

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia

Samuel Duarte Timponi França

ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO DAS CÉLULAS LINFÓIDES
INATAS NA HANSENÍASE

Belo Horizonte

2025

Samuel Duarte Timponi França

**ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO DAS CÉLULAS LINFÓIDES
INATAS NA HANSENÍASE**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Área de concentração: Patologia Investigativa.

Orientador: Prof. Marcelo Antônio Pascoal Xavier.

Belo Horizonte

2025

043

França, Samuel Duarte Timponi.

Estudo imuno-histoquímico das células linfóides inatas na Hanseníase
[manuscrito] / Samuel Duarte Timponi França. – 2025.

50 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Marcelo Antônio Pascoal Xavier.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia.

1. Patologia. 2. Linfócitos. 3. Doenças Negligenciadas. 4. Hanseníase. 5.
Imuno-Histoquímica. I. Xavier, Marcelo Antônio Pascoal. II. Universidade
Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 616



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG - ICB/UFMG

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO **Nº 500** DE SAMUEL DUARTE TIMPONI
FRANÇA

Realizou-se, no dia 19 de fevereiro de 2025, às 14 horas, no formato on-line, Plataforma TEAMS da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de Dissertação, intitulada “***Estudo Imuno-Histoquímico das Células Linfoides Inatas na Hanseníase***”, apresentada por **Samuel Duarte Timponi França** número de registro 2023664262, graduado no curso de Medicina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: **PROFA. DRA. ANA LUIZA GOMES MENDES**, UFLA; **PROFA. DRA. MILENE ALVARENGA RACHID**, ICB/UFMG; **Prof. Dr. Marcelo Antônio Pascoal Xavier**, FM/UFMG – **ORIENTADOR**.

A Comissão considerou a Dissertação:

☒ **APROVADO**

☐ **REPROVADO**

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 19 de fevereiro de 2025.

*** De acordo com as Normas Gerais de Pós-Graduação da UFMG o grau de Mestre só será concedido ao aluno que entregar ao Colegiado do Curso, no prazo máximo de 60 dias, a versão final da Dissertação, em conformidade com as indicações da Comissão Examinadora. Após a entrega da versão final com a documentação exigida para emissão de Diploma, a secretaria emitirá Certificado de Conclusão do Mestrado.**



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Antonio Pascoal Xavier, Professor do Magistério Superior**, em 21/02/2025, às 15:11, 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 **Milene Alvarenga Rachid, Servidor(a)**, em 28/02/2025, às 11:29, 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 **Ana Luisa Gomes Mendes, Usuário Externo**, em 07/03/2025, às 10:17, 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 3964196 e o código CRC 85A89080.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, à minha família e aos amigos, que me ofereceram suporte e incentivo em todos os momentos dessa trajetória. Conciliar o trabalho como médico com o desenvolvimento acadêmico não foi uma tarefa fácil, mas foi recompensador pelas trocas e pelo conhecimento adquirido ao longo do caminho.

Sou profundamente grato aos colegas de mestrado, orientadores e professores, que compartilharam seus saberes e experiências, ajudando a tornar este percurso possível. Especialmente ao Prof. Dr. Marcelo Antônio Pascoal Xavier pelas conversas enriquecedoras durante a execução do projeto. Reconheço, ainda, a importância do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) e da Faculdade de Medicina da UFMG como instituições que me proporcionaram uma formação sólida e um ambiente de aprendizado inspirador.

Agradeço especialmente às pessoas do hospital e aos pacientes que gentilmente permitiram que esta pesquisa fosse viável, contribuindo para o avanço do conhecimento científico.

A todos que, de alguma forma, fizeram parte dessa caminhada, meu mais sincero agradecimento.

RESUMO

A hanseníase é uma doença marcada por uma complexa interação imunológica, amplamente estudada em relação à participação de diversas células imunes e às respostas Th1 e Th2. No entanto, o papel das células linfoides inatas (ILCs) ainda não foi descrito na doença. Este estudo investigou a participação das ILCs nas diferentes formas da hanseníase por meio de análises imuno-histoquímicas dos fatores de transcrição de linfócitos T-bet, GATA-3 e ROR γ t em amostras de pele de 46 participantes com diagnóstico clínico e laboratorial de hanseníase. No estudo, foram incluídos 46 participantes provenientes de Belo Horizonte (n=26) e Teófilo Otoni (n=20), classificados nas formas operacionais paucibacilares -PB (n=17) e multibacilares -MB (n=29). A análise imuno-histoquímica revelou diferenças estatisticamente significativas entre as amostras dos grupos PB e MB na expressão dos três fatores de transcrição investigados, com maiores proporções de hiperexpressão nas amostras do grupo MB (t-bet $p = 0,006$, GATA-3 $p = 0,042$, ROR γ T $<0,001$). Ao repetir a comparação excluindo as amostras hiperexpressas para CD4, o grupo MB permaneceu com maior proporção de hiperexpressos para GATA-3 E ROR γ t ($p=0,039$ e $p=0.001$, respectivamente), enquanto T-bet não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0.137$). Esses achados apontam para uma possível participação das ILCs na modulação da inflamação na hanseníase. Estudos adicionais, com metodologias complementares, são necessários para confirmar e esclarecer o papel das ILCs na doença.

Palavras-chave: Células Linfoides Inatas (ILCs); Doenças negligenciadas; Hanseníase; Respostas Th1 e Th2; imunopatologia.

ABSTRACT

Leprosy is a disease characterized by a complex immune interaction, extensively studied regarding the involvement of various immune cells and Th1 and Th2 responses. However, the role of innate lymphoid cells (ILCs) has not yet been described in the disease. This study investigated the involvement of ILCs in different forms of leprosy through immunohistochemical analyses of the transcription factors T-bet, GATA-3, and ROR γ t in skin samples from 46 participants with a clinical and laboratory diagnosis of leprosy. The study included 46 participants from Belo Horizonte (n=26) and Teófilo Otoni (n=20), classified into the operational forms of paucibacillary (PB) (n=17) and multibacillary (MB) (n=29) leprosy. Immunohistochemical analysis revealed statistically significant differences between PB and MB groups in the expression of the three investigated transcription factors, with higher proportions of overexpression in MB group samples (T-bet $p = 0.006$, GATA-3 $p = 0.042$, ROR γ t $p < 0.001$). When the comparison was repeated, excluding samples with CD4 overexpression, the MB group still showed a higher proportion of overexpression for GATA-3 and ROR γ t ($p=0.039$ and $p=0.001$, respectively), while T-bet did not show a statistically significant difference between the groups ($p=0.137$). These findings suggest a possible role of ILCs in modulating inflammation in leprosy. Additional studies using complementary methodologies are needed to confirm and clarify the role of ILCs in the disease.

Keywords: Innate Lymphoid Cells (ILCs); Neglected Diseases; Leprosy; Th1 and Th2 Responses; Immunopathology.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD – do inglês *cluster of differentiation*

GATA-3 – do inglês *zinc-finger transcription factor-3*

IFN- γ – Interferon-gama

IL – Interleucina

ILC1 – Célula Linfoide Inata tipo 1

ILC2 - Célula Linfoide Inata tipo 2

ILC3 - Célula Linfoide Inata tipo 3

MB – Multibacilar

MHDD – hanseníase dimorfa dimorfa

MHDT – hanseníase dimorfa tuberculoide

MHDV – hanseníase dimorfa virchowiana

MHI - hanseníase indeterminada

MHT - hanseníase tuberculóide

MHV – hanseníase virchowiana

OMS/WHO – Organização Mundial da Saúde/ *World Health Organization*

PB – Paucibacilar

ROR γ t – do inglês *RAR-related orphan receptor gamma factor*

T-bet – da sigla em inglês *T-cell specific Tbox transcription factor*

Th1 – Linfócitos T CD4⁺ do tipo 1

Th2 – Linfócitos T CD4⁺ do tipo 2

Th17 – Linfócitos Th17

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Epidemiologia da Hanseníase	13
2.2 Manifestações Clínicas	15
2.2.1 Hanseníase indeterminada	16
2.2.2 Hanseníase Tuberculóide	16
2.2.3 Hanseníase Virchowiana	16
2.2.4 Hanseníase Dimorfa	16
2.3 Histopatologia da hanseníase	17
2.4 Classificação da Hanseníase	18
2.5 Imunopatologia: Dicotomia Th1/Th2 na Hanseníase	19
2.6 A imunidade inata na hanseníase	21
2.7 As Células Linfoides Inatas	22
2.8 As células linfoides inatas na pele e nas doenças cutâneas	24
3. OBJETIVOS	27
4. MÉTODOS	28
4.1 Aprovação do projeto no comitê de Ética	28
4.2 Delineamento do estudo e cálculo amostral	28
4.3 Critério de inclusão e exclusão	28
4.3.1 Critérios de inclusão	28
4.3.2 Critérios de exclusão	28
4.4 Exames histopatológicos e Imuno-histoquímica	29
4.5 Avaliação do exame imunohistoquímico	29
4.6 Cálculo do escore de expressão imuno-histoquímica	31
4.7 Coleta de dados epidemiológicos e relativos à forma de hanseníase	31
4.7.1 Coleta de dados epidemiológicos	31
4.7.2 Classificação quanto a forma de hanseníase	31
5. RESULTADOS	34
6. DISCUSSÃO	41
REFERÊNCIAS	45

