgroups while healthy individuals were only stratified into two subgroups by age. Other demographic and clinical characteristics of all subjects studied in this work are shown in Table 1. The frequency of leprosy reactions was similar between groups; thus, it seems that reactions were not influenced by age. Although the educational level was quite unequal between young (Y) and elderly (E) leprosy patients ($P = 0.0051$ between E T-Lep vs. Y T-Lep; $P = 0.0173$ E L-Lep vs. Y L-Lep), the time for diagnosis of the disease was similar for all subgroups, averaging 12 months from symptom onset to diagnosis. The presence of the BCG scar was more frequent in younger patients and additionally the result from Mitsuda reaction was higher in young T-Lep patients.

Table 1. Demographic and clinical data of the individuals of this study.

	TT/BT >60 ys (E T-Lep)	TT/BT 20-40 ys (Y T-Lep)	BL/LL >60 ys (E L-Lep)	BL/LL 20-40 ys (Y L-Lep)	Healthy volunteers > 60 ys (E HV)	Healthy volunteers 20-40ys (Y HV)
N	25	20	20	22	15	10
Age (Mean ± SD)	69.2 ± 7.2	31.8 ± 5.4	68.1 ± 6.4	31.3 ± 5.9	77 ± 6.6	29.6 ± 6.2
Gender						
Male N (%)	6 (24%)	12 (60%)	13 (65%)	15 (68%)	7 (47%)	4 (40%)
Female N (%)	19 (76%)	8 (40%)	7 (35%)	7 (32%)	8 (53%)	6 (60%)
BI (Mean ± SD)	-	-	3.8 ± 1.3	4.3 ± 1.2	-	-
WHO disability grade Ior II (%)	17.40%	6.20%	60%	42.10%	-	-
Lepromin Test (Mitsudamm ± SD)	6.88 ± 3.99	10.07 ± 2.84	0	0	-	-
History of Reaction (%)*						
Type 1 N (%)	4 (18.2%)	3 (21.4%)	4 (22%)	4 (19%)	-	-
Type 2 N (%)	0	0	5 (27,8%)	6 (28,5%)	-	-
Time to diagnosis** (Mean±SD)	12.3 ± 9.4	11.3 ± 6.5	10.7 ± 11.5	12.1 ± 7.5	-	-
Presence of BCG vaccinescar N (%)	7 (28%)	17 (85%)	1 (5%)	11 (55%)	-	-
Scholling degree (years)						
0-5	17 (81%)	3 (20%)	13 (86.7%)	9 (42.8%)	-	-
> 5	4 (19%)	12 (80%)	2 (13.3%)	12 (57.2%)	-	-

* Up to two years after diagnosis. SD: standard deviation.

** Time in months between onset of symptoms and clinical diagnosis.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009214.t001>

Increased levels of protein carbonyls in serum samples of elderly leprosy patients

To check oxidative damage, serum samples from patients and healthy individuals were analyzed as to the production of nitric oxide (NO) and to the levels of protein carbonyls. The concentration of NO in the serum did not show significant differences between young and elderly leprosy patients, regardless of the clinical form of the disease. The NO concentration was significantly higher in young volunteers than in elderly ones ($P = 0.0245$ Fig 1A).

Protein carbonylation is a major form of protein oxidation and is used as a parameter of oxidative stress. Serum samples of all the elderly leprosy patients demonstrated a significant increase in protein carbonyl levels. Furthermore, when elderly and young individuals were compared, the difference was only significant for L-Lep patients and for the elderly HV group (Fig 1B–1D). Among T-Lep patients, the protein carbonyl concentration in serum samples was also higher in elderly individuals than in the young, but no significant difference was observed between groups ($P = 0.1223$; Fig 1C). Serum samples of all the elderly leprosy patients demonstrated a significant increase in protein carbonyl levels ($P = 0.0044$; Y Lep vs. E Lep; Fig 1E). Although healthy elderly volunteers have a significant increase in the concentration of protein carbonyls compared to healthy young ones, in our study both elderly L-Lep and T-Lep leprosy patients have a higher concentration of protein carbonyls than healthy elderly volunteers ($P = 0.0257$ and $P = 0.0291$, respectively; Fig 1E).

In elderly T-Lep patients, the higher levels of carbonylated proteins may be associated with higher *NOX1* gene expression, which is responsible for the production of superoxide anion. Moreover, the normalized expression values of *NOX1* enzyme in blood samples was higher in E T-Lep patients compared to Y T-Lep patients ($P = 0.0005$; S1A Fig). As expected, the number

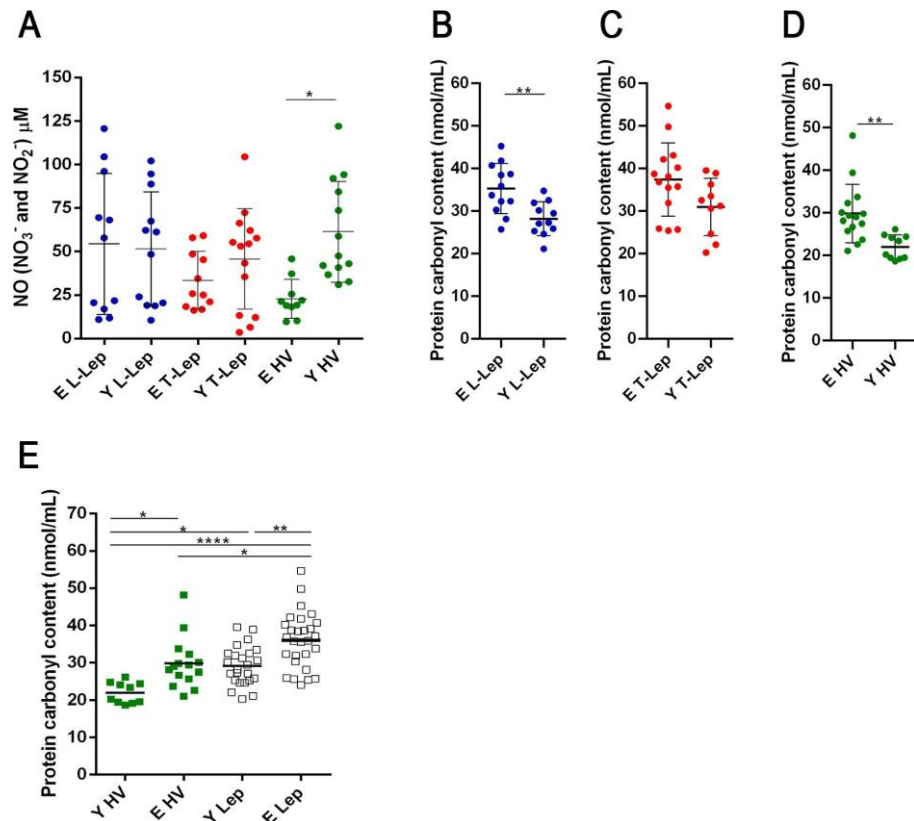


Fig 1. Evaluation of oxidative stress in serum samples. (A) Concentration of NO in the serum of patients and healthy volunteers. Horizontal short lines represent mean of each group. Analysis of variance was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. Graphs represent means \pm SD of serum protein carbonyl group concentration and a Mann/Whitney U-test for continuous variables was performed to evaluate significant differences between groups of **(B)** L-Lep patients (Y n = 12 and E n = 13), **(C)** T-Lep patients (Y n = 12 and E n = 15) and **(D)** healthy volunteers (Y n = 10 and E n = 15), each circle represents an individual. **(E)** Serum protein carbonyl group concentration, each square represents an individual (same n above) and the short horizontal lines represent means. Analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and **** $P = 0.0001$. Abbreviations: E—Elderly; Y—Young; T-Lep (paucibacillary; TT/BT patients); L-Lep (multibacillary; BL/LL patients); HV—healthy volunteers.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009214.g001>

of men and women was uneven between elderly L-Lep and T-Lep patient groups. In the GLM analysis of protein carbonyl levels among L-Lep patients, BI was not statistically significant (beta = - 0.762; 95% IC = [-2.405; 0.881], ($P = 0.346$), while age was an independent factor associated with protein carbonyl level (beta = 6.867; 95% IC = [2.500; 11.234], ($P = 0.004$). Therefore, the increased concentration of protein carbonyl is related to the aging process; however, damage is not influenced by bacillary load in L-Lep patients.

Protein carbonyl concentration increases one year after multidrug therapy (MDT) discharge in young L-Lep patients

After evaluating the concentration of protein carbonyls in newly diagnosed leprosy patients before beginning specific disease treatment (MDT), we conducted a follow-up study to understand the relationship between variation in bacillary load and

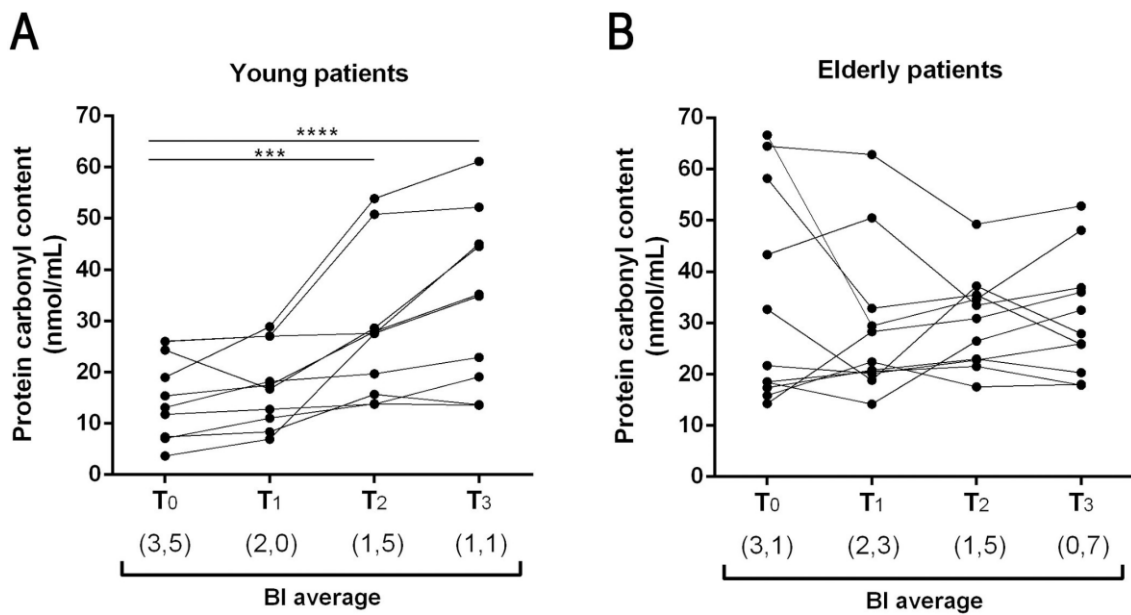


Fig 2. Increase in serum protein carbonyl concentration one year after multidrug therapy (MDT) discharge in the young L-Lep group. (A) Effects of treatment on oxidative stress in Y L-Lep patients (n = 9) and (B) in E L-Lep patients (n = 10): T0—at diagnosis, before starting MDT; T1—discharge after treatment; T2—one year after discharge; T3—two years after discharge. Each circle represents a patient and lines represent the follow up. The Friedman test was performed to evaluate significant differences between the beginning of MDT and the years following discharge. Values in parenthesis refer to the BI average for each time point. *** $P < 0.001$ and **** $P = 0.0001$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009214.g002>

oxidative stress after completion of treatment. Thus, patient sera were obtained at four different time points: untreated patients before the start of MDT (T0), at MDT discharge (T1), one year after MDT discharge (T2), and two years after MDT discharge (T3; Fig 2A and 2B). Patients affected by acute inflammation (leprosy reactions) at the time points were removed from this analysis. In both young and elderly L-Lep patients, we observed a reduction in the mean bacterial index (BI) after MDT (from 3.5 to 1.1 in young, and from 3.1 to 0.7 in elderly leprosy patients). Although BI decreased in both groups, the concentration of protein carbonyls increased in young patients only, while a more heterogeneous profile was observed in elderly leprosy patients, where higher levels were detected before and after MDT.

Elderly leprosy patients present higher presence of 4-HNE in skin lesions samples

To investigate oxidative damage caused by ROS in skin lesions of leprosy patients, cutaneous fragments of these tissues were stained with anti-4-HNE (a marker of oxidative tissue damage), anti-CD8, and anti-CD45RO antibodies. We traced anti-CD8 and anti-CD45RO antibodies because of the accumulation of memory CD8⁺ T cells (CD8⁺CD45RO⁺) in tissues as a result of aging. Thus, to assess oxidative stress in the surroundings of these cells involved in skin immunosenescence, we immunolocalized this cell population and 4-HNE in skin lesions of four patients from each group (Fig 3A). Regardless of the clinical form of the disease, the percentage of 4-HNE-associated cells was significantly higher in the elderly inflammatory infiltrate than

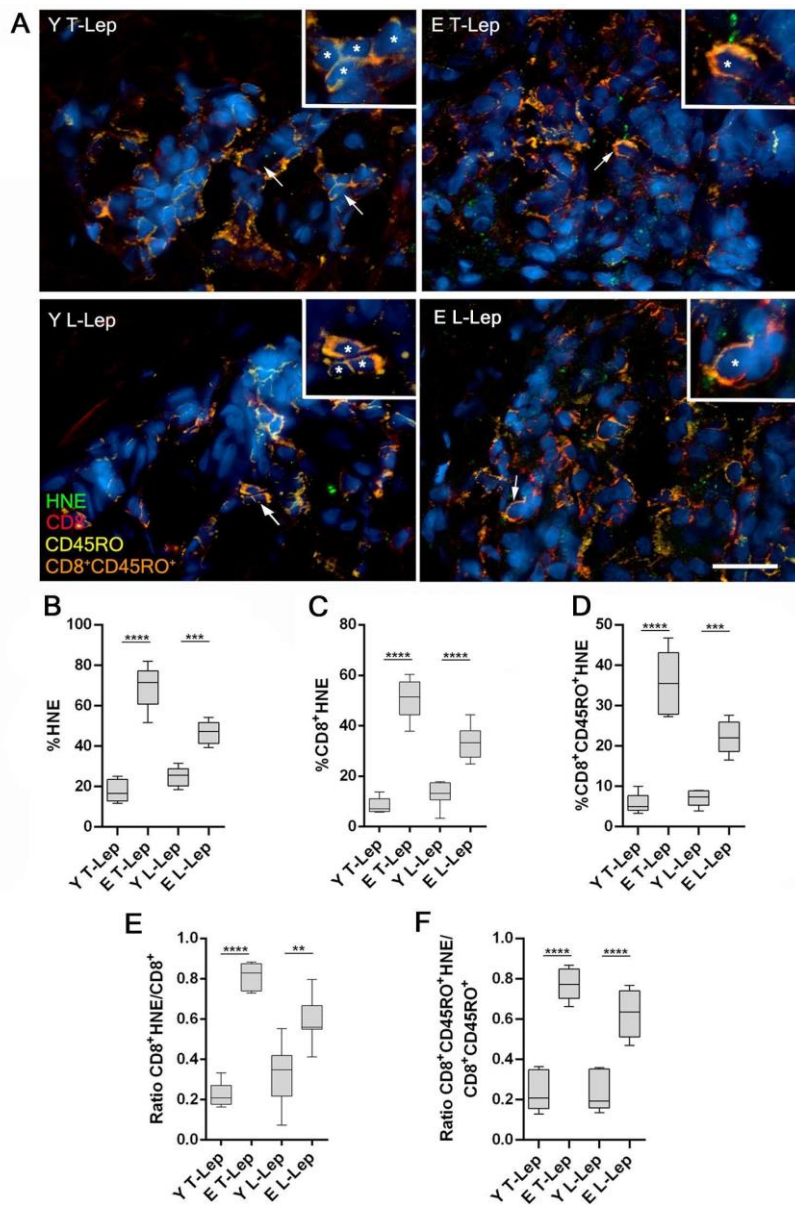


Fig 3. Analysis of oxidative stress by quantifying 4-hydroxynonenal in skin lesions of leprosy patients. Immunofluorescence assays were performed to determine the number of memory CD8⁺ T cells (CD8⁺CD45RO⁺) associated with 4-hydroxynonenal (HNE) signal, as well as HNE abundance in tissue. (A) Representative images of skin lesions from a young paucibacillary patient (Y T-Lep), an elderly paucibacillary patient (E T-Lep), a young multibacillary patient (Y L-Lep) and an elderly multibacillary patient (E L-Lep), presenting HNE (green, Alexa Fluor 488), CD8 (red, Alexa Fluor 594), CD45RO (yellow, Alexa Fluor 633) and nuclei stained by DAPI (blue). Arrows and asterisks indicate CD8⁺CD45RO⁺ cells, stained in orange. In the enlarged inserts, more intense HNE signal in elderly T-Lep and L-Lep patients is observed. Scale bar represents 40 μm in main image and 20 μm in inserts. The graphs present frequency of (B) HNE-associated cells, (C) double-positive CD8⁺HNE-associated cells, (D) triple-positive CD8⁺CD45RO⁺HNE-associated cells (E) ratio between frequency of CD8⁺HNE-associated cells and total CD8⁺ cells and (F) ratio between frequency of CD8⁺CD45RO⁺HNE-associated cells and CD8⁺CD45RO⁺. Results are reported as percentage of positive cells in interquartiles (minimum to maximum) in groups of 4 patients. These data were compared using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. ***P* < 0.005, ****P* < 0.001 and *****P* < 0.0001.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009214.g003>

in young patients (Fig 3B). Similarly, the CD8⁺ HNE-associated T cells were significantly increased among elderly, when compared to young individuals (Fig 3C). Furthermore, the frequency of HNE-associated memory CD8⁺ T lymphocytes (CD8⁺CD45RO⁺HNE-associated) was significantly higher in elderly patients when compared to young patients (Fig 3D). Moreover, the ratio between CD8⁺HNE-associated cells and CD8⁺ cells was higher in E L-Lep than in Y L-Lep patients (*P* = 0.012; Fig 3E). This ratio was also significantly higher in E T-Lep when compared to Y T-Lep patients (*P* < 0.0001; Fig 3E). Furthermore, the ratio between memory CD8⁺ T lymphocytes associated to 4-HNE signal and memory CD8⁺ T cells was significantly higher in elderly patients than in young ones, regardless of the

clinical form of leprosy ($P < 0.05$; Fig 3F). In the same figure, it is possible to note that around 80% of memory T lymphocytes from skin lesions in elderly T-Lep patients showed oxidative damages measured by the presence of 4-HNE. So, it was also possible to note an increased oxidative damage in skin lesions from elderly patients, in addition to the damages observed in the blood samples.

Lower levels of antioxidant enzymes in elderly L-Lep skin lesion

To investigate gene expression of antioxidant enzymes, real time RT-qPCR assays were performed in skin lesion specimens using a StepOnePlus™ Real-Time PCR System. Gene expression of superoxide dismutase 1 (*SOD1*) and 2 (*SOD2*), glutathione-disulfide reductase (*GSR*), and glutathione peroxidase 1 (*GPX1*) enzymes can contribute to better understanding of the imbalance between ROS production and the role of the antioxidant defense system in the individuals involved in this study. Regarding enzyme gene expression in skin lesion samples, the normalized expression values were remarkably similar between young and elderly T-Lep patients. Gene expression levels of antioxidant enzymes in the skin were significantly higher in young L-Lep patients when compared to the elderly, such as *SOD1* and *SOD2* enzymes (Fig 4A and 4B; $P = 0.0367$ and $P = 0.0485$ respectively). Only *GSR* did not show a significant increase in young L-Lep patients ($P = 0.4144$), although the normalized expression values were also higher in these patients (Fig 4C). In these experiments, the *GPX1* gene stood out from the rest due to significant upregulation in young L-Lep patients in relation to elderly ($P < 0.0001$; Fig 4D). Measured by Biomark's Fluidigm technology, the expression of antioxidant enzyme genes in blood samples was quite similar in both groups of patients across all clinical forms of leprosy and healthy volunteers respectively (Fig 4E-4H). Increased expression of these antioxidant enzymes in Y L-Lep patients was associated with increased ROS production. Furthermore, normalized expression values of *NOX2* in skin lesions were higher in Y L-Lep patients when compared to E L-Lep patients ($P = 0.0039$; S1B Fig). So, according to the results, young L-Lep patients presented an increased gene expression of antioxidant enzymes in the skin samples, when compared to elderly L-Lep patients.

Discussion

Infections are favored by age-related alterations in immune response with a consequent increase in susceptibility and disruption in cytokine production [39- 41]. In leprosy, age-related mechanisms of alterations affecting the immune system still require clarification since most individuals present the signs and symptoms of the disease between the second and the fourth decades of life [5].

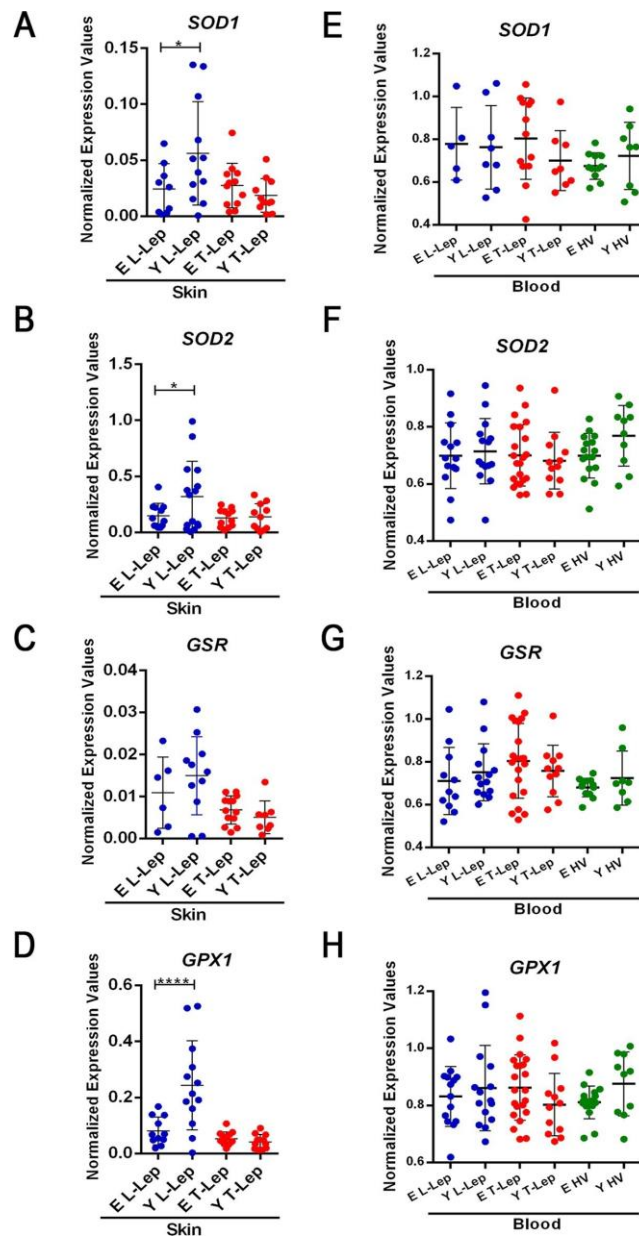


Fig 4. Gene expression analysis of antioxidant enzymes in whole blood and skin lesions. Quantitative PCR (qPCR) evaluation of mRNA levels of SOD1 (A and E), SOD2 (B and F), GSR (C and G) and GPX1 (D and H) was performed in whole blood and skin lesion samples. Each circle represents one individual. Horizontal bars represent the mean values \pm SD. Data analysis was performed using ordinary one-way ANOVA followed by Holm-Sidak's multiple comparison test (A, B, and G). Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison post-test was used for the analysis of non-normally distributed and/or heteroscedastic data (C). Variation in number of individuals for each gene expression analysis was due to lack of amplification. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ and **** $P = 0.0001$. Abbreviations: E-Elderly; Y-Young; T-Lep- TT/BT patients; L-Lep-BL/LL patients.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009214.g004>

In view of the above, we hypothesize whether oxidative stress patterns could be detected among elderly patients, which could indicate specific immunophenotypic profiles potentially affecting severity to leprosy or even the course of the disease. Here, we provide evidence that oxidative stress, as detected by carbonylated proteins in sera, is higher in elderly patients as compared to younger patients or elderly healthy individuals. To corroborate these findings, we also detected higher levels of tissue damage induced by oxidation in skin samples, although no differences were observed between L-Lep and T-Lep patients.

Part of the decline in physiological function during the natural aging process is linked to the imbalance between the production of ROS and the antioxidant defense system [42,43]. Damage caused by ROS can be measured by quantifying certain molecules, such as 4-HNE and carbonyl proteins. Our data showed that oxidative stress is higher in elderly leprosy patients compared to healthy elderly subjects. Furthermore, marked oxidative damage in

L-Lep patients does not seem to be linked to bacillary load, at least when comparing elderly and young patients. The relationship between *M. leprae* and the increased damage caused by ROS remains unclear, but previous studies have suggested a correlation between bacillary load and oxidative stress [44,45]. However, these works did not clarify the mechanism of such process during aging.

Our data demonstrate that leprosy may reduce oxidative stress among young leprosy patients, considering that after treatment and reduction in bacillary load, the concentration of protein carbonyls increased in the sera of these patients. In view of the above, some studies have already shown that there is an increase in ROS production during the first months of multidrug therapy (MDT), probably due to dapsone [46,47]. In the case of young L-Lep patients, oxidative stress increased one year after release from MDT while, in elderly patients, oxidative stress remained high both during and years after leprosy treatment. From demonstrated that, in young L-Lep patients, progressive *M. leprae* elimination may explain the increase in carbonylated protein levels over the years following treatment, considering the increased mRNA expression of antioxidant defense enzymes (*SOD1*, *SOD2*, and *GPX1*) in these unattended patients. Similar findings have been reported by Medeiros and collaborators who showed that *M. leprae* is capable of reducing oxidative stress by increasing the enzymatic activity of glutathione reductase and reducing mitochondrial activity in the Schwann cell model. Thus, the leprosy bacillus seems to be able to modulate oxidative stress, whereas this reduction is strategic for promoting an appropriate niche for their survival [48]. Genetic studies have identified several genes and genomic regions contributing to the control of host susceptibility to leprosy. Our finding of low levels of *SOD2* gene expression in skin samples of elderly L-Lep patients is interesting, considering that variants of this gene are located at the same genomic locus as *PRKN*, a well-known leprosy susceptibility gene [49]. Future research may better explain the exact mechanism of interaction between the pathogen and expression of antioxidant enzyme genes in other tissues, such as blood and skin.

Our data suggest that high levels of 4-HNE in skin lesions of elderly L-Lep patients are linked with low antioxidant enzyme expression. The enzyme Glutathione peroxidase 1 (GPx1) catalyzes the conversion of H_2O_2 into water using glutathione as a substrate and also promotes the reduction of lipid peroxides, such as 4-HNE [50]. Therefore, higher GPX1 gene expression in skin lesions can protect against oxidative damage in young L-Lep patients. Additionally,

4-HNE has a harmful effect of amplifying inflammation and increasing tissue damage. These effects are produced from activation of a TLR4/NF- κ B-dependent pathway [51].

Previous data showed that *M. leprae* modulates host lipid metabolism to facilitate its survival and reduce the immune response [52,53]. Patients in this study did not present dyslipidemia and there were also no significant differences in the levels of total cholesterol, HDL, LDL or triglycerides between elderly and young patients with same clinical form (S2 Table). A recent study showed that in L-Lep patients, oxidative stress was enhanced due to changes in the chemical composition of HDL, which impairs its antioxidant and anti-inflammatory action [54]. Although an increase in HDL levels in multibacillary patients was not observed in our study, the analysis of changes in the chemical composition of HDL among elderly and young leprosy patients can help to understand the influence of the aging process on the relationship between changes in lipid metabolism of the host and oxidative stress.

The downregulated expression of GPX1 observed in elderly L-Lep patients in this study may be associated with induction of the cell senescence process. ROS, especially H_2O_2 , which is neutralized by the GPx1 enzyme, alter the regulation of protein expression, such as p53, p21 and p16INK4a, which induce cellular senescence [55,56]. High levels of lipid peroxidation found in skin lesions of elderly leprosy patients, especially in memory CD8⁺ T lymphocytes, indicate that bacilli elimination can be reduced due to the cellular senescence process that these lymphocytes may be undergoing. In addition, these senescent cells increase tissue damage caused by inflammation due to senescence-associated secretory phenotype (SASP), which is characterized by increased expression and secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines [57,58]. These effects can be amplified through factors of the secretory phenotype and induce the generation of senescence in normal neighboring cells in a paracrine manner.

In addition, higher gene expression of antioxidant enzymes in skin lesions of Y L-Lep patients may be related to oxidative burst. Although these patients present increased gene expression of the Nox2 enzyme, oxidative damage seems to be controlled by the high expression of antioxidant enzymes, mainly glutathione peroxidase. Nox2 is highly expressed in phagocytes and contributes to killing of intracellular pathogens. This enzyme transports electrons from cytoplasmic NADPH to extracellular or phagosomal oxygen to generate superoxide anion [59]. Recent work showed that *Mycobacterium tuberculosis* survived in Nox2-KO macrophages, and high levels of ROS induced via NOX2 were correlated with more favorable tuberculosis treatment outcome [60]. Moreover, another recent study showed that a genetic variation in NCF2, a Nox2 complex activator, contributes to the susceptibility to tuberculosis in a Chinese population [61]. These data reinforce the possibility that Nox2 activity is essential to *M. tuberculosis* phagolysosomal degradation. Likewise, Nox2 expression could play a crucial role in eliminating bacillus from the elderly L-Lep patients studied herein.

