

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical

Nathália Chebli de Abreu

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES *TOLL-LIKE* 1/2 E DE
MEDIADORES DA IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA EM
PACIENTES COM HANSENÍASE**

Belo Horizonte

2024

Nathália Chebli de Abreu

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES *TOLL-LIKE* 1/2 E DE
MEDIADORES DA IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA EM
PACIENTES COM HANSENÍASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa
Rocha

Coorientador: Prof. Dr. Daniel Menezes Souza

Belo Horizonte

2024

Abreu, Nathália Chebli de.
AB162a Avaliação da expressão dos Receptores TOLL-LIKE 1/2 e de mediadores da Imunidade Inata e adaptativa em pacientes com Hanseníase [recurso eletrônico]. / Nathália Chebli de Abreu. - - Belo Horizonte: 2024.
70f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Manoel Otávio da Costa Rocha.
Coorientador (a): Daniel Menezes Souza.
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Hanseníase. 2. Mycobacterium leprae. 3. Receptores Toll-Like. 4. Imunidade. 5. Citocinas. 6. Dissertação Acadêmica. I. Rocha, Manoel Otávio da Costa. II. Souza, Daniel Menezes. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WC 335

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos vinte e seis dias do mês de abril de dois mil e vinte e quatro (26/04/2024), às 14:00 (quatorze) horas, por videoconferência pela plataforma GOOGLE MEET (<https://meet.google.com/hbz-ywmq-rqs>), realizou-se a sessão pública para a 449ª defesa de dissertação de **NATHÁLIA CHEBLI DE ABREU**, número de registro 2022662436, graduada no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS DA SAÚDE. A presidência da sessão coube ao professor **MANOEL OTAVIO DA COSTA ROCHA**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **PROF. MANOEL OTAVIO DA COSTA ROCHA - ORIENTADOR (UFMG)**, **PROF. DANIEL MENEZES SOUZA - COORIENTADOR (UFMG)**, **DRA. ANA THEREZA CHAVES (UFMG)**, **PROF. BRUNO MENDES ROATT (UFOP)**. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: **"Avaliação da expressão dos receptores Toll-like 1/2 e de mediadores da imunidade inata e adaptativa em pacientes com hanseníase"**. Seguiu-se a arguição pela Comissão Examinadora, com a respectiva defesa da aluna. Logo após, a Comissão reuniu-se sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado da dissertação e considerou-a **APROVADA**, condicionado ao cumprimento das modificações determinadas pela banca examinadora, sendo estabelecido o prazo de 30 (trinta) dias para entrega do manuscrito, com as correções, e de 90 (noventa) dias para entrega do trabalho final. As modificações deverão ser entregues ao professor responsável, que deverá atestar se as demandas foram ou não foram cumpridas. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata e ao público, pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão, sendo lavrada a presente ata que, depois de lida e aprovada, foi assinada eletronicamente por todos os membros titulares da Comissão Examinadora presente através do SEI (Sistema Eletrônico de Informações) do Governo Federal.

Belo Horizonte, 26 de abril de 2024.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Ana Thereza Chaves Lages, Usuário Externo**, em 29/04/2024, às 11:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Mendes Roatt, Usuário Externo**, em 29/04/2024, às 12:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Manoel Otavio da Costa Rocha, Professor do Magistério Superior**, em 29/04/2024, às 17:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Menezes Souza, Professor Ensino Básico Técnico Tecnológico**, em 09/05/2024, às 09:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3202751** e o código CRC **F7AF8A2F**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

ATESTADO

"AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES TOLL-LIKE 1/2 E DE MEDIADORES DA IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA EM PACIENTES COM HANSENÍASE"

NATHÁLIA CHEBLI DE ABREU

A Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Infectologia e Medicina Tropical da Universidade Federal de Minas Gerais, assim constituída: **PROF. MANOEL OTAVIO DA COSTA ROCHA - ORIENTADOR (UFMG)**, **PROF. DANIEL MENEZES SOUZA - COORIENTADOR (UFMG)**, **DRA. ANA THEREZA CHAVES (UFMG)**, **PROF. BRUNO MENDES ROATT (UFOP)**, atesta que as modificações exigidas na dissertação de **NATHÁLIA CHEBLI DE ABREU**, número de registro 2022662436, defendida no dia 26 de abril de 2024, por videoconferência pela plataforma GOOGLE MEET, foram integralmente cumpridas.

PROF. MANOEL OTAVIO DA COSTA ROCHA - Orientador
UFMG

PROF. DANIEL MENEZES SOUZA - Coorientador
UFMG

DRA. ANA THEREZA CHAVES
UFMG

PROF. BRUNO MENDES ROATT
UFOP

Belo Horizonte, 23 de outubro de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Ana Thereza Chaves Lages, Usuário Externo**, em 23/10/2024, às 10:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Manoel Otavio da Costa Rocha, Professor do Magistério Superior**, em 23/10/2024, às 19:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Mendes Roatt, Usuário Externo**, em 24/10/2024, às 09:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Menezes Souza, Professor Ensino Básico Técnico Tecnológico**, em 24/10/2024, às 21:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3668082** e o código CRC **596EB18D**.

*“O homem que queria um barco insiste:
mas quero encontrar a ilha desconhecida,
quero saber quem sou quando nela estiver,
Não o sabes? Se não saís de ti,
não chegas a saber quem és”*

José Saramago. O Conto da Ilha Desconhecida

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação foi minha ilha desconhecida. E como todo navegante, só pude alcançá-la porque não estive sozinha.

Aos meus pais, José Célio e Cristiane, agradeço imensamente por serem os primeiros a me mostrar que o horizonte do conhecimento é vasto e sempre acolhedor. Sua dedicação e amor incondicional foram os ventos que impulsionaram minha jornada desde o início.

Ao Matheus, meu irmão, pela cumplicidade que não precisa de palavras. E ao Felipe, por ser a âncora que me lembrava, nos dias mais turbulentos, por que valia a pena seguir viagem.

Ao Professor Manoel Otávio, meu orientador, pela paciência de quem conhece o mar. Suas críticas foram os mapas que me impediram de perder o rumo.

Ao Professor Daniel, meu coorientador, por me mostrar que a ciência também se faz com improvisação – e que até nas marés mais difíceis há sempre um caminho.

À equipe do Departamento de Patologia Clínica da UFMG e ao Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos da Secretaria de Saúde do Paraná, pelos detalhes que fizeram a diferença. E à Dra. Sandra Lyon, cujo trabalho com hanseníase me mostrou que a medicina é, antes de tudo, um gesto de encontro.

Por fim, aos pacientes que compartilharam suas histórias: vocês são a razão desta viagem. Se este trabalho contribuir em algo, que seja para tornar a ilha menos desconhecida.

A todos, meu muito obrigada.

RESUMO

Introdução: A hanseníase, uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, continua sendo um desafio para a saúde pública devido à sua complexa patogênese e às variadas respostas imunológicas que determinam suas formas clínicas. **Objetivos:** Este estudo teve como objetivo investigar o papel dos marcadores intracelulares e de superfície em leucócitos, com ênfase nos *Toll-like receptors* (TLRs), na modulação da resposta imune e na polarização das formas clínicas da doença. **Métodos:** Utilizando amostras de sangue periférico de pacientes recentemente diagnosticados com hanseníase, categorizados em formas paucibacilares (PB) e multibacilares (MB), investigamos a expressão e a funcionalidade desses marcadores após a estimulação *in vitro* com antígeno solúvel de *M. leprae*. Os grupos experimentais incluíram pacientes com formas PB (n=17), MB (n=15) e controles saudáveis (n=31). Foram realizadas análises detalhadas por citometria de fluxo, avaliando marcadores de superfície em macrófagos derivados de monócitos (CD14, HLA-DR, TLR1, TLR2) e linfócitos (CD3, CD4, CD45RO), além da expressão de marcadores intracelulares em macrófagos derivados de monócitos (NF- κ B, IL-1 β , IL-12) e linfócitos (IFN- γ , IL-10). **Resultados:** Observou-se que pacientes MB apresentaram índice baciloscópico significativamente maior (25,2 vezes; $p < 0,0001$) que PB. Nos macrófagos CD14⁺HLA-DR⁺TLR1⁺TLR2⁺NF- κ B⁺, o grupo PB mostrou maior porcentagem de células produtoras de IL-12 (1,6x vs. controles, $p=0,0046$; 2,3x vs. MB, $p=0,0046$) e IL-1 β (1,6x vs. controles, $p=0,0147$; 1,9x vs. MB, $p=0,0192$), com padrão similar na IMF. Quanto aos linfócitos T CD4⁺CD45RO⁺, o grupo PB apresentou maior produção de IFN- γ (2,6x vs. MB, $p=0,0012$), enquanto os MB exibiram maior IL-10 (2,2x vs. PB, $p=0,0054$). A razão IFN- γ /IL-10 foi marcadamente maior nos PB tanto em porcentagem celular (28,5x, $p<0,05$) quanto em IMF (5,14x, $p<0,05$). **Conclusão:** Nossos resultados demonstram diferenças imunológicas significativas entre as formas PB e MB, com padrão T_{H1} predominante nos PB versus resposta regulatória nos MB, destacando o papel crítico dos TLRs e citocinas na polarização da hanseníase.

Palavras-chave: hanseníase, *Mycobacterium leprae*, *Toll-like receptors*, resposta imune inata, citocinas inflamatórias.

ABSTRACT

Introduction: Leprosy, a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*, remains a public health challenge due to its complex pathogenesis and the wide range of immune responses that determine its clinical forms. **Objectives:** This study aimed to investigate the role of intracellular and surface markers on leukocytes – particularly Toll-like receptors (TLRs) – in modulating the immune response and influencing clinical polarization of the disease. **Methods:** Peripheral blood samples were collected from newly diagnosed leprosy patients classified into paucibacillary (PB) and multibacillary (MB) forms. The expression and function of immune markers were evaluated after *in vitro* stimulation with soluble *M. leprae* antigen. Study groups included PB patients (n=17), MB patients (n=15), and healthy controls (n=31). Flow cytometry was used to assess surface markers on monocyte-derived macrophages (CD14, HLA-DR, TLR1, TLR2) and lymphocytes (CD3, CD4, CD45RO), as well as intracellular markers in macrophages (NF- κ B, IL-1 β , IL-12) and lymphocytes (IFN- γ , IL-10). **Results:** MB patients showed a significantly higher bacilloscopic index (25.2-fold increase; $p < 0.0001$) compared to PB patients. In CD14⁺HLA-DR⁺TLR1⁺TLR2⁺NF- κ B⁺ macrophages, the PB group had higher percentages of IL-12-producing cells (1.6-fold increase compared to controls, $p = 0.0046$; 2.3-fold increase compared to MB, $p = 0.0046$) and IL-1 β -producing cells (1.6-fold increase compared to controls, $p = 0.0147$; 1.9-fold increase compared to MB, $p = 0.0192$), with similar findings for IMF. In CD4⁺CD45RO⁺ T lymphocytes, the PB group showed higher IFN- γ production (2.6 times higher than MB, $p = 0.0012$), whereas IL-10 was higher in the MB group (2.2 times higher than PB, $p = 0.0054$). The IFN- γ /IL-10 ratio was substantially higher in PB patients, both in cell percentages (28.5-fold increase, $p < 0.05$) and IMF (5.14-fold increase, $p < 0.05$). **Conclusion:** Our findings demonstrate significant immunological differences between PB and MB forms, with a predominant T_H1 response in PB and a regulatory profile in MB, underscoring the critical role of TLRs and cytokines in leprosy polarization.

Keywords: leprosy, *Mycobacterium leprae*, Toll-like receptors, innate immune response, inflammatory cytokines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Número de casos novos de hanseníase no mundo em 2022. Fonte: Organização Mundial da Saúde (2023).....19

Figura 2. Taxa de detecção geral de casos novos de hanseníase por 100 mil habitantes segundo a região de residência no Brasil, de 2012 a 2021. Fonte: Sinan/SVS/MS e IBGE (2023)20

Figura 3. Resposta imune nas formas clínicas polares da hanseníase. a Na hanseníase tuberculoide (MHT), a resposta imune inata é ativada pelo *M. leprae* por meio dos TLR1/2. A IL-15 estimula o programa antimicrobiano dependente de vitamina D nos macrófagos, inibindo a fagocitose de micobactérias. Esses eventos promovem uma resposta de citocinas do tipo T_H1, que contém a infecção em granulomas bem formados, e uma resposta T_H17 que leva à inflamação e destruição tecidual, recrutamento de neutrófilos, ativação de macrófagos e intensificação das células efectoras T_H1. **b** Na hanseníase virchowiana (MHV), IL-4, IL-10, LILRA2 e fosfolipídios oxidados inibem as respostas de citocinas induzidas por TLR1/2, mas preservam a liberação de IL-10. Além disso, imunocomplexos desencadeiam a produção de IL-10 e aumentam a fagocitose do *M. leprae* e de lipoproteínas oxidadas de baixa densidade por meio dos receptores CD209 e CD163, sem ativar a via antimicrobiana dependente de vitamina D. Há também um aumento na síntese de receptores de LDL e na captação de colesterol endógeno, que se acumula intracelularmente. Isso induz um perfil imune T_H2 e T_{reg}, com produção de IL-4, IL-10 e anticorpos, ausência de granulomas e falha em conter o crescimento do *M. leprae*. Adaptado de Fonseca *et al.*, 2017.....31

Figura 4. Paradigma imunológico da resposta dos linfócitos T auxiliares (T_H) 1/ T_H2 nas formas polares da hanseníase. Adaptado de de Sousa *et al.*, 2017.....34

Figura 5. Análise representativa de macrófagos derivados de monócitos e linfócitos do sangue periférico na população de células avaliada por citometria de fluxo. A figura A representa a seleção de células isoladas (*singlets*). B representa a população de células vivas (Live/Dead⁻). A figura C representa o perfil celular da população de monócitos e linfócitos, selecionada na janela “*gate*” em gráfico de tamanho e granulosidade. A figura D representa o perfil de análise da população de macrófagos derivados de monócitos em gráfico de densidade de fluorescência para CD14⁺ (APC-Cy7). A figura E representa o perfil de análise da população de linfócitos em gráfico de densidade de fluorescência para CD3⁺ (FITC).....43

Figura 6. Análise do perfil fenotípico dos macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico após estimulação com antígeno de *M. leprae*. A representa SSC *versus* densidade de fluorescência para HLA-DR (AF700). B representa SSC *versus* densidade de fluorescência para TLR1⁺ (eFluor660). C representa SSC *versus* densidade de fluorescência para TLR2⁺ (FITC). D representa SSC *versus* densidade de fluorescência para NF-κB⁺ (PE-CY7). E e F representam as análises da expressão das citocinas IL-12 e IL-1β, respectivamente.....44

Figura 7. Análise do perfil fenotípico dos linfócitos do sangue periférico e suas subpopulações, por citometria de fluxo. **A** representa o perfil da subpopulação de linfócitos T CD4⁺. **B** representa o perfil da subpopulação de linfócitos T CD4⁺ em relação à expressão de CD45RO (PerCP-Cy5), selecionada no *gate* em gráfico de densidade de fluorescência para CD45RO *versus* densidade de fluorescência para CD4 (APC-Cy7). **C** e **D** representam o perfil de análise da expressão de IFN- γ e IL-10 pelas subpopulações de linfócitos T CD4⁺ do sangue periférico, respectivamente.....45

Figura 8. Análise do índice baciloscópico percentual em pacientes com hanseníase Paucibacilar (PB) e Multibacilar (MB). Os resultados estão apresentados como dados de dispersão com sobreposição de gráficos de barra (média+SD). Diferença estatística ($p < 0,05$) em comparação ao grupo PB está demonstrada no gráfico pela letra “a”47

Figura 9. Análise de macrófagos derivados de monócitos ativados, duplo positivos para TLR1/2 e produtores das citocinas IL-12 (CD14⁺HLA-DR⁺TLR1⁺TLR2⁺NF- κ B⁺IL-12⁺) e IL-1 β (CD14⁺HLA-DR⁺TLR1⁺TLR2⁺NF- κ B⁺IL-1 β ⁺), expressos em valores percentuais (A e C) e por intensidade média de fluorescência (IMF; B e D), após estímulo com antígeno de Mitsuda. Os resultados estão apresentados como dados de dispersão com sobreposição de gráficos de barra (média+SD). Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos CTL, PB e MB estão demonstradas nos gráficos pelas letras “a”, “b” e “c”, respectivamente.....49

Figura 10. Análise do percentual de linfócitos T CD4⁺ ativados e produtores de IFN- γ (A) e IL-10 (C) e da IMF para essas citocinas (B e D, respectivamente), após estímulo com antígeno de Mitsuda. Os resultados foram apresentados como dados de dispersão com sobreposição de gráficos de barra (média+SD). Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos CTL, PB e MB estão demonstradas nos gráficos pelas letras “a”, “b” e “c”, respectivamente.50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação e apresentação clínica da hanseníase. Adaptado de Maymone <i>et al.</i>, 2020.....	22
Tabela 2. Distribuição dos pacientes com hanseníase de acordo com as formas clínicas.....	38
Tabela 3. Marcadores utilizados para avaliação do perfil de monócitos e linfócitos.....	41
Tabela 4. Razão da produção de citocinas de subpopulação de linfócitos T CD4⁺.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

AP-1: proteína ativadora-1;
BAAR: bacilos álcool-ácido resistentes;
CMSPs: células mononucleares do sangue periférico;
ENH: eritema nodoso hansênico;
IB: índice baciloscópico;
IRF: fator regulador do interferon (*interferon-regulatory factor*);
MB: multibacilar;
MHD: hanseníase dimorfa;
MHDD: hanseníase dimorfa dimorfa;
MHDT: hanseníase dimorfa tuberculoide;
MHDV: hanseníase dimorfa virchowiana;
MHI: hanseníase indeterminada;
MHT: hanseníase tuberculoide;
MHV: hanseníase virchowiana;
NF- κ B: fator nuclear κ B;
OMS: Organização Mundial da Saúde;
PAMPs: Padrões Moleculares Associados a Patógenos;
PB: paucibacilar;
PGL-1: glicolipídio fenólico 1;
PRRs: Receptores de Reconhecimento de Padrões;
PQT: poliquimioterapia;
PQT-U: poliquimioterapia única;
RR: reação reversa;
TLRs: *Toll Like Receptors*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Aspectos epidemiológicos da hanseníase	19
2.2 Classificação clínica da hanseníase	21
2.3 Diagnóstico da hanseníase.....	22
2.4 Tratamento da hanseníase.....	24
2.5 Reações hansênicas.....	25
2.6 Aspectos imunológicos da hanseníase.....	26
2.6.1 Papel dos monócitos na hanseníase	27
2.6.2 Papel dos linfócitos na hanseníase.....	33
3 OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo geral	36
3.2 Objetivos específicos.....	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa, local de estudo e seleção dos pacientes	37
4.2 Cálculo amostral	38
4.3 Antígeno de <i>M. leprae</i> para ensaios de estimulação <i>in vitro</i>	39
4.4 Obtenção, cultura e estimulação de CMSPs.....	39
4.5 Avaliação do perfil de expressão de marcadores de superfície celular em macrófagos derivados de monócitos e linfócitos T CD4 ⁺ após ensaio de estimulação <i>in vitro</i>	40
4.6 Aquisição e estratégia de análise de dados	42
4.6.1 Estratégias de análise para a caracterização das populações de macrófagos derivados de monócitos e linfócitos.....	42
4.6.2 Estratégias de análise para a caracterização das populações de macrófagos derivados de monócitos TLR1 ⁺ /TLR2 ⁺	43
4.6.3 Estratégias de análise para a caracterização das subpopulações de linfócitos	44
4.7 Análise estatística	46
5 RESULTADOS	47
5.1 Pacientes multibacilares apresentam maior índice baciloscópico comparado aos paucibacilares	47
5.2 Pacientes paucibacilares apresentam aumento no percentual e na intensidade média de fluorescência de macrófagos derivados de monócitos ativados, duplo positivos para TLR1/2 (CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ TLR1 ⁺ TLR2 ⁺ NF-κB ⁺) e produtores das citocinas IL-12 e IL-1β, em comparação a pacientes multibacilares.....	48

5.3 Estimulação de linfócitos T CD4 ⁺ CD45RO ⁺ de pacientes multibacilares com antígeno de <i>M. leprae</i> induziu ao aumento da produção de IL-10 e à redução da produção de IFN- γ nessas células, em comparação a pacientes com hanseníase paucibacilar	49
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÃO.....	60
8 PERSPECTIVAS.....	61
9 ANEXOS.....	62
9.1 Anexo I: Aprovação do projeto pelo CEP/UFMG	62
9.2 Anexo II: Aprovação do projeto pelo CEP/FHEMIG	63
10 REFERÊNCIAS.....	64

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase, uma doença infecciosa crônica causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae*, persiste como um grande desafio para a saúde global, afetando milhares de indivíduos anualmente (WHO, 2023). Sua patogênese envolve a invasão de macrófagos dérmicos e células de Schwann dos nervos periféricos, resultando em ampla variedade de manifestações clínicas, que vão desde lesões cutâneas até o comprometimento dos nervos periféricos. Com uma evolução insidiosa, a hanseníase exerce um impacto substancial na qualidade de vida dos pacientes e pode levar a incapacidades físicas graves quando não diagnosticada e tratada precocemente (FROES; SOTTO; TRINDADE, 2022; MAYMONE; LAUGHTER; VENKATESH; DACSO *et al.*, 2020).