1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa crônica, negligenciada, causada pelo *Mycobacterium leprae*, um bacilo álcool-ácido resistente, intracelular obrigatório. Encontra-se endêmica em diversos países tropicais, particularmente nos subdesenvolvidos. Em 2023, foram registrados 182.815 novos casos de hanseníase em 143 países, com mais de 75% dos casos concentrados na Índia, Brasil e Indonésia. O Brasil continua como o segundo país com o maior número de novos casos, apresentando uma incidência de 13,09 casos por 100.000 habitantes (WHO, 2024).

Clínica e imunopatologicamente, a hanseníase apresenta-se como uma doença espectral entre os polos tuberculóide e virchowiano (YASMIN et al. 2021). O polo tuberculóide é caracterizado pelo desenvolvimento de uma resposta celular forte ao bacilo. Os pacientes acometidos tendem a ter uma doença limitada, geralmente com apenas uma lesão cutânea. Do outro lado, há o polo virchowiano, caracterizado por uma resposta humoral ao bacilo. Esta resposta é ineficaz no controle da bactéria intracelular, e o paciente apresenta uma carga bacilar alta, podendo disseminar a doença na comunidade. Estes pacientes podem ter um quadro cutâneo extenso, com a ocorrência de dezenas a centenas de lesões (TALHARI, TALHARI e PENNA, 2015). Entre os polos virchowiano e tuberculóide, há as formas interpolares, chamadas de dimorfas, onde se encontram a maioria dos doentes. Essas formas são subclassificadas em dimorfa-tuberculóide, dimorfa-dimorfa e dimorfa virchowiana (RIDLEY e JOPLING, 1966).

Imunologicamente, a doença pode ser entendida no espectro Th1/Th2 (T helper 1 e 2) (FROES JR, 2020). O polo tuberculóide é marcado por uma imunidade celular forte, orquestrada principalmente por linfócitos Th1, predominando as citocinas IFN- γ , IL-2, IL-12, IL-7, IL-15. O polo virchowiano é marcado por uma resposta Th2, predominando IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 (FROES JR, 2020). Para efeito de comparação, optamos por classificar a doença utilizando a classificação operacional, que divide os pacientes em dois grupos. Assim, os pacientes paucibacilares (PB) representam o grupo mais próximo do polo tuberculóide, enquanto os multibacilares (MB) se encontram mais próximos do polo virchowiano (FROES JR, TRINDADE e SOTTO, 2020).

No contexto do entendimento dos diferentes tipos de imunidade (Th1, Th2, Th17), um grupo de células vem ganhando importância: as células linfóides inatas (ILCs). As células linfóides inatas são linfócitos que não expressam receptores diversificados de antígenos (CLOTTU et al. 2021). Participam da regulação de inflamação tecidual, produção de citocinas e potencializam a resposta adaptativa. Essas células tendem a espelhar a função de linfócitos T. Entretanto, enquanto linfócitos T tem que reconhecer um antígeno específico e passar por expansão clonal antes de participar efetivamente da inflamação, as ILCs já podem agir prontamente (VIVIER et al. 2018). As ILC podem ser divididas em 3 grupos, cada um espelhando a função de determinado tipo de linfócito. ILC1s, ILC2s e ILC3s copiam linfócitos Th1 CD4+, Th2 e Th17, respectivamente. As células *natural killer* (NK), embora pertencentes ao grupo das ILC1s, copiam a função de linfócitos citotóxicos CD8+. Os fatores de transcrição e perfil de citocinas dos diferentes grupos de ILCs são conhecidos. As ILC1s expressam o fator de transcrição T-bet e secretam IFN γ ; As ILC2s, dependem da expressão de GATA-3 e liberam IL-5 e IL-13. As ILC3s, expressam ROR γ t e secretam IL-17 e IL-22 (ZHENG e ZHU, 2022).

As ILCs já foram investigadas em diversos contextos, incluindo em doenças infecciosas e doenças cutâneas inflamatórias. Nas dermatites crônicas, como dermatite atópica e psoríase, as ILC encontram-se numericamente aumentadas e associadas à liberação de importantes citocinas reguladoras da função de macrófagos, mastócitos e linfócitos T, como IL-17, IL-22, IL-4, IL-5 e IL-13 (RAFEI-SHAMSABADI et al., 2019). Mais recentemente, foram investigados o papel e a relação das ILC com citocinas inflamatórias no líquen plano oral (WANG et al., 2021). Diante dessas evidências, a hipótese de presença e participação das ILC na resposta inflamatória crônica da hanseníase se fortalece, em especial, considerando-se os dois padrões clássicos de produção de citocinas das respostas imunes do Th1 e Th2 nos polos tuberculoide e virchowiano da hanseníase, respectivamente. Essa presença e participação das ILCs pode ser específica e estar relacionada aos tipos particulares de citocinas inflamatórias. Assim, esse projeto busca contribuir para o entendimento da imunopatologia da hanseníase por meio de estudo imunohistoquímico ILCs na doença.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epidemiologia da Hanseníase

A hanseníase persiste como um desafio de saúde pública global, especialmente em países de baixa e média renda, onde fatores socioeconômicos influenciam sua incidência e detecção precoce (Figura 1). De acordo com o relatório mais recente da Organização Mundial da Saúde (OMS), publicado em 13 de setembro de 2024, foram notificados 182.815 casos novos de hanseníase em 2023. Este número representa um aumento em relação aos 174.087 casos registrados em 2022. Além disso, em 2023, 10.322 casos novos foram identificados em crianças, correspondendo a 5,6% do total de casos novos. A Índia, Brasil e Indonésia continuam a concentrar a maior parte dos casos, sendo responsáveis por mais de 78% das notificações globais (WHO, 2024).

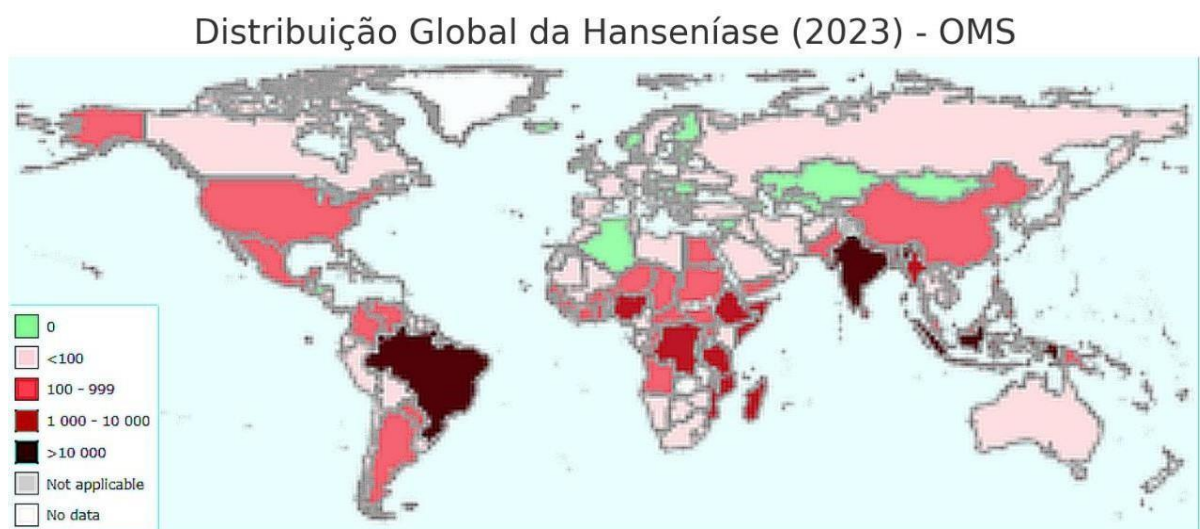


Figura 1. Incidência global de hanseníase em 2023. Fonte: Organização Mundial da Saúde.

