

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

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

Análise dos mecanismos imunológicos associados ao estabelecimento da reação reversa em pacientes com a forma lepromatosa da hanseníase

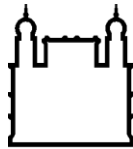
Luciana Nahar dos Santos

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

Orientadora: Euzenir Nunes Sarno

RIO DE JANEIRO

2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Luciana Nahar dos Santos

Análise dos mecanismos imunológicos associados ao estabelecimento da reação reversa em pacientes com a forma lepromatosa da hanseníase

ORIENTADOR: Prof. Dra. Euzenir Nunes Sarno

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Fátima da Conceição Silva
Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ – Titular/Presidente da Banca

Prof. Dra. Cleonice Alves de Melo Bento
Depto. de Microbiologia e Parasitologia - UNIRIO – Titular

Prof. Dra. Cynthia Silveira Horn
Instituto de Pesquisas Evandro Chagas - FIOCRUZ – Titular

Prof. Dra. Alda Maria Da-Cruz
Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ – Revisora/Suplente

Prof. Dra. Roberta Olmo Pinheiro
Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ – Suplente

Rio de Janeiro, 27 de março de 2014

Agradeço à Profa. Dra. Danuza Esquenazi que me orientou em cada mínimo detalhe e que com certeza contribuiu fortemente para a minha formação com toda a paciência e dedicação que um coorientador pode ter para com seu aluno

Agradecimentos

Agradeço à Deus, foi Ele quem me deu todas as forças que precisava para enfrentar cada momento difícil que encontrei durante o mestrado, sem Ele nada do que fiz e consegui até hoje seria possível;

À Dra Euzenir que confiou em mim, me dando o grande prazer de fazer parte de sua equipe e a honra de tê-la como orientadora. É enorme a minha admiração e respeito.

À Dra Roberta Olmo, pelas oportunidades, dedicação, paciência e incentivo desde a época da iniciação científica.

Ao Dr José Augusto que cuidou tão bem para que não perdêssemos um paciente do estudo.

À Dra Íris Alvim Peixoto, por toda a paciência do mundo nas análises das amostras no citômetro.

Aos alunos de iniciação científica e grandes amigos que fiz, Pedro Lopes Siva e Jhulli Matos por todo o apoio e companherismo dentro do laboratório.

Aos colegas e companheiros da sala 21, meus queridos Thais Amadeu, Priscila Andrade e Rafael Petito, sempre muito prestativos comigo.

Ao pessoal da sala 05/06 que me aturam desde a época da iniciação científica; Ariane, Andressa, Eliane, Mayara Barbosa, Mayara Mendes, Bruno Andrade, Rhana.

À minha querida mãe Victória e minha avó Luzia que sempre batalharam muito para eu poder chegar até aqui.

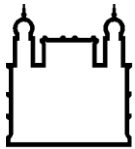
Aos amigos que entenderam todos os momentos que eu precisei ficar ausente para o desenvolvimento da dissertação, em especial ao Nathan Felipe e Sabrina que foram os que mais sofreram com a minha ausência.

Ao CNPq e à Fiocruz, pelo financiamento nestes últimos dois anos.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho, um sincero obrigada!

“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de palavras tem qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?”

Fernando Pessoa



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

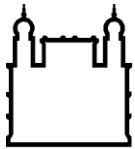
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Análise dos mecanismos imunológicos associados ao estabelecimento da reação reversa em pacientes com a forma lepromatosa da hanseníase

RESUMO

A reação reversa (RR) é um quadro súbito com lesões cutâneas e neurais agudas que interrompem o curso crônico da hanseníase. A RR pode ocorrer em qualquer momento da evolução clínica da doença, inclusive após cura bacteriológica, afetando tanto pacientes multibacilares como paucibacilares. É largamente aceito que mecanismos imunológicos estão envolvidos neste processo, entretanto, o papel da resposta imune adaptativa específica ao *M. leprae* na patogênese da RR ainda não está esclarecido, já que ocorre em pacientes hiporrespondedores. No presente estudo caracterizamos as subpopulações de linfócitos T sanguíneos *ex vivo* envolvidas na RR assim como suas atividades funcionais *in vitro*. Para tanto, analisamos pacientes multibacilares com a forma clínica Borderline Lepromatosa (BL) que desenvolveram pela primeira vez a RR. Pacientes BL não reacionais e controles sadios de área endêmica para a hanseníase também foram incluídos no estudo. As análises fenotípica e funcionais *ex vivo* e *in vitro* foram realizadas por meio de citometria de fluxo multiparamétrica. Para os ensaios *in vitro*, as células mononucleares de sangue periférico (PBMC) dos pacientes foram cultivadas e estimuladas com *M. leprae* (ML, 20µg/mL) e enterotoxina B de *Staphylococcus aureus* (SEB, 1µg/mL) por 6 horas. Para detectar a resposta proliferativa, as células foram incubadas com carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster (CFSE) e estimuladas com ML e SEB por 5 dias. A análise dos genes que codificam os fatores de transcrição críticos para a diferenciação de linfócitos T foi realizada por reação da polimerase em cadeia quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Os resultados obtidos em nosso estudo sugerem que na abertura da RR, *stat4* e *t-bet* são preferencialmente expressos *in vivo*. Observamos ainda diminuição *ex vivo* na frequência de linfócitos T_{NAÏVE} no grupo RR e a prevalência nesses pacientes de células T_{EF} e de memória previamente ativadas. As mesmas observações e conclusões podem ser aplicadas no que concerne à resposta proliferativa, vez que linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ do grupo RR proliferam *in vitro* espontaneamente e em resposta ao *M. leprae*. As células produtoras de IFN-γ foram observadas em todas as subpopulações de linfócitos T do grupo RR, incluindo T_{NAÏVE}. No grupo RR também observamos frequências aumentadas de células T_{EF}, T_{CM} e T_{EM} CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de TNF. Além disso, nas mesmas condições, observamos frequência significativa de células T_{EF} produtoras de IL-10. Em conjunto, os dados aqui apresentados e discutidos sugerem ativação Th1 *in vivo* como fator preponderante na patogênese da RR em pacientes BL.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Analysis of the mechanisms associated with the establishment of the Reversal Reaction in lepromatous leprosy patients

ABSTRACT

Reversal reaction (RR) is a sudden acute cutaneous and neural manifestation with lesions, that interrupt the chronic course of leprosy. RR can occur at any time during the clinical course of the disease, even after bacteriological cure, affecting both multibacillary and paucibacillary patients. It is widely accepted that immune mechanisms are involved in this process; however, the role of specific adaptive immune response to *M. leprae* in the RR pathogenesis is not clear, since it occurs in hyporesponsive patients. In the present study, we characterize *ex vivo* blood T lymphocytes subsets involved in RR, as well as their *in vitro* functional activities. For such purpose, we analyzed BL patients which developed RR. Non reactional BL patients and healthy individuals from endemic leprosy area were also included in the study. Phenotypic and functional *ex vivo* and *in vitro* analyzes were performed by multiparametric flow cytometry. For *in vitro* assays, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were cultured and stimulated with *M. leprae* (ML, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and *Staphylococcus aureus* enterotoxin B (SEB, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 6 hours. To detect the proliferative response, PBMC incubated with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) were stimulated with ML or SEB for 5 days. The analysis of the transcription factors involved in T cell differentiation was performed by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The results obtained from our study suggest that, at RR onset, *stat4* and *t-bet* are preferentially expressed *in vivo*. Among RR patients, we still observed an *ex vivo* decrease in the frequency of T_{NAIVE} lymphocytes, as well as the prevalence of T_{EF} and previously activated memory cells. The same remarks and conclusions may be applied to the proliferative response, as T CD4+ and CD8+ lymphocytes proliferate *in vitro*, both spontaneously and in response to *M. leprae*. IFN- γ producing cells were observed in all T lymphocytes subsets in RR, including T_{NAIVE} . Among RR patients, we also noted an increased frequency of TNF producing T_{EF} , T_{CM} and T_{EM} CD4+ and CD8+ cells. Moreover, under the same conditions, we observed a significant frequency of IL-10 producing T_{EF} cells. Taken together, the data submitted and discussed herein suggest *in vivo* Th1 activation as a predominant factor in the pathogenesis of RR among BL patients.

Índice

Agradecimentos	iv
Resumo	vi
Abstract	vii
Lista de abreviaturas	xi
Lista de tabela figuras	xiii
Índice	Vii
I – Introdução	1
I.1- Hanseníase: definição geral, transmissão e prevenção	1
I.2- Epidemiologia da hanseníase	3
I.3- <i>Mycobacterium leprae</i>	4
I.4- Susceptibilidade à hanseníase	7
I.5- Formas clínicas, histopatológicas e tratamento	8
I.6- Episódios reacionais	12
I.7- Mecanismos gerais da resposta imune. Ênfase na hanseníase	13
I.7.1- Resposta imune inata	13
I.7.2- Resposta imune adaptativa	18
II – Justificativa	26

III – Objetivos	28
III.1 Objetivo Geral	28
III.2 Objetivos específicos	28
IV – Metodologia	29
IV.1 – População de estudo, biossegurança e considerações éticas	29
IV.2- Separação de células mononucleares do sangue periférico	30
IV.3- Cultivo de células mononucleares e ensaios de estimulação <i>in vitro</i>	30
IV.4- Análise de marcadores de superfície de membrana celular e citocinas intracelulares por citometria de fluxo	31
IV.5- Metodologia de análise de subpopulações linfocitárias por citometria de fluxo	32
IV.6- Avaliação da resposta proliferativa frente a antígenos	34
IV.7- Quantificação da expressão gênica de fatores transcricionais por PCR em tempo real	35
IV.8- Análise estatística	37
V – Resultados	38
V.1- Características clínicas e demográficas dos pacientes e doadores sadios	38
V.2- Expressão de genes envolvidos com a diferenciação de linfócitos T em pacientes BL com e sem RR	38
V.3- Determinação de subpopulações de linfócitos T de pacientes BL com e sem RR	39
V.3.1 Análise fenotípica <i>ex vivo</i> das subpopulações de linfócitos T de pacientes BL com e sem RR	40
V.3.2 Análise fenotípica <i>in vitro</i> das subpopulações de linfócitos T de pacientes BL com e sem RR em resposta ao <i>M. leprae</i>	43

V.4- Proliferação de linfócitos T em resposta ao <i>M. leprae</i>	45
V.5- Frequência de subpopulações de linfócitos T produtores de IFN-γ, TNF e IL-10 em resposta ao <i>M. leprae</i>	47
VI – Discussão	50
VII – Conclusões	61
VIII – Referências Bibliográficas	62

Lista de Abreviaturas

BAAR – Bacilo Álcool-Ácido Resistente

BB – forma clínica Borderline Borderline

BCG- Bacilo Calmette-Guérin

BL – forma clínica Borderline Lepromatosa

BT – forma clínica Borderline Tuberculóide

cDNA – Ácido Desoxiribonucléico complementar

EDTA – do inglês, Ácido Etilenodiaminotetracético

ENL – Eritema Nodoso Leproso

FITC – do inglês, Isotiocianato de Fluoresceína

GM-CSF - do inglês, Fator Estimulador de Colônia de Macrófagos e Granulócitos

HLA-DR – do inglês, Antígeno Leucocitário Humano de classe II, alelo DR

IB – Índice Bacteriológico

LL – forma clínica Lepromatosa Lepromatosa

LPS – Lipopolissacarídeo

M-CSF- do inglês, Fator Estimulador de Colônia de Macrófago

MCP-1- do inglês, Proteína Quimiotática de Monócito 1

MDT – do inglês, Multidrogaterapia

ML- *Mycobacterium leprae*

mRNA – Ácido Ribonucléico mensageiro

NF- κ B – do inglês, Fator Nuclear kappa B

NK- do inglês, Natural Killer

NO – do inglês, Óxido Nítrico

OMS – Organização Mundial da Saúde

PB – forma clínica Paucibacilar

PBMC – do inglês, células mononucleares de sangue periférico

PBS – do inglês, Tampão Salina Fosfato

PCR – do inglês, Reação de Polimerase em Cadeia

PGL1 – do inglês, Glicolípido fenólico-1

PQT – poliquimioterapia

RF – livre de RNase do inglês “RNAase free”

RR – Reação Reversa

SFB – Soro Fetal Bovino

TLR – do inglês, receptores do tipo Toll like

TT – forma clínica Tuberculóide Tuberculóide

xg – velocidade de sedimentação em unidade gravitacional

Lista de Figuras e Tabelas

Tabela 1- Características clínicas e demográficas dos indivíduos estudados	39
Figura 1- Taxa de prevalência da hanseníase no mundo	4
Figura 2- Fragmento de derme de paciente mostrando infiltrado de células mononucleares repleto de bacilos e globias no interior de macrófagos	5
Figura 3- Hanseníase: transmissão, espectro de formas clínicas e resposta imune ao <i>M. leprae</i> adaptado de acordo com a classificação de Ridley e Jopling	11
Figura 4- Características macro e microscópicas das lesões cutâneas de pacientes das formas polares da hanseníase	12
Figura 5- Metodologia de análise	34
Figura 6- Avaliação da expressão de genes de fatores de transcrição que induzem a diferenciação das subpopulações de linfócitos T nos grupos de pacientes borderline lepromatoso com e sem reação reversa	41
Figure 7- Expressão fenotípica das diferentes subpopulações de linfócitos T	42
Figura 8. Identificação das diferentes subpopulações de linfócitos T em resposta ao <i>M.leprae</i>	45
Figura 9. Ensaio de proliferação celular por citometria de fluxo	47
Figura 10. Análise funcional das diferentes subpopulações de linfócitos T frente ao <i>M.leprae</i>	49
Figura 11- Correlação entre a expressão de genes que induzem diferenciação de linfócitos T e frequência de linfócitos T produtores de IFN-γ e IL-10	50

I- INTRODUÇÃO

I.1- Hanseníase: definição geral, transmissão e prevenção

A hanseníase é uma doença infecciosa sistêmica de curso crônico, que afeta principalmente os nervos periféricos, a pele e a mucosa das vias aéreas superiores. Seu agente etiológico, o *Mycobacterium leprae*, infecta preferencialmente macrófagos, células de Schwann e o endotélio vascular. A doença leva a danos neurológicos que resultam em acometimento sistêmico e lesões de pele com falta de sensibilidade. Também é considerada uma doença incapacitante, uma vez que o dano neural causado pode ser irreversível em muitos casos (Gallo et al., 2005).

Admite-se que a via de entrada do *M. leprae* é o trato respiratório superior, por meio de aerossóis expelidos por indivíduos infectados, onde atinge a mucosa e dissemina-se pelo organismo. A hipótese da via de transmissão aérea é reiterada pela grande quantidade de bacilos íntegros isolados de secreções nasais de pacientes, ainda que achados dos Estados Unidos sugiram tratar-se de uma zoonose no Estado da Louisiana pela identificação de cepas idênticas do patógeno em pacientes e tatus infectados naturalmente (Truman et al., 2011).

Historicamente, a doença foi denominada lepra, termo derivado do latim “lepros” que significa escamoso. Acredita-se que a hanseníase tenha sua origem na Ásia ou África. Nas Américas a doença chegou com os colonizadores, tendo o tráfico de escravos como o maior fator de expansão (Talhari e Neves, 1997; Monot et al., 2005). Os primeiros documentos que relatam a existência de hanseníase no Brasil são do século XVII citando os portadores da doença, já então em número apreciável, como “miseros leprosos” e, confinando-os em colônias agrícolas. Como na época não existia tratamento para a doença, os pacientes apresentavam lesões ulcerantes na pele, deformidades nos membros e perda das extremidades, o que efetivou o

estigma e o preconceito que podem ser observados, até mesmo, nos dias atuais (Talhari e Neves, 1997).

O início do tratamento com a dapsona na década de 1940 teve um papel significativo na contenção do avanço da doença. Entretanto, além de vários efeitos colaterais (anemia, hepatite, fotodermatite, dentre outros), pelo menos de 5 a 30% das cepas do *M. leprae* apresentam resistência à dapsona (Ji,1985).

A hanseníase pode afetar indivíduos em todas as faixas etárias, de ambos os sexos e diversos fatores podem contribuir para a transmissão da doença. Um estudo desenvolvido entre populações expostas ao *M. leprae* demonstrou que o risco de desenvolver a hanseníase também está associado com condições precárias de habitação, baixo nível sócio-econômico e pouca escolaridade (Pönnighaus et al., 1994; Sales et al., 2011).

Já está amplamente demonstrado que fatores genéticos influenciam no processo de adoecimento e no curso clínico da hanseníase. Com sua origem poligênica, apenas 1 a 3% das pessoas expostas ao bacilo desenvolvem a doença (Alter et al., 2008). Dessa forma, a maioria da população apresenta imunidade à hanseníase e assim, o tipo de resposta imune de um indivíduo susceptível infectado pelo *M. leprae* vai ser determinante na evolução e na forma clínica da doença (Rodrigues e Lockwood, 2011).

Apesar do *M. leprae* ter sido o primeiro microorganismo patogênico descrito na literatura em 1873 pelo cientista norueguês Gerhard Armauer Hansen, até hoje não existe uma vacina disponível para a hanseníase. Existem evidências de que a proteção contra a infecção pelo *M. leprae* pode ser induzida em indivíduos vacinados com BCG (Bacilo de Calmette-Guérin). Entretanto, os resultados obtidos são controversos, variando de 20 a 90% a eficácia da vacinação nas diferentes áreas endêmicas testadas, sendo esta variação atribuída a reações cruzadas com

micobactérias do meio ambiente. No Brasil, o BCG confere cerca de 70% de proteção contra a forma multibacilar da doença na vacinação neonatal. Em contatos de pacientes com hanseníase, a vacinação neonatal confere 50% de proteção, porém, na revacinação, essa taxa aumenta para 75% (Cunha et al., 2004, Setia et al., 2006, Duppre et al., 2008).

I.2- Epidemiologia da Hanseníase

Com a introdução da poliquimioterapia (PQT) preconizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e implementada nos anos 1980, a diminuição na prevalência da hanseníase foi significativa. De mais de 10 milhões de casos espalhados pelo mundo quando da implantação do tratamento poliquimioterápico, dados oficiais recentes indicam cerca de 250 mil casos nos dias atuais, estão restritos a 32 países, a maioria da África, Ásia e América do Sul. Nesses países, a infecção permanece como um problema de saúde pública, pois, aproximadamente 8% dos novos casos registrados são de crianças, normalmente contatos intradomiciliares de pacientes (WHO, 2013). Além disso, estima-se que ainda existam 2 milhões de indivíduos com incapacidades permanentes advindas da doença em todo o mundo (Rodrigues e Lockwood, 2011).

O Brasil apresenta cerca de 34 mil novos casos/ano e o estado do Mato Grosso lidera a detecção com 100 casos/100.000 habitantes. O estado do Rio de Janeiro apresenta 14 casos/100.000 habitantes, com maioria dos casos localizados nos municípios da Baixada Fluminense. Em nosso país, um dado preocupante é o aumento da incidência da doença em menores de 15 anos, refletindo a precocidade de exposição ao *M. leprae* e evidenciando a força de transmissão da doença (MS, 2013).

Na figura 1 é mostrado o mapa mundi com a taxa de prevalência da hanseníase (WHO, 2013).

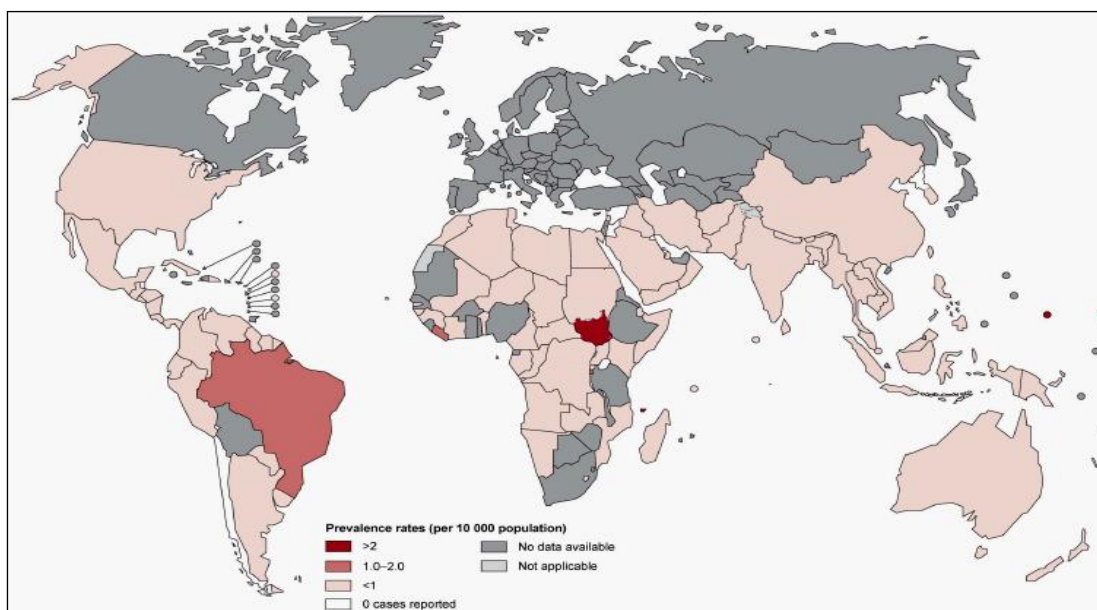


Figura 1- Taxa de prevalência da hanseníase por 10 mil habitantes (WHO 2013).
Modificado a partir de [http://www.int/lep/situation/Leprosy PR 2013.pdf](http://www.int/lep/situation/Leprosy_PR_2013.pdf).