Under chronic inflammatory conditions, ROS reduce activation signals to the T cell and impair the immune response against pathogens [29]. Despite the regular levels of TCR expression in T lymphocytes isolated from the peripheral blood of patients with chronic diseases, such as leprosy, there are structural changes in the TCR chain, specifically on T-cell receptor z-chain (TCRz). ROS can induce these structural modifications of the TCR, therefore impairing the T lymphocytes activation and proliferation [62]. Thus, the increased ROS production and a deficient antioxidant system are responsible for the induction of hyporesponsiveness in T lymphocytes. In addition, Zea and colleagues demonstrated that alterations on TCRz expression were correlated with lower levels of IFN- γ release in leprosy patients [63]. In this regard, in L-Lep patients, there is extensive replication of *M. leprae* in macrophages. This reduction in macrophage microbicidal activity has been attributed to the hyporesponsiveness of T cells, as shown in blood and cutaneous lesions of L-Lep patients [64,65]. In addition to the effects of oxidative damage in the suppression of the T cell immune response, there is evidence that the increase in oxidant stress is associated with mycobacterial survival in macrophages. Indeed, Oberley-Deegan and coworkers showed that MnTE-2-PyP, a ROS scavenger, reduces intracellular *Mycobacterium abscessus* numbers by enhancing phagosome-lysosome fusion [66].

Considering the lower synthesis ability of antioxidant enzymes in elderly L-Lep patients verified in this work, there are various mechanisms used by the cells to repair damages produced by the oxidative stress in leprosy. The co-supplementation of some antioxidants, in addition to the specific treatment for the disease was previously described as a contributing factor to improve such repair and to mitigate oxidative damage, particularly in L-Lep patients. The list of antioxidants tested encompasses zinc [67], vitamin E [68] and ascorbic acid [69].

Most works disclosed a reduction in oxidative damage following supplementation with the antioxidant agent. Nevertheless, none of them addressed elderly patients. Therefore, the administration of an antioxidant as a co-supplement throughout the clinical course of leprosy appears to be a possible alternative to reduce, or even to prevent, oxidative stress. This supplementation could be concomitant to MDT, and even administered after treatment, particularly in elderly L-Lep patients. We have grouped T-Lep (TT/BT) and L-Lep (LL/BL) patients since clinical, immunological and bacteriological features are similar facilitating comparisons of the groups. Also, we decided to fix the recruitment trying to polarize young (from 20-40y/o) and elderly (>60y/o) patients. All these strategies were performed to facilitate interpretation of the data, although we understand that these approaches can bias the results. Studies increasing recruitment (age ranges) and sample size allowing comparisons between clinical forms are necessary to confirm the data.

Briefly, our study showed exacerbated oxidative damage in elderly leprosy patients, when compared to younger patients. This damage noted both in blood and in skin lesions, was higher in the skin of elderly L-Lep patients. This finding possibly arises, at least in part, from the role of ageing in reducing the antioxidant enzyme system in these individuals. Thus, considering that all elderly patients involved in this study have always lived in an endemic area of leprosy, the exacerbated oxidative stress during the aging process can be an important factor for leprosy susceptibility and immunopathogenesis of the disease after the sixth decade of life.

Supporting information

S1 Fig. Gene expression of NADPH oxidase enzymes in whole blood and skin lesions. Quantitative PCR (qPCR) evaluation of NOX1 mRNA levels (**A**) in whole blood (L-Lep patients, Y n = 12 and E n = 13; T-Lep patients Y n = 12 and E n = 15; HV Y n = 10 and E n = 15), and NOX2 (**B**) in skin lesion samples (Y L-Lep n = 13 and E L-Lep n = 10; Y T-Lep n = 10 and E T-Lep n = 12). Bar graphs represent means \pm SD of each group. Data analysis was performed using Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison post-test. ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$. Abbreviations: E-Elderly; Y-Young; T-Lep-TT/BT patients; L-Lep-LL/BL patients; HV-healthy volunteers. (TIF)

S1 Table. Oligonucleotides used in the study.

(DOCX)

S2 Table. Biochemical data of analyzed group.

(DOCX)

Acknowledgments

We are grateful to all the leprosy patients and non-leprosy volunteers for agreeing to participate in the study, as well as to Cristiane Domingues and José Augusto da Silva for the administrative assistance. Our recognition to Anna Beatriz Robottom Ferreira, a native speaker for editing the text.

Author Contributions

Conceptualization: Danuza Esquenazi.

Data curation: Pedro Henrique Lopes da Silva, Danuza Esquenazi.

Formal analysis: Pedro Henrique Lopes da Silva, Mayara Abud Mendes, Thyago Leal Calvo, Mariana de Andréa Vilas-Boas Hacker, Flávio Alves Lara, Danuza Esquenazi.

Funding acquisition: Euzenir Nunes Sarno, Roberto Alves Lourenço, Milton Ozório Moraes, Danuza Esquenazi.

Investigation: Pedro Henrique Lopes da Silva, Milton Ozório Moraes, Flávio Alves Lara, Danuza Esquenazi.

Methodology: Pedro Henrique Lopes da Silva, Katherine Kelda Gomes

de Castro, Mayara Abud Mendes, Thyago Leal Calvo, Júlia Monteiro Pereira Leal, José Augusto da Costa Nery, Euzenir Nunes Sarno, Roberto Alves Lourenço.

Project administration: Danuza Esquenazi.

Resources: Milton Ozório Moraes, Flávio Alves Lara, Danuza Esquenazi.

Supervision: Danuza Esquenazi.

Validation: Milton Ozório Moraes, Flávio Alves Lara, Danuza Esquenazi.

Visualization: Pedro Henrique Lopes da Silva, Danuza Esquenazi.

Writing – original draft: Pedro Henrique Lopes da Silva, Mayara Abud Mendes, Milton Ozório Moraes, Flávio Alves Lara, Danuza Esquenazi.

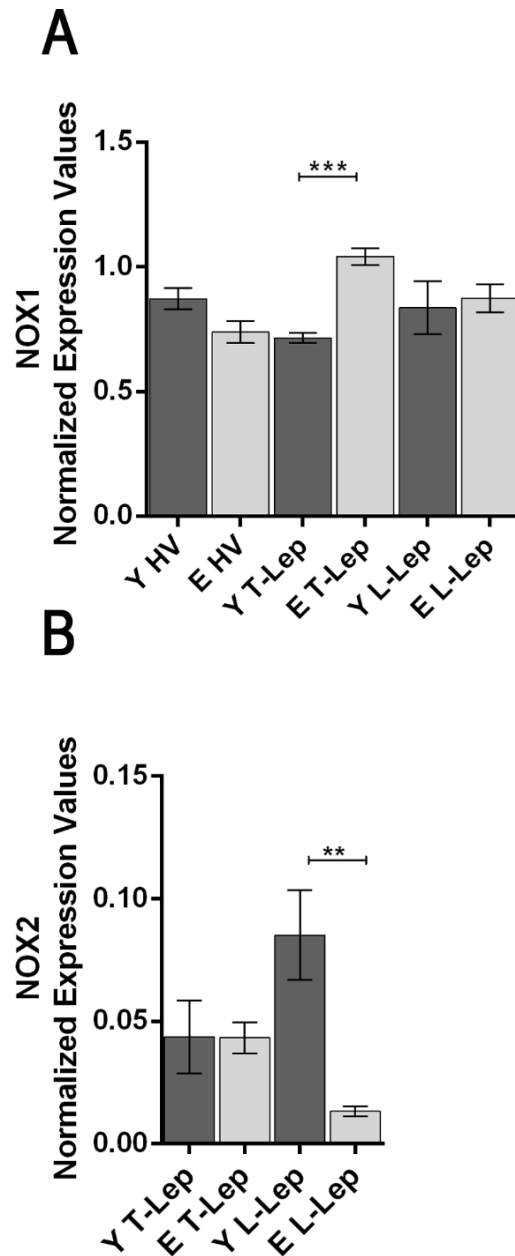
Writing – review & editing: Milton Ozório Moraes, Danuza Esquenazi.

References

1. Gallo MEN, Sampaio EP, Nery JAC, Moraes MO, Antunes SLG, Pessolani MCV, et al. Hanseníase: Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Imunológicos. In: Coura, JR (ed.) *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*, Rio de Janeiro, RJ. Ed. Guanabara Koogan. 2013. pp.1383-94.
2. WHO. Weekly Epidemiological Record. 2020; 95: 36. Available from: <https://www.who.int/wer/en>
3. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1966; 34(3):255–73. PMID: 5950347
4. Bhatia AS, Katoch K, Narayanan RB, Ramu G, Mukherjee A, Lavania RK. Clinical and histopathological correlation in the classification of leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1993; 61(3):433–8. PMID: 8228443
5. Scollard D M, Adams L B, Gillis T P, Krahenbuhl J L, Truman R W, et al., The continuing challenges of leprosy. *Clin. Microbiol Rev.* 2006; 19, 338–381. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.338-381.2006> PMID: 16614253
6. Mi Z, Liu H, Zhang F. Advances in the Immunology and Genetics of Leprosy. *Front Immunol.* 2020; 11:567. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00567> PMID: 32373110
7. Britton WJ, Lockwood DN. Leprosy. *Lancet.* 2004; 363(9416):1209–1219. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)15952-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15952-7) PMID: 15081655
8. Mira MT, Alcaïs A, Nguyen VT, Moraes MO, Di Flumeri C, Vu HT, et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature.* 2004; 427(6975):636–640. <https://doi.org/10.1038/nature02326> PMID: 14737177
9. Schuring RP, Hamann L, Faber WR, Pahan D, Richardus JH, Schumann RR, et al. Polymorphism N248S in the human Toll-like receptor 1 gene is related to leprosy and leprosy reactions. *J Infect Dis.* 2009; 199(12):1816–1819. <https://doi.org/10.1086/599121> PMID: 19456232
10. Marques CdeS Brito-de-Souza VN, Guerreiro LT Martins JH, Amaral EP Cardoso CC, et al. Toll-like receptor 1 N248S single-nucleotide polymorphism is associated with leprosy risk and regulates immune activation during mycobacterial infection. *J Infect Dis.* 2013; 208(1):120–129. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit133> PMID: 23547143
11. Bochud PY, Hawn TR, Aderem A. Cutting edge: a Toll-like receptor 2 polymorphism that is associated with lepromatous leprosy is unable to mediate mycobacterial signaling. *J Immunol.* 2003; 170(7):3451–3454. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.7.3451> PMID: 12646604
12. Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Dias-Baptista IM, Maniero VC, Venturini J, et al. IFNG +874 T>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians. *Hum Genet.* 2010; 128(5):481–490. <https://doi.org/10.1007/s00439-010-0872-x> PMID: 20714752
13. Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Duraes SM, Ribeiro-Alves M, Nery JA, et al. TNF-308G>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians: a genetic epidemiology assessment, meta-analysis, and functional study. *J Infect Dis.* 2011; 204(8):1256–1263. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir521> PMID: 21917899
14. Alcaïs A, Alter A, Antoni G, Orlova M, Nguyen VT, Singh M, et al. Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin-alpha allele as a major risk factor for early-onset leprosy. *Nat Genet.* 2007; 39 (4):517–522. <https://doi.org/10.1038/ng2000> PMID: 17353895
15. Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Cardoso CC, Dias-Baptista IM, Parelli FP, Venturini J, et al. Genetic, epidemiological, and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for -819C/T in leprosy susceptibility. *Genes Immun.* 2009; 10(2):174–180. <https://doi.org/10.1038/gene.2008.97> PMID: 19110537
16. Cardoso CC, Pereira AC, de Sales Marques C, Moraes MO. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. *Future Microbiol.* 2011; 6(5):533–549. <https://doi.org/10.2217/fmb.11.39> PMID: 21585261
17. Fava VM, Dallmann-Sauer M, Schurr E. Genetics of leprosy: today and beyond. *Hum Genet.* 2020; 139(6–7):835–846. <https://doi.org/10.1007/s00439-019-02087-5> PMID: 31713021
18. Lloyd-Sherlock P. Population ageing in developed and developing regions: implications for health policy. *Soc Sci Med.* 2000; 51(6):887–895. [https://doi.org/10.1016/s0277-9536\(00\)00068-x](https://doi.org/10.1016/s0277-9536(00)00068-x) PMID: 10972432
19. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: *Projecção da população do Brasil e das Unidades da Federação*. 2019. Available from: <https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao>.
20. Nobre ML, Illarramendi X, Dupnik KM, Hacker MA, Nery JA, Jero-nimo SM, et al. Multibacillary leprosy by population groups in Brazil: Lessons from an observational study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017; 11(2): e0005364. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005364> PMID: 28192426

21. Nobre ML, Amorim FM, Souza MCF, Neves-Manta FS, Esquenazi D, Moraes MO, et al. Multibacillary leprosy and the elderly: a field for further research. *Leprosy Rev.* 2017; 88:510–519.
22. Pawelec G. Age and immunity: What is "immunosenescence"? *Exp Gerontol.* 2017; 105:4–9. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.10.024> PMID: 29111233
23. Wertheimer AM, Bennett MS, Park B, Uhrlaub JL, Martinez C, Pulko V, et al. Aging and cytomegalovirus infection differentially and jointly affect distinct circulating T cell subsets in humans. *J Immunol.* 2014; 192(5):2143–2155. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301721> PMID: 24501199
24. Cepeda S, Griffith AV. Thymic stromal cells: Roles in atrophy and age-associated dysfunction of the thymus. *Exp Gerontol.* 2018; 105:113–117. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.12.022> PMID: 29278750
25. Pomatto LCD, Davies KJA. Adaptive homeostasis and the free radical theory of ageing. *Free Radic Biol Med.* 2018; 124:420–430. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.016> PMID: 29960100
26. Chocron ES, Munkácsy E, Pickering AM. Cause or casualty: The role of mitochondrial DNA in aging and age-associated disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2019; 1865(2):285–297. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2018.09.035> PMID: 30419337
27. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Free Radic Res.* 2006; 40(12):1250–1258. <https://doi.org/10.1080/10715760600918142> PMID: 17090414
28. Zhang H, Forman HJ. 4-hydroxynonenal-mediated signaling and aging. *Free Radic Biol Med.* 2017; 111:219–225. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.032> PMID: 27876535
29. Cemerski S, Cantagrel A, Van Meerwijk JP, Romagnoli P. Reactive oxygen species differentially affect T cell receptor-signaling pathways. *J Biol Chem.* 2002; 277(22):19585–19593. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111451200> PMID: 11916964
30. Barbouti A, Vasileiou PVS, Evangelou K, Vlasis KG, Papoudou-Bai A, Gorgoulis VG, et al. Implications of Oxidative Stress and Cellular Senescence in Age-Related Thymus Involution. *Oxid Med Cell Longev.* 2020:7986071. <https://doi.org/10.1155/2020/7986071> PMID: 32089780
31. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1994; 233:346–357. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(94)33040-9) PMID: 8015469
32. Ramakers C, Ruijter JM, Lekanne Deprez RH, Moorman AFM. Assumption-free analysis of quantitative real-time PCR data. *Neurosci Letters.* 2003; 339:62–66.
33. Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars W, Bakker O, van den Hoff MJB, Karlen Y, Moorman AFM. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research.* 2009; 37:e45. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp045> PMID: 19237396
34. R Core Team. 2020. R: A language and environment for statistical computing. Available from: <http://cran.r-project.org>
35. Rutledge RG, Stewart D. Critical evaluation of methods used to determine amplification efficiency refutes the exponential character of real-time PCR. *BMC Mol Biol.* 2008; 9:96. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-96> PMID: 18973660
36. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29(9):e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45> PMID: 11328886
37. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002; 3(7) <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034> PMID: 12184808
38. Perkins JR, Dawes JM, McMahon SB, Bennett DL, Orengo C, Kohl M. ReadqPCR and NormqPCR: R packages for the reading, quality checking and normalisation of RT-qPCR quantification cycle (Cq) data. *BMC Genomics.* 2012; 13:296. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-296> PMID: 22748112
39. Alvarez-Rodríguez L, Lopez-Hoyos M, Muñoz-Cacho P and Martínez-Taboada VM. Aging is associated with circulating cytokine dysregulation. *Cell Immunol.* 2012; 273:124–132. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.01.001> PMID: 22316526
40. Frasca D, Blomberg BB. Inflammaging decreases adaptive and innate immune responses in mice and humans. *Biogerontology.* 2016; 17(1):7–19. <https://doi.org/10.1007/s10522-015-9578-8> PMID: 25921609
41. Nikolich-Zugich J. The twilight of immunity: emerging concepts in aging of the immune system. *Nat Immunol.* 2018; 19:10–19. <https://doi.org/10.1038/s41590-017-0006-x> PMID: 29242543
42. Aiello A, Farzaneh F, Candore G, Caruso C, Davinelli S, Gambino CM, et al. Immunosenescence and Its Hallmarks: How to Oppose Aging Strategically? A Review of Potential Options for Therapeutic Intervention. *Front Immunol.* 2019; 10:2247. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02247> PMID: 31608061
43. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013; 153 (6):1194–1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039> PMID: 23746838
44. Prasad CV, Kodliwadmth MV, Kodliwadmth GB. Erythrocyte glutathione peroxidase, glutathione reductase activities and blood glutathione content in leprosy. *J Infect.* 2008; 56(6):469–473. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2008.03.009> PMID: 18440071
45. Swathi M & Tagore R. Study of Oxidative Stress in Different Forms of Leprosy. *Indian J Dermatol.* 2015; 60(3):321. <https://doi.org/10.4103/0019-5154.156426> PMID: 26120177
46. Sahu A, Saha K, Mukherjee A, Sehgal VN. In vivo effects of anti-leprosy drugs on the rat peritoneal macrophages and lymphocyte subpopulations. *Int J Immunopharmacol.* 1992; 14(4):721–730. [https://doi.org/10.1016/0192-0561\(92\)90135-8](https://doi.org/10.1016/0192-0561(92)90135-8) PMID: 1325957
47. Schalcher TR, Borges RS, Coleman MD, Batista Júnior J, Salgado CG, Vieira JL, Romão PR, Oliveira FR, Monteiro MC. Clinical oxidative stress during leprosy multidrug therapy: impact of dapsone oxidation. *PLoS One.* 2014; 9(1):e85712. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085712> PMID: 24465659
48. Medeiros RC, Girardi KD, Cardoso FK, Mietto BS, Pinto TG, Gomez LS, et al. Subversion of Schwann Cell Glucose Metabolism by *Mycobacterium leprae*. *J Biol Chem.* 2016; 291(41):21375–21387. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.725283> PMID: 27555322

49. Ramos GB, Salomão H, Francio AS, Fava VM, Werneck RI, Mira MT. Association Analysis Suggests SOD2 as a Newly Identified Candidate Gene Associated With Leprosy Susceptibility. *J Infect Dis.* 2016; 214(3):475–8. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw170> PMID: 27132285
50. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal.* 2011 Oct 1; 15(7):1957–1997. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3586> PMID: 21087145
51. Gargiulo S, Gamba P, Testa G, Rossin D, Biasi F, Poli G, et al. Relation between TLR4/NF-κB signaling pathway activation by 27-hydroxycholesterol and 4-hydroxynonenal, and atherosclerotic plaque instability. *Aging Cell.* 2015; 14(4):569–581. <https://doi.org/10.1111/acer.12322> PMID: 25757594
52. Cruz D, Watson AD, Miller CS, Montoya D, Ochoa MT, Sieling PA, et al. Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy. *Version 2. J Clin Invest.* 2008; 118(8):2917–28. <https://doi.org/10.1172/JCI34189> PMID: 18636118
53. Amaral JJ, Antunes LC, de Macedo CS, Mattos KA, Han J, Pan J, et al. Metabonomics reveals drastic changes in anti-inflammatory/pro-resolving polyunsaturated fatty acids-derived lipid mediators in leprosy disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7(8):e2381. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002381> PMID: 23967366
54. Lemes RMR, Silva CAME, Marques MA M, Atella GC, Nery JADC, Nogueira MRS, et al. Altered composition and functional profile of high-density lipoprotein in leprosy patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020; 14(3):e0008138. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008138> PMID: 32226013
55. de Magalhães JP, Chainiaux F, de Longueville F, Mainfroid V, Migeot V, Marcq L, et al. Gene expression and regulation in H₂O₂-induced premature senescence of human foreskin fibroblasts expressing or not telomerase. *Exp Gerontol.* 2004 Sep; 39(9):1379–89. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2004.06.004> PMID: 15489061
56. Hohn A, Weber D, Jung T, Ott C, Hugo M, Kochlik B, et al. Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. *Redox Biol.* 2017; 11:482–501. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.001> PMID: 28086196
57. Coppe JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol.* 2010; 5:99–118. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144> PMID: 20078217
58. Picca A, Lezza AMS, Leeuwenburgh C, Pesce V, Calvani R, Landi F, et al. Fueling Inflamm-Aging through Mitochondrial Dysfunction: Mechanisms and Molecular Targets. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(5):933. <https://doi.org/10.3390/ijms18050933> PMID: 28452964
59. Bedard K & Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007; 87(1):245–313. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005> PMID: 17237347
60. Koster S, Upadhyay S, Chandra P, Papavinasundaram K, Yang G, Hassan A, et al. *Mycobacterium tuberculosis* is protected from NADPH oxidase and LC3-associated phagocytosis by the LCP protein CpsA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017; 114(41):E8711–E8720. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707792114> PMID: 28973896
61. Jiao L, Song L, Ding L, Liu T, Wu T, Zhang J, et al. A Novel Genetic Variation in NCF2, the Core Component of NADPH Oxidase, Contributes to the Susceptibility of Tuberculosis in Western Chinese Han Population. *DNA Cell Biol.* 2020; 39(1):57–62. <https://doi.org/10.1089/dna.2019.5082> PMID: 31794672
62. Cemerski S, van Meerwijk JP, Romagnoli P. Oxidative-stress-induced T lymphocyte hyporesponsiveness is caused by structural modification rather than proteasomal degradation of crucial TCR signaling molecules. *Eur J Immunol.* 2003; 33(8):2178–85. <https://doi.org/10.1002/eji.200323898> PMID: 12884292
63. Zea AH, Ochoa MT, Ghosh P, Longo DL, Alvord WG, Valderrama L, et al. Changes in expression of signal transduction proteins in T lymphocytes of patients with leprosy. *Infect Immun.* 1998; 66(2):499–504. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.2.499-504.1998> PMID: 9453602
64. Kaplan G, Weinstein DE, Steinman RM, Levis WR, Elvers U, Patarroyo ME, et al. An analysis of in vitro T cell responsiveness in lepromatous leprosy. *J Exp Med.* 1985; 162(3):917–29. <https://doi.org/10.1084/jem.162.3.917> PMID: 3928804
65. de Sousa JR, Pagliari C, de Almeida DSM, Barros LFL, Carneiro FRO, Dias LB Jr, et al. Th9 cytokines response and its possible implications in the immunopathogenesis of leprosy. *J Clin Pathol.* 2017; 70(6):521–527. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2016-204110> PMID: 27927694
66. Oberley-Deegan RE, Lee YM, Morey GE, Cook DM, Chan ED, Crapo JD. The antioxidant mimetic, MnTE-2-PyP, reduces intracellular growth of *Mycobacterium abscessus*. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009; 41(2):170–178. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0138OC> PMID: 19097985
67. Mathur NK, Bumb RA, Mangal HN, Sharma ML. Oral zinc as an adjunct to dapsone in lepromatous leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1984; 52:331–338. PMID: 6541200
68. Vijayaraghavan R, Suribabu CS, Sekar B, Oommen PK, Kavithalakshmi SN, Madhusudhanan N, et al. Protective role of vitamin E on the oxidative stress in Hansen's disease (Leprosy) patients. *Eur J Clin Nutr.* 2005; 59(10):1121–1128. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602221> PMID: 16015260
69. Prabhakar MC, Santhikrupa D, Manasa N, Rao OU. Status of free radicals and antioxidants in leprosy patients. *Indian J Lepr.* 2013; 85(1):5–9. PMID: 24046909



S1 Fig. Gene expression of NADPH oxidase enzymes in whole blood and skin lesions. Quantitative PCR (qPCR) evaluation of NOX1 mRNA levels (A) in whole blood (L-Lep patients, Y n = 12 and E n = 13; T-Lep patients Y n = 12 and E n = 15; HV Y n = 10 and E n = 15), and NOX2 (B) in skin lesion samples (Y L-Lep n = 13 and E L-Lep n = 10; Y T-Lep n = 10 and E T-Lep n = 12). Bar graphs represent means \pm SD of each group. Data analysis was performed using Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison post-test. **P < 0.01, and ***P < 0.001. Abbreviations: E–Elderly; Y–Young; T-Lep–TT/BT patients; L-Lep–LL/BL patients; HV–healthy volunteers.

S1 Table. Oligonucleotides used in the study.

<i>Gene</i>	Gene name	Sequence 5' → 3'	Gene bank
<i>SOD1</i>	Superoxide dismutase 1	Fwd - GGAAGCATTAAGGACTGACTG Rev - CCAACATGCCTCTCTTCATCC	NM_000454.5
<i>SOD2</i>	Superoxide dismutase 2	Fwd - CAGCGGTAGCACCAGCACTARev - GAGCCCAGATACCCCAAAC	NM_000636.4
<i>GSR</i>	Glutathione-disulfide reductase	Fwd - CAGCCCTGGGTTCTAAGACAT Rev - CCTTGACCTGGGAGAACTTCAG	NM_000637.5
<i>GPX1</i>	Glutathione peroxidase 1	Fwd - GGAGAACGCCAAGAACGAAG Rev - CGCACTTCTCGAAGAGCATGA	NM_000581.4
<i>NOX1</i>	NADPH oxidase 1	Fwd - GTTCTGGTTGTTTGGTTAGGGCRev - ATTGCTTTCTCAGTGTGCGG	NM_007052.5
<i>NOX2</i>	NADPH oxidase 2	Fwd - TCCTATGACTTGGAAATGGATAGTGG Rev - CCTTCTTCTCATCTGTAGCTCG	NM_000397.4
<i>RPL13</i>	Ribosomal protein L13	Fwd - GACAAGAAAAAGCGGATGGTRev - GTACTTCCAGCCAACCTCGT	NM_000977.4
<i>RPS16</i>	Ribosomal protein S16	Fwd - GCGCACGCTACAGTACAAG Rev - AGATGGACTGACGGATAGCATA	NM_001020.6
<i>RPL35</i>	Ribosomal protein L35	Fwd - CGAGTCGTCCGAAATCCAT Rev - GGCTTGTACTTCTTGCCCTTG	NM_007209.4

S2 Table Biochemical data of analyzed group.

	E T-Lep	Y T-Lep	E L-Lep	Y L-Lep	E HV
Glucose (mg/dL)	98.4 ± 15.4	97.5 ± 23	109 ± 39.5	92.6 ± 7.6	119.4 ± 24.5
Creatinine (mg/dL)	1.1 ± 0.3	0.8 ± 0.3	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.2
Urea (mg/dL)	35.7 ± 10.5	30.3 ± 8.3	36.1 ± 9.2	26 ± 8.6	42.1 ± 13.6
Total bilirubin (mg/dL)	0.8 ± 0.3 ^b	0.3 ± 0.1 ^{b, c}	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.5	0.9 ± 0.3 ^c
Albumin (g/dL)	3.7 ± 0.4	3 ± 0.8	3.8 ± 0.5	3.7 ± 0.7	3.6 ± 1.9
Uric acid (mg/dL)	5.4 ± 0.9	3.6 ± 2.2	3 ± 1.2	2.9 ± 1.6	4.3 ± 1.4
Total cholesterol (mg/dL)	176.9 ± 40.4	150.5 ± 42.7 ^a	191.6 ± 24.9 ^a	182.4 ± 36.7	192.9 ± 46.7
Triglycerides (mg/dL)	140.4 ± 82.8	112.1 ± 66.3	126.5 ± 56.6	112.1 ± 66.4	146.9 ± 67.1
HDL (mg/dL)	34.2 ± 8.5 ^a	33 ± 6.1 ^{#, b}	55.8 ± 15.6 ^{a, #}	50.8 ± 12	51.8 ± 8.9 ^b
LDL (mg/dL)	101.9 ± 22.7	82.7 ± 21.6	99.9 ± 36.9	119.8 ± 31.6	111.6 ± 39.2
VLDL (mg/dL)	30.2 ± 17.9	21.8 ± 16.8	25.3 ± 12.2	24.9 ± 11.9	29.5 ± 13.5

^a*P* < 0.05; ^b*P* < 0.01; ^c*P* < 0.001; [#]*P* < 0.05

4.2 – ARTIGO 2

Frontiers: Congratulations! Your manuscript is accepted

De [Frontiers Immunology Editorial Office](#)

Para danuza@ioc.fiocruz.br

Data 15/02/2021 15:18

Dear Dr Esquenazi,

I am pleased to inform you that your manuscript PRESENCE OF SENESCENT AND MEMORY CD8+ LEUKOCYTES AS IMMUNOCENESCENCE MARKERS IN SKIN LESIONS OF ELDERLY LEPROSY PATIENTS has been approved for production and accepted for publication in Frontiers in Immunology, section Microbial Immunology.

A proof is being prepared for you to check before publication. A temporary version of the abstract is currently online but will be replaced with the full version when your article is published. Please do not communicate any changes until you receive your proof.

Manuscript title: PRESENCE OF SENESCENT AND MEMORY CD8+ LEUKOCYTES AS IMMUNOCENESCENCE MARKERS IN SKIN LESIONS OF ELDERLY LEPROSY PATIENTS

Journal: Frontiers in Immunology, section Microbial Immunology

Article type: Original Research

Authors: Pedro Henrique Lopes Silva, Katherine Kelda Gomes Castro, Mayara Abud Mendes, Thyago Leal Calvo, Julia Monteiro Pereira Leal, Jose Augusto Costa Nery, Euzenir Nunes Sarno, Roberto Alves Lourenço, Milton Ozório Moraes, Flavio AlvesLara, Danuza Esquenazi

Manuscript ID: 647385

Edited by: Fabienne Tacchini-Cottier

You can click here to access the final review reports and manuscript:

<http://www.frontiersin.org/Review/EnterReviewForum.aspx?activationno=277794db-f653-4234-93b5-4a6c5a72e8a2>

As an author, it is important that you maintain your Frontiers research network (Loop) profile up to date, as your publication will be linked to your profile allowing you and your publications to be more discoverable. You can update profile pages (profile pictures, short bio, list of publications) using this link: <http://loop.frontiersin.org/people/>

Thank you very much for taking the time to share your thoughts.