Nas últimas duas décadas, a incidência global de hanseníase apresentou uma tendência geral de redução (Figura 2). Desde meados da década de 2000, o número de novos casos vem diminuindo progressivamente. No entanto, a queda acentuada observada em 2020 e 2021 não representa uma redução real da transmissão, mas sim um reflexo da subnotificação durante a

pandemia da COVID-19. As restrições impostas pelas medidas sanitárias globais dificultaram o acesso aos serviços de saúde, impactando diretamente a identificação de novos casos e a vigilância epidemiológica da doença. Esse fenômeno foi seguido por um aumento no número de notificações a partir de 2022 e 2023, sugerindo um efeito de represamento de casos anteriormente não diagnosticados (WHO, 2024).

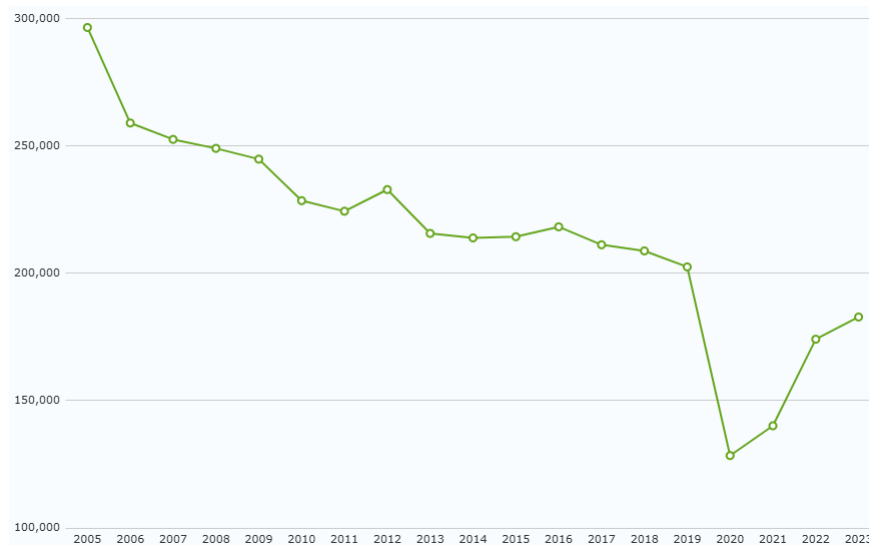


Figura 2. Incidência de hanseníase no mundo. Fonte: Organização Mundial da Saúde (2023).

No Brasil, foram registrados 19.635 novos casos em 2022, representando 11,3% do total global (BRASIL, 2024). No período de 2013 a 2022, o país notificou 316.182 casos, com uma tendência de queda de 28,9%. Entretanto, a redução mais acentuada entre 2019 e 2022 ocorreu devido a uma subnotificação no contexto da pandemia de COVID-19.

A taxa de detecção da doença no país apresentou variações regionais significativas (Figura 3). Em 2022, a taxa nacional foi de 9,67 casos por 100 mil habitantes, mas algumas regiões apresentaram índices superiores. A região Centro-Oeste apresentou a maior incidência, com 23,15 casos por 100 mil habitantes, enquanto a região sul apresentou a menor, com 2,15 casos por 100 mil habitantes. Mato Grosso (66,20 casos por 100 mil habitantes) e Tocantins (50,88 casos por 100 mil habitantes) registraram os maiores índices do país. Já o Rio Grande do Sul apresentou o menor, com apenas 0,81 casos por 100 mil habitantes. O Sudeste apresentou uma taxa de detecção de 3,69 casos por 100 mil habitantes, com Minas Gerais apresentando uma taxa de 5,05 (BRASIL, 2024).

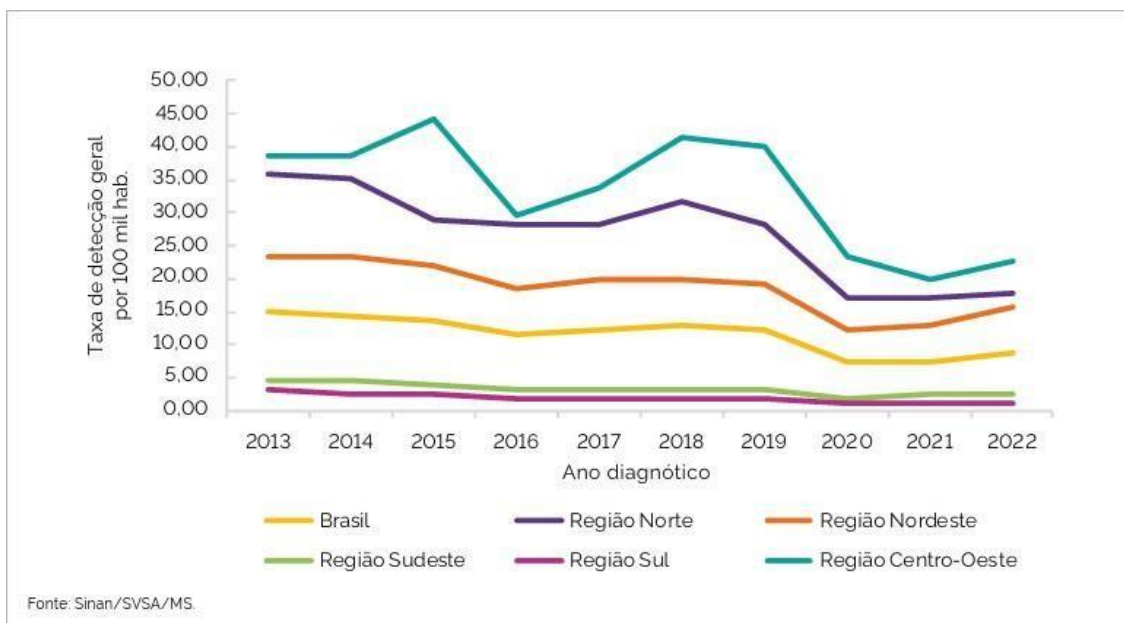


Figura 3: Taxa de detecção geral de casos novos de hanseníase (por 100.000 habitantes) por região de residência e ano de diagnóstico – Brasil, 2013 a 2022. Fonte: Boletim epidemiológico do Ministério da Saúde - Hanseníase 2024.

A distribuição da hanseníase no Brasil também reflete desigualdades sociais, com maior incidência em populações com menor escolaridade. Dos casos novos em 2022, 47,6% ocorreram em indivíduos com ensino fundamental incompleto ou completo, enquanto 19,3% foram diagnosticados entre aqueles com ensino médio incompleto ou completo, e apenas 5,0% dos casos apresentava ensino superior completo ou incompleto. (BRASIL, 2024).

2.2 Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas na hanseníase são variáveis a depender da resposta imunológica orquestrada pelo hospedeiro, que resulta em diferentes formas da doença. Essas formas são descritas em um espectro clínico-imunológico, onde de um lado há a hanseníase tuberculoide, caracterizada por uma imunidade celular forte e efetiva, com um quadro cutâneo limitado. Do outro lado, há a hanseníase virchowiana, caracterizada por uma resposta humoral forte ao bacilo. Essa resposta é inefetiva, e o paciente tem um quadro disseminado. Entre esses dois polos, há os pacientes dimorfos, que apresentam padrões clínicos intermediários entre o polo tuberculoide e virchowiano (BRASIL, 2022; BRASIL, 2017).

2.2.1 Hanseníase indeterminada

A hanseníase indeterminada é considerada a forma inicial da doença, ocorrendo geralmente em crianças ou adultos jovens. Caracteriza-se por manchas hipocrômicas, geralmente únicas ou poucas, de bordas mal definidas, com perda parcial da sensibilidade térmica e dolorosa. Essa forma pode evoluir para a cura espontânea ou progredir para outras formas clínicas da doença (BRASIL, 2017; OCHOA et al., 2025).

2.2.2 Hanseníase Tuberculóide

Essa forma é caracterizada por poucas lesões, tipicamente uma ou duas. As lesões são placas eritematosas bem delimitadas, com perda total da sensibilidade. Pode haver espessamento neural, com diminuição da força muscular e sensibilidade nos nervos afetados, podendo causar deformidades se não tratada precocemente (BRASIL, 2022; BRITTON e LOCKWOOD, 2004).

