

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical

Jéssica Marques Macedo

**Avaliação da coexpressão NLRP3/ASC do inflamassoma e sua relação com inflamação e
atividade microbicida no espectro clínico da hanseníase**

Belo Horizonte

2026

Jéssica Marques Macedo

Avaliação da coexpressão NLRP3/ASC do inflamassoma e sua relação com inflamação e atividade microbica no espectro clínico da hanseníase

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Menezes Souza

Coorientador: Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha

Belo Horizonte

2026

M141a Macedo, Jessica Marques.
Avaliação da coexpressão NLRP3/ASC do inflamassoma e sua relação com inflamação e atividade microbida no espectro clínico da hanseníase [recurso eletrônico]. / Jessica Marques Macedo. - - Belo Horizonte: 2026.
79f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

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

1. Hanseníase. 2. Proteína 3 que Contém Domínio de Pirina da Família NLR. 3. Hanseníase Paucibacilar. 4. Hanseníase Multibacilar. 5. Dissertação Acadêmica. I. Souza, Daniel Menezes. II. Rocha, Manoel Otavio da Costa. 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 dez dias do mês de março de dois mil e vinte e seis (10/03/2026), às 09:00 (nove) horas, realizou-se a defesa por videoconferência pela plataforma GOOGLE MEET (<https://meet.google.com/ecv-gqvfp-ipy>), sessão pública para a 490ª defesa de dissertação de **JÉSSICA MARQUES MACEDO**, número de registro 2024665971, graduada no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL. A presidência da sessão coube ao professor **DANIEL MENEZES SOUZA**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **PROF. DANIEL MENEZES SOUZA - ORIENTADOR (UFMG)**, **PROF. MANOEL OTAVIO DA COSTA ROCHA – COORIENTADOR (UFMG)**, **PROF. BRUNO MENDES ROATT (UFOP)**, **PROFA. ANA LAURA GROSSI DE OLIVEIRA (UFMG)**. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua dissertação de Mestrado, intitulada: **"Avaliação da ativação do inflamassoma NLRP3/ASC no espectro clínico da hanseníase e sua relação com a carga bacilar e o perfil de citocinas"**. Seguiu-se a arguição pelos examinadores e, logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público, e decidiu considerar a dissertação **APROVADA**. 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, 10 de março de 2026.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Ana Laura Grossi de Oliveira, Usuário Externo**, em 10/03/2026, às 14:55, 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 10/03/2026, às 16:25, 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 17/03/2026, às 14:14, 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**

Ata de defesa de Dissertação/Tese 5009808

SEI 23072.213304/2026-34 / pg. 1



Magistério Superior, em 17/03/2026, às 19:22, 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 5009808 e o código CRC 94C4C386.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITORA: Prof^ª. Dr^ª. Sandra Regina Goulart Almeida

VICE-REITOR: Prof. Dr. Alessandro Fernandes Moreira

PRÓ-REITORA DE PÓS-GRADUAÇÃO: Prof^ª Dra. Isabela Almeida Pordeus

PRÓ-REITOR DE PESQUISA: Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis

FACULDADE DE MEDICINA

DIRETORA: Prof^ª. Dra. Alamanda Kfoury Pereira

VICE-DIRETORA: Prof^ª. Dra. Cristina Gonçalves Alvim

COORDENADORA DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO: Prof^ª. Dra. Ana Cristina Simões e Silva

SUBCOORDENADORA DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO: Prof^ª. Dra. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Infectologia e Medicina Tropical

COORDENADOR: Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho

SUBCOORDENADOR: Prof. Dr. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos

MEMBROS DO COLEGIADO

Prof. Dr. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos

Prof^ª. Dr^ª. Denise Utsch Gonçalves

Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho

Prof^ª. Dr^ª. Maria Auxiliadora Parreiras Martins

Prof^ª. Dr^ª. Mariana Costa Duarte

Prof^ª. Dr^ª. Walderez Ornelas Dutra

Raquel Soares Bandeira Câmara – Representante Discente

COLABORADORES

Profª. MSc. Nathália Chebli de Abreu - UFJF/MG

Profª. Drª. Vanete Thomaz Soccol - UFPR/PR

Profª. Drª. Mariana Costa Duarte - UFMG/MG

Dr. João Carlos Minozzo - CPPI/PR

MSc. Yargos Rodrigues Menezes - HEM/FHEMIG/MG e UFMG/MG

APOIO FINANCEIRO

FAPEMIG - Processo APQ-03362-24

CAPES

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES DO PROJETO

Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte - Minas Gerais

Universidade Federal de Juiz de Fora - Juiz de Fora - Minas Gerais

Hospital Eduardo de Menezes - Belo Horizonte - Minas Gerais

Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos - Secretaria de Saúde do Paraná

À minha família, razão da minha existência e aprimoramento diário.

À Luide, pelo companheirismo incondicional.

Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Daniel Menezes Souza, por ter aberto essa oportunidade e conduzido o percurso com muita leveza e seriedade em iguais proporções.

Ao Professor Manoel Otávio da Costa Rocha pelo conhecimento que nos passa em qualquer diálogo e pela paixão contagiante pelo ensino e pela ciência.

À equipe do Departamento de Patologia Clínica do Colégio Técnico da UFMG pelo auxílio durante toda a caminhada de construção deste trabalho.

Aos profissionais do Ambulatório de Dermatologia do Hospital Eduardo de Menezes pela convivência e colaboração diários durante toda minha formação e em diversas etapas desta pesquisa.

Aos pacientes, sem os quais nada disso teria significado, finalidade última de todo o esforço e compromisso com a pesquisa e a assistência.

Resumo

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), cuja diversidade clínica reflete diferenças marcantes na resposta imunológica do indivíduo infectado. A polarização entre as formas paucibacilares (PB) e multibacilares (MB) envolve interações complexas entre imunidade inata e adaptativa, incluindo vias inflamatórias ainda não completamente esclarecidas. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o padrão de expressão do complexo NLRP3/ASC em pacientes com hanseníase em diferentes apresentações clínicas da doença. Trata-se de um estudo observacional e transversal, que utilizou células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes PB (n = 18), MB (n = 22) e controle (CTL, n = 16), estimuladas *in vitro* com antígeno de *M. leprae*, seguidas de análise por citometria de fluxo para caracterização de macrófagos derivados de monócitos, incluindo a coexpressão de NLRP3 e ASC e a produção intracelular de IL-1 β . Linfócitos T estimulados (LTCD4⁺CD45RO⁺ e LTCD8⁺CD45RO⁺) foram ainda avaliados quanto à produção de IFN- γ e IL-10, além da quantificação de óxido nítrico (NO) no sobrenadante das culturas. Pacientes MB apresentaram aumento significativo no percentual de macrófagos CD14⁺HLA-DR⁺NLRP3⁺ASC⁺ e maior intensidade média de fluorescência (MFI) para IL-1 β nessas células. Observou-se correlação positiva entre o índice baciloscópico e a frequência dessas células, bem como correlação negativa entre a expressão do complexo e a produção de NO. Diferentemente do observado no polo MB, pacientes PB demonstraram maior índice de estimulação para produção de NO após estímulo antigênico, além de maior produção de IFN- γ e razão IFN- γ /IL-10 significativamente superior em linfócitos T CD4⁺CD45RO⁺ e CD8⁺CD45RO⁺. Verificou-se ainda correlação negativa entre carga bacilar e atividade de produção de NO. Em conjunto, os achados indicam que, embora a forma MB esteja associada a maior expressão de componentes estruturais do inflamassoma e aumento de IL-1 β , a contenção bacilar parece depender de mecanismos microbicidas mais eficientes, como a produção de NO e o predomínio de um microambiente T_H1, característicos dos pacientes PB, evidenciando dissociação entre intensidade de inflamação e controle efetivo da infecção na forma MB.

Palavras-chave: Hanseníase; Paucibacilar; Multibacilar; Inflamassoma; Complexo NLRP3/ASC.

Abstract

Hansen's disease is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), whose clinical diversity reflects marked differences in the host immune response. The polarization between paucibacillary (PB) and multibacillary (MB) forms involves complex interactions between innate and adaptive immunity, including inflammatory pathways that remain incompletely understood. In this context, the present study aimed to evaluate the expression pattern of the NLRP3/ASC complex in patients with leprosy presenting different clinical forms of the disease. This was an observational, cross-sectional study using peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) stimulated *in vitro* with *M. leprae* antigen, followed by flow cytometric analysis to characterize monocyte-derived macrophages, including the coexpression of NLRP3 and ASC and intracellular IL-1 β production. Stimulated T lymphocytes (LTCD4⁺CD45RO⁺ and LTCD8⁺CD45RO⁺) were further evaluated for IFN- γ and IL-10 production, and nitric oxide (NO) levels were quantified in culture supernatants. MB patients exhibited a significantly increased percentage of CD14⁺HLA-DR⁺NLRP3⁺ASC⁺ macrophages and higher mean fluorescence intensity (MFI) for IL-1 β in these cells. A positive correlation was observed between the bacillary index and the frequency of these double-positive cells, as well as a negative correlation between complex expression and NO production. Differently from MB patients, the PB group exhibited a higher stimulation index for NO production in response to antigenic stimuli, along with increased IFN- γ production and a significantly higher IFN- γ /IL-10 ratio in T lymphocytes. A negative correlation between bacillary load and NO production activity was also identified. Collectively, these findings indicate that although the MB form is associated with increased expression of structural components of the inflammasome and enhanced IL-1 β production, bacillary containment appears to depend on more efficient microbicidal mechanisms, such as NO production and a predominant T_H1 microenvironment, characteristic of PB patients. These results highlight a dissociation between the intensity of inflammatory signaling and effective infection control in the MB form.

Keywords: Hansen's disease; Paucibacillary; Multibacillary; Inflammasome; NLRP3/ASC complex.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Distribuição geográfica mundial de novos casos da hanseníase. Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2025 22
- Figura 2.** Número de casos novos e taxa de detecção de hanseníase no Brasil, segundo ano do diagnóstico entre 2015-2024. Fonte: Brasil, 2026 23
- Figura 3.** Representação esquemática da resposta imune na hanseníase: perfis T_H1 e T_H2 . Fonte: Adaptado de Li *et al.*, 2024.....31
- Figura 4.** Diagrama esquemático da ativação do Inflamassoma NLRP3. Fonte: Adaptado de Li *et al.*, 2024.....36
- 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).....47
- 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 (AF-700); B representa SSC *versus* densidade de fluorescência para NLRP3⁺ASC⁺ (AF-488 e PE-Cy7, respectivamente); C e D representam as análises da produção das citocinas IL-1 β (PE) e IL-18 (AF-405), respectivamente.....48
- Figura 7.** Análise do perfil fenotípico dos linfócitos do sangue periférico e suas subpopulações, por citometria de fluxo. A e B representam o perfil das subpopulações de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ e C representa o perfil de linfócitos de memória/ativados, selecionados no gate em gráfico de densidade de fluorescência para CD45RO (PerCP-Cy5) *versus* densidade de fluorescência para CD4 (APC-Cy7) ou para CD8 (AF700). D e E representam o perfil de análise da expressão de IFN- γ e IL-10 pelas subpopulações de linfócitos do sangue periférico.....49
- Figura 8.** Análise do índice de estimulação (CE/CC) de monócitos ativados duplo positivos para NLRP3 e ASC (CD14⁺HLA-DR⁺NLRP3⁺ASC⁺), expressos em valores percentuais, após estímulo *in vitro* com antígeno de *M. leprae*. Os resultados estão apresentados como dados de dispersão com sobreposição de gráficos de barra (média $\pm$ DP). Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre o grupo multibacilar (MB) e os demais grupos, controle (CTL) e paucibacilar (PB), estão demonstradas no gráfico.....51
- Figura 9.** Análise do índice de estimulação (CE/CC) da produção das citocinas IL-18 e IL-1 β em monócitos ativados duplo positivos para NLRP3 e ASC (CD14⁺HLA-DR⁺NLRP3⁺ASC⁺), expressas em valores percentuais (A e C) e por intensidade média de fluorescência (MFI; B e D), após estímulo *in vitro* com antígeno de *M. leprae*. Os resultados estão apresentados como

dados de dispersão com sobreposição de gráficos de barra (média±DP). Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos estão demonstradas nos gráficos quando presentes.....52

Figura 10. Análise do índice de estimulação para a produção de óxido nítrico (NO) nos grupos controle (CTL), paucibacilar (PB) e multibacilar (MB), após estímulo *in vitro*. Os resultados estão apresentados como dados de dispersão com sobreposição de gráficos de barra (média±DP). Diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$), quando presentes, estão indicadas no gráfico.....53

Figura 11. Análise da correlação entre o índice bacilos cópico (IB) e a produção de óxido nítrico (NO) nos pacientes incluídos no estudo. Os dados estão apresentados em gráfico de dispersão, evidenciando a relação entre a carga bacilar e a produção de NO após estímulo *in vitro*. O coeficiente de correlação (r) e o valor de p estão indicados no gráfico.....54

Figura 12. Análise da correlação entre a frequência de macrófagos derivados de monócitos CD14⁺HLA-DR⁺NLRP3⁺ASC⁺ (%) e a produção de óxido nítrico (NO) em pacientes com hanseníase. Os dados estão apresentados em gráfico de dispersão, evidenciando correlação inversa entre as variáveis. O coeficiente de correlação (r) e o valor de p estão indicados no gráfico.....55

Figura 13. Análise do índice de estimulação para a produção das citocinas IFN- γ e IL-10 por linfócitos T CD4⁺CD45RO⁺ nos grupos controle (CTL), paucibacilar (PB) e multibacilar (MB), após estímulo *in vitro*. Os resultados estão apresentados em valores percentuais e por intensidade média de fluorescência (MFI). Os dados estão representados como dispersão individual, com sobreposição de gráficos de barra (média±DP). Diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$), quando presentes, estão indicadas no gráfico.....56

Figura 14. Análise do índice de estimulação para a produção das citocinas IFN- γ e IL-10 por linfócitos T CD8⁺CD45RO⁺ nos grupos controle (CTL), paucibacilar (PB) e multibacilar (MB), após estímulo *in vitro*. Os resultados estão apresentados em valores percentuais e por intensidade média de fluorescência (MFI). Os dados estão representados como dispersão individual, com sobreposição de gráficos de barra (média±DP). Diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$), quando presentes, estão indicadas no gráfico.....57

Figura 15. Análise do índice de estimulação da razão IFN- γ /IL-10 em linfócitos T CD4⁺CD45RO⁺ e T CD8⁺CD45RO⁺ nos grupos controle (CTL), paucibacilar (PB) e multibacilar (MB), após estímulo *in vitro*. Os resultados estão apresentados em valores percentuais e por intensidade média de fluorescência (MFI). Os dados estão representados como dispersão individual, com sobreposição de gráficos de barra (média±DP). Diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$), quando presentes, estão indicadas no gráfico.....58

Figura 16. Esquema ilustrativo com os principais resultados obtidos nos grupos PB e MB no presente estudo.....67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos indivíduos de acordo com os grupos.....	43
Tabela 2. Marcadores utilizados para avaliação do perfil de células do sistema imunológico inato e adaptativo.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASC: *Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD* (Proteína do tipo *speck* associada à apoptose contendo domínio CARD);

APCs: *Antigen-presenting cells* (Células apresentadoras de antígenos);

BAAR: Bacilos álcool-ácido resistentes;

CARD: *Caspase activation and recruitment domains* (Domínios de ativação e recrutamento de caspases);

COLTEC: Colégio Técnico;

COX-2: Enzima Ciclooxygenase tipo 2;

DAMPs: *Damage-associated molecular patterns* (Padrões Moleculares Associados a Danos);

ENH: Eritema nodoso hansênico;

FDM: Fagócitos derivados de monócitos;

GIF2: Grau de Incapacidade Física 2;

CTL: Grupo controle;

DC: *dendritic cells* (células dendríticas)

DP: Desvio padrão;

IB: Índice baciloscópio;

iNOS: Óxido nítrico sintase

IL-1 β : Interleucina do tipo 1 beta;

IL-18: Interleucina do tipo 18;

IL-1R1: receptor de IL-1 tipo I;

IL-2: Interleucina do tipo 2;

IL-12: Interleucina do tipo 12;

IFN- α : Interferon alfa;

IFN- β : Interferon beta;

IKK: Quinase inibitória de I κ B

LPS: lipopolissacarídeo;

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;

MS: Ministério da Saúde;

NAIP: *Neuronal apoptosis inhibitory protein* (proteína inibidora da apoptose neuronal);

NF- κ B: fator nuclear kappa-B;

NLR: *Nucleotide-binding oligomerization domain Like Receptors* (receptores do tipo domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos);

NO: Óxido nítrico;

NP: Neural primária;

OMS: Organização Mundial da Saúde;

PAMPs: *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (Padrões Moleculares Associados a Patógenos);

PB: Paucibacilar;

PBMCs: *Peripheral blood mononuclear cells* (Células mononucleares do sangue periférico);

PCR: Reação em cadeia da polimerase;

PGL-1: Glicopeptídeo fenólico tipo 1;
PRRs: Receptores de Reconhecimento de Padrões;
PQT: Poliquimioterapia;
PQT-U: Poliquimioterapia única;
RR: Reação reversa;
TLRs: *Toll-Like Receptors* (Receptores do tipo Toll);
TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa;
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais.

Sumário

1. Introdução	18
2. Revisão de Literatura	20
2.1. Aspectos históricos da hanseníase	20
2.2. O bacilo <i>Mycobacterium leprae</i>	21
2.3. Epidemiologia	21
2.4. Classificação	23
2.5. Diagnóstico	25
2.6. Tratamento	26
2.7. Reações hansênicas	27
2.8. Resposta imune e patogênese da hanseníase	28
2.9. Inflamassomas	32
2.9.1. Estrutura, componentes e mecanismos de ativação do inflamassoma NLRP3	32
2.9.2. O Inflamassoma NLRP3 e a Hanseníase	37
3. Justificativa	39
4. Objetivos	40
4.1. Objetivo geral	40
4.2. Objetivos específicos	40
5. Materiais e Métodos	41
5.1. Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa, local de estudo e critérios de seleção dos participantes	41
5.2. Cálculo amostral	41
5.3. Antígeno de <i>M. leprae</i> para ensaios de estimulação <i>in vitro</i>	43
5.4. Obtenção, cultura e estimulação de PBMCs	43
5.5. Avaliação do perfil de expressão de marcadores de superfície celular em fagócitos derivados de monócitos e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ após ensaio de estimulação <i>in vitro</i>	44
5.6. Aquisição e estratégia de análise de dados	46
5.6.1. Estratégias de análise para a caracterização das populações de fagócitos derivados de monócitos e linfócitos	46
5.6.2. Estratégias de análise para a caracterização das populações de FDMs NLRP3⁺ASC⁺	47
5.6.3. Estratégias de análise para a caracterização das subpopulações de linfócitos	48
5.7. Quantificação da produção de óxido nítrico (NO) no sobrenadante da cultura	49
5.8. Análise estatística	50
6. Resultados	51

6.1. Pacientes MB apresentam aumento no percentual de FDM ativados duplo positivos para NLRP3 e ASC (CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ NLRP3 ⁺ ASC ⁺) em comparação a pacientes PB	51
6.2. Pacientes MB apresentam aumento de intensidade média de fluorescência para IL-1 β em monócitos ativados duplo positivos para NLRP3 e ASC (CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ NLRP3 ⁺ ASC ⁺) em relação a PB.	51
6.3. Pacientes PB apresentam maior índice de estimulação para produção de NO em comparação a MB e CTL, indicando aumento da atividade de óxido nítrico após estímulo antigênico nesse grupo.	53
6.4. Correlação inversa entre CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ NLRP3 ⁺ ASC ⁺ (%) e a produção de óxido nítrico	54
6.5. Linfócitos T CD4 ⁺ CD45RO ⁺ de pacientes PB apresentam maior índice de estimulação para IFN- γ , enquanto pacientes MB apresentam maior índice de estimulação para IL-10	55
6.6. Linfócitos T CD8 ⁺ CD45RO ⁺ no polo paucibacilar apresentam fenótipo efetor caracterizado por aumento de IFN- γ e redução de IL-10	56
6.7. A razão IFN- γ /IL-10 tanto em linfócitos T CD4 ⁺ CD45RO ⁺ quanto em T CD8 ⁺ CD45RO ⁺ é maior em pacientes PB em comparação aos demais grupos.	57
7. Discussão	59
8. Conclusão	69
9. Perspectivas	70
10. Anexos	71
10.1. Anexo I: Aprovação do projeto pelo CEP/UFMG	71
10.2. Anexo II: Aprovação do projeto pelo CEP/FHEMIG	72
11. Referências	73

1. Introdução

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa de curso crônico, cujo agente etiológico pertence ao complexo *Mycobacterium leprae*, que engloba as espécies *M. leprae* e *M. lepromatosis*, sendo essa última descrita recentemente na literatura (HAN; SEO; SIZER; SCHOBERLE *et al.*, 2008). Trata-se de doença milenar de elevada morbidade, historicamente associada a contextos de vulnerabilidade social e reconhecida como um importante problema de saúde pública, sobretudo em países endêmicos como o Brasil (BRASIL, 2024). O Brasil, Índia e Indonésia figuram como os países com o maior número de casos novos detectados no mundo, correspondendo a mais de 70% de todos eles em 2024. O Brasil, especificamente, registrou o maior número de casos novos de hanseníase nas Américas, totalizando 93.8% dos casos. É o segundo país no mundo em número de casos novos e o primeiro em incidência da doença (WHO, 2025).

A hanseníase apresenta amplo espectro clínico-imunológico, determinado principalmente pela interação entre a carga bacilar e a resposta imune que o hospedeiro consegue montar. Essa interação define desde formas paucibacilares (PB), com resposta celular mais efetiva, até formas multibacilares (MB), marcadas por maior disseminação bacilar e perfil imunológico distinto. No entanto, para além das manifestações diretamente atribuídas à replicação da micobactéria, destacam-se as reações hansênicas, episódios inflamatórios agudos ou subagudos que podem ocorrer antes, durante ou após o tratamento específico. Esses eventos representam a principal causa de dano neural irreversível, deformidades e incapacidades físicas associadas à doença, configurando um dos maiores desafios clínicos no seu manejo. A fisiopatologia das reações permanece parcialmente compreendida, envolvendo desregulação imunológica complexa e intensa ativação de mediadores inflamatórios (CARVALHO; ARAUJO; COELHO-DOS-REIS; PERUHYPE-MAGALHAES *et al.*, 2018; MENDONÇA; COSTA; DE MELO; ANTUNES *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, avanços significativos na compreensão da imunidade inata têm ampliado o entendimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos na resposta às infecções micobacterianas. Nesse contexto, os inflamassomas emergem como plataformas centrais de detecção de sinais de perigo e de amplificação da resposta inflamatória. O termo inflamassoma foi criado para descrever complexos de alto peso molecular que ativam caspases inflamatórias, induzindo a secreção de interleucina do tipo 1 beta (IL-1 β) e do tipo 18 (IL-18), além de poderem induzir morte celular inflamatória (MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002). O inflamassoma NLRP3 é estruturalmente constituído pela interação entre o receptor sensor

NLRP3, a proteína adaptadora ASC e a caspase-1, formando um complexo funcional capaz de amplificar rapidamente a resposta inflamatória. Embora esse mecanismo seja fundamental para a contenção de agentes infecciosos, sua ativação desregulada pode contribuir para inflamação exacerbada e dano tecidual. Tal característica dual torna o NLRP3 um elemento particularmente relevante em doenças caracterizadas por desequilíbrio imunológico, incluindo infecções crônicas e estados inflamatórios recorrentes (LI; QIANG; CAO; WU *et al.*, 2024).