A transmissão de pessoa para pessoa, somada às complexidades associadas ao diagnóstico e tratamento eficazes, destacam a necessidade premente de aprofundar a compreensão dos mecanismos imunológicos subjacentes à hanseníase (CASSIRER-COSTA; MEDEIROS; CHAVES; LYON *et al.*, 2017). Nesse contexto, receptores do tipo *Toll* (TLRs) desempenham um papel crucial na ativação de vias imunológicas que podem influenciar a evolução clínica da doença. A hipótese é que variações na expressão e ativação desses receptores possam estar associadas às diferentes formas clínicas da hanseníase, fornecendo informações que possam contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

Diante disso, o presente estudo propõe-se a investigar a expressão de marcadores intracelulares e de superfície em leucócitos do sangue periférico de pacientes com hanseníase, com foco particular na resposta imune inata, por meio da análise de biomarcadores relacionados à ativação dos TLRs. A compreensão aprofundada dos mecanismos imunológicos envolvidos na patogênese da hanseníase é fundamental para avanços na prevenção, diagnóstico e tratamento da doença. Este estudo busca, portanto, expandir o conhecimento sobre os aspectos imunológicos da hanseníase, proporcionando uma base para futuras pesquisas que possam melhorar o manejo clínico dos pacientes, com ênfase nas respostas imunológicas diferenciadas entre os indivíduos acometidos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos epidemiológicos da hanseníase

A hanseníase continua a ser um desafio para a saúde pública global, com 174.087 novos casos registrados em 2022. Desse total, Brasil, Índia e Indonésia contribuíram com 78,1% dos casos mundiais, sendo que a Índia respondeu por 59,6% das notificações globais (Figura 1). Na região das Américas, foram registrados 21.398 casos, representando 12,3% do total mundial, dos quais 19.635 (11,3%) ocorreram no Brasil, consolidando o país como o segundo com maior número de casos do mundo, atrás apenas da Índia e à frente da Indonésia (WHO, 2023).

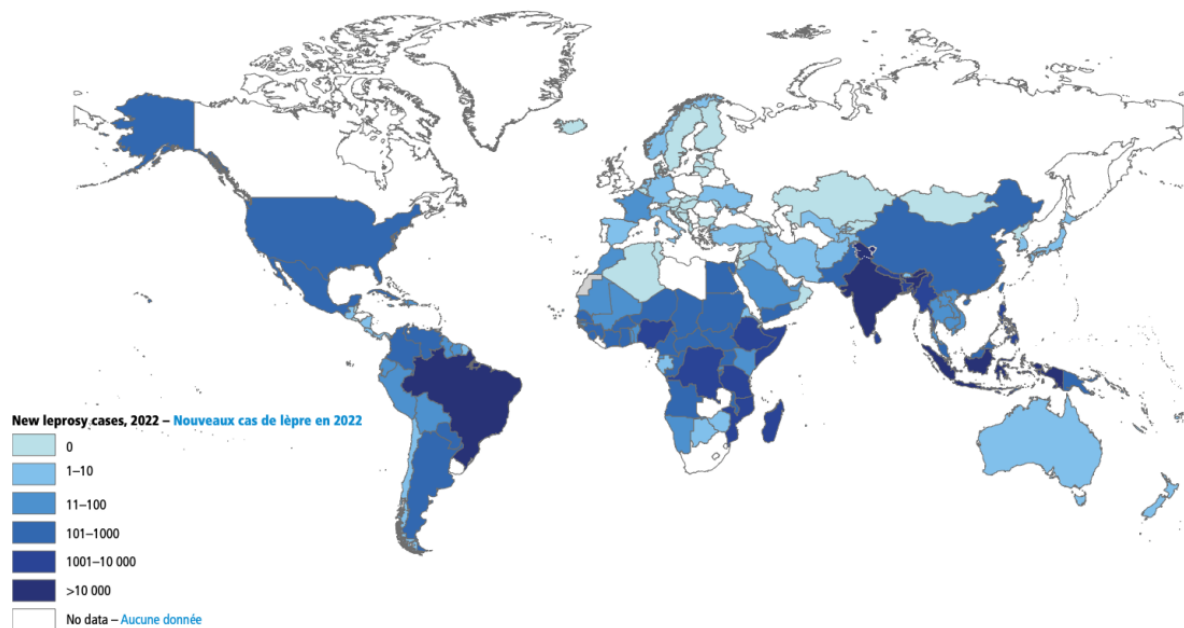


Figura 1. Número de casos novos de hanseníase no mundo em 2022. Fonte: Organização Mundial da Saúde (2023).

No contexto brasileiro, a hanseníase apresenta uma distribuição heterogênea, com maior incidência nas regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste (Figura 2). Em 2021, todos os estados brasileiros relataram novos casos, mas Mato Grosso destacou-se com a maior taxa de

detecção geral (58,76 casos por 100 mil habitantes). A capital Cuiabá registrou 22,45 casos por 100 mil habitantes, enquanto Tocantins apresentou a segunda maior taxa estadual (47,97 casos por 100 mil habitantes). A capital de Tocantins, Palmas, teve a maior taxa entre as capitais do país (79,78 casos por 100 mil habitantes). Em contraste, estados como o Rio Grande do Sul e sua capital apresentaram taxas de detecção significativamente mais baixas, evidenciando disparidades regionais (BRASIL, 2023).

Desde 2006, o Ministério da Saúde tem identificado áreas de alto risco, conhecidas como *clusters*, para a transmissão da hanseníase. Análises recentes revelaram dez *clusters* proeminentes, abrangendo 860 municípios e responsáveis por 24,4% dos novos casos. O primeiro *cluster*, identificado entre 2017 e 2020, inclui 41 municípios em Mato Grosso, sendo considerado a área de maior risco para a transmissão da doença (BRASIL, 2023).

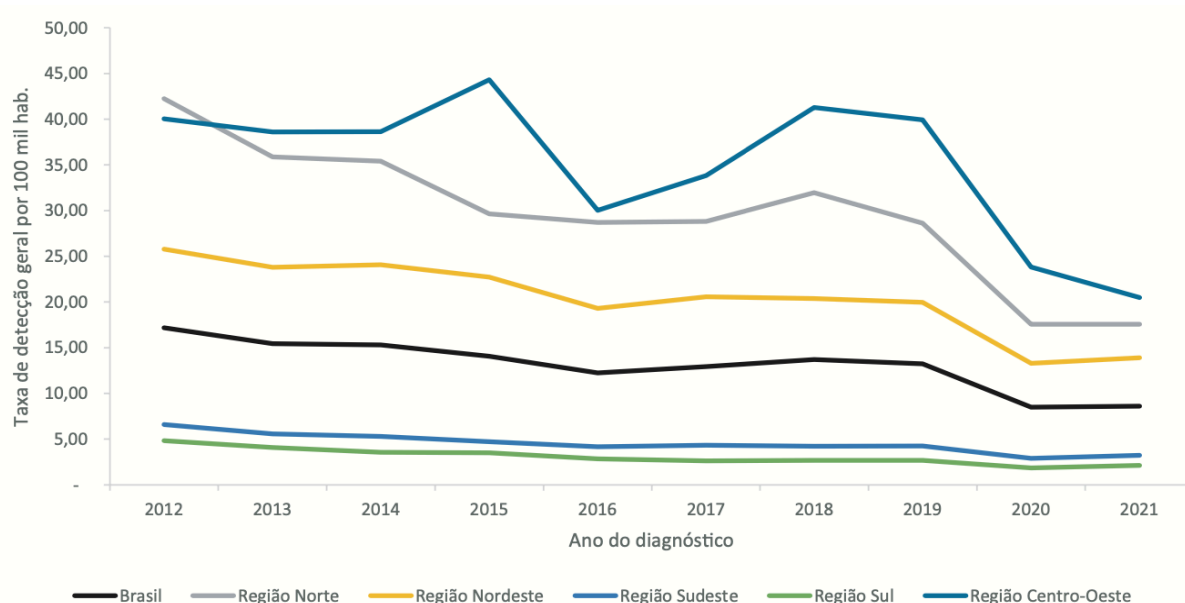


Figura 2: Taxa de detecção geral de casos novos de hanseníase por 100 mil habitantes segundo a região de residência no Brasil, de 2012 a 2021. Fonte: Sinan/SVS/MS e IBGE.

Esse cenário epidemiológico ressalta a complexidade da hanseníase no Brasil e a urgência de estratégias de controle e prevenção adaptadas às realidades locais, especialmente em áreas de alta incidência e nos *clusters* de alto risco. A persistência de taxas elevadas em determinadas regiões reforça a necessidade de políticas públicas direcionadas e investimentos em vigilância epidemiológica para reduzir a carga da doença no país.

2.2 Classificação clínica da hanseníase

A hanseníase é uma doença de notável variabilidade clínica, diretamente associada à resposta imunológica do hospedeiro frente à infecção pelo *M. leprae*. Essa diversidade de manifestações clínicas é influenciada pelo *status* imunológico do paciente, resultando em dois padrões imunológicos distintos: um de resistência, caracterizado por robusta resposta imune celular mediada por linfócitos T CD4⁺ T_{H1} e T_{H17}, com poucos bacilos e lesões localizadas (polo tuberculoide); e outro de suscetibilidade, marcado pela ausência de resposta celular específica, predomínio de linfócitos T CD4⁺ T_{H2} e T_{Reg}, exacerbação da resposta humoral, proliferação bacilar intensa e lesões disseminadas (polo virchowiano) (CHAVES; RIBEIRO-JUNIOR; LYON; MEDEIROS *et al.*, 2018; FONSECA; SIMON; CAZZANIGA; DE MOURA *et al.*, 2017; MAYMONE; LAUGHTER; VENKATESH; DACSO *et al.*, 2020).

Para fins de estudos clínicos e epidemiológicos, duas classificações são amplamente utilizadas: a da Organização Mundial da Saúde (OMS) e a de Ridley & Jopling (RIDLEY; JOPLING, 1966; WHO, 1995). A classificação da OMS é operacional, baseada no índice baciloscópico (IB) ou no número de lesões cutâneas. Nela, os pacientes são categorizados como paucibacilares (PB), quando apresentam de uma a cinco lesões cutâneas, ou multibacilares (MB), quando há mais de cinco lesões e/ou baciloscopia positiva (EICHELMANN; GONZALEZ GONZALEZ; SALAS-ALANIS; OCAMPO-CANDIANI, 2013). Já a classificação de Ridley & Jopling, frequentemente empregada em estudos imunológicos, considera manifestações clínicas, características histopatológicas das lesões cutâneas e o IB, categorizando a hanseníase em um espectro clínico-imunológico. Esse espectro inclui a hanseníase tuberculoide (MHT), a dimorfa tuberculoide (MHDT), a dimorfa dimorfa (MHDD), a dimorfa virchowiana (MHDV) e a virchowiana (MHV). A hanseníase indeterminada (MHI) é considerada a forma mais precoce da doença, caracterizada pela ausência de uma resposta imune celular definida. Nessa fase, os pacientes podem evoluir para a cura espontânea ou progredir para uma das formas secundárias da doença, dependendo de sua resposta imunológica (MAYMONE; LAUGHTER; VENKATESH; DACSO *et al.*, 2020).

De modo geral, pacientes com MHT apresentam uma resposta imune celular robusta contra o *M. leprae*, resultando em um curso clínico menos grave. Essa forma é caracterizada por uma mácula ou placa anestésica com bordas bem definidas. A hanseníase dimorfa (MHD), por sua vez, representa um estágio imunologicamente instável, situado entre as formas MHT e

MHV, no qual a progressiva redução da resposta imune celular é acompanhada por lesões cutâneas e nervosas mais numerosas, aumento da carga bacilar e dos níveis de anticorpos. A MHD inclui as formas MHDT, MHDD e MHDV, sendo a mais frequente entre os pacientes. No extremo oposto do espectro, a MHV é caracterizada pela ausência de resposta imune celular eficaz, resultando em doença disseminada com múltiplas lesões que podem afetar diversos órgãos, como rins e testículos (Tabela 1) (EICHELMANN; GONZALEZ GONZALEZ; SALAS-ALANIS; OCAMPO-CANDIANI, 2013; FROES; SOTTO; TRINDADE, 2022; MAYMONE; LAUGHTER; VENKATESH; DACSO *et al.*, 2020).

Tabela 1. Classificação e apresentação clínica da hanseníase (Adaptado de Maymone *et al.*, 2020).

Resposta imune celular	Variando de alta (esquerda) a baixa (direita)				
Classificação de Ridley-Jopling	MHT	MHDT	MHDD	MHDV	MHV
Descrição da lesão	Mácula ou placa bem definida	Máculas e placas infiltradas	Lesões anulares com bordas mal definidas	Lesões anulares, eritematoinfiltradas, com bordas mal definidas	Infiltração difusa, hansenomas
Número de lesões	Única Ausente	Única ou poucas Ausente / moderadamente diminuída	Várias Moderadamente diminuída	Numerosas Discretamente diminuída	Incontáveis Inalterada em estágios iniciais; difusamente diminuída com a progressão da doença
Sensibilidade					
Índice baciloscópio	0/raramente 1+ (0 bacilos em 100 campos)	1-2+ (1-10 bacilos em 100 campos)	2-3+ (1-10 bacilos em 10 campos)	3-4+ (1-10 bacilos por campo)	4-6+ (100-1000 bacilos por campo)
OMS	Paucibacilar			Multibacilar	

MHT, hanseníase tuberculoide; MHDT, hanseníase dimorfa tuberculoide; MHDD, hanseníase dimorfa dimorfa; MHDV, hanseníase dimorfa virchowiana; MHV, hanseníase virchowiana; OMS, Organização Mundial da Saúde.

2.3 Diagnóstico da hanseníase

O diagnóstico da hanseníase é baseado em uma abordagem essencialmente clínica e epidemiológica, que inclui a realização de um exame dermatoneurológico para identificar lesões cutâneas com alterações de sensibilidade e/ou comprometimento dos nervos periféricos. Em casos específicos, exames complementares, como baciloscopia e biópsia da pele, podem ser necessários para confirmar o diagnóstico (CHEN; LIN; SU; CHEN, 2022).

Clinicamente, o diagnóstico é confirmado quando o paciente apresenta pelo menos dois dos três sinais cardinais da doença: 1) lesão cutânea anestésica; 2) espessamento de nervos periféricos; e 3) identificação de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) em esfregaço de linfa superficial. A presença dos três sinais aumenta a sensibilidade diagnóstica para cerca de 97% (ALEMU BELACHEW; NAAFS, 2019; EICHELMANN; GONZALEZ GONZALEZ; SALAS-ALANIS; OCAMPO-CANDIANI, 2013).

A avaliação da sensibilidade tátil é realizada utilizando monofilamentos de Semmes-Weinstein (Figura 3) ou, alternativamente, um pedaço de algodão. Para a sensibilidade térmica, aplica-se calor ou frio na pele do paciente, utilizando tubos com água ou com algodões seco e embebido em álcool. Já a sensação de dor é avaliada com uma agulha de seringa, com o paciente de olhos fechados, para identificar a presença ou ausência de dor. Em determinadas circunstâncias, testes clínicos adicionais, como os da histamina, pilocarpina e iodo-amido, podem ser utilizados para avaliar possíveis danos às terminações nervosas dérmicas (ALEMU BELACHEW; NAAFS, 2019).

A palpação dos nervos periféricos é essencial para avaliar espessamento, consistência e sensibilidade. Nervos como os auriculares posteriores, ulnares, radiais, medianos, fibulares comuns e tibiais posteriores devem ser examinados minuciosamente (ALEMU BELACHEW; NAAFS, 2019).

A baciloscopia é um exame complementar importante, utilizado tanto para o diagnóstico quanto para o acompanhamento da doença e detecção de recidivas. O procedimento envolve a coleta de raspados dérmicos de lesões cutâneas, lóbulos auriculares ou cotovelos, seguida da coloração pelo método de Ziehl-Neelsen. A contagem de bacilos é realizada com base em uma escala logarítmica (índice baciloscópico – IB), e estima-se o percentual de bacilos viáveis. Outra técnica, a reação em cadeia da polimerase (PCR), apresenta alta especificidade e sensibilidade, mas seu uso rotineiro é limitado devido aos custos elevados e à infraestrutura necessária (ALEMU BELACHEW; NAAFS, 2019; CHEN; LIN; SU; CHEN, 2022).

Exames laboratoriais, como a detecção de anticorpos contra o glicolípido fenólico 1 (PGL-1), específico da parede celular do *M. leprae*, são úteis principalmente na Hanseníase MB. No entanto, esse teste pode apresentar resultados positivos em indivíduos saudáveis e negativo em casos de Hanseníase PB, limitando sua aplicação. Ainda assim, ele é útil para classificar a doença, monitorar a resposta ao tratamento em pacientes MB e identificar de

recidivas (DE SOUZA; IYER; LAMMAS; NAAFS *et al.*, 2016; MUNGROO; KHAN; SIDDIQUI, 2020).

O teste de lepromina (Mitsuda) tem por objetivo avaliar a imunidade celular do indivíduo em relação ao *M. leprae*. Consiste na injeção intradérmica do antígeno de lepromina (bacilos de *M. leprae* inativados extraídos de hansenomas), com avaliação da reação de hipersensibilidade tardia em dois momentos. O teste tende a ser positivo em casos de hanseníase PB e negativo em MB, mas sua utilidade é limitada, pois pode apresentar resultados variáveis em indivíduos saudáveis. Além disso, há questionamentos sobre seu uso devido ao risco de sensibilização, decorrente de sua natureza biológica. (ALEMU BELACHEW; NAAFS, 2019; CHEN; LIN; SU; CHEN, 2022).

A histopatologia é uma ferramenta de valiosa para o diagnóstico, classificação e detecção de reações hansênicas. A biópsia de pele, corada pela técnica de Fite-Faraco, revela características específicas conforme a forma clínica da doença. Na MHT, observa-se um infiltrado inflamatório granulomatoso perianexial e perineural, sem bacilos. Já na MHV, há presença de células de Virchow (histiócitos espumosos repletos de bacilos), distribuídas difusamente na derme, além de plasmócitos, linfócitos, zona de Grenz e epiderme atrófica (ALREHAILI, 2023; MAYMONE; LAUGHTER; VENKATESH; DACSO *et al.*, 2020).

2.4 Tratamento da hanseníase

O tratamento da hanseníase passou por evoluções significativas ao longo dos anos, com o objetivo de aprimorar a eficácia terapêutica e a adesão dos pacientes. Um marco importante nesse processo foi a introdução da poliquimioterapia (PQT) pela OMS em 1982, que se tornou fundamental para reduzir a duração do tratamento e a prevalência da doença (WHO, 1994).

Até recentemente, a PQT era baseada em esquemas terapêuticos distintos para pacientes classificados como PB ou MB. No entanto, essa diferenciação apresentava desafios significativos. A baixa disponibilidade de baciloscopia, a acurácia limitada dos profissionais de saúde na classificação da hanseníase e a alta rotatividade de profissionais na atenção primária à saúde – onde ocorrem 70% dos diagnósticos e tratamentos de casos novos – contribuíam para erros diagnósticos. Como consequência, pacientes MB eram frequentemente

tratados como PB, comprometendo a eficácia do tratamento (PENNA; DE OLIVEIRA; PENNA, 2009).

Diante dessas complexidades, ganhou força a discussão sobre a necessidade de simplificar os regimes de tratamento. Estudos realizados na China, Índia, Bangladesh e Brasil compararam o regime tradicional com o novo esquema, conhecido como poliquimioterapia única (PQT-U), que consiste na administração de rifampicina, clofazimina e dapsona por seis meses para todos os pacientes, independentemente da classificação de PB ou MB. Essas pesquisas evidenciaram que ambos os regimes eram igualmente eficazes, inclusive para pacientes MB com alta carga bacilar (BUTLIN; PAHAN; MAUG; WITHINGTON *et al.*, 2016; BUTLIN, 2016; MANICKAM; MEHENDEALE; NAGARAJU; KATOCH *et al.*, 2016; PENNA; BUHRER-SEKULA; KERR; STEFANI *et al.*, 2017; YAN, 2016).