Kind regards,
Your Frontiers in Immunology team

Frontiers | Editorial Office - Collaborative Peer Review Team
www.frontiersin.org
12 Moorgate,
EC2R 6DA, London, UK
Office T 44 203 5144 082

Presence of Senescent and Memory CD8⁺ Leukocytes as Immunosenescence Markers in Skin Lesions of Elderly Leprosy Patients

OPEN ACCESS

Pedro Henrique Lopes da Silva ^{1*}, Katherine Kelda Gomes de Castro ^{1†}, Mayara Abud Mendes ^{1†}, Thyago Leal-Calvo ^{1†}, Júlia Monteiro Pereira Leal ^{1†}, José Augusto da Costa Nery ^{1†}, Euzenir Nunes Sarno ^{1†}, Roberto Alves Lourenço ^{2†}, Milton Ozório Moraes ^{1†}, Flávio Alves Lara ^{3†} and Danuza Esquenazi ^{1,4*}

Edited by:
Fabienne Tacchini-Cottier, University of
Lausanne, Switzerland

Reviewed by: Mirian
Nacagami Sotô, University of São Paulo,
Brazil; Guillaume Sarrabayroux, e,
Vall d'Hebron Research Institute
(VHIR), Spain

*Correspondence: Danuza Esquenazi
danuza@iccfocruz.br

Pedro Henrique Lopes da Silva
pedro.henrique10@gmail.com

†ORCID:

Pedro Henrique Lopes da Silva

orcid.org/0000-0001-7683-398X

Katherine Kelda Gomes de Castro

orcid.org/0000-0003-4324-0744

Mayara Abud Mendes

orcid.org/0000-0002-9689-6440

Thyago Leal-Calvo

orcid.org/0000-0001-9520-4791

Júlia Monteiro Pereira Leal

orcid.org/0000-0002-1048-2088

José Augusto da Costa Nery

orcid.org/0000-0003-0550-9327

Euzenir Nunes Sarno

orcid.org/0000-0003-0129-2159

Roberto Alves Lourenço

orcid.org/0000-0003-0838-1285

Milton Ozório Moraes

orcid.org/0000-0003-2653-0037

Flávio Alves Lara

orcid.org/0000-0002-2717-6597

Danuza Esquenazi

orcid.org/0000-0002-1312-7161

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

Received: 29 December 2020

Accepted: 15 February 2021

Published: 11 March 2021

¹Laboratório de Hanseníase, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, ²Laboratório de Envelhecimento Humano, Gerolab, Policlínica Piquet Carneiro, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, ³Laboratório de Microbiologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, ⁴Disciplina de Patologia Geral, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Leprosy is an infectious disease that remains endemic in approximately 100 developing countries, where about 200,000 new cases are diagnosed each year. Moreover, multibacillary leprosy, the most contagious form of the disease, has been detected at continuously higher rates among Brazilian elderly people. Due to the so-called immunosenescence, characterized by several alterations in the quality of the immune response during aging, this group is more susceptible to infectious diseases. In view of such data, the purpose of our work was to investigate if age-related alterations in the immune response could influence the pathogenesis of leprosy. As such, we studied 87 individuals, 62 newly diagnosed and untreated leprosy patients distributed according to the age range and to the clinical forms of the disease and 25 healthy volunteers, who were studied as controls. The frequency of senescent and memory CD8⁺ leukocytes was assessed by immunofluorescence of biopsies from cutaneous lesions, while the serum levels of IgG anti-CMV antibodies were analyzed by chemiluminescence and the gene expression of T cell receptors' inhibitors by RT-qPCR. We noted an accumulation of memory CD8⁺ T lymphocytes, as well as reduced CD8⁺CD28⁺ cell expression in skin lesions from elderly patients, when compared to younger people. Alterations in *LAG3* and *PDCD1* gene expression in cutaneous lesions of young MB patients were also observed, when compared to elderly patients. Such data suggest that the age-related alterations of T lymphocyte subsets can facilitate the onset of leprosy in elderly patients, not to mention other chronic inflammatory diseases.

Keywords: leprosy, elderly, immunosenescence, skin lesions, memory T cell, cytomegalovirus

INTRODUCTION

Leprosy is a neglected chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*, which remains a public health problem in low-income countries (1, 2). *M. leprae* affects mainly the skin and peripheral nervous system, where the bacilli are responsible for neurological damage, bone resorption, and irreversible physical disabilities (3–5). Genetic and environmental factors contribute to disease progression (3). Fortunately, around 95% of people are genetically resistant to *M. leprae* infection (3, 6).

Leprosy presents a wide spectrum of clinical forms, which is essentially determined by the presence (or absence) of cell-mediated immunity (CMI) against the pathogen. According to the Ridley and Jopling classification (7), tuberculoid forms (T-Lep) are characterized by a strong immune response to localized disease with a single (or few) skin lesion(s) without bacilli detection. On the other side, lepromatous forms (L-Lep) are characterized by several disseminated skin lesions with many bacilli, and the absence of CMI against *M. leprae*. Between these polar forms (TT and LL) there are borderline forms (BT, BB, and BL), which comprise most of the patients. In addition, there is also a WHO classification, a more practical and operational classification, which classifies leprosy patients into two groups: paucibacillary leprosy (PB leprosy) that presents five or less skin lesions and no apparent bacilli in slit-skin smears; and multibacillary leprosy (MB leprosy) with more than five skin lesions (8).

During the aging process, significant changes in the composition of peripheral T lymphocytes occur (9). These changes are mostly caused by decline in the output of naive T cells due to thymic involution and exposure to pathogens over the lifetime, especially latent viruses, such as cytomegalovirus (CMV), which are related to the accumulation of highly differentiated CD8⁺ memory T cells

(9, 10). Although a mechanism of compensation by homeostatic proliferation partly maintains the numbers of naive T cells in the periphery, the adaptive immune system in elderly people is characterized by higher proportions of memory T cells and lower proportions of naive T cells (11). CD8⁺ T cells play a central role in the recognition and clearance of intracellular pathogens, such as *M. leprae*. CD8⁺

T cell frequency is similar between the leprosy clinical forms, although functional features such as higher IL-10 levels in MB compared to PB patients in this T cell subset has been observed (12). Moreover, TNF-producing CD8⁺ T cells are

essential in the pathogenesis of the type 2 leprosy reaction in MB patients, these reactions are episodes of acute hypersensitivity presenting as aggravation of the previous symptoms and skin lesions (13).

During the aging process, the T cell costimulatory molecule, CD28 (needed for activation and survival), is lost, interfering in cellular signaling and functional aspects of these cells (14,15). The binding of CD28, expressed on the T cell surface, to CD80 or CD86 stimulates IL-2 production leading to T cell activation and proliferation, while signals through the TCR/CD3 complex in the absence of a costimulatory signal induces anergy (16). Recent works have shown that the loss of CD28 expression is a hallmark of senescent CD8⁺ T cells, and

proportion changes in CD8⁺CD28⁻ cells have been reported in aging-related diseases such as cancer, cardiovascular disease, and other chronic inflammatory diseases (17–19). Accumulating evidence indicates that CD8⁺CD28⁻ T cells

play a relevant role in immune response suppression, such as impairing T cell activation and proliferation, and inducing apoptosis in these cells *in vitro* (20, 21). The immunosuppressive mechanisms performed by these cells are diverse, including secretion of anti-inflammatory cytokines, increased expression of programmed cell death protein 1 (PD-1) and its ligands, and FasL (22, 23). Several studies showed that the CD28 constitutive expression level is similar between PB patients and healthy individuals, while MB patients presented lower CD28 expression (24–26). This suggests that upregulation of the CD28 molecule plays a critical role in the cell-mediated immunity response against

M. leprae, restricting the proliferation of the pathogen.

The present study aimed at investigating potential age-related alterations that are associated with CD8⁺ cells in elderly leprosy patients. For this purpose, blood and skin

lesion samples from young and elderly patients were evaluated for the frequency of memory and senescent CD8⁺

T cells, anti-CMV IgG titers, and gene expression of inhibitory T cell receptors. We observed the accumulation of memory CD8⁺ cells in the skin lesions of all elderly patients, followed

by a lower frequency of CD8⁺CD28⁺ in elderly PB patients compared to young ones. We also observed changes in gene expression of the *LAG3* and *PDCD1* receptors in cutaneous lesions of young MB patients and not in elderly leprosy patients.

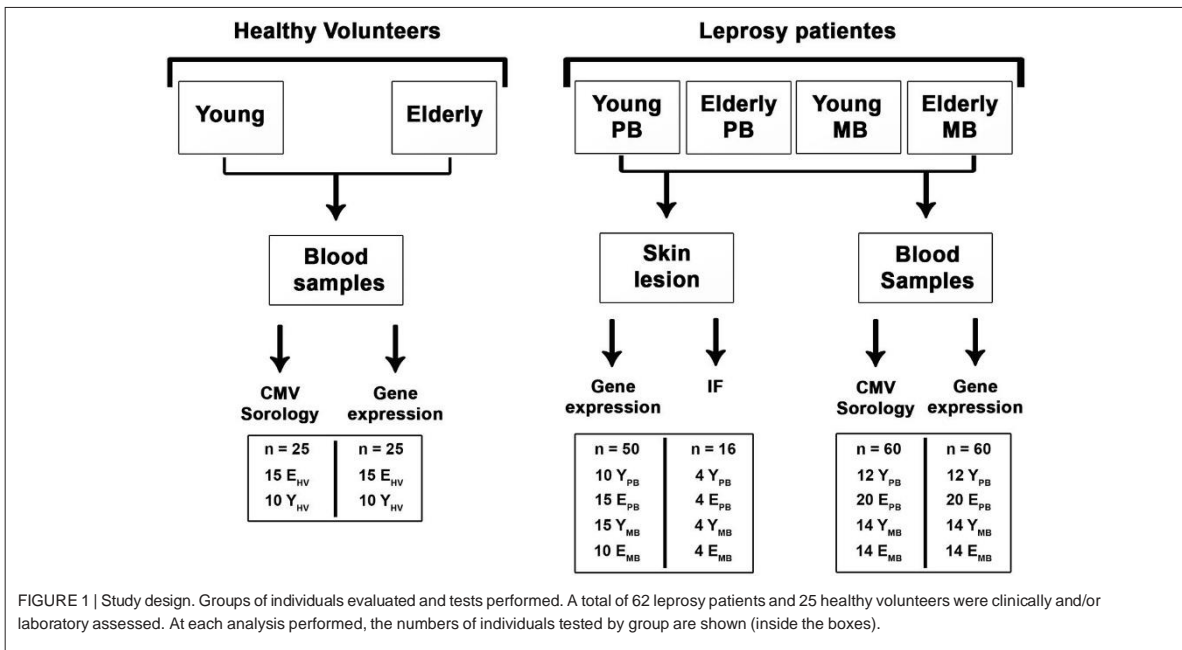
METHODS

Participants and Study Design

All enrolled leprosy patients were classified according to the Ridley and Jopling scale (1966), then the diagnosis was confirmed by clinical examination and histopathological analysis of skin lesions. Blood and skin lesion samples were collected before treatment (Figure 1). Patients were classified according to clinical forms and also stratified into two groups: young (20–40 years old) and elderly (over 60 years old). All patients and healthy volunteers resided in the metropolitan region of Rio de Janeiro state, Brazil, a leprosy endemic area. Exclusion criteria for leprosy patients and healthy elderly volunteers were: relapse cases, pregnancy or breast-feeding women, coinfections such as tuberculosis, hepatitis B and C, and HIV. Hypertensive and diabetic elderly individuals under drug control were included. As previously mentioned, our work used clinical samples of young and elderly patients diagnosed according to the R&J criteria. Nevertheless, in order to avoid repetitions, BL and LL individuals shall be hereinafter grouped as MB patients, and BT and TT as PB patients.

Ethical Considerations

The study was approved by the Institutional Ethics Committee of Oswaldo Cruz Foundation/FIOCRUZ (permit protocol number 27052919.0.0000.5248). Leprosy patients and healthy volunteers signed a written consent form to participate in the study. The biological samples from leprosy patients were obtained



at the Leprosy outpatient clinic (FIOCRUZ/Rio de Janeiro). Elderly healthy individuals were recruited at the Human Aging Laboratory - GeronLab, Policlínica Piquet Carneiro (UERJ/Rio de Janeiro).

Immunofluorescence Assay

Frozen skin lesion section assays were performed in a Leica LM3000 cryostat, fixed in paraformaldehyde. Unspecific bindingsites were blocked with 10% Fetal Calf Serum (FCS, GIBCO, LifeTechnologies) in 0.01 M of PBS for 1 h at room temperature. Permeabilization was performed by incubating the sections with 0.05% Triton X-100 for 15 min. Rat IgG2b anti-human CD8 (1:50; Abcam, ab60076), mouse IgG2a anti-human CD45RO (1:25; Abcam, ab86080), and rabbit IgG anti-human CD28 (1:50; Abcam, ab243228) or their respective isotypes were diluted in 1% Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma-Aldrich) in 0.01 M of PBS and incubated at 4°C overnight. Tissue sections were washed three times and incubated with Alexa Fluor 594 goat anti-Rat IgG (1:1,000, Abcam, ab150164), Alexa Fluor 633 goat anti-mouse IgG1 (1:1,000, ThermoFisher Scientific, A-21126), and Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (1:1,000, Abcam, ab150077) secondary antibodies for 1.5 h at room temperature. The nuclei were stained with 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 1:10,000, Molecular Probes, D1306), and slides were mounted with VECTASHIELD Mounting Medium (Vector Laboratories, H-1000). Tissues were imaged using an Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) using an EC Plan-Neofluar 20×/0.50 objective and Plan-Apochromat 63×/1.3 oil objective. Images were acquired with an AxioCam HRm digital camera, in the format of structured confocal

images by Apotome (Carl Zeiss), mathematically deconvoluted by the AxioVision Rel. 4.6 software (Carl Zeiss). For quantitative analysis of CD8⁺, CD45RO⁺, and CD28⁺ cells,

10 microscopic fields were imaged and the number of positive cells was counted in each field. The results were summarized as the average of fields' counts, as determined by three independent observers.

CMV Serology

IgG antibodies against CMV were determined in sera samples with a commercially available chemiluminescent microparticle immunoassay according to the manufacturer's instructions (Architect CMV IgG, Abbott Laboratories, Diagnostic Division, Sligo, Ireland). Absorbance was measured and an optical density (OD) ratio was calculated. The default result unit for the assay was AU/mL. Specimens with concentration values ≥ 15.0 AU/mL were considered reactive for IgG antibodies to CMV and indicated past or acute infection.

Total RNA Isolation and cDNA Synthesis

The total RNA from whole blood obtained by venous puncture was isolated using the PAXgene™ Blood RNA kit (Qiagen, Hilden, Germany) in accordance with the manufacturer's instructions. For biopsy specimens, RNA

from skin lesion samples (6 mm punch) was obtained using the Polytron Homogenizer Model PT3100 apparatus (Kinematica AG, Lucerne, Switzerland) in 2 mL of TRIzol™ Reagent (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA), following the manufacturer's instructions. Total RNA was treated with TURBO™ DNase (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's standard protocol, quantified, and their integrity was evaluated by agarose gel electrophoresis. RNA

reverse transcription into cDNA was performed as previously described (27).

Gene Expression Analysis by RT-qPCR
Quantitative RT-PCR was carried out with a final volume of 10 μ L containing 200 nM of each primers (**Supplementary Table 1**), 1X Fast SYBR[™] Green Master Mix (ThermoFisherScientific), and 10 ng of cDNA. All reactions were conducted with three technical replicates for each biological sample. No reverse transcriptase negative controls and no template controls were included in each run. The assays were performed on a StepOnePlus[™] Real-Time PCR Systems thermocycler (ThermoFisher Scientific) as detailed elsewhere (27). The relative expression levels of the genes of interest were normalized by ribosomal protein L13. qPCR data analysis was performed with the N_0 method implemented in LinRegPCR v. 2020.0, which considers qPCR mean efficiencies estimated by the window-of-linearity method as proposed by Ramakers et al. (28) and Ruijter et al. (29). Briefly, N_0 values were calculated in LinRegPCR using default parameters. Then, N_0 values from the gene of interest (GOI) were normalized by taking its ratio to the N_0 of the reference gene (REF) *RPL13a* (N_{GOI}/N_{REF}).

Biomark Fluidigm Gene Expression

Gene expression from whole blood was measured using Biomark's microfluidic-based qPCR technology. cDNA was obtained from RNA as described above. Then, 1.25 μ L of cDNA (from stock concentration of 5 ng/ μ L) was pre-amplified with a pool of 96 primer pairs (final concentration of 50 nM) with the TaqMan PreAmp Master Mix 2X (Applied Biosystems, USA, # 4391128) in a GeneAmp PCR System 9700 thermocycler for 14 cycles. All subsequent steps are detailed in research by Guerreiro et al. (27). For data analysis, initial quality control was performed based on melting curve analysis (MCA) using the Fluidigm Real-Time PCR Analysis Software v. 4.5.2, where targets with multiple dissociation curve peaks were removed from further analysis. Later, raw data were exported and processed with custom R scripts as described elsewhere by Guerreiro et al. (27). In brief, foreground data (EvaGreen) were adjusted by the subtraction of background (Rox) intensity to generate R_n (background-adjusted accumulated fluorescence). Then, qPCR reaction efficiency was estimated by fitting a four-parameter sigmoid model according to Rutledge and Stewart (30), with functions from the R package qpcR v.1.41-1 (31). Cycle thresholds (Ct) were determined from the maximum of the second derivative from the fitted sigmoid curve. Cts and efficiencies were used to estimate relative expression based on the method proposed by Pfaffl (32). The normalization factor used in the denominator for relative expression consisted of the geometric mean from *RPS16*, *RPL13*, and *RPL35* genes, selected as the most stable by the R implementation of the geNorm algorithm (33, 34).

Statistical Analysis

Results were analyzed using Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) V. 10.1 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) and Graph Prism V. 8 (San Diego, CA, USA) software. After testing

for normality (Shapiro-Wilk normality test), non-normally distributed data were analyzed through non-parametric tests. The Mann/Whitney U-test was used to test the differences between two groups, and comparisons between more than two groups were examined through the Kruskal-Wallis test followed by *post-hoc* Dunn's correction. Normally distributed data were compared using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. A *P*-value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Subject Demographics and Clinical Data

The present study enrolled 87 individuals, 62 of whom were patients diagnosed with leprosy and 25 were healthy Volunteers (HV). Both patients and HV were divided into two groups according to age: young (20–40 years age) and elderly (60 years age or older). The mean age of the young groups was 30 years of age (29.3 for young HV, 29.3 for young PB, 31.7 for young MB). In the elderly groups, the mean ages were 79.1, 69.1, and 67.7 years for elderly HV, elderly PB, and elderly MB patients, respectively. Participants' clinical and demographic data are shown in **Table 1**. According to the Ridley and Jopling classification of patient clinical spectrums, those in the MB group were classified as BL (40%) or LL (60%), while PB patients were either TT (12.5%) or BT (87.5%). Among elderly MB patients, there was a high frequency of male individuals when compared to the other groups. This unequal gender distribution was expected due to the influence of sex hormones on the immune response to infectious diseases. Lower education level (average of 5 years) of elderly patients was not related to a delay in diagnosing the disease. Although young patients had higher education levels when compared to elderly patients ($p = 0.0035$), especially in the PB group (10 years), the time from symptoms onset to disease diagnosis was, on average, 1 year for both young and elderly participants.

Bacterial load, as measured by the bacterial index (BI) in slit skin smears samples, was greater in young MB patients than in the elderly patients, although this difference was not significant ($p = 0.2932$). On the other hand, bacterial lesion index (BLI) was significantly greater in young MB patients than in elderly patients ($p = 0.0112$). This information is particularly interesting considering that the frequency of MB patients in young and elderly groups was similar.

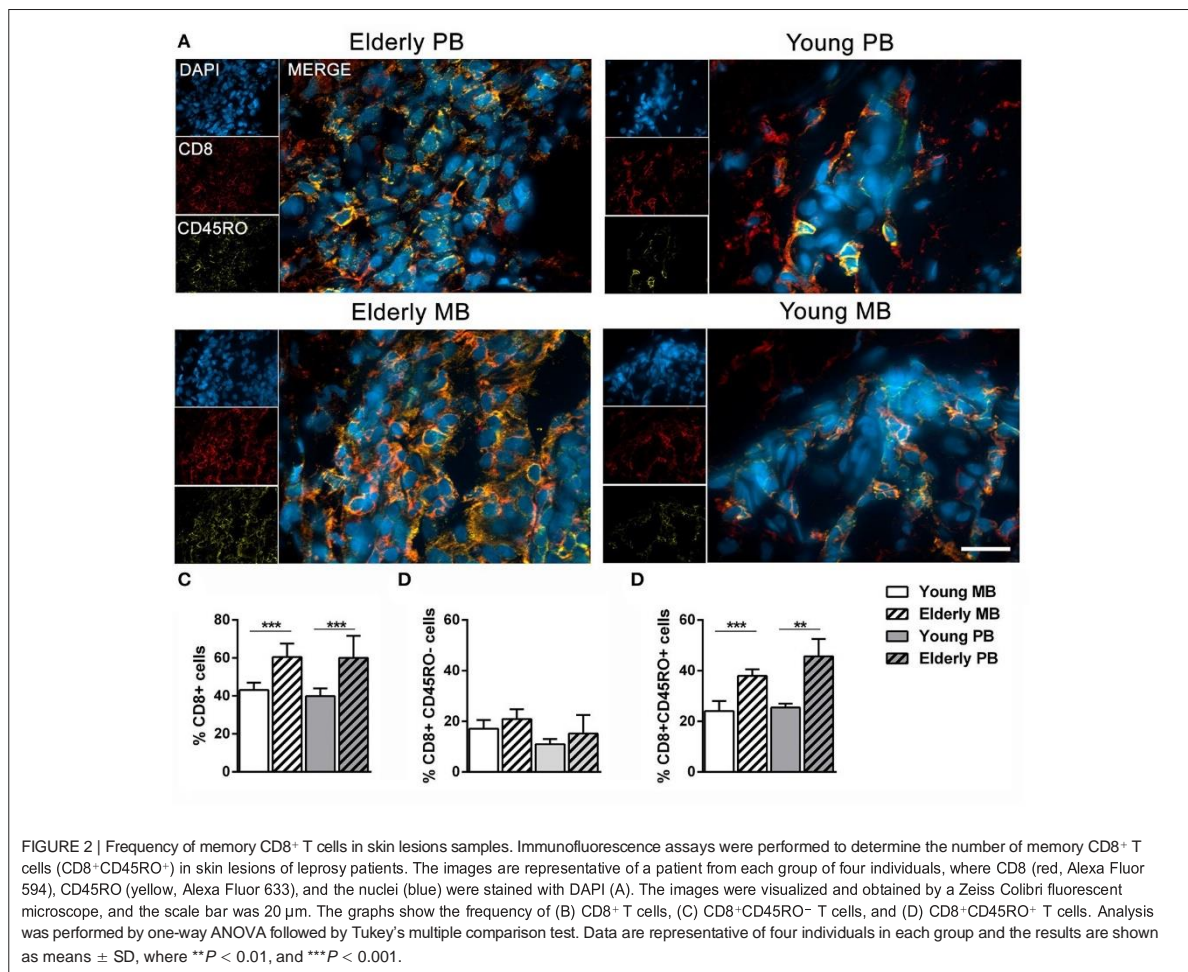
Memory Cutaneous CD8⁺ Cell Populations are More Frequent in Elderly Leprosy Patients

Memory CD8⁺ cells (CD8⁺CD45RO⁺) presence was detected in patients' skin lesions by labeling with anti-CD8 and anti-CD45RO antibodies, as described in the methods section. **Figure 2A** represents results from the four studied groups. CD8⁺ leukocytes were significantly higher in elderly skin lesions when compared to those of young patients, regardless of clinical form (**Figure 2B**). Memory CD8⁺ cells (CD8⁺CD45RO⁺) were also greater in elderly than in young patients (**Figure 2C**),

TABLE 1 | Characteristics of study population.

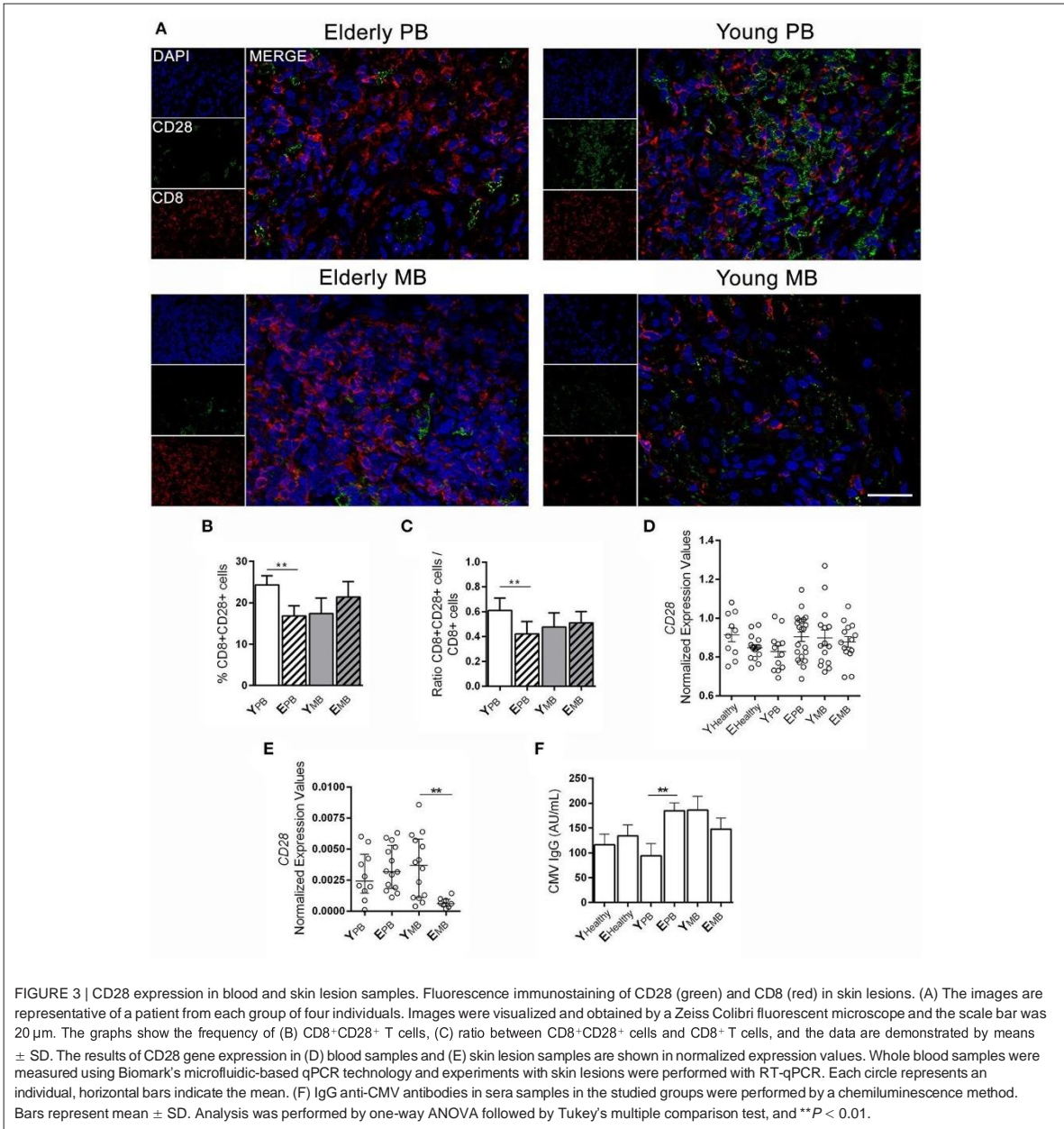
Groups	N	Age, years (Mean ± SD)	Sex (%male)	BI (Mean ± SD)	LBI (Mean ± SD)	DG (%)			Education level (Mean ± SD)	Time to diagnosis (median)
						0	I	II		
Y HV	10	29.3 ± 7.1	40	-	-	-	-	-	16.1 ± 5.7	-
E HV	15	79.1 ± 6.3	46.7	-	-	-	-	-	10.4 ± 4.1	-
Y PB	12	29.3 ± 6.2	66.7	0	0	83.3	16.7	0	10.1 ± 4.3	12
E PB	20	69.1 ± 7.5	30	0	0	90	5	5	5.9 ± 4.4	10
Y MB	15	31.7 ± 3.2	60	4.5 ± 1.2	4.9 ± 1.1	53.3	33.3	13.4	7.9 ± 4.3	11.5
E MB	15	67.7 ± 6.7	73.3	4.1 ± 1.1	3.7 ± 1.4	33.3	46.7	20	3.5 ± 2.8	11.5

Y, Young; E, Elderly; HV, Healthy Volunteers; PB, Paucibacillary leprosy; MB, Multibacillary leprosy; BI, Bacillary Index; LBI, Lesion Bacillary Index; DG, Disability Degree.



irrespective of clinical form. On the other hand, naïve cells (CD8⁺CD45RO⁻) were not significantly different in skin lesions from young and elderly patients (Figure 2D). As expected,

these results demonstrate an accumulation of memory CD8⁺ cells in elderly patient skin lesions, which is a process linked to immunosenescence.