Apesar do crescente corpo de evidências acerca do papel dos inflamassomas em diferentes doenças infecciosas e inflamatórias, ainda são limitados os estudos que exploram, de forma integrada, sua participação na hanseníase, especialmente no contexto das reações hansênicas e das distintas apresentações clínicas da doença. Permanecem lacunas importantes quanto à dinâmica de ativação do complexo NLRP3/ASC, sua relação com o perfil de citocinas circulantes e sua possível contribuição para a exacerbação inflamatória observada em determinados subgrupos de pacientes.

Diante dessa complexidade, torna-se interessante aprofundar a investigação dos mecanismos da imunidade inata envolvidos na hanseníase, integrando dados clínicos e laboratoriais que permitam melhor compreensão da interface entre resposta do organismo infectado e evolução clínica. Nesse cenário, o presente estudo propõe-se a investigar a expressão do complexo NLRP3/ASC e suas vias associadas em indivíduos com diferentes apresentações clínicas da hanseníase, buscando contribuir para o esclarecimento de mecanismos relacionados à ativação do inflamassoma, ainda pouco explorados. Ao ampliar o entendimento sobre esses processos, espera-se oferecer subsídios para futuras estratégias terapêuticas que incluam a possível identificação e utilização de biomarcadores, bem como contribuir para o aprimoramento do manejo clínico da doença e de suas manifestações inflamatórias.

2. Revisão de Literatura

2.1. Aspectos históricos da hanseníase

Embora não seja possível identificar de forma inequívoca a hanseníase nos textos antigos, acredita-se que a doença tenha se originado na Ásia, ainda que alguns autores postulem uma possível origem africana. Evidências arqueológicas, como achados esqueléticos datados do século II a.C., sugerem que a Índia possa ter sido o local originário da doença. Estudos de genômica comparativa indicam que o *M. leprae* evoluiu no Leste da África ou no Sul da Ásia entre 11.700 e 129.000 anos atrás. A disseminação da doença ocorreu, provavelmente, por meio das rotas comerciais, alcançando progressivamente outras regiões da Ásia e demais continentes. No Brasil, os primeiros registros documentados remontam ao ano de 1600, na cidade do Rio de Janeiro onde, anos mais tarde, seria criado o primeiro lazareto ou leprosário, local destinado a abrigar os doentes de Lázaro, lazarentos ou leprosos. O médico norueguês Gerhard Armauer Hansen foi o responsável pela identificação do agente etiológico, publicando seus estudos em 1873, sendo um marco importante para a definição da etiologia bacteriana do agente causador e motivando a mudança de denominação da doença para hanseníase (EIDT, 2004; SIL; DAS, 2022).

Durante séculos, a hanseníase foi interpretada como um castigo divino ou uma forma de punição moral, o que contribuiu para a formação de um profundo estigma social em torno da doença. Pessoas acometidas eram isoladas em leprosários e privadas do convívio social e familiar, situação que perdurou até meados do século XX. Com o avanço do conhecimento científico e a introdução de terapias eficazes, ao longo de muitos anos, houve mudança significativa na percepção pública em relação à doença e da própria abordagem sanitária. Um fato importante ocorrido no Brasil foi a proposição do termo “hanseníase” em substituição ao termo “lepra” e todo o preconceito secular que ele trazia consigo. A substituição se tornou mandatória, formalmente, por meio de regramento legal em 1995, que buscou mitigar a conotação negativa do termo anterior e facilitar o entendimento social a respeito da doença (LASTORIA; ABREU, 2014). Campanhas educativas, ações de conscientização e programas de controle implementados pelos governos contribuíram para reduzir o estigma e promover o diagnóstico precoce, o tratamento e a reabilitação social das pessoas acometidas. Assim, a hanseníase passou a ser reconhecida como doença infecciosa curável e passível de eliminação como problema de saúde pública, refletindo o avanço científico e social em relação à sua compreensão e enfrentamento.

2.2. O bacilo *Mycobacterium leprae*

O *M. leprae* é um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), intracelular obrigatório, de crescimento lento, cuja divisão binária ocorre a cada 12 a 21 dias, idealmente na temperatura entre 27 e 33°C. Não é cultivável em meios de cultura artificiais e apresenta tropismo por macrófagos dérmicos, células endoteliais e células de Schwann. Essa afinidade justifica as apresentações clínicas dermatoneurológicas observadas nos pacientes. A transmissão ocorre por meio do contato prolongado com indivíduos com alta carga bacilar, nos quais a eliminação dos patógenos se dá pelas vias aéreas superiores, porta de entrada do bacilo no processo infeccioso. Os indivíduos mais susceptíveis à contaminação são os chamados contatos, definidos assim como toda pessoa que resida ou tenha residido, conviva ou tenha convivido com o doente no âmbito domiciliar nos últimos cinco anos anteriores ao diagnóstico, podendo ser ou não um familiar. A disseminação bacilar é hematogênica, com tropismo para nervos periféricos e para a pele, embora possa acometer a mucosa do trato respiratório superior, olhos, linfonodos e outros órgãos. O período de incubação, embora não se saiba com precisão exata, é estimado em cinco anos (BRASIL, 2017; 2022; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002; MAYMONE; LAUGHTER; VENKATESH; DACSO *et al.*, 2020).

2.3. Epidemiologia

Desde a recomendação da poliquimioterapia (PQT) como tratamento padrão pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1981, e posteriormente, com o lançamento da campanha de “eliminação da hanseníase como problema de saúde pública” em 1991, observou-se redução significativa na prevalência global da doença. No entanto, o número de casos novos permanece elevado, com a maioria dos registros concentrados em três países: Brasil, Índia e Indonésia (RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011).

Em 2024, a prevalência global da hanseníase, com dados compilados de 188 países, regiões e territórios, foi de 191.792 casos. No mesmo período, foram registrados 172.717 novos casos, dos quais 40,2% eram do sexo feminino e 5,4% em crianças. A maior concentração desses casos ocorre nos territórios americano e sudeste asiático, sendo que Brasil, Índia e Indonésia concentram 79,8% do total (Figura 1). O Brasil, segundo país com maior número de casos novos e primeiro em incidência, continua como umas das prioridades para a OMS no enfrentamento da hanseníase. A doença segue como um importante problema de saúde pública, com história natural intimamente relacionada à pobreza e às condições precárias de vida

(BRASIL, 2017; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002; MAYMONE; LAUGHTER; VENKATESH; DACSO *et al.*, 2020; PENNA; DE OLIVEIRA; PENNA, 2009; WHO, 2025).

A estratégia da OMS, lançada em 1991 para a eliminação da hanseníase como problema global de saúde pública, considerava como “eliminação da doença” a obtenção de taxa de prevalência menor que um caso por 10.000 habitantes. Esse objetivo foi alcançado globalmente no ano de 2000 e, individualmente, pela maioria dos países por volta de 2010. Entretanto, no Brasil, a taxa de prevalência ainda em 2023 mantinha-se superior à almejada, em 1,21 caso por 10.000 habitantes (Chemotherapy of leprosy for control programmes, 1982; BRASIL, 2025).

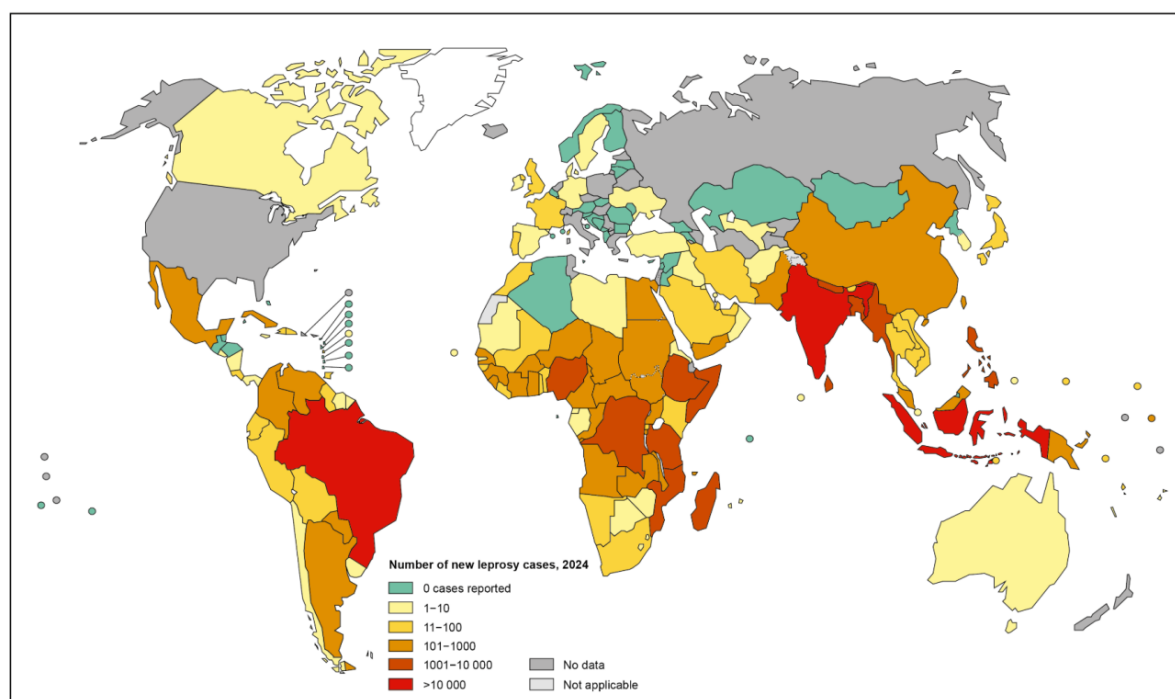


Figura 1. Distribuição geográfica mundial de novos casos da hanseníase. Fonte: WHO, 2025.

O Brasil registrou, em 2024, 22.129 novos casos, número muito semelhante ao de 2023, de 22.773, porém ainda inferior ao período pré-pandemia, que somou 27.864 novos casos em 2019. Esse fato sugere uma provável retomada na detecção de casos no pós-pandemia (Figura 2). Desses novos casos, 4,1% ocorreram em menores de 15 anos, percentual que vem se mantendo relativamente estável nos últimos anos. Além disso, 71,8% dos casos ocorreram em pessoas pretas ou pardas. Em relação à classificação quanto ao grau de incapacidade física, o grau 2 (GIF2) está vinculado a complicações motoras em áreas como pés, olhos e mãos ou a deformidades visíveis irreversíveis, refletindo, assim, atraso no diagnóstico da doença. Em 2023, no momento do diagnóstico, 11,5% dos pacientes foram classificados como GIF2, percentual ainda considerado alto (acima de 10%), e discretamente superior em relação ao ano anterior, de 11,2%, os maiores percentuais registrados entre 2015-2024 (BRASIL, 2026).

Minas Gerais figura como o segundo estado com maior número de casos novos em 2024. Possui padrão heterogêneo de endemicidade, mantendo bolsões de transmissão ativa sobretudo ao norte, com mais de 20 municípios sendo classificados como hiperendêmicos. Além disso, a proporção de casos novos com GIF2 no diagnóstico foi de 12,5% no mesmo ano, enquanto a avaliação do grau de incapacidade física no diagnóstico atingiu 95,4% (BRASIL, 2026).

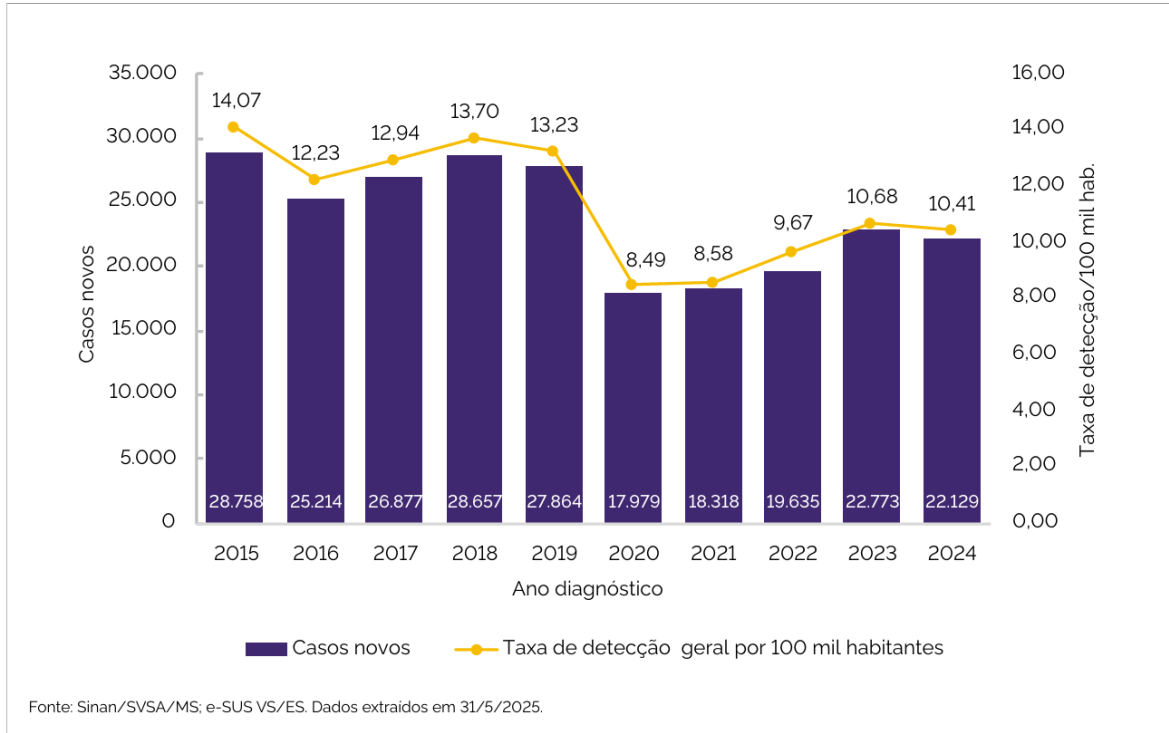


Figura 2. Número de casos novos e taxa de detecção de hanseníase no Brasil, segundo ano do diagnóstico entre 2015-2024. Fonte: BRASIL, 2026.

2.4. Classificação

Várias classificações da doença foram propostas ao longo dos anos, sendo a de Ridley & Jopling a mais utilizada em pesquisas. Essa classificação leva em consideração aspectos clínicos, histopatológicos e o índice baciloscópico para enquadrar o paciente em um dos espectros da doença. As formas dimorfas (ou *borderlines*) são instáveis e se situam entre os pólos hiperérgico tuberculoide (MHT) e anérgico virchowiano (MHV). Subdividem-se em hanseníase dimorfo-tuberculoide (MHDT), dimorfo-dimorfo (MHDD) e dimorfo-virchowiano (MHDV), dependendo da proximidade clínica e imunológica com um ou outro polo. Ao percorrer o espectro, nota-se que a progressiva redução da resposta imune mediada por células é acompanhada por maior número de lesões neurocutâneas, aumento da carga bacilar e dos

níveis de anticorpos (MAYMONE; VENKATESH; LAUGHTER; ABDAT *et al.*, 2020; RIDLEY; JOPLING, 1966).

A apresentação clínica da doença é variável e está intimamente relacionada à resposta imune que o indivíduo é capaz de montar ao entrar em contato com o agente. No polo MHT, há, então, vigorosa resposta celular contra o agente, associada a ativação de linfócitos T CD4⁺ subtipos T_H1 e T_H17. Clinicamente, manifesta-se por lesões localizadas, por vezes máculas hipopigmentadas ou placas bem delimitadas, associadas à hipoestesia ou anestesia e com poucos bacilos. Um ou mais nervos podem estar acometidos. Em contraste, no polo MHV, de maior susceptibilidade, observa-se uma resposta humoral predominante, ausência de resposta celular específica e predomínio de linfócitos T CD8⁺, T_H2 e T_{reg}, culminando em lesões simétricas, disseminadas, eritematovioláceas, com múltiplos bacilos e capacidade de afetar diversos órgãos e tecidos. O dano neural, a princípio acompanhado de poucos sintomas, evolui com o espessamento dos nervos, resultando em anestesia. A forma MHDT constitui-se clinicamente de lesões similares às vistas na forma MHT, embora geralmente maiores e mais numerosas, com acometimento neural extenso. A forma MHDD situa-se no meio do espectro, sendo muito instável, com lesões anulares, assimétricas e bem definidas. É comum o padrão em “queijo-suíço” e com acometimento neural variável. A forma MHDV é caracterizada por placas infiltradas com centro tendendo à cura, podendo ocorrer múltiplos nódulos semelhantes ao ocorrido no polo virchowiano com a progressão do quadro. Diversos nervos podem estar acometidos (MAYMONE; LAUGHTER; VENKATESH; DACSO *et al.*, 2020; RIDLEY; JOPLING, 1966).

A forma indeterminada da doença (MHI) é aquela em que há uma ou poucas máculas hipocrômicas, por vezes mal delimitadas, podendo apresentar algum grau de hipoestesia e sem acometimento neural. Suas características histopatológicas ainda não estão definidas, razão pela qual essa forma não pode ser incorporada em nenhuma das cinco anteriormente citadas (RIDLEY; JOPLING, 1966).

A hanseníase neural primária (NP) é a forma caracterizada por manifestações clínicas exclusivamente neurais, sem a presença de lesões cutâneas e baciloscopia negativa. Assim como a MHI, também não foi expressa como uma categoria específica por Ridley e Jopling. É de difícil diagnóstico, visto que a maioria das instituições não tem acesso a métodos propedêuticos avançados para avaliação neural, como eletroneuromiografia e biópsia do nervo, e não há achados cutâneos ou baciloscópicos. Não obstante, a forma NP pode ser igualmente incapacitante, devendo ser investigada e tratada adequadamente (SANTOS; MENDONÇA; ANTUNES; SABINO *et al.*, 2017).

A classificação operacional adotada pela OMS para fins de tratamento da doença distingue indivíduos PB e MB, baseado no número de lesões cutâneas que apresentam: PB, até cinco lesões; MB, acima de cinco lesões e/ou baciloscopia positiva (WHO, 2000). Esta classificação também é a utilizada no Brasil pelo Ministério da Saúde (MS), que define o indivíduo PB como aquele que possui até cinco lesões cutâneas e baciloscopia negativa e MB quando apresenta mais de cinco lesões, baciloscopia positiva ou mais de um nervo acometido (BRASIL, 2022; WHO, 2018).

A apresentação dos estágios espectrais da doença demonstra a quão dinâmica ela é, reforçando a fundamental importância do diagnóstico e da abordagem terapêutica precoces, com a consequente interrupção de sua evolução (GOULART; PENNA; CUNHA, 2002).

2.5. Diagnóstico

O diagnóstico da hanseníase é eminentemente clínico-epidemiológico. A definição de caso trazida pelo MS é a presença de pelo menos um dos seguintes sinais cardinais: uma ou mais lesões ou áreas cutâneas com alteração de sensibilidade, seja térmica, dolorosa ou tátil; espessamento de nervo periférico associado a alterações sensitivas, motoras ou autonômicas; e presença do *M. leprae*, confirmada pela baciloscopia de raspado intradérmico ou biópsia de pele (BRASIL, 2022).

O diagnóstico da hanseníase pode ser auxiliado por exames complementares. A baciloscopia direta, a partir de esfregaço intradérmico de lesões ativas ou de sítios padronizados como cotovelos e lóbulos auriculares com posterior submissão do material à técnica de coloração de Ziehl-Neelsen, é um exame disponível, mas dependente do examinador dependente. Um resultado negativo, mesmo em um paciente MB, não exclui o diagnóstico e não invalida esta classificação operacional, visto que pode se tratar de um exame falso-negativo decorrente, por exemplo, de falhas na coleta ou erros de leitura (BRASIL, 2022).

O exame anatomopatológico da lesão cutânea é outra ferramenta importante, sobretudo nos casos duvidosos após avaliação clínica e baciloscópica, podendo alcançar 72% de especificidade e 70% de sensibilidade (BRASIL, 2022; CHEN; TSAI; LU; HU *et al.*, 2012). Os achados do exame variam amplamente e se associam à forma clínica observada. Na forma MHT, há granulomas bem-organizados, sem a presença de bacilos, compostos por histiócitos epitelioides e, por vezes, células gigantes de Langerhans, cercados por linfócitos. Na forma MHDT, há granulomas semelhantes, diferenciando-se pela possibilidade de presença escassa de bacilos e conservação de delgada faixa subepidérmica poupada, sem infiltrado inflamatório

significativo. No paciente MHDD, os bacilos já aparecem em maior quantidade, os granulomas já são menos organizados, as células epitelioides estão difusamente distribuídas, sem a presença de cinturão linfocitário periférico. Já naqueles MHDV, predominam os histiócitos, podendo apresentar citoplasma espumoso, com grande quantidade de bacilos, sem a organização estrutural dos granulomas observados nas formas anteriores. No polo MHV, observam-se histiócitos com graus variados de degeneração gordurosa, podendo se notar a formação de globias. Na MHI, os achados são inespecíficos, semelhantes aos de uma dermatite crônica, com linfócitos e histiócitos ao redor de anexos da pele e nervos, sem incontinência pigmentar. As biópsias de nervo apresentam padrões semelhantes às cutâneas (RIDLEY; JOPLING, 1966).

Outros exames complementares de auxílio diagnósticos são a reação em cadeia da polimerase (PCR) e os testes sorológicos. A PCR, embora de difícil acesso e, por essa razão, mais restrita a centros de pesquisas, é de grande interesse em casos de baciloscopia negativa e histopatologia inconclusiva. A técnica permite multiplicar exponencialmente sequências genéticas, facilitando a identificação do agente por meio da eletroforese ou outros métodos. Por sua vez, os testes sorológicos vêm sendo desenvolvidos com suporte biotecnológico, tornando-se alternativas diagnósticas mais acessíveis e eficazes. Houve grandes avanços recentes, como a melhora importante da acurácia pela utilização de proteínas quiméricas com elevada sensibilidade e especificidade diagnósticas, embora ainda restrita ao âmbito da pesquisa, ainda indisponível para uso clínico (ASSIS; CHAVES; LAGE; CARDOSO *et al.*, 2024; BRASIL, 2022).