2.2.3 Hanseníase Virchowiana

É caracterizada por lesões cutâneas infiltradas difusas, sem bordas bem definidas, podendo acometer face, tronco e membros. Essas lesões frequentemente evoluem para nódulos, conhecidos como hansenomas, que conferem à pele um aspecto infiltrado e brilhante. Um sinal clássico é a madarose, que corresponde à perda parcial ou total das sobrancelhas e cílios, especialmente na borda lateral das sobrancelhas. Além do acometimento cutâneo, há envolvimento mucoso, particularmente da mucosa nasal, resultando em epistaxe, crostas nasais e até perfuração do septo nasal nos casos mais avançados. O envolvimento neural é difuso e simétrico, levando a alterações sensitivas e motoras de curso insidioso (BRASIL, 2022; TALHARI et al., 2015).

2.2.4 Hanseníase Dimorfa

Os pacientes com hanseníase dimorfa apresentam um espectro clínico intermediário entre as formas tuberculoide e virchowiana. A classificação em hanseníase dimorfa-tuberculoide (MHDT), hanseníase dimorfa-dimorfa (MHDD) e hanseníase dimorfa-virchowiana (MHDV) é determinada pela proximidade clínica e imunológica da doença com um dos extremos desse espectro (ARAÚJO, 2003).

Os pacientes com MHDT apresentam manifestações cutâneas semelhantes às da forma tuberculoide. As lesões são placas eritematosas, hipocrômicas ou acastanhadas, de bordas bem definidas e levemente elevadas. Entretanto, as lesões podem ser numerosas, diferentemente da

forma tuberculoide pura, que tende a ter poucas lesões. Essas placas podem apresentar áreas centrais de clareamento, conferindo um aspecto anular ou em alvo. A sensibilidade na pele afetada está reduzida ou ausente, e pode haver espessamento neural com perda sensitiva e motora nos nervos periféricos acometidos. (RIDLEY; JOPLING, 1966; BRASIL, 2022).

Os pacientes com MHDV, assim como na MHV, apresentam infiltrações difusas na pele, podendo haver nódulos. No entanto, diferentemente da forma virchowiana, o paciente pode desenvolver placas, embora estas apresentem bordas pouco definidas. O acometimento neurológico também tende a ser difuso (SOUZA et al., 2022).

A forma MHDD representa um estágio intermediário entre as formas tuberculoide e virchowiana, apresentando um quadro clínico misto. As lesões cutâneas são mais numerosas que na MHDT, geralmente em forma de máculas e placas eritematosas com bordas menos delimitadas, podendo coexistir áreas infiltradas na pele. Diferente da MHDT, os limites entre a pele afetada e a pele sã são menos evidentes, e a perda de sensibilidade é variável. (RIDLEY E JOPLING, 1966; BRASIL, 2017).

2.3 Histopatologia da hanseníase

O exame histopatológico é uma ferramenta essencial para o diagnóstico, classificação clínica e monitoramento da evolução da doença, sendo particularmente útil em casos de diagnóstico duvidoso e na diferenciação de outras dermatoses (BRASIL, 2022).

O exame envolve a análise de biópsias de pele ou nervos periféricos, utilizando coloração por hematoxilina-eosina (HE) para visualização do infiltrado inflamatório e por Fite-Faraco ou Wade para identificação dos bacilos álcool-ácido resistentes (*Mycobacterium leprae*). O padrão histológico varia conforme a resposta imunológica do hospedeiro, sendo classificado de acordo com o espectro de Ridley e Jopling, que inclui as formas tuberculoide, dimorfa e seus subtipos e virchowiana (SOUZA et al., 2022).

Na hanseníase tuberculóide, há granulomas epitelioides bem organizados, compostos por células epitelioides e células gigantes do tipo Langhans, envolvidos por denso infiltrado linfocitário. Há infiltração perineural significativa e destruição de filetes nervosos. Os bacilos são tipicamente ausentes (RIDLEY; JOPLING, 1966).

A hanseníase virchowiana se caracteriza por um infiltrado inflamatório difuso de histiócitos vacuolados (células de Virchow) repletos de bacilos que podem ser vistos formando globias. Linfócitos são escassos, e se encontram difusamente distribuídos (SOUZA et al., 2022).

As formas dimorfas exibem padrões intermediários entre as formas tuberculoide e virchowiana. Os granulomas são menos organizados que na forma tuberculoide, e a presença de bacilos varia de acordo com a proximidade do polo virchowiano (MASSONE et al., 2022).

Na hanseníase dimorfa tuberculoide (MHDT), observa-se a presença de granulomas epitelioides com bainha linfocitária, semelhantes aos da forma tuberculoide. A característica mais marcante quando comparado a MHT é a presença de uma faixa subepidérmica não afetada pelo infiltrado (zona de Grenz). Bacilos, quando presentes, são escassos. (RIDLEY; JOPLING, 1966; FACHIN et al., 2017).

A hanseníase dimorfa dimorfa (MHDD) apresenta características intermediárias, com granulomas menos organizados e uma mistura de células epitelioides e macrófagos vacuolados. A carga bacilar é maior do que na forma MHDT, mas menor do que na forma MHDV (FACHIN et al., 2017; MASSONE et al., 2015).

Na hanseníase dimorfa-virchowiana (MHDV), a histopatologia apresenta macrófagos vacuolados contendo bacilos, sendo semelhante à forma virchowiana. Porém, essas células se encontram em menor quantidade e estão distribuídas de maneira menos difusa. Além disso, ainda podem ser observados esboços de granulomas, porém frouxos e mal organizados. Os bacilos são menos numerosos e formam menos globias quando comparado a MHV (FACHIN et al., 2017; RIDLEY; JOPLING, 1966).

2.4 Classificação da Hanseníase

Devido à sua grande variabilidade clínica e imunológica, a hanseníase exige sistemas de classificação que permitam padronizar o diagnóstico, direcionar o tratamento e prever a evolução da doença. Ao longo dos anos, diferentes esquemas classificatórios foram propostos, sendo os mais utilizados a classificação de Ridley e Jopling e a classificação operacional da OMS. A classificação de Ridley e Jopling é baseada na resposta imunológica do hospedeiro, e é amplamente empregada na pesquisa e na prática clínica. A classificação operacional da Organização Mundial da Saúde (OMS) é utilizada globalmente para facilitar a definição

terapêutica e a vigilância epidemiológica. Esta classificação é de simples aplicação, podendo ser usada por profissionais não especialistas (BRASIL, 2022; RIDLEY e JOPLING, 1966).

A classificação de Ridley e Jopling foi desenvolvida em 1966 para organizar a hanseníase dentro de um espectro clínico-imunológico, considerando diversos parâmetros. Do ponto de vista clínico, avalia-se o número e o padrão das lesões cutâneas, o grau de infiltração, a simetria das lesões e o comprometimento neural. A histopatologia é analisada com base no tipo de infiltrado inflamatório, na presença ou ausência de granulomas, na distribuição de macrófagos e linfócitos e na carga bacilar nos tecidos. Já a baciloscopia permite quantificar os bacilos do *Mycobacterium leprae* em raspados dérmicos, utilizando o Índice Baciloscópico (IB), que varia de 0 a 6+. O teste de Mitsuda (lepromina) também é descrito na classificação para avaliar a resposta imune celular do paciente. Entretanto, este teste não se encontra mais disponível (RIDLEY; JOPLING, 1966).

A classificação da organização Mundial da Saúde (OMS) se baseia no número de lesões cutâneas e na baciloscopia. Os casos são classificados como paucibacilares (PB) quando há até cinco lesões cutâneas e baciloscopia negativa, e como multibacilares (MB) quando o paciente apresenta seis ou mais lesões cutâneas e/ou baciloscopia positiva. (BRASIL, 2022).

Embora as classificações de Ridley e Jopling e a classificação operacional da OMS sejam independentes, há uma sobreposição entre elas. Os pacientes classificados MHDD, MHDV e MHV geralmente apresentam seis ou mais lesões cutâneas e baciloscopia positiva, sendo enquadrados como multibacilares (MB) pela classificação operacional. Já os pacientes com MHT apresentam menos de seis lesões e baciloscopia negativa, sendo classificados como paucibacilares (PB). Os MHDT, por sua vez, geralmente também se encaixam na categoria PB; entretanto, se a baciloscopia for positiva, o paciente passa a ser classificado como MB.