Low Frequency of CD8⁺CD28⁺ Cells in Skin Lesion Samples of Elderly Leprosy Patients

Although CD8⁺ T lymphocytes play an important part in controlling *M. leprae* proliferation, the presence of these senescent lymphocytes (CD8⁺CD28⁻) may hinder the control of infection due to their regulatory T cell activities.

Figure 3A presents CD8 and CD28 expression in skin lesions of the groups of patients in this study. CD8⁺CD28⁺ cells were significantly more frequent in young PB than elderly PB patients in skin lesions ($p = 0.0015$; **Figure 3B**). However, the same was not observed among patients in MB groups, in which both young and elderly exhibited similar levels of CD8⁺CD28⁺ cells (**Figure 3B**). Ratios were calculated between CD8⁺CD28⁺ and total CD8⁺ cells in order to confirm the higher frequency of CD8⁺CD28⁺

cells in young PB patients when compared to total CD8⁺ cells (**Figure 3C**).

Gene expression of co-stimulating *CD28* in whole blood samples showed no difference in *CD28* mRNA expression in blood across the studied groups (**Figure 3D**). However, when it comes to *CD28* mRNA expression in skin lesions by RT-qPCR, elderly MB patients showed a significant reduction when compared to other groups in the study, including young patients with the same clinical form (**Figure 3E**; $p = 0.0024$).

Latent subclinical infection caused by CMV may lead to immunological alterations linked to aging, such as the accumulation of memory CD8⁺ cells that do not express CD28. We carried out detection of anti-CMV IgG in the serum of studied participants. All elderly patients were positive for anti-CMV IgG, while 85% of young patients were positive. The lowest frequency of anti-CMV IgG positive individuals occurred in the young and healthy group (72%). However, antibody titers were not correlated to CD8⁺CD28⁺ cells in any of the studied groups. Furthermore, in elderly PB patients, only those with significantly lower CD8⁺CD28⁺ cells presented higher anti-CMV IgG levels, as opposed to young PB patients (**Figure 3F**; $p = 0.0054$).

Regardless of Age, MB Patients Presented Higher Gene Expression of T Cell Inhibitory Receptors Than PB Patients

Regulatory T lymphocytes use diverse strategies to suppress the immune response mediated by other subpopulations of T lymphocytes. Therefore, we hypothesized that PD-1 and LAG3 T lymphocyte inhibition receptors (also known as CD279 and CD223, respectively) could be part of the suppression strategy, linked to greater susceptibility to infectious diseases such as leprosy. Furthermore, CMV infection may induce these inhibition receptors.

We carried out gene expression analysis of programmed cell death 1 (*PDCD1*) receptor and its ligands *PDCD1lg1* and *PDCD1lg2*, as well as lymphocyte activation protein (*LAG3*) in blood and skin lesion samples. Blood samples from patients and healthy controls showed similar expression levels of *LAG3* and *PDCD1* (**Figures 4 A, B**). In skin lesions, differences were observed between groups regardless of age. MB patients presented increased expression of *LAG3* and *PDCD1* in skin lesions in comparison to PB patients ($p < 0.0001$, $p = 0.0031$, respectively; **Figures 4 C, D**). Furthermore, young MB patients presented significantly higher expression in skin lesions than PB patients ($p = 0.0219$). It seems that *LAG3* and *PDCD1* could be associated with mechanisms leading to weaker T lymphocyte response to *M. leprae* in MB patients. However, the expression of these receptors does not seem to be related to aging, at least not under these studied conditions. Then, we analyzed putative age-related changes in programmed cell death receptor (*PDCD1*, i.e., *PDCD1lg1* and *PDCD1lg2*) gene expression in blood and skin lesions (**Supplementary Figure 1**) and no differences were observed among all groups tested. *PDCD1lg1* and *PDCD1lg2* also demonstrated no difference in gene expression between PB and MB patients, as opposed to *PDCD1*.

DISCUSSION

The aging process leads to a myriad of innate and adaptive immune system adaptations, which result in increased susceptibility to infections, reduction in vaccine response, and even greater incidence of cancer (35). Although these alterations are related to T cell mediated immune response, the mechanisms by which they increase susceptibility to infectious diseases remain unknown (36). Cunha and collaborators addressed these factors among elderly people affected by SARS-CoV-2 infection (37). Considering that *M. leprae* is capable of infecting a large amount of people, and only a minority will progress toward the disease (1), factors behind delayed disease onset that could be associated with changes in T lymphocyte subpopulations remain unclear. Studies in this area are even more relevant considering epidemiological tendencies of increased disease detection in the population over 60 years of age and stabilization in those between 15 and 60 years (38, 39), which could be increased in a transition from high-endemic to middle-endemicity.

The social impact of leprosy is high due to the physical sequelae that it may render, which are even more serious in the elderly population. Our work identified the increased frequency of physical incapacity in elderly, especially in MB patients, which is in agreement with other findings in the Brazilian population (38–40). Similarly, the greater frequency of males among MB patients has also been documented previously due to the progressive increase in MB leprosy with age (38, 39). It is known from experimental models of intracellular pathogens such as *Leishmania* (41), *Mycobacterium tuberculosis* (42), and *Paracoccidioides brasiliensis* (43) that testosterone is capable of increasing the levels of Th2 anti-inflammatory cytokines, such as IL-10 and IL-4, while estrogen induces a Th1 response, such as IL-2 and IFN- γ . These findings may explain the higher susceptibility of men for developing the multibacillary form of leprosy.

Herein, the observation of increased memory CD8⁺ cells in skin lesions of elderly patients corroborates preceding evidence that demonstrated increased subpopulations of these cells during aging (9, 44). Although T lymphocytes are essential for the elimination of *M. leprae*, many subpopulations have reduced activation and proliferation due to the absence of the CD28 costimulatory molecule. CD8⁺CD28⁻ T cells exhibit a senescence profile along with severe reduction in telomere function due to a long replication history (45). Although other cells may express CD8 molecules, such as NK (CD8⁺CD3⁻CD56⁺) cells (46), it is highly likely that these CD8⁺ cells found in the skin of our patients studied herein are T lymphocytes. NK cells are also present in granulomatous diseases, such as tuberculosis and tuberculoid leprosy (47). Nevertheless, few studies disclosed the frequency of these cells in skin lesions of patients affected by such diseases. While reduced expression of CD28 in peripheral blood T lymphocytes of MB patients has been previously described (24, 25), the current work provides new information correlating these data with age. We observed lower expression of CD28 molecules in CD8⁺ of elderly PB patients in comparison with young patients with the same clinical form. These findings could compromise the activation and proliferation of these cells,

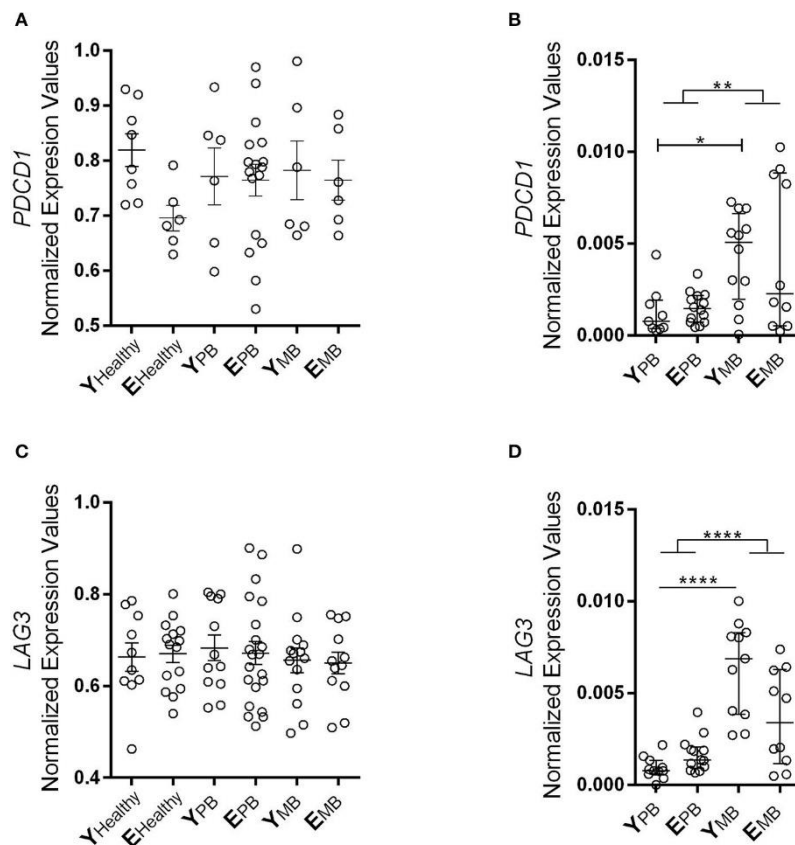


FIGURE 4 | PD-1 and LAG3 gene expression in whole blood and skin lesion samples. Expression of *PDCD1* gene on (A) blood and (B) skin samples. Expression of *LAG3* gene on (C) blood and (D) skin lesion samples. The results of these two inhibitory receptors are represented in normalized expression values. Whole blood samples were measured using Biomark's microfluidic-based qPCR technology and fragments of lesions were performed by RT-qPCR. Each circle represents an individual, and the horizontal bars indicate the mean. Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test correction was used to compare the groups. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and **** $P < 0.0001$.

favoring bacilli proliferation in elderly patients. Furthermore, $CD8^+CD28^-$ cells disclosed its ability to suppress immune activity, which could hamper the activation and proliferation of Th lymphocytes through different mechanisms, such as TGF- β and IL-10 secretion and expression of PDL-1 and FasL ligands (20, 21). Nonetheless, $CD8^+CD28^-$ T lymphocytes may also reduce the capacity of dendritic cells and monocytes to present *M. leprae*-derived antigens, through increased expression of *Ig-like transcript 3* (ILT3) and *4* (ILT4) (48). In summary, increased expression of senescent leukocytes in elderly patients could constitute a permissive environment that favors *M. leprae* replication and spread.

Our data are even more striking in the elderly PB patient group since they not only present lower $CD8^+CD28^+$ cells in skin lesions but showed increased detection of anti-CMV IgG antibodies in serum. Longitudinal studies have demonstrated that elderly people have a reduced capacity to resist new infections due to an excess of memory leukocytes, especially

$CD8^+CD28^-$. Another contributing factor is the scarcity of naive T lymphocytes that present a T lymphocyte receptor (TCR) repertoire (49–51). Studies suggest that T cell subsets frequencies may be caused, in part, by latent CMV control (52, 53). In fact, CMV seropositivity seems to be a determinant

factor of life expectancy, CMV $^+$ individuals who present other risk factors, such as increase in $CD8^+CD28^-$ cells tend to have a shorter life span (54, 55).

As age advances, a decline of distinct intensity in adaptive immune functions is observed. It is speculated that this decline may be explained by regulatory T lymphocytes (Treg), however, these data are still inconsistent. Some studies describe a reduction in Treg ($CD4^+CD25^+$) suppressive activity during aging (54), while others show that blood Treg frequency is higher in the elderly and that their depletion improves conventional $CD4^+$ T lymphocyte activity in these individuals (55). Here, expression of two receptors (PD-1 and LAG3) related to the suppression mechanisms of Treg cells does not appear to be associated to age in leprosy patients.

Our results show that, regardless of age, MB patients present higher expression levels of these two receptors in skin samples than PB patients. These results are in accordance with the fact that MB patients present a permissive environment for the proliferation of *M. leprae*, considering their high bacilli counts in cutaneous lesions. LAG3 receptor function seems to be influenced by different cytokines as well as by persistent antigen exposure (56). We found evidence that corroborates other studies showing that high bacillary load in MB patients may provide an environment that increases immunosuppressive action of Treg through LAG3. This could hinder the containment of bacilli, since LAG3 tends to increase Treg activity in an environment with high antigen exposure (57, 58). Similarly, increased PD-1 expression hampers effector T lymphocyte actions in containing *M. leprae* proliferation, resulting in high bacillary load, a characteristic of MB leprosy (59). For example, in an achronic infection model, blocking of PD-1 interaction with its ligands with nivolumab was able to revert the exhaustion of T lymphocytes (60). Taken together, our data suggest that changes in cell subpopulations associated with aging may facilitate the appearance of signs and symptoms of leprosy in elderly people exposed to *M. leprae*. Thus, the accumulation of memory CD8⁺ and reduced frequency of CD8⁺CD28⁺ cells in elderly patients constitute important immunosenescence changes that compromise the activation of resistance mechanisms against *M. leprae*. Future studies are necessary to evaluate the senescent cells response to bacterial challenge, confirm their hyporesponsiveness when compared to non-senescent cells and still, verify the functional profile of these subsets. On this basis, the data shown in this study provide information and perspectives on the implications of immunosenescence in leprosy progression, which can be extended to other models of chronic infectious diseases.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Institutional Ethics Committee of Oswaldo Cruz Foundation/FIOCRUZ (permit protocol number 27052919.0.0000.5248).

The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

DE: conceptualization. ES, MMo, RL, and DE: funding acquisition. PS, KC, TL-C, MMe, and JL: performed

the experiments. JN, RL and ES: clinical follow-up. PS, TL-C, MMe, FL, MMo, and DE: analyzed the data and writing. PS, MMo, and DE: review and editing. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

PS was a postgraduate student sponsored by FIOCRUZ/CAPES (in Portuguese: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, number 16.11.38.106). KC and TL-C were postgraduate students sponsored by FIOCRUZ/CNPq (in Portuguese: Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico, numbers 18.08.38.140 and 18.08.18.013 respectively). MMe and JL were postgraduate student sponsored by FIOCRUZ/CNPq, numbers 15.06.38.062 and 18.03.37.105, respectively. MM (process 313657/2018-1), ES (process 305105/2019-1), FL (process 31633/2017-7), and RL (process 309853/2019-2) are fellows sponsored by CNPq. This investigation received financial support from PAEF (in Portuguese: Projeto de Ações Estratégicas para Desenvolvimento e Fortalecimento dos Laboratórios Credenciados e das Áreas de Apoio à Pesquisa do IOC, process number IOC-023-FIO-18-2-41, MM) and PAPES VI/CNPq/Fiocruz (process number 422.103/2017-9, DE). The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to all the leprosy patients and non-leprosy volunteers for agreeing to participate in the study, as well as to Cristiane Domingues and José Augusto da Silva for their administrative assistance. Our recognition goes to Anna Beatriz Robottom Ferreira, a native speaker for editing the text.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.647385/full#supplementary-material>

Supplementary Figure 1 | PD-1 ligands gene expression in blood and skin lesions samples. Expression of *PDCD1LG1* gene on (A) whole blood samples and (B) skin samples, and *PDCD1LG2* gene on (C) whole blood samples and (D) skin specimens. The results of gene expression of these PD-1 ligands are represented in normalized expression values. In the whole blood, the analysis was performed by Bio mark's microfluidic-based qPCR technology and in the cutaneous fragments, analysis was performed by RT-qPCR. Each circle represents an individual, and horizontal bars indicate the mean. Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test correction was used to compare the groups.

Supplementary Table 1 | Oligonucleotides used in the study.

REFERENCES

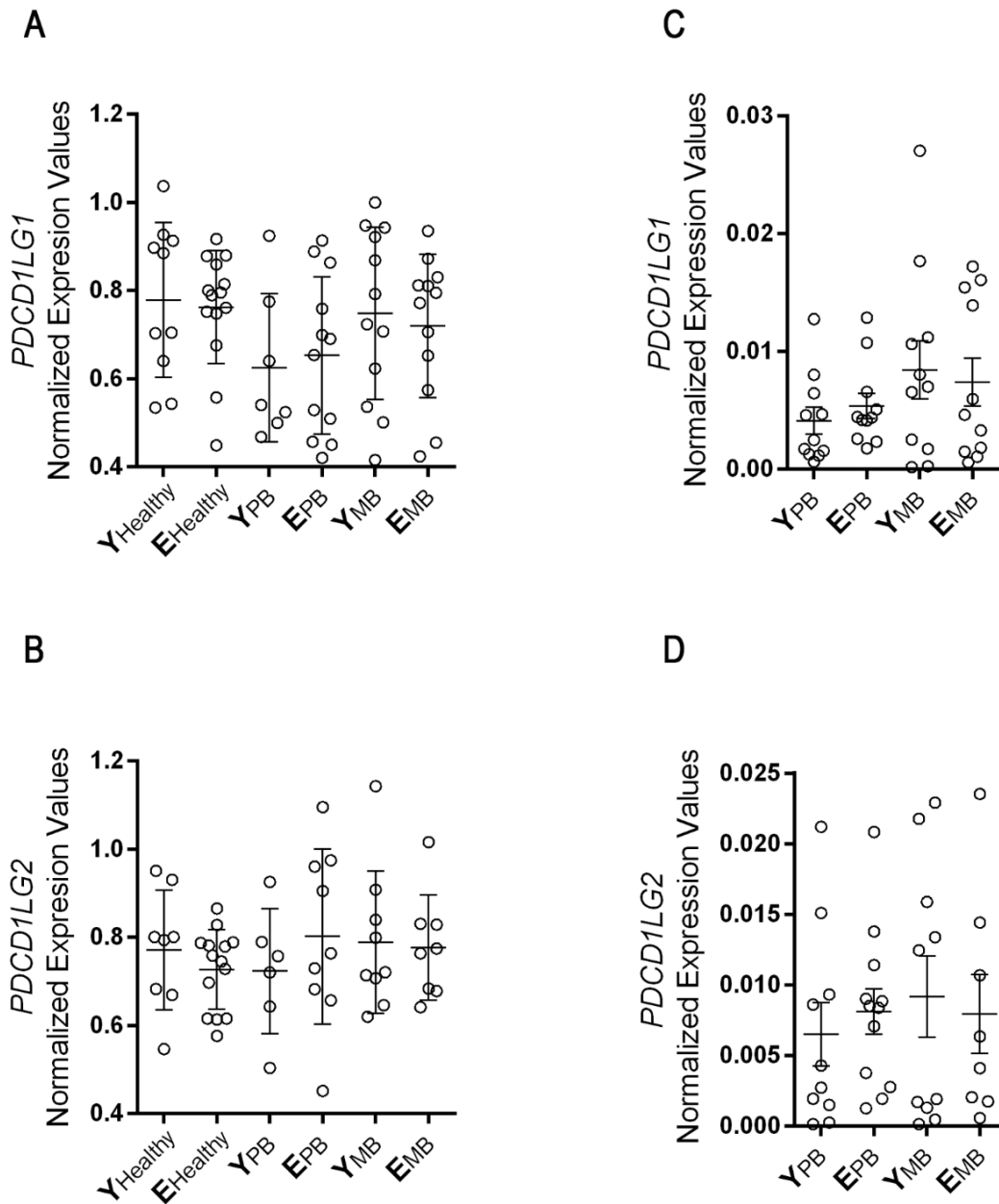
1. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev.* (2006) 19:338–81. doi: [10.1128/CMR.19.2.338-381.2006](https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.338-381.2006)
2. Foss NT, Motta AC. Leprosy, a neglected disease that causes a wide variety of clinical conditions in tropical countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* (2012) 107(Suppl.1):28–33. doi: [10.1590/S0074-02762012000900006](https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000900006)
3. Scollard DM, Truman RW, Ebenezer GJ. Mechanisms of nerve injury in leprosy. *Clin Dermatol.* (2015) 33:46–54. doi: [10.1016/j.clindermatol.2014.07.008](https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2014.07.008)
4. Lockwood DN, Saunderson PR. Nerve damage in leprosy: a continuing challenge to scientists, clinicians and service providers. *Int Health.* (2012) 4:77–85. doi: [10.1016/j.inhe.2011.09.006](https://doi.org/10.1016/j.inhe.2011.09.006)
5. Silva SR, Illarramendi X, Tempone AJ, Silva PH, Nery JA, Monteiro AM, et al. Downregulation of PHEX in multibacillary leprosy patients: observational cross-sectional study. *J Transl Med.* (2015) 13:296. doi: [10.1186/s12967-015-0651-5](https://doi.org/10.1186/s12967-015-0651-5)
6. Britton WJ, Lockwood DN. Leprosy. *Lancet.* (2004) 363:1209–19. doi: [10.1016/S0140-6736\(04\)15952-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15952-7)
7. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* (1966) 34:255–73.
8. World Health Organization (WHO). *Guide to Eliminate Leprosy as a Public Health Problem.* 1st ed. Geneva: World Health Organization (1995).
9. Boyd SD, Liu Y, Wang C, Martin V, Dunn-Walters DK. Human lymphocyte repertoires in ageing. *Curr Opin Immunol.* (2013) 25:511–5. doi: [10.1016/j.coi.2013.07.007](https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.07.007)
10. Fülöp T, Larbi A, Pawelec G. Human T cell aging and the impact of persistent viral infections. *Front Immunol.* (2013) 4:271. doi: [10.3389/fimmu.2013.00271](https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00271)
11. Goronzy JJ, Fang F, Cavanagh MM, Qi Q, Weyand CM. Naïve T cell maintenance and function in human aging. *J Immunol.* (2015) 194:4073–80. doi: [10.4049/jimmunol.1500046](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500046)
12. Carvalho JC, Araújo MG, Coelho-Dos-Reis JGA, Peruhype-Magalhães V, Alvares CC, Moreira ML, et al. Phenotypic and functional features of innate and adaptive immunity as putative biomarkers for clinical status and leprosy reactions. *Microb Pathog.* (2018) 125:230–9. doi: [10.1016/j.micpath.2018.09.011](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.09.011)
13. Silva PHL, Santos LN, Mendes MA, Nery JAC, Sarno EN, Esquenazi D. Involvement of TNF-Producing CD8+ effector memory T cells with immunopathogenesis of erythema nodosum leprosum in leprosy patients. *Am J Trop Med Hyg.* (2019) 100:377–85. doi: [10.4269/ajtmh.18-0517](https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0517)
14. Vallejo AN, Brandes JC, Weyand CM, Goronzy JJ. Modulation of CD28 expression: distinct regulatory pathways during activation and replicative senescence. *J Immunol.* (1999) 162:6572–9.
15. Esensten JH, Helou YA, Chopra G, Weiss A, Bluestone JA. CD28 costimulation: from mechanism to therapy. *Immunity.* (2016) 44:973–88. doi: [10.1016/j.immuni.2016.04.020](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.04.020)
16. Bour-Jordan H, Esensten JH, Martinez-Llordella M, Penaranda C, Stumpf M, Bluestone JA. Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/ B7 family. *Immunol Rev.* (2011) 241:180–205. doi: [10.1111/j.1600-065X.2011.01011.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01011.x)
17. Huff WX, Kwon JH, Henriquez M, Fetcko K, Dey M. The evolving role of CD8+CD28- immunosenescent T cells in cancer immunology. *Int J Mol Sci.* (2019) 20:2810. doi: [10.3390/ijms20112810](https://doi.org/10.3390/ijms20112810)
18. Pera A, Caserta S, Albanese F, Blowers P, Morrow G, Terrazzini N, et al. CD28null pro-atherogenic CD4 T-cells explain the link between CMV infection and an increased risk of cardiovascular death. *Theranostics.* (2018) 8:4509–4519. doi: [10.7150/thno.27428](https://doi.org/10.7150/thno.27428)
19. Teteloshvili N, Dekkema G, Boots AM, Heeringa P, Jellema P, de Jong D, et al. Involvement of MicroRNAs in the aging-related decline of CD28 expression by human T cells. *Front Immunol.* (2018) 9:1400. doi: [10.3389/fimmu.2018.01400](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01400)
20. Liu Z, Tugulea S, Cortesini R, Suci-Foca N. Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells. *Int Immunol.* (1998) 10:775–83. doi: [10.1093/intimm/10.6.775](https://doi.org/10.1093/intimm/10.6.775)
21. Chen X, Liu Q, Xiang AP. CD8+CD28- T cells: not only age-related cells but a subset of regulatory T cells. *Cell Mol Immunol.* (2018) 15:734–6. doi: [10.1038/cmi.2017.153](https://doi.org/10.1038/cmi.2017.153)
22. Liu Q, Zheng H, Chen X, Peng Y, Huang W, Li X, et al. Human mesenchymal stromal cells enhance the immunomodulatory function of CD8(+)/CD28(-) regulatory T cells. *Cell Mol Immunol.* (2015) 12:708–18. doi: [10.1038/cmi.2014.118](https://doi.org/10.1038/cmi.2014.118)
23. Reiser J, Banerjee A. Effector, memory, and dysfunctional CD8(+) T cell fates in the antitumor immune response. *J Immunol Res.* (2016) 2016:8941260. doi: [10.1155/2016/8941260](https://doi.org/10.1155/2016/8941260)
24. Sridevi K, Neena K, Chitralkha KT, Arif AK, Tomar D, Rao DN. Expression of costimulatory molecules (CD80, CD86, CD28, CD152), accessory molecules (TCR alpha/beta, TCR gamma/delta) and T cell lineage molecules (CD4+, CD8+) in PBMC of leprosy patients using *Mycobacterium leprae* antigen (MLCWA) with murabutide and T cell peptide of T rat protein. *Int Immunopharmacol.* (2004) 4:1–4. doi: [10.1016/j.intimp.2003.09.001](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2003.09.001)
25. Palermo Mde L, Trindade Mde A, Duarte AJ, Cacere CR, Benard G. Differential expression of the costimulatory molecules CD86, CD28, CD152 and PD-1 correlates with the host-parasite outcome in leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* (2012) 107(Suppl.1):167–73. doi: [10.1590/S0074-02762012000900024](https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000900024)
26. Dagur PK, Sharma B, Kumar G, Khan NA, Katoch VM, Sengupta U, et al. Mycobacterial antigen(s) induce anergy by altering TCR- and TCR/CD28- induced signalling events: insights into T-cell unresponsiveness in leprosy. *Mol Immunol.* (2010) 47:943–52. doi: [10.1016/j.molimm.2009.11.009](https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.11.009)
27. Guerreiro LTA, Robottom-Ferreira AB, Ribeiro-Alves M, Toledo-Pinto TG, Rosa Brito T, Rosa PS, et al. Gene expression profiling specifies chemokine, mitochondrial and lipid metabolism signatures in leprosy. *PLoS ONE.* (2013) 8:e64748. doi: [10.1371/journal.pone.0064748](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064748)
28. Ramakers C, Ruijter JM, Lekanne Deprez RH, Moorman AFM. Assumption-free analysis of quantitative real-time PCR data. *Neurosci Lett.* (2003) 339:62–6. doi: [10.1016/S0304-3940\(02\)01423-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)01423-4)
29. Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars W, Bakker O, van den Hoff MJB, Karlen Y, et al. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* (2009) 37:e45. doi: [10.1093/nar/gkp045](https://doi.org/10.1093/nar/gkp045)
30. Rutledge R, Stewart D. A kinetic-based sigmoidal model for the polymerase chain reaction and its application to high-capacity absolute quantitative real-time PCR. *BMC Biotechnology.* (2008) 8:47. doi: [10.1186/1472-6750-8-47](https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-47)
31. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* (2001) 29:e45. doi: [10.1093/nar/29.9.e45](https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45)
32. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paep A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* (2002) 3:34. doi: [10.1186/gb-2002-3-7-research0034](https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034)
33. Perkins JR, Dawes JM, Orengo C, McMahon SB, Bennett DL, Kohl M. ReadqPCR and NormqPCR: R packages for the reading, quality checking and normalisation of RT-qPCR quantification cycle (Cq) data. *BMC Genomics.* (2012) 13:296. doi: [10.1186/1471-2164-13-296](https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-296)
34. McElhane JE, Effros RB. Immunosenescence: what does it mean to health outcomes in older adults? *Curr Opin Immunol.* (2009) 4:418–24. doi: [10.1016/j.coi.2009.05.023](https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.05.023)
35. Hakim FT, Gress RE. Immunosenescence: deficits in adaptive immunity in the elderly. *Tissue Antigens.* (2007) 70:179–89. doi: [10.1111/j.1399-0039.2007.00891.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2007.00891.x)
36. Cunha LL, Perazzio SF, Azzi J, Cravedi P, Riella LV. Remodeling of the immune response with aging: immunosenescence and its potential impact on COVID-19 immune response. *Front Immunol.* (2020) 11:1748. doi: [10.3389/fimmu.2020.01748](https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01748)
37. Oliveira JSS, Reis ALMD, Margalho LP, Lopes GL, Silva ARD, Moraes NS, et al. Leprosy in elderly people and the profile of a retrospective cohort in an endemic region of the Brazilian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis.* (2019) 13:e0007709. doi: [10.1371/journal.pntd.0007709](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007709)