I.3- *Mycobacterium leprae*

Também conhecido como bacilo de Hansen, *M. leprae* é um patógeno intracelular obrigatório, multiplica-se lentamente *in vivo*, por divisão binária, com um período de geração estimado de 14 dias em média, não sendo possível cultivá-lo *in vitro* até os dias atuais. O gênero *Mycobacterium* pertence à ordem Actinomycetales, família Mycobacteriaceae e se caracteriza por não apresentar micélios ou apresentá-los de forma rudimentar. O bacilo apresenta forma de bastonete reto ou levemente curvado de 1-8 micrômetros de comprimento por 0,3 micrômetros de diâmetro, com extremidades arredondadas. Não forma endósporos ou cápsulas e é considerado Gram-positivo, embora não seja bem corado pelo método de Gram. Por ser álcool-ácido resistente (BAAR) cora-se em vermelho pela fucsina e não se descora pela lavagem com ácidos e álcoois quando corado pelo

método de Ziehl-Neelsen (Scollard et al., 2006). Na figura 2 é mostrado um infiltrado inflamatório de lesão de pele de um paciente multibacilar com *M. leprae* em abundância no citoplasma de macrófagos.

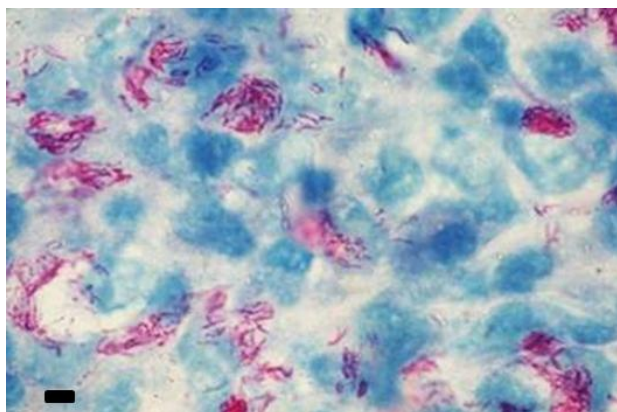


Figura 2. Fragmento de derme de paciente mostrando infiltrado de células mononucleares repleto de bacilos e globias no interior de macrófagos. Coloração de Wade (1000X).

Devido à ausência de modelos experimentais que mimetizem a doença e por não ser possível o cultivo de *M. leprae* em meios artificiais, a infecção em animais tem sido utilizada a fim de se obter o bacilo viável para estudo. Em 1960, Shepard demonstrou que o coxim plantar de camundongos infectados com 10^3 a 10^4 BAAR podia sustentar uma multiplicação limitada com cerca de um milhão de bacilos (Shepard, 1960). Com a descoberta do tatu de nove bandas, *Dasypus novencintus*, como hospedeiro suscetível à infecção pelo *M. leprae*, estudos bioquímicos e imunológicos sobre este patógeno passaram a ser realizados a partir dessa fonte de bacilo, que pode ser facilmente recuperado de linfonodos, baço e especialmente do fígado do tatu (Scollard et al., 2006).

M. leprae tem um genoma de aproximadamente 3.2 Mb, que é significativamente menor do que as demais micobactérias, e a ausência de genes fundamentais pode implicar na carência de vias enzimáticas críticas, sendo, desta forma, necessário o estado de parasitismo (Cole et al., 2001).

O envelope do *M. leprae* é constituído por três compartimentos: membrana plasmática e parede celular e cápsula. A membrana plasmática é uma bicamada assimétrica composta principalmente de fosfolípidos e proteínas. O lipoarabinomannan (LAM), componente do *M. leprae*, encontra-se ancorado à membrana plasmática via fosfatidilinositol. A parede celular determina a forma e o tamanho da micobactéria e é composta por peptidoglicana, que confere rigidez ao envelope do microrganismo (Rees, 1985).

A descoberta em 1980 do PGL-I, uma molécula exclusiva da cápsula do *M. leprae* proporcionou vários avanços nas pesquisas acerca da relação patógeno-hospedeiro. Trata-se de um glicolípido fenólico altamente antigênico, que confere resistência à capsula do bacilo e está relacionado com a sobrevivência intracelular da micobactéria. O PGL-I pode ser encontrado em tecidos, no sangue circulante e na urina de pacientes com hanseníase. O bacilo tem predileção por temperaturas mais baixas e, conseqüentemente pelos nervos periféricos. Para invadir as células de Schwann o *M. leprae* se liga à laminina- α -2 de matriz extracelular (MEC) pelo PGL-I e a usa como uma ponte para alcançar o receptor α -dístroglicano dessas células (Spencer e Brennan, 2011; Rambukana, 2000).

Mais recentemente, foi demonstrado que tanto em macrófagos como em células de Schwann o *M. leprae* é capaz de induzir a biogênese de corpúsculos lipídicos, e que tais corpúsculos são recrutados para o fagossoma contendo a micobactéria. Além disso, foi observado que a inibição deste recrutamento reduzia significativamente a viabilidade do patógeno dentro das células. Também foi mostrado que, ao interagir com o colesterol da membrana plasmática, a ligação do *M. leprae* com cultura de macrófagos é mais estável, tornando sua posterior internalização mais eficiente (Gatfield e Pieters, 2000; de Mattos et al., 2012).

Também, bastante atual foi a demonstração da interação e sobrevivência *in vitro* do *M. leprae* em células epiteliais nasais humanas. Os autores demonstraram ainda que, após infecção intranasal em modelo animal, o *M. leprae* se instalou no interior de macrófagos e de células epiteliais no tecido pulmonar e que adesinas envolvidas na interação patógeno-hospedeiro são potencialmente relevantes no processo (Silva et al., 2013).

I.4- Susceptibilidade à hanseníase

A susceptibilidade à hanseníase é ainda incompletamente compreendida e polimorfismos em vários genes, e consequentes diferenças nas proteínas codificadas participam na susceptibilidade à doença. A parkina, proteína assim denominada por estar implicada na doença de Parkinson, é uma E3-ubiquitina ligase responsável por reconhecer proteínas mal formadas ou desnaturadas e levá-las para a degradação no proteossoma. Esta proteína foi implicada na susceptibilidade à hanseníase, o que demonstra a importância da degradação (de inibidores de enzimas participantes de vias de sinalização, de proteínas envolvidas na transcrição gênica ou na tradução do RNA, ou para a degradação de proteínas microbianas) para a adequada resposta efetora (Mira et al., 2004). Polimorfismos em moléculas críticas para reconhecimento de microrganismos, sinalizadoras de sinais de perigo para as células, como os receptores do tipo Toll (TLR) e NOD2 (Nucleotide Oligomerization Domain containing 2) foram relacionadas à susceptibilidade à doença ou ao desenvolvimento de episódios reacionais (Shenk et al., 2012). Proteínas relacionadas com a apresentação de antígenos, tais como as proteínas do complexo HLA (“Human Leukocyte Antigens”) e TAP (“transporter associated with antigen processing”) foram igualmente relatadas como predispondo à doença,

porém, este achado pode ter sido influenciado pela interligação de dados das amostras (Mira, 2006). A variabilidade nas moléculas efetoras para a morte da bactéria, tais como polimorfismos no gene para o receptor da vitamina D (VDR) (Roy et al., 1999; Fitness et al., 2004) ou para NRAMP1 (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 1; Abel et al., 1998; Ferreira et al., 2004), proteína lisossomal dos macrófagos que funciona como uma bomba para a remoção do interior do lisossoma de cátions divalentes como ferro e o manganês, essenciais para a sobrevivência dos microorganismos, foram somadas à lista de moléculas importantes para a defesa. As variações genéticas na capacidade de gerar citocinas estão representadas nos polimorfismos para TNF, IL-10 e IFN- γ implicados na diversidade da resposta (Scollard et al., 2006; Mira, 2006). A mais recente descrição da variabilidade genética conferindo susceptibilidade à hanseníase foi descrita nas ficolinas, proteínas capazes de ativar as proteínas do complemento pela via das lecitinas, da mesma forma que a lecitina ligadora de manose. O *M. leprae* aproveita a opsonização pelo complemento para facilitar sua entrada nos macrófagos. Polimorfismos nas regiões promotoras dos genes que codificam alteração nos níveis das distintas ficolinas auxiliam a susceptibilidade ou a resistência à doença (Boldt et al., 2003).

I.5- Formas Clínicas, Histopatológicas e Tratamento

A hanseníase manifesta-se através de um amplo espectro de formas clínicas, determinado pela intensidade da resposta imune celular do paciente ao *M. leprae*. A manifestação inicial da doença pode ser a forma clínica indeterminada (I), onde a resposta do hospedeiro é insuficientemente diferenciada para permitir classificação. Pode evoluir para cura espontânea ou desenvolver aspectos clínicos da doença

estabelecida dentro do espectro, dependendo da sua capacidade em montar uma resposta imune celular aos antígenos de patógeno (Gallo et al., 2005).

A doença apresenta duas formas polares e três intermediárias. De um modo geral, o pólo lepromatoso (LL) é representado por lesões disseminadas e o pólo tuberculóide (TT) por lesões limitadas. As formas clínicas intermediárias são chamadas de “borderline” e classificadas como borderline lepromatoso (BL), borderline borderline (BB) e borderline tuberculóide (BT), de acordo com a maior proximidade a um dos pólos (Ridley e Jopling, 1966; Gallo et al., 2005).

Os pacientes tuberculóides, na maioria das vezes, apresentam apenas uma ou poucas lesões hipopigmentadas de pele. A doença é granulomatosa, baixos níveis de anticorpos específicos contra o *M. leprae* são observados e a resposta imune celular restringe o crescimento do patógeno. O teste intradérmico de lepromina (reação de Mitsuda) que é utilizado como prognóstico da capacidade de resposta imune celular ao patógeno é positivo (>5mm) nos pacientes tuberculóides. No outro pólo, estão os pacientes lepromatosos, que possuem lesões nodulares disseminadas, com alta carga bacilar no interior dos nódulos. Estes pacientes possuem níveis elevados de anticorpos anti-*M. leprae* e resposta imune celular baixa ou inexistente aos antígenos micobacterianos, apresentando Mitsuda negativo. Nas formas borderline, a resposta imune celular é mais intensa de acordo com a proximidade ao pólo tuberculóide (Ridley e Jopling, 1966; Gallo et al., 2005).

Durante a investigação da hanseníase uma avaliação importante é o Grau de Incapacidade Funcional (GI) onde são avaliados sinais ou sintomas em olhos, mãos e pés, normalmente acometidos pela doença. A escala do GI vai de 0 a III, sendo 0, nenhum problema relacionado à hanseníase; I, áreas anestésicas; II lesões moderadas e III, lesões tardias. Dessa forma, a avaliação define desde diminuição

ou perda de sensibilidade na pele, lesões oculares até traumas nos membros. Como o curso da infecção é lento, os sinais e sintomas aparecem quando alguma incapacidade já tenha se instalado, sendo a doença diagnosticada tardiamente. Dessa forma, a maioria dos casos já apresenta algum GI no diagnóstico e início de tratamento (MS, 2013).

Na figura 3 estão esquematizados o espectro de formas clínicas, o modo de transmissão e a resposta imune da hanseníase, de acordo com a classificação de Ridley e Jopling (Ridley e Jopling, 1966).

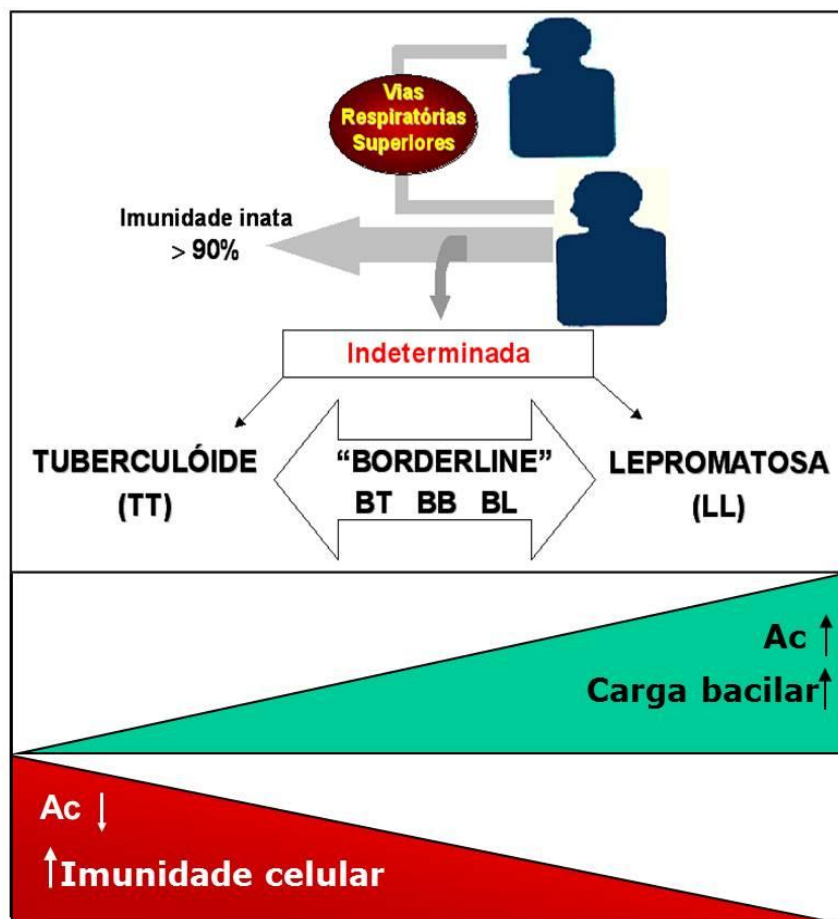


Figura 3. Hanseníase: transmissão, espectro de formas clínicas e resposta imune ao *M. leprae* adaptado de acordo com a classificação de Ridley e Jopling. (TT - Tuberculóide Tuberculóide, BT - Borderline Tuberculóide, BB - Borderline Borderline, BL- Borderline Lepromatosa, LL- Lepromatosa Lepromatosa, Ac- anticorpo).

Para fins terapêuticos, o Ministério da Saúde do Brasil dividiu os pacientes em dois grupos: multibacilares e paucibacilares. Pacientes BB, BL e LL com índice bacilar maior ou igual a 2 foram classificados como multibacilares (MB) e pacientes TT e BT com índice bacilar menor do que 2 foram classificados como paucibacilares (PB; MS, 2013). Posteriormente, para locais onde o exame baciloscópico não é realizado, recomendou-se que a classificação se baseasse no número de lesões, sendo: menos ou igual a 5 lesões para os PB e mais de 6 lesões para os MB (MS, 2013).

O tratamento é feito através da administração da poliquimioterapia (PQT), com dapsona, rifampicina e clofazimina. Para os pacientes MB o tratamento é de cerca de um ano e são utilizados rifampicina (600 mg, uma dose mensal), clofazimina (300 mg, uma dose mensal e 50 mg/dia) e dapsona (100 mg/dia), no total de 12 doses. Para pacientes PB o tratamento é de cerca de 6 meses de duração com rifampicina (600 mg, uma dose mensal) e dapsona (100 mg/dia), empregados em 6 doses (Gallo et al., 2005).

O diagnóstico da hanseníase é eminentemente clínico, mas a avaliação histológica de fragmento de lesão cutânea auxilia na classificação correta do paciente e escolha do tratamento. De forma sucinta, lesões de pele de pacientes tuberculóides ou PB são caracterizadas por infiltrados inflamatórios com células epitelióides, granulomas bem formados e, normalmente, não são observados BAAR. Nos lepromatosos observa-se um infiltrado difuso, com predominância de linfócitos T e B, macrófagos e ausência de granuloma. Os macrófagos geralmente são carregados de bacilos que podem formar um denso ajuntamento no citoplasma, denominado de globias (Rees, 1985; figura 2). Na figura 4 estão ilustradas lesões cutâneas e histopatológicas típicas de pacientes com as formas polares da hanseníase.

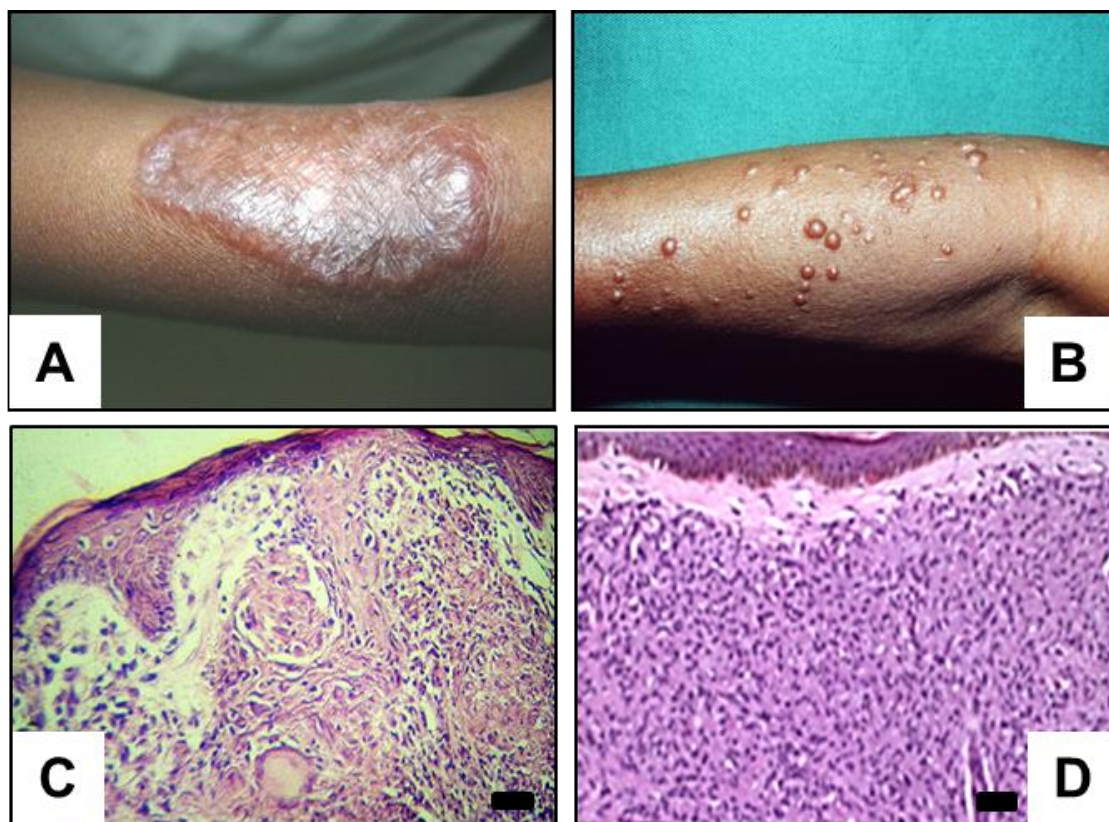


Figura 4. Características macro e microscópicas das lesões das formas polares da hanseníase. (A) Lesão em placa em antebraço de paciente tuberculóide e (B) nódulos disseminados em paciente lepromatoso. (C) Característica histológica típica de fragmento de lesão cutânea de paciente com a forma tuberculóide mostrando granuloma e célula epitelióide e (D) de lesão lepromatosa com infiltrado mononuclear difuso e inespecífico (coloração de Hematoxilina e Eosina, HE 200X).