2.5 Imunopatologia: Dicotomia Th1/Th2 na Hanseníase

A resposta imune mediada por linfócitos T auxiliares desempenha um papel fundamental na patogênese da hanseníase, determinando a evolução clínica da doença. A dicotomia Th1/Th2 é um dos principais paradigmas imunológicos utilizados para explicar a polarização das formas clínicas da hanseníase, que variam entre os polos tuberculóide (MHT) e virchowiano (MHV) dentro do espectro de Ridley e Jopling (RIDLEY; JOPLING, 1966).

A resposta Th1 é predominantemente celular e está associada a um perfil inflamatório que favorece o controle da infecção pelo *Mycobacterium leprae*. Essa resposta é mediada por citocinas como interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina-2 (IL-2). O IFN- γ é uma citocina chave na ativação de macrófagos, promovendo a produção de óxido nítrico e outras moléculas microbidas que eliminam o bacilo intracelularmente. O TNF- α atua em sinergia com o IFN- γ para aumentar a resposta inflamatória e estimular a formação de granulomas, que são estruturas essenciais para conter a disseminação do patógeno. A IL-2, por sua vez, é responsável pela proliferação e diferenciação de células T efectoras, intensificando a resposta imune celular. Além disso, a ativação da resposta Th1 favorece a polarização dos macrófagos para o fenótipo M1, caracterizado por uma alta capacidade microbicida e pró-inflamatória, sendo crucial para a eliminação do *M. leprae* (YASMIN et al., 2021; FROES et al., 2020).

Em contraste, a resposta Th2 é caracterizada pela produção de citocinas que favorecem uma resposta humoral e anti-inflamatória, sendo predominante na hanseníase virchowiana. Dentre essas citocinas, destacam-se a interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5) e interleucina-10 (IL-10). A IL-4 estimula a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos produtores de anticorpos, mas essa resposta não é eficaz na eliminação do *M. leprae*, uma vez que o bacilo reside em células do sistema fagocítico mononuclear. A IL-10 exerce efeito imunossupressor, inibindo a produção de IFN- γ e TNF- α , além de reduzir a atividade microbicida dos macrófagos. Como consequência, os macrófagos expostos a IL-4 e IL-10 adquirem o fenótipo M2, caracterizado por um perfil anti-inflamatório e uma reduzida capacidade de eliminar o bacilo, favorecendo a persistência do *M. leprae* no hospedeiro e a progressão da hanseníase virchowiana (YASMIN et al., 2021; FROES et al., 2020).

Pacientes com formas dimorfas da hanseníase apresentam um perfil imunológico intermediário entre os extremos da resposta Th1 e Th2. A resposta imune nesses indivíduos é parcialmente eficaz no controle do *M. leprae*, resultando em uma carga bacilar variável e manifestações clínicas mistas. Essa instabilidade imunológica pode predispor os pacientes a episódios reacionais, caracterizados por inflamação exacerbada e desregulação da resposta imune (SADHU; MITRA, 2018).

Além da clássica dicotomia Th1/Th2, outras subpopulações de células T têm sido associadas à hanseníase, como as células T reguladoras (Tregs) e as células Th17. As Tregs, através da produção de IL-10 e TGF- β , contribuem para a imunossupressão, sendo mais expressivas na hanseníase virchowiana, o que pode justificar a incapacidade do hospedeiro em eliminar o

bacilo. Já a resposta Th17, caracterizada pela secreção de IL-17, IL-22 e IL-23, está associada a um perfil inflamatório, sendo mais evidente em formas paucibacilares e em eventos reacionais (SADHU e MITRA et al., 2017; SANTOS et al., 2017).

2.6 A Imunidade Inata na Hanseníase

A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra o *Mycobacterium leprae*, desempenhando um papel essencial na contenção inicial da infecção e na ativação da resposta adaptativa. Os principais componentes dessa resposta incluem macrófagos, células dendríticas, complementos e receptores de reconhecimento de padrões, como os *Toll-like receptors* (TLRs) e os *Nod-like receptors* (NLRs) (PINHEIRO et al., 2018).

Os macrófagos são as células predominantes na resposta inata contra *M. leprae*, sendo responsáveis pela fagocitose do bacilo. No entanto, a capacidade microbicida dos macrófagos pode ser modulada pelo perfil imunológico do hospedeiro. Enquanto macrófagos com fenótipo M1, ativados por IFN- γ , possuem alta capacidade bactericida, os macrófagos M2, induzidos por IL-4 e IL-10, apresentam um perfil anti-inflamatório e favorecem a sobrevivência do bacilo (YANG et al., 2016; QUARESMA et al., 2023).

Os receptores de reconhecimento de padrões (PRR), presentes principalmente em macrófagos e células dendríticas, reconhecem antígenos da micobactéria. Dentre esses receptores, destacam-se os TLRs, em especial TLR1, TLR2 e TLR4. Esses receptores reconhecem componentes do *M. leprae* (KRUTZIK et al., 2003), induzindo a produção de citocinas inflamatórias como IL-12, essencial para a ativação da resposta Th1. Polimorfismos em genes relacionados a esses receptores podem influenciar a susceptibilidade ao desenvolvimento da hanseníase (JOHNSON et al., 2007; SCHURING et al., 2009).

Os receptores *Nod-like* (NLRs) atuam reconhecendo padrões moleculares associados a patógenos intracelulares e ativam vias inflamatórias. Além disso esses receptores atuam na formação dos inflamassomas, plataformas proteicas intracelulares que são ativadas em resposta a sinais de perigo, levando à ativação da caspase-1 e à liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β (ZHONG et al., 2013). Estudos indicam que a expressão do inflamassoma NLRP3 pode estar envolvida na resposta inflamatória contra *M. leprae*, influenciando a progressão da doença (MENDES et al., 2020). Além disso, determinados polimorfismos no NLRP1 e NLRP3

estão associados à susceptibilidade à hanseníase, sendo mais frequentes em pacientes paucibacilares quando comparados aos multibacilares, e em indivíduos infectados em relação aos controles (PONTILLO et al., 2013).

As células dendríticas são apresentadoras de antígenos profissionais, desempenhando um papel fundamental na ativação da resposta imune adaptativa. Elas capturam e processam antígenos, tendo potencial de participar do direcionamento da resposta imune de acordo com o microambiente local (KASHEM et al., 2017). Além disso, essas células participam da formação dos granulomas, estruturas essenciais para o controle da infecção na hanseníase, onde atuam em conjunto com macrófagos na modulação da resposta inflamatória (VON BUBNOFF et al., 2011).

Por fim, o sistema do complemento também participa da resposta inata ao *M. leprae*, podendo contribuir para a lesão nervosa quando ativado pelo lipoarabinomanana (LAM), um dos componentes da parede celular do *M. leprae* (BAHIA EL IDRISSI et al., 2015). Além disso, o sistema do complemento parece exercer papel importante nas reações hansênicas, com estudos demonstraram um aumento na imunorreatividade do complexo de ataque à membrana (MAC) e deposição de C1q em amostras de pele de pacientes em reação quando comparado com amostras não reacionais (BAHIA EL IDRISSI et al., 2017; DUPNIK et al., 2015).

2.7 As Células Linfoides Inatas

As células linfoides inatas (ILCs) são um grupo de células que residem nos tecidos e desempenham um papel importante na resposta imune inata, contribuindo para a defesa do organismo contra patógenos e a manutenção da homeostase tecidual. Diferentemente dos linfócitos B e T, as ILCs não possuem receptores gerados por recombinação somática, como os receptores de células B (BCR) e de células T (TCR), atuando predominantemente por meio da liberação de citocinas, modulando a resposta inflamatória (GAHEDI et al., 2021).

O desenvolvimento das ILCs ocorre a partir de um precursor comum de células linfoides, diferenciado sob a influência de fatores transcricionais específicos. Esses fatores guiam a maturação das ILCs em três grupos principais: grupo 1, 2 e 3 (Figura 4). Cada um desses grupos é regulado por fatores de transcrição específicos, que direcionam sua diferenciação e função. O grupo 1 é composto pelas células NK e pelas ILC1s, sendo regulado pelos fatores de transcrição

T-bet. As células NK são especializadas na destruição de células infectadas por vírus e células tumorais, exercendo funções semelhantes às das células T CD8+, liberando perforinas e granzimas para induzir apoptose (VIVIER et al., 2018). Já as ILC1s ativam macrófagos por meio da produção de IFN- γ estando envolvidas na resposta contra infecções intracelulares, desempenhando funções similares às das células T auxiliares Th1 (GAHEDI et al., 2021; DIEFENBACH et al., 2014).