2.6. Tratamento

A introdução da PQT pela OMS em 1981 representou um marco no controle da hanseníase, resultando em expressiva redução da prevalência global da doença e da sobrecarga imposta aos sistemas de saúde (Chemotherapy of leprosy. Report of a WHO Study Group, 1994). A principal motivação para essa mudança foi o surgimento de cepas resistentes à dapsona, fármaco anteriormente utilizado em monoterapia por décadas. O esquema terapêutico preconizado passou a variar conforme a classificação operacional dos pacientes. Para os casos PB, a dose supervisionada mensal consistia em rifampicina, enquanto a dose diária domiciliar era composta por dapsona. Já para os casos MB, a dose supervisionada incluía rifampicina e clofazimina, e a dose domiciliar era composta por dapsona e clofazimina (Chemotherapy of leprosy for control programmes, 1982).

Com o avanço das políticas globais de enfrentamento à hanseníase, a OMS revisou os esquemas terapêuticos em diversas ocasiões. Em 2018, nova diretriz foi emitida com o objetivo de ampliar a eficácia do tratamento e simplificar sua aplicação, recomendando a inclusão da clofazimina também para pacientes PB e a uniformização das doses supervisionadas com as três drogas: rifampicina, clofazimina e dapsona (BRASIL, 2018). Assim, o tratamento foi padronizado, diferenciando-se apenas pelo tempo de duração: seis meses para PB e 12 meses para MB. Em situações de resistência confirmada ou intolerância a algum fármaco, esquemas alternativos podem ser empregados (HUANG; SU; CHEN, 2024).

No Brasil, o novo regime terapêutico foi oficialmente adotado em 2021 sob a denominação de poliquimioterapia única (PQT-U), consolidando-se como a principal estratégia de tratamento da hanseníase no país. Essa abordagem tem demonstrado eficácia na redução da resistência à dapsona, na diminuição da taxa de recidivas e na queda da infectividade da doença (BRASIL, 2021; EICHELMANN; GONZALEZ GONZALEZ; SALAS-ALANIS; OCAMPO-CANDIANI, 2013; MAYMONE; VENKATESH; LAUGHTER; ABDAT *et al.*, 2020). No entanto, apesar desses avanços, o Brasil permanece entre os países com maior número de casos de hanseníase resistente à rifampicina. Esse dado evidencia a necessidade de vigilância ativa e acompanhamento rigoroso dos pacientes em tratamento, especialmente aqueles com risco aumentado de recidiva (LI; MA; LI; JIN *et al.*, 2024).

2.7. Reações hansênicas

As reações hansênicas são episódios inflamatórios imunomediados decorrentes da presença do bacilo no organismo. São classificadas em reação tipo 1 (reação reversa - RR) e reação tipo 2 (eritema nodoso hansênico - ENH), em referência a sua mais frequente forma de manifestação (MENDONÇA; COSTA; DE MELO; ANTUNES *et al.*, 2008). Ambas podem ocorrer antes, durante ou após o tratamento e, não raramente, estão relacionadas a fatores desencadeantes, como a vacinação, estresse físico e emocional, e infecções.

A RR resulta de uma súbita resposta inflamatória mediada por linfócitos do tipo T_H1 aos antígenos de *M. Leprae*, com produção de $TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$, $IL-1\beta$, $IL-2$ e $IL-12$. O nome "reversa" remete à resposta celular hiperérgica promovida, cuja intensidade mimetiza um retorno (na classificação de Ridley-Jopling) do paciente de um espectro *borderline* para o polo celular tuberculóide (SERRANO-COLL; WAN; RESTREPO-RIVERA; CARDONA-CASTRO, 2024). Pode ocorrer antes do tratamento, mas é mais comum após o início da PQT, geralmente

dentro dos primeiros dois meses. Corresponde à reação de hipersensibilidade do tipo IV de Gell e Coombs e manifesta-se clinicamente com neurite e exacerbação das lesões cutâneas.

A reação do tipo 2 ocorre primordialmente em indivíduos MB não tratados, embora possa ocorrer em qualquer momento do curso clínico e terapêutico. A ativação da cascata do sistema Complemento, juntamente com a deposição de imunocomplexos, desempenha papel importante na fisiopatologia da reação do tipo 2 em indivíduos MB. Essa reação está associada ao predomínio da resposta imune do tipo 2, resultando em quadro inflamatório semelhante à reação de hipersensibilidade do tipo III de Gell e Coombs (MENDONÇA; COSTA; DE MELO; ANTUNES *et al.*, 2008; RAJAN, 2003). O acometimento é sistêmico e envolve diversas citocinas. As citocinas presentes na reação tipo 1 estão presentes, somadas a aumento expressivo das interleucinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, além de TNF- α e TGF- β . A manifestação clínica mais comum é o ENH, nódulos subcutâneos eritematosos e dolorosos, resultado de uma paniculite predominantemente lobular com vasculite, provocadas pelo processo inflamatório, podendo ser acompanhado por diversas outras manifestações como febre, linfadenite, artrite, orquite e neurite (FONSECA; SIMON; CAZZANIGA; DE MOURA *et al.*, 2017; MENDONÇA; COSTA; DE MELO; ANTUNES *et al.*, 2008; REQUENA; SANCHEZ YUS, 2001).

2.8. Resposta imune e patogênese da hanseníase

A resposta imunológica na hanseníase relaciona-se diretamente com as manifestações clínicas da doença. Apesar da elevada infectividade do *M.leprae*, mais de 90% dos indivíduos expostos a ele não desenvolvem a doença, por resistência natural ao bacilo. A variabilidade das apresentações clínicas e dos episódios reacionais está intrinsecamente ligada ao tipo de resposta imune desencadeada, particularmente à diferenciação dos linfócitos T auxiliares em perfis T_H1 ou T_H2. Além disso, variantes genéticas em genes relacionados à produção de citocinas, receptores imunológicos e moléculas de sinalização (como IL-10, receptores NOD, receptores de vitamina D e proteínas transportadoras de íons intracelulares) podem alterar o equilíbrio entre as populações celulares. Isso resulta em respostas que variam de eficientes e controladas a disfuncionais ou hiperativas. Essa modulação genética influencia diretamente o espectro clínico da doença, favorecendo, por exemplo, uma resposta inflamatória do tipo 1, 2 ou mesmo uma resposta regulatória exacerbada, que permite a disseminação da bactéria e o desenvolvimento de formas mais graves. As diversas possibilidades explicam a heterogeneidade clínica observada na doença (MI; LIU; ZHANG, 2020).

As primeiras células do sistema imune responsáveis pelo reconhecimento dos bacilos são os macrófagos e as células dendríticas. O glicopeptídeo fenólico tipo 1 (PGL-1), presente na parede da micobactéria, liga-se à proteína do Complemento C3 favorecendo a fagocitose por meio dos receptores de Complemento nos macrófagos (BRASIL, 2022; MENDONÇA; COSTA; DE MELO; ANTUNES *et al.*, 2008; WALKER; LOCKWOOD, 2006).

Além de exercerem atividade fagocítica, os macrófagos desempenham papel fundamental na apresentação de antígenos aos linfócitos e na resposta microbida, contribuindo para a formação de granulomas e para a contenção eficaz do *M. leprae* em indivíduos capazes de montar uma resposta imune eficiente. O reconhecimento do bacilo por Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs), especialmente pelos receptores do tipo Toll (TLRs), constitui um importante estímulo para a diferenciação dos macrófagos em subpopulações funcionais distintas (FONSECA; SIMON; CAZZANIGA; DE MOURA *et al.*, 2017).

Os macrófagos de perfil M1 apresentam atividade pró-inflamatória e secretam elevados níveis de citocinas, como IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-12. Demonstram, também, elevada capacidade microbida mediada pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e pelo complexo NADPH-oxidase. Essas células promovem ainda a diferenciação de linfócitos T_{naive} em T_{H1}, os quais, por meio de um mecanismo de retroalimentação positiva, reforçam a ativação dos próprios macrófagos. Em contrapartida, os macrófagos do subtipo M2 estão envolvidos nos processos de reparo tecidual e apresentam perfil anti-inflamatório, caracterizado pela expressão aumentada de IL-10 e TGF- β , favorecendo uma resposta imune do tipo 2. A citocina IL-37 também exerce influência sobre essa diferenciação fenotípica, induzindo a polarização para o fenótipo M2, cuja expressão é mais acentuada em pacientes MB. Mais recentemente, foi identificado o fenótipo M4, associado à produção de IL-6, TNF- α e das metaloproteinases 7 e 12. Esse subtipo é mais frequentemente observado em pacientes do polo virchowiano, os quais demonstram menor eficácia na contenção do bacilo (FROES; TRINDADE; SOTTO, 2022).

As células dendríticas, por sua vez, encontram-se em maior número em pacientes do polo tuberculoide, o que pode contribuir para o predomínio de uma resposta imune celular mais efetiva. No contexto da apresentação antigênica, as células de Schwann também são capazes de processar e expor antígenos do *M. leprae*, desencadeando inflamação e promovendo lesão neural.

Outro fator potencialmente envolvido na diversidade de manifestações clínicas da hanseníase é o receptor de vitamina D (VDR). A estimulação do TLR, na presença de IL-15, aumenta a expressão desse receptor em pacientes tuberculoides, potencializando a atividade

microbicida dos macrófagos por meio da indução de IL-1 e da produção de peptídeos antimicrobianos, como as catelicidinas. Polimorfismos nos genes que codificam o VDR têm sido associados às diferentes formas clínicas da doença, sendo a forma MB mais relacionada a variantes que reduzem sua atividade, o que reforça a hipótese de que esse receptor desempenhe papel modulador na resposta imune frente ao *M. leprae* (FROES; TRINDADE; SOTTO, 2022; ROY; FRODSHAM; SAHA; HAZRA *et al.*, 1999).

Uma vez apresentado pelo complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC II), o antígeno do *M. leprae* é reconhecido pelos linfócitos T CD4⁺, que se diferenciam em células T_H1 ou T_H2, originando perfis de resposta imune distintos e antagônicos, o que é conhecido como o paradigma T_H1/T_H2 da hanseníase. Nesse contexto, a produção de IL-12 pelas células dendríticas (DCs) induz a diferenciação de linfócitos T *naive* em T_H1, responsáveis pela resposta imune mediada por células, atuando principalmente na ativação de macrófagos e na secreção das citocinas IFN- γ , IL-2 e IL-12. Essas, por mecanismos de retroalimentação positiva, potencializam a ativação de outras células apresentadoras de antígeno (APCs), promovendo o aumento de expressão de MHC II e intensificando o processo de apresentação antigênica (LI; MA; LI; JIN *et al.*, 2024).

Adicionalmente, citocinas como a linfotoxina α (LT α), envolvida na formação e manutenção do granuloma, e o TNF- α , que amplia o potencial microbicida dos macrófagos e contribui para a estruturação do granuloma, participam de forma decisiva na resposta tipo 1. Esse conjunto de mecanismos favorece a contenção bacilar, definindo o polo tuberculoide como o perfil hiperérgico e resistente à infecção pela micobactéria. Em contrapartida, na ausência de IL-12 e sob a influência de IL-4, os linfócitos T CD4⁺ diferenciam-se em células T_H2, responsáveis pela indução de uma resposta humoral. Esse perfil é predominante na hanseníase virchowiana, caracterizada por níveis elevados de IL-4, IL-5 e IL-10. Em conjunto, essas citocinas estimulam a ativação de linfócitos B, promovendo a produção aumentada de anticorpos contra o PGL-1 e contra outras proteínas bacilares e contribuem para a formação de imunocomplexos e perpetuação da supressão de resposta imune ao bacilo (DE CARVALHO; PASCOAL-XAVIER; ARAUJO; TEIXEIRA-CARVALHO *et al.*, 2024).

As formas intermediárias da hanseníase exibem ampla variabilidade imunológica. Entretanto, na evolução das formas dimorfas no sentido da dimorfa-virchowiana, observa-se tendência progressiva à redução da resposta celular, acompanhada de aumento da carga bacilar e intensificação da resposta tipo 2 (FONSECA; SIMON; CAZZANIGA; DE MOURA *et al.*, 2017).

Outros subtipos linfocitários também desempenham papel relevante na modulação imunológica da hanseníase. As células T reguladoras (T_{reg}) secretam IL-10 e TGF- β , citocinas fundamentais para a manutenção da tolerância imunológica, e expressam moléculas inibitórias como CTLA-4 e IL-35. Essas células são encontradas em maior número na circulação de pacientes do polo virchowiano, estando associadas ao perfil anérgico dessa forma clínica.

Os linfócitos T_H17 , por sua vez, exibem perfil pró-inflamatório e encontram-se mais expressos nos pacientes PB. A IL-17, principal citocina produzida por essas células, estimula a produção de TNF- α , iNOS e IL-6, promovem ativação das células endoteliais, além de modular a ativação e a função dos macrófagos, contribuindo, assim, para a manutenção do processo inflamatório crônico. Pela sua atividade pró-inflamatória intensa, exercem papel de destaque no processo de desmielinização neural observado nas neurites decorrentes da doença. Nota-se, portanto, que as vias de ativação imune na hanseníase são amplas e muito complexas, envolvendo outros subtipos de linfócitos além dos T_H1 e T_H2 , bem como múltiplas citocinas, que participam da modulação da resposta imunológica e influenciam a evolução clínica da doença (Figura 3) (DE CARVALHO; PASCOAL-XAVIER; ARAUJO; TEIXEIRA-CARVALHO *et al.*, 2024; FONSECA; SIMON; CAZZANIGA; DE MOURA *et al.*, 2017; FROES; TRINDADE; SOTTO, 2022).

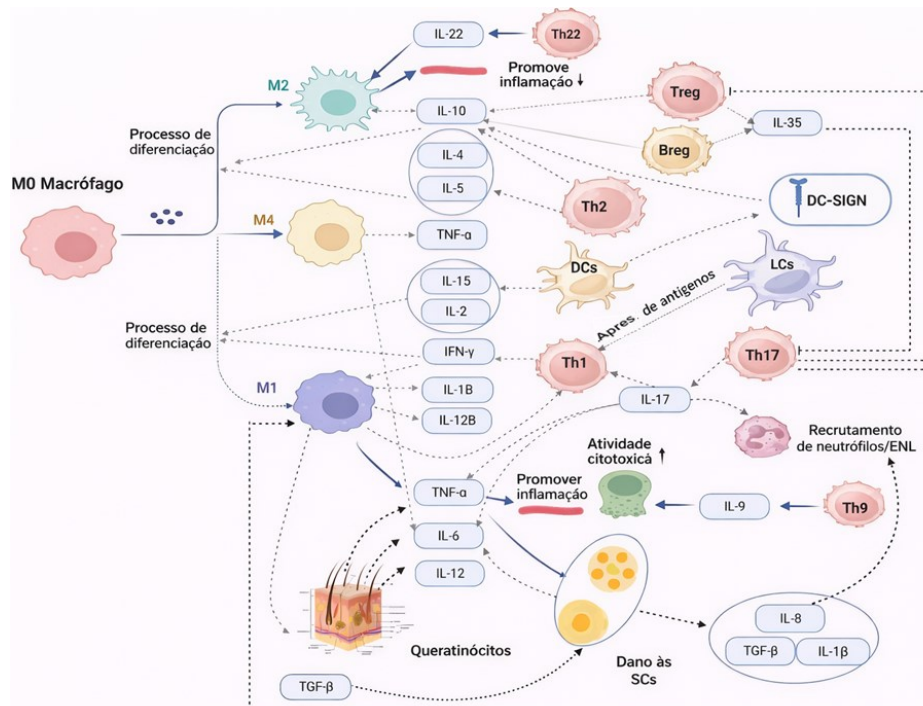


Figura 3. Representação esquemática da resposta imune na hanseníase: perfis T_H1 e T_H2 . Fonte: Adaptado de Li *et al.*, 2024.

A RR ocorre com participação das imunidades inata e adaptativa. Está associada a hipersensibilidade do tipo IV e cursa com aumento significativo dos linfócitos TCD4⁺, com exacerbação da resposta celular, aumento da liberação de TNF- α e IFN- γ pelos linfócitos T além da participação de citocinas pró-inflamatórias, sobretudo IL-9 e IL-17, com impacto importante no agravamento neural e nas manifestações clínicas resultantes. No ENH, observa-se deposição de imunocomplexos no espaço extravascular, associada à presença de infiltrado neutrofílico. Diversas interleucinas típicas da resposta tipo 2, como IL-4, IL-6 e IL-10, encontram-se elevadas, juntamente com o TNF- α . Há, ainda, predomínio de resposta T_H17, evidenciada pelo aumento da expressão de IL-17 e pela redução da atividade de T_{reg}. A participação das diversas citocinas na reação tipo 2 demonstra o caráter sistêmico desta manifestação, justificando o potencial de dano a múltiplos órgãos e tecidos (DE CARVALHO; PASCOAL-XAVIER; ARAUJO; TEIXEIRA-CARVALHO *et al.*, 2024; FONSECA; SIMON; CAZZANIGA; DE MOURA *et al.*, 2017).

2.9. Inflamassomas

O termo inflamassoma foi criado para descrever complexos de alto peso molecular, componentes da imunidade inata, que ativam caspases inflamatórias induzindo a secreção de IL-1 β e IL-18 (MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002). Os inflamassomas mais estudados são o NLRP3, NLRC4, NLRP1, AIM2 e *Pyrin*, além daqueles responsáveis pela via não canônica, mediada por caspases 4, 5 e 11. Esses modelos estão bem descritos quanto à estrutura, ativação e papel em várias doenças. Outros inflamassomas, ainda pouco explorados, seguem em estudo com potencial de revelar novos mecanismos inflamatórios (PANDEY; LI; GAUTAM; GHOSH *et al.*, 2025).

2.9.1. Estrutura, componentes e mecanismos de ativação do inflamassoma NLRP3

Inflamassomas geralmente possuem uma estrutura formada por um sensor, um adaptador e um efetor. No caso dos inflamassomas do tipo NLR, esses são, respectivamente, um receptor citoplasmático do tipo NOD, uma molécula adaptadora ASC e a enzima caspase 1 (FU; WU, 2023).

Receptores do tipo domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos (NLR) são PRR citoplasmáticos capazes de reconhecer padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), como o ácido úrico, radiação ultravioleta B (UVB) e histonas, além de diversos PAMPs, como

o peptidoglicano bacteriano muramil dipeptídeo (MDP). A partir desse reconhecimento, os NLRs ativam a clivagem proteolítica e induzem a produção de citocinas (ROH; SOHN, 2018). O MDP de *M. leprae* tem estrutura singular: substitui o L-Ala por glicina e não apresenta N-glicosilação no ácido murâmico, o que o diferencia dos MDPs de outros microorganismos. Mesmo assim, é reconhecido por receptores NOD, principalmente o NOD2. Esse reconhecimento ativa a resposta inflamatória e estimula citocinas como IL-32, IL-1 β e IL-6, auxiliando no controle da infecção (SCHENK; MAHAPATRA; LE; KIM *et al.*, 2016).

A família dos NLRs é composta por 22 subtipos em humanos, com expressão predominante em células do sistema imune (como linfócitos e APCs, incluindo macrófagos e células dendríticas), embora também possam ser expressos em células não imunes (como epiteliais e mesoteliais) (CHEN; TSAI; LU; HU *et al.*, 2012; TING; KASTNER; HOFFMAN, 2006). Estruturalmente, os NLRs compartilham um domínio central de oligomerização (NOD), um domínio carboxiterminal de repetições ricas em leucina (LRR), responsável pelo reconhecimento de moléculas antigênicas, e um domínio aminoterminal variável, que determina sua função efetora e permite sua ativação frente a PAMPs ou DAMPs (ATHMAN; PHILPOTT, 2004). A classificação dos NLRs baseia-se justamente nesse domínio N-terminal: a subfamília NLRA possui um domínio de ativação ácido, como no ativador da transcrição do MHC classe II; a NLRB contém um domínio BIR, encontrado em proteínas como a proteína inibidora da apoptose neuronal (NAIP); a NLRC apresenta o domínio CARD, característico de membros como NLRC1 (NOD1), NLRC2 (NOD2), NLRC3 a NLRC5 e NLRX1; por fim, a subfamília NLRP é definida pela presença do domínio de pirina (PYD) e inclui os membros NLRP1 a NLRP14 (AMIN; BOCHE; RAKIC, 2017).

A proteína NLRP3 é uma das mais bem caracterizadas na resposta imune inata relacionada à ativação de caspases e é ativada por ampla variedade de moléculas derivadas de patógenos, sinais endógenos e de origem ambiental. Da mesma forma, essa complexa estrutura molecular pode ser regulada por mecanismos inibitórios induzidos por certas proteínas virais, fatores de virulência bacteriana e vias moleculares do próprio hospedeiro (como a pirina e a caspase-12), a fim de modular a resposta inflamatória potencial do inflamassoma (MARIATHASAN; MONACK, 2007; SCHRODER; TSCHOPP, 2010).

O inflamassoma NLRP3 desempenha papel central na regulação da inflamação em diversas doenças dermatológicas, podendo atuar tanto na defesa imunológica quanto na patogênese quando sua ativação é exacerbada. Em infecções como a acne, é ativado por bactérias como *Cutibacterium acnes*, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β . Em doenças autoimunes e autoinflamatórias, como a psoríase, funciona como

sensor de sinais de perigo, amplificando respostas inflamatórias desreguladas. Durante a cicatrização de feridas, sua ativação promove a fase inflamatória necessária para o reparo tecidual, embora a ativação excessiva possa prejudicar a resolução adequada do processo (WANG; DUNCAN; LI; SHI, 2020).

A proteína do tipo *speck* associada à apoptose contendo domínio CARD (ASC) é uma molécula adaptadora necessária em grande parte dos inflamassomas. Ela é codificada pelo gene *PYCARD* e contém dois domínios estruturais envolvidos na mediação de interações entre proteínas envolvidas nos processos de morte celular e inflamação. Especificamente, ASC possui um domínio Pirina e um domínio CARD. O domínio Pirina permite que ASC interaja com os sensores do inflamassoma, promovendo sua oligomerização em estruturas denominadas *specks*, compostas principalmente pela união de diversos dímeros de ASC. Já o domínio de ativação e recrutamento de caspases (CARD) aproxima os monômeros de pró-caspase-1, facilitando sua autoativação e levando à formação do complexo funcional da caspase-1 (LATZ; XIAO; STUTZ, 2013).

As caspases são proteases indutoras de morte celular ou de inflamação, que se encontram na forma inativa quando sintetizadas. As caspases com atividade pró-inflamatórias mais conhecidas em humanos são a caspase-1, 4 e 5. Dentre elas, a caspase-1 é a mais bem caracterizada e depende da ativação pelo inflamassoma para sua maturação e se torne ativa. Uma vez ativa, inicia-se uma cascata enzimática inflamatória que culmina na ocorrência de piroptose, um tipo de morte celular dependente de ativação de caspase, que normalmente ocorre em resposta a patógenos intracelulares (como no caso do *M. leprae*) e é caracterizada por alta resposta inflamatória, lise osmótica, extravasamento de conteúdo pró-inflamatório e condensação nuclear, distinguindo-se, portanto, da morte silenciosa que ocorre na apoptose (SCHRODER; TSCHOPP, 2010).