Com base nessas evidências, a OMS recomendou, em 2018, o uso da PQT-U para todos os pacientes com hanseníase, com tratamento de seis meses para a forma PB e de 12 meses para a forma MB (OMS, 2019). Desde julho de 2021, o Brasil implementou esse novo esquema terapêutico, mantendo a possibilidade de substituir a dapsona por ofloxacina ou minociclina quando necessário (BRASIL, 2020). Essa transição visa simplificar o tratamento, promover maior adesão dos pacientes e aprimorar o processo de diagnóstico, especialmente nas unidades de atenção primária à saúde (BRASIL, 2020; PENNA; BUHRER-SEKULA; KERR; STEFANI *et al.*, 2017).

2.5 Reações hansênicas

No curso crônico da hanseníase intercalam-se as chamadas reações hansênicas ou episódios reacionais – fenômenos inflamatórios agudos que podem anteceder o diagnóstico da doença, ocorrer durante o tratamento ou mesmo após a alta. Esses episódios estão relacionados à carga bacilar e à resposta imune do hospedeiro, acometendo até 50% dos pacientes infectados pelo *M. leprae*. Representam a principal causa de lesões nervosas irreversíveis e deformidades anatômicas relacionadas à hanseníase, demandando diagnóstico e tratamento urgentes (CARVALHO; ARAUJO; COELHO-DOS-REIS; PERUHYPE-MAGALHAES *et al.*, 2018; FROES; SOTTO; TRINDADE, 2022).

As reações hansênicas são classificadas em dois tipos principais: reação tipo 1 (reação reversa –RR) e reação tipo 2 (eritema nodoso hansênico – ENH).

A reação tipo 1, mediada pela reação tipo IV de Gell & Coombs, ocorre predominantemente em pacientes PB. Está associada a um aumento abrupto da resposta T_H1 aos antígenos do *M. leprae*, com produção tecidual de citocinas como interleucina (IL)-1 β , fator de necrose tumoral (TNF)- α , IL-2, interferon gama (IFN- γ) e IL-12. Clinicamente, observa-se exacerbação das lesões cutâneas pré-existentes e envolvimento neural significativo (FONSECA; SIMON; CAZZANIGA; DE MOURA *et al.*, 2017; FROES; SOTTO; TRINDADE, 2022).

Já a reação tipo 2, mediada pela reação tipo III de Gell & Coombs, ocorre principalmente em pacientes MB. É caracterizada pela deposição de imunocomplexos e ativação do complemento, com predomínio da resposta T_H2 . Além das citocinas presentes na reação tipo 1, há níveis elevados de TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, além de infiltrados neutrofílicos e vasculite. O quadro clínico inclui o surgimento de nódulos eritematosos dolorosos, acompanhados de febre, linfadenite, artrite e neurite (FONSECA; SIMON; CAZZANIGA; DE MOURA *et al.*, 2017; FROES; SOTTO; TRINDADE, 2022).

2.6 Aspectos imunológicos da hanseníase

A hanseníase representa um modelo excepcional para o estudo das interações entre o hospedeiro e o patógeno, uma vez que a doença se manifesta em um espectro clínico-imunológico cujas características estão diretamente relacionadas à resposta imune ao *M. leprae* (GOULART; PENNA; CUNHA, 2002).

Nesse espectro, em uma extremidade, encontra-se a forma MHT, caracterizada por lesões cutâneas localizadas e uma resposta imune adaptativa mediada por citocinas do tipo T_H1 , associada à ativação de macrófagos. Na outra extremidade, a forma MHV apresenta infecção disseminada, com lesões que refletem uma resposta imune adaptativa do tipo T_H2 e uma resposta imune inata na qual os macrófagos exibem atividade fagocítica aumentada (FROES; TRINDADE; SOTTO, 2022; FROES; SOTTO; TRINDADE, 2022).

Essa dualidade na resposta imunológica evidencia a complexa interação entre os sistemas imunes inato e adaptativo na hanseníase. A resposta imune inata desempenha um

papel crítico na definição do curso da infecção por *M. leprae* e, em última análise, no desfecho clínico da doença. Enquanto a imunidade inata atua como primeira linha de defesa, a imunidade adaptativa, mediada principalmente por linfócitos T CD4⁺, é essencial para a polarização entre os perfis T_H1 e T_H2, que determinam a contenção ou progressão da infecção (FONSECA; SIMON; CAZZANIGA; DE MOURA *et al.*, 2017).

2.6.1 Papel dos monócitos na hanseníase

Os monócitos, leucócitos derivados da medula óssea e presentes na circulação sanguínea, desempenham papéis fundamentais na defesa contra patógenos ao se diferenciarem em macrófagos nos tecidos (SLAVICK; FURER; POLACHEK; TZEMACH *et al.*, 2023). Na hanseníase, os macrófagos derivados de monócitos configuram células-chave na resposta imune ao *M. leprae*, atuando tanto na fagocitose do patógeno quanto na modulação da resposta inflamatória por meio da produção de citocinas e da ativação de vias de sinalização imunológica (PINHEIRO; SCHMITZ; SILVA; DIAS *et al.*, 2018). A resposta dos monócitos e macrófagos varia entre as formas clínicas da hanseníase, refletindo a complexa interação entre o patógeno e o sistema imune do hospedeiro (FROES; TRINDADE; SOTTO, 2022).

O sistema imune inato representa a primeira linha de defesa contra patógenos, sendo responsável pela ativação dos Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs), encontrados em células como macrófagos e células dendríticas. Esses PRRs desempenham um papel fundamental na identificação de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), como ácidos nucleicos, proteínas específicas de microrganismos, lipídios e carboidratos complexos não encontrados em mamíferos. Diversas combinações de PRRs e PAMPs estão envolvidas na resposta imunológica inata ao *M. leprae* e microrganismos relacionados (MONTROYA; MODLIN, 2010).

Entre os PRRs, os *Toll Like Receptors* (TLRs) destacam-se por sua capacidade de induzir a ativação de cascatas de transdução de sinais, mediadas pelos fatores de transcrição nuclear (NF)-κB, regulador do interferon (IRF) e proteína ativadora (AP)-1. Essas cascatas promovem a secreção de diversas citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas coestimulatórias, essenciais para combater a infecção e modular a resposta imune adaptativa. Os heterodímeros TLR1-TLR2 e TLR2-TLR6, bem como os homodímeros TLR2, TLR4 e

TLR9 têm relevância especial no reconhecimento de antígenos micobacterianos (IWANASZKO; KIMMEL, 2015; KRUTZIK; OCHOA; SIELING; UEMATSU *et al.*, 2003; PINHEIRO; SCHMITZ; SILVA; DIAS *et al.*, 2018; TAPPING; TOBIAS, 2003).

A pesquisa inicial sobre a expressão e a ativação dos TLRs na hanseníase, conduzida por Krutzik *et al.* (2003), destacou dois achados fundamentais: (1) um aumento na expressão de TLR1 e TLR2 nos macrófagos das lesões da forma MHT em comparação com a MHV, (2) a ativação de monócitos/macrófagos pelo *M. leprae* inativado requer a participação de heterodímeros TLR2-TLR1, sugerindo a presença de lipoproteínas triaciladas no patógeno. Esses achados serviram como base para pesquisas subsequentes, que identificaram que a lipoproteína de 33 kDa e a proteína de membrana principal-II do *M. leprae* desencadearam respostas mediadas por TLR2. A ativação do heterodímero TLR1-TLR2 por lipopeptídeos do *M. leprae* resultou na produção de TNF- α , como parte da resposta inflamatória aguda, e de IL-12, que modula a resposta imune adaptativa do tipo 1 (KRUTZIK; OCHOA; SIELING; UEMATSU *et al.*, 2003; MAEDA; MUKAI; SPENCER; MAKINO, 2005; YAMASHITA; MAEDA; TAKESHITA; BRENNAN *et al.*, 2004).

Notavelmente, a ativação dos TLR1-TLR2 é influenciada pelo padrão de citocinas no ambiente: citocinas do tipo T_H1, como IFN- γ , fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), IL-2, IL-12 e IL-18, estimulam sua ativação, enquanto citocinas do tipo T_H2, como IL-4 e IL-10, exercem efeito inibitório. Além disso, a IL-4 não apenas inibe a ativação de TLR1-TLR2, mas também reduz a expressão de TLR2. Por outro lado, citocinas do tipo T_H1 não só aumentam a ativação de TLR1-TLR2, mas também promovem a expressão de TLR1 em monócitos. Assim, o padrão local de citocinas durante a infecção microbiana desempenha papel fundamental na regulação do sistema imunológico inato, influenciando tanto a ativação quanto a expressão dos TLR (MONTROYA; MODLIN, 2010).

Além dos TLR1 e TLR2, outros membros da família TLR também têm sido implicados na resposta ao *M. leprae*. Estudos sugerem que o TLR4 pode ser ativado pelo patógeno, embora seus ligantes específicos ainda não sejam completamente elucidados (POLYCARPOU; HOLLAND; KARAGEORGIU; EDDAOUDI *et al.*, 2016; WALKER; ROBERTS; ATKINSON; KHADGE *et al.*, 2012). Da mesma forma, o TLR6 e o TLR9 têm sido associados a aspectos específicos da imunopatogênese da hanseníase, como a formação de gotículas lipídicas em células de Schwann e a ocorrência de reações inflamatórias, respectivamente (DIAS; SILVA; SANTOS; BATISTA-SILVA *et al.*, 2016; MATTOS; OLIVEIRA; D'AVILA; RODRIGUES *et al.*, 2011). No entanto, os TLR1 e TLR2 emergem

como os principais mediadores da resposta imune ao *M. leprae*, destacando-se por sua capacidade de modular a polarização das formas clínicas da doença.

Além disso, polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos genes que codificam esses receptores têm sido associados à suscetibilidade à hanseníase e à ocorrência de reações hansênicas, com variantes como TLR1 I602S e TLR1 rs4833095 ligadas à redução da incidência da doença, enquanto TLR1 N248S e T1805G são fatores de suscetibilidade (ALVARENGA NIITSUMA; FERNANDES; LANA, 2018; JOHNSON; LYLE; OMUETI; STEPENSKY *et al.*, 2007; MARQUES CDE; BRITO-DE-SOUZA; GUERREIRO; MARTINS *et al.*, 2013; MISCH; MACDONALD; RANJIT; SAPKOTA *et al.*, 2008; SCHURING; HAMANN; FABER; PAHAN *et al.*, 2009). Adicionalmente, uma mutação no TLR2 (Arg677Trp) foi identificada em pacientes com MHV, mas não em MHT, reduzindo a resposta dos monócitos ao *M. leprae* e a produção de IL-12 (BOCHUD; HAWN; SIDDIQUI; SAUNDERSON *et al.*, 2008; KANG; CHAE, 2001; KANG; LEE; CHAE, 2002; PINHEIRO; SCHMITZ; SILVA; DIAS *et al.*, 2018). Esses achados reforçam a relevância dos TLR1 e TLR2 na resposta imune ao *M. leprae*, destacando seu papel central na imunopatogênese da hanseníase.

A ativação dos TLR1 e TLR2 pelo *M. leprae* desencadeia cascatas de sinalização intracelular que resultam na ativação do fator de transcrição NF- κ B. Esse fator regula a expressão de genes pró-inflamatórios, incluindo citocinas como TNF- α , IL-12 e IL-1 β , além de moléculas coestimulatórias como o antígeno leucocitário humano (HLA)-DR, essencial para a apresentação de antígenos e a ativação da resposta imune adaptativa (CABRAL; DE FIGUEIREDO; GANDINI; DE SOUZA *et al.*, 2022; KRUTZIK; OCHOA; SIELING; UEMATSU *et al.*, 2003; LIU; ZHANG; JOO; SUN, 2017; TAPPING; TOBIAS, 2003). Interessantemente, a expressão do NF- κ B pode variar entre as formas clínicas da hanseníase, com estudos genéticos identificando uma associação entre polimorfismos no gene DEFB1 e expressão reduzida do NF- κ B1 em pacientes virchowianos, sugerindo uma possível ligação com a suscetibilidade à forma mais grave da doença (OCA, 2011).

Novas pesquisas ampliaram o entendimento sobre o papel dos TLRs na defesa antimicrobiana, destacando, por exemplo, a importância da expressão gênica em monócitos e macrófagos ativados por TLR na ativação de mecanismos antimicrobianos fundamentais. Dentre esses, destaca-se a indução da enzima 25-hidroxivitamina D3-1 α -hidroxilase (CYP27b1), essencial para a conversão da vitamina D na sua forma ativa. Essa transformação é crucial para a ativação do receptor de vitamina D (VDR) e a subsequente produção do

peptídeo antimicrobiano catelicidina (WANG; NESTEL; BOURDEAU; NAGAI *et al.*, 2004). Nos pacientes com hanseníase, foi observado que a ativação dos TLR1/2 potencializa a expressão de CYP27b1 e VDR, um processo mediado pela indução de IL-15 e os componentes de seu receptor (KRUTZIK; TAN; LI; OCHOA *et al.*, 2005). Notavelmente, a indução da via antimicrobiana dependente da vitamina D, estimulada pela IL-15 em macrófagos, apresenta prevalência marcante nas lesões da forma MHT (FONSECA; SIMON; CAZZANIGA; DE MOURA *et al.*, 2017; MONTTOYA; CRUZ; TELES; LEE *et al.*, 2009).

Estudo adicionais, como o de Liu *et al.* (2012), enfatizaram a importância dos TLRs, especialmente o TLR1/2, na regulação da atividade antimicrobiana de macrófagos. Observou-se que o microRNA hsa-mir-21 modula negativamente a expressão de TLR1/2, resultando na diminuição da expressão de peptídeos antimicrobianos dependentes de vitamina D e no aumento da produção de IL-10 (LIU; WHEELWRIGHT; TELES; KOMISOPOULOU *et al.*, 2012). Paralelamente, Salgado *et al.* (2018) identificaram a superexpressão de outros miRNAs que visam TLR4 e IL15R, implicando-os na modulação da mesma via antimicrobiana em pacientes com hanseníase MB. Esses achados sugerem mecanismos adicionais pelos quais a atividade microbiana, crítica na resposta imune, é inibida em contextos específicos da doença (GROSSI DE OLIVEIRA; CHAVES; CARDOSO; PINHEIRO *et al.*, 2022; KIM; TELES; HAILE; LIU *et al.*, 2018; SALGADO; PINTO; BOUTH; GOBBO *et al.*, 2018).

Na hanseníase, as citocinas IL-1 β e IL-12 desempenham papéis fundamentais ao orientar a resposta imunológica para um perfil T_{H1}, essencial na eliminação do *M. leprae* (FROES; TRINDADE; SOTTO, 2022). A IL-1 β , produzida principalmente por macrófagos ativado, não só promove a inflamação local e o recrutamento de células imunes, mas também atua em conjunto com os TLR1/2 e o VDR para induzir a expressão do gene DEFB4, um peptídeo antimicrobiano crucial na defesa contra patógenos intracelulares (LIU; SCHENK; WALKER; DEMPSEY *et al.*, 2009). Essa complexa rede de sinalização destaca a importância da IL-1 β tanto na defesa antimicrobiana quanto na modulação da resposta imune inata.

Já a IL-12, secretada por macrófagos e células dendríticas, é fundamental para a polarização da resposta imune em direção ao perfil T_{H1}. Ela ativa células T CD4⁺ e estimula a produção de IFN- γ , estabelecendo um vínculo essencial entre a imunidade inata e adaptativa. No entanto, na forma MHV da hanseníase, a liberação de IL-12 é significativamente inibida por mecanismos como a ativação do receptor de imunoglobulina leucocitária semelhante a receptor A membro 2 (LILRA2) e a presença de fosfolipídios oxidados, que suprimem a sinalização mediada por TLR1/2 (MONTTOYA; MODLIN, 2010). Essa inibição é

acompanhada pela produção de citocinas regulatórias, como IL-10 e TGF- β 1, que não apenas antagonizam os efeitos das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- γ e IL-12), mas também inibem a ativação dos macrófagos e promovem a proliferação bacteriana. Como resultado, observa-se uma resposta imune predominantemente T_H2, caracterizada pela ineficácia na eliminação do *M. leprae* e pela progressão da doença (Figura 3) (FROES; TRINDADE; SOTTO, 2022; PINHEIRO; SCHMITZ; SILVA; DIAS *et al.*, 2018; ULLRICH; SCHULZE; PAAP; MULLER *et al.*, 2020).

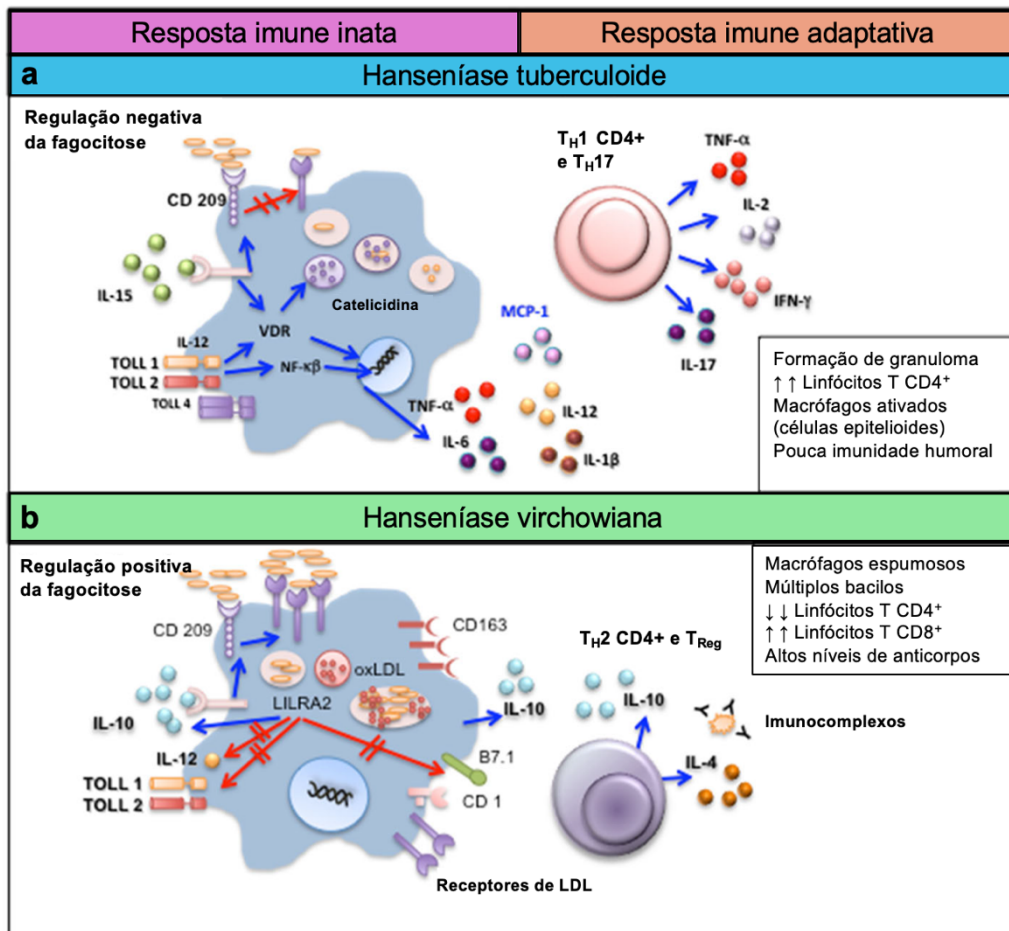


Figura 3. Resposta imune nas formas clínicas polares da hanseníase. **a** Na hanseníase tuberculóide (MHT), a resposta imune inata é ativada pelo *M. leprae* por meio dos TLR1/2. A IL-15 estimula o programa antimicrobiano dependente de vitamina D nos macrófagos, inibindo a fagocitose de micobactérias. Esses eventos promovem uma resposta de citocinas do tipo T_H1, que contém a infecção em granulomas bem formados, e uma resposta T_H17 que leva à inflamação e destruição tecidual, recrutamento de neutrófilos, ativação de macrófagos e intensificação das células efetoras T_H1. **b** Na hanseníase virchowiana (MHV), IL-4, IL-10, LILRA2 e fosfolípidios oxidados inibem as respostas de citocinas induzidas por TLR1/2, mas preservam a liberação de IL-10. Além disso, imunocomplexos desencadeiam a produção de IL-10 e aumentam a fagocitose do *M. leprae* e de lipoproteínas oxidadas de baixa densidade por meio dos receptores CD209 e CD163, sem ativar a via antimicrobiana dependente de vitamina D. Há também um aumento na síntese de receptores de LDL e na captação de colesterol endógeno, que se acumula intracelularmente. Isso induz um perfil imune T_H2 e T_{Reg}, com produção de IL-4, IL-10 e anticorpos, ausência de granulomas e falha em conter o crescimento do *M. leprae*. Adaptado de Fonseca *et al.*, 2017.