O grupo 2 é composto pelas ILC2s, cuja diferenciação é dependente dos fatores de transcrição GATA3 e ROR α . Essas células desempenham um papel fundamental na resposta imune contra parasitas e na regulação de processos alérgicos. Essas células secretam citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13, que estimulam a ativação de eosinófilos e promovem a produção de muco nas barreiras epiteliais (COLONNA, 2018). As ILC2s compartilham funções com as células T auxiliares do tipo Th2, sendo importantes na defesa contra helmintos e na mediação de doenças alérgicas (VIVIER et al., 2018).

O grupo 3 inclui as ILC3s e as *lymphoid tissue inducer cells* (LTi), cuja diferenciação é regulada pelo fator de transcrição ROR γ t. As ILC3s produzem IL-17 e IL-22, citocinas essenciais para a manutenção da integridade da barreira epitelial e a resposta contra patógenos extracelulares. Essas células estão envolvidas na homeostase da microbiota intestinal e na proteção contra infecções bacterianas (ZHENG et al., 2022), desempenhando um papel semelhante ao das células Th17 na imunidade adaptativa (VIVIER et al., 2018). As LTi participam da formação dos linfonodos e placas de Peyer durante o desenvolvimento embrionário (Mebius et al., 1997).

As ILCs desempenham um papel fundamental na regulação da inflamação e na manutenção da homeostase imune. Elas são particularmente importantes em tecidos de barreira, como pele, pulmão e trato gastrointestinal, onde ajudam a reforçar a integridade epitelial e participam da regulação da resposta imune inata. Além disso, estudos indicam que as ILCs podem interagir diretamente com células do sistema imunológico adaptativo, modulando a ativação de células T e promovendo um ambiente imunológico equilibrado (COLONNA, 2018).

Alterações na função das ILCs têm sido associadas a diversas doenças inflamatórias, incluindo distúrbios intestinais e inflamações crônicas. Em doenças intestinais inflamatórias, como a doença de Crohn e a colite ulcerativa, as ILC3s desempenham um papel duplo, podendo promover a reparação tecidual ou exacerbar a inflamação dependendo do microambiente imune (ZHENG; ZHU, 2022). No câncer, as ILCs podem exercer tanto funções protetoras quanto patogênicas. Alguns estudos indicam que as ILC1s e ILC3s podem contribuir para a

imunovigilância antitumoral, enquanto as ILC2s podem favorecer um ambiente pró-tumorigênico por meio da regulação da inflamação e da remodelação tecidual (JACQUELOT et al., 2022).

2.8 As células linfoides inatas na pele e nas doenças cutâneas

As ILCs na pele são mantidas e expandidas localmente, sem necessidade de reposição de células circulantes (GASTEIGER et al., 2015). Enquanto as ILC1s podem traficar entre circulação e linfonodos, as ILC2s e ILC3s não costumam deixar a pele (DUTTON et al., 2019). Estudos em modelo murino sugerem que as ILCs se localizam de maneira compartimentada na pele, com ILC2 predominando no tecido subcutâneo enquanto ILC3s predominam na epiderme (KOBAYASHI et al., 2019). Essa localização e migração na pele é dependente de diferentes receptores de quimiocina em cada subtipo de ILCs (NAGAO et al., 2012; SALIMI *et al.* 2013).

As ILCs participam da regulação da homeostase da pele. ILC3s atuam no desenvolvimento das glândulas sebáceas, limitando seu desenvolvimento. Além disso, essas células podem regular a proporção de bactérias gram-negativas na pele (KOBAYASHI et al., 2019). O reparo da pele também tem a participação das ILCs, com estudos demonstrando atraso na cicatrização de feridas em camundongos com depleção de ILC2s (RAK et al., 2016).

Além de função na homeostasia da pele, as ILCs já tiveram sua participação estudada em diversas doenças de pele, como na dermatite de contato, dermatite atópica e na psoríase (KOBAYASHI et al., 2020).

As ILCs do grupo 1 já foram estudadas na dermatite de contato em modelo murino. Nesse modelo, as células NK residentes do fígado induziram reposta de memória independente dos linfócitos T e B, sugerindo que, embora pertencentes a imunidade inata, as ILC1s podem ter propriedade de memória (O'LEARY et al., 2016).

Na dermatite atópica, as ILC2s parecem atuar ativamente na inflamação cutânea, possuindo concentração aumentada nas lesões de paciente com a doença em relação à pele de indivíduos saudáveis (SALIMI et al., 2013).

Estudos experimentais indicam que os basófilos podem modular a ativação das ILC2s por meio da produção de IL-4, promovendo a inflamação alérgica em modelos de dermatite atópica induzida (KIM et al., 2014). Além disso, foi demonstrado que as ILC2s podem contribuir para

a amplificação da resposta Th2 por meio da produção de IL-13, que estimula a liberação da quimiocina CCL17 pelas células dendríticas(CD), facilitando a ativação de linfócitos Th2 de memória (HALIM et al., 2016). Além da modulação da resposta imune, as ILC2s podem interagir com outros componentes da pele. A IL-4, citocina também produzida pelas ILC2s, tem papel na sensação de prurido, atuando diretamente em células nervosas (OETJEN et al., 2017).

As ILCs também participam ativamente da inflamação na psoríase, particularmente as ILC3s. A psoríase tem imunopatologia complexa, mas as citocinas IL-23 e IL-17 apresentam papel central (BOEHNCKE et al., 2015). A IL-23 estimula os linfócitos Th17 a produzirem IL-17 e IL-22, que vai agir nos queratinócitos e células imunes, causando a doença (CHIRICOZZI et al., 2011). Entretanto, assim como os linfócitos Th17, as ILC3s também são capazes de produzir estas citocinas, e essas células estão aumentadas na pele e sangue periférico de pacientes com a doença (TEUNISSEN et al., 2014). A participação da ILC3s na psoríase também foi demonstrada por meio de modelo murino humanizado de psoríase, no qual enxertos de pele humana normal foram implantados em camundongos imunossuprimidos e posteriormente injetados com ILC3s purificadas, resultando na indução de lesões psoriáticas (KAREN et al., 2018).

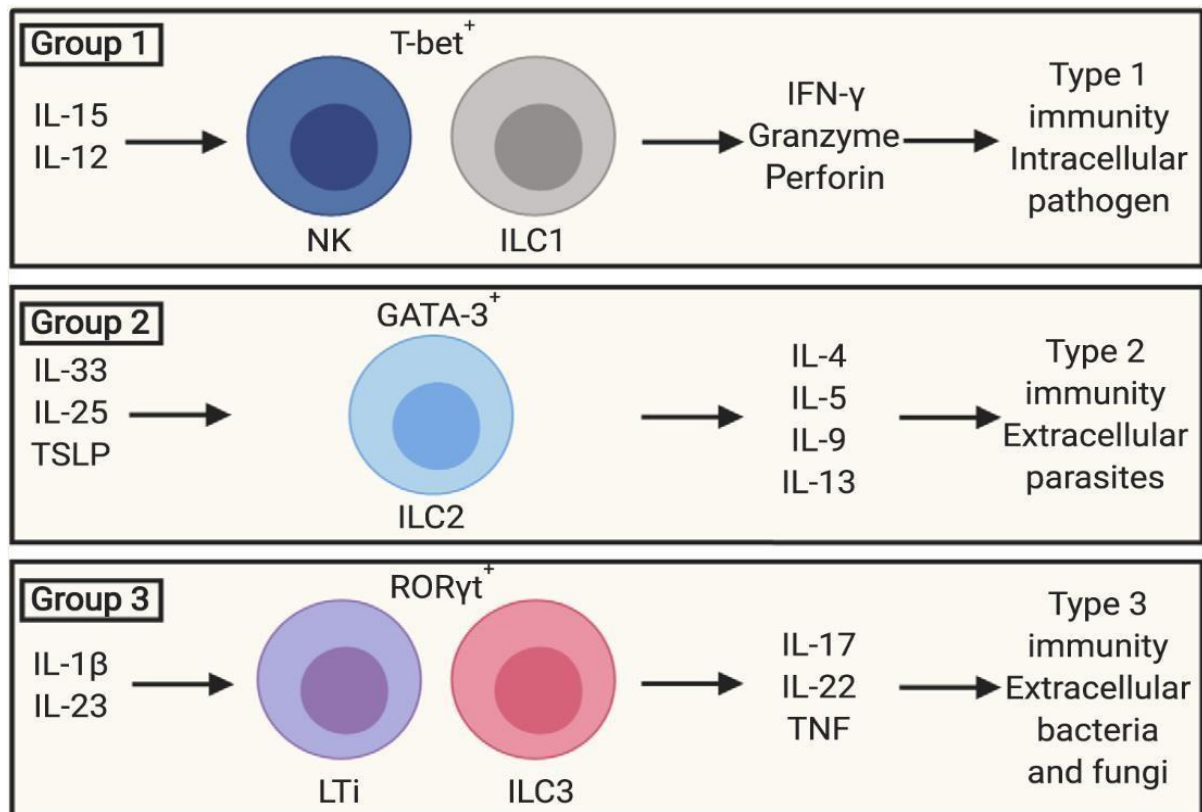


Figura 4. Os diferentes grupos das células linfóides inatas. Fonte: KOBAYASHI; RICARDO-GONZALEZ; MORO, 2020.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar por imuno-histoquímica os fatores de transcrição de linfócitos T-bet, GATA-3, ROR γ T na hanseníase.