A ativação de caspases pelo inflamassoma envolve duas etapas principais. A primeira etapa, chamada de fase de preparação ou *priming*, envolve o reconhecimento dos PAMPs e DAMPs pelos PRRs, levando a liberação de fator nuclear kappa B (NF- κ B), que estimula a transcrição de componentes do inflamassoma, como NLRP3 inativado, pró-IL-1 β e pró-IL-18. A segunda etapa é a ativação propriamente dita, com oligomerização do NLRP3 e a montagem estrutural do complexo ativo, ante a agregação dos demais componentes como ASC e a pró-caspase-1 (Figura 4) (LI; QIANG; CAO; WU *et al.*, 2024; ZHAO; ZHAO, 2020). Embora existam lacunas consideráveis no entendimento dos processos moleculares envolvidos nesta etapa, duas vias de ativação são amplamente caracterizadas: a via canônica e a via não canônica.

Na via canônica, a cascata de eventos se dá mediante múltiplas etapas que finalizam com a ativação da caspase-1 e liberação de interleucinas. Nela, alterações no gradiente de concentração iônica podem tanto ativar quanto inibir o inflamassoma. A redução da concentração intracelular de potássio (K) e cloreto (Cl) pode promovê-lo, enquanto o aumento da concentração extracelular desses íons tende a inibi-lo. Além disso, outras modificações intracelulares como a lise lisossomal, a liberação de fragmentos de DNA mitocondrial e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como as geradas por fármacos como o imiquimod, também podem ativar o inflamassoma.

A via não canônica de ativação do inflamassoma ocorre a partir da liberação de lipopolissacarídeo (LPS) proveniente de bactérias Gram-negativas fagocitadas. O LPS ativa as caspases 4 e 5, que induzem a morte celular por meio da formação de poros na membrana plasmática. A inflamação resultante desse processo promove a ativação do inflamassoma pela via canônica, com a liberação das citocinas IL-1 β e IL-18. Além disso, existem vias alternativas de ativação do inflamassoma associadas ao LPS, mas com a participação de outras caspases, particularmente as caspases 6 e 8, o que sugere interações complexas entre as vias de apoptose e piroptose celular (MA, 2023).

As citocinas IL-1 β e IL-18 fazem parte da família da IL-1 e são moléculas fundamentais na organização celular em defesa contra agentes nocivos. A IL-1 β é responsável pela cascata inflamatória que resulta em efeitos tanto locais quanto sistêmicos, uma vez que o principal receptor ao qual se liga, receptor de IL-1 tipo I (IL-1R1) está presente na maioria das células. Essa interação promove ativação de NF-kB e secreção de outros mediadores pró-inflamatórios como IL-6, TNF- α , a enzima ciclooxygenase tipo 2 (COX-2) e da própria IL-1 β , potencializando a resposta por retroalimentação positiva (SATO; OTSUKA; CONTASSOT; FRENCH, 2015). A IL-18 apresenta uma atividade inflamatória mais comedida, se liga ao receptor de IL-18, sobretudo o tipo alfa (IL-18R α), estimula liberação de mediadores inflamatórios, mas apenas quando em altas concentrações consegue induzir febre. É essencial para o estímulo de resposta inflamatória tipo 1 e, conseqüentemente, para a liberação de interferon gama (IFN- γ), molécula com importante papel no estímulo à atividade microbicida. Nota-se, portanto, que a liberação de tais citocinas a partir da ativação do inflamassoma, seja uma liberação ativa por meio da interação das formas bioativas com a membrana plasmática celular, seja passiva por meio da piroptose com conseqüente extravasamento, tem uma função sinalizadora essencial às células vizinhas no processo de contenção da infecção (FENINI; CONTASSOT; FRENCH, 2017; VAN DE VEERDONK; NETEA; DINARELLO; JOOSTEN, 2011).

A ativação dos inflamassomas constitui mecanismo essencial da resposta imune inata, especialmente frente a agressões infecciosas, desempenhando papel crucial na contenção de processos patológicos. No entanto, sua ativação exacerbada pode resultar em resposta inflamatória descontrolada, com potencial para causar danos teciduais significativos e contribuir para o desenvolvimento de doenças autoimunes e imunomediadas. Nesse contexto, a modulação negativa da atividade dos inflamassomas torna-se estratégica, sendo mediada por elementos como os interferons do tipo I (IFN- α e IFN- β) e o óxido nítrico (NO), os quais exercem papel regulador sobre esses complexos multiproteicos. Esses mediadores limitam a intensidade da inflamação e despontam como potenciais alvos terapêuticos em doenças autoinflamatórias, nas quais os inflamassomas possuem participação patogênica relevante, a exemplo da esclerose múltipla e da febre familiar do Mediterrâneo (BLEVINS; XU; BIBY; ZHANG, 2022; KELLEY; JELTEMA; DUAN; HE, 2019; SHAO; XU; HAN; SU *et al.*, 2015).

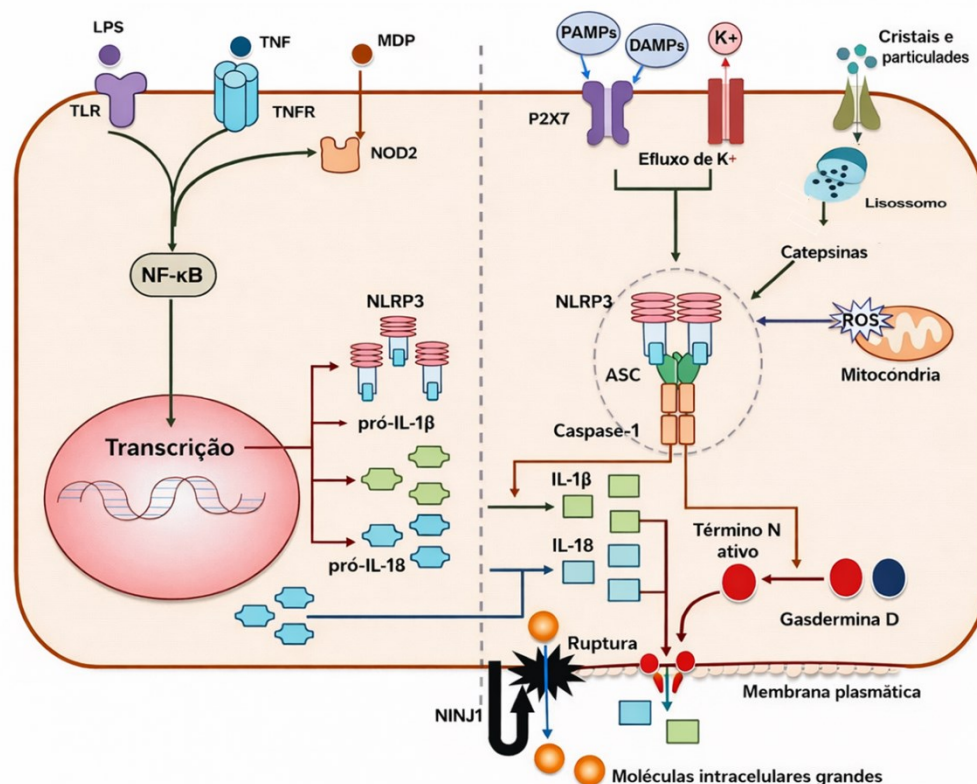


Figura 4. Diagrama esquemático da ativação do Inflamassoma NLRP3. Fonte: Adaptado de Li *et al.*, 2024.

2.9.2. O Inflamassoma NLRP3 e a Hanseníase

Apesar das incertezas ainda existentes sobre os mecanismos que regulam a ativação do inflamassoma frente às micobactérias, evidências apontam para uma ativação preferencial da via não canônica do NLRP3 em indivíduos com hanseníase MB. Nesses casos, observa-se maior expressão de NLRP3 e das caspases-4/5, possivelmente em resposta à elevada carga bacilar nas lesões. Em contrapartida, a baixa expressão dessas moléculas no polo tuberculoide poderia decorrer da escassez de bacilos viáveis, o que limitaria a ativação do complexo. Tal ativação, no entanto, não parece resultar em maior eficácia na contenção da infecção, sugerindo que o bacilo possa interferir negativamente na funcionalidade do inflamassoma, à semelhança do que se observa na infecção por *M. tuberculosis* (MENDES; JOAQUIM; ZAMAE; ASSIS *et al.*, 2020).

Embora o NLRP3 seja o inflamassoma mais estudado, evidências crescentes apontam para um papel significativo de outros, como o NLRP1, na resposta imune frente ao *M. leprae*. Em uma coorte desenvolvida no Brasil, variantes genéticas e haplótipos específicos de NLRP1 foram associados à suscetibilidade à hanseníase, em especial à forma PB. Esses polimorfismos parecem modular a ativação do inflamassoma e aumentar a produção de IL-1 β , sugerindo um possível envolvimento do NLRP1 na mediação da resposta inflamatória do tipo 1 e na formação de granulomas. Além disso, a sobreposição de variantes genéticas entre hanseníase e doenças inflamatórias crônicas (como a doença de Crohn) reforça a hipótese de vias imunológicas compartilhadas envolvendo receptores da família NLR, incluindo o NLRP1 (PONTILLO; LAURENTINO; CROVELLA; PEREIRA, 2013).

Outro membro da família NLR envolvido na resposta inflamatória da hanseníase é o NLRC4, da subfamília NLRC. Estudos indicam que esse receptor também participa da ativação de inflamassomas no contexto de infecção pelo *M. leprae*, com expressão significativamente aumentada em pacientes com a forma MHV em comparação à forma MHT e a controles saudáveis. Além disso, os níveis de NLRC4 mostraram correlação positiva não apenas com o índice baciloscópico (IB), mas também com marcadores clínicos de gravidade, como o grau de incapacidade física e o dano neural, sugerindo um papel ativo desse inflamassoma na imunopatogênese das formas MB. A menor expressão de NLRC4 observada no polo tuberculoide pode estar relacionada à escassez ou ausência de bacilos viáveis, o que resultaria em menor estímulo para a ativação de inflamassomas e, consequentemente, em níveis reduzidos desse receptor nessa forma clínica (BATTÀ; FAR; SOLIMAN; NASSAR, 2023).

O estado de hiperativação dos inflamassomas pode repercutir na hanseníase especialmente na ocorrência de reações hansênicas e, sobretudo, se outros componentes celulares envolvidos na produção ou degradação dos inflamassomas estiverem com funcionamento inadequado. A deficiência na autofagia celular é um exemplo disso, pois compromete a degradação de componentes celulares e de partes do próprio inflamassoma, permitindo seu acúmulo no meio intracelular e favorecendo a ativação mais intensa do complexo NLRP3. Isso resulta em maior liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , que desempenha papel importante especialmente na RR. Além disso, a maior expressão de PRR, como o TLR2, intensifica o estímulo inflamatório e parece atuar em sinergia com o inflamassoma, indicando uma predisposição à ocorrência futura de reações hansênicas (PINHEIRO; SCHMITZ; SILVA; DIAS *et al.*, 2018).

3. Justificativa

A hanseníase apresenta uma resposta imunológica complexa, que impacta não apenas a apresentação clínica dos pacientes, mas também as oscilações observadas ao longo do curso da doença. Embora estudos prévios com amostras teciduais tenham demonstrado a participação dos inflamassomas, persistem lacunas relevantes quanto ao papel desses complexos na modulação da resposta imune frente ao *M. leprae*. Nesse contexto, estudos que avaliem a coexpressão de componentes estruturais do inflamassoma e das vias imunológicas em diferentes apresentações clínicas da doença, utilizando células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) ativadas, podem ampliar a compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos e contribuir para o esclarecimento da imunopatogênese da hanseníase.

4. Objetivos

4.1. Objetivo geral

Analisar a coexpressão NLRP3/ASC do inflamassoma e a produção das citocinas em macrófagos derivados de monócitos e em subpopulações de células T (CD4⁺ e CD8⁺) de pacientes com diferentes formas clínicas da hanseníase.

4.2. Objetivos específicos

- Realizar avaliação diagnóstica clínica e laboratorial, incluindo a investigação do perfil inflamatório e a detecção de bacilos por baciloscopia, para a classificação operacional dos pacientes estudados;
- Avaliar, em indivíduos sadios (grupo controle) e em pacientes PB e MB, a expressão intracelular das proteínas NLRP3 e ASC em subpopulações de fagócitos derivados de monócitos (FDM) ativados (CD14⁺HLA-DR⁺), bem como o perfil de citocinas relacionadas, a partir de ensaios de estímulo *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) com antígeno solúvel de *M. leprae*;
- Investigar a relação entre a expressão do inflamassoma NLRP3/ASC e a carga bacilar, por meio da análise de correlações entre o índice baciloscópico, produção de óxido nítrico (NO) e os níveis de produção das citocinas IL-1 β e IL-18;
- Caracterizar o perfil de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ produtores de IFN- γ e IL-10 (intracelular), correlacionando esses achados com o tipo de resposta imunológica inata associada ao NLRP3/ASC.

5. Materiais e Métodos

5.1. Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa, local de estudo e critérios de seleção dos participantes

Este projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) das instituições participantes, conforme documentação apresentada nos Anexos I e II. As aprovações foram concedidas pelo CEP da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG – CAAE: 68583223.2.0000.5149) e pelo CEP da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (HEM/FHEMIG – CAAE: 68583223.2.3001.5124).

A seleção dos participantes ocorreu mediante abordagem direta realizada pelo médico assistente durante as consultas na instituição, ocasião em que eram apresentados os objetivos e procedimentos do estudo, incluindo a coleta sanguínea, e sanadas eventuais dúvidas. Após a entrevista inicial e a manifestação de interesse, a inclusão no estudo foi efetivada mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Indivíduos saudáveis foram recrutados de acordo com os critérios de elegibilidade estabelecidos.

A identificação e o recrutamento dos participantes foram realizados pela equipe médica do Ambulatório de Dermatologia Tropical e Hansenologia do Hospital Eduardo de Menezes, instituição de referência estadual para o diagnóstico, tratamento e reabilitação de pacientes com hanseníase, vinculada à Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais. O diagnóstico foi estabelecido com base em critérios clínicos de acordo com as diretrizes do MS, corroborado por exames complementares, incluindo a determinação do índice baciloscópico e a realização de biópsia cutânea. Foram incluídos pacientes com idade entre 18 e 60 anos, com diagnóstico confirmado de hanseníase nos 12 meses anteriores à data de recrutamento, caracterizados como casos novos da doença. Nenhum participante apresentava evidências de recidiva ou reinfeção, nem se encontrava em vigência de surto reacional. Foram excluídos indivíduos em uso recente de imunossupressores (menos de 30 dias antes da coleta) ou com doenças infecciosas ou autoimunes concomitantes.

5.2. 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 (DP = 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 (três grupos) foi de oito indivíduos.

Os pacientes com hanseníase foram estratificados em dois grupos, de acordo com as formas clínicas da doença: Grupo PB (n = 18; média da idade de 38,2 ± 14,8; 10 do sexo feminino e 8 do masculino), composto por indivíduos com hanseníase paucibacilar, incluindo as formas MHT e MHDT com IB igual a zero; e Grupo MB (n = 22; média da idade de 48,8 ± 13,3; 4 do sexo feminino e 18 do masculino), constituído por pacientes com hanseníase multibacilar, englobando as formas MHT, MHDD, MHDV e MHV (Tabela 1). Adicionalmente, foi incluído um grupo controle (CTL), composto por 16 indivíduos saudáveis (média da idade de 33,7 ± 10,3; 8 do sexo feminino e 8 do masculino), sem histórico de doenças infectocontagiosas ou autoimunes, sem diagnóstico prévio de hanseníase e sem relato de contato conhecido com indivíduos acometidos pela doença. Os participantes do grupo controle apresentavam faixa etária entre 18 e 60 anos e eram funcionários do Laboratório de Análises Clínicas do Colégio Técnico da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)(CARVALHO, A.; FERRAZ, I. A.; HOJO-SOUZA, N. S.; MEDEIROS, F. A. C. *et al.*, 2023).

Tabela 1. Distribuição dos pacientes com hanseníase de acordo com as formas clínicas.

Grupo	Forma Clínica	Número de Indivíduos
CTL	-	16
PB	MHT	2
	MHDT	16
MB	MHDD	2
	MHDV	3
	MHV	17

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

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

O antígeno empregado nos experimentos de estimulação das PBMCs consistiu em uma suspensão contendo 40.000.000 bacilos de *M. leprae*/mL, fornecida pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná. Originalmente preparado para o teste intradérmico de Mitsuda, esse material foi utilizado *in vitro* com o propósito de analisar a resposta imunológica dos leucócitos frente ao estímulo.

5.4. Obtenção, cultura e estimulação de PBMCs

As células mononucleares do sangue periférico foram obtidas a partir de 15 mL de sangue total coletados de cada participante dos grupos G1 a G3, utilizando tubos com heparina sódica como anticoagulante. A separação celular foi realizada por gradiente de densidade com HISTOPAQUE®-1077. Após centrifugação a $1.200 \times g$ por 40 minutos a 25 °C, a interface contendo as PBMCs foi cuidadosamente retirada e transferida para tubos de polipropileno de 50 mL. Em seguida, as células foram submetidas a duas lavagens por centrifugação e ressuspensas em meio RPMI 1640 completo. A contagem e avaliação de viabilidade celular foram efetuadas em Câmara de Neubauer, empregando Azul de Trypan (diluição 1:10). Por fim, a suspensão celular foi ajustada para 1×10^7 células/mL, em conformidade com protocolo previamente descrito (CARVALHO, A. M. R. S.; FERRAZ, I. A.; HOJO-SOUZA, N. S.; MEDEIROS, F. A. C. *et al.*, 2023; CHEBLI-DE-ABREU; CARVALHO; MENEZES; MACEDO *et al.*, 2025).

As PBMC's foram distribuídas em placas de cultura de 96 poços, na concentração de 1×10^6 células por poço, em 200 µL de meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino

e Pen-Strep. A estimulação celular foi realizada com 1,25 μ L do antígeno de Mitsuda, correspondente à proporção de 1:20 entre bacilos e células, seguida de incubação por quatro horas em estufa de CO₂ a 37 °C e 5% de umidade. Como controles positivos de ativação, empregou-se concanavalina A (ConA) para linfócitos e lipopolissacarídeo (LPS) para monócitos. Culturas mantidas nas mesmas condições, porém sem adição de antígeno ou estímulos ConA e LPS, foram utilizadas como controles negativos para o cálculo do índice de estimulação.

5.5. Avaliação do perfil de expressão de marcadores de superfície celular em fagócitos derivados de monócitos e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ após ensaio de estimulação *in vitro*

Em alíquotas de 200 μ L provenientes das culturas preparadas conforme descrito no passo anterior, adicionaram-se 20 μ L de Brefeldina A (BFA, Sigma-Aldrich) para obtenção de uma concentração final de 10 μ g/mL. As amostras foram mantidas sob incubação adicional por quatro horas nas mesmas condições controladas de estufa previamente estabelecidas. Em seguida, as células foram coradas com o reagente de viabilidade celular "Live/Dead" (MP34955 – Invitrogen) por 20 minutos a 4 °C, processo seguido de centrifugação a 400 $\times$ g por cinco minutos também a 4 °C. Após a etapa de marcação para viabilidade, procedeu-se à coloração imunofenotípica com anticorpos monoclonais específicos para a caracterização de monócitos e subpopulações linfocitárias. Para isso, 50 μ L de uma solução previamente preparada com anticorpos monoclonais diluídos em tampão FACS foram dispensados em placas de 96 poços com fundo em U (Becton-Dickinson), de acordo com os seguintes painéis:

- Para identificação de fagócitos derivados de monócitos: CD14 e HLA-DR;
- Para caracterização de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺: CD3, CD4 ou CD8 e CD45RO.

As amostras celulares foram submetidas a incubação inicial de 20 minutos a 4 °C, em ambiente protegido da luz, para favorecer a fixação adequada. Em seguida, adicionaram-se 100 μ L da solução BD Cytofix/Cytoperm (Becton-Dickinson) em cada poço, realizando-se leve homogeneização da placa para garantir distribuição uniforme. As amostras permaneceram incubadas por mais 20 minutos nas mesmas condições de temperatura e ausência de luz. Após esse passo, foi realizada centrifugação a 400 $\times$ g por cinco minutos a 4 °C, seguida do descarte cuidadoso dos sobrenadantes. As células foram ressuspensas em vórtex e receberam 100 μ L da solução BD Perm/Wash (Becton-Dickinson), sendo novamente homogeneizadas e submetidas a nova etapa de lavagem por centrifugação a 400 $\times$ g a 4 °C por cinco minutos. Concluídas as etapas de permeabilização e lavagem, procedeu-se à marcação intracelular utilizando anticorpos

monoclonais específicos. Para isso, foram dispensados 50 µL de uma mistura de anticorpos previamente preparados em tampão FACS em placas de 96 poços com fundo em U (Becton-Dickinson), com os seguintes marcadores:

- Para fagócitos derivados de monócitos: NLRP3, ASC, IL-1 β e IL-18;
- Para linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺: IFN- γ e IL-10.

Em seguida, as amostras foram incubadas com a mistura de anticorpos monoclonais por 20 minutos a 4 °C, sob proteção da luz, para permitir a marcação específica das populações celulares de interesse. Após a incubação, procedeu-se à centrifugação a 400 $\times$ g por cinco minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram cuidadosamente descartados, e as células ressuspensas e homogeneizadas por vórtex, sendo então adicionados 200 µL de solução fixadora (MFF) por poço. Posteriormente, as suspensões celulares foram transferidas para microtubos de poliestireno com capacidade de 500 µL (Becton Dickinson). A aquisição dos dados foi realizada em um citômetro de fluxo BD LSRFortessa™ (Becton Dickinson), com posterior análise morfométrica e imunofenotípica conduzida no software FlowJo® (versão 10.0). Para a avaliação imunológica em amostras de sangue periférico, empregou-se uma abordagem metodológica voltada à caracterização funcional de monócitos e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, por meio da detecção de marcadores moleculares de superfície e intracitoplasmáticos (Tabela 2).

Tabela 2. Marcadores utilizados para avaliação do perfil de células do sistema imunológico inato e adaptativo.