I.6- Episódios Reacionais

Durante o curso da doença, cerca de 50% dos pacientes apresentam episódios de resposta inflamatória aguda, denominados de reações. Esses episódios estão correlacionados com reativação da resposta imune celular, ligada à produção de mediadores pró- e anti-inflamatórios e associados ao dano tecidual, muitas vezes, severos. As reações podem ocorrer durante a evolução crônica da doença, sobretudo após o início da PQT, pois o tratamento provoca morte bacilar e liberação maciça de antígenos micobacterianos (Scollard et al., 2006). As reações levam à piora do quadro clínico dos pacientes, aumentando o dano neural e contribuindo para o surgimento de incapacidades físicas, muitas vezes permanentes.

Os estados reacionais são classificados como reação tipo 1 ou Reação Reversa (RR) e Reação tipo 2 ou Eritema Nodoso Leproso (ENL), conforme as características clínicas e imunológicas dos pacientes (Gallo et al., 2005).

A RR se desenvolve gradualmente e seu curso natural pode durar várias semanas. Ocorre principalmente em pacientes com as formas intermediárias da hanseníase (BL, BB e BT) e raramente em pacientes LL. Clinicamente, a RR se manifesta por um aumento do processo inflamatório nas lesões de pele pré-existentes, bem como pelo aparecimento de novas lesões e, geralmente, a sintomatologia é local (Nery et al., 2013). Dentre os fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento da RR estão: idade (indivíduos com idade >15 anos no sul do Vietnã e ≥40 anos no Brasil estão em maior risco), índice baciloscópio superior a 4+, aumento do número de lesões no diagnóstico da hanseníase e detecção de DNA de *M. leprae* em lesões (Orlova et al., 2013). Para o tratamento específico da RR são utilizados principalmente glicocorticóides, como a prednisona (Gallo et al., 2005; Nery et al., 2013).

O ENL apresenta curso natural de uma a duas semanas, porém, muitos pacientes apresentam recorrências múltiplas ao longo de vários meses. Este tipo de reação ocorre em pacientes MB (LL e BL) que podem apresentar nódulos eritematosos na face, extremidades, ou tronco, sem predileção por lesões existentes. Sistemáticamente, os pacientes apresentam febre, mal-estar, anorexia e algum grau de neurite sensorial e motora. Em casos graves as lesões podem se tornar ulceradas. Para o tratamento do ENL a droga de escolha é a talidomida, podendo-se administrar em mulheres em idade fértil a pentoxifilina, associada ou não à prednisona (Nery et al., 1998).

I.7- Mecanismos gerais da resposta imune. Ênfase na hanseníase

I.7.1- Resposta Imune Inata

Com relação aos mecanismos de resposta inata, destacam-se as células dendríticas (DC), conhecidas como células apresentadoras de antígenos (APC) profissionais. A capacidade das DC ativarem os linfócitos T depende do seu grau de maturação. DC imaturas são células com alta capacidade fagocítica que após o estímulo com componentes microbianos, passam a expressar na sua superfície os receptores do tipo Toll (TLR), ativando NF- κ B e MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno), induzindo a maturação e ativação dessas células. As DC maduras são APC eficientes que apresentam na sua superfície celular o aumento das moléculas de MHC (complexo de histocompatibilidade principal). Além disso, ocorre o aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras CD80/B7.1, CD86/B7.2, CD83 e CD40. As DC migram do tecido infectado para a circulação linfática através da expressão de CCR7, que é o um receptor de quimiocina expresso pelas DC maduras (Steinman, 2003).

Estudos sobre a hanseníase apontam que o *M. leprae* ativa as DC através de TLR1 e TLR2 (Krutzik et al., 2003), sendo que o polimorfismo em TLR2 está relacionado à susceptibilidade à doença (Kang et al., 2001). A captura do *M. leprae* pelas DC e subsequente produção local de citocinas e quimiocinas pode regular a resposta inflamatória e manipular o curso da imunidade mediada por células ao patógeno (Santos et al., 2001). Mais recentemente, dois elegantes estudos com biopsias de lesão de pele de pacientes com hanseníase mostraram frequência aumentada de DC maduras expressando NOD2 e IL-32 nas lesões tuberculóides, ao contrário das lepromatosas, nas quais estavam diminuídos ou mesmo ausentes. Nessas lesões os autores encontraram níveis elevados de galectina-3, uma lecitina

solúvel associada com ciclo celular e pior prognóstico em lesões neoplásicas (Schenk et al., 2012; Chung et al., 2013). Somado a estudo anterior que identificou uma redução significativa nos níveis de mRNA de genes associados com ativação e maturação de DC infectadas por *M. leprae* (Murray et al., 2007), essas investigações apontam a grande capacidade do patógeno em modular a ativação e a maturação das DC de pacientes com as formas lepromatosas da hanseníase.

Os macrófagos são fagócitos altamente heterogêneos e podem ser classificados segundo sua polarização em M ϕ -1 e M ϕ -2. Essa polarização ocorre em resposta a citocinas e/ou produtos microbianos. O perfil M ϕ -1 é induzido por IFN- γ , TNF e GM-CSF ou ainda por estímulos microbianos, como o lipopolissacarídeo (LPS). Por outro lado, tem sido demonstrado que IL-4 e IL-13, além de inibirem a ativação de M ϕ -1, são capazes de induzir a polarização para M ϕ -2 (Mantovani et al., 2007). Somente macrófagos polarizados para o perfil M ϕ -1 são capazes de secretar altos níveis de mediadores pró-inflamatórios como IL-12, IL-23, IL-1 β , IL-18, IL-6 e TNF. Além disso, esse mesmo perfil é responsável por participar de respostas do tipo Th1. Por outro lado, M ϕ -2 são associados com a supressão da resposta Th1 através da secreção de IL-10 (Verreck et al., 2006).

Os macrófagos são as células preferencialmente infectadas pelo *M. leprae* sendo a fagocitose do bacilo mediada por receptores do sistema complemento e regulada pela proteína quinase (Schlesinger e Horwitz, 1991; Prabhakaran et al., 2000). O patógeno reside dentro dos macrófagos não só da pele como em vários tecidos e inibe a fusão do fagossoma com o lisossomo, não sendo assim digerido pelas enzimas presentes no lisossomo (Frehel e Rastogi, 1987). Além disso, estudos *in vitro* demonstraram que o patógeno ou os seus componentes induzem apoptose de monócitos em processo desencadeado por TNF (Hernandez et al., 2003) e

fornece sinais reguladores através de múltiplas vias de sinalização envolvendo PI3K, NF-kappa B e caspase-1, mantendo as células em um estado “naïve” (Sinsimer et al., 2010).

Recentemente, dois trabalhos de pesquisadores do nosso grupo demonstraram que a expressão da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) com ação imunomoduladora encontrava-se aumentada em lesões de pele de pacientes lepromatosos e que macrófagos dessas lesões expressam CD163, um receptor *scavenger*. Além disso, níveis aumentados do receptor solúvel também foram encontrados no soro desses pacientes, ao contrário de pacientes com a forma tuberculóide. Os autores sugeriram que IDO é regulada pelo patógeno e contribua para a hiporresponsividade observada no polo lepromatoso da hanseníase. Em conjunto, o aumento de IDO e de células CD163⁺ nas mesmas lesões, talvez possa garantir a sobrevivência do *M. leprae* nas células hospedeiras (de Souza Sales et al., 2011; Moura et al., 2012).

Com relação à participação de mediadores envolvidos na regulação da resposta inata, a IL-12 é produzida normalmente por macrófagos e DCs de pacientes tuberculóides e está ausente em lepromatosos, dados esses observados tanto em sangue como nas lesões (Sieling e Modlin, 1994; Sarno e Sampaio, 1996). Outra citocina importante neste tipo de resposta é a IL-10, produzida por macrófagos, mas também por linfócitos T CD4⁺. Sua expressão está aumentada no polo lepromatoso da doença, apontando para uma ação anti-inflamatória, inibindo a produção de óxido nítrico e sendo ineficaz na contenção do *M. leprae* (Sarno e Sampaio, 1996). Muito recentemente, foi demonstrada a capacidade da IL-1 β de induzir a diferenciação de macrófagos M1 infectados com *M. leprae* aumentando a apresentação de antígenos micobacterianos aos linfócitos T (Schenk et al., 2014).

Em lesões cutâneas de pacientes com hanseníase, foi observado que uma importante via microbicida dos macrófagos, induzida pela síntese de defensina- β 4 e catelicidina, ambas dependentes de vitamina D, está ativada nos pacientes tuberculóides e nos pacientes em RR necessária para a produção de IFN- γ . Esta via encontra-se diminuída em pacientes lepromatosos (Fabri et al., 2011). Além disso, também já foi mostrado que a via microbicida dependente de vitamina D em fagócitos é inibida pelo IFN- β e IL-10, sugerindo que na patogênese da hanseníase exista uma correlação inversa entre a expressão de IFN- γ e IFN- β (Teles et al., 2013).

Mais recentemente, um trabalho do mesmo grupo demonstrou, por técnicas de microarranjo e análise bioinformática, que 13 miRNAs (micro RNAs) são diferencialmente expressos em lesões de pacientes BT e LL, com destaque para o miRNA-21, altamente expresso no citosol de macrófagos das lesões lepromatosas. Os autores mostraram ainda que o miRNA-21 induz a degradação da via antimicrobicida dependente de vitamina D e regula negativamente TLRs (Liu et al., 2012).

Embora produzida na fase inata da resposta imune, a IL-15 é uma citocina que se destaca na modulação da resposta adaptativa com potente atividade sobre a proliferação de linfócitos T. Já foi demonstrado que uma alta expressão de mRNA de IL-15 está presente nas lesões de pacientes BT/TT, mas não nas lesões lepromatosas. Além disso, os autores mostraram que a adição de IL-15 recombinante aumentou a expressão do receptor CD56 em células NK e induziu a ativação de clones de linfócitos T em resposta ao *M. leprae* (Julien et al., 1997). O mesmo grupo também demonstrou que o mRNA de IL-18 está aumentado em lesões tuberculóides e ausente nas lepromatosas e correlacionou esses dois achados com

o *link* da resposta inata com a adaptativa na patogênese das formas da hanseníase (García et al., 1999).

I.7.2- Resposta Imune Adaptativa

Quando a imunidade inata não consegue controlar uma infecção e a multiplicação do parasito, o desenvolvimento de uma resposta imune específica pode passar a desempenhar este papel. No entanto, esses dois tipos de imunidade celular não devem ser vistos separadamente. A resposta imune adaptativa pode ser dividida em diferentes fases; reconhecimento de antígenos, ativação dos linfócitos T específicos, fase efetora e retorno à homeostase com apoptose de clones efetores e manutenção de células de memória (Abbas et al., 2012).

Para que ocorra a diferenciação de linfócitos T a participação de fatores de transcrição é essencial. O perfil de linfócitos Th1 sofre diferenciação após a ligação de IL-12 a receptores de linfócitos T CD4⁺ ativados induzindo o fator de transcrição STAT4 a promover a diferenciação destes linfócitos (Abbas et al., 2012). O fator de transcrição, T-bet também tem importante função no desenvolvimento de linfócitos Th1, sendo induzido por IFN- γ , amplificando essas respostas e inibindo a diferenciação do perfil Th2. Como T-bet é expresso não somente em linfócitos T, mas também em um grande número de células do sistema imune, incluindo as DCs, não é exagero afirmar que sua expressão afeta a regulação de vários estágios da resposta imune (Szabo et al., 2000; Hwang et al., 2005). Dessa forma, a diferenciação do fenótipo Th1 é induzida principalmente por IL-12 e IFN- γ e ocorre em resposta aos patógenos intracelulares, por meio da ativação de DCs, macrófagos e células Natural Killer (NK; Abbas et al., 2012).

A diferenciação de linfócitos T para o perfil Th2 é dependente de IL-4 que ativa o fator de transcrição STAT6 e, normalmente, esse fenótipo é ativado em resposta aos helmintos e alérgenos (Zhu et al., 2001). Juntamente com a sinalização do receptor de antígenos dos linfócitos T (TCR), STAT6 induz a expressão de GATA3, outro fator importante que participa da diferenciação de linfócitos Th2, sendo responsável pela ativação do gene da IL-4. Assim, a produção aumentada de IL-4 promove um mecanismo de amplificação das respostas Th2 e inibição de respostas Th1 e Th17 (Hwang et al., 2005; Abbas et al., 2012).

Estudos mostram que quando GATA3 é expresso, a resposta Th1 é suprimida e isto se deve, em parte, pela inibição da expressão da cadeia do receptor $\beta 2$ da IL-12. Além disso, parece que GATA3 é mais importante para a amplificação das respostas dependente de IL-4 do que a expressão aumentada de T-bet para a produção de IFN- γ pelas células Th1. Em resumo, GATA3 é fundamental para a diferenciação Th1/Th2 (Zhu et al., 2001).

Os linfócitos T reguladores (Treg) tiveram por muito tempo, o seu fenótipo associado ao receptor constitutivo da cadeia α da IL-2, denominado CD25. Entretanto, estudos sobre uma mutação recessiva ligada ao cromossomo X levaram a descoberta de um novo fator de transcrição que seria considerado como único e específico na identificação das células Treg, o *forkhead box P3* (FOXP3; Fontenot et al., 2003). Embora não seja totalmente conhecida a biologia do FOXP3, sugere-se que ele atue como um inibidor transcricional via NFAT (fator nuclear de célula T ativada) e NF- κ B, sendo, por isso, crítico na inibição de respostas Th1. De um modo geral, as Treg regulam a homeostase ao controlar as respostas aos antígenos próprios em tecidos periféricos e modulam a resposta imune durante as infecções. O fator de crescimento de linfócitos T-beta (TGF- β) é a citocina chave na indução da

expressão de *FOXP3* e fundamental para a função reguladora dos linfócitos Treg (Shevac et al., 2008).

Atualmente propõe-se uma relação entre Treg e Th17. Isto porque TGF- β é capaz de converter TCD4⁺FOXP3⁻ em células TCD4⁺FOXP3⁺ (Campbell e Koch, 2011). Contudo, na presença de IL-6, TGF- β induz a secreção de IL-17 e, concomitantemente, inibe a diferenciação de linfócitos T reguladores, gerando as células Th17 (Tran, 2012). Isso ocorre a partir da transcrição do fator RORC, responsável pela indução da transcrição de IL-17. Desta forma a diferenciação para Treg ou para Th17 depende da quantidade de TGF- β , especialmente sua isoforma β 1 e também de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e IL-6, o que influi diretamente na expressão de RORC e/ou FOXP3 (Tran, 2012).

Paralelamente ao processo de ativação de linfócitos T, divisão e diferenciação em células efetoras, uma subpopulação é programada para desempenhar funções de memória, que persistem no organismo, mesmo após a resolução da infecção. Os linfócitos T de memória permanecem presentes na ausência de estimulação antigênica e tem a capacidade de se expandir rapidamente após uma segunda exposição ao antígeno (Abbas et al., 2012). Os linfócitos T de memória são divididos em células de memória central (T_{CM}) ou de memória efetora (T_{EM}). A identificação dessas subpopulações é definida pela combinação de receptores de superfície específicos. As moléculas associadas à migração celular (CCR7 e CD62L) e coestimulação (CD27 e CD28), juntamente com isoformas da molécula CD45 (CD45RA e CD45 RO), definem importantes marcadores funcionais de linfócitos T virgens (T_{NAÏVE}), de memória, ou efetora. As células T_{CM} expressam CCR7 que as direcionam para os órgãos linfoides secundários. Essas células são consideradas linfócitos T de memória de longa duração, não necessitando de novas exposições a

antígenos específicos para garantir sua viabilidade por muito tempo. Os T_{EM} são linfócitos que, sob novo estímulo específico, rapidamente diferenciam-se em células efetoras. Estas células ao serem ativadas sofrem modificações funcionais e estruturais, passando a apresentar novos receptores na superfície como CD25, CD69, integrinas e moléculas efetoras, como por exemplo, perforina e granzima. Além disso, a resposta imediata destas células pode contribuir para o controle de novas infecções através da secreção de citocinas de ação microbicidas como o IFN- γ e TNF ou pela eliminação das células infectadas via ação de perforina. Ao contrário das células T_{CM} , as T_{EM} requerem um contínuo estímulo com antígeno específico para sua manutenção (Mueller et al., 2013).

As subpopulações de memória em seres humanos são bastante heterogêneas e vários estudos propõem o uso de dois principais receptores de superfície, CCR7 e CD45RA para a classificação fenotípica destas células. Desse modo, linfócitos $T_{NAÍVE}$ apresentam fenótipo $CCR7^+/CD45RA^+$, os T_{CM} são $CCR7^+/CD45RA^-$, os T_{EM} são $CCR7^-/CD45RA^-$ e os T efetores (T_{EF}) são $CCR7^-/CD45RA^+$ (Abbas et al., 2012; Mueller et al., 2013).

Com relação as citocinas que desempenham papel crítico na resposta imune contra patógenos intracelulares, como o *M. leprae*, destacam-se o IFN- γ , o TNF e a IL-10. A produção de IFN- γ é controlada por citocinas secretadas pelas APCs, principalmente por IL-12, IL-15 e IL-18. A IL-12 promove a secreção de IFN- γ pelas células NK, sendo ele o principal produto do fenótipo Th1 e tem papel relevante na inibição da diferenciação de linfócitos T $CD4^+$ com perfil Th2. O IFN- γ também regula a expressão de MHC I e II e a apresentação de antígenos, induz a interação de leucócitos com células epiteliais aumentando a expressão de inúmeras moléculas de adesão (Abbas et al., 2012).

O TNF é um mediador de funções efetoras, produzido principalmente por leucócitos, atua na ativação de células endoteliais e na amplificação de quimiocinas, levando à acumulação de células no sítio da inflamação (Abbas et al., 2012). A síntese de TNF é induzida por receptores celulares, com destaque para TLR4 e a atividade biológica da citocina é mediada por sua ligação aos receptores 1 e 2 (TNFR1 e TNFR2). Após essa fase, é iniciada a sinalização através de MAPKs, levando à produção de moléculas apoptóticas e/ou anti-apoptóticas, proliferação e maturação celular, além de NF- κ B (Pedersen et al., 2014). O TNF atua em sinergia com o IFN- γ na indução da formação e maturação do granuloma em micobacterioses. Em pacientes tuberculóides, o TNF produzido por macrófagos das lesões cutâneas, não só tem papel relevante na manutenção do granuloma, como na ativação da resposta antígeno-específica (Kaplan e Cohn, 1986; Lima et al., 2000).

Em humanos, a IL-10 é produzida principalmente por monócitos, linfócitos T (principalmente Treg e Th2) e B, macrófagos e DCs (Nagalakshmi et al., 2004). Ela tem função de limitar a produção de citocinas e quimiocinas induzidas por ligantes de TLRs, principalmente o LPS e afeta diretamente a função dos macrófagos/monócitos através da regulação negativa de MHC e de CD80/CD86 (De Waal Malefyt et al., 1991). Já foi observado predomínio de mRNA de IL-4 e IL-10 nas lesões de pacientes lepromatosos quando comparado com lesões de tuberculóides. O mesmo achado foi demonstrado em estudo *in vitro* com leucócitos sanguíneos de pacientes com as formas polares da hanseníase (Sieling et al., 1993). Assim como o TNF, o fato da IL-10 estar aumentada na circulação de pacientes lepromatosos faz dessas citocinas participantes importantes da regulação imunológica da hanseníase (Lima et al., 2000).

Na forma tuberculóide da hanseníase, os linfócitos T CD8+ são críticos para o *clearance* do *M. leprae*. Além da produção de IFN- γ , classicamente conhecido por sua importância na ativação de macrófagos infectados, a produção de perforina e granzima B por linfócitos T CD8+, juntamente com a produção da granulísina por linfócitos TCD4+, também são peças-chave no processo (Walker e Lockwood, 2006).

Os pacientes lepromatosos apresentam uma baixa capacidade de produzir IFN- γ em resposta ao *M. leprae*, possibilitando a multiplicação e disseminação do patógeno (Nogueira et al., 1983; Kaplan e Cohn, 1986). Kaplan e colaboradores demonstraram que administração de IFN- γ na derme resultou em um aumento do fluxo de células mononucleares e da razão CD4/CD8 nas lesões de pacientes, mas não reverteu a ausência de respostas dos leucócitos circulantes ao *M. leprae*. Em outro trabalho foi mostrado o aumento da ação microbicida de macrófagos de lesão cutânea de lepromatosos após injeções intradérmicas de IFN- γ recombinante. Entretanto, esses estudos não prosseguiram, pois os pacientes desenvolveram quadros de reação inflamatória aguda, como o ENL (Kaplan et al., 1989; Sampaio et al., 1992).