O IFN- γ , embora seja produzido principalmente por linfócitos T e células NK, tem um papel indireto na ativação dos macrófagos, amplificando a resposta imune mediada por IL-12 e IL-1 β . Ele atua como um potente ativador de macrófagos, induzindo a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que são cruciais para a eliminação intracelular do *M. leprae* (FROES; TRINDADE; SOTTO, 2022).

Na hanseníase, a ativação dos TLR1/TLR2 e a produção de citocinas como IL-1 β e IL-12 estão intimamente relacionadas à expressão de moléculas coestimulatórias, como o HLA-DR. Essa molécula do complexo de histocompatibilidade classe II é expressa em monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos B, desempenhando um papel crucial na apresentação de antígenos aos linfócitos T CD4⁺ e na ativação da resposta imune adaptativa. Sua expressão é um marcador de ativação celular, refletindo a capacidade dessas células de modular a resposta imune (ALTER; GRANT; ABEL; ALCAIS *et al.*, 2011; PINHEIRO; SCHMITZ; SILVA; DIAS *et al.*, 2018).

Em pacientes com a forma MHT, observa-se uma maior expressão de HLA-DR nos macrófagos das lesões, correlacionada com uma resposta imune do tipo T_H1 e uma maior produção de citocinas como IFN- γ e IL-12. Essas citocinas, por sua vez, estimulam ainda mais a expressão de HLA-DR, criando um ciclo positivo de ativação imune que favorece a eliminação do patógeno (FROES; TRINDADE; SOTTO, 2022). Por outro lado, na forma MHV, a expressão de HLA-DR é reduzida, refletindo uma menor ativação dos macrófagos e uma resposta imune predominantemente regulatória. Essa diminuição na expressão de HLA-DR está associada à menor ativação dos TLR1/2 e à presença de polimorfismos genéticos que afetam a funcionalidade desses receptores (BOCHUD; HAWN; SIDDIQUI; SAUNDERSON *et al.*, 2008; KANG; CHAE, 2001; KANG; LEE; CHAE, 2002; PINHEIRO; SCHMITZ; SILVA; DIAS *et al.*, 2018).

Além disso, estudos sobre polimorfismos no gene HLA-DR revelam sua influência na suscetibilidade à hanseníase. Variantes como HLA-DRB1*11 e HLA-DRB1*1501, identificadas em populações brasileira, chinesa e indiana, estão associadas a um maior risco de desenvolver a forma MHV da doença, ressaltando a importância da interação genético-imunológica na patogênese da hanseníase (LAVADO-VALENZUELA; JOSE BRAVO; JUNQUEIRA-KIPNIS; RAMOS DE SOUZA *et al.*, 2011; WONG; GOCHHAIT; MALHOTRA; PETTERSSON *et al.*, 2010; ZHANG; LIU; CHEN; WANG *et al.*, 2009). Esses achados destacam como a expressão de HLA-DR, modulada pela ativação dos TLR1/2

e por fatores genéticos, desempenha um papel central na determinação do curso clínico da hanseníase.

A ativação dos monócitos e macrófagos, mediada por TLRs e outras moléculas de reconhecimento, não apenas desencadeia a resposta imune inata, mas também desempenha um papel crucial na modulação da resposta imune adaptativa. Esses mecanismos, ilustrados na Figura 3, destacam a complexidade da interação entre o patógeno e o sistema imune do hospedeiro. Além disso, reforçam o papel central dos TLR1 e TLR2 na imunopatogênese da hanseníase.

2.6.2 Papel dos linfócitos na hanseníase

Os linfócitos, particularmente as células T CD4⁺, constituem elementos centrais da resposta imune adaptativa frente ao *M. leprae*. Derivadas de precursores linfoides comuns, essas células amadurecem no timo e se diferenciam em subpopulações funcionais específicas, incluindo T_{H1} e T_{H2}, cujos perfis estão intimamente ligados às manifestações clínicas da hanseníase. A polarização entre essas subpopulações define a qualidade da resposta imunológica e influencia diretamente a capacidade do hospedeiro em controlar ou permitir a disseminação do bacilo (ADU-BERCHIE; OBUSEH; MOONEY, 2023; ALREHAILI, 2023; CHATZILEONTIADOU; SLOANE; NGUYEN; GRAS *et al.*, 2020).

Na forma MHT, a resposta do tipo T_{H1} predomina, havendo elevada produção de IFN- γ , IL-2 e TNF- α . O IFN- γ desempenha papel essencial na ativação de macrófagos, estimulando a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a consequente produção de óxido nítrico (NO), molécula microbicida fundamental para o controle intracelular do *M. leprae*. Essa citocina também aumenta a expressão de HLA-DR e da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), promovendo a apresentação eficiente de antígenos e a interação entre células acessórias e linfócitos T. O TNF- α atua sinergicamente com o IFN- γ na formação e manutenção de granulomas bem-organizados, estruturas típicas da MHT que representam um mecanismo eficaz de contenção do bacilo (FROES; TRINDADE; SOTTO, 2022; YASMIN; VARGHESE; BHAKTA; KISHORE, 2021).

Em contrapartida, a forma MHV é dominada por uma resposta do tipo T_{H2}, com produção elevada de IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β . A IL-4 atua suprimindo a ativação de

macrófagos mediada por $\text{IFN-}\gamma$, inibindo a proliferação de células T dependente de IL-2 e estimulando a produção de anticorpos por linfócitos B (DE SOUSA; SOTTO; SIMOES QUARESMA, 2017; FONSECA; SIMON; CAZZANIGA; DE MOURA *et al.*, 2017). Já a IL-10 exerce efeito imunossupressor marcante, sendo produzida por células $\text{T}_{\text{H}2}$, T reguladoras (Tregs) e macrófagos, promovendo a inibição da produção de IL-12 e da via antimicrobiana dependente da vitamina D. Além disso, a IL-10 favorece a fagocitose de lipoproteínas e micobactérias por macrófagos sem induzir sua ativação plena, estabelecendo um ambiente permissivo à sobrevivência do *M. leprae*. O $\text{TGF-}\beta$ contribui para a supressão da resposta inflamatória e para o desenvolvimento de fibrose tecidual, reforçando o perfil regulatório observado em MHV (Figura 4) (MI; LIU; ZHANG, 2020).

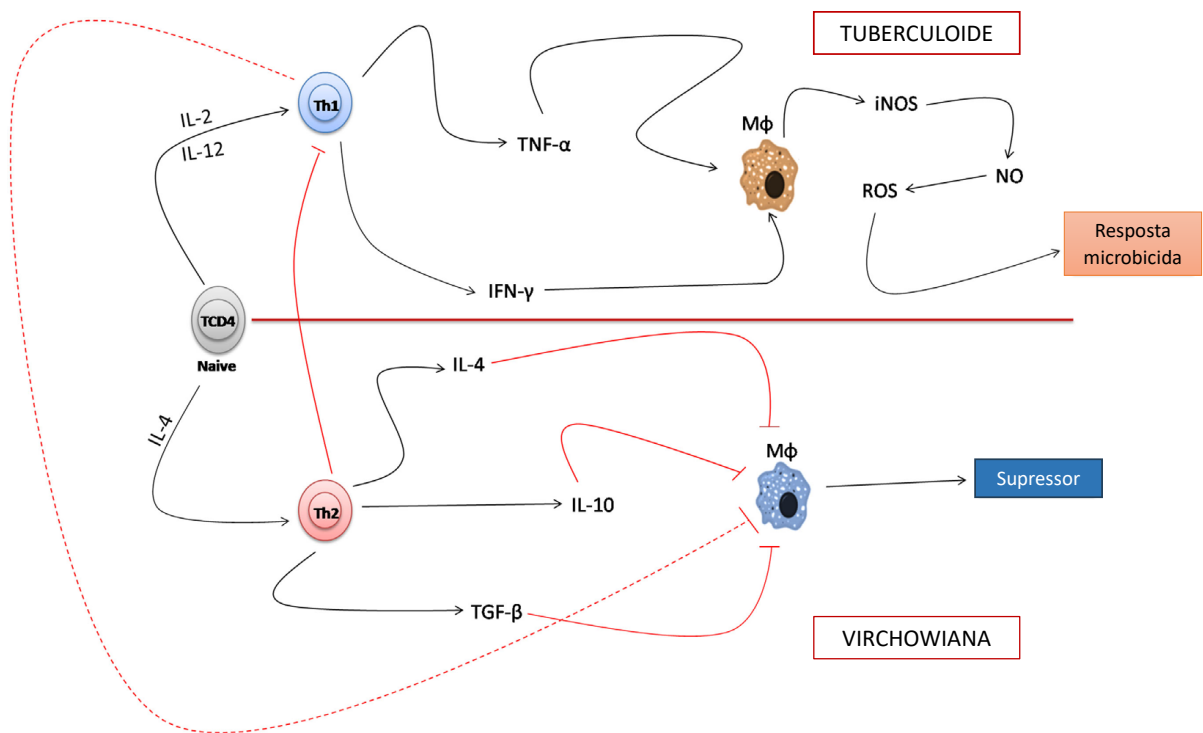


Figura 4. Paradigma imunológico da resposta dos linfócitos T auxiliares ($\text{T}_{\text{H}1}$ / $\text{T}_{\text{H}2}$) nas formas polares da hanseníase. Adaptado de de Sousa *et al.*, 2017.

A caracterização fenotípica dos linfócitos revela ainda diferenças marcantes entre as formas clínicas. Em MHT, predominam células T CD4^+ com perfil de memória (CD45RO^+), compatível com uma resposta imune robusta e eficiente. Em contraste, nas lesões da MHV, observa-se uma maior proporção de linfócitos T CD8^+ com fenótipo supressor (CD28^-) e de

células T naïve, refletindo uma resposta imunológica menos eficaz e mais tolerogênica (CABRAL; DE FIGUEIREDO; GANDINI; DE SOUZA *et al.*, 2022).

Estudos transcricionais mostram que as lesões MHT expressam predominantemente genes induzidos por IFN- γ (um IFN tipo II), associados à ativação efetiva de vias antimicrobianas. Já em MHV, observa-se uma assinatura molecular dominada por IFNs do tipo I (IFN- α/β), que promovem a produção de IL-10 e suprimem genes dependentes de IFN- γ , como aqueles relacionados à ativação do receptor de vitamina D e à produção de peptídeos antimicrobianos. Essa interferência cruzada entre os dois tipos de IFN evidencia a exclusividade funcional de cada eixo na polarização imune (TELES; GRAEBER; KRUTZIK; MONTOYA *et al.*, 2013).

Adicionalmente, polimorfismos genéticos têm sido associados à modulação dessa resposta. O polimorfismo +874 A/T (rs2430561) no gene IFNG, por exemplo, está relacionado à maior produção de IFN- γ e à proteção contra a hanseníase. Em contrapartida, variantes no promotor do gene IL10, como -819 C/T (rs1800871), estão associadas à susceptibilidade à forma multibacilar, por promoverem maior expressão de IL-10 e, conseqüentemente, um perfil mais regulatório e permissivo (CARDOSO; PEREIRA; BRITO-DE-SOUZA; DIAS-BAPTISTA *et al.*, 2010; SILVA; NAVECA; RAMASAWMY; BOECHAT, 2014).

Dessa forma, o equilíbrio entre as subpopulações de linfócitos T CD4⁺ T_{H1} e T_{H2} e suas respectivas citocinas — IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-10 e TGF- β — é determinante para a evolução clínica da hanseníase. A resposta T_{H1} está associada à contenção eficaz do bacilo e à formação de granulomas, enquanto a resposta T_{H2} permite a evasão imunológica e a disseminação da infecção. Compreender essas interações celulares e moleculares é fundamental para o avanço de estratégias terapêuticas direcionadas ao controle imunológico da hanseníase.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar como a expressão de marcadores intracelulares e de superfície em leucócitos do sangue periférico de pacientes com hanseníase, especialmente os TLRs, influencia a polarização das formas clínicas da doença.

3.2 Objetivos específicos

A partir de ensaios de estímulo *in vitro* das CMSPs de pacientes com diferentes formas clínicas da hanseníase utilizando antígeno solúvel de *M. leprae*, avaliar:

- O perfil de expressão de marcadores de superfície em macrófagos derivados de monócitos (CD14, HLA-DR, TLR1 e TLR2) e linfócitos (CD3, CD4 e CD45RO).
- O perfil de expressão de marcadores intracelulares em macrófagos derivados de monócitos (NF- κ B, IL-1 β e IL-12) e linfócitos (IFN- γ e IL-10).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa, local de estudo e seleção dos pacientes

Todos os procedimentos foram devidamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG - CAAE: 68583223.2.0000.5149) e da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (HEM/FHEMIG - CAAE: 68583223.2.3001.5124), conforme documentação detalhada nos anexos I e II.

O recrutamento dos participantes ocorreu por meio de abordagens pessoais durante as consultas médicas, seguido de esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa e os procedimentos envolvidos na coleta de sangue. Após entrevista e concordância em participar do estudo, os participantes formalizaram sua participação mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Voluntários saudáveis foram selecionados seguindo os mesmos critérios de inclusão.

Os pacientes com hanseníase foram rigorosamente classificados de acordo com os critérios estabelecidos por Ridley e Jopling, incluindo também pacientes com a forma indeterminada da doença. A seleção dos participantes foi conduzida pela equipe médica do Ambulatório de Dermatologia do Hospital Eduardo de Menezes, um centro especializado no tratamento da hanseníase. Os critérios de inclusão exigiram que os pacientes fossem diagnosticados com hanseníase nos últimos 12 meses, com idades entre 18 e 60 anos, e consentissem em participar da pesquisa. Foram excluídos pacientes com diagnóstico de hanseníase há mais de um ano, idade abaixo de 18 ou acima de 60 anos, recusa em participar, uso recente de imunossupressores (menos de 30 dias), bem como a presença concomitante de outras doenças infecciosas ou autoimunes.

4.2 Cálculo amostral

O cálculo amostral foi estabelecido para análises estatísticas baseado na comparação entre mais de duas médias com grupos independentes (ANOVA – Grupos G1-G3). Para o cálculo amostral foi realizado, inicialmente, ensaio piloto de estimulação *in vitro* com antígeno de *M. leprae* de macrófagos derivados de monócitos (CD14⁺), principal célula do sistema imune inato avaliada no presente estudo, de indivíduos sadios e de pacientes com hanseníase (n=5 por grupo). O percentual dessas células positivas para CD14⁺ foi estabelecido baseado em índice de estimulação (cultura estimulada/cultura não estimulada) avaliado por citometria de fluxo. A partir dos dados de percentual de monócitos positivos estimou-se o desvio padrão médio dos grupos analisados (SD=0,126). A diferença mínima a ser detectada foi estimada em 0,21 unidades correspondentes ao percentual de células CD14⁺. Esse valor corresponde a 10% da média do grupo dos pacientes, sendo que, a menor diferença observada em relação ao grupo de sadios foi de 14,2% (0,23 unidades), possibilitando, então, sensibilidade superior à menor diferença detectada no ensaio piloto. O erro alfa foi estabelecido em 5% (0,05), enquanto o erro beta, conforme bem estabelecido no campo da saúde, foi estabelecido em 20%, garantindo então 80% de poder estatístico na detecção de uma diferença entre as médias dos grupos em relação ao percentual de células CD14⁺. O tamanho amostral mínimo estabelecido por grupo (3 grupos) foi de oito indivíduos.

Os pacientes com hanseníase foram então agrupados em duas categorias de acordo com as formas clínicas da doença: Grupo 1 (n = 17) – hanseníase paucibacilar (compreendendo as formas MHT e MHDT); Grupo 2 (n = 15) – hanseníase multibacilar (englobando as formas MHDD, MHDV e MHV) (Tabela 2). Adicionalmente, foi incluído um grupo controle composto por 31 indivíduos saudáveis (G3), sem histórico de hanseníase, para fornecer base de referência e expressão de cada biomarcador avaliado.

Tabela 2. Distribuição dos pacientes com hanseníase de acordo com as formas clínicas.

Grupo	Forma Clínica	Quantidade de Pacientes
1 – PB	MHT	2
	MHDT	15
2 – MB	MHDD	1
	MHDV	2
	MHV	12

PB, paucibacilar; MB, multibacilar; MHT, hanseníase tuberculoide; MHDT, hanseníase dimorfa tuberculoide; MHDD, hanseníase dimorfa dimorfa; MHDV, hanseníase dimorfa virchowiana; MHV, hanseníase virchowiana.

4.3 Antígeno de *M. leprae* para ensaios de estimulação *in vitro*

O antígeno utilizado nos experimentos de estimulação das CMSPs trata-se de uma suspensão de 40.000.000 de bacilos de *M. leprae*/mL, fornecido pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná (CPPI/PR). Este antígeno, preparado para o teste de intradermoreação de Mitsuda, foi utilizado *in vitro* para avaliar a resposta imunológica dos leucócitos.

4.4 Obtenção, cultura e estimulação de CMSPs

CMSPs foram obtidas a partir de amostras de sangue coletadas (G1-G3) em tubos de heparina sódica (15 mL) empregando-se a metodologia de gradiente de densidade utilizando HISTOPAQUE®-1077. Após a centrifugação a 1200 x g por 40 minutos à 25°C, o anel de CMSP foi removido e colocado em tubos de polipropileno (50 mL). As células foram lavadas duas vezes por centrifugação e ressuspensas em meio RPMI 1640 completo. Posteriormente, as células foram contadas em câmara de Neubauer, utilizando o corante Azul de Trypan, diluídas na proporção de 1:100. Em seguida foram realizados os ajustes necessários para obtenção de uma preparação celular com 1×10^7 células/mL, conforme descrito previamente (CARVALHO; FERRAZ; HOJO-SOUZA; MEDEIROS *et al.*, 2023; GAZZINELLI; LEME; CANCADO; GAZZINELLI *et al.*, 1990).

As CMSPs foram então plaqueadas em placas de cultura de 96 poços, com 200 µL da suspensão celular (1×10^6 células/well), em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e Pen-Strep. As células foram estimuladas com 1,25 µL antígeno de Mitsuda (proporção 1:20 de bacilos em relação às células) e incubadas por quatro horas em uma estufa de CO₂ com 5% de umidade a 37°C. Poços de controle positivo de estimulação foram obtidos utilizando concanavalina A (ConA) para linfócitos, ou lipopolissacarídeo (LPS), para

monócitos. Além disso, foram realizadas também culturas, nas mesmas condições descritas acima, mas na ausência de bacilos ou estímulos ConA e LPS, que foram utilizadas como culturas-controle para o cálculo do índice de estimulação.

4.5 Avaliação do perfil de expressão de marcadores de superfície celular em macrófagos derivados de monócitos e linfócitos T CD4⁺ após ensaio de estimulação *in vitro*

Em 200 µL de amostras das culturas obtidas nos ensaios 4.3 foram adicionados 20 µL de Brefeldina A - BFA (Sigma-Aldrich), em todos os tubos (concentração final de 10 µg/mL), que foram mantidos por mais quatro horas em estufa nas condições mencionadas anteriormente. Em seguida as células foram marcadas com o reagente "*Live/Dead*" (MP34955 – Invitrogen) a 4°C por vinte minutos, e em seguida foi centrifugada a 400 x g a 4°C por cinco minutos. Em sequência, as células foram tratadas com Human BD Fc Block™ (BD Pharmingen™) e as amostras foram marcadas com anticorpos monoclonais para identificação da população de monócitos e subpopulações de linfócitos. Aliquotas contendo 50 µL de mix dos seguintes anticorpos monoclonais previamente diluídos em FACS foram adicionadas nas amostras em placas de fundo em U de 96 poços (Becton-Dickinson):

- Macrófagos derivados de monócitos: CD14, HLA-DR, TLR1 e TLR2;
- Linfócitos T CD4: CD3, CD4 e CD45RO.