Anticorpo	Células	Fluorocromo	Clone	Fabricante	Nº de Catálogo
Live/Dead	Todas	Acqua	-	ThermoFisher	L34965
CD14	FDM	APC-Cy7	HCD14	Biolegend	325620
HLA-DR	FDM	AF-700	LN3	ThermoFisher	56-9956-42
NLRP3	FDM	AF-488	768319	R&D Systems	IC7578G
ASC	FDM	PE-Cy7	OTI6G5	Novus Biologicals	NBP2-71879PECY7
IL-1b	FDM	PE	CRM56	ThermoFisher	12-7018-82
IL-18	FDM	AF-405	74801	R&D Systems	IC646V-100UG
CD3	Linfócitos	FITC	OKT3	ThermoFisher	11-0037-42
CD4	Linfócitos	APC-Cy7	A161A1	Biolegend	357416
CD8	Linfócitos	AF-700	SK1	Biolegend	344724
CD45RO	Linfócitos	PE-Cy5	UCHL1	Biolegend	304208
IFN-γ	Linfócitos	PE	4S.B3	ThermoFisher	12-7319-42
IL-10	Linfócitos	eFluor660	JES3-9D7	ThermoFisher	50-7108-42

5.6. Aquisição e estratégia de análise de dados

Para a caracterização celular por citometria de fluxo, foram considerados os parâmetros físicos de tamanho celular (FSC) e complexidade interna ou granulosidade (SSC), além dos sinais fluorescentes gerados pela excitação dos fluoróforos por diferentes fontes de *laser*. Os *lasers* utilizados incluíram: azul (488 nm), com detecção nos canais correspondentes a FITC, PE, PE-Cy5 e PE-Cy7; vermelho (640 nm), para os fluoróforos APC, AF-700 e APC-Cy7; e violeta (405 nm), direcionado para Pacific Blue e Amcyan. A análise das populações celulares de interesse, bem como a determinação de suas respectivas frequências percentuais, foi realizada por meio do *software* FlowJo® (versão X). Foram adquiridos pelo menos 100.000 eventos, abrangendo as populações de linfócitos e fagócitos derivados de monócitos.

5.6.1. Estratégias de análise para a caracterização das populações de fagócitos derivados de monócitos e linfócitos

Para caracterização fenotípica dos fagócitos derivados de monócitos e dos linfócitos cultivados *in vitro*, bem como de suas subpopulações, foram aplicadas estratégias de *gating* sequencial na análise citométrica. Inicialmente, elaborou-se um gráfico de dispersão frontal (*forward scatter*, FSC-A $\times$ FSC-H; Figura 5A) para a seleção de eventos correspondentes a células únicas (*singlets*). Em seguida, aplicou-se um *gate* específico para excluir células inviáveis, selecionando a população de células viáveis negativas para o corante de morte celular (Live/Dead; Figura 5B). Posteriormente, com base na dispersão lateral (*Side Scatter*, SSC) *versus* dispersão frontal (FSC), definiu-se um *gate* abrangendo as populações de monócitos e linfócitos (Figura 5C). Para a caracterização específica, foram aplicados *gates* adicionais: macrófagos derivados de monócitos foram identificados como CD14⁺ (APC-Cy7; Figura 5D) e linfócitos T como CD3⁺ (FITC; Figura 5E).

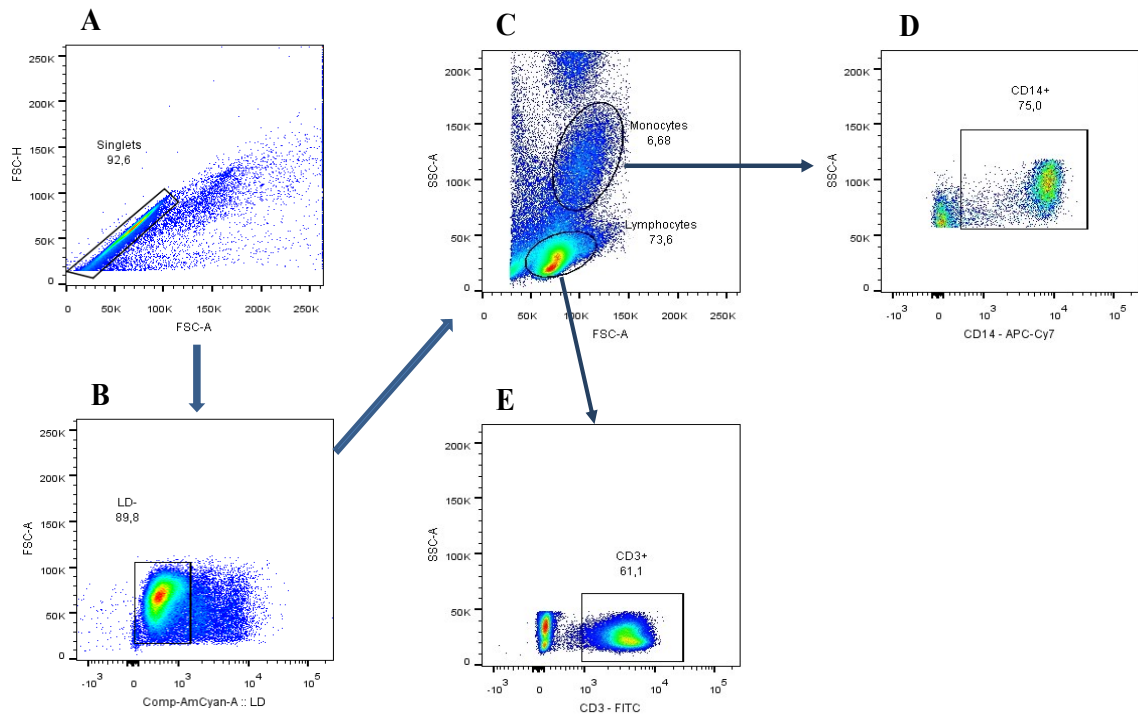


Figura 5. Análise representativa de macrófagos derivados de monócitos e linfócitos do sangue periférico na população de células avaliada por citometria de fluxo. A figura A representa a seleção de células isoladas (*singlets*). B representa a população de células vivas (Live/Dead). A figura C representa 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).

5.6.2. Estratégias de análise para a caracterização das populações de FDMs NLRP3⁺ASC⁺

Após a definição inicial da população de células CD14⁺ (Figura 5D), foi gerado um gráfico de dispersão lateral (SSC) em relação à intensidade de fluorescência para o marcador HLA-DR (AF-700; Figura 6A). A partir desse *gate* previamente estabelecido, aplicaram-se de forma sequencial as seguintes estratégias analíticas: (i) SSC versus fluorescência para NLRP3⁺ASC⁺ (AF-488 e PE-Cy7, respectivamente; Figura 6B). Em sequência, procedeu-se à avaliação da expressão de citocinas intracelulares, com gráficos SSC *versus* intensidade de fluorescência para IL-1 β (PE e Figura 6C) e IL-18 (AF-405; Figura 6D). Todas as análises foram conduzidas para determinação tanto do percentual de células positivas dentro do total de células presentes na avaliação, quanto da intensidade média de fluorescência (MFI), que traduz a intensidade média com que as células avaliadas expressam o marcador, por meio de gráficos do tipo histograma.

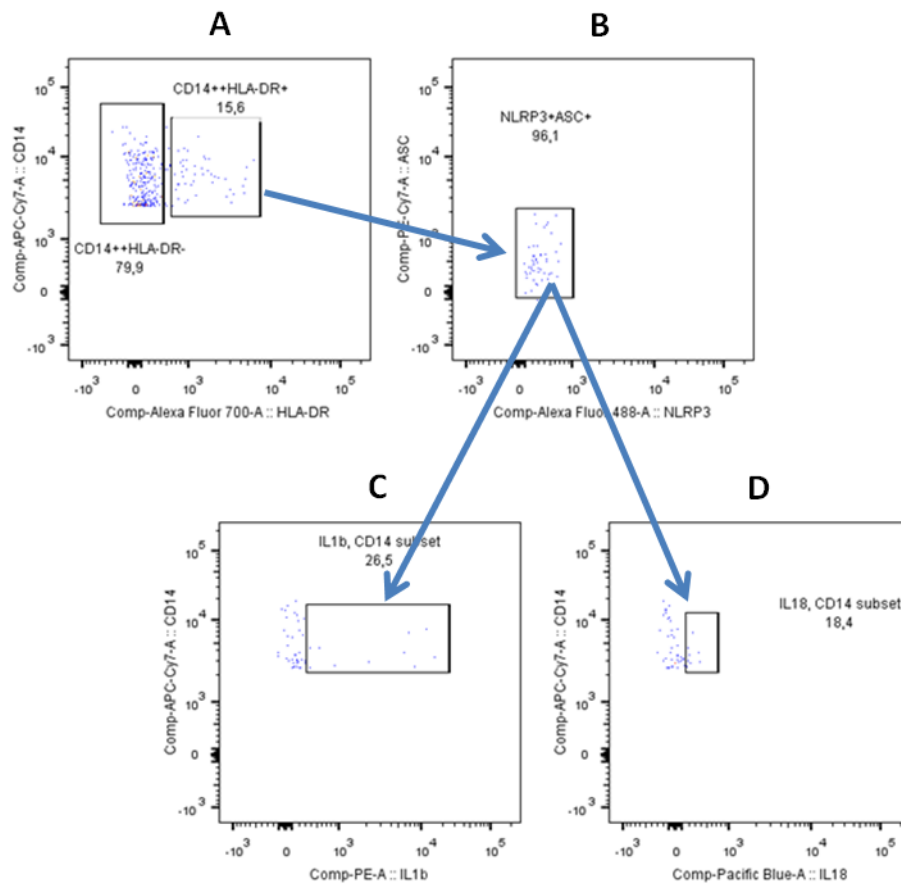


Figura 6. Análise do perfil fenotípico dos macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico após estimulação com antígeno de *M. leprae*. **A** representa SSC versus densidade de fluorescência para HLA-DR (AF-700); **B** representa SSC versus densidade de fluorescência para NLRP3⁺ASC⁺ (AF-488 e PE-Cy7, respectivamente); **C** e **D** representam as análises da produção das citocinas IL-1 β (PE) e IL-18 (AF-405), respectivamente.

5.6.3. Estratégias de análise para a caracterização das subpopulações de linfócitos

Para a caracterização fenotípica dos linfócitos circulantes e de suas subpopulações, iniciou-se a análise com a construção de um gráfico de dispersão frontal (*forward scatter*, FSC) em relação à intensidade de fluorescência para CD3 (FITC), permitindo a seleção da população total de linfócitos por meio de um *gate* específico (Figura 5E). Em seguida, foram aplicadas estratégias direcionadas à identificação das subpopulações T: para os linfócitos T CD4⁺, foi gerado um gráfico FSC versus fluorescência para CD4 (APC-Cy7; Figura 7A); para os linfócitos T CD8⁺, utilizou-se um gráfico FSC versus fluorescência para CD8 (AF700; Figura 7B). Após a definição dessas subpopulações, procedeu-se à análise de memória/ativadas, criando gráficos de fluorescência para CD45RO (PerCP-Cy5; Figura 7C) em relação a CD4 (APC-Cy7) ou CD8 (AF-700). Por fim, investigou-se o perfil funcional dessas subpopulações linfocitárias por meio da detecção intracelular das citocinas IFN- γ e IL-10 (Figura 7D e E,

respectivamente). Todas as análises foram realizadas considerando tanto o percentual de células positivas quanto MFI, utilizando gráficos do tipo histograma para exposição dos dados.

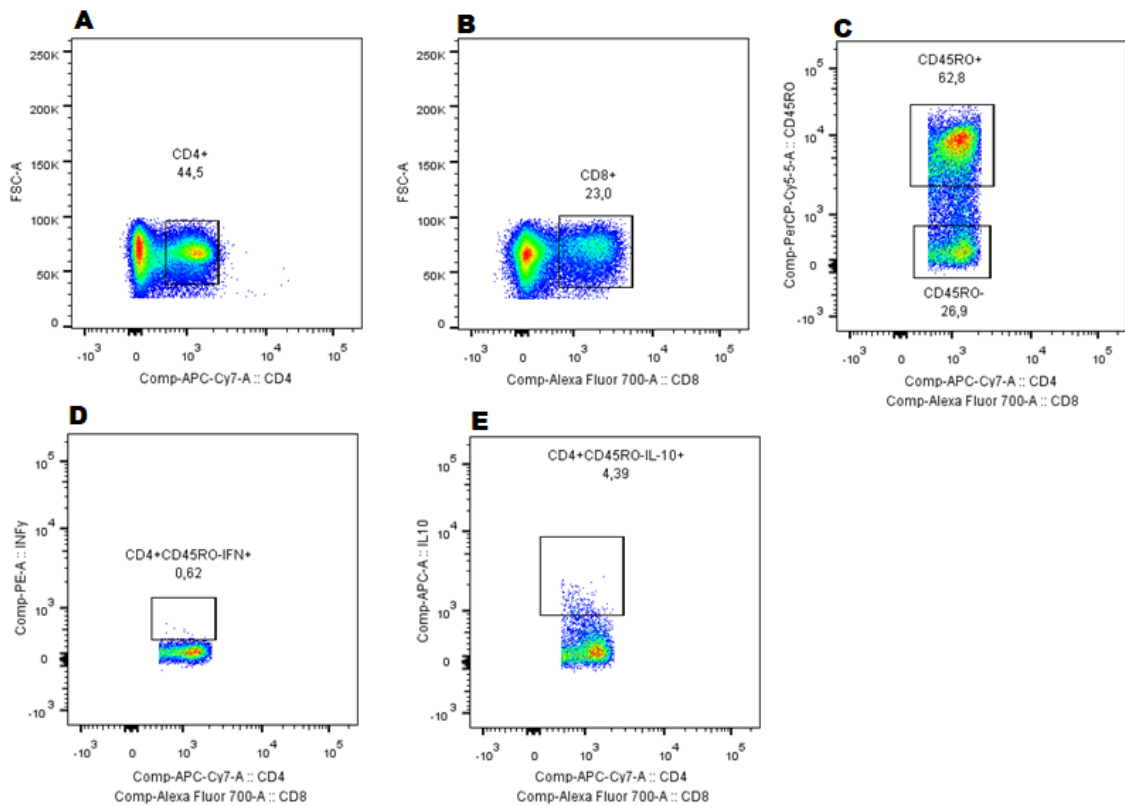


Figura 7. Análise do perfil fenotípico dos linfócitos do sangue periférico e suas subpopulações, por citometria de fluxo. **A** e **B** representam o perfil das subpopulações de linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$ e **C** representa o perfil de linfócitos de memória/ativados, selecionados no *gate* em gráfico de densidade de fluorescência para $CD45RO$ (PerCP-Cy5) *versus* densidade de fluorescência para $CD4$ (APC-Cy7) ou para $CD8$ (AF-700). **D** e **E** representam o perfil de análise da expressão de IFN- γ e IL-10 pelas subpopulações de linfócitos do sangue periférico.

5.7. Quantificação da produção de óxido nítrico (NO) no sobrenadante da cultura

Foram incubados 25 μ L do sobrenadante de cada cultura com a mesma quantidade de reagente de Griess (Sigma-Aldrich) por 30 minutos em temperatura ambiente. A absorbância foi medida a 540 nm utilizando um leitor de microplacas EMax. A concentração de óxido nítrico foi calculada por meio de uma curva padrão de $NaNO_2$, conforme descrito anteriormente (MOURA; CARVALHO; BRITO; ROATT et al., 2024).

O índice de estimulação foi calculado pela razão entre a produção de NO pelas células estimuladas (CE) e as não estimuladas (CC), permitindo avaliar a magnitude da resposta celular induzida pelo estímulo experimental.

5.8. Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados com o apoio instrumental do *software* GraphPad Prism 8.00 (Prism Software, Irvine, EUA). A normalidade dos dados foi demonstrada pelo teste Kolmogorov-Smirnov. As comparações entre os grupos experimentais foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA), seguida de correção para múltiplas comparações pelo teste de Bonferroni para dados paramétricos. Para dados não paramétricos foi utilizado o teste Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn. Em relação as análises de correlações, o teste de Pearson foi utilizado para dados paramétricos enquanto o teste de Spearman para os não-paramétricos. Os dados obtidos foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de p foi menor do que 0,05 ($p < 0,05$).

6. Resultados

6.1. Pacientes MB apresentam aumento no percentual de FDM ativados duplo positivos para NLRP3 e ASC (CD14⁺HLA-DR⁺NLRP3⁺ASC⁺) em comparação a pacientes PB

A Figura 8 apresenta o índice de estimulação (CE/CC) da frequência (%) de células CD14⁺HLA-DR⁺NLRP3⁺ASC⁺ após estímulo *in vitro* com antígeno de *M. leprae*, comparando grupos CTL, PB e MB. Observou-se que pacientes do grupo MB apresentaram valores médios mais elevados do índice de estimulação quando comparados aos grupos CTL e PB ($p = 0,0006$ e $p = 0,0001$, respectivamente). A análise estatística indicou diferença significativa entre o MB e os demais grupos, sendo de 2,2 vezes maior em relação ao CTL e 2,3 vezes maior em relação ao grupo PB. Não houve diferença significativa entre os grupos CTL e PB.

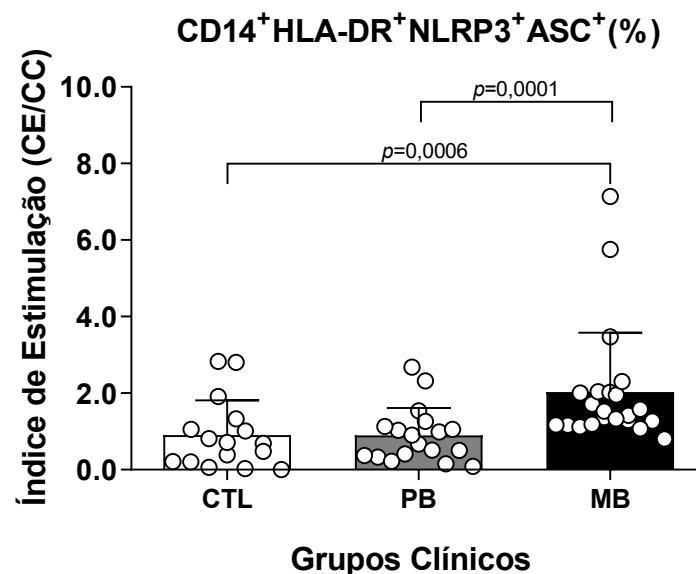


Figura 8. Análise do índice de estimulação (CE/CC) de monócitos ativados duplo positivos para NLRP3 e ASC (CD14⁺HLA-DR⁺NLRP3⁺ASC⁺), expressos em valores percentuais, após estímulo *in vitro* com antígeno de *M. leprae*. Os resultados estão apresentados como dados de dispersão com sobreposição de gráficos de barra (média±DP). Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre o grupo multibacilar (MB) e os demais grupos, controle (CTL) e paucibacilar (PB), estão demonstradas no gráfico.

6.2. Pacientes MB apresentam aumento de intensidade média de fluorescência para IL-1 β em monócitos ativados duplo positivos para NLRP3 e ASC (CD14⁺HLA-DR⁺NLRP3⁺ASC⁺) em relação a PB.

A Figura 9 demonstra o índice de estimulação (CE/CC) da produção das citocinas IL-18 e IL-1 β em células CD14⁺HLA-DR⁺NLRP3⁺ASC⁺, analisadas tanto em termos de frequência de células positivas (%) quanto MFI, nos grupos CTL, PB e MB.

Observou-se um aumento na frequência (%) de FDM CD14⁺HLA-DR⁺NLRP3⁺ASC⁺IL-18⁺ nos grupos PB ($p = 0,0330$; 1,9 vezes maior; Figura 9A) e MB ($p = 0,0490$; 1,7 vezes maior; Figura 9A) em relação ao controle. Em relação a MFI para IL-18, também observou-se níveis maiores nos grupos clínicos PB e MB em relação em comparação ao CTL ($p = 0,0070$ e $p = 0,0002$, respectivamente; Figura 9B).

Embora a frequência (%) de células IL-1 β não tenha apresentado variação estatística significativa entre os grupos clínicos (Figura 9C), a análise da MFI revelou que as células do grupo MB expressam uma quantidade significativamente maior dessa citocina quando comparadas ao grupo controle ($p = 0,0018$) e ao grupo PB ($p = 0,0294$), conforme Figura 9D.

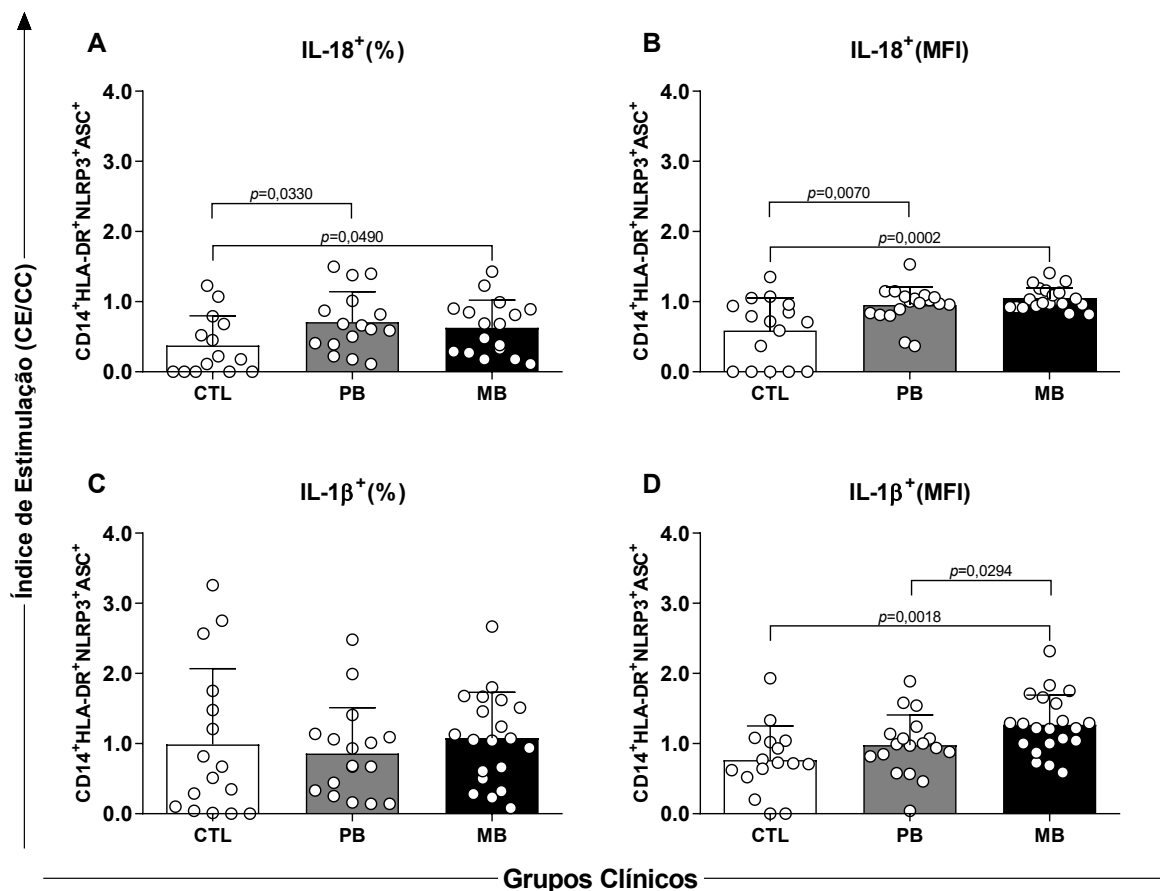


Figura 9. Análise do índice de estimulação (CE/CC) da produção das citocinas IL-18 e IL-1 β em monócitos ativados duplo positivos para NLRP3 e ASC (CD14⁺HLA-DR⁺NLRP3⁺ASC⁺), expressas em valores percentuais (A e C) e por intensidade média de fluorescência (MFI; B e D), após estímulo *in vitro* com antígeno de *M. leprae*.