Palermo e colaboradores demonstraram que as T regs possuem um importante papel na interação parasito hospedeiro na hanseníase. Neste trabalho, os autores mostraram que as T regs estão presentes em maior proporção no sangue periférico e em lesões de pele de pacientes lepromatosos. Um aumento da expressão de IL-10 e CTLA-4 foi também observado nesses indivíduos, sugerindo que as T regs contribuem para a multiplicação descontrolada do *M. leprae* nesses pacientes (Palermo et al., 2012). No episódio reacional do tipo 2, a presença do

gene *foxp3* em lesões cutâneas de pacientes apontam para uma atividade reguladora de linfócitos Treg nesses processos (Haslett et al., 2005).

Nas lesões de pacientes lepromatosos também foi demonstrado aumento na expressão de TGF- β quando comparado com lesões granulomatosas de pacientes tuberculóides (Kiszewski et al., 2003). Conhecido por seus diferentes papéis, o TGF- β destaca-se na regulação negativa de monócitos e linfócitos T, inibindo a produção de IFN- γ e favorecendo a secreção de IL-10 (Ludviksson et al., 2000). A IL-4, cuja produção na forma lepromatosa é reconhecidamente alta, pode induzir a produção de TGF- β , mantendo ativadas as células Treg.

As citocinas inflamatórias são responsáveis pelos danos teciduais nos pacientes que apresentam episódios reacionais. Evidências mostram que, no ENL o TNF e a IL- β são as principais moléculas envolvidas nessas injúrias (Sarno et al., 1991). Com relação à IL-6, citocina produzida por fagócitos mononucleares ativados, já foi mostrado que tem importante papel coestimulador, induzindo a síntese de outras proteínas de fase aguda em hepatócitos e estimulando a ativação e proliferação de queratinócitos (Hurst et al., 2001). Em pacientes com hanseníase, tanto com a forma clássica do ENL, quanto com a grave e incomum reação do tipo 2, foram observados níveis séricos aumentados de IL-6 (Moreira et al., 1993; Esquenazi et al., 2008).

Na abertura da RR, as células de lesão cutânea e do sangue periférico de pacientes BT apresentam aumento na expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias, especialmente IFN- γ , IL-2 e IL-12 (Moraes et al., 1999). A elevação nos níveis séricos de IL-1 β e TNF também já foi observada nesse episódio reacional (Manandhar et al., 2002). De fato, em pacientes tuberculóides, a RR é tida como uma resposta inflamatória abrupta, induzida por antígenos do *M. leprae*. Nas lesões,

há um grande influxo de linfócitos T CD4+, aumento do receptor de IL-2, forte expressão de HLA-DR e aumento do número de queratinócitos na epiderme, induzido por IFN- γ (Modlin et al., 1988). Além disso, Yamamura e colaboradores mostraram que juntamente com IFN- γ e TNF, a enzima óxido nítrico sintetase (iNOS) pode ser detectada em macrófagos ativados (Yamamura et al., 1992). A resposta imune do tipo Th1 na RR é abolida com o tratamento da reação, realizado com corticosteroide nas doses preconizadas pelo Ministério da Saúde do Brasil. Um trabalho prospectivo mostrou um significativo decréscimo no mRNA de citocinas pró-inflamatórias nas lesões de pele de pacientes borderline após a RR (Verhagen et al., 1997).

II- Justificativa

O conjunto de informações revisados na introdução desta dissertação mostra que pacientes com hanseníase, especialmente os lepromatosos, apresentam um defeito funcional nos linfócitos T, não respondendo ou sendo hiporresponsivos ao *M. leprae*. De um modo geral, esses pacientes apresentam um defeito básico na função efetora durante a fase inata da resposta imune contra a infecção e a diferenciação da resposta imune celular leva a um padrão funcional ineficaz para a destruição do patógeno.

Pacientes borderline são imunologicamente instáveis e mais vulneráveis aos surtos inflamatórios agudos (episódios reacionais) onde mediadores da resposta imunoinflamatória acarretam dano tecidual e, por vezes, provocam a incapacidade da função do nervo periférico, contribuindo para a morbidade e o sofrimento dos pacientes.

Na RR que acomete pacientes borderline, observa-se a progressão da resposta imune celular para um cenário altamente reativo e ainda pouco compreendido. Entretanto, nos estudos sobre RR com esses pacientes, não é raro observar que formas clínicas distintas são agrupadas, levando-se somente em conta o tipo de reação.

Desse modo, diferenças fenotípicas e funcionais entre as populações celulares de pacientes borderline com formas clínicas distintas (BT, BB e BL), podem ser determinantes na gênese da RR. Até onde se sabe estas análises ainda não foram feitas exclusivamente em pacientes BL e podem colaborar para uma melhor caracterização das subpopulações de linfócitos T e de suas atividades funcionais na gênese da RR.

Pacientes BT sabidamente respondem aos antígenos do *M. leprae* e a histopatologia das lesões é reflexo dessas respostas, com formação de granuloma e predomínio de células epitelióides e gigantes, enquanto que em pacientes BB há menos células linfóides. Continuando em direção ao polo lepromatoso polar do espectro, torna-se curiosa a presença de uma grande quantidade de linfócitos T na derme de lesões inflamatórias dos pacientes BL, um achado constante e em oposição ao observado no polo lepromatoso, cujas lesões são majoritariamente macrofágicas.

O fato de pacientes BL apresentarem sistematicamente episódios de RR nos levou a formular a hipótese de que os linfócitos T que migram para as lesões possam ter papel crítico na gênese dessas reações. Desse modo, o presente estudo se justificou e, pretendemos com os dados obtidos com a avaliação funcional de linfócitos T sanguíneos, trazer à luz novas contribuições sobre a fisiopatologia da RR em pacientes BL. Esse empreendimento poderá auxiliar o direcionamento das estratégias de controle da resposta inflamatória que reduzam o aparecimento de novos episódios reacionais, assim como de danos neurais causados pela RR nesses pacientes.

III. Objetivos

III.1- Principal

Avaliar a participação dos linfócitos T na resposta imunoinflamatória de pacientes com hanseníase “borderline” lepromatosa (BL) na abertura de episódios de reação tipo I (RR) e, se possível, contribuir para o entendimento da patogênese da RR nessa forma clínica da hanseníase.

III.2- Específicos

- Identificar os fatores de transcrição predominantemente envolvidos na diferenciação de linfócitos T (*stat3*, *stat4*, *stat6*, *t-bet*, *rorc*, *foxp3* e *gata3*) em sangue total *ex vivo* de pacientes BL com e sem RR, por RT-PCR.
- Determinar a frequência *ex vivo* de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (virgens, efetores, de memória central e efetora) em pacientes BL com e sem RR por citofluorimetria de fluxo multiparamétrica.
- Avaliar a frequência *in vitro* de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (virgens, efetores, de memória central e efetora) em pacientes BL com e sem RR em resposta ao *M. leprae* por citofluorimetria de fluxo multiparamétrica.
- Verificar a resposta proliferativa antígeno-específica das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ citadas acima em pacientes BL com e sem RR por meio de citofluorimetria de fluxo multiparamétrica.
- Avaliar a frequência dessas subpopulações produtoras de IFN- γ , TNF e IL-10 em resposta ao *M. leprae* em pacientes BL com e sem RR por meio de citometria de fluxo multiparamétrica.
- Verificar se há a correlação entre a expressão *ex vivo* de genes dos fatores de transcrição responsáveis pela diferenciação de linfócitos T e a produção de citocinas por essas células em resposta *in vitro* ao *M. leprae*.

IV. Metodologia

IV.1 – População de Estudo, Biossegurança e Considerações Éticas

Um total de 32 indivíduos foi incluído neste estudo sendo: 12 pacientes BL com RR (imediatamente após o diagnóstico do episódio reacional e sem uso de medicação imunossupressora), 10 pacientes BL não reacionais, imediatamente após o diagnóstico e antes do início da PQT. Para o estudo foram utilizadas também amostras de sangue de 10 indivíduos sadios, moradores da cidade do Rio de Janeiro, área endêmica para a hanseníase.

Os pacientes eram acompanhados no Ambulatório Souza Araújo, parte do Laboratório de Hanseníase do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, no Rio de Janeiro e foram diagnosticados segundo a classificação de Ridley e Jopling. A participação de cada indivíduo no estudo só ocorreu após sua concordância e assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ (Protocolo nº 518/09).

Não entraram neste estudo pacientes com comorbidades infecciosas agudas ou crônicas, idade inferior a 15 anos e os que não concordaram em participar do projeto em questão. Para a proteção e o bem estar dos indivíduos incluídos neste estudo, seus nomes não foram divulgados. Os dados clínicos e demográficos dos pacientes foram colhidos na fase diagnóstica e, juntamente com dados dos indivíduos sadios, encontram-se especificados de forma detalhada na Tabela 1.

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

IV.2- Separação de células mononucleares do sangue periférico

Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram obtidas a partir do sangue periférico de pacientes e doadores saudáveis. O sangue periférico heparinizado foi diluído 1:1 em salina tampão fosfato (PBS) para separação das células por gradiente de densidade em Ficoll Hypaque (GE Healthcare, Suécia). Após centrifugação a 900 xg, por 30 minutos, à temperatura ambiente, as PBMC foram coletadas e lavadas duas vezes com PBS (500 xg, por 10 minutos, a 4°C), ressuspensas em meio AIM V (Gibco Invitrogen Co., EUA). Uma pequena alíquota de 10 µL desta suspensão celular foi diluída em 1:1 em azul de Tripán 0.4% (Bio WHITTAKER, EUA) e contada em câmara de Neubauer para a estimativa da concentração de células viáveis.

IV.3- Cultivo de células mononucleares e ensaios de estimulação *in vitro*

Após a separação as PBMC tiveram suas contagens ajustadas a uma concentração de 2×10^6 /poço foi utilizada em placa de 96 poços fundo U estéril (BD-Bioscience, San José, CA, USA). Foram adicionadas em cada poço a ser estimulado 1 µg/mL de CD28 e CD49d (BD Pharmingen, USA). Em seguida, as células foram estimuladas com 1 µg/mL de enteroxina B de *Staphylococcus aureus* (SEB, Sigma, USA) ou 20 µg/mL de *M. leprae* (ML) irradiado e sonificado proveniente de tatu (fornecido pelo contrato NIH/NIAID N01 AI-25469 da Universidade do Colorado, CO, USA). As culturas foram mantidas a 37°C em estufa com 5% de CO₂ por 6 horas, sendo que na última hora de cultura foram acrescentados 10 µg/mL de brefeldina A (protein transport inhibitor, BD GolgiPlug™, USA). Após o término da cultura, as placas com PBMC foram mantidas na geladeira a 4°C por até 24 horas até o momento da fenotipagem e determinação de citocinas intracelulares por citofluorimetria de fluxo. Paralelamente, PBMC na concentração de 2×10^5 /poço,

estimuladas com SEB e ML nas concentrações acima citadas foram mantidas a 37°C em estufa com 5% de CO₂ durante 5 dias para o ensaio de proliferação com CFSE (BD Biosciences).

IV.4- Análise de moléculas de superfície de membrana celular e de citocinas intracelulares por citometria de fluxo

As culturas estimuladas por 6 horas e PBMC frescas (tempo 0) foram centrifugadas durante 5 minutos, a 4°C, 600xg sob freio baixo. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e os poços foram ressuspensos com 150 µL de PBS a 4°C. As células foram lavadas novamente por centrifugação por 5 minutos, a 4°C, 600 xg sob freio baixo e o sobrenadante mais uma vez descartado. As células foram ressuspensas com 150 µL de PBS contendo 0,02% de EDTA o sobrenadante foi misturado cuidadosamente em “vortex” por um minuto e a placa foi mantida por 15 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, foram efetuadas mais duas lavagens por centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram coradas com DAPI (Kit Live/Dead, Invitrogen, USA) para separação de células mortas de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, as células foram incubadas por 30 minutos em ambiente protegido da luz, imediatamente lavadas duas vezes por centrifugação e o sobrenadante descartado. As células foram então incubadas com os anticorpos monoclonais de superfície CD3V500, CCR7 PerCp, CD4 ou CD8APC, CD69APC-Cy7, CD45RA FITC e seus respectivos controles de isotipo marcados com os mesmos fluorcromos. Todos os anticorpos utilizados, assim como os controles isotípicos foram obtidos da Biolegend (USA). Após 30 minutos de incubação a 4°C, as células foram lavadas por centrifugação com 150 µL de PBS 0,1% de azida sódica e 1% de soro fetal bovino (SFB). Em seguida, as células foram ressuspensas em 1% de paraformaldeído (PA) e incubadas por 30 minutos a 4°C em ambiente protegido da luz. Após esse período, as culturas foram mantidas a 4°C em

ambiente protegido da luz. As culturas celulares de 6 horas foram lavadas por centrifugação por duas vezes e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, as PBMC foram ressuspensas com 200 µL de tampão de permeabilização 1:10 (PERM-2; BD Biosciences). As culturas foram homogeneizadas em vortex cuidadosamente por 1 minuto e incubadas à temperatura ambiente em ambiente protegido da luz por 10 minutos. Após esse período, PBMC foram lavadas por centrifugação por duas vezes com 150 µL de PBS 0,1% de azida sódica e 1% de SFB. Em seguida, as células foram coradas com os anticorpos monoclonais para citocinas intracelulares, a saber: IFN- γ PE-Cy7, TNF Alexa700, IL-10 PE e seus respectivos controles de isotipo (Biolegend) durante 30 minutos a 4°C em ambiente protegido da luz. Nova etapa dupla de centrifugação foi realizada em 150 µL de PBS 0,1% de azida sódica e 1% de SFB. As células foram ressuspensas com 200 µL de paraformaldeído 1%, transferidas para tubos de citometria e analisadas em citometro de fluxo FACSAria (BD Biosciences). Utilizando o programa Diva (BD), foram adquiridos 50.000 eventos por amostra dentro da região de linfócitos e as análises de citometria foram realizadas no programa Flowjo v. 7.5 (Tree Star Inc., USA).

IV.5- Metodologia de análise das subpopulações linfocitárias por citometria de fluxo

As frequências de linfócitos TCD4⁺ e CD8⁺ foram avaliadas em PBMC isoladas dos sangue periférico recém-obtidos (tempo zero, T0) e na identificação das subpopulações de interesse em resposta ao *M. leprae* e SEB, nas culturas de 6h. Para tal, uma sequência de análises foi realizada, a partir da aquisição em citômetro de fluxo FACSAria. Inicialmente, células mortas foram excluídas com o uso do kit “Live/Dead” (núcleos corados em DAPI). Posteriormente, os grumos de células foram excluídos utilizando os parâmetros de tamanho FSC-A (“Foward Scatter” -

área) X FSC-HA (“Foward Scartter” – altura; **Figura 5A e B**). Em seguida, os parâmetros de complexidade estrutural (SSC-A) e tamanho (FSC-A) foram utilizados para selecionar a região de análise de linfócitos T (**Figura 5C**). A região dos linfócitos T CD3⁺/CD4⁺ e CD3⁺/CD8⁺ foi determinada utilizando anticorpos monoclonais específicos e controles isotípicos (**Figura 5D**). A partir da determinação dessas subpopulações, utilizamos a marcação com anticorpos anti-CD45RA e anti-CCR7 para identificar as subpopulações com os fenótipos denominados e, conforme os fluorocromos utilizados foram assim distribuídos: T_{NAÏVE}, CD45RA⁺/CCR7⁺ (quadrante superior direito); T_{CM}, CD69⁺/CCR7⁺/CD45RA⁻ (quadrante superior esquerdo); T_{EM}, CD69⁺/CD45RA⁻/CCR7⁻ (quadrante inferior esquerdo) e T_{EF}, CD69⁺/CD45RA⁺/CCR7⁻ (quadrante inferior direito). Nas **Figuras 5E e F** estão demonstradas as subpopulações de estudo ativadas, levando-se em consideração a positividade de anti-CD69, antígeno de ativação precoce de linfócitos T.

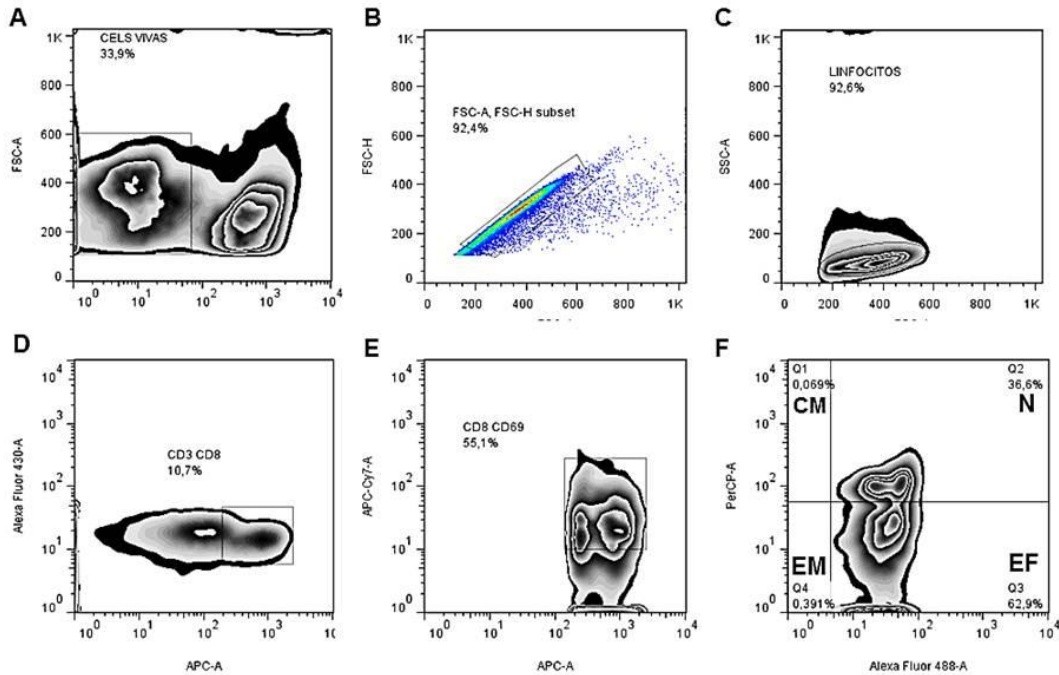


Figura 5. Sequência de análises para a determinação de linfócitos T $CD3^+/CD4^+$ e $CD3^+/CD8^+$, tanto em T0 quanto em PBMC cultivadas por 6h com *M. leprae*. (A) Exclusão de células mortas. (B) Exclusão de grumos pelos parâmetros FSC-H x FSC-A. (C) Identificação da região de linfócitos. (D) Determinação dos linfócitos T $CD3^+/CD4^+$ ou $CD3^+/CD8^+$. (E) Determinação da frequência de células ativadas ($CD69^+$) e (F) Identificação das subpopulações de linfócitos T de acordo com a positividade ou não de CCR7 PerCP e CD45RA Alexa Fluor 488 em T_{NAIVE} (N), T_{CM} (CM), T_{EM} (EM) e T_{EF} (EF). Dados obtidos por citometria de fluxo multiparamétrica em citômetro FACSaria (BD) e analisados com os programas Diva e FlowJo v. 7.5.

IV.6- Avaliação da proliferação celular frente a estímulos

PBMC foram marcadas com CFSE (Molecular Probes) por 15 minutos a $37^{\circ}C$ e em seguida por mais 30 minutos a temperatura ambiente protegida de luz em tubo conico de 15 mL de acordo com protocolo estabelecido pelo fabricante. Em seguida, as células foram transferidas para placas de cultura de 96 poços, na densidade de 2×10^5 células/poço, estimuladas com ML ou SEB nas concentrações especificadas no ite IV.3 e mantidas em cultura ($37^{\circ}C$, 5% CO_2) por 5 dias. Após esse período, as células foram coradas com anticorpos monoclonais de superfície $CD3$ PE-Cy5, $CD4$ ou $CD8$ APC e $CD69$ PE, como descrito no item IV.4. As células foram analisadas no citômetro Accuri C6 e as análises gráficas realizadas no programa FlowJo versão 7.5.