3.2 Objetivos específicos

- 1- Descrever as características demográficas, epidemiológicas e clínicas da população do estudo;
- 2- Caracterizar a expressão imuno-histoquímica de T-bet, GATA-3, ROR γ T em amostras de pele de pacientes com hanseníase;
- 3- Caracterizar a expressão imuno-histoquímica de T-bet, GATA-3 e ROR γ T de acordo com a expressão de CD4;

4 MÉTODOS

4.2 Aprovação do projeto no comitê de Ética

A presente proposta é subprojeto do estudo “H-COVID: Aspectos epidemiológico, microbiológico, imunopatológico e clínico da Hanseníase em contexto pós-COVID-19” que foi aprovada pelos Comitês de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP) do Hospital Eduardo de Menezes e do Instituto René Rachou. O estudo segue a Resolução CNS 466/12 e, em respeito à Lei da Biodiversidade (Lei 13.123), não contemplará acesso ao patrimônio genético (PGN).

4.3 Delineamento do estudo e cálculo amostral

A presente proposta contempla estudo primário, multicêntrico, observacional, transversal e comparativo. O estudo contou com um total de 46 amostras de pele, colhidas por meio de biópsias realizadas em pacientes diagnosticados com hanseníase atendidos no Hospital Eduardo de Menezes (26 pacientes) e no centro de especialidades médicas de Teófilo Otoni (20 pacientes). Os pacientes foram atendidos no período de Maio/2021 a Fevereiro/2024 em dias da semana que contavam com infraestrutura para realização da pesquisa (quanto a acondicionamento e transporte dos materiais).

4.4 Critério de inclusão e exclusão

4.4.1 Critérios de inclusão

Pacientes diagnosticados com hanseníase no ambulatório de dermatologia do Hospital Eduardo de Menezes e no centro de especialidades médicas de Teófilo Otoni, que não tenham tido tratamento para a doença nos últimos 12 meses.

4.4.2 Critérios de exclusão

Menores de 18 anos; casos com diagnóstico histopatológico não conclusivo; pacientes imunossuprimidos (por drogas ou doenças).

4.5 Exames histopatológicos e Imuno-histoquímica

Os fragmentos de pele colhidos por biópsia foram acondicionados em solução tamponada de formol nos serviços de origem (H. Eduardo de Menezes e Centro de Especialidades de Teófilo Otoni) e enviados para o Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG. No laboratório, foram realizados cortes para estudo anatomopatológico trabalhados em Hematoxilina e Eosina e em FITE-FARACO. As lâminas foram analisadas por médico patologista experiente, e o laudo foi emitido para auxiliar a equipe assistente no diagnóstico e classificação da doença.

Posteriormente, os alvos T-bet, GATA-3, ROR γ t e CD4 foram avaliados por imuno-histoquímica (IHQ). Para tanto, lâminas com cortes parafinados de 4 μ m dos blocos de tecido foram desparafinizadas em xilol e re-hidratadas em álcool. A recuperação da antigenicidade foi feita pelo aquecimento a 90°C no vapor por 20 minutos em solução tampão 10mM Tris EDTA (pH 9,0) e em solução tampão de citrato de sódio (pH 6,0). A coloração para imuno-histoquímica foi feita com os anticorpos primários anti-T-bet (Abcam ab154200:Recombinant Anti-T-bet/Tbx21 [EPR9302]), anti-GATA-3 (Abcam ab199428: Recombinant Anti-GATA3 antibody [EPR16651]), anti-ROR γ t (Abcam ab219501: Anti-ROR gamma antibody) e anti-CD4⁺ (Anti-CD4 antibody (ab133616) [EPR6855]) diluídos em PBS. A peroxidase endógena foi bloqueada e as lâminas foram lavadas em solução tampão. Serão adicionados 100 μ L do anticorpo primário, na diluição informada, por 50 minutos, em temperatura ambiente em câmara úmida. Os cortes foram lavados com PBS e incubados com MACH4 Universal AP Polymer Kit (BIO CARE), de acordo com as especificações do fabricante.

4.6 Avaliação do exame imuno-histoquímico

As lâminas foram avaliadas quanto a intensidade e distribuição da marcação no infiltrado inflamatório (Figura 5). Quanto à intensidade, a reação foi classificada em ausente, leve, moderada ou acentuada. Quanto à distribuição de células positivas no infiltrado inflamatório, a reação foi classificada como ausente, esporádica (1 a 25%), focal (26 a 50%), multifocal (51 a 75%) ou difusa (76 a 100%).

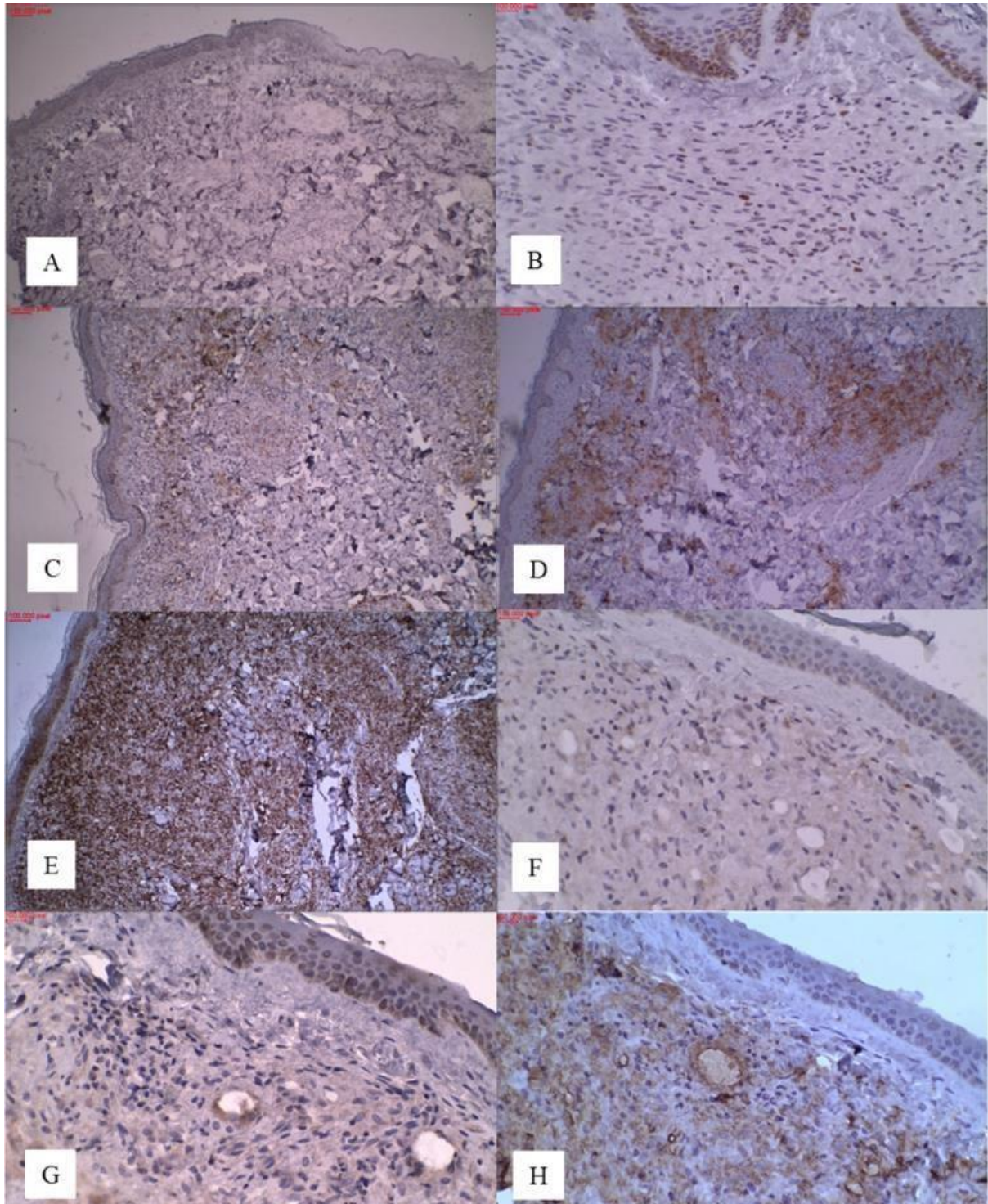


Figura 5. Microfotografias da imunorreatividade nos tecidos. A) Negativo (HEx10); B) Distribuição <25% (HEx40); C) Distribuição <50% (HEx10); D) Distribuição <75% (HEx10); E) Distribuição >75% (HEx10); F, G e H) Intensidades leve, moderada e acentuada, respectivamente (HEx40).