39. Nobre ML, Illarramendi X, Dupnik KM, Hacker MA, Nery JA, Jerônimo SM, et al. Multibacillary leprosy by population groups in Brazil: Lessons from an observational study. *PLoS Negl Trop Dis*. (2017) 11:e0005364. doi: [10.1371/journal.pntd.0005364](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005364)
40. Matos TS, Carmo RFD, Santos FGB, Souza CD F. Leprosy in the elderly population and the occurrence of physical disabilities: is there cause for concern? *Ann Bras Dermatol*. (2019) 94:243–5. doi: [10.1590/abd1806-4841.20198067](https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20198067)
41. Snider H, Lezama-Davila C, Alexander J, Satoskar AR. Sex hormones and modulation of immunity against leishmaniasis. *Neuroimmunomodulation*. (2009) 16:106–13. doi: [10.1159/000180265](https://doi.org/10.1159/000180265)
42. Bini EI, Mata Espinosa D, Marquina Castillo B, Barrios Payán J, Colucci D, Cruz AF, et al. The influence of sex steroid hormones in the immunopathology of experimental pulmonary tuberculosis. *PLoS ONE*. (2014) 9:e93831. doi: [10.1371/journal.pone.0093831](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093831)
43. Pinzan CF, Ruas LP, Casabona-Fortunato AS, Carvalho FC, Roque-Barreira MC. Immunological basis for the gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *PLoS ONE*. (2010) 5:e10757. doi: [10.1371/journal.pone.0010757](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010757)
44. Gupta S, Bi R, Su K, Yel L, Chiplunkar S, Gollapudi S. Characterization of naive, memory and effector CD8+ T cells: effect of age. *Exp Gerontol*. (2004) 4:545–50. doi: [10.1016/j.exger.2003.08.013](https://doi.org/10.1016/j.exger.2003.08.013)
45. Effros RB, Boucher N, Porter V, Zhu X, Spaulding C, Walford RL, et al. Decline in CD28+ T cells in centenarians and in long-term T cell cultures: a possible cause for both in vivo and in vitro immunosenescence. *Exp Gerontol*. (1994) 29:601–9. doi: [10.1016/0531-5565\(94\)90073-6](https://doi.org/10.1016/0531-5565(94)90073-6)
46. McKinney EF, Cuthbertson I, Harris KM, Smilek DE, Connor C, Manferrari G, et al. A CD8+ NK cell transcriptomic signature associated with clinical outcome in relapsing remitting multiple sclerosis. *Nat Commun*. (2021) 12:635. doi: [10.1038/s41467-020-20594-2](https://doi.org/10.1038/s41467-020-20594-2)
47. Sadhu S, Mitra DK. Emerging concepts of adaptive immunity in leprosy. *Front Immunol*. (2018) 9:604. doi: [10.3389/fimmu.2018.00604](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00604)
48. Vlad G, Cortesini R, Suciu-Foca N. License to heal: bidirectional interaction of antigen-specific regulatory T cells and tolerogenic APC. *J Immunol*. (2005) 174:5907–14. doi: [10.4049/jimmunol.174.10.5907](https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.10.5907)
49. Reker-Hadrup S, Strindhall J, Kollgaard T, Seremet T, Johansson B, Pawelec G, et al. Longitudinal studies of clonally expanded CD8 T cells reveal a repertoire shrinkage predicting mortality and increased number of dysfunctional cytomegalovirus-specific T cells in the elderly. *J Immunol*. (2006) 176:2645–53. doi: [10.4049/jimmunol.176.4.2645](https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.4.2645)
50. Wikby A, Månsson IA, Johansson B, Strindhall J, Nilsson SE. The immune risk profile is associated with age and gender: findings from three Swedish population studies of individuals 20-100 years of age. *Biogerontology*. (2008) 9:299–308. doi: [10.1007/s10522-008-9138-6](https://doi.org/10.1007/s10522-008-9138-6)
51. Derhovanessian E, Larbi A, Pawelec G. Biomarkers of human immunosenescence: impact of Cytomegalovirus infection. *Curr Opin Immunol*. (2009) 21:440–5. doi: [10.1016/j.coi.2009.05.012](https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.05.012)
52. Schwanninger A, Weinberger B, Weiskopf D, Herndl-Brandstetter D, Reitingger S, Gassner C, et al. Age-related appearance of a CMV-specific high-avidity CD8+ T cell clonotype which does not occur in young adults. *Immun Ageing*. (2008) 5:14. doi: [10.1186/1742-4933-5-14](https://doi.org/10.1186/1742-4933-5-14)
53. Nikolich-Zugich J. Ageing and life-long maintenance of T-cell subsets in the face of latent persistent infections. *Nat Rev Immunol*. (2008) 8:512–22. doi: [10.1038/nri2318](https://doi.org/10.1038/nri2318)
54. Tsaknaridis L, Spencer L, Culbertson N, Hicks K, LaTocha D, Chou YK, et al. Functional assay for human CD4+CD25+ Treg cells reveals an age-dependent loss of suppressive activity. *J Neurosci Res*. (2003) 74:296–308. doi: [10.1002/jnr.10766](https://doi.org/10.1002/jnr.10766)
55. Lages CS, Suffia I, Velilla PA, Huang B, Warshaw G, Hildeman DA, et al. Functional regulatory T cells accumulate in aged hosts and promote chronic infectious disease reactivation. *J Immunol*. (2008) 181:1835–48. doi: [10.4049/jimmunol.181.3.1835](https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.3.1835)
56. Graydon CG, Balasko AL, Fowke KR. Roles, function and relevance of LAG3 in HIV infection. *PLoS Pathog*. (2019) 15:e1007429. doi: [10.1371/journal.ppat.1007429](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007429)
57. Do JS, Visperas A, Sanogo YO, Bechtel JJ, Dvorina N, Kim S, et al. An IL-27/Lag3 axis enhances Foxp3+ regulatory T cell-suppressive function and therapeutic efficacy. *Mucosal Immunol*. (2016) 9:137–45. doi: [10.1038/mi.2015.45](https://doi.org/10.1038/mi.2015.45)
58. Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity*. (2004) 21:503–13. doi: [10.1016/j.immuni.2004.08.010](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.08.010)
59. Chaves AT, Ribeiro-Junior AF, Lyon S, Medeiros NI, Cassirer-Costa F, Paula KS, et al. Regulatory T cells: Friends or foe in human *Mycobacterium leprae* infection? *Immunobiology*. (2018) 223:397–404. doi: [10.1016/j.imbio.2017.11.002](https://doi.org/10.1016/j.imbio.2017.11.002)
60. Nguyen LT, Ohashi PS. Clinical blockade of PD1 and LAG3-potential mechanisms of action. *Nat Rev Immunol*. (2015) 15:45–56. doi: [10.1038/nri3790](https://doi.org/10.1038/nri3790)

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Citation: da Silva PHL, de Castro KKG, Mendes MA, Leal-Calvo T, Leal JMP, Nery JAdC, Sarno EN, Lourenço RA, Moraes MO, Lara EA and Esquenazi D (2021) Presence of Senescent and Memory CD8+ Leukocytes as Immunosenescence Markers in Skin Lesions of Elderly Leprosy Patients. *Front. Immunol.* 12:647385. doi: [10.3389/fimmu.2021.647385](https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.647385)

Copyright © 2021 da Silva, de Castro, Mendes, Leal-Calvo, Leal, Nery, Sarno, Lourenço, Moraes, Lara and Esquenazi. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Supplementary Figure 1. PD-1 ligands gene expression in blood and skin lesion samples. Expression of PDCD1LG1 gene on (A) whole blood samples and (B) skin samples, and PDCD1LG2 gene on (C) whole blood samples and (D) skin specimens. The results of gene expression of these PD-1 ligands are represented in normalized expression values. In the whole blood, the analysis was performed by Bio mark's microfluidic-based qPCR technology and in the cutaneous fragments, analysis was performed by RT-qPCR. Each circle represents an individual, and horizontal bars indicate the mean. Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test correction was used to compare the groups.

Table S1: Oligonucleotides used in the study.

Gene	Official full name	Sequence 5' → 3'	Gene bank
<i>PDCD1</i>	Programmed cell death 1	Fwd - GCACGAGGGACAATAGGAGC Rev - ATAGTCCACAGAGAACACAGGC	NM_005018.3
<i>PDCD1LG1</i>	Programmed cell death 1 ligand 1	Fwd - AGGGAGAATGATGGATGTGAA Rev - CGTCTCCTCCAAATGTGTATCA	NM_014143.4
<i>PDCD1LG2</i>	Programmed cell death 1 ligand 2	Fwd - TTCACCAGATAGCAGCTTTATTCA Rev - GCTCCAAGGTTACATGACTTC	NM_025239.4
<i>LAG3</i>	Lymphocyte activating 3	Fwd - CACCTCCTGCTGTTTCTCATC Rev - GTCTTGGTCGCCACTGTCTT	NM_002286.6
<i>CD28</i>	CD28 molecule	Fwd - TTAGCTGCAAGTATTCCTACAATCTC Rev - AGCACTATCCAGTCCCTTTGTGAAG	NM_006139.4
<i>RPL13</i>	Ribosomal protein L13	Fwd - GACAAGAAAAAGCGGATGGT Rev - GTACTCCAGCCAACCTCGT	NM_000977.4
<i>RPS16</i>	Ribosomal protein S16	Fwd - GCGCACGCTACAGTACAAG Rev - AGATGGACTGACGGATAGCATA	NM_001020.6
<i>RPL35</i>	Ribosomal protein L35	Fwd - CGAGTCGTCCGAAATCCAT Rev - GGCTTGACTTCTTGCCCTTG	NM_007209.4

Fwd, forward primer; *Rev*, reverse primer.

5 - DISCUSSÃO

Nesta seção da presente tese de doutorado serão discutidos, de forma integrada, os resultados obtidos e descritos nos artigos 1 e 2 que foram apresentados anteriormente.

Tendo em vista que o *M. leprae* pode infectar uma grande quantidade de pessoas e que apenas uma minoria desenvolve sinais e sintomas da doença, os fatores para o início da Hanseníase somente nas fases mais tardias da vida, em indivíduos que habitam áreas endêmicas, podem estar associados a alterações relacionadas à idade, como o aumento progressivo no estresse oxidativo e à imunossenescência. Essa indagação torna-se ainda mais relevante considerando as tendências epidemiológicas de aumento da detecção da doença na população acima de 60 anos e estabilização dos casos na faixa etária de 15 a 60 anos (Nobre *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2019). Dessa forma, a presente tese traz dados de uma investigação que buscou analisar possíveis alterações de parâmetros ligados à imunossenescência e ao estresse oxidativo em pacientes idosos, comparando-os com pacientes jovens e indivíduos idosos e jovens sem Hanseníase.

O estudo desenvolveu-se a partir de amostras de sangue periférico e lesão de pele de pacientes com hanseníase das formas PB e MB, divididos de acordo com a idade: jovens (20 a 40 anos) e idosos (acima de 60 anos). Embora todos os pacientes acompanhados no Ambulatório Sousa Araújo, parte integrante do Laboratório de Hanseníase, tenham recebido o diagnóstico da doença de acordo com o espectro de formas clínicas da classificação de Ridley e Jopling, os pacientes TT e BT foram analisados em conjunto como pertencentes às formas PB, e, da mesma forma, os pacientes BL e LL foram agrupados como MB. Além disso, amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis foram incluídas no estudo como parâmetro de controle dos experimentos. Assim como os pacientes, os voluntários saudáveis também foram divididos em dois grupos em função da idade: jovens (20 – 40 anos) e idosos (maiores de 60 anos).

Quanto aos aspectos clínicos e demográficos dos indivíduos incluídos neste estudo, destacou-se a maior frequência de homens idosos nas formas MB, assim como a maior frequência de GI2 nos pacientes idosos MB, fato acompanhado pelo menor grau de escolaridade nos pacientes idosos.

Estudos anteriores já demonstraram que homens idosos têm maiores riscos de

desenvolverem as formas BL e LL da Hanseníase quando comparados às mulheres (Nobre *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2019). Não há um consenso sobre os fatores que geram essa masculinização dos casos MB em idosos, entretanto, algumas hipóteses já foram levantadas, e entre elas está a influência dos hormônios esteroides sexuais na resposta imune. Tendo em vista que as formas MB são caracterizadas pela menor resposta imune do tipo T_H1 ao *M. leprae* e que a interação da testosterona com seus receptores nos linfócitos T CD4⁺ inibe a diferenciação dessas células para o fenótipo T_H1 (Kissick *et al.*, 2014), pode-se considerar a participação dos hormônios sexuais na diferenciação das formas clínicas na Hanseníase (Nobre *et al.*, 2017).

Outro aspecto clínico em destaque foi o GI2, verificado em maior frequência nos pacientes MB, sobretudo nos idosos. As incapacidades físicas causadas pela Hanseníase são resultantes, essencialmente, dos danos em nervos que passam pela face, braços e pernas (Ministério da Saúde, 2001). O grau dois é identificado quando há deformidades visíveis nas mãos, pés ou olhos, ou deficiência visual grave. O estudo de Nobre e colaboradores demonstrou que o GI2 está ligado à Hanseníase MB, além disso, pode ser considerado um preditor da demora do diagnóstico (Srinivas *et al.*, 2019).

Embora o diagnóstico precoce esteja associado a um menor GI, o tempo para o diagnóstico foi bastante semelhante entre os grupos estudados: por volta de 11 meses. Outro fator que não esteve relacionado à demora para o diagnóstico foi o grau de escolaridade. Como já esperado, devido aos projetos recentes de universalização da educação básica, os pacientes jovens estudaram por mais tempo que os pacientes idosos. Entretanto, isso parece não interferir no tempo para diagnóstico. Outros fatores como equidade de acesso à saúde pública e qualificação dos médicos da saúde da família devem ser considerados (Avancini *et al.*, 2019).

Inicialmente, este trabalho dedicou-se a entender a variação do dano causado pelas EROs entre os pacientes e indivíduos não hansenianos e a influência da idade nesse contexto. Sabe-se que o declínio das funções fisiológicas em idosos está ligado ao enfraquecimento do sistema antioxidante, que é potencializado pelo acúmulo do dano oxidativo durante a vida (Pomatto & Davies, 2018; Aiello *et al.*, 2019). Além disso, a ativação e proliferação das subpopulações de linfócitos T é prejudicada pelas espécies reativas de oxigênio tendo em vista que estas podem causar alterações na estrutura proteica na cadeia ζ (zeta) do complexo receptor antigênico da célula T (Cemerski *et al.*, 2003).

Dessa forma, o presente trabalho avaliou o estresse oxidativo nos indivíduos por meio do dano molecular e tecidual a partir do 4-HNE (nas amostras de lesão de pele) e a concentração de proteínas de proteínas carboniladas (no soro). A avaliação desses marcadores mostrou que ambos estavam em níveis maiores nos pacientes idosos em comparação com os pacientes jovens, sobretudo nos pacientes idosos MB.

Outro ponto que mereceu destaque, foi a associação entre a eliminação do bacilo durante e após a PQT e o aumento do estresse oxidativo, observado somente nos pacientes MB idosos. Esses dados em conjunto mostram que, embora o *M. leprae* aumente a expressão de EROs nos pacientes MB jovens, por meio da expressão aumentada de NOX2, estes pacientes controlam o dano oxidativo, considerando que há um aumento na expressão de enzimas que compõem o sistema antioxidante. E, com a progressiva eliminação dos bacilos ao longo da administração da PQT, os níveis de proteínas carboniladas aumentaram. Desta forma, podemos afirmar, pelo menos em tese, que o *M. leprae* por mais que induza uma resposta inflamatória potencializadora da síntese de EROs, é capaz de induzir o sistema antioxidante e, portanto, constituir um microambiente permissivo para sua proliferação.

A capacidade do *M. leprae* de aumentar a expressão de enzimas antioxidantes já foi demonstrada em outros trabalhos. Utilizando o modelo in vitro com cultura de células de Schwann, um elegante estudo brasileiro mostrou que o patógeno é capaz de reduzir o estresse oxidativo, aumentando a atividade enzimática da GR e reduzindo a atividade mitocondrial, a maior fonte de EROs (Medeiros *et al.*, 2016). A regulação aumentada da GR e a menor produção de EROs na fosforilação oxidativa é essencial para a composição de um microambiente ideal para a sobrevivência e proliferação do *M. leprae*. Diferente do *M. tuberculosis*, o *M. leprae* possui diversas deleções em genes como *furA* e *katG* que são essenciais para a neutralização de certas EROs, como o superóxido (Zahrt & Deretic, 2002). Portanto, o *M. tuberculosis* pode ser menos suscetível aos EROs que o agente etiológico da Hanseníase.

Em nosso modelo de estudo, as enzimas SOD1, SOD2 e GPX1 apresentaram a expressão gênica na lesão de pele aumentada em pacientes MB jovens em comparação com os idosos das mesmas formas clínicas. A comparação da expressão gênica dessas enzimas nos pacientes PB não apresentou diferença em função da idade. Embora o aumento da expressão dessas enzimas antioxidantes esteja relacionado com a maior carga bacilar, e, tendo em vista a maior expressão nos jovens MB do que nos jovens PB, o dano oxidativo, medido pelos níveis de proteínas

carboniladas, não parece ser diretamente proporcional ao IB, mas apenas ligada ao processo de envelhecimento, como demonstrou a análise GLM (modelo linear geral). Ou seja, em pacientes MB, à medida que a idade avançou, menor foi a expressão de enzimas antioxidantes e maior foi o dano oxidativo observado por nós.

Ainda no contexto do dano oxidativo estimado pela presença do 4-HNE nas lesões cutâneas, os pacientes idosos, MB ou PB, exibiram níveis maiores quando comparados aos pacientes jovens, independente da forma da doença. Devido às duas características químicas, o 4-HNE é bastante estável e consegue fluir no interior e para fora da célula (Meagher & FitzGerald, 2000).

Dessa forma, nossos resultados apontaram que a marcação do 4-HNE ocorreu ao redor das células e/ou no interior delas e, no infiltrado inflamatório das lesões de pele dos pacientes idosos, sobretudo, ao redor ou no interior dos linfócitos T de memória (CD8⁺CD45RO⁺), células que já estão em maior frequência nos tecidos de indivíduos idosos (Boyd *et al.*, 2013). Naturalmente, a capacidade de resposta desses linfócitos T de memória nos idosos é baixa, devido ao longo histórico replicativo dessas células e alteração dos padrões de expressão gênica (Cao *et al.*, 2010). Neste caso, o estudo ainda mostrou que essa capacidade de resposta pode estar ainda mais reduzida em função da presença do dano oxidativo que contribui para a anergia e/ou hiporresponsividade dessas células (Cemerski *et al.*, 2003). Nesse sentido, o 4-HNE pode agravar a inflamação na lesão de pele, ao passo que esse lipídio peroxidado pode ativar a via de sinalização do NF-KB e da ciclo-oxigenase-2 (Zhang & Forman, 2017; Uchida, 2017).

Ainda em relação ao estresse oxidativo, nosso grupo buscou investigar alterações relacionadas ao perfil lipídico que pudessem estar ligadas a este aspecto. Já foi demonstrado que ocorre uma alteração do perfil lipídico em pacientes com Hanseníase, sobretudo nos MB, nos quais é possível verificar acúmulo de lipídios em células de Schwann e macrófagos (Mattos *et al.*, 2010; Mattos *et al.*, 2011). Esse acúmulo está relacionado às modificações estruturais nas moléculas de HDL que perdem sua capacidade anti-inflamatória, antioxidante e de transporte de colesterol (Lemes *et al.*, 2020). A partir daí, foi feita uma análise do perfil lipídico dos grupos estudados, porém não foi encontrada diferença significativa entre os grupos de pacientes jovens e idosos com as mesmas formas clínicas.

Também não foi verificado os níveis reduzidos de HDL nos pacientes MB em relação aos voluntários sadios, como verificado por Lemes e colaboradores.

Entretanto, não descartamos a hipótese que alterações estruturais na molécula de HDL em pacientes idosos com Hanseníase, principalmente os MB, possam estar associadas ao aumento do estresse oxidativo.

Assim, tendo em vista o verificado aumento do dano oxidativo em pacientes idosos com Hanseníase comparados aos pacientes jovens, é possível que a co-suplementação de componentes não enzimáticos do sistema antioxidante durante o curso da doença nos pacientes idosos em conjunto com a PQT traga benefícios. Estes componentes podem contribuir para neutralização das EROs, reduzindo não só o dano oxidativo, mas também minimizando os efeitos do estresse oxidativo na resposta imune mediada por células, além de reduzir danos teciduais gerados pela exacerbação da inflamação, considerando que tanto as EROs, quanto algumas moléculas oxidadas têm o efeito de ativar vias pró-inflamatórias, entre elas a do NF-KB.

Estudos prévios já demonstraram um efeito positivo na redução do dano oxidativo em condições de suplementação de zinco (Mathur *et al.*, 1984), vitamina E (Vijayaraghavan *et al.*, 2005) e ácido ascórbico (Prabhakar *et al.*, 2013). Embora os estudos citados anteriormente não tenham sido feitos em pacientes idosos, o efeito esperado, a redução do dano oxidativo, pode ocorrer da mesma forma.

Como já abordado anteriormente, diversas alterações relacionadas ao envelhecimento ocorrem no sistema imune, e entre elas destacam-se o acúmulo de linfócitos T CD8⁺ de memória, a menor frequência de linfócitos T *naïve* e da expressão de CD28 (Pawelec, 2017). Essas alterações além de comprometerem a resposta vacinal, também aumentam a suscetibilidade às doenças infecciosas (Weinberger *et al.*, 2008).

Os achados desse trabalho demonstram que há uma frequência aumentada de linfócitos T CD8⁺ de memória em lesões de pele de pacientes idosos, o que corrobora com as evidências que demonstraram aumento dessa subpopulação celular durante o envelhecimento (Gupta *et al.*, 2004; Boyd *et al.*, 2013). Por mais que os linfócitos T citotóxicos sejam essenciais para a eliminação do *M. leprae*, a subpopulação CD8⁺CD45RO⁺ em idosos pode exibir redução da ativação e proliferação devido à baixa expressão de CD28, também verificada neste trabalho, e em função do longo histórico replicativo.

Não obstante, os dados acima estão correlacionados com a exposição a certos patógenos durante a vida, como ao CMV. A acumulação desses linfócitos T de

memória durante o envelhecimento está fortemente associada aos títulos de IgG anti-CMV (Fülöp *et al.*, 2013).

Como já esperado, a maior parte dos indivíduos estudados apresentou resultado positivo IgG anti-CMV analisada no soro. Entretanto, os maiores títulos de anticorpos e a maior frequência de indivíduos positivos observada ocorreu nos pacientes idosos. Já no grupo de pacientes no qual foi verificado níveis maiores de anticorpos anti-CMV, os idosos PB, também foi verificado menor frequência de células CD8⁺CD28⁺. Este dado está em concordância com outros trabalhos que evidenciaram a relação entre a infecção subclínica latente causada pelo CMV e as alterações imunológicas ligadas ao envelhecimento, como o acúmulo de células CD8⁺ de memória que não expressam CD28 (Derhovanessian *et al.*, 2011; Derhovanessian *et al.*, 2013).

As células senescentes (CD8⁺CD28⁻) apresentam características como redução dos telômeros que compromete diretamente sua proliferação frente a um determinado estímulo (Plunkett *et al.*, 2007; Henson *et al.*, 2009). Além disso, essas células têm seu processo de ativação drasticamente comprometido em função da baixa ou não expressão do CD28. Nosso trabalho demonstrou que os pacientes idosos apresentaram níveis maiores dessas células senescentes nas lesões de pele comparado aos pacientes jovens.

A alta frequência dessas células hiporrespondedoras compromete a eliminação do patógeno, sobretudo dos patógenos intracelulares, como o *M. leprae*. Não só isso, essas células senescentes podem agravar o quadro das lesões de pele, tendo em vista que elas exibem o fenótipo SASP, contribuindo para a exacerbação da resposta inflamatória nos tecidos (Callender *et al.*, 2018). É válido ressaltar que nas lesões de pele desses pacientes idosos também foram encontrados altos níveis de 4-HNE que também tem ação de potencializar a resposta inflamatória, ao passo que promove a ativação de vias como a do NF-KB e da COX-2 (Zhang & Forman, 2017; Uchida, 2017).

Os resultados indicam que os pacientes idosos com Hanseníase têm o acúmulo de células senescentes, mas que a exacerbação da resposta imune no tecido, que é mediada pelas células citadas anteriormente, tende a aumentar a frequência das células senescentes num efeito em cascata. Uma possibilidade é que o aumento da expressão de quimiocinas, característica das células SASP, aumente o infiltrado inflamatório de fagócitos que expressam as enzimas do grupo NOX, que por sua vez

produzem EROs. Já foi demonstrado que essas espécies reativas induzem a senescência de células vizinhas por meio da expressão de p16INK4a e p53 (Zhou *et al.*, 2021; Prieur *et al.*, 2011).

Embora observássemos menor frequência de células CD8⁺ expressando CD28 em lesões de pele de pacientes PB idosos em comparação aos jovens das mesmas formas clínicas, verificamos alteração a nível molecular, na expressão gênica de CD28 apenas entre os pacientes MB. Isto é, houve menor expressão do mRNA de CD28 nas lesões de pele de pacientes MB idosos quando comparados aos pacientes MB jovens. Assim sendo, sugerimos que a menor expressão de CD28, no caso dos pacientes MB idosos, esteja relacionada aos linfócitos T CD4⁺ e não aos CD8⁺, que foram o alvo deste estudo.

Ainda em relação à subpopulação celular CD8⁺CD28⁻, há trabalhos que hipotetizam a ação delas como linfócitos T_{reg} (Niederlova *et al.*, 2021). A capacidade dessas células de suprimir a resposta imune, ou seja, dificultar a ativação e proliferação de linfócitos T helper, foi documentada por diferentes mecanismos, como a secreção de citocinas anti-inflamatórias, entre elas TGF-β e IL-10, a expressão de PD-1 e ligantes FasL (Liu *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2018). Além disso, as células CD8⁺CD28⁻ também podem reduzir a capacidade das células dendríticas e monócitos de apresentar antígenos derivados do *M. leprae* (Sadhu & Mitra, 2018). Os autores anteriormente citados, as descrevem como linfócitos T_{reg}.

Dessa forma, a partir desse achado, buscou-se avaliar a presença de marcadores que estão associados à supressão da resposta imune (PD-1, PD-L1, PD-L2 e LAG3), a fim de demonstrar, ou não, o perfil supressor nestes pacientes que exibiram maior frequência dos linfócitos T CD8⁺ ditos como reguladores.

Sabe-se que à medida que a idade avança, ocorre um declínio da resposta imune adaptativa em conjunto com um aumento da atividade da imunidade inata, processo conhecido como inflammaging. Mas ainda não está muito claro o que provoca o declínio da imunidade adaptativa, embora alguns estudos apontem que este fato poderia ser explicado pela ação das T_{reg}. Há evidências que mostram uma redução na atividade supressora das T_{reg} (CD4⁺CD25⁺) durante o envelhecimento (Tsaknaridis *et al.*, 2003). Outro grupo mostrou que a frequência de T_{reg} no sangue é maior no idosos e que sua depleção melhora a atividade de linfócitos T CD4⁺ convencionais nesses indivíduos (Lages *et al.*, 2008).

Nos indivíduos incluídos em nosso trabalho, a expressão dos receptores PD-1

e LAG3, relacionados aos mecanismos de supressão das células T_{reg} , não parece estar associada à idade em pacientes com Hanseníase. Nossos resultados mostraram que, independentemente da idade, os pacientes MB apresentam maiores níveis de expressão desses dois receptores em amostras de pele do que os pacientes PB. Dessa forma, esses resultados estão de acordo com o fato de os pacientes MB apresentarem um ambiente permissivo à proliferação do *M. leprae*, considerando o elevado número de bacilos em suas lesões cutâneas.

Em contrapartida, os ligantes do receptor PD-1 não exibiram diferenças significativas nas suas expressões gênicas, seja em amostras de pele ou sangue, entre os pacientes PB e MB, ou mesmo em função da idade. Embora o foco do presente trabalho não fosse investigar diferentes parâmetros relacionados às células T_{reg} nestes grupos de pacientes, a avaliação destes receptores fez-se necessária devido à possível atividade reguladora das células senescentes $CD8^+CD28^-$ analisadas neste estudo.

Dessa forma, nossos dados sugerem que as mudanças relacionadas ao envelhecimento, no contexto do estresse oxidativo e das subpopulações de células $CD8^+$, podem facilitar o aparecimento de sinais e sintomas da Hanseníase em idosos expostos ao *M. leprae*. Assim, o aumento do dano oxidativo, o acúmulo de linfócitos $T CD8^+$ de memória e a frequência reduzida de células $CD8^+CD28^+$ em pacientes idosos constituem alterações importantes do envelhecimento que comprometem a ativação de mecanismos de resistência contra o patógeno.

Nossa perspectiva é que em estudos futuros nosso grupo possa avaliar especificamente a resposta das células senescentes, derivadas dos pacientes, quanto à presença de antígenos particulados oriundos do *M. leprae*, bem como do próprio patógeno inteiro vivo. Essas análises podem comprovar a hiporresponsividade da subpopulação celular acima citada, quando comparada às células não senescentes, bem como desvendar os mecanismos específicos que promovem a referida redução de resposta imune dessas células no contexto da Hanseníase.

Estes dados podem fornecer ainda informações e perspectivas acerca das implicações da imunosenescência na progressão da doença, que podem ser estendidos a outros modelos de doenças infecciosas crônicas.

6 – CONCLUSÕES

- Os pacientes idosos com Hanseníase, sejam PB ou MB, apresentaram dano oxidativo aumentado em relação aos pacientes jovens e voluntários não hansenianos;
- Em pacientes jovens MB, o dano oxidativo aumentou com a redução do Índice Bacilar, IB, anos após a alta da PQT. Este fato não ocorreu em pacientes idosos MB, que mantiveram os níveis do dano oxidativo altos mesmo antes, durante ou após o tratamento;
- As análises estatísticas de correlação realizadas demonstraram que existe uma forte associação entre o dano oxidativo e idade, mas que o mesmo não ocorre entre o dano oxidativo e o IB;
- Os pacientes jovens MB apresentaram capacidade aumentada de impedir o dano oxidativo comparado aos idosos agrupados na mesma forma da Hanseníase, pois apresentam níveis mais elevados de expressão gênica das enzimas do sistema antioxidante, que são capazes de neutralizar as espécies reativas de oxigênio. Ao mesmo tempo, os pacientes jovens MB demonstram maior habilidade em eliminar o *M. leprae* em relação aos idosos MB, por apresentarem maior expressão gênica de NOX2;
- Tanto os pacientes idosos MB quanto os PB apresentaram acúmulo de linfócitos T CD8⁺ de memória nas lesões de pele, sendo este acúmulo um importante marcador de imunosenescência;
- Pacientes idosos PB apresentaram frequência menor das células CD8⁺CD28⁺, que desempenham papel efetor como observado nas lesões cutâneas, quando comparados aos jovens agrupados com a mesma forma da doença. Este fato pode estar ligado à infecção latente pelo CMV, cujos títulos de anticorpos específicos séricos foram maiores nos próprios idosos PB;
- A expressão dos receptores PD-1 e LAG3, foi maior nos pacientes MB em

relação aos PB, entretanto, não observamos relação com o processo de envelhecimento nos mesmos.