IV.7- Quantificação da expressão gênica de fatores transcricionais por PCR quantitativo em tempo real

Para extração do RNA proveniente do sangue total estocado em tubos Paxgenes (BD Biosciences) a -70°C por período inferior a seis meses procedeu-se a centrifugação dos tubos a 3000 xg por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Ao “pellet” foi adicionado 5 mL de água deionizada livre de RNAase e foi realizado homogeneização em “vortex” por 1 minuto. Em seguida, o pellet foi lavado por 10 minutos a 3000 xg e o sobrenadante foi descartado. O “pellet” foi ressuspense em $350\text{ }\mu\text{L}$ de Tampão BR1, homogeneizado em vortex e a amostra foi transferida para tubos de poliuretano (Eppendorf, EUA) com $300\text{ }\mu\text{L}$ de tampão BR2 e $40\text{ }\mu\text{L}$ de proteinase K. As amostras foram homogeneizadas em vortex e incubadas por 10 minutos a 55°C em banho-maria. Em seguida, as amostras por 10 minutos na velocidade máxima da microcentrífuga. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de poliuretano (Eppendorf) e foi adicionado $350\text{ }\mu\text{L}$ de etanol 100%. O lisado foi transferido para a coluna inserida no tubo coletor e levado à centrifugação a 8000 xg por 60 segundos em microcentrífuga. Em outro tubo, a 2ª coluna foi inserida e o lisado foi ajustado para $750\text{ }\mu\text{L}$. Após nova etapa de centrifugação (1800 xg por 30 segundos) foi adicionado ao sedimento $350\text{ }\mu\text{L}$ de tampão de dissociação e nova centrifugação foi realizada a 8000 gx por 60 segundos. O tampão de RNAse (MIX) foi feito imediatamente antes do uso com $90\text{ }\mu\text{L}$ de tampão para rDNAse e $10\text{ }\mu\text{L}$ de rDNAse, ambos homogeneizados com pipeta de forma suave. O MIX ($95\text{ }\mu\text{L}$) foi colocado em uma membrana, sendo esta incubada à temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, foram adicionados $200\text{ }\mu\text{L}$ de tampão para a inativação de rDNAse e nova etapa de centrifugação foi realizada (8000 xg por 30 segundos). Esta operação foi repetida por 3 vezes. A partir de então, a membrana seca foi transferida para um tubo de 1,5 mL livre de nucleases. O RNA foi eluído com $60\text{ }\mu\text{L}$

de água deionizada livre de RNase e o tubo coletor foi centrifugado a 8000 xg por 60 segundos. Para dosar a concentração de RNA e DNA apenas 4µL da solução de RNA total foi utilizada. O restante foi usado para a conversão em cDNA. A leitura foi realizada em fluorímetro (absorbância 260/280 nm; valor 1,0 = 40µg/mL de RNA). A concentração de rDNA (DNA residual) foi determinada com 2 µL de RNA e a conversão do RNA para o cDNA foi feita com o kit HC cDNA reversal transcription (Applied Biosystems, USA).

Para a reação de síntese de cDNA foi utilizado o Kit Superscript II (Invitrogen) e os procedimentos foram realizados conforme orientação do fabricante. Em um tubo Eppendorf contendo 1µg de RNA, foi adicionado 1µL de oligodT₂₀, 1µL de solução de anelamento e H₂O RF até um volume de 8µL. As amostras foram então incubadas a 65°C por 5min. Em seguida, foram adicionados aos tubos 10µL de Mix de reação (2X) e 2µL de supercript-III já contendo RNaseOUT. As amostras foram então centrifugadas e incubadas a 50°C por 50min seguido de incubação a 85°C por 5min.

Pra a amplificação de material genômico por PCR em tempo real, as amostras de cDNA foram utilizadas na quantidade de 50ng por reação em volume final de 25µl (já contendo o cDNA). Foi utilizado o sistema *Taqman* de RT-PCR em tempo real com o ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) para contínuo monitoramento da fluorescência. Em cada poço (ABI Prismopticalplates, Applied Biosystems), foram adicionados 12,5 µL de 2X TaqMan Universal Master Mix (1X;contendo AmpliTaqGold 250U, AmpErase UNG, 10X Taqman Buffer A e dNTPs) e 1µL 20X de TaqMan contendo os genes de interesse (*stat3*, *stat4*, *stat6*, *t-bet*, *rorc*, *foxp3* e *gata3*) e o gene de referência glicerol-3-fosfato desidrogenase (*gapdh*). O material foi então amplificado em um total de quatro etapas: i) 1 ciclo a 50°C por 2 minutos, para a ativação da enzima AmpEraser UNG; ii) 1 ciclo a 95°C

por 10 minutos para a ativação da AmpliTaqGold DNA polimerase; iii) 45 ciclos contendo etapas de desnaturação a 95°C por 15 segundos, iv) seguidos pelas etapas de anelamento e a extensão a 60°C por 1 minuto. A variação nos níveis de expressão dos genes de interesse foi calculada a partir da variação entre os valores de Ct dos genes de interesse e do *gapdh*. Os valores de ΔCt foram calculados segundo a fórmula abaixo, de modo a gerar resultados que refletissem a expressão dos genes de interesse em relação à expressão do *gapdh*: $\Delta Ct = Ct \text{ gene de interesse} - Ct \text{ gapdh}$.

IV.8- Análise estatística

Os resultados foram expressos em mediana e intervalo (mínimo-máximo). Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas com os testes não paramétricos ANOVA Mann-Whitney e/ou Kruskal-Wallis, seguido de *post-test* de Dunn. O método de Spearman foi utilizado para a obtenção do coeficiente de correlação (r) entre dois resultados de uma mesma amostra. O programa Prisma versão 5.1 foi utilizado para a análise estatística e gráfica (Graph Prism, USA). Os valores com $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) e $p \leq 0,001$ (***) foram considerados significativos.

V- Resultados

V.1 Características clínicas e demográficas dos pacientes e doadores sadios

Um total de 32 indivíduos foi estudado, sendo: 12 pacientes com a forma BL da hanseníase em RR (RR), 10 pacientes BLs não reacionais (BL) e 10 indivíduos sadios de área endêmica para a doença (HS).

A média de idade do grupo RR foi de $41 \pm 5,5$ anos, do grupo BL de $44,3 \pm 4,9$ anos e do grupo HS de $38,2 \pm 4,5$ anos. Quanto ao gênero, no grupo RR, 58,3% eram do sexo feminino e 41,7% do masculino; no grupo BL e de sadios o percentual médio era de 50,0% para cada sexo. A baciloscopia foi positiva em todos os pacientes com RR, com carga bacilar média de 2,1 (variando de 1,25 a 2,75) e no grupo BL de 3,16 (variando de 2,75 a 4). O teste da lepromina foi realizado (reação de Mitsuda) foi positivo em todos os pacientes BL. No grupo com RR a média foi de 4,4 mm (variação de 3 a 6 mm) e no grupo BL de 3,7 mm (variação de 3 a 5 mm). A avaliação do grau de incapacidade funcional foi realizada em 11 dos 12 pacientes do grupo RR até o momento da coleta de sangue e revelou que 81,8% (9 pacientes) já tinham perda de sensibilidade ou incapacidades decorrentes da doença. No grupo BL 8 pacientes foram avaliados e, desses, 62,5% (5 pacientes) também já apresentavam algum comprometimento. Todos os pacientes receberam o tratamento poliquimioterápico (PQT) como preconizado pelo Ministério da Saúde. Além disso, durante a RR os pacientes foram tratados com prednisona em doses preconizadas. A coleta de sangue para a avaliação imunológica ocorreu imediatamente antes do início do tratamento do episódio reacional. As características clínicas e demográficas dos indivíduos avaliados nesse estudo encontram-se detalhadas na **Tabela 1**.

Características clínicas e demográficas dos indivíduos estudados

ID	Forma clínica	Sexo	Idade (anos)	Carga bacilar	Mitsuda (mm)	GI	Tempo de tratamento (doses)
HR001	BL/RR	F	69	1,75	3	I	10 ^o
HR002	BL/RR	F	25	2,5	4	I	8 ^o
HR003	BL/RR	M	28	1,75	4	II	8 ^o
HR004	BL/RR	M	22	2,5	6	0	9 ^o
HR005	BL/RR	F	29	1,5	4	I	NT
HR006	BL/RR	M	54	2,75	5	III	NT
HR007	BL/RR	F	68	2,5	5	II	NT
HR008	BL/RR	M	59	2,5	4	II	7 ^o
HR009	BL/RR	F	42	1,25	3	NR	NT
HR010	BL/RR	F	28	2,25	4	0	7 ^o
HR011	BL/RR	F	56	2,5	3	III	NT
HR012	BL/RR	M	15	1,25	5	I	9 ^o
BS001	BL	M	29	3,75	4	II	NT
BS002	BL	M	61	4	3	II	NT
BS003	BL	F	63	3,75	3	I	NT
BS004	BL	F	56	2,75	3	I	NT
BS005	BL	M	31	2,5	5	0	NT
BS006	BL	M	33	3	4	0	NT
BS007	BL	F	42	2,55	4	NR	NT
BS008	BL	F	53	2,5	3	NR	NT
BS009	BL	M	57	4	3	I	NT
BS010	BL	F	18	2,75	5	0	NT
SD001	HS	F	25	-	-	-	-
SD002	HS	F	52	-	-	-	-
SD003	HS	F	29	-	-	-	-
SD004	HS	F	39	-	-	-	-
SD005	HS	F	42	-	-	-	-
SD006	HS	M	20	-	-	-	-
SD007	HS	M	32	-	-	-	-
SD008	HS	M	39	-	-	-	-
SD009	HS	M	59	-	-	-	-
SD010	HS	M	46	-	-	-	-

Tabela 1. Características clínicas e demográficas dos indivíduos estudados (ID, código do sujeito em estudo; HS, doador saudável de área endêmica; BL/RR, forma clínica BL em RR; BL, forma clínica Borderline Lepromatosa; NR, não realizado; NT, não tratado; GI, grau de incapacidade; M, masculino; F, feminino).

V.2 Expressão de genes dos fatores de transcrição envolvidos com a diferenciação de linfócitos T em pacientes borderline lepromatosos com e sem reação reversa

Para avaliar a expressão dos genes dos fatores de transcrição responsáveis pela diferenciação de linfócitos T (*stat3*, *stat4*, *stat6*, *t-bet*, *rorc*, *foxp3* e *gata3*) foi realizado PCR quantitativo em tempo real a partir de cDNA extraído de sangue periférico, obtido com o tubo PAXGene. Utilizamos a dupla de genes *stat4/t-bet* para identificar o perfil Th1, *stat6/gata3* para Th2, *stat6/rorc* para Th17 e *stat3/foxp3* para Treg. Como podemos observar na **Figura 6A**, a expressão dos genes *t-bet* e *stat4* encontravam-se significativamente aumentados nos pacientes com RR em comparação com o mesmo número de pacientes BL ($p < 0.01$). Em seguida, avaliamos a expressão de *stat6* e *gata3* que foi significativamente mais expressa no grupo BL do que no RR ($p < 0.01$), sugerindo tendência ao desenvolvimento do perfil Th2 nos pacientes BL (**Figura 6B**). Quando observamos os genes que induzem a diferenciação para o perfil Th17 vimos um aumento significativo de *rorc* nos pacientes BL não reacionais em comparação com o grupo RR ($p < 0.001$), enquanto *stat3* se manteve similar nos dois grupos, como mostrado na **Figura 6C**. Por fim, ao avaliarmos a expressão de *foxp3*, observamos diferença entre os grupos, com valores significativamente maiores nos pacientes BL em comparação aos RR ($p < 0.001$). Mais uma vez, como já descrito anteriormente, a expressão de *stat3* não permitiu discriminar pacientes BL com e sem RR (**Figura 6D**). A análise da expressão dos genes por nós avaliados nos permite sugerir que a diferenciação de linfócitos T na RR seja para o fenótipo Th1 com a expressão aumentada dos genes *stat4* e *t-bet* e na forma BL não reacional seja Th2, pelo aumento de *stat6* e *gata3*. Não se pode descartar a participação de Treg nos BL não reacionais, vez que a expressão de *foxp3* encontrava-se aumentada nesse grupo de pacientes.

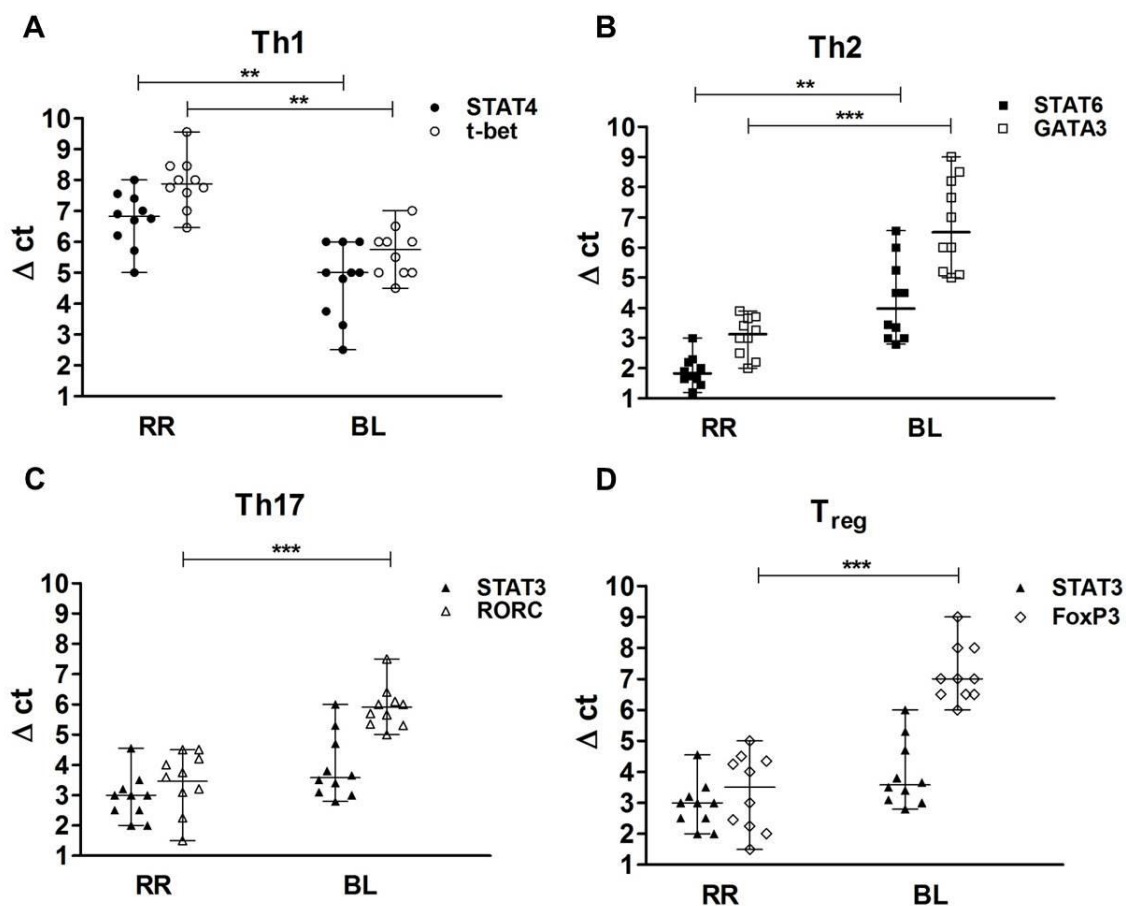


Figura 6. Avaliação da expressão de genes de fatores de transcrição que induzem a diferenciação das subpopulações de linfócitos T nos grupos de pacientes BL com e sem RR por qRT-PCR. (A) *stat4* e *t-bet*, (B) *stat6* e *gata3*, (C) *stat3* e *rorc*, e (D) *stat3* e *foxp3*. Os resultados estão representados por Δct (médias de ct dos genes de interesse menos médias de ct dos genes constitutivos) de experimentos independentes de 10 pacientes em cada grupo, sendo: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn).

V.3 Determinação de subpopulações de linfócitos T de pacientes BL com e sem RR

V.3.1 Análise fenotípica *ex vivo* das subpopulações de linfócitos T de pacientes BL com e sem RR

As subpopulações de linfócitos T CD3⁺/CD4⁺ e CD3⁺/CD8⁺ sanguíneas de pacientes BL com e sem RR, assim como de indivíduos sadios foram analisadas no que chamamos de tempo zero (T0) a fim de caracterizar as populações linfocitárias *ex vivo* predominantes nos dois grupos.

Com relação aos linfócitos T_{NAÏVE}, os pacientes com RR apresentaram diminuição no percentual das CD3⁺/CD4⁺ em comparação aos não reacionais e aos indivíduos sadios, sendo significativa a diferença entre os grupos RR e BL ($p \leq 0,001$), e também entre RR e HS ($p \leq 0,001$). Uma diminuição significativa foi também observada nas CD3⁺/CD8⁺ no grupo RR em comparação ao grupo de pacientes BL ($p < 0,01$) e ao grupo de sadios ($p < 0,001$; **Figura 7A**). Ainda com relação ao T₀, o grupo RR apresentou frequências aumentadas tanto de linfócitos T CD3⁺/CD4⁺ quanto de CD3⁺/CD8⁺ efetores (T_{EF}), de memória central (T_{CM}) e de memória efetora (T_{EM}) ativados (CD69⁺), de forma significativa quando comparado aos outros grupos, mas principalmente, ao grupo BL. Como observado na **Figura 7B**, a frequência das CD4⁺ efetoras dos RR foi significativamente maior do que dos BL e HS ($p < 0,01$ respectivamente). Com relação ao fenótipo T_{CM} foram significativas as diferenças entre RR e BL ($p < 0,05$) e RR e HS ($p < 0,001$). As maiores diferenças ficaram por conta dos linfócitos T_{EM} CD4⁺, onde o grupo RR apresentou alta positividade em comparação aos grupos BL ($p < 0,01$) e HS ($p < 0,001$) respectivamente.

Nas CD8⁺ T_{EF} também foram significativas as diferenças entre RR e BL ($p < 0,01$) e RR e HS ($p < 0,001$). Nas T_{CM} observamos diferenças significativas entre RR e BL ($p < 0,001$) e entre RR e HS ($p < 0,001$). Nas T_{EM}, também achamos grande diferença entre as CD8⁺ de RR e BL ($p < 0,01$) e menor, porém significativa, entre RR e HS ($p < 0,05$). Na **Figura 7C** estão mostradas as frequências dos linfócitos CD8⁺ e as diferenças entre os grupos estão apontadas.

Esses dados iniciais indicam que, mesmo diminuídas as frequências das células T naíve, levando-se em conta que os BL são pacientes multibacilares, na abertura da RR suas subpopulações de linfócitos T de memória encontram-se ativadas *ex vivo*, como observado pela positividade ao receptor CD69.

Possivelmente, nossos dados reflitam o que está ocorrendo no compartimento intravascular e até mesmo nas lesões.

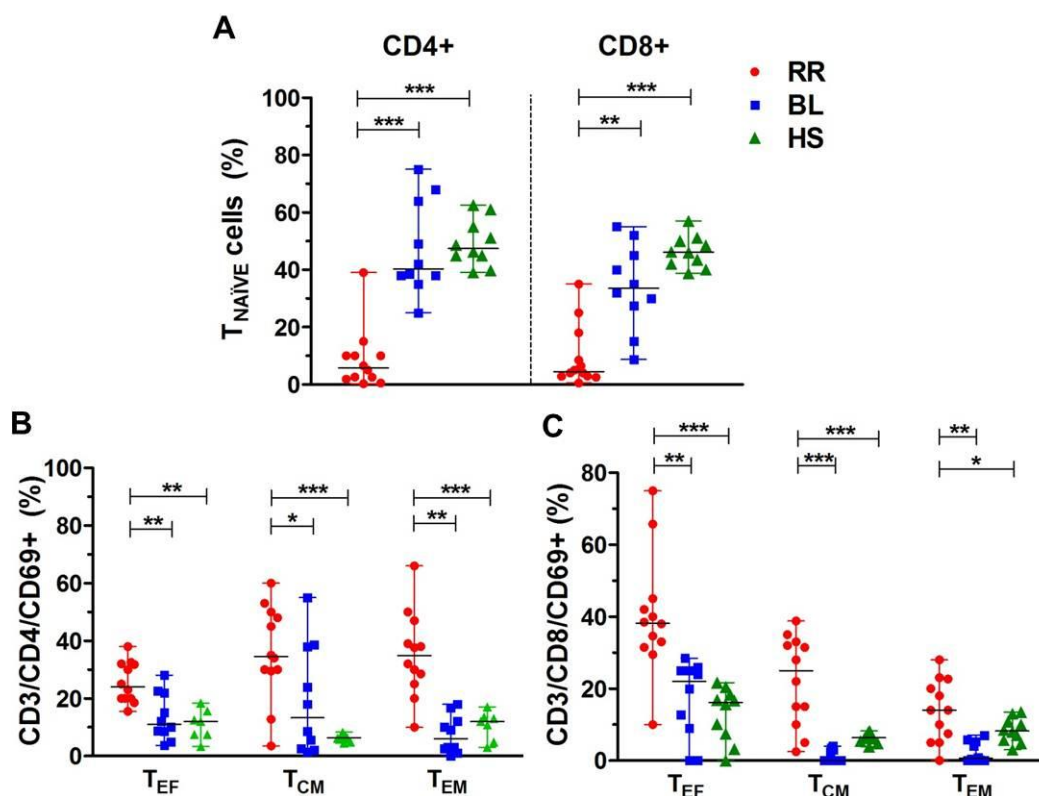


Figura 7. Frequência de linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺ naíve. (B) Frequência de linfócitos T CD4⁺/CD69⁺ efetores (T_{EF}), memória central (T_{CM}) e memória efetora (T_{EM}). (C) Frequência de linfócitos TCD8⁺/CD69⁺ efetores (T_{EF}), memória central (T_{CM}) e memória efetora (T_{EM}). Os resultados representam média e erros padrões de experimentos isolados, sendo: 12 RR, 10 BL e 10 HS. O teste Kruskal Wallis com pós teste de Dunn foi usado para análise estatística, sendo: *para valor de $p < 0,05$, **para valor de $p < 0,01$ e ***para valor de $p < 0,001$.