Em seguida, as amostras foram incubadas por vinte minutos à 4 °C e ao abrigo da luz, sendo submetidas à centrifugação a 400 x g a 4°C por cinco minutos. Após, foram adicionados 100 µL de BD Cytotfix/Cytoperm (Becton-Dickinson), a placa foi homogeneizada levemente e foi incubada por vinte minutos a 4 °C e ao abrigo da luz, depois foi submetida à centrifugação a 400 x g a 4°C por cinco minutos. Os sobrenadantes foram desprezados, as células ressuspensas em vortex e, em seguida, adicionados 100 µL de BD Perm/Wash (Becton-Dickinson), homogeneizado levemente e as suspensões celulares lavadas por centrifugação a 400 x g, à temperatura de 4°C por cinco minutos. Em sequência, as amostras foram marcadas com anticorpos monoclonais para marcação intracelular. Aliquotas contendo 50 µL de mix dos seguintes anticorpos monoclonais, previamente diluídos em FACS, foram adicionados nas amostras em placas de fundo em U de 96 poços (Becton-Dickinson):

- Macrófagos derivados de monócitos: NF-κB, IL-1β e IL-12;

- Linfócitos T CD4: IFN- γ e IL-10.

As amostras foram, posteriormente, incubadas com o mix de anticorpos por vinte minutos a 4°C e ao abrigo da luz, para em seguida serem submetidas à centrifugação por 400 x g a 4°C por cinco minutos. Os sobrenadantes foram desprezados, as células ressuspensas e homogeneizadas em vortex e adicionados 200 μ L de solução fixadora - MFF/poço. Em seguida, as suspensões celulares foram transferidas para microtubos de poliestireno de 500 μ L (Becton Dickinson). Foram adquiridos dados sobre as células e a análise dos parâmetros morfométricos e imunofenotípicos determinada com o auxílio do citômetro de fluxo BD LSRFortessa™ (Becton Dickinson) e analisada no *software* FlowJo® (versão 10.0). Para execução dos ensaios de avaliação imunológica no sangue periférico utilizamos as abordagens metodológicas de avaliação do perfil funcional de monócitos e linfócitos T CD4⁺ pela análise de citocinas intracitoplasmáticas (Tabela 3).

Tabela 3. Marcadores utilizados para avaliação do perfil de monócitos e linfócitos.

Painel de Anticorpos para Citometria de Fluxo				
Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Fabricante	Nº de Catálogo
Live/Dead	Acqua	-	ThermoFisher	L34965
CD14	APC-Cy7	HCD14	Biologend	325620
HLA-DR	AF-700	LN3	ThermoFisher	56-9956-42
TLR1	eFluor660	eBioTR23 (TR23)	ThermoFisher	50-9011-82
TLR2	FITC	11G7	ThermoFisher	MA517723
NF-κB	PE-Cy7	K10-895.12.50	BD Bioscience	560335
IL-1b	PE	CRM56	ThermoFisher	12-7018-82
IL-12	eFluor450	eBioHP40	ThermoFisher	48-7235-42
CD3	FITC	OKT3	ThermoFisher	11-0037-42
CD4	APC-Cy7	A161A1	Biologend	357416
CD45RO	PE-Cy5	UCHL1	Biologend	304208
IFN-g	PE	4S.B3	ThermoFisher	12-7319-42
IL-10	eFluor660	JES3-9D7	ThermoFisher	50-7108-42

4.6. Aquisição e estratégia de análise de dados

Foram utilizados os seguintes parâmetros: tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), e os sinais luminosos emitidos pela excitação dos fluoróforos a partir dos seguintes lasers: azul (488 nm: canais para FITC, PE, PE-Cy5 e PE-Cy7), vermelho (640 nm: APC, AF-700 e APC-Cy7) e violeta (405 nm: Pacific Blue e Amcyan). A identificação de populações celulares de interesse, bem como a determinação do valor percentual destas populações e subpopulações, foi feita por meio da análise no *software* FlowJo (versão 10.0). O equipamento foi ajustado para coletar até 100.000 eventos dentro da população de linfócitos e macrófagos derivados de monócitos.

4.6.1 Estratégias de análise para a caracterização das populações de macrófagos derivados de monócitos e linfócitos

Para caracterizar o perfil fenotípico dos macrófagos derivados de monócitos e linfócitos cultivados *in vitro* e suas subpopulações, inicialmente foi criado um gráfico de tamanho celular (*forward scatter* - FSCA x FSC-H, Figura 5A) para selecionar células isoladas (*singlets*). Em seguida, foi selecionado um *gate* para a população de células vivas (Live/Dead, Figura 5B). Posteriormente, utilizando um gráfico de granulosidade celular (Side Scatter - SSC) *versus* tamanho celular (*forward scatter* - FSC) selecionou-se um *gate* para a população de monócitos e linfócitos (Figura 5C). Posteriormente, foi selecionado um *gate* para análise da população de macrófagos derivados de monócitos (CD14⁺, APC-Cy7: Figura 5D) e linfócitos (CD3⁺, FITC: Figura 5E).

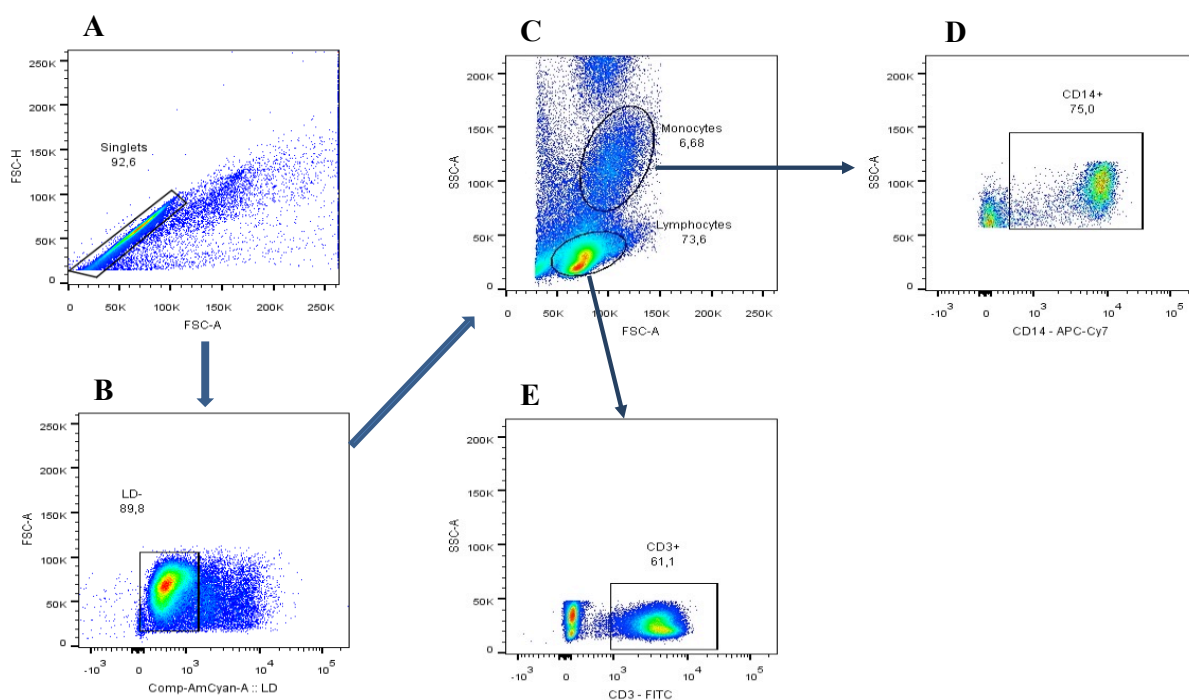


Figura 5. Análise representativa de macrófagos derivados de monócitos e linfócitos do sangue periférico na população de células avaliada por citometria de fluxo. A figura A representa a seleção de células isoladas (*singlets*). B representa a população de células vivas (Live/Dead). A figura C representa o perfil celular da população de monócitos e linfócitos, selecionada na janela “*gate*” em gráfico de tamanho e granulosidade. A figura D representa o perfil de análise da população de macrófagos derivados de monócitos em gráfico de densidade de fluorescência para CD14⁺ (APC-Cy7). A figura E representa o perfil de análise da população de linfócitos em gráfico de densidade de fluorescência para CD3⁺ (FITC).

4.6.2 Estratégias de análise para a caracterização das populações de macrófagos derivados de monócitos TLR1⁺/TLR2⁺

Após a seleção da população de células CD14⁺, conforme figura 5D, foi criado um novo gráfico de SSC *versus* densidade de fluorescência para HLA-DR (AF700; Figura 6A). Posteriormente, a partir do *gate* da etapa anterior, seguiu-se com as seguintes estratégias de forma consecutiva: *i*) gráfico de SSC *versus* densidade de fluorescência para TLR1⁺ (eFluor660; Figura 6B); *ii*) gráfico de SSC *versus* densidade de fluorescência para TLR2⁺ (FITC; Figura 6C); *iii*) gráfico de SSC *versus* densidade de fluorescência para NF- κ B⁺ (PE-CY7; Figura 6D). A próxima estratégia correspondeu à avaliação da expressão das citocinas IL-12 (eFluor450; Figura 6E) e IL-1 β (PE; Figura 6F). Todas foram analisadas quanto ao percentual e intensidade média de fluorescência (IMF) em gráfico do tipo histograma.

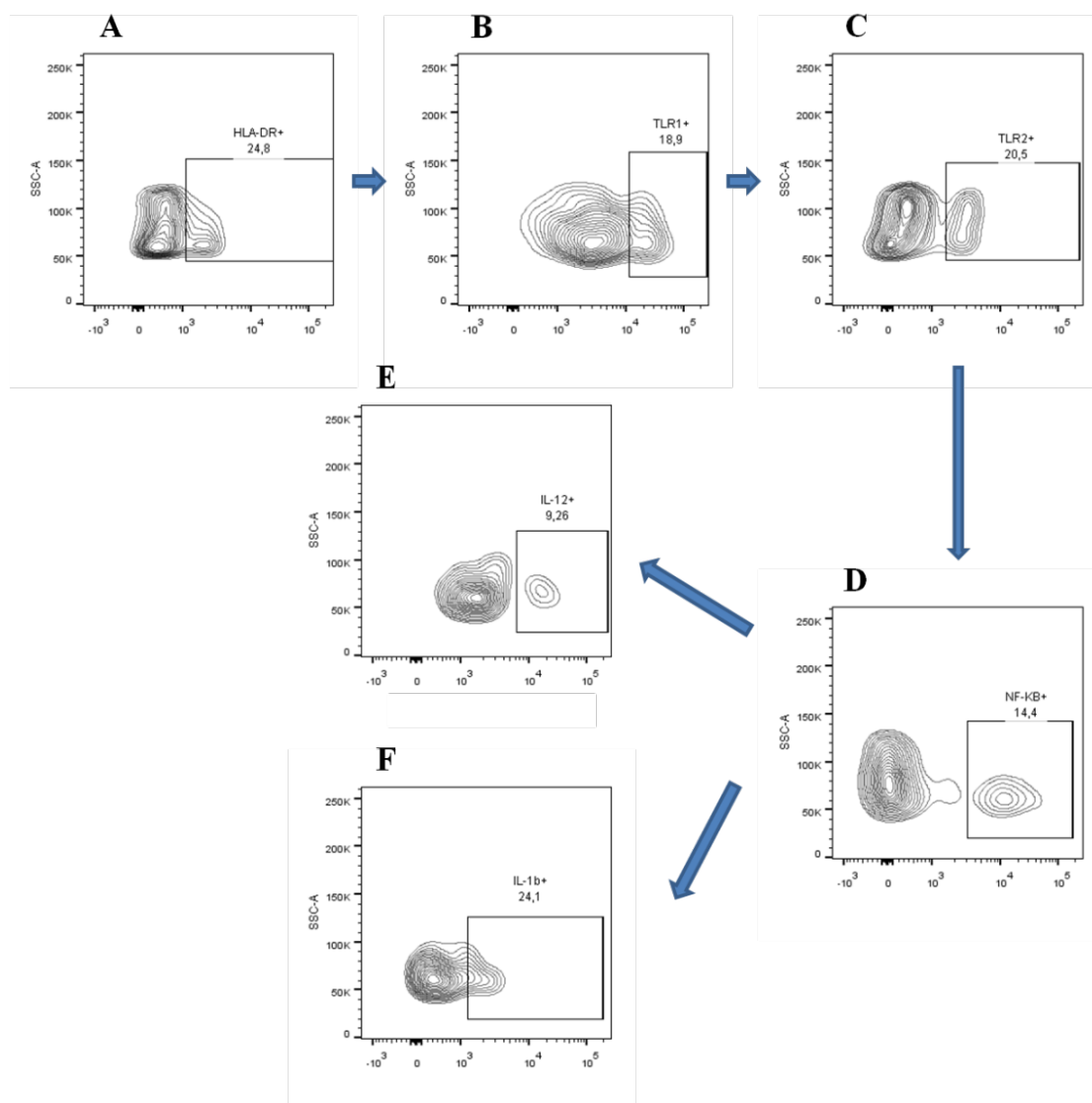


Figura 6. Análise do perfil fenotípico dos macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico após estimulação com antígeno de *M. leprae*. **A** representa SSC *versus* densidade de fluorescência para HLA-DR (AF700). **B** representa SSC *versus* densidade de fluorescência para TLR1⁺ (eFluor660). **C** representa SSC *versus* densidade de fluorescência para TLR2⁺ (FITC). **D** representa SSC *versus* densidade de fluorescência para NF-κB⁺ (PE-CY7). **E** e **F** representam as análises da expressão das citocinas IL-12 e IL-1β, respectivamente.

4.6.3 Estratégias de análise para a caracterização das subpopulações de linfócitos

Para caracterizar o perfil fenotípico dos linfócitos e do sangue periférico e suas subpopulações, inicialmente foi criado um gráfico de tamanho celular (*forward scatter* - FSC) *versus* densidade de fluorescência para CD3 (FITC), sendo selecionado por uma janela – *gate* – a população de linfócitos total.

A próxima estratégia foi utilizada para a identificação das subpopulações de linfócitos T CD4⁺. Após seleção do *gate* na população total de linfócitos, foi criado um gráfico de tamanho celular (*forward scatter* - FSC) *versus* densidade de fluorescência para CD4 (APC-Cy7), permitindo a identificação e seleção da subpopulação de linfócitos T CD4⁺ (Figura 7A).

Em seguida, para avaliar a expressão de CD45RO, foi criado um gráfico de densidade de fluorescência para CD45RO (PerCP-Cy5) *versus* densidade de fluorescência para CD4 (APC-Cy7; Figura 7B). A próxima etapa correspondeu à avaliação do perfil fenotípico-funcional das subpopulações de linfócitos T CD4⁺, com foco na expressão das moléculas IFN- γ e IL-10 (Figura 7C-D). Todas as análises foram realizadas com base no percentual e na intensidade média de fluorescência (IMF), utilizando gráficos de histograma para quantificar a expressão dos marcadores de interesse.

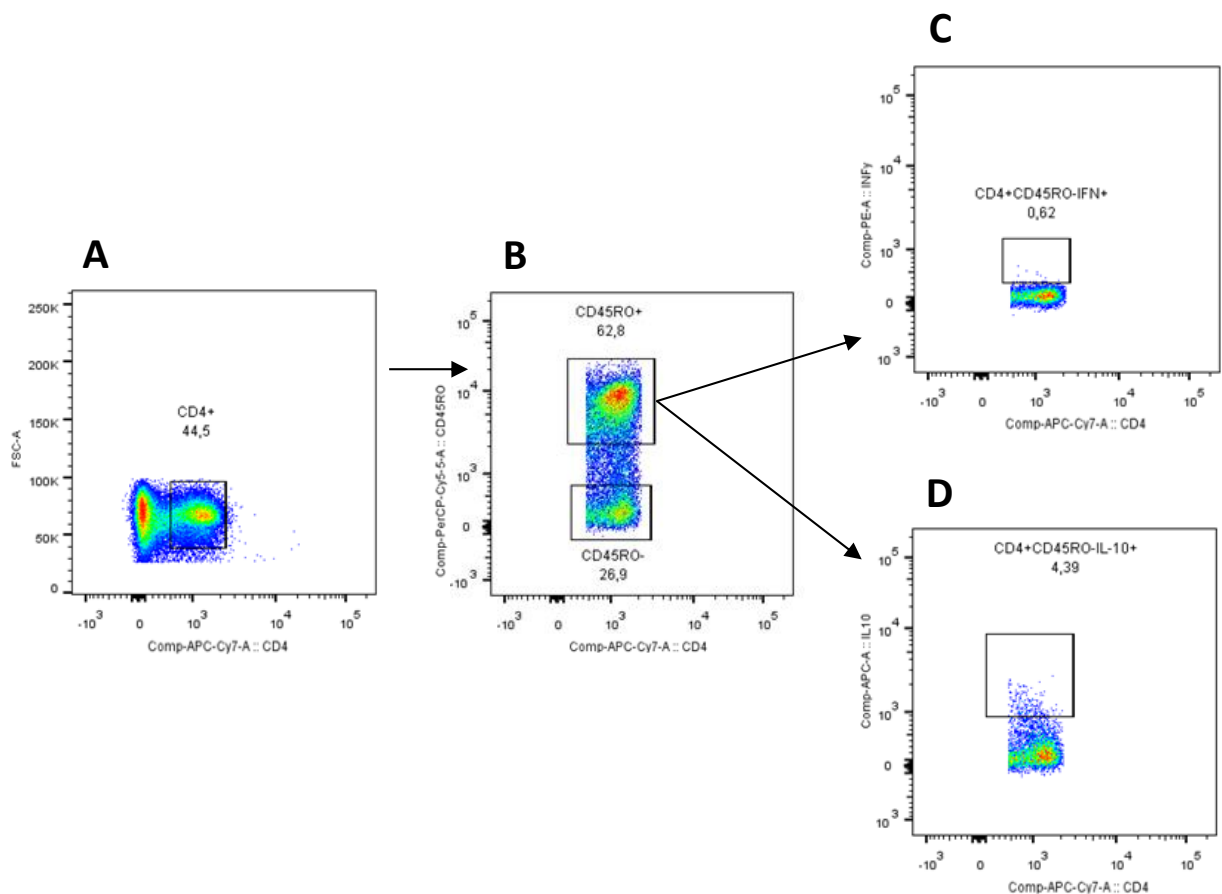


Figura 7. Análise do perfil fenotípico dos linfócitos do sangue periférico e suas subpopulações, por citometria de fluxo. **A** representa o perfil da subpopulação de linfócitos T CD4⁺. **B** representa o perfil da subpopulação de linfócitos T CD4⁺ em relação à expressão de CD45RO (PerCP-Cy5), selecionada no *gate* em gráfico de densidade de fluorescência para CD45RO *versus* densidade de fluorescência para CD4 (APC-Cy7). **C** e **D** representam o perfil de análise da expressão de IFN- γ e IL-10 pelas subpopulações de linfócitos T CD4⁺ do sangue periférico, respectivamente.

4.7 Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados com o apoio instrumental do *software* GraphPad Prism 5.00 (Prism Software, Irvine, EUA). As diferenças estatísticas foram detectadas utilizando ANOVA seguida de pós-testes de Bonferroni. Os dados obtidos foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de p foi menor do que 0,05 ($p < 0,05$).

5.2 Pacientes paucibacilares apresentam aumento no percentual e na intensidade média de fluorescência de macrófagos derivados de monócitos ativados, duplo positivos para TLR1/2 (CD14⁺HLA-DR⁺TLR1⁺TLR2⁺NF- κ B⁺) e produtores das citocinas IL-12 e IL-1 β , em comparação a pacientes multibacilares

Os macrófagos CD14⁺HLA-DR⁺TLR1⁺TLR2⁺NF- κ B⁺ de pacientes PB apresentaram um aumento significativo no percentual de células positivas para IL-12 em comparação aos indivíduos saudáveis ($p=0,0046$; 1,6 vezes) e ao grupo MB ($p=0,0046$; 2,3 vezes) (Figura 9A). Além disso, o percentual dessas células foi significativamente maior nos controles em relação aos MB ($p=0,0230$; 1,5 vezes), com um incremento de aproximadamente 1,5 vezes (Figura 9A).

De maneira semelhante, o percentual de células positivas para IL-1 β foi significativamente maior no grupo PB em relação aos controles ($p=0,0147$; 1,6 vezes) e ao grupo MB ($p=0,0192$; 1,9 vezes; Figura 9C).

Além do aumento no percentual de células produtoras dessas citocinas, verificou-se que a IMF para IL-12 foi significativamente maior nos pacientes PB em comparação aos controles ($p=0,0461$; 1,4 vezes) e ao grupo MB ($p=0,0250$; 1,7 vezes). Além disso, os controles também apresentaram uma IMF de IL-12 significativamente maior em relação aos MB ($p=0,0270$; 1,2 vezes; Figura 9B).

No caso da IMF para IL-1 β , observou-se um aumento significativo nos PB apenas em relação ao grupo controle ($p=0,0295$; 1,4 vezes; Figura 9D).