Os resultados estão apresentados como dados de dispersão com sobreposição de gráficos de barra (média±DP). Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos estão demonstradas nos gráficos quando presentes.

6.3. Pacientes PB apresentam maior índice de estimulação para produção de NO em comparação a MB e CTL, indicando aumento da atividade de óxido nítrico após estímulo antigênico nesse grupo.

A análise do índice de estimulação para a produção de NO demonstrou diferenças entre os grupos avaliados após estímulo *in vitro* (Figura 10). Diferentemente das citocinas pró-inflamatórias, a produção de Óxido Nítrico (NO) apresentou um comportamento inverso no espectro clínico. O grupo PB demonstrou os maiores índices de estimulação de NO, sendo significativamente superior ao grupo controle ($p = 0,0083$; 1,6 vezes maior) e, notadamente, ao grupo multibacilar ($p < 0,0001$; 2,4 vezes maior).

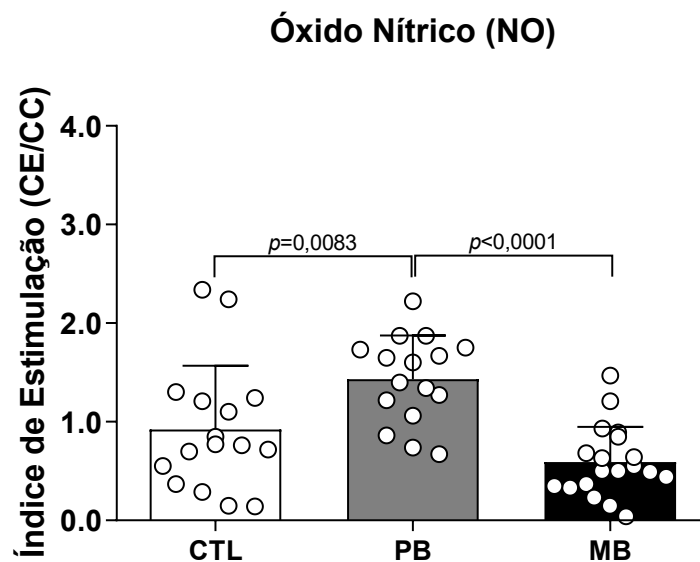


Figura 10. Análise do índice de estimulação para a produção de óxido nítrico (NO) nos grupos controle (CTL), paucibacilar (PB) e multibacilar (MB), após estímulo *in vitro*. Os resultados estão apresentados como dados de dispersão com sobreposição de gráficos de barra (média±DP). Diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$), quando presentes, estão indicadas no gráfico.

A análise de correlação demonstrou uma relação negativa moderada e significativa ($r = -0,5721$; $p = 0,0001$; Figura 11) entre a produção de óxido nítrico e o IB. Esse resultado sugere que a incapacidade de produzir níveis adequados de NO está diretamente relacionada ao aumento da carga bacilar nos pacientes.

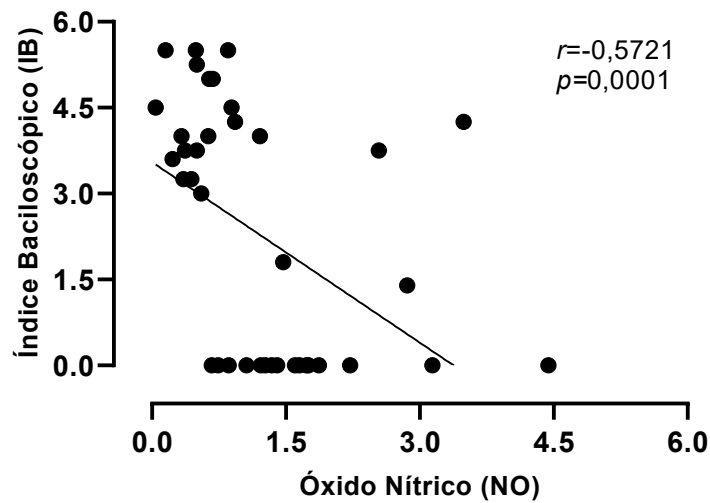


Figura 11. Análise da correlação entre o índice baciloscópico (IB) e a produção de óxido nítrico (NO) nos pacientes com hanseníase. Os dados estão apresentados em gráfico de dispersão, evidenciando a relação entre a carga bacilar e a produção de NO após estímulo *in vitro*. O coeficiente de correlação (r) e o valor de p estão indicados no gráfico.

6.4. Correlação inversa entre CD14⁺HLA-DR⁺NLRP3⁺ASC⁺ (%) e a produção de óxido nítrico

A análise apresentada avaliou a relação entre a frequência de FDM CD14⁺HLA-DR⁺NLRP3⁺ASC⁺ (%) e a produção de NO, evidenciando associação inversa entre as variáveis. Observou-se que o aumento na frequência de células expressando os componentes do inflamassoma NLRP3/ASC esteve associado à redução dos níveis de óxido nítrico, conforme indicado pelo gráfico (Figura 12). A análise estatística demonstrou correlação inversa com coeficiente de correlação $r = -0,4845$ e $p = 0,0024$, indicando significância estatística. Os dados estão apresentados em gráfico de dispersão, permitindo a visualização da distribuição individual dos valores e da tendência negativa entre a frequência de macrófagos NLRP3⁺ASC⁺ e a produção de NO.

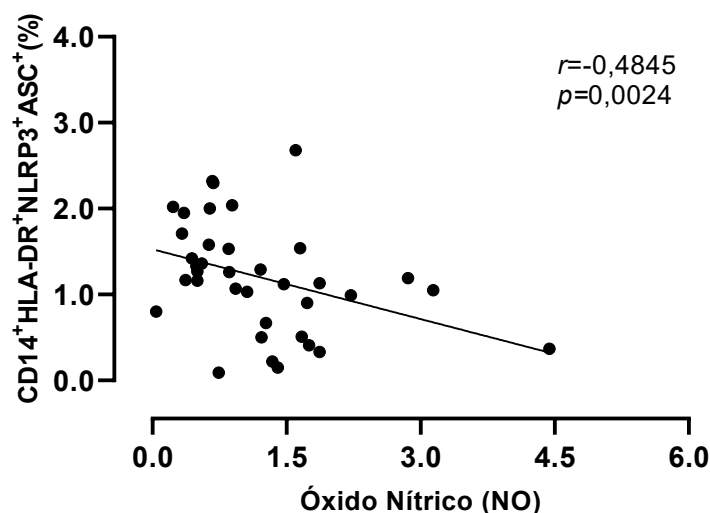


Figura 12. Análise da correlação entre a frequência de macrófagos derivados de monócitos CD14⁺HLA-DR⁺NLRP3⁺ASC⁺ (%) e a produção de óxido nítrico (NO) em pacientes com hanseníase. Os dados estão apresentados em gráfico de dispersão, evidenciando correlação inversa entre as variáveis. O coeficiente de correlação (r) e o valor de p estão indicados no gráfico.

6.5. Linfócitos T CD4⁺CD45RO⁺ de pacientes PB apresentam maior índice de estimulação para IFN- γ , enquanto pacientes MB apresentam maior índice de estimulação para IL-10

A análise do índice de estimulação para a produção das citocinas IFN- γ e IL-10 por linfócitos T CD4⁺CD45RO⁺ revelou diferenças entre os grupos avaliados após estímulo *in vitro*. O grupo PB apresentou a maior frequência de células produtoras de IFN- γ ($p = 0,0011$; Figura 13A) em relação ao CTL, enquanto o grupo MB demonstrou uma supressão dessa resposta efetora em relação ao grupo PB ($p < 0,0001$; Figura 13A). Observa-se também uma redução significativa na produção IFN- γ no grupo MB em relação ao CTL ($p = 0,0052$; Figura 13B) e PB ($p < 0,0001$; Figura 13B).

Inversamente, o grupo MB exibiu uma expansão de linfócitos T produtores de IL-10 ($p = 0,0126$ em relação ao PB; Figura 13C). A análise da MFI corrobora e aprofunda o padrão de expressão observado na frequência celular de linfócitos T CD4⁺. Observou-se uma supressão característica no polo paucibacilar, no qual o grupo apresentou estatisticamente inferior ao grupo controle com um valor de $p = 0,0272$ (Figura 1D). Em contrapartida, o polo multibacilar exibiu uma elevação na MFI em comparação ao grupo PB ($p = 0,0391$; Figura 1D).

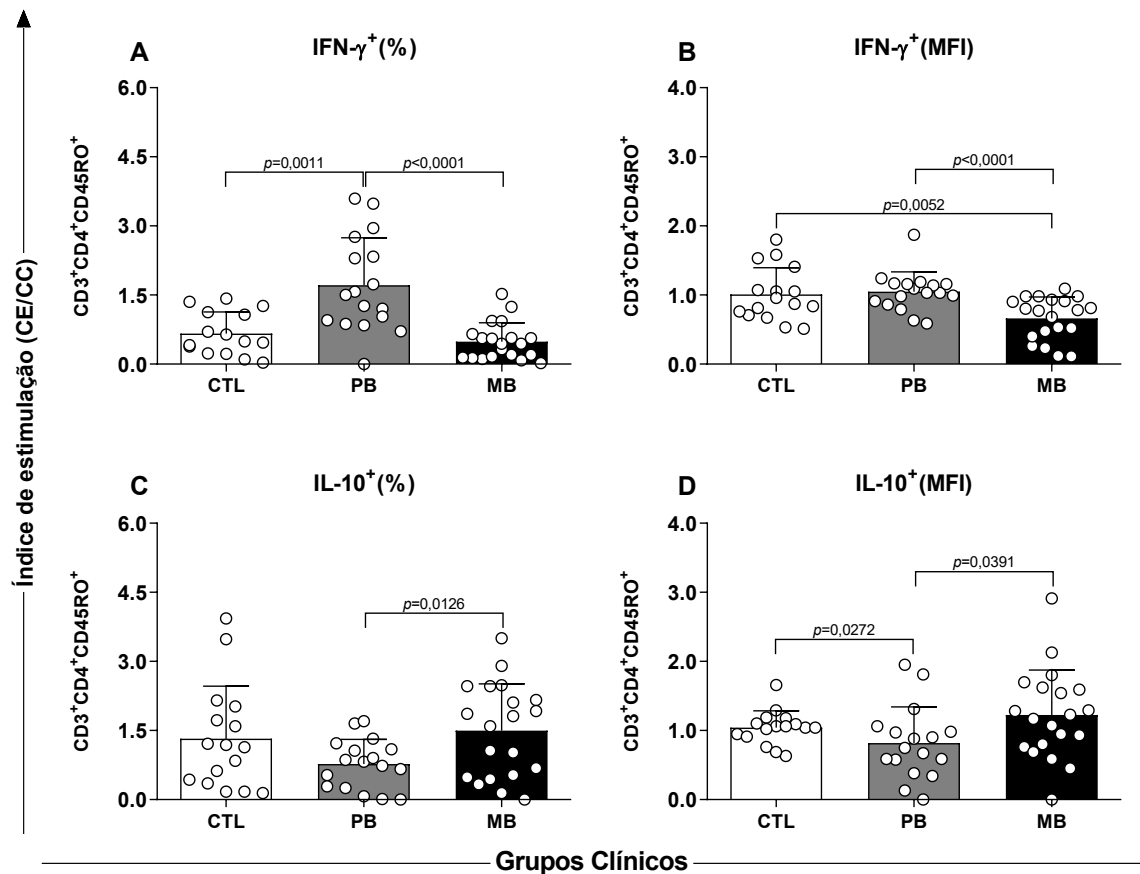


Figura 13. Análise do índice de estimulação para a produção das citocinas IFN- γ e IL-10 por linfócitos T CD4⁺CD45RO⁺ nos grupos controle (CTL), paucibacilar (PB) e multibacilar (MB), após estímulo *in vitro*. Os resultados estão apresentados em valores percentuais e por intensidade média de fluorescência (MFI). Os dados estão representados como dispersão individual, com sobreposição de gráficos de barra (média $\pm$ SD). Diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$), quando presentes, estão indicadas no gráfico.

6.6. Linfócitos T CD8⁺CD45RO⁺ no polo paucibacilar apresentam fenótipo efetor caracterizado por aumento de IFN- γ e redução de IL-10

A análise do índice de estimulação para a produção das citocinas IFN- γ e IL-10 por linfócitos T CD8⁺CD45RO⁺ demonstrou variações tanto no percentual de células produtoras quanto na MFI dessas citocinas entre os grupos analisados (Figura 14).

O grupo PB apresentou a maior porcentagem média de células produtoras de IFN- γ , sendo superior ao grupo MB ($p = 0,0084$; Figura 14A), o qual exibiu os menores níveis de frequência entre todos os grupos. O perfil de MFI reforçou a deficiência no polo multibacilar. Observou-se que a intensidade de IFN- γ por célula no grupo MB foi significativamente menor quando comparada aos grupos CTL ($p = 0,0396$; Figura 14B) e PB ($p = 0,0001$; Figura 14B).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na porcentagem de células CD8⁺CD45RO⁺IL-10⁺ entre os grupos (Figura 14C). Houve uma variação significativa

na carga de IL-10 por célula. O grupo PB apresentou a menor intensidade de expressão, sendo estatisticamente inferior tanto ao grupo controle ($p = 0,0016$; Figura 14D) quanto ao grupo multibacilar ($p = 0,0012$; Figura 14D).

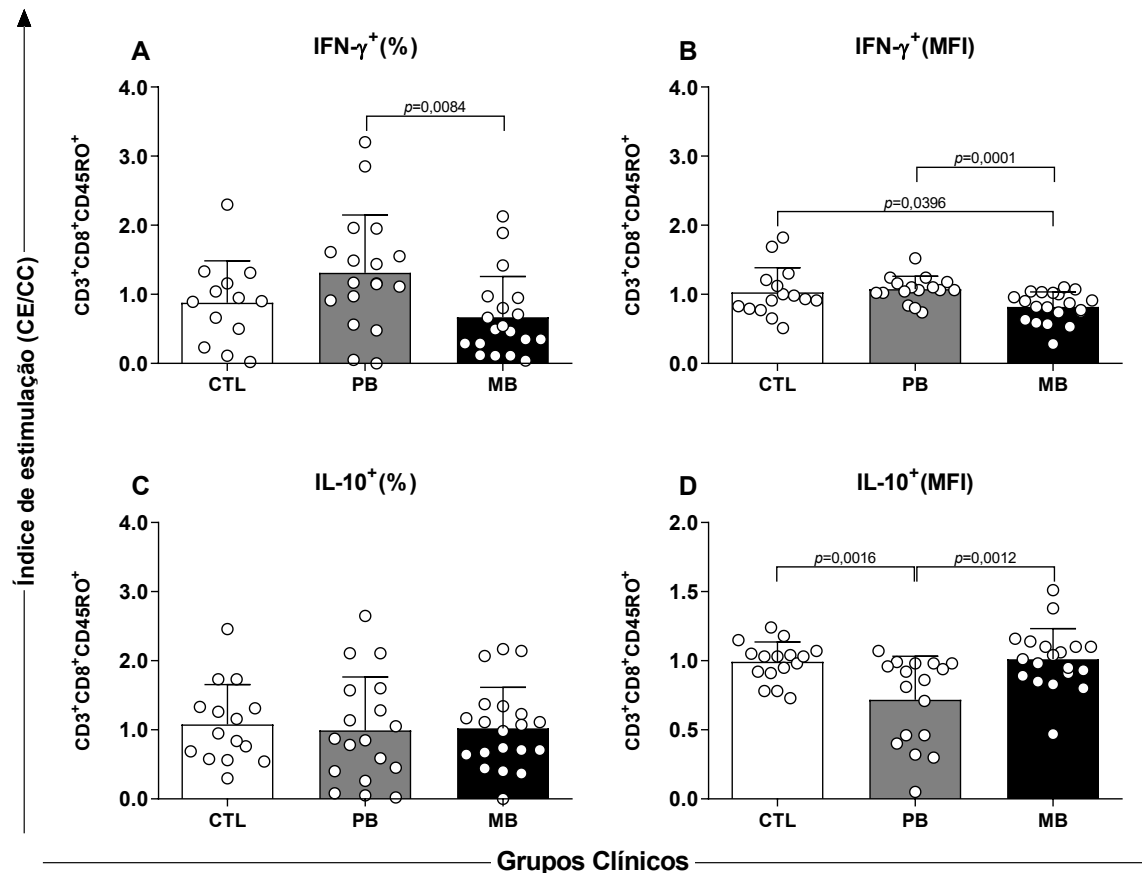


Figura 14. Análise do índice de estimulação para a produção das citocinas IFN-γ e IL-10 por linfócitos T CD8⁺CD45RO⁺ nos grupos controle (CTL), paucibacilar (PB) e multibacilar (MB), após estímulo *in vitro*. Os resultados estão apresentados em valores percentuais e por intensidade média de fluorescência (MFI). Os dados estão representados como dispersão individual, com sobreposição de gráficos de barra (média ± DP). Diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$), quando presentes, estão indicadas no gráfico.

6.7. A razão IFN-γ/IL-10 tanto em linfócitos T CD4⁺CD45RO⁺ quanto em T CD8⁺CD45RO⁺ é maior em pacientes PB em comparação aos demais grupos.

A análise do índice de estimulação da razão IFN-γ/IL-10 em linfócitos T CD4⁺CD45RO⁺ e T CD8⁺CD45RO⁺ evidenciou diferenças entre os grupos CTL, PB e MB após estímulo *in vitro* (Figura 15). Os pacientes PB apresentaram os maiores valores do índice de estimulação da razão IFN-γ/IL-10, tanto em percentual quanto em MFI, na subpopulação

linfocitárias T CD4⁺CD45RO⁺. Em relação aos linfócitos T CD8⁺CD45RO⁺, indivíduos PB também expressaram os maiores valores em relação ao MB para percentual de células ativadas e MFI, embora houvesse diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CTL apenas no gráfico de MFI. Em contraste, os pacientes MB apresentaram os menores valores dessa razão, refletindo a predominância relativa de IL-10 em relação ao IFN- γ . O grupo controle apresentou valores intermediários entre os dois grupos clínicos, embora nem sempre acompanhado de diferença significativa em relação aos demais grupos isoladamente.

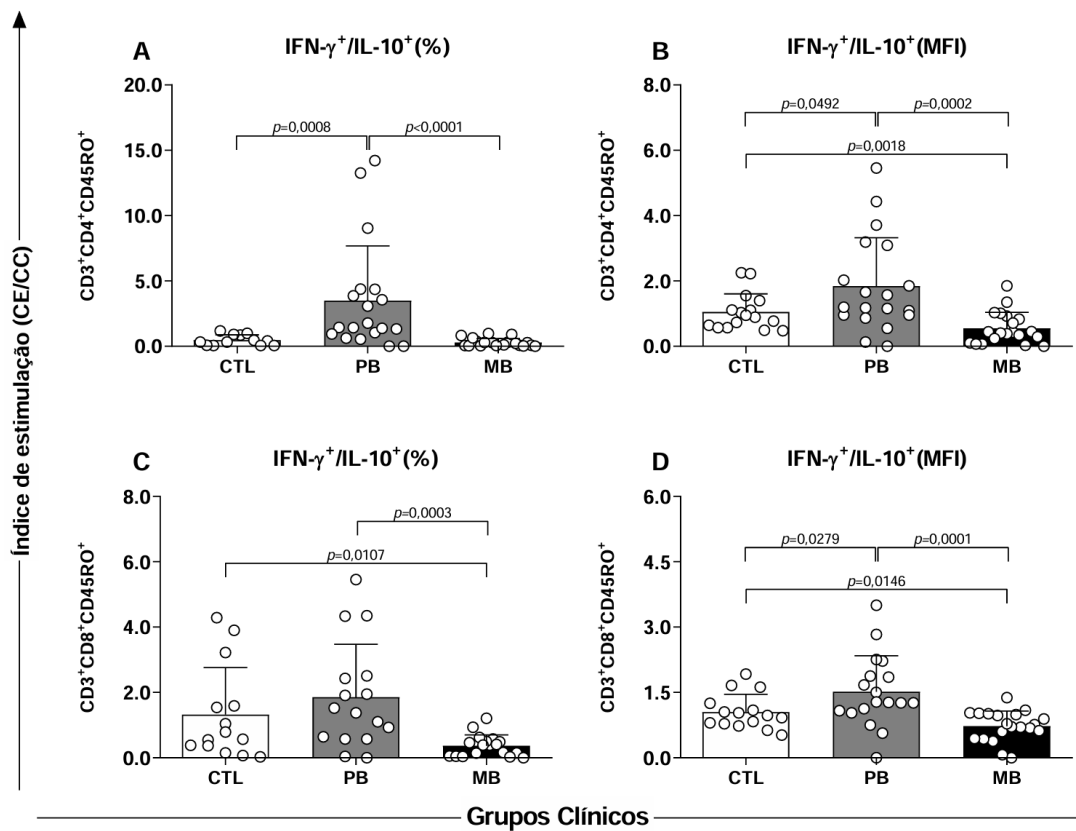


Figura 15. Análise do índice de estimulação da razão IFN- γ /IL-10 em linfócitos T CD4⁺CD45RO⁺ e T CD8⁺CD45RO⁺ nos grupos controle (CTL), paucibacilar (PB) e multibacilar (MB), após estímulo *in vitro*. Os resultados estão apresentados em valores percentuais e por intensidade média de fluorescência (MFI). Os dados estão representados como dispersão individual, com sobreposição de gráficos de barra (média $\pm$ DP). Diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$), quando presentes, estão indicadas no gráfico.