V.3.3 Análise fenotípica *in vitro* das subpopulações de linfócitos T de pacientes BL com e sem RR em resposta ao *M. leprae*

A fim de caracterizar as principais subpopulações que participam da resposta antígeno-específica de pacientes BL na abertura da RR, realizamos o protocolo de marcação citado na metodologia e a análise mostrada na figura 5. O limiar de ativação das células T CD4⁺ pelo *M. leprae* não se altera significativamente no grupo

RR, quando comparadas as culturas não estimuladas com as estimuladas, com exceção da subpopulação CD4⁺ T_{CM}, mas assim mesmo, devido ao comportamento de um dos pacientes do grupo, cuja frequência foi de aproximadamente 60% de células positivas frente ao *M. leprae* (**Figura 8C**). Possivelmente, o antígeno não induziu aumento significativo nas subpopulações no grupo RR devido à prévia ativação *in vivo* em consequência da resposta inflamatória. Com relação aos linfócitos T CD8⁺ observamos uma leve tendência no aumento das células T_{EF} e T_{CM} do grupo RR, mas sem significância. Já nas células de memória efetora (T_{EM}), as diferenças entre o grupo RR e os outros foram maiores, tanto nas culturas não estimuladas (RR vs BL, $p < 0,01$; RR vs HS, $p < 0,001$), quanto após o estímulo antigênico (RR vs BL, $p < 0,05$; **Figura 8H**). Em todos os experimentos mostrados na Figura 8 na página a seguir, as culturas também foram estimuladas com SEB e os resultados foram positivos (dados não mostrados).

A observação de uma predominância de linfócitos TCD4⁺ e CD8⁺ previamente ativados no grupo RR e nos permitem sugerir que estas subpopulações celulares possam estar contribuindo para o aparecimento e estabelecimento da sintomatologia do quadro reacional.

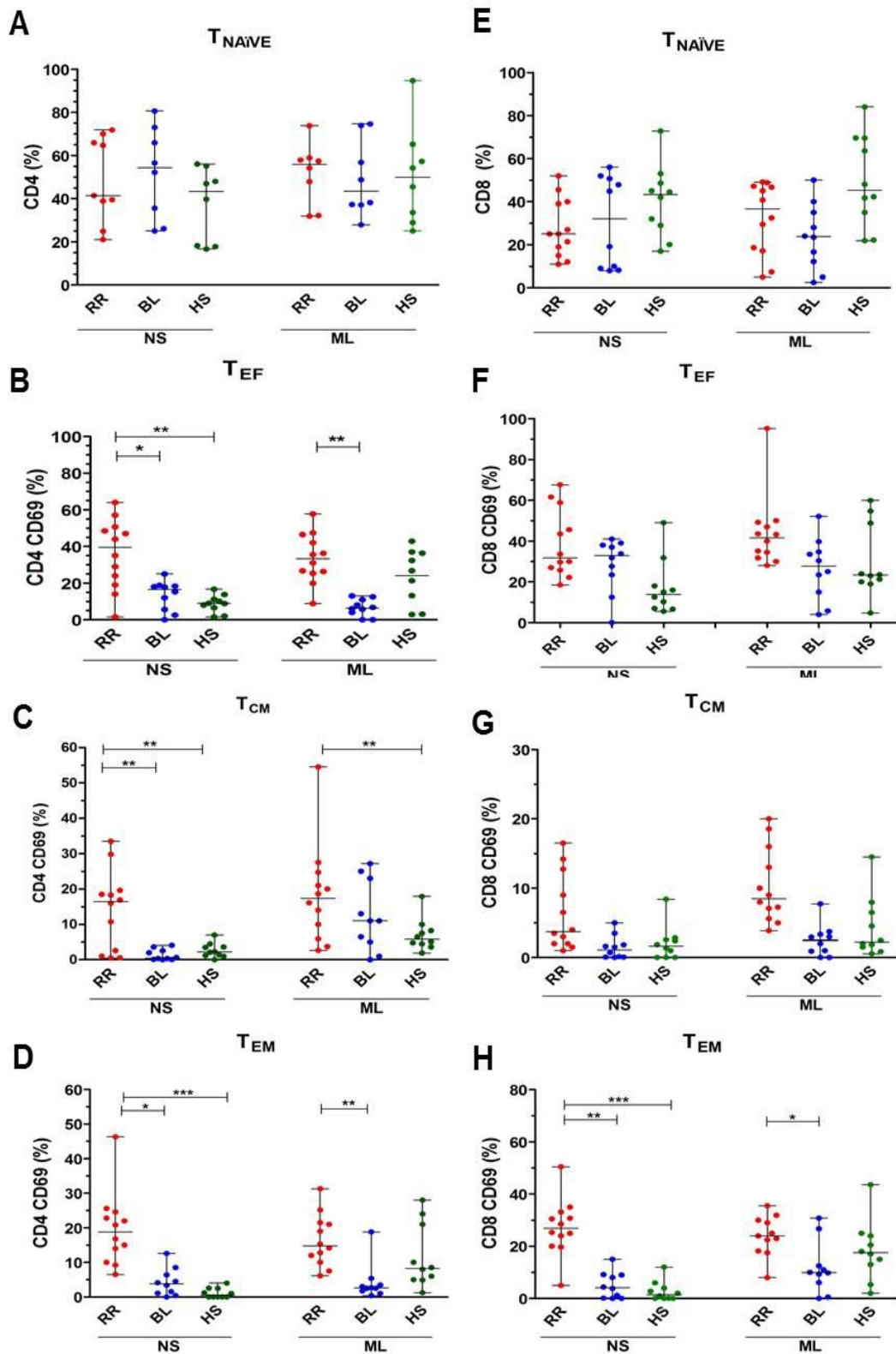


Figura 8. Identificação das diferentes subpopulações de linfócitos T em resposta ao *M. leprae*. Frequência de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ naïve (T_{NAIVE}), efetores (T_{EF}), de memória central (T_{CM}) e de memória efetora (T_{EM}) são mostradas. Os resultados representam mediana com intervalos (mínimo-máximo) de experimentos isolados. Cada círculo colorido representa um indivíduo de determinado grupo e cada traçado preto maior a mediana de cada grupo. RR, n=12; BL, n=10 e HS, n=10. Em todos os experimentos os resultados com SEB foram positivos e serviram como controle do experimento (resultados não mostrados). O teste Kruskal Wallis com pós teste de Dunn foi usado para análise estatística, sendo: * para valor de $p < 0,05$, ** para valor de $p < 0,01$ e *** para valor de $p < 0,001$.

V.4 Proliferação de linfócitos T em resposta ao *Mycobacterium leprae*

Para avaliar a resposta proliferativa antígeno-específica de linfócitos T, PBMC dos indivíduos em estudo foram previamente incubadas com CFSE, estimuladas com *M. leprae* (ML) e SEB e mantidas em cultura por 5 dias. Após esse período, as análises foram realizadas a partir da marcação com os anticorpos monoclonais anti-CD3, CD4, CD8 e CD69, onde identificamos a frequência de linfócitos T que proliferaram por meio de citometria de fluxo. Os resultados obtidos nas culturas não estimuladas mostram maior resposta proliferativa tanto de linfócitos TCD4⁺ como TCD8⁺ em pacientes com RR em comparação ao grupo BL não reacional, indicando que esses pacientes já apresentam células ativadas e em proliferação na circulação. Na **Figura 9A** é mostrada a porcentagem de células CD4⁺, sendo a mediana de 51,5 no grupo RR, 12,8 no grupo BL e 14,6 no grupo HS. Houve diferenças significativas entre RR vs BL e RR vs HS, com $p < 0,001$ respectivamente. Nas mesmas condições, isto é, em ausência de estímulo antigênico, as medianas das CD8⁺ (**Figura 9B**) foram: 59,6 no grupo RR, 0,5 no BL e 10,75 no HS, sendo todas as comparações significativas ($p < 0,001$). Em resposta ao *M. leprae* observamos um ligeiro aumento na mediana da proliferação dos indivíduos RR nas CD4⁺ (de 51,5 para 72,8). Entretanto, nas CD8⁺ houve uma pequena queda na mediana no grupo RR (59,6 para 56,9), ambas sem significância (valores de p não mostrados). No grupo de pacientes BL a proliferação não foi significativa em nenhuma das duas populações de linfócitos T, em células estimuladas ou não com o antígeno (**Figura 9A e B**). Um experimento representativo da proliferação em um indivíduo de cada grupo estudado é mostrado em forma de histograma em **9C** (TCD4⁺) e **D** (TCD8⁺). Os dados acima descritos são sugestivos de proliferação intravascular com discreto aumento após estímulo antigênico no grupo RR, enquanto o grupo BL não respondeu ou foi

hiporresponsivo ao *M. leprae*. Todos os grupos estudados foram respondedores para SEB (dados não mostrados).

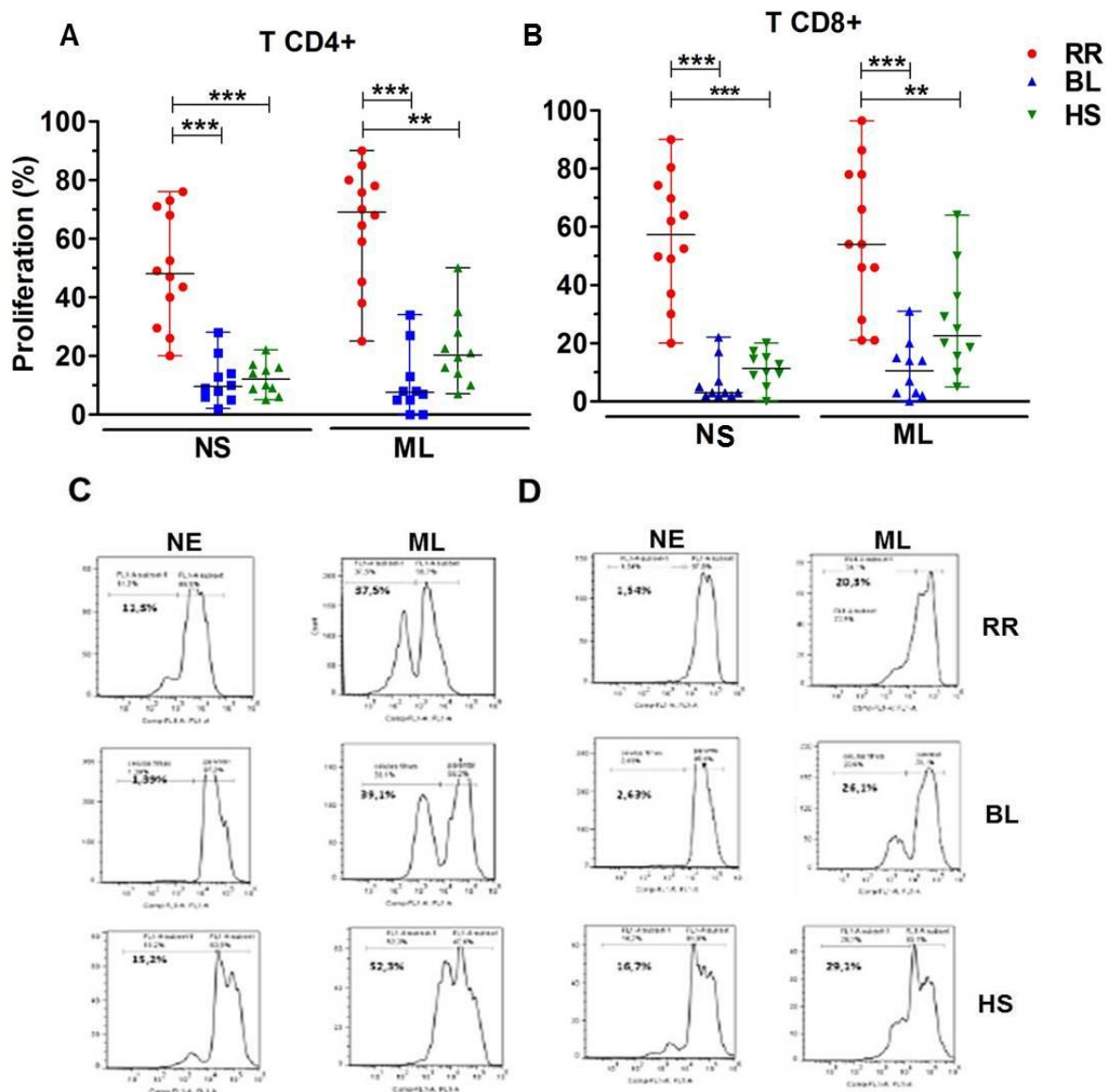


Figura 9. Ensaio de proliferação celular por citometria de fluxo. Os dados mostram a frequência de células CD4⁺/CD69⁺ ou CD8⁺/CD69⁺ após marcação com CFSE em PBMC de pacientes e doadores saudáveis não estimulados (NS) e estimulados por *M. leprae* (ML). (A) Gráfico representativo dos grupos estudados mostrando a proliferação celular em células CD4⁺. (B) Percentual de células CD8⁺ nas culturas NS e ML. Os resultados representam a mediana com intervalo (mínimo-máximo) de experimentos isolados de 12 pacientes RR, 10 BL e 10 saudáveis. O teste Kruskal Wallis com pós teste de Dunn foi usado para análise estatística (*p<0,05, **p <0,01 e ***p<0,001). Em C e D estão representados histogramas de um indivíduo de cada grupo em culturas não estimuladas (NE) e estimuladas com *M. leprae* (ML). PBMC, célula mononuclear de sangue periférico.

V.5 Frequência de subpopulações de linfócitos T produtores de IFN- γ , TNF e IL-10 em resposta ao *Mycobacterium leprae*

As citocinas IFN- γ , TNF e IL-10 são mediadores classicamente associados à patogênese da hanseníase. Para completar o estudo em questão, avaliamos por citometria de fluxo multiparamétrica a frequência de subpopulações de linfócitos T produtores dessas citocinas em culturas estimuladas ou não com *M. leprae*. Com relação aos linfócitos T CD4⁺ (**Figura 10A a D**), no grupo RR houve predomínio de células naïve produtoras de IFN- γ e IL-10 sem estímulo antigênico em comparação com os outros grupos. Nas células estimuladas do grupo em questão o *M. leprae* inibiu a produção das duas citocinas, mas o mesmo ocorreu nos grupos BL e HS. O achado de células naïve CD4⁺ produtoras de IL-10 no grupo RR foi um achado curioso, especialmente pelo fato de não terem sido estimuladas *in vitro* com o antígeno do *M. leprae*. Células produtoras de TNF também foram observadas no grupo RR, mas não foi uma exclusividade do episódio reacional, vez que o grupo BL apresentou percentual aproximado em todas as subpopulações estudadas. Todas as culturas estimuladas com SEB foram positivas para as citocinas estudadas (dados não mostrados).

Esses resultados mostram que, embora a frequência das células T_{NAÏVE} tenha sido menor no grupo RR logo após a abertura do quadro reacional (T0, **Figura 7A**), o IFN- γ foi a principal citocina produzida por essas células e pode ter influenciado o aumento da expressão do fenótipo de memória que encontramos no grupo RR.

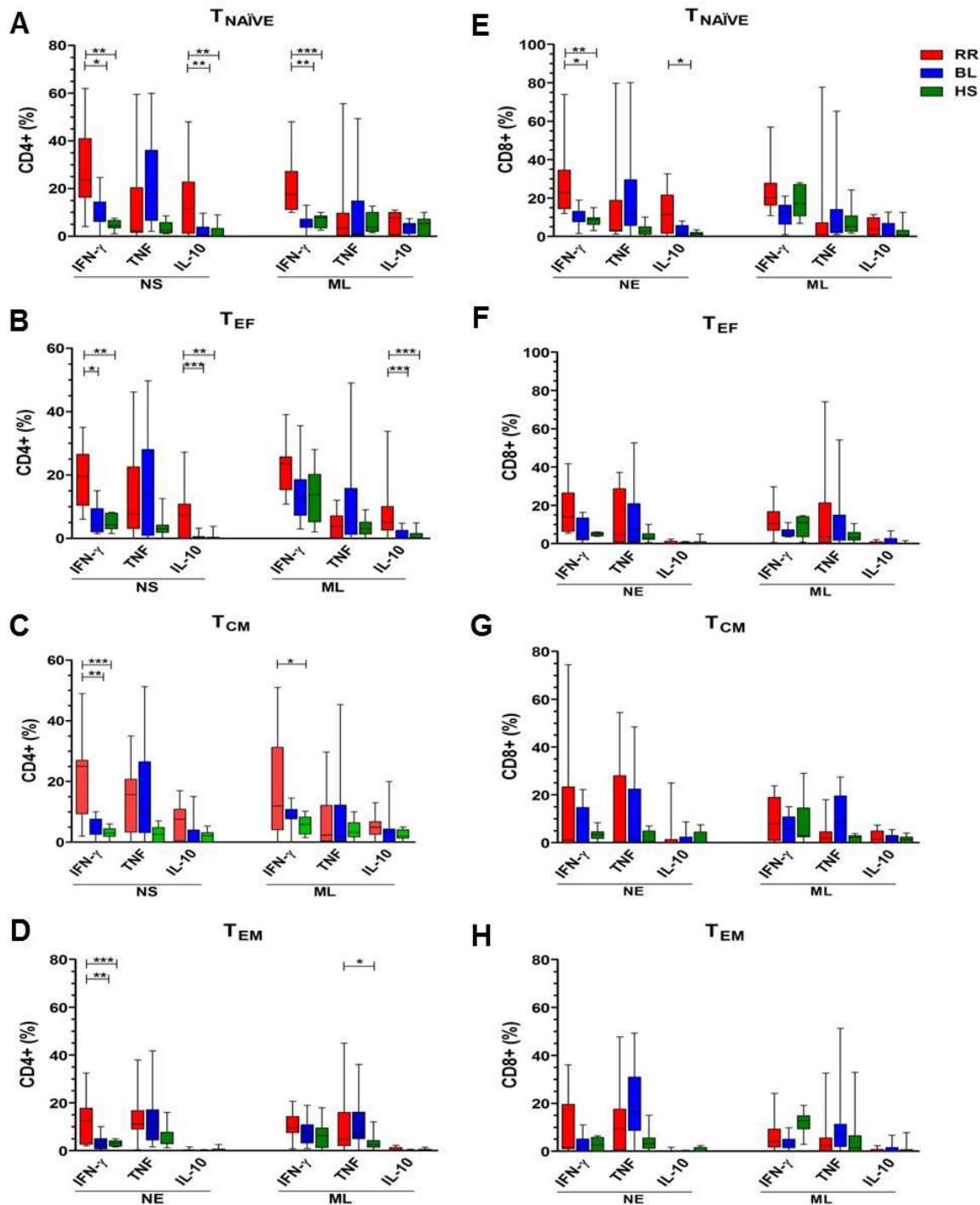


Figura 10. Análise funcional das diferentes subpopulações de linfócitos T frente ao *Mycobacterium leprae* (ML). Produção de IFN- γ , TNF e IL-10 por linfócitos T CD4⁺ naïve (T_{NAIVE} , **A**), efetores (T_{EF} , **B**), de memória central (T_{CM} , **C**) e de memória efetora (T_{EM} , **D**) em PBMC de pacientes e doadores saudáveis em culturas não estimuladas e estimuladas por ML. Frequência de linfócitos T CD8⁺ naïve (T_{NAIVE} , **E**), T_{EF} (**F**), T_{CM} (**G**) e T_{EM} (**H**) nas mesmas condições descritas acima. Os experimentos foram realizados nos grupos RR (n=12), BL (n=10) e HS (n=10). Em todas as análises os resultados com SEB foram positivos e serviram como controle experimental (dados não mostrados). O teste Kruskal Wallis com pós teste de Dunn foi usado para análise estatística, onde * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. PBMC, célula mononuclear do sangue periférico, SEB enterotoxina de *Staphylococcus aureus*. As caixas, a linha horizontal e as barras verticais representam a mediana e a distribuição dos intervalos de cada grupo avaliado.