REFERÊNCIAS

- Abel L, Sánchez FO, Oberti J, Thuc NV, Hoa LV, Lap VD, Skamene E, Lagrange PH, Schurr E. Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene. *J Infect Dis.* 1998; 177(1):133-45. PubMed PMID: 9419180.
- Abraham S, Mozhi NM, Joseph GA, Kurian N, Rao PS, Job CK. Epidemiological significance of first skin lesion in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1998; 66(2):131-9. PMID: 9728445.
- Adams S, Green P, Claxton R, Simcox S, Williams MV, Walsh K, Leeuwenburgh C. Reactive carbonyl formation by oxidative and non-oxidative pathways. *Front Biosci.* 2001; 6:A17-24. PubMed PMID: 11487471.
- Aiello A, Farzaneh F, Candore G, Caruso C, Davinelli S, Gambino CM, Ligotti ME, Zareian N, Accardi G. Immunosenescence and its hallmarks: how to oppose aging strategically? A review of potential options for therapeutic intervention. *Front Immunol.* 2019; 10:2247. doi: 10.3389/fimmu.2019.02247. PMID: 31608061; PMCID: PMC6773825.
- Alcaín FJ, Villalba JM. Sirtuin activators. *Expert Opin Ther Pat.* 2009; 19(4):403-14. doi: 10.1517/13543770902762893. Review. PubMed PMID: 19441923.
- Alcaís A, Alter A, Antoni G, Orlova M, Nguyen VT, Singh M, Vanderborght PR, Katoch K, Mira MT, Vu HT, Ngyuen TH, Nguyen NB, Moraes M, Mehra N, Schurr E, Abel L. Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin-alpha allele as a major risk factor for early-onset leprosy. *Nat Genet.* 2007; 39(4):517-22. Epub 2007 Mar 11. PubMed PMID: 17353895.
- Alexeyev MF. Is there more to aging than mitochondrial DNA and reactive oxygen species? *FEBS J.* 2009 Oct;276(20):5768-87. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07269.x. PMID: 19796285; PMCID: PMC3097520.
- Aljada A, Ghanim H, Mohanty P, Kapur N, Dandona P. Insulin inhibits the pro-inflammatory transcription factor early growth response gene-1 (Egr)-1 expression in mononuclear cells (MNC) and reduces plasma tissue factor (TF) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentrations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87(3):1419-22. PubMed PMID: 11889219.
- Alter A, Alcaís A, Abel L, Schurr E. Leprosy as a genetic model for susceptibility to common infectious diseases. *Hum Genet.* 2008; 123(3):227-35. doi: 10.1007/s00439-008-0474-z. Epub 2008 Feb 5. PMID: 18247059.
- Alter A, de Léséleuc L, Van Thuc N, Thai VH, Huong NT, Ba NN, Cardoso CC, Grant AV, Abel L, Moraes MO, Alcaís A, Schurr E. Genetic and functional analysis of common MRC1 exon 7 polymorphisms in leprosy susceptibility. *Hum Genet.* 2010; 127(3):337-48. doi: 10.1007/s00439-009-0775-x. Epub 2009 Dec 25. PubMed PMID: 20035344; PubMed Central PMCID: PMC2891106.
- Amorim de Souza E, Fuentes Ferreira A, Heukelbach J, Nzundu Boigny R, Alencar CH, Novaes Ramos A Jr. Epidemiology and spatiotemporal patterns of leprosy detection in the state of Bahia, Brazilian Northeast Region, 2001-2014. *Trop Med Infect Dis.* 2018; 3(3) pii: E79. doi: 10.3390/tropicalmed3030079. PubMed PMID: 30274475; PubMed Central PMCID: PMC6161284.
- 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. doi: 10.1586/1744666X.2015.1012501. Epub 2015 Feb 10. Review. PubMed PMID: 25666357.
- Ault R, Dwivedi V, Koivisto E, Nagy J, Miller K, Nagendran K, Chalana I, Pan X, Wang SH, Turner J. Altered monocyte phenotypes but not impaired peripheral T cell immunity may explain susceptibility of the elderly to develop tuberculosis. *Exp Gerontol.* 2018; 111:35-44. doi: 10.1016/j.exger.2018.06.029. Epub 2018 Jul 3. PubMed PMID: 29991459; PubMed Central PMCID: PMC6119637.
- Avancini J, Trindade MÂB, Sanches JA. Leprosy elimination - still a long way to go. *Sao Paulo Med J.* 2019;; 137(6):552-554. doi: 10.1590/1516-3180.2018.0345021019. PMID: 31939491.

Aw D, Palmer DB. The origin and implication of thymic involution. *Aging Dis.* 2011; 2(5):437-43. Epub 2011 Oct 28. PubMed PMID: 22396892; PubMed Central PMCID: PMC3295077.

Bahia El Idrissi N, Iyer AM, Ramaglia V, Rosa PS, Soares CT, Baas F, Das PK. *In situ* complement activation and T-cell immunity in leprosy spectrum: an immunohistological study on leprosy lesional skin. *PLoS One.* 2017; 12(5):e0177815. doi: 10.1371/journal.pone.0177815. eCollection 2017. PubMed PMID: 28505186; PubMed Central PMCID: PMC5432188.

Barbouti A, Vasileiou PVS, Evangelou K, Vlasis KG, Papoudou-Bai A, Gorgoulis VG, Kanavaros P. Implications of oxidative stress and cellular senescence in age-related thymus involution. *Oxid Med Cell Longev.* 2020; 2020:7986071. doi: 10.1155/2020/7986071. eCollection 2020. Review. PubMed PMID: 32089780; PubMed Central PMCID: PMC7025075.

Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007 Jan;87(1):245-313. Review. PubMed PMID: 17237347.

Bennett BH, Parker DL, Robson M. Leprosy: steps along the journey of eradication. *Public Health Rep.* 2008; 123(2):198-205. Review. PubMed PMID: 18457072; PubMed Central PMCID: PMC2239329.

Ben-Porath I, Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005; 37(5):961-76. Epub 2004 Dec 30. Review. PubMed PMID: 15743671.

Bhat RM, Vaidya TP. What is new in the pathogenesis and management of erythema nodosum leprosum. *Indian Dermatol Online J.* 2020; 11(4):482-492. doi: 10.4103/idoj.IDOJ_561_19. PMID: 32832433; PMCID: PMC7413435.

Bochud PY, Hawn TR, Siddiqui MR, Saunderson P, Britton S, Abraham I, Argaw AT, Janer M, Zhao LP, Kaplan G, Aderem A. Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. *J Infect Dis.* 2008; 197(2):253-61. doi: 10.1086/524688. PubMed PMID: 18177245; PubMed Central PMCID: PMC3077295.

Bouman A, Heineman MJ, Faas MM. Sex hormones and the immune response in humans. *Hum Reprod Update.* 2005; 11(4):411-23. Epub 2005 Apr 7. Review. PubMed PMID: 15817524.

Boyd SD, Liu Y, Wang C, Martin V, Dunn-Walters DK. Human lymphocyte repertoires in ageing. *Curr Opin Immunol.* 2013; 25(4):511-515. doi: 10.1016/j.coi.2013.07.007. Epub 2013 Aug 28. PMID: 23992996; PMCID: PMC4811628.

Brown W. Can social marketing approaches change community attitudes towards leprosy? *Lepr Rev.* 2006; 77(2):89-98. PubMed PMID: 16895065.

Cai Z, Yan LJ. Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health. *J Biochem Pharmacol Res.* 2013; 1(1):15-26. PubMed PMID: 23662248; PubMed Central PMCID: PMC3646577.

Callender LA, Carroll EC, Beal RWJ, Chambers ES, Nourshargh S, Akbar AN, Henson SM. Human CD8⁺ EMRA T cells display a senescence-associated secretory phenotype regulated by p38 MAPK. *Aging Cell.* 2018; 17(1):e12675. doi: 10.1111/accel.12675. Epub 2017 Oct 12. PMID: 29024417; PMCID: PMC5770853.

Camargo RM, Silva WLD, Medeiros P, Belone AFF, Latini ACP. Polymorphisms in the TGFB1 and IL2RA genes are associated with clinical forms of leprosy in brazilian population. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2018; 113(12):e180274. doi: 10.1590/0074-02760180274. PubMed PMID: 30540075; PubMed Central PMCID: PMC6287188.

Candore G, Caruso C, Jirillo E, Magrone T, Vasto S. Low grade inflammation as a common pathogenetic denominator in age-related diseases: novel drug targets for anti-ageing strategies and successful ageing achievement. *Curr Pharm Des.* 2010; 16(6):584-96. Review. PubMed PMID: 20388068.

Cao JN, Gollapudi S, Sharman EH, Jia Z, Gupta S. Age-related alterations of gene expression patterns in human CD8⁺ T cells. *Aging Cell.* 2010 Feb;9(1):19-31. doi: 10.1111/j.1474-9726.2009.00534.x. Erratum in: *Aging Cell.* 2010 Jun;9(3):453. PMID: 19878143.

Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Dias-Baptista IM, Maniero VC, Venturini J, Vilani-Moreno FR, de Souza FC, Ribeiro-Alves M, Sarno EN, Pacheco AG, Moraes MO. IFNG +874 T>A single

nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians. *Hum Genet.* 2010; 128(5):481-90. doi: 10.1007/s00439-010-0872-x. Epub 2010 Aug 17. PubMed PMID: 20714752.

Cemerski S, van Meerwijk JP, Romagnoli P. Oxidative-stress-induced T lymphocyte hyporesponsiveness is caused by structural modification rather than proteasomal degradation of crucial TCR signaling molecules. *Eur J Immunol.* 2003; 33(8):2178-85. doi: 10.1002/eji.200323898. PMID: 12884292.

Cepeda S, Griffith AV. Thymic stromal cells: Roles in atrophy and age-associated dysfunction of the thymus. *Exp Gerontol.* 2018; 105:113-117. doi: 10.1016/j.exger.2017.12.022. Epub 2017 Dec 24. Review. PubMed PMID: 29278750; PubMed Central PMCID: PMC5869099.

Chavarro-Portillo B, Soto CY, Guerrero MI. *Mycobacterium leprae's* evolution and environmental adaptation. *Acta Trop.* 2019; 197:105041. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.105041. Epub 2019 May 30. PMID: 31152726.

Chen X, Liu Q, Xiang AP. CD8⁺CD28⁻ T cells: not only age-related cells but a subset of regulatory T cells. *Cell Mol Immunol.* 2018; 15(8):734-736. doi: 10.1038/cmi.2017.153. Epub 2018 Jan 29. PMID: 29375130; PMCID: PMC6141529.

Chhabra N, Bhattacharya SN, Singal A, Ahmed RS, Verma P. Profile of oxidative stress in response to treatment for type 1 leprosy reaction. *Lepr Rev.* 2015; 86(1):80-8. PubMed PMID: 26065150.

Chinen T, Kannan AK, Levine AG, Fan X, Klein U, Zheng Y, Gasteiger G, Feng Y, Fontenot JD, Rudensky AY. An essential role for the IL-2 receptor in T(reg) cell function. *Nat Immunol.* 2016; 17(11):1322-1333. doi: 10.1038/ni.3540. Epub 2016 Sep 5. PubMed PMID: 27595233; PubMed Central PMCID: PMC5071159.

Cho SN, Cellona RV, Villahermosa LG, Fajardo TT Jr, Balagon MV, Abalos RM, Tan EV, Walsh GP, Kim JD, Brennan PJ. Detection of phenolic glycolipid I of *Mycobacterium leprae* in sera from leprosy patients before and after start of multidrug therapy. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001; 8(1):138-42. PubMed PMID: 11139208; PubMed Central PMCID: PMC96023.

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. doi: 10.1093/infdis/jis920. Epub 2012 Dec 18. PubMed PMID: 23255567; PubMed Central PMCID: PMC3571442.

Chung HY, Lee EK, Choi YJ, Kim JM, Kim DH, Zou Y, Kim CH, Lee J, Kim HS, Kim ND, Jung JH, Yu BP. Molecular inflammation as an underlying mechanism of the aging process and age-related diseases. *J Dent Res.* 2011; 90(7):830-40. doi: 10.1177/0022034510387794. Epub 2011 Mar 29. PMID: 21447699.

Cole ST, Eglmeier 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; 409(6823):1007-11. PubMed PMID: 11234002.

Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol.* 2010; 5:99-118. doi: 10.1146/annurev-pathol-121808-102144. Review. PubMed PMID: 20078217; PubMed Central PMCID: PMC4166495.

Cyktor JC, Turner J. Interleukin-10 and immunity against prokaryotic and eukaryotic intracellular pathogens. *Infect Immun.* 2011; 79(8):2964-73. doi: 10.1128/IAI.00047-11. Epub 2011 May 16. Review. PubMed PMID: 21576331; PubMed Central PMCID: PMC3147550.

Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol.* 2004; 25(1):4-7. Review. PubMed PMID: 14698276.

Davison AR, Kooij R, Wainwright J. Classification of leprosy. Application of the Madrid classification of various forms of leprosy. *Int J Lepr.* 1960; 28:113-25.

- de Léséleuc L, Orlova M, Cobat A, Girard M, Huong NT, Ba NN, Thuc NV, Truman R, Spencer JS, Adams L, Thai VH, Alcais A, Schurr E. PARK2 mediates interleukin 6 and monocyte chemoattractant protein 1 production by human macrophages. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(1):e2015. doi: 10.1371/journal.pntd.0002015. Epub 2013 Jan 17. PubMed PMID: 23350010; PubMed Central PMCID: PMC3547867.
- Derhovanessian E, Maier AB, Hähnel K, Beck R, de Craen AJM, Slagboom EP, Westendorp RGJ, Pawelec G. Infection with cytomegalovirus but not herpes simplex virus induces the accumulation of late-differentiated CD4⁺ and CD8⁺ T-cells in humans. *J Gen Virol*. 2011; 92 (Pt 12):2746-2756. doi: 10.1099/vir.0.036004-0. Epub 2011 Aug 3. PubMed PMID: 21813708.
- Derhovanessian E, Maier AB, Hähnel K, Zelba H, de Craen AJ, Roelofs H, Slagboom EP, Westendorp RG, Pawelec G. Lower proportion of naïve peripheral CD8⁺ T cells and an unopposed pro-inflammatory response to human Cytomegalovirus proteins in vitro are associated with longer survival in very elderly people. *Age (Dordr)*. 2013; 35(4):1387-99. doi: 10.1007/s11357-012-9425-7. Epub 2012 Jun 4. PMID: 22661297; PMCID: PMC3705124.
- Dos Santos DS, Duppre NC, Sarno EN, Pinheiro RO, Sales AM, Nery JADC, Moraes MO, Camacho LAB. Chemoprophylaxis of leprosy with rifampicin in contacts of multibacillary patients: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2018; 19(1):244. doi: 10.1186/s13063-018-2623-6. PMID: 29685164; PMCID: PMC5914061.
- Dos Santos LN, da Silva PH, Alvim IM, Nery JA, Lara FA, Sarno EN, Esquenazi D. Role of T Effector/Memory cells, *TBX21* gene expression and T-cell homing receptor on type 1 reaction in borderline lepromatous leprosy patients. *PLoS One*. 2016; 11(10):e0164543. doi: 10.1371/journal.pone.0164543. eCollection 2016. PubMed PMID: 27764137; PubMed Central PMCID: PMC5072666.
- Dwivedi VP, Banerjee A, Das I, Saha A, Dutta M, Bhardwaj B, Biswas S, Chattopadhyay D. Diet and nutrition: An important risk factor in leprosy. *Microb Pathog*. 2019; 137:103714. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103714. Epub 2019 Sep 4. Review. PubMed PMID: 31493502.
- Ershler WB, Keller ET. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Annu Rev Med*. 2000; 51:245-70. Review. PubMed PMID: 10774463.
- 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
- Fava VM, Dallmann-Sauer M, Schurr E. Genetics of leprosy: today and beyond. *Hum Genet*. 2019. doi: 10.1007/s00439-019-02087-5. [Epub ahead of print] Review. PubMed PMID: 31713021.
- Fava VM, Sales-Marques C, Alcais A, Moraes MO, Schurr E. Age-dependent association of TNFSF15/TNFSF8 variants and leprosy type 1 reaction. *Front Immunol*. 2017; 8:155. doi: 10.3389/fimmu.2017.00155. eCollection 2017. PubMed PMID: 28261213; PubMed Central PMCID: PMC5306391.
- Feenstra SG, Nahar Q, Pahan D, Oskam L, Richardus JH. Recent food shortage is associated with leprosy disease in Bangladesh: a case-control study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5(5):e1029. doi: 10.1371/journal.pntd.0001029. PubMed PMID: 21572979; PubMed Central PMCID: PMC3091833.
- Fischer E, De Vlas S, Meima A, Habbema D, Richardus J. Different mechanisms for heterogeneity in leprosy susceptibility can explain disease clustering within households. *PLoS One*. 2010; 5(11):e14061. doi: 10.1371/journal.pone.0014061. PubMed PMID: 21124916; PubMed Central PMCID: PMC2988824.
- Fonseca AB, Simon MD, Cazzaniga RA, de Moura TR, de Almeida RP, Duthie MS, Reed SG, de Jesus AR. The influence of innate and adaptative immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy. *Infect Dis Poverty*. 2017; 6(1):5. doi: 10.1186/s40249-016-0229-3. Review. PubMed PMID: 28162092; PubMed Central PMCID: PMC5292790.
- Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Lu/ca M, Ottaviani E, De Benedictis G. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci*. 2000; 908:244-54. Review. PubMed PMID: 10911963.

Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev.* 2010; 236:219-42. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00923.x Review. PubMed PMID: 20636820; PubMed Central PMCID: PMC2919275.

Fridovich I. Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem.* 1997; 272(30):18515-7. Review. PubMed PMID: 9228011.

Fülöp T, Larbi A, Pawelec G. Human T cell aging and the impact of persistent viral infections. *Front Immunol.* 2013; 4:271. doi: 10.3389/fimmu.2013.00271

Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9(3):162-74. doi: 10.1038/nri2506. Review. PubMed PMID: 19197294; PubMed Central PMCID: PMC2828349

Garbino JA, Marques W Jr, Barreto JA, Heise CO, Rodrigues MM, Antunes SL, Soares CT, Floriano MC, Nery JA, Trindade MA, Carvalho NB, Andrada NC, Barreira AA, Virmond M da C. Primary neural leprosy: systematic review. *Arq Neuro psiquiatr.* 2013; 71(6):397-404.

Gaschignard J, Grant AV, Thuc NV, Orlova M, Cobat A, Huong NT, Ba NN, Thai VH, Abel L, Schurr E, Alcaïs A. Pauci- and Multibacillary Leprosy: Two Distinct, Genetically Neglected Diseases. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(5):e0004345. doi: 10.1371/journal.pntd.0004345. eCollection 2016 May. Review. PubMed PMID: 27219008; PubMed Central PMCID: PMC4878860.

Gaschignard J, Scurr E, Alcaïs A. Leprosy, a pillar of human genetics of infectious diseases. *Pathol Biol (Paris).* 2013; 61(3):120-8. doi: 10.1016/j.patbio.2013.03.003. Epub 2013 May 24. Review. French. PubMed PMID: 23711949.

Giunta S. Is inflammaging an auto[innate]immunity subclinical syndrome? *Immun Ageing.* 2006; 3:12. PubMed PMID: 17173699; PubMed Central PMCID: PMC1716179.

Goronzy JJ, Li G, Yang Z, Weyand CM. The janus head of T cell aging - autoimmunity and immunodeficiency. *Front Immunol.* 2013; 4:131. doi: 10.3389/fimmu.2013.00131. eCollection 2013. PubMed PMID: 23761790; PubMed Central PMCID: PMC3671290.

Goronzy JJ, Weyand CM. Thymic function and peripheral T-cell homeostasis in rheumatoid arthritis. *Trends Immunol.* 2001; 22(5):251-5. PubMed PMID: 11323282.

Greiwe JS, Cheng B, Rubin DC, Yarasheski KE, Semenkovich CF. Resistance exercise decreases skeletal muscle tumor necrosis factor alpha in frail elderly humans. *FASEB J.* 2001 Feb;15(2):475-82. PubMed PMID: 11156963.

Grewe M. Chronological ageing and photoageing of dendritic cells. *Clin Exp Dermatol.* 2001; 26(7):608-12. Review. PubMed PMID: 11696065.

Griffith AV, Venables T, Shi J, Farr A, van Remmen H, Szweda L, Fallahi M, Rabinovitch P, Petrie HT. Metabolic damage and premature thymus aging caused by stromal catalase deficiency. *Cell Rep.* 2015; 12(7):1071-9. doi: 10.1016/j.celrep.2015.07.008. Epub 2015 Aug 6. PubMed PMID: 26257169; PubMed Central PMCID: PMC4797338.

Guerra-Silveira F, Abad-Franch F. Sex bias in infectious disease epidemiology: patterns and processes. *PLoS One.* 2013; 8(4):e62390. doi: 10.1371/journal.pone.0062390. Print 2013. PubMed PMID: 23638062; PubMed Central PMCID: PMC3634762.

Gupta S, Bi R, Su K, Yel L, Chiplunkar S, Gollapudi S. Characterization of naive, memory and effector CD8⁺ T cells: effect of age. *Exp Gerontol.* 2004; 4:545-50. doi: 10.1016/j.exger.2003.08.013.

Hacker MA, Sales AM, Duppre NC, Sarno EN, Moraes MO. Leprosy incidence and risk estimates in a 33-year contact cohort of leprosy patients. *Sci Rep.* 2021; 11(1):1947. doi: 10.1038/s41598-021-81643-4. Erratum in: *Sci Rep.* 2021 Apr 20;11(1):8954. PMID: 33479421; PMCID: PMC7820484.

Hagge DA, Saunders BM, Ebenezer GJ, Ray NA, Marks VT, Britton WJ, Krahenbuhl JL, Adams LB. Lymphotoxin-alpha and TNF have essential but independent roles in the evolution of the granulomatous response in experimental leprosy. *Am J Pathol.* 2009; 174(4):1379-89. doi: 10.2353/ajpath.2009.080550. Epub 2009 Feb 26. PubMed PMID: 19246648; PubMed Central PMCID: PMC2671369.

Hanson EM, Clements VK, Sinha P, Ilkovitch D, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J Immunol.* 2009; 183(2):937-44. doi: 10.4049/jimmunol.0804253. Epub 2009 Jun 24. PubMed PMID: 19553533; PubMed CentralPMCID: PMC2800824.

He S, Sharpless NE. Senescence in health and disease. *Cell.* 2017; 169(6):1000-1011. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.015. Review. PubMed PMID: 28575665; PubMed Central PMCID: PMC5643029.

Hengel H, Brune W, Koszinowski UH. Immune evasion by cytomegalovirus - survival strategies of a highly adapted opportunist. *Trends Microbiol.* 1998; 6(5):190-7. PubMed PMID: 9614343.

Henle ES, Luo Y, Linn S. Fe²⁺, Fe³⁺, and oxygen react with DNA-derived radicals formed during iron-mediated Fenton reactions. *Biochemistry.* 1996; 35(37):12212-9. doi: 10.1021/bi961235j. PMID: 8810929.

Henson SM, Franzese O, Macaulay R, Libri V, Azevedo RI, Kiani-Alikhan S, Plunkett FJ, Masters JE, Jackson S, Griffiths SJ, Pircher HP, Soares MV, Akbar AN. KLRG1 signaling induces defective Akt (ser473) phosphorylation and proliferative dysfunction of highly differentiated CD8⁺ T cells. *Blood.* 2009 ; 113(26):6619-28. doi: 10.1182/blood-2009-01-199588. Epub 2009 Apr 30. PMID: 19406987.

Hirai KE, Aarão TL, Silva LM, de Sousa JR, de Souza J, Dias LB Jr, Carneiro FR, Fuzii HT, Quaresma JA. Langerhans cells (CD1a and CD207), dermal dendrocytes (FXIIIa) and plasmacytoid dendritic cells (CD123) in skin lesions of leprosy patients. *Microb Pathog.* 2016; 91:18-25. doi: 10.1016/j.micpath.2015.11.013. Epub 2015 Nov 27. PubMed PMID: 26639680.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Mudança demográfica no Brasil no início do século XXI. 2015. Available at: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv93322.pdf> Acessado em 10 fev 2021.

Ioannou M, Alissafi T, Lazaridis I, Deraos G, Matsoukas J, Gravanis A, Mastorodemos V, Plaitakis A, Sharpe A, Boumpas D, Verginis P. Crucial role of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in the regulation of central nervous system autoimmune disease. *J Immunol.* 2012; 188(3):1136-46. doi:10.4049/jimmunol.1101816. Epub 2011 Dec 30. Erratum in: *J Immunol.* 2014 Feb 1;192(3):1334. PubMed PMID: 22210912.

Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol.* 2015; 16(4):343-53. doi: 10.1038/ni.3123. Review. PubMed PMID: 25789684; PubMed Central PMCID: PMC4507498.

Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science.* 2010; 327(5963):291-5. doi: 10.1126/science.1183021. Review. PubMed PMID: 20075244; PubMed Central PMCID: PMC3645875.

Jardim MR, Antunes SL, Santos AR, Nascimento OJ, Nery JA, Sales AM, Illarramendi X, Duppre N, Chimelli L, Sampaio EP, Sarno EP. Criteria for diagnosis of pure neural leprosy. *J Neurol.* 2003; 250(7):806-9. doi: 10.1007/s00415-003-1081-5. PMID: 12883921.

Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2006; 8(9-10):1865-79. Review. PubMed PMID: 16987039.

Jurado JO, Alvarez IB, Pasquinelli V, Martínez GJ, Quiroga MF, Abbate E, Musella RM, Chuluyan HE, García VE. Programmed death (PD)-1:PD-ligand 1/PD-ligand 2 pathway inhibits T cell effector functions during human tuberculosis. *J Immunol.* 2008; 181(1):116-25. PubMed PMID: 18566376.

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

Kammeyer A, Luiten RM. Oxidation events and skin aging. *Ageing Res Rev.* 2015; 21:16-29. doi: 10.1016/j.arr.2015.01.001. Epub 2015 Jan 31. Review. PubMed PMID: 25653189.

Kang PB, Azad AK, Torrelles JB, Kaufman TM, Beharka A, Tibesar E, DesJardin LE, Schlesinger LS. The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *J Exp Med*. 2005; 202(7):987-99. PubMed PMID: 16203868; PubMed Central PMCID: PMC2213176.

Kerr-Pontes LR, Barreto ML, Evangelista CM, Rodrigues LC, Heukelbach J, Feldmeier H. Socioeconomic, environmental, and behavioural risk factors for leprosy in north-east Brazil: results of a case-control study. *Int J Epidemiol*. 2006; 35(4):994-1000. Epub 2006 Apr 27. PubMed PMID: 16645029.

Kim EW, Teles RMB, Haile S, Liu PT, Modlin RL. Vitamin D status contributes to the antimicrobial activity of macrophages against *Mycobacterium leprae*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018; 12(7):e0006608. doi: 10.1371/journal.pntd.0006608. eCollection 2018 Jul. PubMed PMID: 29965969; PubMed Central PMCID: PMC6044553.

Kinnula VL. Focus on antioxidant enzymes and antioxidant strategies in smoking related airway diseases. *Thorax* 2005; 60:8 693–700 10.1136/thx.2004.037473.

Kirchheimer WF. The role of arthropods in the transmission of leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1976; 44(1-2):104-7. PubMed PMID: 776845.

Kissick HT, Sanda MG, Dunn LK, Pellegrini KL, On ST, Noel JK, Arredouani MS. Androgens alter T-cell immunity by inhibiting T-helper 1 differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111(27):9887-92. doi: 10.1073/pnas.1402468111. Epub 2014 Jun 23. PMID: 24958858; PMCID: PMC4103356.

Klein SL. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Parasite Immunol*. 2004; 26(6-7):247-64. Review. PubMed PMID: 15541029.

Kotsakis A, Harasymczuk M, Schilling B, Georgoulas V, Argiris A, Whiteside TL. Myeloid-derived suppressor cell measurements in fresh and cryopreserved blood samples. *J Immunol Methods*. 2012; 381(1-2):14-22. doi: 10.1016/j.jim.2012.04.004. Epub 2012 Apr 13. PubMed PMID: 22522114; PubMed Central PMCID: PMC3385927.

Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, Liu PT, Cole ST, Godowski PJ, Maeda Y, Sarno EN, Norgard MV, Brennan PJ, Akira S, Rea TH, Modlin RL. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med*. 2003; 9(5):525-32. Epub 2003 Apr 14. PubMed PMID: 12692544.

Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE, Graeber TG, Sieling PA, Liu YJ, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat Med*. 2005 Jun;11(6):653-60. Epub 2005 May 8. PubMed PMID: 15880118; PubMed Central PMCID: PMC1409736.

Kumar Rajendran N, George BP, Chandran R, Tynga IM, Houreld N, Abrahamse H. The Influence of light on reactive oxygen species and NF- κ B in disease progression. *Antioxidants (Basel)*. 2019 Dec 12;8(12):640. doi: 10.3390/antiox8120640. PMID: 31842333; PMCID: PMC6943569.

Kurkó J, Vida A, Glant TT, Scanzello CR, Katz RS, Nair A, Szekanecz Z, Mikecz K. Identification of myeloid-derived suppressor cells in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis: a pilot study. *BMC Musculoskelet Disord*. 2014; 15:281. doi: 10.1186/1471-2474-15-281. PubMed PMID: 25138129; PubMed Central PMCID: PMC4152562.

Kuwabara T, Ishikawa F, Kondo M, Kakiuchi T. The Role of IL-17 and related cytokines in inflammatory autoimmune diseases. *Mediators Inflamm*. 2017; 2017:3908061. doi: 10.1155/2017/3908061. Epub 2017 Feb 20. Review. PubMed PMID: 28316374; PubMed Central PMCID: PMC5337858.