7. Discussão

O presente estudo demonstrou que a ativação do complexo inflamassoma NLRP3/ASC apresenta perfis distintos ao longo do espectro clínico da hanseníase. Observamos que o grupo MB apresenta maior expressão de NLRP3/ASC acompanhada de uma produção elevada de IL-1 β por célula. Essa ativação exacerbada no grupo MB, positivamente correlacionada ao índice bacilar, sugere que a elevada carga de *M. leprae* atua como um estímulo persistente para a imunidade inata. Entretanto, embora haja uma intensa via inflamatória ativa, essa se mostra ineficaz na contenção da replicação bacilar, caracterizada por uma menor produção de NO e ao predomínio de mediadores regulatórios como a IL-10, evidenciando uma dissociação crítica entre a ativação do inflamassoma e a resposta celular efetiva. Tais achados destacam o papel do microambiente imunológico na modulação da eficácia das vias inflamatórias frente ao *M. leprae*.

No que se refere às citocinas do inflamassoma, os pacientes MB demonstraram maior MFI para IL-1 β do que os grupos PB e CTL. Observou-se, adicionalmente, que ambas as formas polares da hanseníase exibiram valores de MFI superiores aos do grupo CTL, achado compatível com a presença de infecção ativa e maior estímulo antigênico nesses indivíduos. Achados semelhantes foram descritos por Costa *et al.* (2008), que demonstraram níveis significativamente mais elevados de IL-1 β em pacientes com hanseníase em relação a controles saudáveis, reforçando a associação entre infecção pelo *M. leprae* e ativação de vias inflamatórias dependentes dessa citocina. No presente estudo, a ausência de diferenças significativas no percentual de células produtoras de IL-1 β entre os grupos sugere que o aumento observado esteja predominantemente relacionado à maior intensidade de produção intracelular por célula, e não ao aumento do número de células ativadas, possivelmente associado à maior expressão intracelular do complexo NLRP3/ASC observada nos pacientes MB (COSTA; MENDONÇA; LYON; PENIDO *et al.*, 2008).

De Carvalho e colaboradores (2024) também demonstraram que a resposta pró-inflamatória é mais evidente nos indivíduos pertencentes aos polos clínicos da doença e que estes apresentam concentrações plasmáticas significativamente elevadas de IL-1 β em comparação aos controles saudáveis. Nesse estudo, a quantificação simultânea de 27 mediadores imunológicos foi realizada por meio de ensaio multiplex de citocinas, evidenciando aumento consistente de IL-1 β tanto em indivíduos PB quanto MB. Esses achados reforçam a noção de que a presença da infecção pelo *M. leprae* associa-se com a ativação de vias pró-inflamatórias mediadas por IL-1 β ao longo de todo o espectro clínico-imunológico da

hanseníase, ainda que os desfechos funcionais dessa resposta inflamatória sejam distintos entre os polos da doença (DE CARVALHO; PASCOAL-XAVIER; ARAUJO; TEIXEIRA-CARVALHO *et al.*, 2024).

Em conjunto com os achados apresentados na Figura 8, esses resultados reforçam a hipótese de maior ativação do complexo inflamassoma no grupo MB. A produção de IL-1 β pode ocorrer por vias alternativas independentes da ativação do inflamassoma canônico, particularmente em contextos infecciosos ou inflamatórios específicos. Além da clivagem clássica da pró-IL-1 β pela caspase-1 associada ao inflamassoma, alguns autores demonstraram que proteases distintas são capazes de gerar IL-1 β biologicamente ativa. Entre essas vias, Netea e colaboradores (2015) destacam a clivagem mediada pela caspase-8, que pode ocorrer em resposta a sinais de receptores de morte ou estímulos microbianos, funcionando como um mecanismo compensatório na ausência de ativação do inflamassoma. Outras proteases mieloides, incluindo elastase e catepsina G, também foram implicadas na geração de IL-1 β madura em ambientes ricos em neutrófilos (NETEA; VAN DE VEERDONK; VAN DER MEER; DINARELLO *et al.*, 2015).

Estudo realizado por Hildebrand e colaboradores (2014), por sua vez, demonstrou que proteases como a granzima A podem promover o processamento intracelular da pró-IL-1 β de maneira independente de caspase-1 e sem indução de piroptose, como demonstrado em macrófagos estimulados por toxinas bacterianas. Apesar da existência dessas vias alternativas, o inflamassoma associado à caspase-1 constitui o principal e mais eficiente mecanismo fisiológico de maturação da IL-1 β na maioria dos contextos inflamatórios e, portanto, é esperado que, no contexto de um aumento expressivo de IL-1 β no grupo MB, seja acompanhado de provável aumento de ativação de inflamassoma (HILDEBRAND; BODE; RIESS; CERNY *et al.*, 2014). Ainda assim, ressalta-se que podem ser feitas apenas inferências neste sentido, na medida em que o presente estudo se concentrou na avaliação da expressão dos componentes estruturais do complexo NLRP3/ASC e de seus produtos efetores, e não na mensuração direta do complexo oligomerizado funcionalmente ativo.

Paradoxalmente, embora os pacientes MB deste estudo apresentem maior expressão de NLRP3/ASC e maior intensidade de produção das citocinas resultantes, provavelmente, da ativação do inflamassoma, sugerindo uma ação inflamatória intensa induzida pela carga bacilar, essa resposta não se traduz em controle efetivo da infecção, uma vez que esse grupo corresponde ao polo anérgico do espectro, mostrando dissociação entre aumento de expressão de citocinas inflamatórias e resposta celular efetiva, o que corrobora os achados de estudos

prévios (FROES; TRINDADE; SOTTO, 2022; SILVA; DE SOUSA; HIRAI; DIAS *et al.*, 2018).

Estudo com amostras de pele de pacientes com hanseníase também encontrou maior expressão de NLRP3/ASC em pacientes MB por meio de análise imuno-histoquímica de 99 amostras de lesões cutâneas, em que houve superexpressão também de caspases-4/5 nas formas multibacilares, sobretudo no polo virchowiano, sendo proposta hipótese concordante em relação a provável ineficácia deste inflamassoma em controlar a doença. Entretanto, diferentemente do sugerido em nosso estudo, os referidos autores observaram baixa expressão de caspase-1, IL-1 β e IL-18 em todo o espectro da doença, inclusive nas formas com maior carga bacilar (MENDES; JOAQUIM; ZAMAE; ASSIS *et al.*, 2020).

Ao mesmo tempo, a ativação aumentada do inflamassoma NLRP3/ASC nos pacientes MB pode contribuir para a manutenção de um ambiente inflamatório persistente e funcionalmente desregulado, uma vez que esse grupo apresentou maior expressão de estruturas do complexo concomitantemente à menor eficácia na contenção bacilar. Evidências da literatura indicam que, em contextos imunológicos caracterizados pela polarização para respostas do tipo T_H2/T_{Reg}, característicos da hanseníase MB, a ativação exacerbada do inflamassoma favorece a produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , sem, contudo, induzir respostas T_H1 efetivas contra o *M. leprae*, possivelmente em razão da supressão funcional imposta por um microambiente imunológico predominantemente regulatório (FONSECA; SIMON; CAZZANIGA; DE MOURA *et al.*, 2017; WALKER; LOCKWOOD, 2006).

Em consonância com esses achados, estudos recentes reforçam que a hanseníase MB se caracteriza por um processo inflamatório sistêmico, associado a uma resposta imune celular ineficiente. De Carvalho *et al.* (2024) demonstraram que pacientes MB apresentam um perfil de citocinas complexo, com elevação de mediadores pró-inflamatórios, quimiocinas e fatores de crescimento, refletindo intensa ativação imune sistêmica, embora sem traduzir-se em controle efetivo da infecção. A análise de redes de correlação evidenciou um padrão de interações inflamatórias distinto daquele observado nos pacientes PB, marcado por forte interconectividade entre citocinas pró-inflamatórias e mediadores quimiotáticos. Esse cenário sustenta a hipótese de que, na hanseníase MB, a hiperativação de vias inflamatórias, incluindo o inflamassoma NLRP3/ASC e a consequente produção de IL-1 β e IL-18, ocorre de forma desregulada, contribuindo para a manutenção de inflamação persistente e sistêmica, sem o desenvolvimento de respostas T_H1 protetoras eficazes contra o *M. leprae* (DE CARVALHO; PASCOAL-XAVIER; ARAUJO; TEIXEIRA-CARVALHO *et al.*, 2024).

Nesse sentido, conforme postulado por van de Veerdonk *et al.* (2011), embora a IL-1 β e a IL-18 desempenhem papel central na indução de respostas T_H1/T_H17 protetoras em condições fisiológicas, a eficácia desse eixo inflamatório é fortemente dependente do contexto imunológico e do agente infeccioso envolvido. Assim, acredita-se que, na infecção pelo *M. leprae*, esse processamento poderia ocorrer de maneira dissociada da resposta protetora, contribuindo para inflamação persistente sem controle efetivo da infecção (VAN DE VEERDONK; NETEA; DINARELLO; JOOSTEN, 2011).

O reconhecimento do inflamassoma, particularmente do eixo NLRP3/ASC, como um mediador relevante da inflamação crônica desregulada tem motivado estudos voltados à sua modulação farmacológica. Sua ativação exacerbada está associada à produção sustentada de citocinas inflamatórias e à indução de piroptose, favorecendo dano tecidual e perpetuação da inflamação. Tal desregulação tem sido implicada em diversas doenças inflamatórias crônicas e autoimunes, bem como em distúrbios infecciosos como demonstrado por Li *et al.* (2024) ao citar o agravamento da inflamação hiperpirogênica e dano pulmonar no Covid-19, o agravamento da cirrose na hepatite B crônica e a promoção da osteoclastogênese na osteomielite, evidenciando o caráter ambivalente dessa via: essencial para defesa do hospedeiro, mas potencialmente deletéria quando não adequadamente controlada (LI; QIANG; CAO; WU *et al.*, 2024).

Evidências recentes indicam que a inibição de componentes do inflamassoma pode reduzir a produção excessiva de IL-1 β e IL-18, atenuar processos inflamatórios persistentes e limitar o dano tecidual, sem necessariamente comprometer a resposta imune basal. Pinzón-Fernández *et al.* (2025) descrevem o inflamassoma NLRP3 como um ponto central de integração inflamatória, passível de regulação em múltiplos níveis celulares, incluindo mecanismos pós-traducionais e controle da montagem do complexo (PINZON-FERNANDEZ; SAAVEDRA-TORRES; LOPEZ GARZON; PACHON-BUENO *et al.*, 2025).

De forma complementar, Li *et al.* (2025) revisam estratégias experimentais e clínicas baseadas no bloqueio do inflamassoma, demonstrando potencial na contenção de respostas exacerbadas. Entre os inibidores direcionados especificamente ao NLRP3, destaca-se o CY-09, que se liga ao sítio de ATP dessa proteína, impedindo sua ativação de maneira seletiva. Outro composto relevante é o 16673–34–0, derivado da glicoburida, que demonstrou capacidade de reduzir a ativação do NLRP3, especialmente em modelos experimentais de infarto do miocárdio. O dapansutril (OLT1177) também figura como um inibidor específico do NLRP3, inibindo a oligomerização da ASC, com resultados promissores em cenários clínicos como na gota e na insuficiência cardíaca, além do inzomelid, fármaco em desenvolvimento com

capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e potencial aplicação em doenças neurodegenerativas. Paralelamente, estratégias que atuam a jusante do complexo, como os bloqueadores de IL-1 β , a exemplo do canakinumab e anakinra, interrompem o sinal inflamatório já estabelecido, reduzindo a inflamação sistêmica (LI; LIU; SHI; DU *et al.*, 2025).

A interação entre patógenos intracelulares e o inflamassoma reforça a relevância dessa via como alvo regulatório. O *Mycobacterium tuberculosis*, por exemplo, apresenta mecanismos sofisticados de evasão da imunidade inata, sendo capaz de inibir a ativação do inflamassoma NLRP3, com redução da formação do complexo contendo ASC, redução da ativação da caspase-1 e da secreção de IL-1 β , além de limitar a indução de piroptose em macrófagos. Esse efeito está associado, em parte, à ação de fatores bacterianos que modulam negativamente etapas da ativação do complexo incluindo o efluxo iônico e a produção de ROS, evidenciando como a regulação dessa via pode ser explorada tanto pelo hospedeiro quanto pelo patógeno (RASTOGI; ELLINWOOD; AUGENSTREICH; MAYER-BARBER *et al.*, 2021).

Acredita-se que a montagem de uma resposta imunológica efetiva frente ao *M. leprae* dependa de um conjunto integrado de fatores, não sendo, a ativação do inflamassoma e a liberação isolada de citocinas, suficientes por si só para garantir contenção bacilar eficaz. Nesse contexto, o microambiente imunológico local exerce papel central, modulando a capacidade das citocinas inflamatórias em induzir a produção de IFN- γ e sustentar respostas celulares do tipo T_H1 protetoras, hipótese corroborada pelo trabalho de Mendes *et al.* (2020) (MENDES; JOAQUIM; ZAMAE; ASSIS *et al.*, 2020).

Nesse contexto, a análise funcional dos linfócitos T CD4⁺ reforça a dissociação entre intensidade de inflamação e resposta celular efetiva observada na hanseníase MB. Os dados apresentados nas Figuras 10 e 11 evidenciam que pacientes PB apresentam maior frequência de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ , enquanto pacientes MB exibem predomínio de linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-10. Esse padrão mostra uma polarização funcional distinta entre os polos clínicos da doença, em que a resposta celular do tipo T_H1, fundamental para a ativação microbicida de macrófagos, encontra-se preservada nos pacientes PB, ao passo que, nos pacientes MB, há predomínio de um perfil imunorregulador associado à anergia celular e à persistência do *M. leprae*.

A relevância da análise integrada de citocinas, ao invés da avaliação isolada de seus níveis absolutos, é reforçada pelo estudo de Samuel (2020), que propõe a utilização de razões de citocinas como ferramenta mais representativa do estado funcional do sistema imune. Os autores destacam que a relação entre IFN- γ e IL-10 oferece visão mais aprofundada da homeostase imunológica, considerando que o IFN- γ associa-se com a ativação de respostas pró-

inflamatórias e com a polarização T_H1 , enquanto a IL-10 exerce papel central na modulação anti-inflamatória. Assim, a proporção entre essas citocinas representada pela razão IFN- γ /IL-10, configura indicador dinâmico do equilíbrio entre mecanismos efetores e regulatórios, permitindo interpretação mais precisa do microambiente imunológico e do desfecho clínico, que depende não apenas da magnitude de mediadores isolados, mas da interação dos mesmos nas vias (SAMUEL, 2020).

A análise integrada dessas citocinas por meio da razão IFN- γ /IL-10 no nosso estudo reforça essa interpretação ao evidenciar um desequilíbrio funcional marcante entre os polos clínicos. Pacientes PB apresentaram razão IFN- γ /IL-10 LT $CD4^+$ de 12,1 vezes maior em relação aos pacientes MB. Na análise dos LT $CD8^+$, esse valor foi 5,1 vezes superior. A superioridade se manteve quando analisados os mesmos parâmetros em MFI, sendo de 3,4 vezes na análise de células LT $CD4^+$ e de 2,1 vezes em relação à LT $CD8^+$, dados compatíveis com um microambiente imunológico favorável à ativação da imunidade celular e contenção bacilar. Já os pacientes MB exibiram redução expressiva dessa razão, refletindo o predomínio de mecanismos regulatórios sobre vias efetoras, mesmo na presença de intensa ativação inflamatória sistêmica. Esses resultados encontram respaldo na literatura. Chebli-de-Abreu e colaboradores (2025) demonstraram que pacientes PB apresentavam uma razão IFN- γ /IL-10 substancialmente superior à observada nos pacientes MB, com diferença aproximada de 28,5 vezes entre os grupos, traduzindo de forma quantitativa a predominância de respostas celulares efetoras no polo PB em contraste com a resposta anérgica do polo MB. Os autores propõem que essa razão citocínica representa um indicador funcional do estado imunológico global dos doentes, ao integrar simultaneamente sinais de ativação e mecanismos de contenção da resposta imune, fazendo da razão IFN- γ /IL-10 um possível parâmetro biologicamente relevante para a compreensão da heterogeneidade clínica da hanseníase, podendo contribuir tanto para a estratificação imunológica dos pacientes quanto para a identificação de indivíduos com maior propensão a formas disseminadas e a eventos reacionais (CHEBLI-DE-ABREU; CARVALHO; MENEZES; MACEDO *et al.*, 2025).

Os achados sustentam a noção de que não apenas a presença de citocinas inflamatórias, mas sobretudo o equilíbrio entre mediadores pró-inflamatórios e regulatórios seja determinante para o desfecho imunológico da infecção pelo bacilo. Esse entendimento é reforçado pelos achados de Azevedo *et al.* (2017), que demonstraram que a patogênese da hanseníase é regulada pela dinâmica entre diferentes perfis de resposta imune adaptativa, incluindo células T_H1 , T_H2 , T_H17 e T_{Reg} , com maior produção de IFN- γ no polo PB e maior expressão de IL-10 e expansão de T_{Reg} no polo MB. Os autores destacam que o equilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e

regulatórias é fundamental, também, para a progressão da infecção e o surgimento de eventos reacionais, reforçando que a exacerbação inflamatória sem respostas efetoras adequadas favorece a persistência bacilar (AZEVEDO; MARQUES; BINELLI; MALANGE *et al.*, 2017). A produção aumentada de IL-1 β e IL-18, associada à maior expressão de componentes estruturais do inflamassoma, não é, dessa forma, acompanhada por uma resposta eficaz, possivelmente devido ao predomínio de IL-10 e à supressão funcional da produção de IFN- γ . Esse descompasso entre imunidade inata e adaptativa parece contribuir para a manutenção de inflamação persistente sem controle efetivo da carga bacilar no polo MB.

À semelhança do nosso estudo e ampliando a compreensão dos achados aqui apresentados, Santos *et al.* (2017), estudaram PBMCs isoladas de pacientes distribuídos ao longo do espectro clínico da hanseníase, incluindo formas tuberculoides e virchowianas. A partir da análise funcional dessas células, após estímulo antigênico, os autores demonstraram que as respostas mediadas por células T_{H1} e T_{H17} exerciam papéis funcionalmente distintos na inflamação associada à doença. Evidenciou-se que a produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ associava-se a maior potencial microbicida, enquanto a resposta T_{H17}, caracterizada pela produção de IL-17, relacionava-se predominantemente à amplificação do processo inflamatório. Assim, o desfecho clínico da infecção pelo *M. leprae* parece depender não apenas da magnitude da ativação inflamatória, mas da qualidade funcional da resposta adaptativa subsequente (SANTOS; DE OLIVEIRA; CAZZANIGA; VARJAO *et al.*, 2017).

De Sousa *et al.* (2016) pesquisaram a expressão de macrófagos M2 em lesões cutâneas de pacientes PB e MB. No polo MB, há um microambiente T_{H2} estimulatório à diferenciação neste subtipo de macrófagos, que por sua vez expressam arginase 1, enzima que compete com a óxido nítrico sintase (iNOS) pela L-arginina. Como a iNOS utiliza a L-arginina para produção de NO, no ambiente rico em macrófagos M2 naturalmente há menor quantidade de NO, se comparado ao microambiente T_{H1} dos pacientes PB. Este estudo corrobora nossos resultados expressos na Figura 7, que mostram relação inversa entre IB e produção de NO (DE SOUSA; DE SOUSA; AARAO; DIAS *et al.*, 2016).

A associação inversa entre intensidade de estímulo de macrófagos duplo positivo NLRP3/ASC e produção de NO pode estar diretamente relacionada a um mecanismo regulatório envolvendo a via do NF- κ B. Evidências experimentais demonstram que o NO é capaz de modular negativamente a ativação do NF- κ B por meio da S-nitrosilação da quinase inibitória de I κ B (IKK), resultando na repressão da fosforilação e degradação de I κ B e, conseqüentemente, na diminuição da translocação nuclear do NF- κ B (REYNAERT; CKLESS; KORN; VOS *et al.*, 2004). Dessa forma, em contextos nos quais há maior disponibilidade

intracelular de NO, potente agente microbicida da imunidade inata, espera-se uma atenuação da atividade transcricional dependente de NF- κ B, o que impacta diretamente a expressão de genes pró-inflamatórios regulados por essa via, sugerindo que respostas microbicidas eficazes podem modular negativamente a inflamação excessiva.

Adicionalmente, já se demonstrou que o NF- κ B é fator essencial para a etapa de *priming* do inflamassoma NLRP3, sendo responsável pela indução transcricional de NLRP3 e das formas precursoras das citocinas IL-1 β e IL-18 (ANAND; MALIREDDI; KANNEGANTI, 2011). Outros estudos adicionais reforçam essa relação ao demonstrar que a supressão da via NF- κ B está associada à redução da expressão do NLRP3 e à atenuação da ativação do inflamassoma (SHAO; WU; HONG; TU *et al.*, 2016). Assim, a diminuição dos níveis de NO observada no grupo MB pode favorecer a manutenção da atividade do NF- κ B e, consequentemente, sustentar uma maior transcrição de NLRP3 e pró-IL-1 β , compatível com a maior expressão estrutural do complexo NLRP3/ASC e citocinas detectadas nesses pacientes. Esses dados sugerem que o NO possa atuar como um modulador negativo da fase de preparação do inflamassoma, e que sua redução no polo MB parece contribuir para um ambiente permissivo à ativação persistente do NLRP3, ainda que tal ativação não se traduza em uma resposta efetiva.

Além disso, estudos que avaliaram polimorfismos genéticos têm evidenciado sua relevância como determinantes adicionais na modulação do perfil imunológico desenvolvido pelo indivíduo infectado. Estudos prévios demonstraram que variantes e haplótipos específicos do NLRP1 estão associados à suscetibilidade à hanseníase, particularmente à forma PB, indicando que diferentes membros da família NLR e suas variações podem modular de maneira distinta a resposta imune ao patógeno (PONTILLO; LAURENTINO; CROVELLA; PEREIRA, 2013). Esses polimorfismos parecem influenciar a ativação do inflamassoma e a produção de IL-1 β , possivelmente favorecendo respostas inflamatórias mais organizadas e funcionalmente eficazes, compatíveis com o perfil imunológico observado na forma PB, sobretudo no polo MHT da doença. É possível que, nos pacientes PB, a ativação de vias inflamatórias alternativas ou complementares ao NLRP3, como aquelas mediadas por NLRP1, possa contribuir para uma resposta mais eficiente na contenção bacilar, hipótese que pode ser explorada em estudos futuros.