V.6 Correlação entre a expressão de genes que induzem diferenciação de linfócitos T e a frequência de linfócitos T produtores de IFN- γ , TNF e IL-10 na RR

Por fim, verificamos uma possível correlação entre a expressão de genes que induzem a diferenciação de linfócitos T, especialmente *t-bet* por sua expressão significativamente aumentada na RR com a frequência de linfócitos T CD3⁺ produtores das citocinas avaliadas nesse trabalho. A expressão de cada um dos genes mostrados na **Figura 6** foi correlacionada com a frequência de linfócitos T CD3⁺ que expressavam IFN- γ , TNF e/ou IL-10 na abertura do episódio reacional. Como observado na **Figura 11A**, a expressão de *t-bet* correlacionou significativamente com células CD3⁺/IFN- γ ⁺ ($r=0,898$; $p<0,001$). Ao ser comparado com as células CD3⁺/TNF⁺ a correlação com *t-bet* também foi significativa ($r=0,884$; $p<0,05$) embora, como pode ser observado na **Figura 11B**.

A partir de informações mostrando que linfócitos T CD3⁺ produzem IL-10 e que essas células têm capacidade imunoreguladora nas respostas inflamatórias (Groux et al., 1997), procuramos também correlacionar a expressão de *foxp3* com a frequência de linfócitos T CD3⁺/IL-10⁺. Neste caso, não observamos correlação positiva, embora o coeficiente de correlação tenha ficado acima de 0,5 ($r=0,509$; $p>0,05$) como mostrado na **Figura 11C**. Fizemos ainda outras análises de correlação entre todos os genes avaliados e todas as citocinas estudadas, mas os resultados não foram significativos (dados não mostrados).

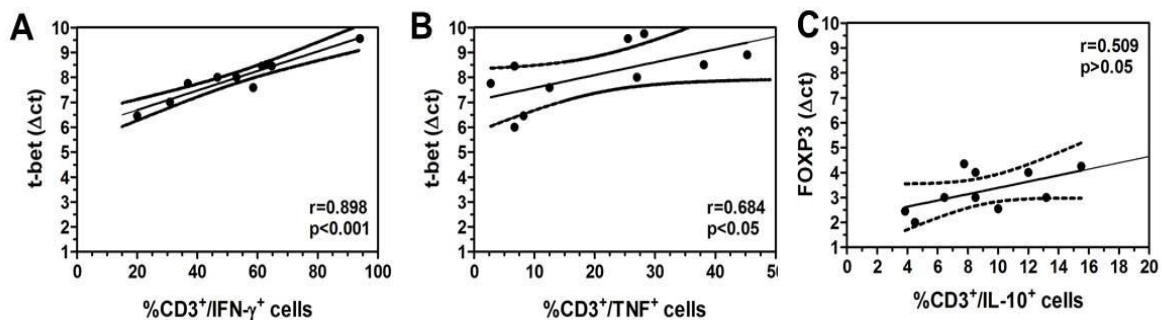


Figura 11. Correlação entre a expressão de genes que induzem diferenciação de linfócitos T e frequência de linfócitos T produtores das citocinas IFN- γ , TNF e IL-10. A expressão do fator de transcrição obtida por meio de RT-PCR quantitativo foi correlacionada com a frequência de linfócitos T produtores de IFN- γ , TNF e IL-10 em análise realizada por citometria de fluxo multiparamétrica. (A) *t-bet* vs $CD3^+/IFN-\gamma^+$; (B) *t-bet* vs $CD3^+/TNF^+$ e (C) *foxp3* vs $CD3^+/IL-10^+$. Dados pareados de 10 pacientes BL em RR e cada ponto representa um indivíduo. As linhas tracejadas mostram os intervalos de confiança em 95% e os coeficientes de correlação são mostrados nas retas (valores de r) e o nível de significância também é mostrado (valores de p). Análise realizada pelo método de Spearman.

Em resumo, os dados obtidos em nosso estudo mostram ativação de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ com perfil Th1 *ex vivo* em pacientes BL na abertura da RR. Os dois fenótipos são produtores de IFN- γ , TNF e IL-10, proliferam *in vitro* e se diferenciam em células efetoras e de memória imunológica. Estas células se mantêm ativadas *in vitro* pelo antígeno de *M. leprae*, especialmente as $CD4^+$ de memória central (TCM). Possivelmente, na forma BL da hanseníase a RR seja desencadeada por essas células, reconhecidas por serem rapidamente ativadas *in vivo* em resposta a patógenos intracelulares e, as T_{CM} produtoras de IL-10, podem atuar na regulação da resposta imunoinflamatória nesses pacientes.

VII- Discussão

A reação reversa (RR) ou reação do tipo 1 é uma exacerbação da resposta inflamatória aguda que interrompe o curso crônico da hanseníase e acomete pacientes das formas *borderlines* da doença (BT, BB e BL), podendo ser observada numa frequência muito baixa em pacientes LL. Novas lesões de pele e reinfilação de antigas, assim como lesão de nervos periféricos causam alterações sensitivas, motoras e de grande morbidade nos pacientes (Nery et al., 2013).

Parâmetros de resposta imune celular em pacientes com as formas *borderline* da hanseníase durante a RR foram descritos anteriormente, entretanto, a maioria dos estudos foi feita com pacientes BT, enquanto outros agrupam indivíduos com todas as formas *borderlines* (Verhagen et al., 1997; Moraes et al., 1999). Esses pacientes são instáveis do ponto de vista clínico e, principalmente imunológico e, a nosso ver devem ser estudados de forma isolada. Em primeiro lugar, dentre as formas *borderlines*, os pacientes podem ser multibacilares, como os BL e os BB, com inúmeros bacilos nas lesões ou paucibacilares, como os BT, nos quais a identificação do *M. leprae* é raramente observada. Além disso, a composição morfológica das lesões de pele distingue-se por completo entre eles. Enquanto nos pacientes BT há formação de granuloma com predomínio de células epitelióides e gigantes nas lesões, em pacientes BL observa-se infiltrado inflamatório inespecífico, com a presença de uma grande quantidade de linfócitos T na derme. Na abertura dos sintomas clínicos da RR, a análise histopatológica das lesões revela que pacientes BL passam a apresentar granulomas, sugerindo que os linfócitos T citados anteriormente possam ser ativados por mediadores da resposta inflamatória e desempenhar papel crítico na imunopatogênese desses episódios. De fato, Sreenivasan e colaboradores, estudaram um pequeno número de pacientes BL com RR e observaram níveis séricos

aumentados de IFN- γ e IL-12p40, com ausência de IL-4 e IL-10, detectadas apenas no soro de pacientes com ENL (Sreenivasan et al., 1998).

Com base nesses achados, no presente estudo tentamos compreender como ocorre a diferenciação, ativação e atividade funcional de linfócitos T na resposta imune de pacientes BL na abertura da RR. Inicialmente, avaliamos a expressão de genes relacionados com a diferenciação de linfócitos T em sangue periférico por meio de PCR quantitativo em tempo real. Observamos que *stat4* e *t-bet* estavam significativamente mais expressos no grupo de pacientes que desenvolveu a RR, sugerindo diferenciação preferencial para o perfil Th1 nesse grupo. Classicamente é sabido que esses fatores induzem a diferenciação para Th1 e, como mostrado em modelo murino, *t-bet* é crítico nesse processo. A ausência de *t-bet* leva a uma desregulação da resposta imune de mucosa com diferenças substanciais na produção de citocinas inflamatórias (Szabo et al., 2000; Neurath et al., 2002; Agnello et al., 2003). Em estudo com pacientes de hanseníase, Quiroga e colaboradores demonstraram por western blot que *t-bet* estava presente em PBMC de pacientes tuberculóides e se correlacionava com a produção de IFN- γ no sobrenadante de culturas estimuladas com *M. leprae*, ao contrário de pacientes lepromatosos, onde a expressão de *t-bet* não foi observada, não sendo detectada também produção de IFN- γ (Quiroga et al., 2004). No entanto, os autores não quantificaram *t-bet* e nem identificaram as células responsáveis pela produção de IFN- γ .

Ainda em nosso trabalho, na forma BL não reacional observamos maior expressão de *gata3* e *foxp3* compatíveis com diferenciação para Th2 e/ou para Treg respectivamente. Entretanto, a expressão tanto de *stat6* quanto de *stat3* foi baixa nesse grupo. Já foi sugerido que a relação *t-bet:gata3* possa refletir o balanço das respostas Th1:Th2 e quanto mais baixa essa relação, maior seria a diferenciação

para o fenótipo Th2 (Chakir et al., 2003). Com efeito, esta relação foi muito baixa quando se avaliou a expressão de *t-bet* e *gata3* em pacientes com tuberculose ativa e os dados coincidiram com a expressão de altos níveis de mRNA de IL-4. Os autores sugeriram que seja possível usá esta relação para discriminar casos de tuberculose latente da ativa (Roberts et al., 2007).

Em nosso estudo, essa relação mostrou-se bastante diminuída no grupo BL, sendo <1 (0,83; dados não mostrados) e confirmou trabalhos anteriores mostrando que citocinas com perfil Th2 são preferencialmente produzidas por células de pacientes lepromatosos. Foi sugerido que essas células poderiam inibir respostas Th1 (Sieling et al., 1993; Misra et al., 1995). Durante algum tempo achou-se que esta seria a função principal de linfócitos T supressores com fenótipo CD8+. Com a descoberta do fator de transcrição *foxp3* e a diferenciação de linfócitos T reguladores, o fenótipo supressor caiu por terra (Bloom et al., 1992; Shevach, 2000).

Mais recentemente, alguns trabalhos demonstraram a participação de linfócitos Treg, naturais e induzidos por estímulo antigênico, tanto em lesão cutânea quanto na circulação de pacientes lepromatosos na inibição de respostas Th1. Em associação com a produção de IL-10, os autores sugerem que essas células sejam cruciais na manutenção da hiporresponsividade observada no polo lepromatoso da doença (Palermo et al., 2012; Kumar et al., 2014). Adicionalmente, em um dos trabalhos, foi demonstrado que células T CD4⁺/CD25⁺/foxp3⁺ produtoras de TGF-β de pacientes LL inibem o desenvolvimento e a expansão de linfócitos T CD8⁺ de memória (Saini et al., 2014).

Com base em estudos anteriores que apontam para a participação de linfócitos T de memória na imunopatologia e/ou na imunidade a infecção por patógeno intracelular (Wang et al., 2010; Khamesipour et al., 2012; Yamane e Paul,

2012), estendemos nosso estudo para a identificação de células T CD4⁺ e CD8⁺ efetoras (T_{EF}), de memória central (T_{CM}) e de memória efetora (T_{EM}) em pacientes BL com RR. As amostras de sangue foram obtidas imediatamente na abertura do episódio reacional para confirmar se os linfócitos T estavam precocemente ativados *in vivo*. De fato, a expressão de CD69 é ideal para detectar linfócitos T recém-ativados no sangue e para a identificação de células de memória as moléculas de superfície CD45, antígeno leucocitário comum e ainda o receptor de *homing* da quimiocina CCR7 são marcadores fenotípicos confiáveis e ambos são expressos na superfície dos linfócitos T_{NAÏVE}. Nossa observação de que a frequência *ex vivo* (Tempo 0) de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ naíve se encontrava significativamente diminuída no grupo com RR em comparação ao grupo de pacientes BL e ao grupo de indivíduos sadios de área endêmica para a hanseníase, não foi uma surpresa. Embora admita-se que células T_{NAÏVE} não sejam tão sensíveis à ativação como células de memória, que são capazes de montar uma resposta antígeno-específica mais rapidamente, o recrutamento dessas células e sua expansão, costuma ser eficiente durante episódios imunoinflamatórios como a RR, sugerindo um papel crítico para essas células na indução de outras subpopulações (Berard e Tough, 2002). Entretanto, a favor da nossa hipótese de uma ativação intravascular na RR, os linfócitos T que estavam ativados eram os efetores e os de memória. Não é possível excluir formalmente uma modulação negativa das moléculas expressas nas membranas celulares, que deveriam ser reconhecidas pelos anticorpos monoclonais específicos; ou ainda, modificações conformacionais nos antígenos de membrana, seguindo-se à ativação das células em questão. Qualquer dessas hipóteses tornaria os receptores inacessíveis aos anticorpos monoclonais utilizados para a identificação das células.

Dando prosseguimento ao nosso estudo *ex vivo*, observamos que na abertura da RR a frequência das outras subpopulações de células T CD4⁺ e CD8⁺ estavam significativamente mais ativadas em comparação com o grupo BL e com o grupo HS. O destaque foi para a frequência de T_{EM}, com altas frequências nas CD4⁺ e nas CD8⁺. As células T_{EM} requerem um contínuo estímulo antígeno-específico para sua manutenção, sendo possível que na RR a intensa morte e fragmentação bacilar permitam que diferentes antígenos do *M. leprae* circulem e ativem essas células. Além disso, apesar de pouca capacidade proliferativa, essas células são grandes produtoras de IFN- γ , citocina predominante na RR. Trabalho com modelo experimental de infecção aguda na pele com vírus do herpes simplex demonstrou que linfócitos T_{EM} são ativados e, mesmo após a retirada do estímulo antigênico, essas células podem residir permanentemente nos tecidos periféricos (Gebhardt et al., 2009).

Em trabalho recente de pesquisadores do nosso grupo, foi observada frequência aumentada de linfócitos T_{EM} CD8⁺ produtores de perforina e granzima B em pacientes coinfetados com hanseníase e HIV que apresentaram episódios de RR. Os autores atribuíram a essas células um papel central na gênese e na gravidade da RR observada nos pacientes (de Oliveira et al., 2013).

Ao procedermos ao estudo *in vitro* com as PBMC estimuladas com *M. leprae*, o perfil de ativação das subpopulações previamente observado no grupo RR não sofreu alterações significativas. De um modo geral, como observado nas culturas não estimuladas, a frequência dos linfócitos T encontravam-se altas no grupo RR. Quando estimulamos com o antígeno do *M. leprae*, essas frequências não se alteraram de forma significativa, com exceção da subpopulação T_{CM} CD8⁺. Mais uma vez, esses resultados estão de acordo com achados do trabalho de nosso

grupo, cujas células CD8+ de memória de pacientes coinfectados com hanseníase e HIV sob RR foram responsivas não só ao *M. leprae*, mas também, embora de forma menos intensa, a um peptídeo ML-específico, derivado de uma proteína exclusiva do patógeno e reconhecido por células MHC de classe I (de Oliveira et al., 2013).

Já foi demonstrado que o *M. leprae* não é um forte indutor da resposta imune inata, inibindo a maturação de DC, tornando-as parcialmente ativadas. Experimentos *in vitro* mostraram que somente a adição de grandes quantidades do bacilo em cultura leva as DC a expressarem os antígenos de ativação CD83 e CD86, além de produzirem IL-10 e TNF (Hashimoto et al., 2002). Uma possibilidade é que a estimulação de PBMC com o bacilo tenha modulado negativamente a função das APC e, mesmo em um estado de reativação imunológica como a RR, houve prejuízos na ativação e expansão das subpopulações analisadas.

Quando analisamos a resposta proliferativa por meio de marcação com CFSE e citometria de fluxo, mais uma vez observamos que o limiar de ativação das PBMC não estimuladas do grupo de pacientes com RR já se encontrava aumentado. Nas culturas não estimuladas o percentual de proliferação dos linfócitos T pouco diferiu das culturas estimuladas com *M. leprae*. A resposta foi significativa em indivíduos saudáveis de área endêmica, cuja proliferação foi induzida pelo patógeno quando comparado aos pontos sem estímulo, cujo *background* foi baixo, resultados similares nas duas populações linfocitárias estudadas. Mais uma vez, detectamos que, além de ativadas, as células T de pacientes BL apresentando a RR encontravam-se proliferando *ex vivo*, possivelmente em resposta aos antígenos micobacterianos. Em trabalho recente, Saini e colaboradores também observaram níveis elevados de resposta proliferativa em pacientes com RR, entretanto, a média das PBMC não estimuladas apresentava nível basal mínimo. Como já citado, um aspecto que

impossibilita a comparação deste estudo com o nosso consistiu na população estudada. No estudo foram incluídos além de pacientes BL, pacientes LL com RR (Saini et al., 2013). Este fato pode ter contribuído para diminuir o limiar de proliferação *ex vivo*, vez que pacientes LL mesmo em RR, mantem-se hiporresponsivos ao bacilo, quanto à capacidade de resposta proliferativa (Esquenazi, D; comunicação pessoal).

Para a verificação mais completa da atividade funcional das subpopulações de linfócitos T, fizemos a caracterização da frequência de linfócitos T produtores de IFN- γ , TNF e IL-10, as duas primeiras sabidamente importantes na ativação da reativação imune da hanseníase e, a IL-10 correlacionada com a patogênese da doença. No grupo RR a frequência de T_{NAÏVE} produtoras das três citocinas sem estímulo antigênico, confirmou nossos dados de um estado de reativação/regulação imunológica na circulação dos pacientes e, sob estímulo antigênico, a frequência das células produtoras dessas citocinas foram inibidas. O aumento na frequência de células produtoras de IFN- γ na RR foi consistente com estudos prévios, apesar do fato de que esses trabalhos identificaram apenas a produção sérica ou em sobrenadantes de cultura da citocina (Verhagen et al., 1997; Moraes et al., 1999).

Curiosamente, o grupo RR apresentou um percentual significativo de linfócitos T produtores de IL-10. Levando-se em consideração que a IL-10 tem uma ação marcante na regulação negativa da resposta inflamatória, inibindo respostas do tipo Th1, esse resultado nos surpreendeu. A IL-10 é produzida por diversas subpopulações de linfócitos T e não está sujeita à regulação epigenética que ocorre com o IFN- γ (Dong et al., 2007). Em modelo murino, já foi demonstrado que camundongos geneticamente deficientes para IL-10 sofrem enterocolite grave (Kuhn et al., 1993). Em outro estudo experimental, a expressão muito aumentada desta

citocina leva a modulação negativa de linfócitos T, especialmente aqueles com perfil Th1 (Ding et al., 2003). Em trabalho com camundongos KO para RAG infectados com *Leishmania major*, foi demonstrado que células CD4⁺/CD25⁻/FoxP3⁻ produzem IL-10 mediando supressão da resposta imune na leishmaniose experimental. Foi interessante notar que essas células eram Th1⁺ (Anderson et al., 2007). Em outro trabalho com modelo experimental murino de infecção por *Toxoplasma gondii*, linfócitos T CD4⁺ aparecem como críticos para a regulação da resposta, induzindo a resolução do processo inflamatório e a sobrevivência dos animais. Essas células eram produtoras de IFN- γ e IL-10 simultaneamente. Interessante ainda foi observar que a IL-10 era produzida somente após reestímulo antigênico e, quando da sua retirada, as células deixaram de produzir a citocina (Jankovik et al., 2007). Em conjunto com os dados acima, nossos achados nos levam a formular a hipótese que os linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-10 possam estar produzindo simultaneamente IFN- γ e serem críticos na regulação das respostas dos pacientes reacionais.

Observamos também frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de TNF no grupo RR, ainda que a frequência delas tenha sido maior no grupo de pacientes BL, tanto naquelas não estimuladas, quanto nas estimuladas com *M. leprae*. Uma possibilidade não explorada nesse estudo é que essas células sejam linfócitos T $\gamma\delta$ ⁺. Em trabalho anterior do nosso grupo evidenciamos aumento na expressão de células T $\gamma\delta$ ⁺ em pacientes com reação do tipo II severa e níveis aumentados de TNF na circulação (Esquenazi et al., 2008).

Nossos dados também mostraram que, embora a frequência das células T_{NAÏVE} tenha sido menor nas PBMC do grupo RR logo após a abertura do quadro reacional, o IFN- γ foi a principal citocina produzida por essas células e pode ter influenciado o aumento da expressão do fenótipo de memória que encontramos no

grupo RR. Entretanto, um tema emergente nos dias atuais é a verificação de que níveis mais elevados de inflamação e resposta antígeno-específica favoreça a geração de T_{EF} de curta duração, e não de células de memória como se esperaria (Obar et al., 2011).

É de se esperar que esses resultados, ganhem importância em doenças infecciosas de curso crônico, onde a persistência antigênica se mantém. Populações heterogêneas de células de memória podem se formar e disfunções metabólicas, podem ocorrer. Já foi demonstrado que a capacidade respiratória de mitocôndrias é uma das etapas críticas para a diferenciação de células de memória (van der Windt et al., 2012).