Lages CS, Suffia I, Velilla PA, Huang B, Warshaw G, Hildeman DA, et al. Functional regulatory T cells accumulate in aged hosts and promote chronic infectious disease reactivation. *J Immunol*. 2008; 181:1835–48. doi: 10.4049/jimmunol.181.3.1835.

Lane, N. *Oxygen: The Molecule that Made the World*. Oxford University Press; USA: 2003.

Larbi A, Fulop T. From "truly naïve" to "exhausted senescent" T cells: when markers predict functionality. *Cytometry A*. 2014; 85(1):25-35. doi: 10.1002/cyto.a.22351. Epub 2013 Sep 30. Review. PubMed PMID: 24124072.

- Lee CK, Weindruch R, Prolla TA. Gene-expression profile of the ageing brain in mice. *Nat Genet.* 2000; 25(3):294-7. PubMed PMID: 10888876.
- Lemes RMR, Silva CAME, Marques MÂM, Atella GC, Nery JADC, Nogueira MRS, Rosa PS, Soares CT, De P, Chatterjee D, Pessolani MCV, de Macedo CS. Altered composition and functional profile of high-density lipoprotein in leprosy patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020; 14(3):e0008138. doi: 10.1371/journal.pntd.0008138. PMID: 32226013; PMCID: PMC7145193.
- Liochev SI, Fridovich I. The effects of superoxide dismutase on H₂O₂ formation. *Free Radic Biol Med.* 2007; 42(10):1465-9. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.015. Epub 2007 Feb 28. PMID: 17448892.
- Liochev SI, Fridovich I. The effects of superoxide dismutase on H₂O₂ formation. *Free Radic Biol Med.* 2007 May 15;42(10):1465-9. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.015. Epub 2007 Feb 28. PMID: 17448892.
- Liu Q, Zheng H, Chen X, Peng Y, Huang W, Li X, Li G, Xia W, Sun Q, Xiang AP. Human mesenchymal stromal cells enhance the immunomodulatory function of CD8(+)CD28(-) regulatory T cells. *Cell Mol Immunol.* 2015; 12(6):708-718. doi: 10.1038/cmi.2014.118. Epub 2014 Dec 8. PMID: 25482073; PMCID: PMC4716622.
- Liu Y, Harrison PM, Kunin V, Gerstein M. Comprehensive analysis of pseudogenes in prokaryotes: widespread gene decay and failure of putative horizontally transferred genes. *Genome Biol.* 2004;5(9):R64. Epub 2004 Aug 26. PubMed PMID:15345048; PubMed Central PMCID: PMC522871.
- Liu Z, Tugulea S, Cortesini R, Suci-Foca N. Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells. *Int Immunol.* 1998; 10(6):775-83. doi: 10.1093/intimm/10.6.775. PMID: 9678758.
- Lockwood DN, Sarno E, Smith WC. Classifying leprosy patients - searching for the perfect solution? *Lepr Rev* 2007; 78:317-20.
- López-Maderuelo D, Arnalich F, Serantes R, González A, Codoceo R, Madero R, Vázquez JJ, Montiel C. Interferon-gamma and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 167(7):970-5. Epub 2003 Jan 16. PubMed PMID: 12531774.
- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013; 153(6):1194-217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039. Review. PubMed PMID: 23746838; PubMed Central PMCID: PMC3836174.
- Majumdar S, Nandi D. Thymic Atrophy: Experimental studies and therapeutic interventions. *Scand J Immunol.* 2018; 87(1):4-14. doi: 10.1111/sji.12618. Epub 2017 Oct 22. Review. PubMed PMID: 28960415.
- Makinodan T. Nature of the decline in antigen-induced humoral immunity with age. *Mech Ageing Dev.* 1980; 14(1-2):165-72. Review. PubMed PMID: 7010008.
- Marques C de S, Brito-de-Souza VN, Guerreiro LT, Martins JH, Amaral EP, Cardoso CC, Dias-Batista IM, Silva WL, Nery JA, Medeiros P, Gigliotti P, Campanelli AP, Virmond M, Sarno EN, Mira MT, Lana FC, Caffarena ER, Pacheco AG, Pereira AC, Moraes MO. Toll-like receptor 1 N248S single-nucleotide polymorphism is associated with leprosy risk and regulates immune activation during mycobacterial infection. *J Infect Dis.* 2013; 208(1):120-9. doi: 10.1093/infdis/jit133. Epub 2013 Apr 1. PubMed PMID: 23547143.
- Mathur NK, Bumb RA, Mangal HN, Sharma ML. Oral zinc as an adjunct to dapsone in lepromatous leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1984; 52:331-338.
- Matos TS, Carmo RFD, Santos FGB, Souza CDF. Leprosy in the elderly population and the occurrence of physical disabilities: Is there cause for concern? *An Bras Dermatol.* 2019; 94(2):243-245. doi: 10.1590/abd1806-4841.20198067. Epub 2019 May 9. PubMed PMID: 31090837; PubMed Central PMCID: PMC6486081.
- Mattos KA, D'Avila H, Rodrigues LS, Oliveira VG, Sarno EN, Atella GC, Pereira GM, Bozza PT, Pessolani MC. Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and Mycobacterium leprae pathogenesis. *J Leukoc Biol.* 2010; 87(3):371-84. doi:

10.1189/jlb.0609433. Epub 2009 Dec 1. Erratum in: J Leukoc Biol. 2010 Nov;88(5):1061. Erratum in: J Leukoc Biol. 2010 Nov;88(5):1061. PMID: 19952355.

Mattos KA, Lara FA, Oliveira VG, Rodrigues LS, D'Avila H, Melo RC, Manso PP, Sarno EN, Bozza PT, Pessolani MC. Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. Cell Microbiol. 2011 Feb;13(2):259-73. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01533.x. Epub 2010 Nov 2. PMID: 20955239.

Matzner M, Al Samie AR, Winkler HM, Nemeth J, Grasnek A, Indra A, Bieglmayer C, Winkler S. Low serum levels of cathelicidin LL-37 in leprosy. Acta Trop. 2011; 117(1):56-9. doi: 10.1016/j.actatropica.2010.09.007. Epub 2010 Sep 29. PubMed PMID: 20887706.

Meagher EA, FitzGerald GA. Indices of lipid peroxidation *in vivo*: strengths and limitations. Free Radic Biol Med. 2000; 28(12):1745-50. Review. PubMed PMID: 10946216.

Medeiros RC, Girardi KD, Cardoso FK, Mietto BS, Pinto TG, Gomez LS, Rodrigues LS, Gandini M, Amaral JJ, Antunes SL, Corte-Real S, Rosa PS, Pessolani MC, Nery JA, Sarno EN, Batista-Silva LR, Sola-Penna M, Oliveira MF, Moraes MO, Lara FA. Subversion of schwann cell glucose metabolism by *Mycobacterium leprae*. J Biol Chem. 2016; 291(41):21375-21387. doi: 10.1074/jbc.M116.725283. Epub 2016 Aug 23. Erratum in: J Biol Chem. 2016 Nov 18;291(47):24803. PMID: 27555322; PMCID: PMC5076808.

Meyer M, Pahl HL, Baeuerle PA. Regulation of the transcription factors NF-kappa B and AP-1 by redox changes. Chem Biol Interact. 1994 Jun;91(2-3):91-100. PubMed PMID: 8194138.

Meyerson MS. Erythema nodosum leprosum. Int J Dermatol. 1996; 35(6):389-92. Review. PubMed PMID: 8737869.

Ministério da Saúde, Brasil. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Controle da hanseníase na atenção básica: guia prático para profissionais da equipe de saúde da família. 2001.

Ministério da Saúde, Brasil. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia para o Controle da hanseníase. Brasília, 2002. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_de_hanseniase.pdf. Acesso em 23 de abril de 2021.

Ministério da Saúde, Brasil. 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, Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Boletim Epidemiológico: Hanseníase. Brasília, 2020.

Ministério da Saúde, Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Boletim Epidemiológico: Hanseníase. Brasília, 2021.

Modlin RL. Learning from leprosy: insights into contemporary immunology from an ancient disease. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol. 2002; 15(1):1-6. Review. PubMed PMID: 11803252.

Mohammadi M, Gozashti MH, Aghadavood M, Mehdizadeh MR, Hayatbakhsh MM. Clinical significance of serum IL-6 and TNF- α levels in patients with metabolic syndrome. Rep Biochem Mol Biol. 2017 Oct;6(1):74-79. PMID: 29090232; PMCID: PMC5643447.

Monot M, Honoré N, Garnier T, Araoz R, Coppée JY, Lacroix C, Sow S, Spencer JS, Truman RW, Williams DL, Gelber R, Virmond M, Flageul B, Cho SN, Ji B, Paniz-Mondolfi A, Convit J, Young S, Fine PE, Rasolofy V, Brennan PJ, Cole ST. On the origin of leprosy. Science. 2005; 308(5724):1040-2. PubMed PMID: 15894530.

Montoya D, Cruz D, Teles RM, Lee DJ, Ochoa MT, Krutzik SR, Chun R, Schenk M, Zhang X, Ferguson BG, Burdick AE, Sarno EN, Rea TH, Hewison M, Adams JS, Cheng G, Modlin RL. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. Cell Host Microbe. 2009; 6(4):343-53. doi: 10.1016/j.chom.2009.09.002. PubMed PMID: 19837374; PubMed Central PMCID: PMC2764558.

- Moore SL, Wilson K. Parasites as a viability cost of sexual selection in natural populations of mammals. *Science*. 2002; 297(5589):2015-8. PubMed PMID: 12242433.
- 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.
- Moran NA. Microbial minimalism: genome reduction in bacterial pathogens. *Cell*. 2002; 108(5):583-6. Review. PubMed PMID: 11893328.
- 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. doi: 10.1002/eji.201142198. Epub 2012 Sep 14. PubMed PMID: 22851198.
- Nery JA, Vieira LM, de Matos HJ, Gallo ME, Sarno EN. Reactional states in multibacillary Hansen disease patients during multidrug therapy. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1998; 40(6):363-70. PubMed PMID: 10436656.
- Neumann A da S, Dias F de A, Ferreira J da S, Fontes AN, Rosa PS, Macedo RE, Oliveira JH, Teixeira RL, Pessolani MC, Moraes MO, Suffys PN, Oliveira PL, Sorgine MH, Lara FA. Experimental Infection of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Triatominae) with *Mycobacterium leprae* Indicates Potential for Leprosy Transmission. *PLoS One*. 2016; 11(5):e0156037. doi: 10.1371/journal.pone.0156037. eCollection 2016. PubMed PMID: 27203082; PubMed Central PMCID: PMC4874629.
- Niederlova V, Tsyklauri O, Chadimova T, Stepanek O. CD8+ Tregs revisited: A heterogeneous population with different phenotypes and properties. *Eur J Immunol*. 2021; 51(3):512-530. doi: 10.1002/eji.202048614. Epub 2021 Feb 19. PMID: 33501647.
- Nigam S, Schewe T. Phospholipase A(2)s and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1488(1-2):167-81. Review. PubMed PMID: 11080686.
- Nilsson MI, Bourgeois JM, Nederveen JP, Leite MR, Hettinga BP, Bujak AL, May L, Lin E, Crozier M, Rusiecki DR, Moffatt C, Azzopardi P, Young J, Yang Y, Nguyen J, Adler E, Lan L, Tarnopolsky MA. Lifelong aerobic exercise protects against inflammaging and cancer. *PLoS One*. 2019; 14(1):e0210863. doi: 10.1371/journal.pone.0210863. eCollection 2019. PubMed PMID: 30682077; PubMed Central PMCID: PMC6347267.
- Nobre ML, Illarramendi X, Dupnik KM, Hacker MA, Nery JA, Jerônimo SM, Sarno EN. Multibacillary leprosy by population groups in Brazil: Lessons from an observational study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11(2):e0005364. doi: 10.1371/journal.pntd.0005364. eCollection 2017 Feb. PubMed PMID: 28192426; PubMed Central PMCID: PMC5325588.
- Nohl H, Gille L, Staniek K. Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. *Biochem Pharmacol*. 2005; 69, 719-723.
- Ogawa K, Oka J, Yamakawa J, Higuchi M. Habitual exercise did not affect the balance of type 1 and type 2 cytokines in elderly people. *Mech Ageing Dev*. 2003; 124(8-9):951-6. PubMed PMID: 14499500.
- Oliveira JSS, Reis ALMD, Margalho LP, Lopes GL, Silva ARD, Moraes NS, Xavier MB. Leprosy in elderly people and the profile of a retrospective cohort in an endemic region of the Brazilian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019; 13(9):e0007709. doi: 10.1371/journal.pntd.0007709. PMID: 31479442; PMCID: PMC6743788.
- Oliveira RB, Ochoa MT, Sieling PA, Rea TH, Rambukkana A, Sarno EN, Modlin RL. Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy. *Infect Immun*. 2003; 71(3):1427-33. PubMed PMID: 12595460; PubMed Central PMCID: PMC148832.
- 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. doi: 10.4269/ajtmh.2012.12-0088. PubMed PMID: 22556091; PubMed Central PMCID: PMC3335697.

Passos Vázquez CM, Mendes Netto RS, Ferreira Barbosa KB, Rodrigues de Moura T, de Almeida RP, Duthie MS, Ribeiro de Jesus A. Micronutrients influencing the immune response in leprosy. *Nutr Hosp*. 2014; 29(1):26-36. doi: 10.3305/nh.2014.29.1.6988. Review. PubMed PMID: 24483959.

Pawelec G, Hirokawa K, Fülöp T. Altered T cell signalling in ageing. *Mech Ageing Dev*. 2001; 122(14):1613-37. Review. PubMed PMID: 11511400.

Pawelec G, Verschoor CP, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Not Only in Tumor Immunity. *Front Immunol*. 2019; 10:1099. doi: 10.3389/fimmu.2019.01099. eCollection 2019. Review. PubMed PMID: 31156644; PubMed Central PMCID: PMC6529572.

Pawelec G. Age and immunity: What is "immunosenescence"? *Exp Gerontol*. 2018; 105:4-9. doi: 10.1016/j.exger.2017.10.024. Epub 2017 Oct 27. Review. PubMed PMID: 29111233.

Penna ML, Grossi MA, Penna GO. Country profile: leprosy in Brazil. *Lepr Rev*. 2013; 84(4):308-15. PubMed PMID: 24745130.

Perry JJ, Shin DS, Getzoff ED, Tainer JA. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1804(2):245-62. doi: 10.1016/j.bbapap.2009.11.004. Epub 2009 Nov 13. Review. PubMed PMID: 19914407; PubMed Central PMCID: PMC3098211.

Pes GM, Lio D, Carru C, Deiana L, Baggio G, Franceschi C, Ferrucci L, Oliveri F, Scola L, Crivello A, Candore G, Colonna-Romano G, Caruso C. Association between longevity and cytokine gene polymorphisms. A study in Sardinian centenarians. *Aging Clin Exp Res*. 2004; 16(3):244-8. PubMed PMID: 15462469.

Pickering AM, Davies KJ. Degradation of damaged proteins: the main function of the 20S proteasome. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2012; 109:227-48. doi: 10.1016/B978-0-12-397863-9.00006-7. Review. PubMed PMID: 22727423; PubMed Central PMCID: PMC3710712.

Pinheiro RO, Schmitz V, Silva BJA, Dias AA, de Souza BJ, de Mattos Barbosa MG, Esquenazi D, Pessolani MCV, Sarno EN. Innate immune responses in Leprosy. *Front Immunol*. 2018; 9:518. doi: 10.3389/fimmu.2018.00518. eCollection 2018. Review. PubMed PMID: 29643852; PubMed Central PMCID: PMC5882777.

Plunkett FJ, Franzese O, Finney HM, Fletcher JM, Belaramani LL, Salmon M, Dokal I, Webster D, Lawson AD, Akbar AN. The loss of telomerase activity in highly differentiated CD8⁺CD28⁻CD27⁻ T cells is associated with decreased Akt (Ser473) phosphorylation. *J Immunol*. 2007; 178(12):7710-9. doi: 10.4049/jimmunol.178.12.7710. PMID: 17548608.

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. PubMed PMID: 16687695.

Pomatto LCD, Davies KJA. Adaptive homeostasis and the free radical theory of ageing. *Free Radic Biol Med*. 2018; 124:420-430. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.016. Epub 2018 Jun 28. PMID: 29960100; PMCID: PMC6098721.

Prabhakar MC, Santhikrupa D, Manasa N, Rao OU. Status of free radicals and antioxidants in leprosy patients. *Indian J Lepr*. 2013; 85(1):5-9. PMID: 24046909.

Prieur A, Besnard E, Babled A, Lemaitre JM. p53 and p16(INK4A) independent induction of senescence by chromatin-dependent alteration of S-phase progression. *Nat Commun*. 2011; 2:473. doi: 10.1038/ncomms1473. PMID: 21915115.

Rambukkana A. Molecular basis for the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Curr Opin Microbiol*. 2001; 4:21-27.

Rambukkana A. *Mycobacterium leprae*-induced demyelination: a model for early nerve degeneration. *Curr Opin Immunol*. 2004 Aug;16(4):511-8. doi: 10.1016/j.coi.2004.05.021. PMID: 15245748.

Rao PN, Suneetha S. Pure neuritic leprosy: Current status and relevance. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2016; 82(3):252-61. doi: 10.4103/0378-6323.179086. PMID: 27088926.

- Renshaw M, Rockwell J, Engleman C, Gewirtz A, Katz J, Sambhara S. Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging. *J Immunol.* 2002; 169(9):4697-701. PubMed PMID: 12391175.
- Reuben DB, Cheh AI, Harris TB, Ferrucci L, Rowe JW, Tracy RP, Seeman TE. Peripheral blood markers of inflammation predict mortality and functional decline in high-functioning community-dwelling older persons. *J Am Geriatr Soc.* 2002; 50(4):638-44. PubMed PMID: 11982663.
- Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1966; 34(3):255-73. PubMed PMID: 5950347.
- Rivas-Santiago B, Hernandez-Pando R, Carranza C, Juarez E, Contreras JL, Aguilar-Leon D, Torres M, Sada E. Expression of cathelicidin LL-37 during *Mycobacterium tuberculosis* infection in human alveolar macrophages, monocytes, neutrophils, and epithelial cells. *Infect Immun.* 2008; 76(3):935-41. Epub 2007 Dec 26. PubMed PMID: 18160480; PubMed Central PMCID: PMC2258801.
- Rodier F, Coppé JP, Patil CK, Hoeijmakers WA, Muñoz DP, Raza SR, Freund A, Campeau E, Davalos AR, Campisi J. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol.* 2009; 11(8):973-9. doi: 10.1038/ncb1909. Epub 2009 Jul 13. Erratum in: *Nat Cell Biol.* 2009 Oct;11(10):1272. Dosage error in article text. PubMed PMID: 19597488; PubMed Central PMCID: PMC2743561.
- Roubenoff R. Catabolism of aging: is it an inflammatory process? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2003; 6(3):295-9. Review. PubMed PMID: 12690262.
- Rudzińska M, Parodi A, Balakireva AV, Chepikova OE, Venanzi FM, Zamyatnin AA Jr. Cellular aging characteristics and their association with age-related disorders. *Antioxidants (Basel).* 2020; 9(2) pii: E94. doi: 10.3390/antiox9020094. Review. PubMed PMID: 31979201.
- Sadhu S, Khaitan BK, Joshi B, Sengupta U, Nautiyal AK, Mitra DK. Reciprocity between regulatory T cells and Th17 cells: relevance to polarized immunity in Leprosy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(1):e0004338. doi: 10.1371/journal.pntd.0004338. eCollection 2016 Jan. PubMed PMID: 26751584; PubMed Central PMCID: PMC4709061.
- Sadhu S, Mitra DK. Emerging concepts of adaptive immunity in leprosy. *Front Immunol.* 2018; 9:604. doi: 10.3389/fimmu.2018.00604. eCollection 2018. Review. PubMed PMID: 29686668; PubMed Central PMCID: PMC5900054.
- Saini C, Ramesh V, Nath I. Increase in TGF- β secreting CD4⁺CD25⁺ FOXP3⁺ T regulatory cells in anergic lepromatous leprosy patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8(1):e2639. doi: 10.1371/journal.pntd.0002639. eCollection 2014. PubMed PMID: 24454972; PubMed Central PMCID: PMC3894184.
- Saini C, Tarique M, Ramesh V, Khanna N, Sharma A. $\gamma\delta$ T cells are associated with inflammation and immunopathogenesis of leprosy reactions. *Immunol Lett.* 2018; 200:55-65. doi: 10.1016/j.imlet.2018.07.005. Epub 2018 Jul 11. PubMed PMID: 30006101.
- Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10(7):490-500. doi: 10.1038/nri2785. Epub 2010 Jun 18. Review. PubMed PMID: 20559327.
- Salgame P, Yamamura M, Bloom BR, Modlin RL. Evidence for functional subsets of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in human disease: lymphokine patterns in leprosy. *Chem Immunol.* 1992; 54:44-59. Review. PubMed PMID: 1358110.
- Salminen A, Huuskonen J, Ojala J, Kauppinen A, Kaarniranta K, Suuronen T. Activation of innate immunity system during aging: NF- κ B signaling is the molecular culprit of inflamm-aging. *Ageing Res Rev.* 2008; 7(2):83-105. Epub 2007 Sep 20. Review. PubMed PMID: 17964225.
- Sanders YY, Liu H, Zhang X, Hecker L, Bernard K, Desai L, Liu G, Thannickal VJ. Histone modifications in senescence-associated resistance to apoptosis by oxidative stress. *Redox Biol.* 2013; 1:8-16. doi: 10.1016/j.redox.2012.11.004. eCollection 2013. PubMed PMID: 24024133; PubMed Central PMCID: PMC3757696.

- Sansoni P, Vescovini R, Fagnoni FF, Akbar A, Arens R, Chiu YL, Cičin-Šain L, Dechanet-Merville J, Derhovanessian E, Ferrando-Martinez S, Franceschi C, Frasca D, Fulöp T, Furman D, Gkrania-Klotsas E, Goodrum F, Grubeck-Loebenstein B, Hurme M, Kern F, Lilleri D, López-Botet M, Maier AB, Marandu T, Marchant A, Matheï C, Moss P, Muntasell A, Remmerswaal EB, Riddell NE, Rothe K, Sauce D, Shin EC, Simanek AM, Smithey MJ, Söderberg-Nauclér C, Solana R, Thomas PG, van Lier R, Pawelec G, Nikolich-Zugich J. New advances in CMV and immunosenescence. *Exp Gerontol*. 2014; 55:54-62. doi: 10.1016/j.exger.2014.03.020. Epub 2014 Apr 3. PubMed PMID: 24703889.
- Santos AR, Suffys PN, Vanderborght PR, Moraes MO, Vieira LM, Cabello PH, Bakker AM, Matos HJ, Huizinga TW, Ottenhoff TH, Sampaio EP, Sarno EN. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J Infect Dis*. 2002 Dec 1;186(11):1687-91. Epub 2002 Nov 11. PubMed PMID: 12447749.
- 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. PubMed PMID: 2015700; PubMed Central PMCID:PMC1535359.
- 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*. 2015; 33(1):99-107. doi: 10.1016/j.clindermatol.2014.10.001. PMID: 25432815.
- Sbardella D, Fasciglione GF, Gioia M, Ciaccio C, Tundo GR, Marini S, Coletta M. Human matrix metalloproteinases: an ubiquitous class of enzymes involved in several pathological processes. *Mol Aspects Med*. 2012; 33(2):119-208. doi: 10.1016/j.mam.2011.10.015. Epub 2011 Nov 10. Review. PubMed PMID: 22100792.
- Schaible UE, Kaufmann SH. Malnutrition and infection: complex mechanisms and global impacts. *PLoS Med*. 2007; 4(5):e115. Review. PubMed PMID: 17472433; PubMed Central PMCID: PMC1858706.
- Schalcher TR, Borges RS, Coleman MD, Batista Júnior J, Salgado CG, Vieira JL, Romão PR, Oliveira FR, Monteiro MC. Clinical oxidative stress during leprosy multidrug therapy: impact of dapsoneoxidation. *PLoS One*. 2014; 9(1):e85712. doi: 10.1371/journal.pone.0085712. eCollection 2014. PubMed PMID: 24465659; PubMed Central PMCID: PMC3899049.
- Schalcher TR, Vieira JL, Salgado CG, Borges Rdos S, Monteiro MC. Antioxidant factors, nitric oxide levels, and cellular damage in leprosy patients. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013; 46(5):645-9. doi: 10.1590/0037-8682-1506-2013. PubMed PMID: 24270257.
- 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-gamma activation inhibits complement receptor function and phagocytosis of this bacterium. *J Immunol*. 1991; 147(6):1983-94. PMID: 1679838.
- Schmitt CA. Senescence, apoptosis and therapy--cutting the lifelines of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3(4):286-95. Review. PubMed PMID: 12671667.
- Schön T, Hernandez-Pando RH, Negesse Y, Leekassa R, Sundqvist T, Britton S. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in borderline leprosy lesions. *Br J Dermatol*. 2001; 145(5):809-15. PubMed PMID: 11736907.
- Scollard DM. Leprosy research declines, but most of the basic questions remain unanswered. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 2005; 73(1):25-7. PubMed PMID: 15898836.
- Scollard, D.M., Adams, L.B., Gillis, T.P., Krahenbuhl, J.L., Truman, R.W., et al. The continuing challenges of leprosy. *Clin. Microbiol. Rev*. 2006; 19:338–381.
- Shao L, Fujii H, Colmegna I, Oishi H, Goronzy JJ, Weyand CM. Deficiency of the DNA repair enzyme ATM in rheumatoid arthritis. *J Exp Med*. 2009; 206(6):1435-49. doi: 10.1084/jem.20082251. Epub 2009 May 18. PubMed PMID: 19451263; PubMed Central PMCID: PMC2715066.
- Sharma R, Singh P, Loughry WJ, Lockhart JM, Inman WB, Duthie MS, Pena MT, Marcos LA, Scollard DM, Cole ST, Truman RW. Zoonotic Leprosy in the Southeastern United States. *Emerg Infect Dis*. 2015; 21(12):2127-34. doi: 10.3201/eid2112.150501. PubMed PMID: 26583204; PubMed Central PMCID: PMC4672434.

- Shimoji Y, Ng V, Matsumura K, Fischetti VA, Rambukkana A. A 21-kDa surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(17):9857-62. doi: 10.1073/pnas.96.17.9857. PMID: 10449784; PMCID: PMC22300.
- Sieling PA, Jullien D, Dahlem M, Tedder TF, Rea TH, Modlin RL, Porcelli SA. CD1 expression by dendritic cells in human leprosy lesions: correlation with effective host immunity. *J Immunol*. 1999; 162(3):1851-8. PubMed PMID: 9973451.
- Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*. 1997; 82(2):291-5. Review. PubMed PMID: 9129943.
- Silva PHL, Santos LN, Mendes MA, Nery JAC, Sarno EN, Esquenazi D. Involvement of TNF-producing CD8(+) effector memory T cells with immunopathogenesis of erythema nodosum leprosum in leprosy patients. *Am J Trop Med Hyg*. 2019; 100(2):377-385. doi: 10.4269/ajtmh.18-0517. PubMed PMID: 30652669; PubMed Central PMCID: PMC6367624.
- Singh MK, Yadav SS, Gupta V, Khattri S. Immunomodulatory role of *Emblica officinalis* in arsenic induced oxidative damage and apoptosis in thymocytes of mice. *BMC Complement Altern Med*. 2013; 13:193. doi: 10.1186/1472-6882-13-193. PubMed PMID: 23889914; PubMed Central PMCID: PMC3733846.
- Singh P, Cole ST. *Mycobacterium leprae*: genes, pseudogenes and genetic diversity. *Future Microbiol*. 2011 Jan;6(1):57-71. doi: 10.2217/fmb.10.153. Review. PubMed PMID: 21162636; PubMed Central PMCID: PMC3076554.
- Smith CS, Noordeen SK, Richardus JH, Sansarricq H, Cole ST, Soares RC, Savioli L, Aerts A, Barua S. A strategy to halt leprosy transmission. *Lancet Infect Dis*. 2014; 14(2):96-8. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70365-7. Erratum in: *Lancet Infect Dis*. 2014 Feb;14(2):98. Aertsh, Ann [corrected to Aerts, Ann]; Barua, Sumana [remove]. *Lancet Infect Dis*. 2014 Mar;14(3):182. PubMed PMID: 24457165.
- Srinivas G, Muthuvel T, Lal V, Vaikundanathan K, Schwienhorst-Stich EM, Kasang C. Risk of disability among adult leprosy cases and determinants of delay in diagnosis in five states of India: A case-control study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019; 13(6):e0007495. doi: 10.1371/journal.pntd.0007495. eCollection 2019 Jun. PubMed PMID: 31247040; PubMed Central PMCID: PMC6619834.
- Sterne JA, Pönnighaus JM, Fine PE, Malema SS. Geographic determinants of leprosy in Karonga District, Northern Malawi. *Int J Epidemiol*. 1995; 24(6):1211-22. PubMed PMID: 8824865.
- St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem*. 2002; 277:44784-44790.
- Strindhall J, Ernerudh J, Mörner A, Waalen K, Löfgren S, Matussek A, Bengner M. Humoral response to influenza vaccination in relation to pre-vaccination antibody titres, vaccination history, cytomegalovirus serostatus and CD4/CD8 ratio. *Infect Dis (Lond)*. 2016; 48(6):436-42. doi: 10.3109/23744235.2015.1135252. Epub 2016 Jan 25. PubMed PMID: 27030916.
- Strindhall J, Löfgren S, Främsth C, Matussek A, Bengner M, Ernerudh J, Wikby A. CD4/CD8 ratio<1 is associated with lymphocyte subsets, CMV and gender in 71-year old individuals: 5-Year follow-up of the Swedish HEXA Immune Longitudinal Study. *Exp Gerontol*. 2017; 95:82-87. doi: 10.1016/j.exger.2017.03.020. Epub 2017 May 2. PubMed PMID: 28476585.
- Swathi M, Tagore R. Study of Oxidative Stress in Different Forms of Leprosy. *Indian J Dermatol*. 2015; 60(3):321. doi: 10.4103/0019-5154.156426. PubMed PMID: 26120177; PubMed Central PMCID: PMC4458962.
- Teteloshvili N, Dekkema G, Boots AM, Heeringa P, Jellema P, de Jong D, Terpstra M, Brouwer E, Pawelec G, Kok K, van den Berg A, Kluiver J, Kroesen BJ. Involvement of MicroRNAs in the aging-related decline of CD28 expression by human T cells. *Front Immunol*. 2018; 9:1400. doi: 10.3389/fimmu.2018.01400. PMID: 29967621; PMCID:PMC6015875.
- Thoma-Uszynski S, Stenger S, Takeuchi O, Ochoa MT, Engele M, Sieling PA, Barnes PF, Rollinghoff M, Bolcskei PL, Wagner M, Akira S, Norgard MV, Belisle JT, Godowski PJ, Bloom BR, Modlin RL. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science*. 2001;

291(5508):1544-7. PubMed PMID: 11222859.