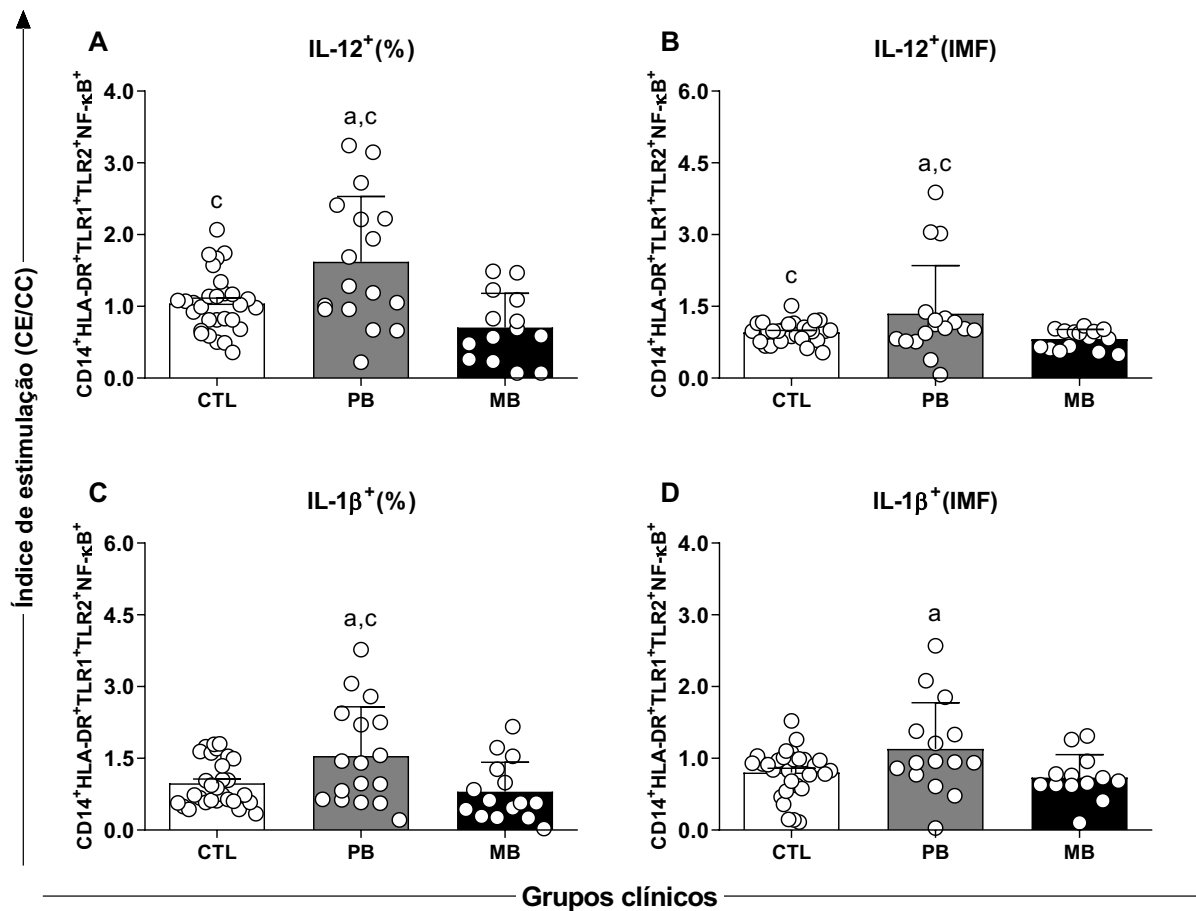


Figura 9. Análise de macrófagos derivados de monócitos ativados, duplo positivos para TLR1/2 e produtores das citocinas IL-12 ($CD14^+HLA-DR^+TLR1^+TLR2^+NF-\kappa B^+IL-12^+$) e IL-1 β ($CD14^+HLA-DR^+TLR1^+TLR2^+NF-\kappa B^+IL-1\beta^+$), expressos em valores percentuais (A e C) e por intensidade média de fluorescência (IMF; B e D), após estímulo com antígeno de Mitsuda. Os resultados estão apresentados como dados de dispersão com sobreposição de gráficos de barra (média+SD). Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos CTL, PB e MB estão demonstradas nos gráficos pelas letras “a”, “b” e “c”, respectivamente.

5.3 Estimulação de linfócitos T $CD4^+CD45RO^+$ de pacientes multibacilares com antígeno de *M. leprae* induziu ao aumento da produção de IL-10 e à redução da produção de IFN- γ nessas células, em comparação a pacientes com hanseníase paucibacilar

Os linfócitos T $CD4^+CD45RO^+$ produtores de IFN- γ apresentaram um percentual significativamente maior no grupo PB em comparação aos grupos controle ($p=0,0060$; 1,7 vezes maior) e MB ($p=0,0012$; 2,6 vezes maior; Figura 10A). Além disso, os controles também exibiram um percentual significativamente superior ao grupo MB ($p=0,0435$; 1,5 vezes maior; Figura 10A).

De maneira semelhante, a expressão intracelular de IFN- γ , representada pela IMF, foi significativamente mais elevada nos pacientes controles e PB em relação ao grupo MB ($p=0,0010$; 1,7 vezes maior; $p=0,0001$; 1,9 vezes maior; respectivamente; Figura 10B).

Os linfócitos T CD4⁺CD45RO⁺IL-10⁺ tiveram um percentual significativamente maior no grupo MB em comparação ao grupo PB ($p=0,0054$; 2,2 vezes maior; Figura 10C). Além disso, a IMF para IL-10 foi significativamente mais elevada no grupo MB em relação aos grupos controle e PB ($p=0,0009$; 1,5 vezes maior; $p=0,0042$; 1,6 vezes maior; Figura 10D).

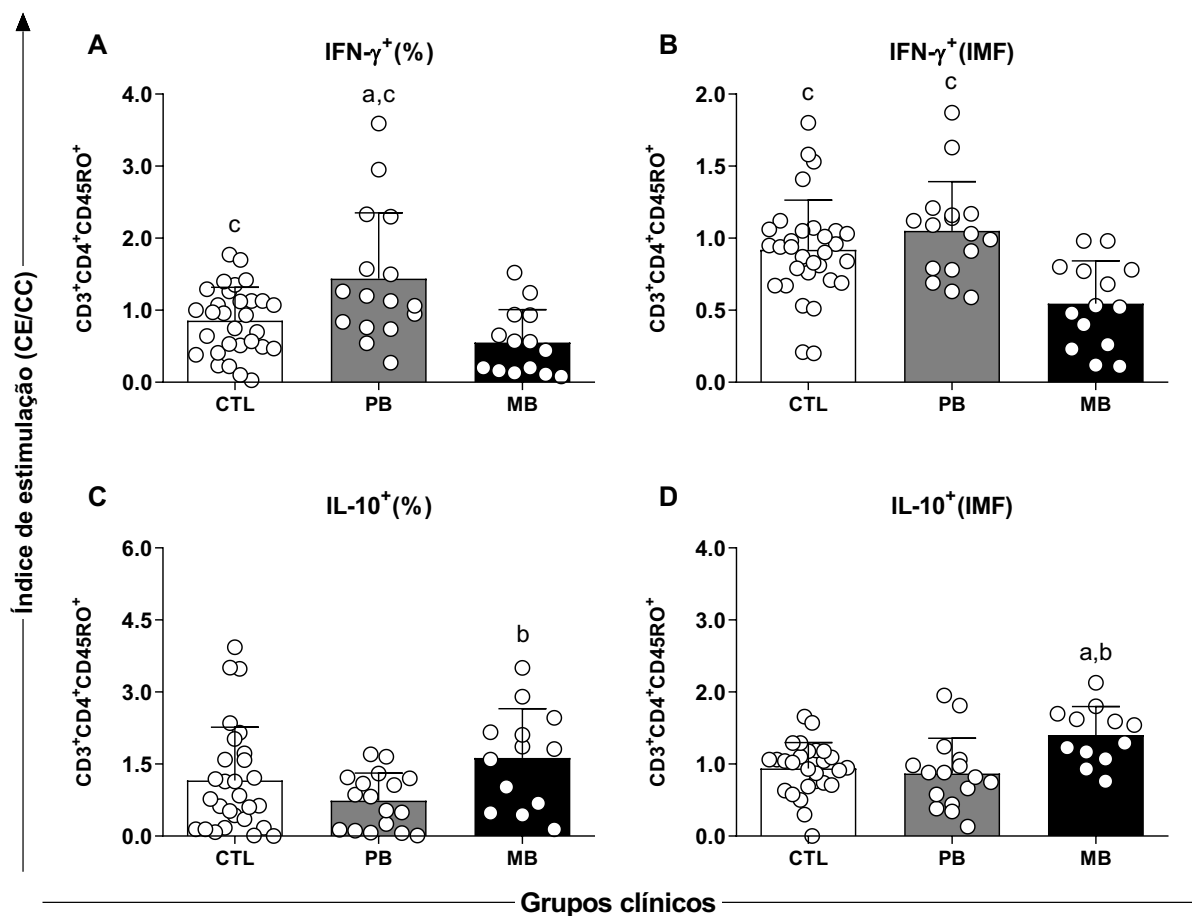


Figura 10. Análise do percentual de linfócitos T CD4⁺ ativados e produtores de IFN- γ (A) e IL-10 (C) e da IMF para essas citocinas (B e D, respectivamente), após estímulo com antígeno de Mitsuda. Os resultados foram apresentados como dados de dispersão com sobreposição de gráficos de barra (média+SD). Diferenças estatísticas ($p<0,05$) entre os grupos CTL, PB e MB estão demonstradas nos gráficos pelas letras "a", "b" e "c", respectivamente.

As razões de citocinas foram estabelecidas para avaliar o predomínio de subpopulações de linfócitos T CD4⁺ associadas as respostas T_{H1} (IFN- γ^+) e T_{Reg} (IL-10⁺). Em

relação à razão IFN- γ /IL-10, o grupo PB apresentou aumento significativo no percentual de células positivas, sendo 28,5 vezes maior em comparação ao grupo MB ($p < 0,05$; Tabela 4). Além disso, ao avaliarmos a IMF para a razão IFN- γ /IL-10, também foi observado um aumento significativo no grupo PB, que foi 5,14 vezes maior do que no grupo MB ($p < 0,05$; Tabela 4).

Tabela 4. Razão da produção de citocinas de subpopulação de linfócitos T CD4⁺.

Subpopulação de linfócito	Razão da produção de citocinas	Grupos Clínicos		
		Controle	Paucibacilar	Multibacilar
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45R0 ⁺	IFN- γ ⁺ /IL-10 ⁺ (%)	0,78 \pm 0,79 ^c	4,56 \pm 4,51 ^{a,c}	0,16 \pm 0,12
	IFN- γ ⁺ /IL-10 ⁺ (IMF)	0,91 \pm 0,56 ^c	1,85 \pm 1,54 ^{a,c}	0,36 \pm 0,27

Dados apresentados como média \pm SD. Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) comparando os grupos Controle, Paucibacilar e Multibacilar estão representados nas tabelas pelas letras "a", "b" e "c", respectivamente.

*Índice de estimulação foi calculado utilizando a partir da razão dos valores obtidos entre a cultura estimulada (antígeno de *M. leprae*) e a cultura controle (apenas meio RPMI).

6 DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo investigar o papel de marcadores intracelulares e de superfície em leucócitos, com ênfase nos TLRs, na modulação da resposta imune e na diferenciação das formas clínicas da hanseníase. Nossos achados revelaram perfis imunológicos distintos entre pacientes PB e MB, evidenciando diferenças significativas na interação entre o sistema imune e o *M. leprae*.

A análise comparativa entre os grupos revelou um aumento significativo no percentual e na produção intracelular de IL-12 por macrófagos CD14⁺HLA-DR⁺TLR1⁺TLR2⁺NF-κB⁺ nos pacientes PB. Esses indivíduos apresentaram os maiores valores, seguidos pelos controles, enquanto os MB exibiram os menores. Esse padrão sugere que, mesmo na ausência de infecção ativa, os macrófagos de indivíduos saudáveis apresentam níveis intermediários de IL-12, o que pode refletir um estado de regulação homeostática dessa citocina. De fato, estudos indicam que a produção de IL-12 por macrófagos é altamente regulada e depende da ativação de PRRs e da sinalização via NF-κB e IRF-1, garantindo um equilíbrio entre a capacidade de resposta imunológica e a prevenção de inflamação excessiva em condições homeostáticas (ULLRICH; SCHULZE; PAAP; MULLER *et al.*, 2020; ZHENG; BAN; WEI; MA, 2016).

Na hanseníase PB, a ativação dessas células parece ser fortemente induzida pela presença do bacilo, possivelmente refletindo um mecanismo compensatório para conter a infecção e contribuindo para a menor carga bacilar observada nesses pacientes. Em contraste, na hanseníase MB, a ativação reduzida dos macrófagos pode indicar um ambiente imunorregulador, potencialmente mediado por IL-10 e TGF-β, que inibem a expressão de IL-12 e favorecem a persistência do *M. leprae* (ALREHAILI, 2023).

A IL-12 desempenha um papel central na resposta imune, promovendo a diferenciação de linfócitos TCD4⁺ em células T_H1, a ativação de células NK e LTCD8⁺, e o aumento da produção de IFN-γ, potencializando a citotoxicidade celular. Além disso, sua sinalização via STAT4 regula a expressão de genes pró-inflamatórios, destacando sua relevância tanto na imunidade inata quanto na adaptativa (ULLRICH; SCHULZE; PAAP; MULLER *et al.*, 2020).

A função da IL-12 na modulação da resposta imune também é evidente na hanseníase. Carvalho *et al.* (2024) demonstraram, por imunoenensaio multiplex (Luminex), níveis elevados

de IL-12 no plasma de pacientes PB (DE CARVALHO; PASCOAL-XAVIER; ARAUJO; TEIXEIRA-CARVALHO *et al.*, 2024). Nossos achados corroboram essa tendência, evidenciando que a ativação de TLR1/TLR2 em macrófagos está associada a um perfil inflamatório mais intenso nos PB, caracterizado pelo aumento da produção de IL-12.

Em relação ao percentual de macrófagos CD14⁺HLA-DR⁺TLR1⁺TLR2⁺NF-κB⁺IL-1β⁺, observamos um aumento significativo nos PB em comparação aos controles e MB, reforçando o perfil inflamatório mais intenso desta forma clínica. Esse achado está alinhado com o papel bem estabelecido da IL-1β na resposta imune inata, onde essa citocina atua na ativação de macrófagos e na indução da formação de granulomas, processos essenciais para o controle do *M. leprae* (JUNG; VANKAYALAPATI; SAMTEN, 2021).

No entanto, diferentemente do observado para IL-12, os controles não apresentaram percentuais significativamente superiores aos MB. Essa diferença entre os grupos pode ser atribuída à regulação mais complexa da IL-1β, cuja ativação ocorre em múltiplas etapas, diferentemente de outras citocinas pró-inflamatórias, como a própria IL-12, cuja expressão é diretamente induzida por TLRs e NF-κB (ULLRICH; SCHULZE; PAAP; MULLER *et al.*, 2020; WANG; MA; SU; LIU *et al.*, 2025).

A produção de IL-1β segue um mecanismo regulatório em duas etapas. O primeiro sinal, mediado por PRRs como TLRs e a família dos *NOD-like receptors* (NLRs), induz a transcrição do gene da pró-IL-1β, gerando uma forma inativa dessa citocina. Dentre os NLRs, destaca-se o NLRP3, um sensor intracelular que, ao ser ativado, participa da montagem do inflamassoma NLRP3. Esse complexo multiproteico intracelular detecta padrões de perigo e estresse celular, recrutando e ativando a caspase-1, que cliva a pró-IL-1β em sua forma biologicamente ativa, promovendo a liberação de IL-1β e IL-18 (WANG; MA; SU; LIU *et al.*, 2025).

Nos controles, a ativação basal de TLRs pode ser suficiente para manter um nível moderado de ativação de NF-κB, garantindo um equilíbrio entre a vigilância imunológica e a prevenção de inflamação exacerbada. No entanto, na ausência de um estímulo inflamatório adicional, como a infecção ativa, a conversão da pró-IL-1β em sua forma ativa pode ser restrita. Isso pode explicar por que os controles não apresentaram percentuais significativamente superiores aos MB: embora ambos os grupos tenham uma ativação inflamatória limitada, os mecanismos envolvidos são diferentes.

Nos MB, a ativação da via inflamatória pode estar comprometida por mecanismos imunossupressores, apesar da presença do *M. leprae*. Estudos sugerem que, embora esses

pacientes apresentem alta expressão do sensor NLRP3 e das caspases-4/5, a ativação do inflamassoma NLRP3 e a produção de IL-1 β e IL-18 são reduzidas. Esse efeito pode indicar um bloqueio na via canônica do inflamassoma, possivelmente mediado por citocinas imunossupressoras como IL-10 e TGF- β , que regulam negativamente a ativação do NF- κ B e restringem a conversão da pró-IL-1 β na sua forma ativa. De fato, essa ineficiência na ativação do inflamassoma na hanseníase MB assemelha-se ao observado para *M. tuberculosis*, que inibe a ativação da caspase-1 e o processamento de IL-1 β , impedindo a montagem de uma resposta inflamatória efetiva (DE CARVALHO; PASCOAL-XAVIER; ARAUJO; TEIXEIRA-CARVALHO *et al.*, 2024; MENDES; JOAQUIM; ZAMAE; ASSIS *et al.*, 2020).

Dessa forma, enquanto a hanseníase PB exhibe um ambiente inflamatório mais favorável à ativação do inflamassoma e consequente produção de IL-1 β , a hanseníase MB pode apresentar mecanismos inibitórios que reduzem essa ativação. Embora MB e controles compartilhem um perfil inflamatório reduzido, essa semelhança ocorre por razões distintas: nos controles, pela ausência de infecção ativa; nos MB, devido à regulação ativa da inflamação pelo bacilo e por citocinas imunorreguladoras.

Já em relação à IMF de IL-1 β , observamos que os PB apresentaram valores significativamente mais elevados do que os controles, mas sem diferença estatística em relação aos MB. Assim como observado no percentual de macrófagos IL-1 β ⁺, os controles exibiram menor produção por célula, mesmo após estimulação com antígeno solúvel de *M. leprae*. Esse achado pode refletir a ausência de exposição crônica prévia ao bacilo, diferentemente dos pacientes PB e MB, cujas células provavelmente já foram condicionadas por múltiplos estímulos antigênicos *in vivo*. Nos PB, a combinação entre memória imunológica e ativação de PRRs parece potencializar a produção dessa citocina, favorecendo um ambiente inflamatório mais intenso.

Por outro lado, a ausência de diferença estatística na IMF de IL-1 β entre PB e MB sugere que, embora os PB apresentem uma maior proporção de macrófagos IL-1 β ⁺, as células que expressam essa citocina nos MB podem estar produzindo IL-1 β em níveis comparáveis. No entanto, essa observação não se traduz necessariamente em uma resposta inflamatória efetiva nos MB, indicando que mecanismos pós-produção podem estar modulando a bioatividade da citocina.

Uma hipótese plausível é que a liberação extracelular da IL-1 β esteja comprometida nos MB. Estudos recentes demonstram que a sinalização de IL-23/IL-23R é essencial para a ativação do inflamassoma e a indução da piroptose, processo mediado por caspase-1 e

gasdermina D, que permite a liberação de IL-1 β madura para o meio extracelular (WANG; LIU; WANG; LI *et al.*, 2023). No entanto, a produção e a sinalização de IL-23 podem estar comprometidas nos MB. Em condições normais, a IL-23 é produzida por células mieloides em resposta a danos teciduais ou insultos patogênicos, promovendo a expansão e a sobrevivência de linfócitos T_H17 e outras células tipo-17, que desempenham um papel crucial na defesa contra patógenos intracelulares (KRUEGER; EYERICH; KUCHROO; RITCHLIN *et al.*, 2024; ZANIOLO; DAMAZO, 2023).

Na hanseníase MB, o microambiente imunorregulador, caracterizado pela elevada produção de citocinas anti-inflamatórias e pela expressão de receptores inibitórios, pode inibir a função das células mieloides, comprometendo a produção de IL-23 e, conseqüentemente, a ativação do inflamassoma e a liberação de IL-1 β (DA SILVA; DA SILVA CAVALCANTE; FONSECA JUNIOR; DA SILVA *et al.*, 2021). Além disso, a disfunção na sinalização de IL-23/IL-23R pode limitar a expansão e a manutenção das células T_H17, contribuindo para a persistência do *M. leprae* e para a ineficácia da resposta inflamatória nos MB. Outra possibilidade é que a ativação de vias alternativas de liberação de IL-1 β – como a necroptose (mediada pela proteína MLKL) ou a caspase-8 – também esteja comprometida na hanseníase MB, favorecendo a falha na liberação extracelular dessa citocina (EVAVOLD; KAGAN, 2022).