Por fim, observamos que em pacientes com RR a expressão de *t-bet* se correlacionava positivamente com a frequência de linfócitos T CD3⁺ produtores de IFN- γ . Numa análise preliminar, o perfil da resposta imune observada em nossos pacientes com RR é Th1. De fato, denominado regulador-mestre da diferenciação de células com perfil Th1, *t-bet* induz uma alça de amplificação positiva que fortalece a transcrição de IFN- γ (Hwang et al., 2005). A correlação positiva de *t-bet* com a frequência de linfócitos T CD3⁺/TNF⁺ reforça nossa hipótese com relação à participação do fenótipo Th1 na RR. Embora não tenhamos conseguido correlacionar positivamente os genes envolvidos com a diferenciação de linfócitos T CD3⁺ produtores de IL-10, é possível que, com o aumento do número de amostras, os valores por nós encontrados tornem a correlação positiva. Afinal, mudanças funcionais em linfócitos Treg vêm sendo a cada dia mais associadas com agudização de doenças crônicas, como a hanseníase.

Nossos pacientes BL do grupo com RR apresentavam média de idade significativamente maior do que os pacientes não reacionais. Este dado está em

oposição a um dos fatores de risco para o desenvolvimento de RR, que é a idade mais baixa (Rose et al., 1975). Além disso, condições de estresse também foram elencadas como fator de risco para o aparecimento da RR. Bem recentemente, um interessante artigo mostrou que níveis urinários e na lesão de pele de cortisol estão aumentados em pacientes com RR. Os autores associaram esse achado com aumento sérico de IP-10, IL-17F, IL-6 e TNF (Chaitanya et al., 2013).

Nossos resultados fazem levantar a hipótese que a RR em pacientes BL seja desencadeada por linfócitos T efetores e de memória, preferencialmente os CD8⁺/TNF⁺ precocemente ativados na circulação por componentes do *M. leprae* fragmentados pela PQT e/ou por mecanismos de resposta imunoinflamatória. Essas células podem migrar rapidamente para as lesões de pele e para os troncos nervosos, causando a sintomatologia do episódio reacional. Além disso, é possível que, mesmo em menor número como observamos, células T_{NAÏVE} ativadas possam também migrar para a pele, atraídas por fatores quimiotáticos da inflamação e, localmente, secretarem IFN- γ . As células T_{EF} CD4⁺ produtoras de IL-10 atuariam então na regulação das respostas Th1 nas lesões.

VIII- Conclusões

- Na abertura da RR em pacientes BL, os fatores de transcrição *stat4* e *t-bet* são preferencialmente expressos *in vivo*, indicando diferenciação para o perfil Th1 ainda na circulação.
- A diminuição *ex vivo* na frequência de linfócitos T_{NAÏVE} no grupo RR e a prevalência nesses pacientes de células T_{EF} e de memória previamente ativadas, confirmam nossa hipótese de uma ativação intravascular na abertura da reação.
- As mesmas observações e conclusões podem ser aplicadas no que concerne à resposta proliferativa, vez que linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ do grupo RR proliferam *in vitro* CD4⁺ e CD8⁺ espontaneamente e em resposta ao *M. leprae*.
- Na RR, células produtoras de IFN- γ foram observadas em todas as subpopulações de linfócitos T estudadas *in vitro*, incluindo T_{NAÏVE}, embora essas células estivessem em menor frequência. IFN- γ pode ser a citocina fundamentalmente produzida na abertura da RR.
- No grupo RR também foram detectadas frequências aumentadas de células T_{EF}, T_{CM} e T_{EM} CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de TNF. Além disso, nas mesmas condições, observamos frequência significativa de células T_{EF} produtoras de IL-10 no grupo RR. Pelos dados já discutidos, essas citocinas, em conjunto com o IFN- γ , parecem ser críticas na imunopatologia da RR.

VIII - Referências bibliográficas

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

Abel L, Sánchez FO, Oberti J, Thuc NV, Hoa LV, Lap VD, et al. Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene. *J Infect Dis.* 1998;177(1):133-45.

Agnello D, Lankford CS, Bream J, et al. Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J Clin Immunol* 2003; 23:147–61.

Alter A, Alcaïs A, Abel L, Schurr E. Leprosy as genetic model for susceptibility to common infectious diseases. *Hum Genet.* 2008;123(3):227-35.

Anderson CF, Oukka M, Kuchroo VJ, Sacks D. CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med.* 2007;204(2):285-97.

Barnes PF, Abrams JS, Lu S, Sieling PA, Rea TH, Modlin RL. Patterns of cytokine production by mycobacterium-reactive human T-cell clones. *Infect. Immun.* 1993;61(1):197-203.

Bloom BR, Modlin RL, Salgame P. Stigma variations: observations on suppressor T cells and leprosy. *Annu Rev Immunol* 1992;10:453-88.

Berard M, Tough DF. Qualitative differences between naïve and memory T cells. *Immunology*,2002; 2:127–38.

Boldt AB, Sanchez MI, Stahlke ER, Steffensen R, Thiel S, Jensenius JC, et al. Susceptibility to leprosy is associated with M-ficolin polymorphisms. *J Clin Immunol.* 2013;33(1):210-9.

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

Casanova JL, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol* 2002;20:581-620.

Chaitanya VS, Lavania M, Nigam A, Turankar RP, Singh I, Horo I, Sengupta U, Jadhav RS. Cortisol and proinflammatory cytokine profiles in type 1 (reversal) reactions of leprosy. *Immunol Lett.* 2013;156(1-2):159-67.

Chaitanya VS, Lavania M, Nigam A, Turankar RP, Singh I, Horo I, Sengupta U, Jadhav RS. Cortisol and proinflammatory cytokine profiles in type 1 (reversal) reactions of leprosy. *Immunol Lett.* 2013;156(1-2):159-67.

Chakir H, Wang H, Lefebvre DE, Webb J, Scott FW. T-bet/GATA-3 ratio as a measure of the Th1/Th2 cytokine profile in mixed cell populations: predominant role of GATA-3. *J Immunol Methods.* 2003;278:157–69.

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

Cole ST, Supply P, Honoré N. Repetitive sequences in *Mycobacterium leprae* and their impact on genome plasticity. *Lepr Rev.* 2001;72(4):449-461.

Cunha SS, Rodrigues LC, Pedrosa A, Dourado IM, Barreto ML, Pereira SM. Neonatal BCG protection against leprosy: a study in Manaus, Brazilian Amazon. *Leprosy Rev,* 2004;75: 357-66.

de Mattos KA, Sarno EN, Pessolani MC, Bozza PT. Deciphering the contribution of lipid droplets in leprosy: multifunctional organelles with roles in *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107 Suppl1:156-66.

de Oliveira AL, Amadeu TP, de França Gomes AC, Menezes VM, da Costa Nery JA, Pinheiro RO, Sarno EN. Role of CD8(+) T cells in triggering reversal reaction in HIV/leprosy patients. *Immunology.* 2013;140(1):47-60.

de Souza Sales J, Lara FA, Amadeu TP, de Oliveira Fulco T, da Costa Nery JA,

Sampaio EP, Pinheiro RO, Sarno EN. The role of indoleamine 2, 3-dioxygenase in lepromatous leprosy immunosuppression. *Clin Exp Immunol.* 2011;165(2):251-63.

De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med.* 1991;174(5):1209-20.

Düppre NC, Camacho LA, da Cunha SS, Struchiner CJ, Sales AM, Nery JA, Sarno EN. Effectiveness of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008;102(7):631-8.

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.

Fabri M, Stenger S, Shin DM, Yuk JM, Liu PT, Realegeno S, Lee HM, Krutzik SR, Schenk M, Sieling PA, Teles R, Montoya D, Iyer SS, Bruns H, Lewinsohn DM, Hollis BW, Hewison M, Adams JS, Steinmeyer A, Zügel U, Cheng G, Jo EK, Bloom BR, Modlin RL. Vitamin D is required for IFN-gamma-mediated antimicrobial activity of human macrophages. *Sci Transl Med.* 2011; 3(104):104ra102.

Ferreira FR, Goulart LR, Silva HD, Goulart IM. Susceptibility to leprosy may be conditioned by an interaction between the NRAMP1 promoter polymorphisms and the lepromin response. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2004;72(4):457-67.

Fitness J, Floyd S, Warndorff DK, Sichali L, Mwaungulu L, Crampin AC, et al. Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;71(3):330-40.

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

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

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

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

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

Gebhardt T, Whitney PG, Zaid A, Mackay LK, Brooks AG, Heath WR, Carbone FR, Mueller SN. Different patterns of peripheral migration by memory CD4+ and CD8+ T cells. *Nature*. 2011;477(7363):216-9.

Geluk A. Biomarkers for Leprosy: would you prefer T (cells)? *Lepr Rev*. 2013;84,3–12.

Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo M G. CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997;389,737–742.

Hashimoto K, Maeda Y, Kimura H, Suzuki K, Masuda A, Matsuoka M, Makino M. *Mycobacterium leprae* infection in monocyte-derived dendritic cells and its influence on antigen-presenting function. *Infect Immun*. 2002;70(9):5167-76.

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

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

Jankovic D, Kullberg MC, Feng CG, Goldszmid RS, Collazo CM, Wilson M, Wynn TA, Kamanaka M, Flavell RA, Sher A. Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J Exp Med.* 2007;204(2):273-83.

Ji BH. Drug resistance in leprosy: a review. *Lepr Rev.* 1985,56(4):265-78.

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

Kang TJ, Chae GT. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2001;31(1):53-8.

Kaplan G, Mathur NK, Job CK, Nath I, Cohn ZA. Effect of multiple interferon gamma injections on the disposal of *Mycobacterium leprae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1989;86(20):8073-7.

Khamesipour A, Nateghi Rostami M, Tasbihi M, Miramin Mohammadi A, Shahrestani T, Sarrafnejad A, Sohrabi Y, Eskandari SE, Keshavarz Valian H. Phenotyping of circulating CD8⁺ T cell subsets in human cutaneous leishmaniasis. *Microbes Infect.* 2012;14(9):702-11.

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

Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat. Med.* 2003;9(5):525-32.

Kumar S, Naqvi RA, Ali R, Rani R, Khanna N, Rao DN. FoxP3 provides competitive fitness to CD4(+) CD25(+) T cells in leprosy patients via transcriptional regulation. *Eur J Immunol.* 2014;44(2):431-9.

Li L, Qiao D, Zhang X, Liu Z, Wu C. The immune responses of central and effector memory BCG-specific CD4+ T cells in BCG-vaccinated PPD+ donors were modulated by Treg cells. *Immunobiology* 2011;4:477–84.

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

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

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

Manandhar R, Shrestha N, Butlin CR, Roche PW. High levels of inflammatory cytokines are associated with poor clinical response to steroid treatment and recurrent episodes of type 1 reactions in leprosy. *Clin Exp Immunol*,2002; 128:333–38.

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

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):636-40.

Mira MT. Genetic host resistance and susceptibility to leprosy. *Microbes Infect* 2006;8(4):1124-31.

Misra N, Murtaza A, Walker B, Narayan NP, Misra RS, et al. Cytokine profile of circulating T cells of leprosy patients reflects both indiscriminate and polarized T-helper subsets: T-helper phenotype is stable and uninfluenced by related antigens of *Mycobacterium leprae*. *Immunology* 1995;86:97–103.

Modlin RL, Melancon-Kaplan J, Young SMM, Pirmez C, Kino H, Convit J, Rea TH, Bloom BR. Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. *Proc. Nat. Acad. Sciences USA* 1988;85:1213-7.

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, Rasolofoa V, Brennan PJ, Cole ST. On the origin of leprosy. *Science*. 2005;13;308(5724):1040-2.

Moraes MO, Sarno EN, Almeida AS, Saraiva BC, Nery JA, Martins RC, Sampaio EP. 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.

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.

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

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

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

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

Nery JA, Bernardes Filho F, Quintanilha J, Machado AM, Oliveira Sde S, Sales AM. Understanding the type 1 reactional state for early diagnosis and treatment: a way to

avoid disability in leprosy. *An Bras Dermatol.* 2013;88(5):787-92.

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.

Neurath, M. F., B. Weigmann, S. Finotto, J. Glickman, E. Nieuwenhuis, H. Iijima, A. Mizoguchi, E. Mizoguchi, J. Mudter, P. B. Galle. The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J. Exp. Med.* 2002;95:1129-43.

Obar JJ, Jellison ER, Sheridan BS, Blair DA, Pham Q-M, et al. Pathogen-induced inflammatory environment controls effector and memory CD8+ T cell differentiation. *J. Immunol.* 2011;187:4967-78.

Ochoa MT, Stenger S, Sieling PA, Thoma-Uszynski S, Sabet S, Cho S, et al. T-cell release of granulysin contributes to host defense in leprosy. *Nat. Med.* 2001;7(2):174-9.

Orlova M, Cobat A, Huong NT, Ba NN, Van Thuc N, Spencer J, Nédélec Y, Barreiro L, Thai VH, Abel L, Alcaïs A, Schurr E. Gene set signature of reversal reaction type I in leprosy patients. *PLoS Genet.* 2013;9(7):e1003624.

Ottenhoff THM. Immunology of leprosy: lessons from and for leprosy. *Internat J Lep.* 1994;62:108-21.

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.

Pedersen J, Coskun M, Soendergaard C, Salem M, Nielsen OH. Inflammatory pathways of importance for management of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20(1):64-77.

Petruccioli E, Petrone L, Vanini V, Sampaolesi A, Gualano G, Girardi E, Palmieri F, Goletti D. IFN γ /TNF α specific-cells and effector memory phenotype associate with active tuberculosis. *J Infect.* 2013;66(6):475-86.

Pönnighaus JM, Fine PE, Sterne JÁ, Bliss L, Wilson RJ, Malema SS, et al. Incidence rates of leprosy in Karonga District, northern Malawi: patterns by age, sex, BCG status and classification. *Int J Lepr Mycobact.* 1994;62(1):10-23.

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

Quiroga MF, Martínez GJ, Pasquinelli V, Costas MA, Bracco MM, Malbrán A, Olivares LM, Sieling PA, García VE. Activation of signaling lymphocytic activation molecule triggers a signaling cascade that enhances Th1 responses in human intracellular infection. *J Immunol.* 2004;173(6):4120-9.

Rambukkana A. How does *Mycobacterium leprae* target the peripheral nervous system? *Trends Microbiol.* 2000;8(1):23-8.

Rea TH, Modlin RL. IL-18 promotes type 1 cytokine production from NK cells and T cells in human intracellular infection. *J Immunol.* 1999;162(10):6114-21.

Rees RJW. The microbiology of leprosy; in *Leprosy* (ed.) R C Hastings (London: Churchill Livingstone) pp 31-52. 1985.

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

Roberts T, Beyers N, Aguirre A, Walzl G. Immunosuppression during active tuberculosis is characterized by decreased interferon- gamma production and CD25 expression with elevated forkhead box P3, transforming growth factor-beta, and interleukin-4 mRNA levels. *J Infect Dis.* 2007;195(6):870-8.

Roche PW, Theuvenet WJ, Britton WJ. Risk factors for type-1 reactions in borderline leprosy patients. *Lancet*. 1991;338:654-7.

Rodrigues LC, Lockwood DNJ. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. *Lancet Infect Dis*. 2011;11(6):464-70.

Rose P, McDougall C. Adverse reactions following pregnancy in patients with borderline leprosy. *Lepr Rev*. 1975;46:109-14.

Roy S, Frodsham A, Saha B, Hazra SK, Mascie-Taylor CG, Hill AV. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *J Infect Dis*. 1999;179(1):187-91.

Saini C, Prasad HK, Rani R, Murtaza A, Misra N, Shanker Narayan NP, Nath I. Lsr2 of Mycobacterium leprae and its synthetic peptides elicit restitution of T cell responses in erythema nodosum leprosum and reversal reactions in patients with lepromatous leprosy. *Clin Vaccine Immunol*. 2013;20(5):673-82.

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.

Sales AM, Ponce de Leon A, Düppre NC, Hacker MA, Nery JAC, Sarno EN, et al. Leprosy among patients contacts: a multilevel study of risk factors. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(3):e1013.

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

Sampaio EP, Sarno EN. Expression and cytokine secretion in the states of immune reactivation in leprosy. *Braz J Med Biol Res*. 1998;31(1):69-76.

Santos DO, Santos SL, Esquenazi D, Nery JA, Defruyt M, Lorré K, et al. Evaluation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) costimulatory molecules and dendritic cells on the

immune response in leprosy. *Jpn J Lepr.* 2001;70(1):15-24.

Sarno EN, 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.

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

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

Schenk M, Krutzik SR, Sieling PA, Lee DJ, Teles RM, Ochoa MT, Komisopoulou E, Sarno EN, Rea TH, Graeber TG, Kim S, Cheng G, Modlin RL. NOD2 triggers an interleukin-32-dependent human dendritic cell program in leprosy. *Nat Med.* 2012;18(4):555-63.

Schlesinger LS, Horwitz MA. Phagocytosis of *Mycobacterium leprae* by human monocyte derived macrophages is mediated by complement receptors CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18), and CR4 (CD11c/CD18) and IFN- γ activation inhibits complement receptor function and phagocytosis of this bacterium. *J Immunol.* 1991;147:1983-94.

Scollard DM, Adams LB, Gillis TB, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(2):338-81.

Setia MS, Steinmaus C, Ho CS, Rutherford GW. The role of BCG in prevention of leprosy: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2006;6:162-70.

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

Shevach, E.M., Tran, D.Q., Davidson, T.S., et al. The critical contribution of TGF-beta

to the induction of Foxp3 expression and regulatory T cell function. *Eur J Immunol.* 2008;38,915-7.

Sieling PA, Abrams JS, Yamamura M, Salgame P, Bloom BR, Rea TH, et al. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. *In vitro* modulation of T cell responses in leprosy. *J. Immunol.* 1993;150(12):5501-10.

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

Shevach EM. Suppressor T cells: Rebirth, function and homeostasis. *Curr Biol* 2000;10(15):572-5.

Silva CA, Danelishvili L, McNamara M, Berredo-Pinho M, Bildfell R, Biet F, Rodrigues LS, Oliveira AV, Bermudez LE, Pessolani MC. Interaction of *Mycobacterium leprae* with human airway epithelial cells: adherence, entry, survival, and identification of potential adhesins by surface proteome analysis. *Infect Immun.* 2013;81(7):2645-59.

Sinsimer D, Fallows D, Peixoto B, Krahenbuhl J, Kaplan G, Manca C. *Mycobacterium leprae* actively modulates the cytokine response in naive human monocytes. *Infect Immun.* 2010;78(1):293-300.

Spencer JS, Brennan PJ. The role of *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid-I (PGL-I) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. *Lepr Rev.* 2011;82(4):344-57.

Sreenivasan P, Misra RS, Wilfred D, Nath I. Lepromatous leprosy patients show T helper 1-like cytokine profile with differential expression of interleukin-10 during type 1 and 2 reactions. *Immunology.* 1998;95(4):529-36.

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

Szabo, S. J., S. T. Kim, G. L. Costa, X. Zhang, C. G. Fathman, L. H. Glimcher. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell.* 2000;100:655-669.

Talhari, Sinésio & Neves, René Garrido. Hanseníase. 3 ed. Manaus: Gráfica Tropical, 1997.

Teles RM, Graeber TG, Krutzik SR, et al. Type I interferon suppresses type II interferon-triggered human antimycobacterial responses. *Science*. 2013;339:1448-53.

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

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.

van der Windt GJW, Everts B, Chang C-H, Curtis JD, Freitas TC, et al. 2012. Mitochondrial respiratory capacity is a critical regulator of CD8+ T cell memory development. *Immunity*. 2012;36:68-78.

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;159:4474–83.

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

Wang X, Cao Z, Jiang J, et al. Association of mycobacterial antigen-specific CD4+ memory T cell subsets with outcome of pulmonary tuberculosis. *J Infect*. 2010;60:133–9.

WHO. Prevalence of leprosy, 2013. Endereço eletrônico: http://www.who.int/lep/situation/Leprosy_PR_2013.pdf. Acessado em 23/01/2013.

Yamamura M, Wang X-H, Ohmen JD, Uyemura TH, Bloom BR, Modlin RL. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. *J. Immunol.* 1992;149:1470-5.

Yamane H, Paul WE. Memory CD4+ T cells: fate determination, positive feedback and plasticity. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(10):1577-83.

Zhu, J., Guo, L., Watson, C.J., Hu-Li, J. & Paul, W.E. Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion. *J. Immunol.* 2001;166,7276–81.