Trautman JR. A brief history of Hansen's disease. *Bull N Y Acad Med.* 1984; 60(7):689-95. PubMed PMID: 6207880; PubMed Central PMCID: PMC1911721.

Trounce I, Byrne E, Marzuki S. Decline in skeletal muscle mitochondrial chain function: possible factor in aging. *Lancet.* 1989; 1:637-639.

Truman RW, Singh P, Sharma R, Busso P, Rougemont J, Paniz-Mondolfi A, Kapopoulou A, Brisse S, Scollard DM, Gillis TP, Cole ST. Probable zoonotic leprosy in the southern United States. *N Engl J Med.* 2011; 364(17):1626-33. doi: 10.1056/NEJMoa1010536. PubMed PMID: 21524213; PubMed Central PMCID: PMC3138484.

Tsaknaridis L, Spencer L, Culbertson N, Hicks K, LaTocha D, Chou YK, et al. Functional assay for human CD4+CD25+ Treg cells reveals an age-dependent loss of suppressive activity. *J Neurosci Res.* 2003; 74:296-308. doi: 10.1002/jnr.10766.

Uchida K. HNE as an inducer of COX-2. *Free Radic Biol Med.* 2017; 111:169-172. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.004. Epub 2017 Feb 9. PMID: 28192229.

Uchio R, Hirose Y, Murosaki S, Yamamoto Y, Ishigami A. High dietary intake of vitamin C suppresses age-related thymic atrophy and contributes to the maintenance of immune cells in vitamin C-deficient senescence marker protein-30 knockout mice. *Br J Nutr.* 2015; 113(4):603-9. doi: 10.1017/S0007114514003857. Epub 2015 Jan 22. PubMed PMID: 25608928.

Van Beers SM, Hatta M, Klatser PR. Patient contact is the major determinant in incident leprosy: implications for future control. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1999; 67(2):119-28. PubMed PMID: 10472363.

Verhagen CE, Wierenga EA, Buffing AA, Chand MA, Faber WR, Das PK. Reversal reaction in borderline leprosy is associated with a polarized shift to type 1-like *Mycobacterium leprae* T cell reactivity in lesional skin: a follow-up study. *J Immunol.* 1997; 159(9):4474-83. PubMed PMID: 9379047.

Verschoor CP, Johnstone J, Millar J, Dorrington MG, Habibagahi M, Lelic A, Loeb M, Bramson JL, Bowdish DM. Blood CD33(+)/HLA-DR(-) myeloid-derived suppressor cells are increased with age and a history of cancer. *J Leukoc Biol.* 2013; 93(4):633-7. doi: 10.1189/jlb.0912461. Epub 2013 Jan 22. PubMed PMID: 23341539; PubMed Central PMCID: PMC3701116.

Vijayaraghavan R, Suribabu CS, Sekar B, Oommen PK, Kavithalakshmi SN, Madhusudhanan N, Panneerselvam C. Protective role of vitamin E on the oxidative stress in Hansen's disease (Leprosy) patients. *Eur J Clin Nutr.* 2005; 59(10):1121-1128. doi: 10.1038/sj.ejcn.1602221. PMID: 16015260.

Walker SL, Balagon M, Darlong J, Doni SN, Hagge DA, Halwai V, John A, Lambert SM, Maghanoy A, Nery JA, Neupane KD, Nicholls PG, Pai VV, Parajuli P, Sales AM, Sarno E, Shah M, Tsegaye D, Lockwood DN; Erythema nodosum leprosum. international STudy group. 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. doi: 10.1371/journal.pntd.0004065. eCollection 2015. PubMed PMID: 26351858; PubMed Central PMCID: PMC4564249.

Watson RE, Gibbs NK, Griffiths CE, Sherratt MJ. Damage to skin extracellular matrix induced by UV exposure. *Antioxid Redox Signal.* 2014; 21(7):1063-77. doi: 10.1089/ars.2013.5653. Epub 2014 Feb 3. Review. PubMed PMID: 24124905.

Weinberger B, Herndler-Brandstetter D, Schwanninger A, Weiskopf D, Grubeck-Loebenstien B. Biology of immune responses to vaccines in elderly persons. *Clin Infect Dis.* 2008; 46(7):1078-84. doi: 10.1086/529197. Review. PubMed PMID: 18444828.

Weindruch R, Kayo T, Lee CK, Prolla TA. Microarray profiling of gene expression in aging and its alteration by caloric restriction in mice. *J Nutr.* 2001; 131(3):918S-923S. Review. PubMed PMID: 11238786.

Wessling-Resnick M. Nramp1 and Other Transporters Involved in Metal Withholding during Infection. *J Biol Chem.* 2015; 290(31):18984-90. doi: 10.1074/jbc.R115.643973. Epub 2015 Jun 8. Review. PubMed PMID: 26055722; PubMed Central PMCID: PMC4521020.

Wintergerst ES, Maggini S, Hornig DH. Immune-enhancing role of vitamin C and zinc and effect on clinical conditions. *Ann Nutr Metab.* 2006; 50(2):85-94. Epub 2005 Dec 21. Review. PubMed PMID: 16373990.

World Health Organization. Global leprosy (Hansen disease) update, 2019: time to step-up prevention initiatives; 2020. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9536>. Acessado em 30 de março de 2021.

World Health Organization. Global leprosy update, 2018: moving towards a leprosy-free world; 2019. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/326776>. Acessado em 31 de março de 2021.

World Health Organization. Chemotherapy of leprosy for control programmes. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 1982;675:1-33.

Xia S, Zhang X, Zheng S, Khanabdali R, Kalionis B, Wu J, Wan W, Tai X. An update on inflamm-aging: mechanisms, prevention, and treatment. *J Immunol Res.* 2016; 8426874. doi: 10.1155/2016/8426874. Epub 2016 Jul 14. Review. PubMed PMID: 27493973; PubMed Central PMCID: PMC4963991.

Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* 1994; 74(1):139-62. doi: 10.1152/physrev.1994.74.1.139. Erratum in: *Physiol Rev* 1995; 75(1): preceding 1. PMID: 8295932.

Zahrt TC, Deretic V. Reactive nitrogen and oxygen intermediates and bacterial defenses: unusual adaptations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antioxid Redox Signal.* 2002 Feb;4(1):141-59. doi: 10.1089/152308602753625924. PMID: 11970850.

Zampanoni V. Leprosy: disease, isolation, and segregation in colonial Mozambique. *Hist Cienc Saude Manguinhos.* 2017 Jan-Mar;24(1):13-39. Portuguese, English. doi: 10.1590/S0104-59702016005000028. Epub 2016 Nov 16. PMID: 27849217.

Zhang H, Forman HJ. 4-hydroxynonenal-mediated signaling and aging. *Free Radic Biol Med.* 2017; 111:219-225. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.032. Epub 2016 Nov 20. PMID: 27876535; PMCID: PMC5438786.

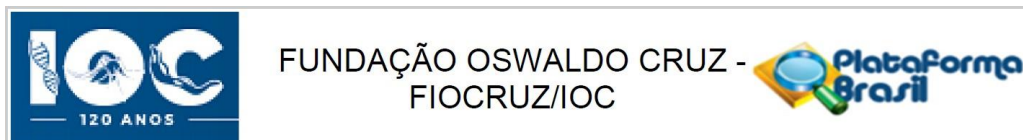
Zhou D, Borsa M, Simon AK. Hallmarks and detection techniques of cellular senescence and cellular ageing in immune cells. *Aging Cell.* 2021; 20(2):e13316. doi: 10.1111/ace1.13316. Epub 2021 Feb 1. PMID: 33524238; PMCID: PMC7884036.

Zhu J, Paul WE. Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol Rev.* 2010; 238(1):247-62. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00951.x. Review. Erratum in: *Immunol Rev.* 2011 Mar;240(1):317. PubMed PMID: 20969597; PubMed Central PMCID: PMC2975272.

Zuk M, McKean KA. Sex differences in parasite infections: patterns and processes. *Int J Parasitol.* 1996; 26(10):1009-23. Review. PubMed PMID: 8982783.

ANEXOS

APROVAÇÃO DO CONSELHO DE ÉTICA EM PESQUISA:



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação entre a associação da patogênese da Hanseníase em idosos e aspectos de imunossenescência, estresse oxidativo, modulação autofágica e expressão gênica.

Pesquisador: Danuza Esquenazi

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 27052919.0.0000.5248

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.827.448

Apresentação do Projeto:

A Hanseníase é caracterizada por um amplo espectro de formas clínicas determinado de acordo com a resposta imune do hospedeiro frente ao *Mycobacterium leprae* (ML). Normalmente, o diagnóstico da doença ocorre entre a segunda e quarta décadas de vida, entretanto, casos de Hanseníase na terceira idade tem sido mais frequentes em nosso país. Ainda não está claro que fatores levam ao desencadeamento da doença em idosos, visto que a maior parte da destes indivíduos reside por toda a vida em área endêmica e que, a priori, a vulnerabilidade à Hanseníase tem determinação genética. Levando em consideração as alterações relacionadas ao estresse oxidativo, conseqüente indução de autofagia, e ao sistema imune durante o envelhecimento, o ML pode encontrar situação favorável para sua multiplicação e o conseqüente desenvolvimento de sinais e sintomas da doença nesta etapa da vida. Ou seja: as conseqüências do aumento das concentrações das espécies reativas do oxigênio e a eficácia reduzida da imunidade podem se associar à susceptibilidade genética da doença, levando ao aparecimento da Hanseníase em idosos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar, em idosos portadores de hanseníase, a possível associação entre a expressão de genes

Endereço: Av. Brasil 4036, sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 3.827.448

relacionados à suscetibilidade à doença, a participação do estresse oxidativo, o mecanismo de autofagia e parâmetros de imunosenescência.

Objetivo Secundário:

Analisar o estresse oxidativo nos grupos a serem estudados por meio da quantificação do HNE em lesões de pele e a expressão gênica de enzimas antioxidantes em sangue periférico;

Avaliar a participação das alças inflamatórias (TNF e IFN-) e anti- inflamatórias (IL-4 e IL-10) e sua correlação com o estresse oxidativo por teste imunoenzimático;

Avaliar a presença de indicadores de imunosenescência tais como: anticorpos anti-CMV no soro por quimioluminescência e a relação linfócitos T CD4/CD8, bem como a frequência da subpopulação de linfócitos T naïve e memória em fragmentos de lesões de pele obtidas por biopsias por meio de imunofluorescência e microscopia confocal;

Avaliar a hiporesponsividade de linfócitos T pela análise da expressão de CD28 e de macrófagos pela expressão de CD68 em fragmentos de lesões de pele obtidas por biopsias por meio de imunofluorescência e microscopia confocal;

Analisar a expressão de genes previamente associados a suscetibilidade à Hanseníase e genes relacionados com envelhecimento e autofagia de pacientes por meio de qPCR em tempo real.

Associar os dados relacionados à imunosenescência aos dados referentes ao estresse oxidativo;

Avaliar proteínas envolvidas no mecanismo autofágico, obtidas através de biópsia cutânea dos pacientes pelo método de Western Blot.

Correlacionar os achados laboratoriais com o índice baciloscópico e dados demográficos dos pacientes no diagnóstico da Hanseníase.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Pode ocorrer, muito raramente, desmaios, manchas arroxeadas ou infecções no local da punção

Endereço: Av. Brasil 4036, sala 705 (Campus Expansão)

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3882-9011

Fax: (21)2561-4815

E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 3.827.448

venosa, porém estes riscos serão mínimos em função do empenho do profissional de saúde responsável pela coleta e pela qualidade dos materiais usados. Caso o voluntário se sinta mal após a coleta, a equipe profissional de saúde prestará total assistência, suprimindo as necessidades e garantindo o bem-estar do indivíduo.

Benefícios:

Ao participar da pesquisa, os pacientes e voluntários sadios contribuirão para a elucidação dos mecanismos envolvidos na imunopatogênese da hanseníase em idosos. Não haverá benefício direto para o participante.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Critério de Inclusão:

Pacientes diagnosticados com hanseníase multibacilar (formas LL e BL da doença) e paucibacilar (TT e BT), classificados em jovens com idade entre 18 a 40 anos, e idosos com idade igual ou superior a 60 anos. Os mesmos deverão ser virgens de tratamento e diagnosticados pela primeira vez. E em relação aos voluntários sadios, incluem-se grupos com a mesma faixa etária e moradores de áreas endêmicas para a hanseníase.

Critério de Exclusão:

Para pacientes com hanseníase, os critérios de exclusão são: 1.casos de recidiva da doença; 3.tratamento com poliquimioterapia já iniciado; 3.uso de fármacos imunomoduladores; 4.comorbidades infecciosas adicionais como, por exemplo, HIV, hepatites B e C; 5.gestantes; 6.indivíduos com idade menor que 18 anos, e entre 40 e 60 anos; 7.doenças autoimunes. E para voluntários não portadores de hanseníase, incluem-se os itens de números 3 a 7.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto devidamente assinado e carimbado

Carta anuência do ASA Ambulatório Souza Araújo para utilizar amostras biológicas

Termo de anuência Faculdade de Ciências Médicas UERJ

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Planilha de Orçamento financeiro detalhada

Declaração Sigilo do Pesquisador

Declaração de Infraestrutura para execução da pesquisa

Endereço: Av. Brasil 4036, sala 705 (Campus Expansão)

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3882-9011

Fax: (21)2561-4815

E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 3.827.448

Recomendações:

Apresentar relatórios parciais (anuais) e relatório final do projeto de pesquisa é responsabilidade indelegável do pesquisador principal.

Qualquer modificação ou emenda ao projeto de pesquisa em pauta deve ser submetida à apreciação do CEP Fiocruz/IOC.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC) em sua 260ª reunião, realizada em 04.02.2020, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1486625.pdf	09/12/2019 18:37:10		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Hanseniose_Envelhecimento.pdf	09/12/2019 18:30:13	Danuza Esquenazi	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	09/12/2019 18:00:47	Danuza Esquenazi	Aceito
Outros	Carta_anuencia_ASA.pdf	09/12/2019 17:58:22	Danuza Esquenazi	Aceito
Outros	Termo_de_anuencia_Faculdade_de_Ciencias_Medicas.pdf	07/12/2019 23:39:00	Danuza Esquenazi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_pacientes.pdf	07/12/2019 23:30:41	Danuza Esquenazi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_voluntarios_sadios.pdf	07/12/2019 23:30:32	Danuza Esquenazi	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	07/12/2019 23:30:05	Danuza Esquenazi	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Pesquisador_Principal.pdf	07/12/2019 23:29:26	Danuza Esquenazi	Aceito

Endereço: Av. Brasil 4036, sala 705 (Campus Expansão)

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3882-9011

Fax: (21)2561-4815

E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 3.827.448

Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_de_Infraestrutura.pdf	07/12/2019 23:29:06	Danuza Esquenazi	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	07/12/2019 23:28:42	Danuza Esquenazi	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

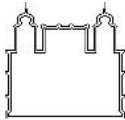
Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 07 de Fevereiro de 2020

Assinado por:
José Henrique da Silva Pilotto
(Coordenador(a))

TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PACIENTES):



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Laboratório de Hanseníase/Ambulatório Souza Araújo

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Título do projeto: Investigação da associação da patogênese da Hanseníase em idosos com aspectos de imunossenescência, estresse oxidativo, modulação autofágica e expressão gênica.

Pesquisadora principal: Danuza de Almeida Esquenazi

Contato: Laboratório de Hanseníase/IOC

Endereço: Av. Brasil, 4365 - Manguinhos

Telefones: 21-2562-1569 / 21-99128-9245

e-mail: danuza@ioc.fiocruz.br; esquenazi.danuza@gmail.com

1 – Considerações iniciais

Estamos lhe convidando para participar como voluntário de uma pesquisa sobre hanseníase em idosos (pessoas com 60 anos ou mais). Esperamos saber um pouco mais sobre os fatores associados à idade avançada que possam participar na forma que ficam doentes os indivíduos idosos. Caso você aceite participar, colheremos sangue da sua veia para experimentos e pedaço da mancha da pele que já foi colhida na rotina do seu diagnóstico. Os experimentos relacionados a esse projeto serão feitos no Laboratório de Hanseníase – IOC/Fundação Oswaldo Cruz. Além de voluntários idosos, convidaremos também voluntários com idade entre 18 e 40 anos com a finalidade de compor um grupo mais jovem para comparar os resultados dos experimentos com os obtidos nos idosos. O presente projeto de pesquisa está de acordo com as normas elaboradas pelo comitê de ética em pesquisa (CEP), que tem como função avaliar e acompanhar os aspectos éticos das pesquisas envolvendo seres humanos, como esta pesquisa.

Descrição do projeto:

A hanseníase é uma doença causada por uma bactéria, que é transmitida entre as pessoas por meio do ar. A bactéria que causa a doença vive nas células dos nervos dos braços e das pernas, o que causa as manchas na pele, normalmente um tom mais claro, que perdem a sensação de dor e de calor. A hanseníase tem cura, o paciente deve se comprometer em fazer o tratamento com os antibióticos pelo período todo, que costuma ser de 6 meses a 1 ano. Serão convidados 40 voluntários portadores de hanseníase e 20 voluntários não portadores da doença, para que possamos de maneira satisfatória alcançar os objetivos desse estudo.

1.1 Procedimentos que serão realizados para este estudo:

- 1.1.1 Coleta de sangue: Serão coletados dois tubos de sangue: um de 2,5mL (uma colher de sobremesa) e outro de 10mL (2 colheres de sopa). O sangue será usado para avaliarmos como o seu corpo se defende da bactéria, bem como a presença de algumas alterações que podem ocorrer em idosos portadores da hanseníase ou não.
- 1.1.2 Um fragmento da pele tirado da biópsia será visto ao microscópio com corantes especiais. Este material já será colhido para realização do diagnóstico da doença, usaremos apenas parte desse fragmento.
- 1.1.3 Revisão de prontuário e consulta ao banco de dados do Ambulatório Souza Araújo (ASA). O seu prontuário será revisado para obter dados, como: endereço, data de nascimento, tempo que mora no mesmo local, profissão, escolaridade, altura, peso, presença de outras doenças, medicamentos que utiliza, ingestão de álcool e uso de cigarro. Além disso, vamos necessitar de dados médicos referentes aos exames que você vai realizar ao longo do seu acompanhamento no ASA.

1.3 – Possíveis riscos:

Pode ocorrer, muito raramente, desmaio, mancha arroxeadada ou infecção no local da coleta do sangue. Porém estes riscos serão mínimos porque um profissional de saúde treinado fará a coleta e será usado material estéril e condições de segurança. Caso o voluntário se sinta mal após a coleta, a equipe profissional de saúde prestará total assistência, suprimindo as necessidades e garantindo o bem-estar do indivíduo.

1.4 – Benefícios da pesquisa

Caso aceite participar dessa pesquisa, você contribuirá para que tenhamos mais informações sobre a hanseníase em idosos e também para que tenhamos menos casos da doença no futuro.

1.5 – Garantias e outras informações:

Você poderá desistir a qualquer momento, basta informar alguém da equipe. Caso desista ou se negue a participar dessa pesquisa seu atendimento não será feito de forma diferente daqueles que participam. Garantimos o segredo dos resultados dos exames laboratoriais. A identificação das amostras coletadas será feita por números, evitando a exposição dos dados que o identifiquem. Apenas os pesquisadores terão acesso às suas informações e seu nome não constará em quaisquer informes a respeito. Todos os dados serão confidenciais, mantidas em anonimato e o uso dos dados será restrito à equipe da pesquisa. Segundo a Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, Ministério da Saúde (CNS/MS) você tem direito a receber cobertura material para reparação de eventual dano decorrente desta pesquisa. Sua participação nesta pesquisa é voluntária, você não receberá pagamento, o Ambulatório Sousa Araújo, como centro de referência no tratamento e diagnóstico da hanseníase, oferece ajuda de custo para o pagamento do transporte, sendo assim, os voluntários não terão gastos na sua participação na pesquisa.

Considerações finais:

Caso você tenha alguma dúvida em relação a esta pesquisa, os processos de coleta de amostra biológica, entre em contato com os pesquisadores da equipe: Danuza Esquenazi (Celular: 021 99128- 9245/e-mail: danuza@ioc.fiocruz.br), Pedro Henrique Lopes da Silva (Celular: 021 99168- 1825/e-mail: peddro.henrique10@gmail.com) ou com Julia Monteiro Pereira Leal (Celular: 021 96765-0409/e-mail: julialeal94@gmail.com). Pode ligar a cobrar, se preferir.

Se tiver dúvidas sobre os seus direitos como participante da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz pelo telefone 2561-4815 ou e-mail cepfiocruz@ioc.fiocruz.br. Este estudo somente vai começar após a sua aprovação pelo Comitê de Ética.

2 – Consentimento livre:

Concordo em participar voluntariamente do estudo: **“Investigação da associação da patogênese da Hanseníase em idosos com aspectos de imunossenescência, estresse oxidativo, modulação autofágica e expressão gênica.”**. Fui devidamente esclarecido (a) quanto ao material a ser coletado, também compreendi todos os riscos e desconfortos que poderei ter, assim como os benefícios que esta pesquisa poderá gerar para a população. O paciente, caso esteja em concordância, deverá assinar este documento em duas vias, sendo que uma delas será entregue ao próprio participante da pesquisa.

Rio de Janeiro, _____

(Data)

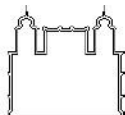
(Nome e assinatura da pessoa que aplica)



(Nome legível do participante)

(Assinatura do participante)

TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (NÃO HANSENIANOS):



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Laboratório de Hanseníase/Ambulatório Souza Araújo

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Título do projeto: Investigação da associação da patogênese da Hanseníase em idosos com aspectos de imunossenescência, estresse oxidativo, modulação autofágica e expressão gênica.

Pesquisadora principal: Danuza de Almeida Esquenazi

Contato: Laboratório de Hanseníase/IOC

Endereço: Av. Brasil, 4365 - Manguinhos

Telefones: 21-2562-1569 / 21-99128-9245

e-mail: danuza@ioc.fiocruz.br; esquenazi.danuza@gmail.com

1 – Considerações iniciais

Estamos lhe convidando para participar como voluntário de uma pesquisa sobre hanseníase em idosos. Esperamos saber um pouco mais sobre os fatores associados à idade avançada que possam participar na forma que ficam doentes os indivíduos idosos. Caso você aceite participar, colheremos sangue da sua veia para experimentos e pedaço da mancha da pele que já foi colhida na rotina do seu diagnóstico. Os experimentos relacionados a esse projeto serão feitos no Laboratório de Hanseníase – IOC/Fundação Oswaldo Cruz. O presente projeto de pesquisa está de acordo com as normas elaboradas pelo comitê de ética em pesquisa (CEP), que tem como função avaliar e acompanhar os aspectos éticos das pesquisas envolvendo seres humanos, como esta pesquisa.

Descrição do projeto:

A hanseníase é uma doença causada por uma bactéria, que é transmitida entre as pessoas por meio do ar. A bactéria que causa a doença vive nas células dos nervos dos braços e das pernas, o que causa as manchas na pele, normalmente um tom mais claro, que perdem a sensação de dor e de calor. A hanseníase tem cura, o paciente deve se comprometer em fazer o tratamento com os antibióticos



pelo período todo, que costuma ser de 6 meses a 1 ano. Serão convidados 40 voluntários portadores de hanseníase e 20 voluntários não portadores da doença, para que possamos de maneira satisfatória alcançar os objetivos desse estudo.

1.1 Procedimentos que serão realizados para este estudo:

- 1.1.1 Coleta de sangue: Serão coletados dois tubos de sangue: um de 2,5mL (uma colher de sobremesa) e outro de 10mL (2 colheres de sopa). O sangue será usado para avaliarmos como o seu corpo se defende da bactéria, bem como a presença de algumas alterações que podem ocorrer em idosos portadores da hanseníase ou não.
- 1.1.2 No caso de indivíduos acompanhados em ambulatórios, será feita a revisão de prontuário. O seu prontuário será revisado para obter dados, como: endereço, data de nascimento, tempo que mora no mesmo local, profissão, escolaridade, altura, peso, presença de outras doenças, medicamentos que utiliza, ingestão de álcool e uso de cigarro. Além disso, vamos necessitar de dados médicos referentes aos exames que você realiza ao longo do seu acompanhamento médico.

1.3 – Possíveis riscos:

Pode ocorrer, muito raramente, desmaio, mancha arroxeadada ou infecção no local da coleta do sangue. Porém estes riscos serão mínimos porque um profissional de saúde treinado fará a coleta e será usado material estéril e condições de segurança.

1.4 – Benefícios da pesquisa

Caso aceite participar dessa pesquisa, você contribuirá para que tenhamos mais informações sobre a hanseníase em idosos e também para que tenhamos menos casos da doença no futuro.

1.5 – Garantias e outras informações:

Você poderá desistir a qualquer momento, basta informar alguém da equipe.

Garantimos o segredo dos resultados dos exames laboratoriais. A identificação das amostras coletadas será feita por números, evitando a exposição dos dados que o identifiquem. Apenas os pesquisadores terão acesso às suas informações e seu nome não constará em quaisquer informes a respeito.

Todos os dados serão confidenciais, mantidas em anonimato e o uso dos dados será restrito à equipe da pesquisa. Segundo a Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, Ministério da



Saúde (CNS/MS) você tem direito a receber cobertura material para reparação de eventual dano decorrente desta pesquisa.

Sua participação nesta pesquisa é voluntária, você não receberá pagamento, o Ambulatório Sousa Araújo, como centro de referência no tratamento e diagnóstico da hanseníase, oferece ajuda de custo para o pagamento do transporte, sendo assim, os voluntários não terão gastos na sua participação na pesquisa.

Considerações finais:

Caso você tenha alguma dúvida em relação a esta pesquisa, os processos de coleta de amostra biológica, entre em contato com os pesquisadores da equipe: Danuza Esquenazi (Celular: 021 99128-9245/danuza@ioc.fiocruz.br), Pedro Henrique Lopes da Silva (Celular: 021 99168-1825/e-mail: peddro.henrique10@gmail.com) ou com Julia Monteiro Pereira Leal (Celular: 021 96765-0409/e-mail: julialeal94@gmail.com). Pode ligar a cobrar, se preferir.

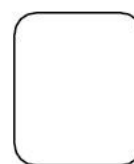
Se tiver dúvidas sobre os seus direitos como participante da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz pelo telefone 2561-4815 ou e-mail cepfiocruz@ioc.fiocruz.br. Este estudo somente vai começar após a sua aprovação pelo Comitê de Ética.

2 – Consentimento livre:

Concordo em participar voluntariamente do estudo: **“Investigação da associação entre expressão gênica, estresse oxidativo, parâmetros de imunosenescência e a patogênese da Hanseníase em idosos”**. Fui devidamente esclarecido (a) quanto ao material a ser coletado, também compreendi todos os riscos e desconfortos que poderei ter, assim como os benefícios que esta pesquisa poderá gerar para a população. O voluntário, caso esteja em concordância, deverá assinar este documento em duas vias, sendo que uma delas será entregue ao próprio participante da pesquisa.

Rio de Janeiro, _____

(Data)



(Nome e assinatura da pessoa que aplica)

(Nome legível do participante)

(Assinatura do participante)

OUTRAS PRODUÇÕES CIENTÍFICAS DO AUTOR COMPLEMENTARES À PRESENTE TESE:

Silva PHL, Santos LN, Mendes MA, Nery JAC, Sarno EN, Esquenazi D. Involvement of TNF-Producing CD8+ Effector Memory T Cells with Immunopathogenesis of Erythema Nodosum Leprosum in Leprosy Patients. *Am J Trop Med Hyg.* 2019 Feb;100(2):377-385. doi: 10.4269/ajtmh.18-0517. PMID: 30652669; PMCID: PMC6367624.

Dos Santos LN, **da Silva PH**, Alvim IM, Nery JA, Lara FA, Sarno EN, Esquenazi D. Role of T effector/memory Cells, TBX21 Gene Expression and T-Cell Homing Receptor on Type 1 Reaction in Borderline Lepromatous Leprosy Patients. *PLoS One.* 2016 Oct 20;11(10):e0164543. doi: 10.1371/journal.pone.0164543. PMID: 27764137; PMCID: PMC5072666.

Silva SR, Illarramendi X, Tempone AJ, **Silva PH**, Nery JA, Monteiro AM, Pessolani MC, Boasquevisque E, Sarno EN, Pereira GM, Esquenazi D. Downregulation of PHEX in multibacillary leprosy patients: observational cross-sectional study. *J Transl Med.* 2015 Sep 11;13:296. doi: 10.1186/s12967-015-0651-5. PMID: 26362198; PMCID: PMC4566286.