No meio extracelular, há indícios de que a IL-1 β liberada nos MB seja neutralizada por receptores solúveis, como o IL-1RA (antagonista do receptor de IL-1), que se liga ao receptor IL-1R1 sem ativá-lo, bloqueando a sinalização da IL-1 β e limitando seus efeitos pró-inflamatórios (EVAVOLD; KAGAN, 2022). Em particular, a IL-1RA é amplamente produzida na hanseníase MB, sendo induzida em macrófagos expostos ao PGL-1 – componente da parede celular do *M. leprae*. Nessas condições, observa-se não apenas o aumento na expressão de mediadores reguladores, como MCP-1 e IL-1RA, mas também a supressão de citocinas inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α (FROES; SOTTO; TRINDADE, 2022). Esse mecanismo revela um efeito combinado do PGL-1: além de induzir a liberação de IL-1RA, suprime diretamente a produção de citocinas inflamatórias, consolidando o ambiente imunossupressor característico dos MB.

Além dos mecanismos já discutidos, é plausível que a degradação acelerada de IL-1 β por metaloproteinases (MMPs) contribua para sua baixa bioatividade em MB. Embora esse processo ainda não tenha sido demonstrado diretamente na hanseníase, evidências indiretas apoiam sua relevância: pacientes MB exibem níveis elevados de MMP-2 e MMP-9 no soro e

lesões cutâneas, enzimas conhecidas por clivar IL-1 β em outras infecções crônicas, como tuberculose. Adicionalmente, o PGL-1 do *M. leprae* também induz a produção de MMP-9 em macrófagos, sugerindo que possa existir uma relação entre PGL-1, MMP-9 e degradação de IL-1 β (MARETTI-MIRA; DE PINHO RODRIGUES; DE OLIVEIRA-NETO; PIRMEZ *et al.*, 2011; SABIR; HUSSAIN; MANGI; ZHAO *et al.*, 2019; TELES; TELES; AMADEU; MOURA *et al.*, 2010).

Esses mecanismos de supressão da resposta imune inata nos MB – envolvendo tanto a regulação da produção quanto da bioatividade de IL-1 β – se complementam com alterações igualmente marcantes na resposta adaptativa. A análise do percentual de linfócitos T CD4⁺CD45RO⁺ produtores de IFN- γ revelou o padrão clássico da hanseníase: valores significativamente maiores nos pacientes PB, intermediários nos controles e reduzidos nos MB. Esse gradiente corrobora plenamente a associação das formas PB com uma resposta do tipo T_{H1} robusta, essencial para o controle intracelular do *M. leprae*, enquanto nos MB, a menor frequência de células produtoras reflete o ambiente imunossupressor predominante, mediado por Tregs e citocinas como IL-10 e TGF- β , capazes de inibir a diferenciação de células efetoras do tipo T_{H1} (CABRAL; DE FIGUEIREDO; GANDINI; DE SOUZA *et al.*, 2022).

A avaliação da IMF de IFN- γ por célula demonstrou um padrão distinto: enquanto os MB mantiveram os valores mais baixos – coerentes com seu perfil imunológico –, PB e controles apresentaram níveis comparáveis. Esta dissociação entre frequência de células produtoras e funcional individual sugere que, embora os controles disponham de menor número de células T específicas, estas mantêm uma produção robusta de IFN- γ .

Essa hipótese é plausível no contexto brasileiro, onde a vacinação universal com BCG e a alta endemicidade de tuberculose favorecem o desenvolvimento de células T de memória com reatividade cruzada a antígenos micobacterianos compartilhados (CORTEZ; MELO; NEVES; RESENDE *et al.*, 2021; GOUDOURIS; ARANDA; SOLE, 2023; LI; DANG; DU; XU *et al.*, 2024). Adicionalmente, a análise gráfica sugere a presença de *outliers* no grupo controle (Figura 10B), que podem ter inflado a média da IMF. Testes estatísticos não paramétricos, como o de Kruskal-Wallis, podem ajudar a esclarecer a robustez dessa observação.

Com relação à IL-10, observou-se um aumento significativo tanto no percentual quanto na IMF de células CD4⁺CD45RO⁺IL-10⁺ no grupo MB quando comparado ao grupo PB. Além disso, a IMF também foi significativamente maior no grupo MB em relação aos

controles. Esses achados reforçam o papel central da IL-10 na modulação imunológica da hanseníase MB. A produção elevada dessa citocina está em consonância com estudos que demonstram sua conhecida ação imunossupressora, que inclui a inibição da produção de IFN- γ por células T_{H1} e a redução da atividade microbicida de macrófagos. A regulação da IL-10 por vias como Jak1/Tyk2-STAT3, influenciada por fatores metabólicos e epigenéticos, explica em parte a maior IMF observada no grupo MB, onde possivelmente a persistência antigênica crônica mantém uma ativação sustentada destes mecanismos (CARLINI; NOONAN; ABDALALEM; GOLETTI *et al.*, 2023).

A associação entre IL-10 e células T reguladoras (Tregs) FOXP3⁺ corrobora estes achados. Estudos anteriores já haviam demonstrado maior frequência de Tregs produtoras de IL-10 nas formas MB, em contraste com a predominância de células T_{H17} nas formas PB (CHAVES; RIBEIRO-JUNIOR; LYON; MEDEIROS *et al.*, 2018; FROES; SOTTO; TRINDADE, 2022; SADHU; KHAITAN; JOSHI; SENGUPTA *et al.*, 2016). Nossos dados complementam estas observações, revelando que na forma MB ocorre não apenas um aumento na frequência, mas também hiperatividade funcional destas células.

Em contraste, a análise do percentual de células IL-10⁺ não revelou diferenças significativas entre pacientes PB e controles, apesar da menor IMF observada no grupo PB em comparação ao MB. Esta dissociação pode refletir a natureza pleiotrópica da IL-10: embora tradicionalmente vista como uma citocina imunossupressora, atuando sobre células T_{H1}, macrófagos e na apresentação antigênica, estudos recentes destacam seu papel dual. Em contextos de inflamação crônica, como na hanseníase MB, atua predominantemente como supressora, enquanto em microambientes específicos pode exercer efeitos imunoestimuladores, como na ativação de células B, NK e T CD8⁺ (CABRAL; DE FIGUEIREDO; GANDINI; DE SOUZA *et al.*, 2022; CARLINI; NOONAN; ABDALALEM; GOLETTI *et al.*, 2023).

Na forma PB, a menor carga antigênica pode favorecer um equilíbrio onde a IL-10 opera mais como moduladora do que como supressora, não exigindo expansão clonal em termos de porcentagem celular, mas mantendo funções regulatórias básicas, conforme sugerido pela IMF reduzida. Esta interpretação está alinhada com evidências recentes que repensam a IL-10 como um regulador contextual, com funções que vão além da simples supressão imunológica.

A compreensão destes achados deve considerar ainda a influência de fatores como história imunológica individual, polimorfismos genéticos – incluindo variantes nos loci

promotores da IL-10 associadas à maior produção desta citocina em formas MB – e exposição prévia a micobactérias, que podem contribuir para a variabilidade observada (MI; LIU; ZHANG, 2020; TARIQUE; NAZ; SAINI; SUHAIL *et al.*, 2020). Estes elementos, somados às características pleiotrópicas da IL-10, ajudam a explicar as diferenças qualitativas nos perfis imunorregulatórios das distintas formas clínicas da hanseníase, evidenciando que a forma PB apresenta um padrão distinto, com menor dependência das vias reguladas por IL-10 em comparação à forma MB.

A análise da razão IFN- γ /IL-10 em linfócitos T CD4⁺ revelou uma disparidade marcante entre as formas clínicas. O grupo PB apresentou valores 28,5 vezes maiores no percentual de células positivas e 5,14 vezes maiores na IMF em comparação ao MB, refletindo a polarização oposta entre os eixos T_H1 (protetor) e regulatório (IL-10/Tregs). Enquanto o PB mantém uma resposta T_H1 robusta, com alta produção de IFN- γ para ativação macrofágica e controle bacilar, o MB mostra predominância da via regulatória, com supressão da resposta efetora pela ação combinada de IL-10 e Tregs – um desbalanço que perpetua a infecção.

A razão IFN- γ /IL-10 destaca-se como uma ferramenta metodologicamente superior por sua capacidade de refletir o balanço dinâmico entre vias imunológicas antagônicas, superando limitações associadas à análise isolada de citocinas. A mensuração de proporções entre mediadores com funções opostas pode oferecer uma estimativa mais acurada do estado imunológico global do que a simples quantificação de níveis absolutos (SAMUEL, 2020). No presente estudo, a diferença mais pronunciada observada no percentual celular (28,5x) em relação à IMF (5,14x) sugere que, na forma MB, o principal mecanismo de supressão envolve a expansão clonal de células Tregs, mais do que o aumento da produção de IL-10 por célula.

A aplicação da razão IFN- γ /IL-10 como marcador funcional tem sido investigada também em outros contextos infecciosos, reforçando sua utilidade translacional. Em um estudo conduzido com pacientes em choque séptico, essa razão demonstrou valor preditivo para resposta ao tratamento: níveis elevados de IFN- γ /IL-10 associaram-se a melhor prognóstico no grupo placebo, enquanto níveis reduzidos indicaram benefício com o uso de hidrocortisona, viabilizando uma abordagem terapêutica personalizada (KONIG; KOLTE; AHLERS; OSWALD *et al.*, 2021). Esses achados reforçam o potencial da razão IFN- γ /IL-10 como indicador funcional do perfil imune predominante e como ferramenta promissora para a estratificação imunológica em doenças infecciosas, o que sustenta sua aplicabilidade na hanseníase como métrica relevante para diferenciar as formas clínicas.

Em conjunto, nossos resultados demonstram que a resposta imune na hanseníase é modulada de forma distinta entre as formas PB e MB, com os TLRs desempenhando um papel central nesta polarização. Os pacientes PB apresentaram um perfil inflamatório robusto, caracterizado pela ativação de macrófagos $CD14^+HLA-DR^+TLR1^+TLR2^+NF-\kappa B^+$ e produção elevada de IL-12 e IL-1 β , e aumento significativo na frequência de linfócitos T $CD3^+CD4^+CD45RO^+$ produtores de IFN- γ . Em contraste, os MB exibiram um padrão imunorregulador marcado por maior produção de IL-10 nestas mesmas células T, acompanhado de redução na razão IFN- γ /IL-10. Estes achados corroboram nossa hipótese de que a sinalização através de TLRs e suas vias de ativação subsequentes, como a via do NF- κB , são determinantes críticos na definição das formas clínicas da hanseníase, regulando o equilíbrio entre respostas inflamatórias e regulatórias. A análise combinada destes marcadores funcionais, particularmente a razão IFN- γ /IL-10, demonstrou ser um parâmetro robusto para diferenciar os perfis imunológicos das formas PB e MB da doença.

Apesar desses avanços, é importante reconhecer as limitações deste estudo. A impossibilidade de cultivo *in vitro* do *M. leprae* e a falta de modelos animais que reproduzam fielmente o espectro humano da doença restringiram investigações mais detalhadas sobre os mecanismos moleculares envolvidos. Além disso, a análise restrita às CMSPs pode não refletir completamente a resposta imune no microambiente das lesões cutâneas, e a variabilidade etária pode ter influenciado a dispersão dos dados. Futuras investigações poderiam explorar a avaliação de lesões cutâneas, a caracterização fenotípica detalhada de subpopulações de Tregs e T_H17, e a análise de polimorfismos em genes de TLRs e citocinas associadas. Estudos longitudinais pós-tratamento também seriam valiosos para avaliar a dinâmica imunológica ao longo da terapia.

No entanto, os rigorosos controles metodológicos adotados, incluindo a citometria de fluxo multiparamétrica com marcadores de viabilidade (LIVE/DEAD™) e bloqueio de Fc γ R, asseguraram a confiabilidade dos dados. A combinação de marcadores de superfície e intracelulares permitiu desvendar perfis funcionais distintos entre PB e MB, validando a relevância dos TLRs como alvos potenciais para estratégias de modulação imunológica. Nossos resultados não apenas aprofundam a compreensão da patogênese da hanseníase, mas também oferecem um modelo metodológico para investigar a polarização imune em outras doenças infecciosas crônicas, reforçando a importância da interação entre sistema imune inato e adaptativo na definição dos desfechos clínicos.

7 CONCLUSÃO

Pacientes com hanseníase MB apresentaram índice baciloscópico 25,2 vezes maior do que os PB, evidenciando a menor capacidade de controle da infecção por *M. leprae*. Pacientes com hanseníase PB apresentam maior ativação da imunidade inata, com predomínio de macrófagos CD14⁺HLA-DR⁺TLR1⁺TLR2⁺NF-κB⁺ produtores de IL-12 e IL-1β, além de resposta adaptativa do tipo T_H1, caracterizada por maior frequência e intensidade de produção de IFN-γ por linfócitos T CD4⁺CD45RO⁺. Em contraste, pacientes com hanseníase MB exibem maior frequência de linfócitos T CD4⁺CD45RO⁺ produtores de IL-10 e menor expressão de IFN-γ, refletindo um perfil imunorregulador associado à persistência bacilar. A razão IFN-γ/IL-10 demonstrou ser um marcador sensível para distinção dos perfis imunológicos, reforçando o papel do desequilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e regulatórias na polarização clínica da doença. Os achados indicam que a ativação de TLR1/2 em monócitos/macrófagos e a resposta T_H1 funcional estão associadas ao controle da carga bacilar e à forma clínica PB da hanseníase.

8 PERSPECTIVAS

- Ampliar a investigação para o tecido cutâneo, com o objetivo de correlacionar os achados do sangue periférico com o microambiente local das lesões.
- Caracterizar subpopulações específicas de linfócitos Treg e T_H17 por citometria de fluxo.
- Investigar de forma mais abrangente os componentes do inflamassoma, incluindo sensores, efetores e citocinas associadas, avaliando seu papel nas diferentes formas clínicas da hanseníase.
- Investigar vias de morte celular inflamatória, como piroptose (via gasdermina D) e necroptose (via MLKL), em amostras teciduais.
- Quantificar a produção de óxido nítrico por monócitos, dada sua importância como molécula efetora na resposta antimicrobiana contra micobactérias.
- Estudar polimorfismos genéticos em genes reguladores de citocinas (IL10, IFNG) e em TLR1/ TLR2, buscando associações com o espectro clínico da doença.
- Explorar a possibilidade de estudos longitudinais para monitorar a dinâmica das respostas imunes durante o tratamento e em episódios reacionais.
- Integrar os dados por meio de análise de Heat Map e agrupamento hierárquico para estabelecer associações entre biomarcadores da imunidade inata e adaptativa e as formas clínicas de hanseníase.
- Publicação de pelo menos um artigo científico em periódico de prestígio internacional, classificados como QUALIS A1 ou A2 pela CAPES.

9 ANEXOS

9.1 Anexo I: Aprovação do projeto pelo CEP/UFMG

Você está em: Público > Confirmar Aprovação pelo CAAE ou Parecer

CONFIRMAR APROVAÇÃO PELO CAAE OU PARECER

Informe o número do CAAE ou do Parecer:

Número do CAAE:	Número do Parecer:	
<input type="text" value="68583223.2.0000.5149"/>	<input type="text"/>	<input type="button" value="Pesquisar"/>

Esta consulta retorna somente pareceres aprovados. Caso não apresente nenhum resultado, o número do parecer informado não é válido ou não corresponde a um parecer aprovado.

DETALHAMENTO

Título do Projeto de Pesquisa:		
<input type="text" value="Estudo da Expressão de Receptores Toll-like 1/2 e de Mediadores da Imunidade Inata nas"/>		
Número do CAAE:	Número do Parecer:	
<input type="text" value="68583223.2.0000.5149"/>	<input type="text" value="6184798"/>	
Quem Assinou o Parecer:	Pesquisador Responsável:	
<input type="text" value="Corinne Davis Rodrigues"/>	<input type="text" value="Manoel Otávio da Costa Rocha"/>	
Data Início do Cronograma:	Data Fim do Cronograma:	Contato Público:
<input type="text" value="01/03/2023"/>	<input type="text" value="01/12/2024"/>	<input type="text" value="Manoel Otávio da Costa Rocha"/>

9.2 Anexo II: Aprovação do projeto pelo CEP/FHEMIG

Você está em: Público > Confirmar Aprovação pelo CAAE ou Parecer

CONFIRMAR APROVAÇÃO PELO CAAE OU PARECER

Informe o número do CAAE ou do Parecer:

Número do CAAE:

68583223.2.3001.5124

Número do Parecer:

[Pesquisar](#)

Esta consulta retorna somente pareceres aprovados. Caso não apresente nenhum resultado, o número do parecer informado não é válido ou não corresponde a um parecer aprovado.

DETALHAMENTO

Título do Projeto de Pesquisa:

Estudo da Expressão de Receptores Toll-like 1/2 e de Mediadores da Imunidade Inata nas

Número do CAAE:

68583223.2.3001.5124

Número do Parecer:

6190547

Quem Assinou o Parecer:

JADER BERNARDO CAMPOMIZZI

Pesquisador Responsável:

Manoel Otávio da Costa Rocha

Data Início do Cronograma:

01/03/2023

Data Fim do Cronograma:

01/12/2024

Contato Público:

null

10 REFERÊNCIAS

- ADU-BERCHIE, K.; OBUSEH, F. O.; MOONEY, D. J. T Cell Development and Function. **Rejuvenation Res**, 26, n. 4, p. 126-138, Aug 2023.
- ALEMU BELACHEW, W.; NAAFS, B. Position statement: LEPROSY: Diagnosis, treatment and follow-up. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, 33, n. 7, p. 1205-1213, Jul 2019.
- ALREHAILI, J. Leprosy Classification, Clinical Features, Epidemiology, and Host Immunological Responses: Failure of Eradication in 2023. **Cureus**, 15, n. 9, p. e44767, Sep 2023.
- ALTER, A.; GRANT, A.; ABEL, L.; ALCAIS, A. *et al.* Leprosy as a genetic disease. **Mamm Genome**, 22, n. 1-2, p. 19-31, Feb 2011.
- ALVARENGA NIITSUMA, E. N.; FERNANDES, G. D. R.; LANA, F. C. F. The TLR1 gene is associated with higher protection from leprosy in women. **PLoS One**, 13, n. 10, p. e0205234, 2018.
- BOCHUD, P. Y.; HAWN, T. R.; SIDDIQUI, M. R.; SAUNDERSON, P. *et al.* Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. **J Infect Dis**, 197, n. 2, p. 253-261, Jan 15 2008.
- BRASIL. NOTA TÉCNICA Nº 4/2020-CGDE/.DCCI/SVS/MS - Ampliação de uso da clofazimina para hanseníase paucibacilar no âmbito do Sistema Único de Saúde. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde. 2020.
- BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico de Hanseníase.** 2023.
- BUTLIN, C. R.; PAHAN, D.; MAUG, A. K. J.; WITHINGTON, S. *et al.* Outcome of 6 months MBMDT in MB patients in Bangladesh- preliminary results. **Lepr Rev**, 87, n. 2, p. 171-182, Jun 2016.
- BUTLIN, C. R. P., D.; Maug, A. K. J.; Withington, S.; Nicholls, P.; Alam, K.; Salim, A. H. Outcome of 6 months MBMDT in MB patients in Bangladesh- preliminary results. **Lepr Rev**, 87, p. 171-182, 2016.
- CABRAL, N.; DE FIGUEIREDO, V.; GANDINI, M.; DE SOUZA, C. F. *et al.* Modulation of the Response to Mycobacterium leprae and Pathogenesis of Leprosy. **Front Microbiol**, 13, p. 918009, 2022.
- CARDOSO, C. C.; PEREIRA, A. C.; BRITO-DE-SOUZA, V. N.; DIAS-BAPTISTA, I. M. *et al.* IFNG +874 T>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians. **Hum Genet**, 128, n. 5, p. 481-490, Nov 2010.

CARLINI, V.; NOONAN, D. M.; ABDALALEM, E.; GOLETTI, D. *et al.* The multifaceted nature of IL-10: regulation, role in immunological homeostasis and its relevance to cancer, COVID-19 and post-COVID conditions. **Front Immunol**, 14, p. 1161067, 2023.