De forma complementar, Roy *et al.* (1997) evidenciaram que polimorfismos no gene do TNF- α associavam-se com maior suscetibilidade ao desenvolvimento da hanseníase MB, reforçando o papel dessa citocina na organização de respostas inflamatórias efetivas (ROY; MCGUIRE; MASCIE-TAYLOR; SAHA *et al.*, 1997). Similarmente, estudos avaliando polimorfismos no gene da IL-10 demonstraram associação com resistência ao bacilo,

possivelmente por modularem o equilíbrio entre respostas inflamatórias e regulatórias (SANTOS; SUFFYS; VANDERBORGHT; MORAES *et al.*, 2002)

Nosso estudo contribui para o aprofundamento do conhecimento sobre os mecanismos imunológicos envolvidos na hanseníase, com ênfase no papel do inflamassoma na resposta ao *M. leprae*. Demonstrou-se maior frequência de macrófagos derivados de monócitos ativados duplo-positivos para NLRP3 e ASC ($CD14^+HLA-DR^+NLRP3^+ASC^+$), bem como maior intensidade média de fluorescência para IL-1 β nessas células dos pacientes MB, indicando provável ativação aumentada e, provavelmente, desregulada da via do inflamassoma NLRP3/ASC, com um intenso porém ineficaz processo inflamatório. Por outro lado, pacientes PB apresentaram maior índice de estimulação para a produção de NO após estímulo antigênico, sugerindo maior atividade microbicida mediada por macrófagos nesse grupo, o que condiz com a resposta imune efetiva do grupo frente ao bacilo. Observou-se, ainda, correlação inversa entre a carga bacilar e a produção de NO, associação positiva entre o IB e a frequência de macrófagos $NLRP3^+ASC^+$, além de correlação inversa entre a expressão de componentes do inflamassoma e a atividade de NO intracelular, mostrando que as células estudadas dos pacientes MB apresentam produção menor, a despeito de elevados estímulo antigênico (Figura 16).

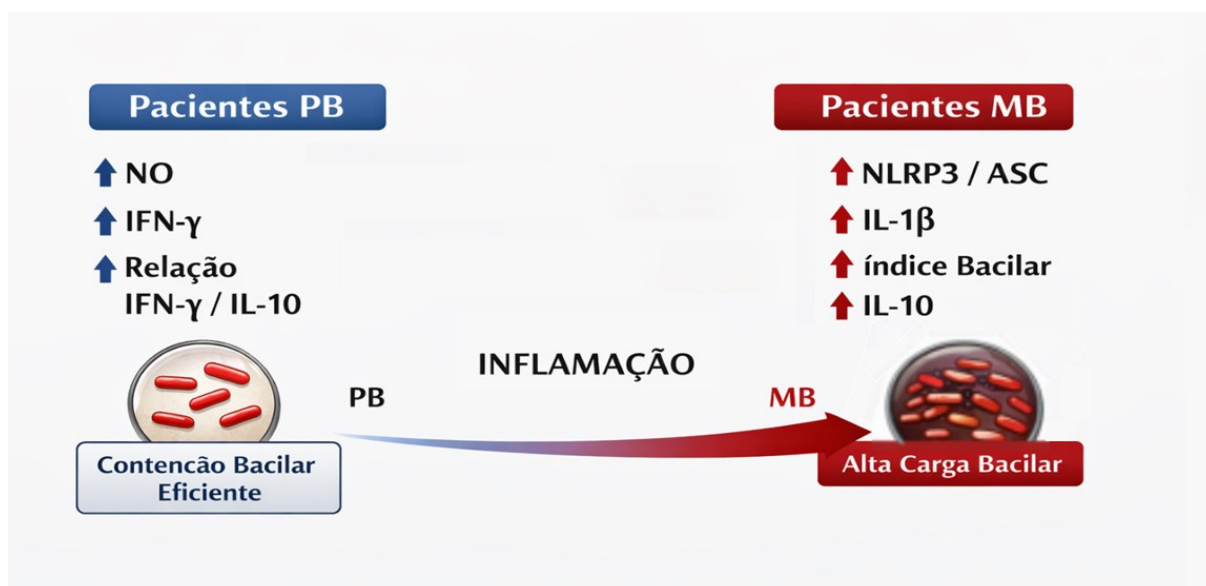


Figura 16. Esquema ilustrativo com os principais resultados obtidos nos grupos PB e MB no presente estudo.

Ao evidenciar a ativação diferencial de componentes inflamatórios em distintos perfis clínicos, nossos achados reforçam o papel da dinâmica entre diferentes mecanismos de resposta imune na definição do curso clínico da doença. Além disso, os resultados ampliam a

compreensão da diversidade imunológica associada às formas clínicas e oferecem subsídios para futuras abordagens diagnósticas e terapêuticas, como por exemplo, as baseadas em biomarcadores imunológicos e em terapias-alvo.

Apesar do progresso no esclarecimento das respostas imunes associadas à hanseníase, a pesquisa na área, assim como o presente estudo, ainda é marcada por limitações significativas. A impossibilidade de cultivar o *M. leprae* in vitro representa entrave central, dificultando a realização de experimentos funcionais e a avaliação direta da atividade antimicrobiana do sistema imune. A heterogeneidade dos pacientes, tendo em vista a cronicidade da hanseníase e as diversas possibilidades de apresentação e estágio da doença, dificulta a padronização dos grupos e a interpretação dos dados. A ausência de modelos animais que reflitam com precisão o espectro clínico e imunológico da doença em humanos limita a extrapolação dos achados laboratoriais. No contexto específico dos estudos envolvendo o inflamassoma, ainda há lacunas no conhecimento sobre a regulação temporal e espacial desses complexos inflamatórios no transcorrer da doença, bem como sobre suas interações com outras vias imunológicas. Essas limitações, em conjunto, comprometem a compreensão abrangente dos mecanismos que modulam as diferentes formas clínicas da hanseníase e expõem a necessidade de se conduzir novos estudos imunológicos relacionados a esta doença, a fim de compreendê-la cada vez mais profunda e detalhadamente.

Estudos longitudinais que incluam, além dos PBMCs, diferentes tipos celulares, especialmente aqueles presentes no local da lesão, obtidos de forma complementar por meio de amostras teciduais, são essenciais para aprofundar a compreensão da dinâmica dos mecanismos imunológicos ao longo da progressão clínica da hanseníase. Esse tipo de abordagem possibilitaria não apenas uma visão mais detalhada da resposta imune no tempo e em diferentes ambientes teciduais, mas também inferências mais robustas sobre relações causais e possíveis alvos terapêuticos, contribuindo significativamente para o avanço do conhecimento sobre essa doença complexa e ainda tão relevante em termos de saúde pública.

8. Conclusão

Em conjunto, os resultados deste estudo evidenciam diferenças relevantes na ativação de mecanismos da imunidade inata e adaptativa ao longo do espectro clínico da hanseníase. Os achados indicam que embora a forma MB esteja associada a maior ativação de componentes estruturais do inflamassoma NLRP3/ASC e ao aumento da produção de IL-1 β , a contenção bacilar parece depender principalmente de mecanismos microbicidas mais eficientes, como a produção de NO e a presença de um microambiente imunológico do tipo T_H1, predominantes nos pacientes PB. Estes resultados reforçam a importância da integração entre vias inflamatórias e mecanismos efetores antimicrobianos na determinação do controle da infecção por *M. leprae*, contribuindo para a compreensão da imunopatogênese da doença e para a identificação de potenciais alvos imunomodulatórios, predominantes nos pacientes PB.

9. Perspectivas

- Elaboração e submissão do artigo científico;
- Avaliar a expressão de demais componentes da via de ativação/sinalização do inflamassoma NLRP3, como Caspase-1, e à ocorrência de ativação do processo de piroptose associado a via Gasdermina-D por meio de ensaios de expressão gênica e *western blotting* dessas células estimuladas;
- Avaliar a expressão do inflamassoma NLRP3 em diferentes tipos celulares como, por exemplo, células epitelíóides, por meio de amostras cutâneas a fim de correlacionar os dados com os achados de sangue periférico.

10. Anexos

10.1. 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:

68583223.2.0000.5149

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:

68583223.2.0000.5149

Número do Parecer:

6184798

Quem Assinou o Parecer:

Corinne Davis Rodrigues

Pesquisador Responsável:

Manoel Otávio da Costa Rocha

Data Início do Cronograma:

01/03/2023

Data Fim do Cronograma:

01/12/2024

Contato Público:

Manoel Otávio da Costa Rocha

10.2. 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

11. Referências

- AMIN, J.; BOCHE, D.; RAKIC, S. What do we know about the inflammasome in humans? **Brain Pathol**, 27, n. 2, p. 192-204, Mar 2017.
- ANAND, P. K.; MALIREDDI, R. K.; KANNEGANTI, T. D. Role of the nlrp3 inflammasome in microbial infection. **Front Microbiol**, 2, p. 12, 2011.
- ASSIS, B. P. N.; CHAVES, A. T.; LAGE, D. P.; CARDOSO, M. M. *et al.* Serodiagnosis of paucibacillary and multibacillary leprosy using a recombinant chimeric protein composed of specific B-cell epitopes derived from Mycobacterium leprae proteins. **Tuberculosis (Edinb)**, 147, p. 102505, Jul 2024.
- ATHMAN, R.; PHILPOTT, D. Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. **Curr Opin Microbiol**, 7, n. 1, p. 25-32, Feb 2004.
- AZEVEDO, M. C. S.; MARQUES, H.; BINELLI, L. S.; MALANGE, M. S. V. *et al.* Simultaneous analysis of multiple T helper subsets in leprosy reveals distinct patterns of Th1, Th2, Th17 and Tregs markers expression in clinical forms and reactional events. **Med Microbiol Immunol**, 206, n. 6, p. 429-439, Dec 2017.
- BATTA, S. M.; FAR, N. N. E.; SOLIMAN, N. A.; NASSAR, S. O. A Study of NLRC4 in Patients with Leprosy. **Indian J Dermatol**, 68, n. 4, p. 385-392, Jul-Aug 2023.
- BLEVINS, H. M.; XU, Y.; BIBY, S.; ZHANG, S. The NLRP3 Inflammasome Pathway: A Review of Mechanisms and Inhibitors for the Treatment of Inflammatory Diseases. **Front Aging Neurosci**, 14, p. 879021, 2022.
- BRASIL. Guia prático sobre a hanseníase. **Editora MS**, p. 68, 2017.
- BRASIL. Ampliar o uso da clofazimina para hanseníase paucibacilar **Editora MS**, 2018.
- BRASIL. Orientações a Estados e Municípios para a implementação da ampliação de uso da clofazimina para o tratamento da hanseníase paucibacilar, no âmbito do Sistema Único de Saúde. 2021.
- BRASIL. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Hanseníase. **Editora MS**, p. 152, 2022.
- BRASIL. Estratégia Nacional para Enfrentamento à Hanseníase 2024-2030. **Editora MS**, 2024.

BRASIL. Boletim Epidemiológico da Hanseníase. **Editora MS**, 2026.

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, A. M. R. S.; 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. **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.

CHEBLI-DE-ABREU, N.; CARVALHO, A.; MENEZES, Y. R.; MACEDO, J. M. *et al.* TLR1/2-driven macrophage polarization shapes memory CD4(+)T-cell responses across the leprosy spectrum. **Acta Trop**, 271, p. 107870, Nov 2025.

Chemotherapy of leprosy for control programmes. **World Health Organ Tech Rep Ser**, 675, p. 1-33, 1982.

Chemotherapy of leprosy. Report of a WHO Study Group. **World Health Organ Tech Rep Ser**, 847, p. 1-24, 1994.

CHEN, C. C.; TSAI, S. H.; LU, C. C.; HU, S. T. *et al.* Activation of an NLRP3 inflammasome restricts *Mycobacterium kansasii* infection. **PLoS One**, 7, n. 4, p. e36292, 2012.

COSTA, R. D.; MENDONÇA, V. A.; LYON, S.; PENIDO, R. A. *et al.* Evaluation of the expression of interleukin 1 beta (IL-1beta) and interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) in leprosy patients. **Rev Soc Bras Med Trop**, 41 Suppl 2, p. 99-103, 2008.

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.; DE SOUSA, R. P.; AARAO, T. L.; DIAS, L. B., Jr. *et al.* In situ expression of M2 macrophage subpopulation in leprosy skin lesions. **Acta Trop**, 157, p. 108-114, May 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.

EIDT, L. M. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. **Saúde e Sociedade**, 13, n. 2, p. 76-88, 2004.

FENINI, G.; CONTASSOT, E.; FRENCH, L. E. Potential of IL-1, IL-18 and Inflammasome Inhibition for the Treatment of Inflammatory Skin Diseases. **Front Pharmacol**, 8, p. 278, 2017.

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.

FU, J.; WU, H. Structural Mechanisms of NLRP3 Inflammasome Assembly and Activation. **Annu Rev Immunol**, 41, p. 301-316, Apr 26 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.

HAN, X. Y.; SEO, Y. H.; SIZER, K. C.; SCHOBERLE, T. *et al.* A new *Mycobacterium* species causing diffuse lepromatous leprosy. **Am J Clin Pathol**, 130, n. 6, p. 856-864, Dec 2008.

HILDEBRAND, D.; BODE, K. A.; RIESS, D.; CERNY, D. *et al.* Granzyme A produces bioactive IL-1 β through a nonapoptotic inflammasome-independent pathway. **Cell Rep**, 9, n. 3, p. 910-917, Nov 6 2014.

HUANG, C. Y.; SU, S. B.; CHEN, K. T. An update of the diagnosis, treatment, and prevention of leprosy: A narrative review. **Medicine (Baltimore)**, 103, n. 34, p. e39006, Aug 23 2024.

KELLEY, N.; JELTEMA, D.; DUAN, Y.; HE, Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. **Int J Mol Sci**, 20, n. 13, Jul 6 2019.

LASTORIA, J. C.; ABREU, M. A. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - part 1. **An Bras Dermatol**, 89, n. 2, p. 205-218, Mar-Apr 2014.

LATZ, E.; XIAO, T. S.; STUTZ, A. Activation and regulation of the inflammasomes. **Nat Rev Immunol**, 13, n. 6, p. 397-411, Jun 2013.

LI, H.; LIU, T.; SHI, X.; DU, H. *et al.* Mechanisms and therapeutic potential of pharmacological agents targeting inflammasomes. **Biomed Pharmacother**, 189, p. 118164, Aug 2025.

LI, X.; MA, Y.; LI, G.; JIN, G. *et al.* Leprosy: treatment, prevention, immune response and gene function. **Front Immunol**, 15, p. 1298749, 2024.

LI, Y.; QIANG, R.; CAO, Z.; WU, Q. *et al.* NLRP3 Inflammasomes: Dual Function in Infectious Diseases. **J Immunol**, 213, n. 4, p. 407-417, Aug 15 2024.

LIMA, M. P.; COSTA, L. E.; DUARTE, M. C.; MENEZES-SOUZA, D. *et al.* Evaluation of a hypothetical protein for serodiagnosis and as a potential marker for post-treatment serological evaluation of tegumentary leishmaniasis patients. **Parasitol Res**, 116, n. 4, p. 1197-1206, Apr 2017.

MA, Q. Pharmacological Inhibition of the NLRP3 Inflammasome: Structure, Molecular Activation, and Inhibitor-NLRP3 Interaction. **Pharmacol Rev**, 75, n. 3, p. 487-520, May 2023.

MARIATHASAN, S.; MONACK, D. M. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. **Nat Rev Immunol**, 7, n. 1, p. 31-40, Jan 2007.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. **Mol Cell**, 10, n. 2, p. 417-426, Aug 2002.

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.

MAYMONE, M. B. C.; VENKATESH, S.; LAUGHTER, M.; ABDAT, R. *et al.* Leprosy: Treatment and management of complications. **J Am Acad Dermatol**, 83, n. 1, p. 17-30, 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.

MENDONÇA, V. A.; COSTA, R. D.; DE MELO, G. E. B. A.; ANTUNES, C. M. *et al.* Immunology of leprosy. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 83, n. 4, p. 343-350, 2008.

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

MOURA, D. M.; CARVALHO, A.; BRITO, R. C. F.; ROATT, B. M. *et al.* CD4(+) and CD8(+) Tcell multi-epitope chimeric protein associated with an MPLA adjuvant induce protective efficacy and long-term immunological memory for the immunoprophylaxis of American Tegumentary Leishmaniasis. *Vaccine*, 42, n. 21, p. 126178, Aug 30 2024.

NETEA, M. G.; VAN DE VEERDONK, F. L.; VAN DER MEER, J. W.; DINARELLO, C. A. *et al.* Inflammasome-independent regulation of IL-1-family cytokines. *Annu Rev Immunol*, 33, p. 49-77, 2015.

PANDEY, A.; LI, Z.; GAUTAM, M.; GHOSH, A. *et al.* Molecular mechanisms of emerging inflammasome complexes and their activation and signaling in inflammation and pyroptosis. *Immunol Rev*, 329, n. 1, p. e13406, Jan 2025.

PENNA, M. L.; DE OLIVEIRA, M. L.; PENNA, G. O. The epidemiological behaviour of leprosy in Brazil. *Lepr Rev*, 80, n. 3, p. 332-344, Sep 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.

PINZON-FERNANDEZ, M. V.; SAAVEDRA-TORRES, J. S.; LOPEZ GARZON, N. A.; PACHON-BUENO, J. S. *et al.* NLRP3 and beyond: inflammasomes as central cellular hub and emerging therapeutic target in inflammation and disease. *Front Immunol*, 16, p. 1624770, 2025.

PONTILLO, A.; LAURENTINO, W.; CROVELLA, S.; PEREIRA, A. C. NLRP1 haplotypes associated with leprosy in Brazilian patients. *Infect Genet Evol*, 19, p. 274-279, Oct 2013.

RAJAN, T. V. The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. *Trends Immunol*, 24, n. 7, p. 376-379, Jul 2003.

RASTOGI, S.; ELLINWOOD, S.; AUGENSTREICH, J.; MAYER-BARBER, K. D. *et al.* Mycobacterium tuberculosis inhibits the NLRP3 inflammasome activation via its phosphokinase PknF. *PLoS Pathog*, 17, n. 7, p. e1009712, Jul 2021.

REQUENA, L.; SANCHEZ YUS, E. Panniculitis. Part II. Mostly lobular panniculitis. *J Am Acad Dermatol*, 45, n. 3, p. 325-361; quiz 362-324, Sep 2001.

REYNAERT, N. L.; CKLESS, K.; KORN, S. H.; VOS, N. *et al.* Nitric oxide represses inhibitory kappaB kinase through S-nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, n. 24, p. 8945-8950, Jun 15 2004.

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.

RODRIGUES, L. C.; LOCKWOOD, D. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. **Lancet Infect Dis**, 11, n. 6, p. 464-470, Jun 2011.

ROH, J. S.; SOHN, D. H. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. **Immune Netw**, 18, n. 4, p. e27, Aug 2018.

ROY, S.; FRODSHAM, A.; SAHA, B.; HAZRA, S. K. *et al.* Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. **J Infect Dis**, 179, n. 1, p. 187-191, Jan 1999.

ROY, S.; MCGUIRE, W.; MASCIE-TAYLOR, C. G.; SAHA, B. *et al.* Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. **J Infect Dis**, 176, n. 2, p. 530-532, Aug 1997.

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

SANTOS, A. R.; SUFFYS, P. N.; VANDERBORGHT, P. R.; MORAES, M. O. *et al.* Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. **J Infect Dis**, 186, n. 11, p. 1687-1691, Dec 1 2002.

SANTOS, D. F. D.; MENDONCA, M. R.; ANTUNES, D. E.; SABINO, E. F. P. *et al.* Revisiting primary neural leprosy: Clinical, serological, molecular, and neurophysiological aspects. **PLoS Negl Trop Dis**, 11, n. 11, p. e0006086, Nov 2017.

SANTOS, M. B.; DE OLIVEIRA, D. T.; CAZZANIGA, R. A.; VARJAO, C. S. *et al.* Distinct Roles of Th17 and Th1 Cells in Inflammatory Responses Associated with the Presentation of Paucibacillary Leprosy and Leprosy Reactions. **Scand J Immunol**, 86, n. 1, p. 40-49, Jul 2017

SATOH, T.; OTSUKA, A.; CONTASSOT, E.; FRENCH, L. E. The inflammasome and IL-1beta: implications for the treatment of inflammatory diseases. **Immunotherapy**, 7, n. 3, p. 243-254, 2015.

SCHENK, M.; MAHAPATRA, S.; LE, P.; KIM, H. J. *et al.* Human NOD2 Recognizes Structurally Unique Muramyl Dipeptides from Mycobacterium leprae. **Infect Immun**, 84, n. 9, p. 2429-2438, Sep 2016.

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. **Cell**, 140, n. 6, p. 821-832, Mar 19 2010.

SERRANO-COLL, H.; WAN, E. L.; RESTREPO-RIVERA, L.; CARDONA-CASTRO, N. Leprosy reactions: Unraveling immunological mechanisms underlying tissue damage in leprosy patients. **Pathog Dis**, 82, Feb 7 2024.

SHAO, A.; WU, H.; HONG, Y.; TU, S. *et al.* Hydrogen-Rich Saline Attenuated Subarachnoid Hemorrhage-Induced Early Brain Injury in Rats by Suppressing Inflammatory Response: Possible Involvement of NF-kappaB Pathway and NLRP3 Inflammasome. **Mol Neurobiol**, 53, n. 5, p. 3462-3476, Jul 2016.

SHAO, B. Z.; XU, Z. Q.; HAN, B. Z.; SU, D. F. *et al.* NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review. **Front Pharmacol**, 6, p. 262, 2015.

SIL, A.; DAS, A. History of leprosy in India: An overview of historic and modern contributions. **Clin Dermatol**, 40, n. 6, p. 691-699, Nov-Dec 2022.

SILVA, L. M.; DE SOUSA, J. R.; HIRAI, K. E.; DIAS, L. B., Jr. *et al.* The inflammasome in leprosy skin lesions: an immunohistochemical evaluation. **Infect Drug Resist**, 11, p. 2231-2240, 2018.

TING, J. P.; KASTNER, D. L.; HOFFMAN, H. M. CATERPILLERS, pyrin and hereditary immunological disorders. **Nat Rev Immunol**, 6, n. 3, p. 183-195, Mar 2006.

VAN DE VEERDONK, F. L.; NETEA, M. G.; DINARELLO, C. A.; JOOSTEN, L. A. Inflammasome activation and IL-1beta and IL-18 processing during infection. **Trends Immunol**, 32, n. 3, p. 110-116, Mar 2011.

WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N. The clinical and immunological features of leprosy. **Br Med Bull**, 77-78, p. 103-121, 2006.

WANG, D.; DUNCAN, B.; LI, X.; SHI, J. The role of NLRP3 inflammasome in infection-related, immune-mediated and autoimmune skin diseases. **J Dermatol Sci**, 98, n. 3, p. 146-151, Jun 2020.

WHO. Guide to Eliminate Leprosy as a Public Health Problem. p. 22, 2000.

WHO. Guidelines for the diagnosis, treatment and prevention of leprosy. p. 106, 2018.

WHO. Global leprosy (Hansen disease) update, 2023: Elimination of leprosy disease is possible – Time to act. n. 37, p. 21, 2024.

WHO. Global leprosy (Hansen disease) update, 2024: Beyond zero cases – what elimination of leprosy really means – Time to act. n. 37, p. 35-384, 2025

ZHAO, C.; ZHAO, W. NLRP3 Inflammasome-A Key Player in Antiviral Responses. **Front Immunol**, 11, p. 211, 2020.