CARVALHO, A.; FERRAZ, I. A.; HOJO-SOUZA, N. S.; MEDEIROS, F. A. C. *et al.* Chagas cardiomyopathy is associated with a high susceptibility to *T. cruzi* infection in monocyte-derived macrophages and a predominance of CD4(+)CD45RO(+) T-cells with immunoregulatory patterns. **Acta Trop**, 237, p. 106749, Jan 2023.

CARVALHO, J. C.; ARAUJO, M. G.; COELHO-DOS-REIS, J. G. A.; PERUHYPE-MAGALHAES, V. *et al.* Phenotypic and functional features of innate and adaptive immunity as putative biomarkers for clinical status and leprosy reactions. **Microb Pathog**, 125, p. 230-239, Dec 2018.

CASSIRER-COSTA, F.; MEDEIROS, N. I.; CHAVES, A. T.; LYON, S. *et al.* Cytokines as biomarkers to monitoring the impact of multidrug therapy in immune response of leprosy patients. **Cytokine**, 97, p. 42-48, Sep 2017.

CHATZILEONTIADOU, D. S. M.; SLOANE, H.; NGUYEN, A. T.; GRAS, S. *et al.* The Many Faces of CD4(+) T Cells: Immunological and Structural Characteristics. **Int J Mol Sci**, 22, n. 1, Dec 23 2020.

CHAVES, A. T.; RIBEIRO-JUNIOR, A. F.; LYON, S.; MEDEIROS, N. I. *et al.* Regulatory T cells: Friends or foe in human *Mycobacterium leprae* infection? **Immunobiology**, 223, n. 4-5, p. 397-404, Apr-May 2018.

CHEN, K. H.; LIN, C. Y.; SU, S. B.; CHEN, K. T. Leprosy: A Review of Epidemiology, Clinical Diagnosis, and Management. **J Trop Med**, 2022, p. 8652062, 2022.

CORTEZ, A. O.; MELO, A. C.; NEVES, L. O.; RESENDE, K. A. *et al.* Tuberculosis in Brazil: one country, multiple realities. **J Bras Pneumol**, 47, n. 2, p. e20200119, 2021.

DA SILVA, S. F.; DA SILVA CAVALCANTE, L. R.; FONSECA JUNIOR, E. A.; DA SILVA, J. M. *et al.* Analysis of the myeloid-derived suppressor cells and annexin A1 in multibacillary leprosy and reactional episodes. **BMC Infect Dis**, 21, n. 1, p. 1050, Oct 9 2021.

DE CARVALHO, J. C.; PASCOAL-XAVIER, M. A.; ARAUJO, M. G.; TEIXEIRA-CARVALHO, A. *et al.* Different profiles of chemokines, cytokines and cell growth factors in plasma samples from patients with leprosy, leprosy reactions and households contacts. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 119, p. e230129, 2024.

DE SOUSA, J. R.; SOTTO, M. N.; SIMOES QUARESMA, J. A. Leprosy As a Complex Infection: Breakdown of the Th1 and Th2 Immune Paradigm in the Immunopathogenesis of the Disease. **Front Immunol**, 8, p. 1635, 2017.

DE SOUZA, V. N.; IYER, A. M.; LAMMAS, D. A.; NAAFS, B. *et al.* Advances in leprosy immunology and the field application: A gap to bridge. **Clin Dermatol**, 34, n. 1, p. 82-95, Jan-Feb 2016.

DIAS, A. A.; SILVA, C. O.; SANTOS, J. P.; BATISTA-SILVA, L. R. *et al.* DNA Sensing via TLR-9 Constitutes a Major Innate Immunity Pathway Activated during Erythema Nodosum Leprosum. **J Immunol**, 197, n. 5, p. 1905-1913, Sep 1 2016.

EICHELMANN, K.; GONZALEZ GONZALEZ, S. E.; SALAS-ALANIS, J. C.; OCAMPO-CANDIANI, J. Leprosy. An update: definition, pathogenesis, classification, diagnosis, and treatment. **Actas Dermosifiliogr**, 104, n. 7, p. 554-563, Sep 2013.

EVAVOLD, C. L.; KAGAN, J. C. Diverse Control Mechanisms of the Interleukin-1 Cytokine Family. **Front Cell Dev Biol**, 10, p. 910983, 2022.

FONSECA, A. B.; SIMON, M. D.; CAZZANIGA, R. A.; DE MOURA, T. R. *et al.* The influence of innate and adaptative immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy. **Infect Dis Poverty**, 6, n. 1, p. 5, Feb 6 2017.

FROES, L. A. R., Jr.; TRINDADE, M. A. B.; SOTTO, M. N. Immunology of leprosy. **Int Rev Immunol**, 41, n. 2, p. 72-83, 2022.

FROES, L. A. R. J.; SOTTO, M. N.; TRINDADE, M. A. B. Leprosy: clinical and immunopathological characteristics. **An Bras Dermatol**, 97, n. 3, p. 338-347, May-Jun 2022.

GAZZINELLI, R. T.; LEME, V. M.; CANCADO, J. R.; GAZZINELLI, G. *et al.* Identification and partial characterization of *Trypanosoma cruzi* antigens recognized by T cells and immune sera from patients with Chagas' disease. **Infect Immun**, 58, n. 5, p. 1437-1444, May 1990.

GOUDOURIS, E.; ARANDA, C. S.; SOLE, D. Implications of the non-specific effect induced by *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) vaccine on vaccine recommendations. **J Pediatr (Rio J)**, 99 Suppl 1, n. Suppl 1, p. S22-S27, Mar-Apr 2023.

GOULART, I. M.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. [Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*]. **Rev Soc Bras Med Trop**, 35, n. 4, p. 365-375, Jul-Aug 2002.

GROSSI DE OLIVEIRA, A. L.; CHAVES, A. T.; CARDOSO, M. S.; PINHEIRO, G. R. G. *et al.* Reduced vitamin D receptor (VDR) and cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene expression contribute to the maintenance of inflammatory immune response in leprosy patients. **Microbes Infect**, 24, n. 6-7, p. 104981, Sep 2022.

IWANASZKO, M.; KIMMEL, M. NF-kappaB and IRF pathways: cross-regulation on target genes promoter level. **BMC Genomics**, 16, n. 1, p. 307, Apr 17 2015.

JOHNSON, C. M.; LYLE, E. A.; OMUETI, K. O.; STEPENSKY, V. A. *et al.* Cutting edge: A common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. **J Immunol**, 178, n. 12, p. 7520-7524, Jun 15 2007.

JUNG, B. G.; VANKAYALAPATI, R.; SAMTEN, B. Mycobacterium tuberculosis stimulates IL-1beta production by macrophages in an ESAT-6 dependent manner with the involvement of serum amyloid A3. **Mol Immunol**, 135, p. 285-293, Jul 2021.

KANG, T. J.; CHAE, G. T. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. **FEMS Immunol Med Microbiol**, 31, n. 1, p. 53-58, Jul 2001.

KANG, T. J.; LEE, S. B.; CHAE, G. T. A polymorphism in the toll-like receptor 2 is associated with IL-12 production from monocyte in lepromatous leprosy. **Cytokine**, 20, n. 2, p. 56-62, Oct 21 2002.

KIM, E. W.; TELES, R. M. B.; HAILE, S.; LIU, P. T. *et al.* Vitamin D status contributes to the antimicrobial activity of macrophages against Mycobacterium leprae. **PLoS Negl Trop Dis**, 12, n. 7, p. e0006608, Jul 2018.

KONIG, R.; KOLTE, A.; AHLERS, O.; OSWALD, M. *et al.* Use of IFNgamma/IL10 Ratio for Stratification of Hydrocortisone Therapy in Patients With Septic Shock. **Front Immunol**, 12, p. 607217, 2021.

KRUEGER, J. G.; EYERICH, K.; KUCHROO, V. K.; RITCHLIN, C. T. *et al.* IL-23 past, present, and future: a roadmap to advancing IL-23 science and therapy. **Front Immunol**, 15, p. 1331217, 2024.

KRUTZIK, S. R.; OCHOA, M. T.; SIELING, P. A.; UEMATSU, S. *et al.* Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. **Nat Med**, 9, n. 5, p. 525-532, May 2003.

KRUTZIK, S. R.; TAN, B.; LI, H.; OCHOA, M. T. *et al.* TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. **Nat Med**, 11, n. 6, p. 653-660, Jun 2005.

LAVADO-VALENZUELA, R.; JOSE BRAVO, M.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P.; RAMOS DE SOUZA, M. *et al.* Distribution of the HLA class II frequency alleles in patients with leprosy from the mid-west of Brazil. **Int J Immunogenet**, 38, n. 3, p. 255-258, Jun 2011.

LI, F.; DANG, W.; DU, Y.; XU, X. *et al.* Tuberculosis Vaccines and T Cell Immune Memory. **Vaccines (Basel)**, 12, n. 5, Apr 30 2024.

LIU, P. T.; SCHENK, M.; WALKER, V. P.; DEMPSEY, P. W. *et al.* Convergence of IL-1beta and VDR activation pathways in human TLR2/1-induced antimicrobial responses. **PLoS One**, 4, n. 6, p. e5810, Jun 5 2009.

LIU, P. T.; WHEELWRIGHT, M.; TELES, R.; KOMISOPOULOU, E. *et al.* MicroRNA-21 targets the vitamin D-dependent antimicrobial pathway in leprosy. **Nat Med**, 18, n. 2, p. 267-273, Jan 29 2012.

LIU, T.; ZHANG, L.; JOO, D.; SUN, S. C. NF-kappaB signaling in inflammation. **Signal Transduct Target Ther**, 2, p. 17023-, 2017.

MAEDA, Y.; MUKAI, T.; SPENCER, J.; MAKINO, M. Identification of an Immunomodulating Agent from *Mycobacterium leprae*. **Infect Immun**, 73, n. 5, p. 2744-2750, May 2005.

MANICKAM, P.; MEHENDALE, S. M.; NAGARAJU, B.; KATOCH, K. *et al.* International open trial of uniform multidrug therapy regimen for leprosy patients: Findings & implications for national leprosy programmes. **Indian J Med Res**, 144, n. 4, p. 525-535, Oct 2016.

MARETTI-MIRA, A. C.; DE PINHO RODRIGUES, K. M.; DE OLIVEIRA-NETO, M. P.; PIRMEZ, C. *et al.* MMP-9 activity is induced by *Leishmania braziliensis* infection and correlates with mucosal leishmaniasis. **Acta Trop**, 119, n. 2-3, p. 160-164, Aug 2011.

MARQUES CDE, S.; BRITO-DE-SOUZA, V. N.; GUERREIRO, L. T.; MARTINS, J. H. *et al.* Toll-like receptor 1 N248S single-nucleotide polymorphism is associated with leprosy risk and regulates immune activation during mycobacterial infection. **J Infect Dis**, 208, n. 1, p. 120-129, Jul 2013.

MATTOS, K. A.; OLIVEIRA, V. G.; D'AVILA, H.; RODRIGUES, L. S. *et al.* TLR6-driven lipid droplets in *Mycobacterium leprae*-infected Schwann cells: immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence. **J Immunol**, 187, n. 5, p. 2548-2558, Sep 1 2011.

MAYMONE, M. B. C.; LAUGHTER, M.; VENKATESH, S.; DACSO, M. M. *et al.* Leprosy: Clinical aspects and diagnostic techniques. **J Am Acad Dermatol**, 83, n. 1, p. 1-14, Jul 2020.

MENDES, A. L. G.; JOAQUIM, H. D. M.; ZAMAE, M. I. S.; ASSIS, R. M. *et al.* Expression of NLRP3 inflammasome in leprosy indicates immune evasion of *Mycobacterium leprae*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 115, p. e190324, 2020.

MI, Z.; LIU, H.; ZHANG, F. Advances in the Immunology and Genetics of Leprosy. **Front Immunol**, 11, p. 567, 2020.

MISCH, E. A.; MACDONALD, M.; RANJIT, C.; SAPKOTA, B. R. *et al.* Human TLR1 deficiency is associated with impaired mycobacterial signaling and protection from leprosy reversal reaction. **PLoS Negl Trop Dis**, 2, n. 5, p. e231, May 7 2008.

MONTOYA, D.; CRUZ, D.; TELES, R. M.; LEE, D. J. *et al.* Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. **Cell Host Microbe**, 6, n. 4, p. 343-353, Oct 22 2009.

MONTOYA, D.; MODLIN, R. L. Learning from leprosy: insight into the human innate immune response. **Adv Immunol**, 105, p. 1-24, 2010.

MUNGROO, M. R.; KHAN, N. A.; SIDDIQUI, R. *Mycobacterium leprae*: Pathogenesis, diagnosis, and treatment options. **Microb Pathog**, 149, p. 104475, Dec 2020.

OCA, E. P. M. Human polymorphisms as clinical predictors in leprosy. **J Trop Med**, 2011, p. 923943, 2011.

OMS. **Diretrizes para o diagnóstico, tratamento e prevenção da hanseníase.** 2019. 978 92 9022 707 6.

PENNA, G. O.; BUHRER-SEKULA, S.; KERR, L. R. S.; STEFANI, M. M. A. *et al.* Uniform multidrug therapy for leprosy patients in Brazil (U-MDT/CT-BR): Results of an open label, randomized and controlled clinical trial, among multibacillary patients. **PLoS Negl Trop Dis**, 11, n. 7, p. e0005725, Jul 2017.

PENNA, M. L.; DE OLIVEIRA, M. L.; PENNA, G. O. The epidemiological behaviour of leprosy in Brazil. . **Lepr Rev**, 80, p. 332-344, 2009.

PINHEIRO, R. O.; SCHMITZ, V.; SILVA, B. J. A.; DIAS, A. A. *et al.* Innate Immune Responses in Leprosy. **Front Immunol**, 9, p. 518, 2018.

POLYCARPOU, A.; HOLLAND, M. J.; KARAGEORGIU, I.; EDDAOUDI, A. *et al.* Mycobacterium leprae Activates Toll-Like Receptor-4 Signaling and Expression on Macrophages Depending on Previous Bacillus Calmette-Guerin Vaccination. **Front Cell Infect Microbiol**, 6, p. 72, 2016.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, 34, n. 3, p. 255-273, Jul-Sep 1966.

SABIR, N.; HUSSAIN, T.; MANGI, M. H.; ZHAO, D. *et al.* Matrix metalloproteinases: Expression, regulation and role in the immunopathology of tuberculosis. **Cell Prolif**, 52, n. 4, p. e12649, Jul 2019.

SADHU, S.; KHAITAN, B. K.; JOSHI, B.; SENGUPTA, U. *et al.* Reciprocity between Regulatory T Cells and Th17 Cells: Relevance to Polarized Immunity in Leprosy. **PLoS Negl Trop Dis**, 10, n. 1, p. e0004338, Jan 2016.

SAINI, C.; RAMESH, V.; NATH, I. CD4⁺ Th17 cells discriminate clinical types and constitute a third subset of non Th1, Non Th2 T cells in human leprosy. **PLoS Negl Trop Dis**, 7, n. 7, p. e2338, 2013.

SALGADO, C. G.; PINTO, P.; BOUTH, R. C.; GOBBO, A. R. *et al.* miRNome Expression Analysis Reveals New Players on Leprosy Immune Physiopathology. **Front Immunol**, 9, p. 463, 2018.

SAMUEL, P. J. Cytokine Analysis: A Fresh Perspective. **J Interferon Cytokine Res**, 40, n. 11, p. 511-514, Nov 2020.

SCHURING, R. P.; HAMANN, L.; FABER, W. R.; PAHAN, D. *et al.* Polymorphism N248S in the human Toll-like receptor 1 gene is related to leprosy and leprosy reactions. **J Infect Dis**, 199, n. 12, p. 1816-1819, Jun 15 2009.

SILVA, G. A.; NAVECA, F. G.; RAMASAWMY, R.; BOECHAT, A. L. Association between the IFNG +874A/T gene polymorphism and leprosy resistance: a meta-analysis. **Cytokine**, 65, n. 2, p. 130-133, Feb 2014.

SLAVICK, A.; FURER, V.; POLACHEK, A.; TZEMACH, R. *et al.* Circulating and Synovial Monocytes in Arthritis and Ex-Vivo Model to Evaluate Therapeutic Modulation of Synovial Monocytes. **Immunol Invest**, 52, n. 7, p. 832-855, Nov 2023.

TAPPING, R. I.; TOBIAS, P. S. Mycobacterial lipoarabinomannan mediates physical interactions between TLR1 and TLR2 to induce signaling. **J Endotoxin Res**, 9, n. 4, p. 264-268, 2003.

TARIQUE, M.; NAZ, H.; SAINI, C.; SUHAIL, M. *et al.* Association of IL-10 Gene Polymorphism With IL-10 Secretion by CD4 and T Regulatory Cells in Human Leprosy. **Front Immunol**, 11, p. 1974, 2020.

TELES, R. M.; GRAEBER, T. G.; KRUTZIK, S. R.; MONTOYA, D. *et al.* Type I interferon suppresses type II interferon-triggered human anti-mycobacterial responses. **Science**, 339, n. 6126, p. 1448-1453, Mar 22 2013.

TELES, R. M.; TELES, R. B.; AMADEU, T. P.; MOURA, D. F. *et al.* High matrix metalloproteinase production correlates with immune activation and leukocyte migration in leprosy reactional lesions. **Infect Immun**, 78, n. 3, p. 1012-1021, Mar 2010.

ULLRICH, K. A.; SCHULZE, L. L.; PAAP, E. M.; MULLER, T. M. *et al.* Immunology of IL-12: An update on functional activities and implications for disease. **EXCLI J**, 19, p. 1563-1589, 2020.

WALKER, S. L.; ROBERTS, C. H.; ATKINSON, S. E.; KHADGE, S. *et al.* The effect of systemic corticosteroid therapy on the expression of toll-like receptor 2 and toll-like receptor 4 in the cutaneous lesions of leprosy Type 1 reactions. **Br J Dermatol**, 167, n. 1, p. 29-35, Jul 2012.

WANG, C.; LIU, T.; WANG, Z.; LI, W. *et al.* IL-23/IL-23R Promote Macrophage Pyroptosis and T Helper 1/T Helper 17 Cell Differentiation in Mycobacterial Infection. **J Invest Dermatol**, 143, n. 11, p. 2264-2274 e2218, Nov 2023.

WANG, H.; MA, L.; SU, W.; LIU, Y. *et al.* NLRP3 inflammasome in health and disease (Review). **Int J Mol Med**, 55, n. 3, Mar 2025.

WANG, T. T.; NESTEL, F. P.; BOURDEAU, V.; NAGAI, Y. *et al.* Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. **J Immunol**, 173, n. 5, p. 2909-2912, Sep 1 2004.

WHO. Chemotherapy of leprosy: Report of a Study Group. **WHO Technical Report Series**, 847, p. 1-24, 1994.

WHO. Chemotherapy Study Group 1993. **Indian J Lepr**, 67, p. 350-352, 1995.

WHO. **Weekly Epidemiological Record**. 2023. Disponível em: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/372812/WER9837-eng-fre.pdf?sequence=1>. Acesso em: 15 september.

WONG, S. H.; GOCHHAIT, S.; MALHOTRA, D.; PETTERSSON, F. H. *et al.* Leprosy and the adaptation of human toll-like receptor 1. **PLoS Pathog**, 6, n. 7, p. e1000979, Jul 1 2010.

YAMASHITA, Y.; MAEDA, Y.; TAKESHITA, F.; BRENNAN, P. J. *et al.* Role of the polypeptide region of a 33kDa mycobacterial lipoprotein for efficient IL-12 production. **Cell Immunol**, 229, n. 1, p. 13-20, May 2004.

YAN, L. S., J.; Yu, M.; Zhang, G.; Li, J.; Yu, X. Result of eight years follow up among multibacillary patients treated with Uniform Multidrug Therapy in China. **Lepr Rev**, 87, p. 314-321, 2016.

YASMIN, H.; VARGHESE, P. M.; BHAKTA, S.; KISHORE, U. Pathogenesis and Host Immune Response in Leprosy. **Adv Exp Med Biol**, 1313, p. 155-177, 2021.

ZANIOLO, L. M.; DAMAZO, A. S. Th17 Cells and Cytokines in Leprosy: Understanding the Immune Response and Polarization. **Rev Soc Bras Med Trop**, 56, p. e02652023, 2023.

ZHANG, F.; LIU, H.; CHEN, S.; WANG, C. *et al.* Evidence for an association of HLA-DRB1*15 and DRB1*09 with leprosy and the impact of DRB1*09 on disease onset in a Chinese Han population. **BMC Med Genet**, 10, p. 133, Dec 11 2009.

ZHENG, H.; BAN, Y.; WEI, F.; MA, X. Regulation of Interleukin-12 Production in Antigen-Presenting Cells. **Adv Exp Med Biol**, 941, p. 117-138, 2016.