4.7 Cálculo do escore de expressão imuno-histoquímica

O escore de expressão imunohisto-química foi calculado individualmente para cada marcador utilizado na mesma amostra de pele. Para o cálculo do escore, é atribuída uma pontuação de 0 a 3 para cada grau de intensidade, e de 0 a 4 para cada grau de distribuição. Posteriormente, a pontuação da distribuição é multiplicada pela intensidade, resultando no escore imuno-histoquímico. Estudos recentes utilizaram escores na avaliação histopatológica de tecidos e reação imunológica (TAKANO et al., 2016, MENDES et al., 2020). Resultados de escore menor que 5 foram classificados como expressão basal, enquanto resultados maiores ou iguais a 5 foram classificados como hiperexpressão. Foi calculado o escore para cada um dos marcadores estudados: T-bet, GATA-3, ROR γ T e CD4.

4.8 Coleta de dados epidemiológicos e relativos à forma de hanseníase

4.8.1 Coleta de dados epidemiológicos

Os dados epidemiológicos foram coletados diretamente com o paciente no momento da inclusão na pesquisa. Foram utilizadas classificações quanto ao sexo (feminino ou masculino), etnia (cor: branca, parda e preta) e grau de escolaridade (analfabeto, ensino fundamental, ensino médio e ensino superior).

4.8.2 Classificação quanto a forma de hanseníase

Os pacientes foram classificados quanto à forma de hanseníase conforme classificação operacional da OMS (em paucibacilar e multibacilar) e classificação de Ridley e Jopling. A classificação foi realizada pelos médicos dermatologistas responsáveis por cada caso.

Na classificação operacional, o paciente é dito multibacilar (MB) caso tenha mais de 5 lesões ou apresente baciloscopia positiva para bacilos álcool ácido resistentes (em raspado dérmico de lóbulos de orelhas, cotovelos ou de lesão cutânea). Pacientes paucibacilares (PB) apresentam 5 ou menos lesões e baciloscopia negativa. A classificação de Ridley e Jopling é de maior complexidade, levando em conta dados clínicos, anatomopatológicos e baciloscópicos. Critérios para esta classificação se encontram na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação de Ridley e Jopling.

	Tuberculoide (MHT)	Dimorfa Tuberculóide (MHDT)	Dimorfa Dimorfa (MHDD)	Dimorfa Virchowiana (MHDV)	Virchowiana (MHV)
Achados Dermatológicos	Uma ou duas placas com bordas bem definidas e frequentemente elevadas	De uma a cinco placas eritematosas infiltradas, ou uma lesão anular grande	Mais de seis placas infiltradas com aparência de “queijo suíço”	Mais de seis placas anulares	Múltiplas placas infiltradas e nódulos. Fácies leonina (madarose, lóbulos das orelhas infiltrados, ponte nasal alargada)
Simetria da Distribuição	Assimétrica	Assimétrica	Assimétrica	Simétrica	Simétrica
Presença ou Ausência de Anestesia	Anestésica	Anestésica	Pode ou não ser anestésica	Pode ou não ser anestésica	Sem anestesia
Risco de Reação Imunológica	Nenhum	Reação Tipo 1	Reação Tipo 1	Reação Tipo 1 ou Tipo 2	Reação Tipo 2
Histopatologia	Granulomas bem formados - Muitos linfócitos, células gigantes	Mistura de achados Tuberculóides e Virchowianos. MHDT: Mais propensa a observar granulomas bem formados. MHDD ou MHDV: mais propensa a observar macrófagos espumosos			Lençóis de macrófagos espumosos
Bacilos Álcool-Ácido Resistentes	Nenhum detectado	Poucos ou nenhum detectado	Muitos	Muitos	Muitos (globias)

Para cada marcador (T-bet, ROR γ t, GATA-3, CD4) foi realizado a comparação entre o número de amostras com expressão basal e com hiperexpressão entre pacientes PB e MB. Para análise estatística foi utilizado o teste de Qui Quadrado por meio do software MINITAB 17. Os resultados foram considerados como estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

População do estudo

A população do estudo compreende 46 participantes de Minas Gerais, sendo 26 oriundos de Belo Horizonte e 20 de Teófilo Otoni, com idade média de 52,71 anos (Tabela 2). Em Belo Horizonte, 53,85% dos participantes são brancos, enquanto em Teófilo Otoni esse percentual é 23,81%, com maior presença de pardos (55%) e pretos (20%). A proporção entre os sexos foi semelhante nos grupos, com 50% de mulheres em Belo Horizonte e 55% em Teófilo Otoni. Os pacientes foram classificados de acordo com a classificação de Ridley e Jopling, levando em conta características clínicas e histopatológicas (Tabela 3).

Tabela 2. Características epidemiológicas da população estudada.

Característica		Local de amostragem		Total (n grupo)
		Belo Horizonte	Teófilo Otoni	
Sexo	Feminino	13 (50.00%)	11 (55.00%)	24
	Masculino	13 (50.00%)	9 (45.00%)	22
Cor	Branca	14 (53.85%)	5 (25.00%)	19
	Parda	11 (42.31%)	11 (55.00%)	22
	Preta	1 (3.85%)	4 (20.00%)	5
Grau de escolaridade	Analfabeto	4 (15.38%)	2 (10.00%)	6
	Ensino Fundamental	9 (34.62%)	10 (50.00%)	19
	Ensino Médio	8 (30.77%)	4 (20.00%)	12
	Ensino Superior	5 (19.23%)	4 (20.00%)	9
	Total (n)	26 (100%)	20 (100%)	46

Belo Horizonte apresenta maior proporção de casos classificados como MHDD (30,77%) e MHV (34,62%), enquanto Teófilo Otoni tem maior percentual de MHI (20%). Ambas populações tiveram predominância de casos multibacilares, correspondendo a 69,23% dos pacientes de Belo Horizonte e 55% dos pacientes de Teófilo Otoni. Quanto a classificação de

Ridley e Jopling, em Belo Horizonte o maior grupo foi de pacientes MHV (34,62%), enquanto em Teófilo Otoni o maior grupo foi dos MHDD (30,0%). Belo Horizonte não apresentou pacientes MHT e Teófilo Otoni não apresentou pacientes MHDT e MHDV. Além disso, também foi realizada a classificação operacional (Multibacilar e Paucibacilar) (Tabela 3).

Tabela 3. Classificações da forma de hanseníase na população do estudo. PB: paucibacilar; MB: multibacilar; HI: hanseníase indeterminada; MHDD: hanseníase dimorfa dimorfa; MHDT: hanseníase dimorfa tuberculoide; MHDV: hanseníase dimorfa virchowiana; MHT: hanseníase tuberculóide; MHV: hanseníase virchowiana.

Classificação		Local de amostragem		Total (n grupo)
		Belo Horizonte	Teófilo Otoni	
Operacional	PB	8 (30.77%)	9 (45.0%)	17
	MB	18 (69.23%)	11 (55.0%)	29
Ridley e Jopling	HI	1 (3.85%)	4 (20.0%)	5
	MHDD	8 (30.77%)	6 (30.0%)	14
	MHDT	7 (26.92%)	0 (0.0%)	7
	MHDV	1 (3.85%)	0 (0.0%)	1
	MHT	0 (0.0%)	5 (25.0%)	5
	MHV	9 (34.62%)	5 (25.0%)	14
	Total (n)	26 (100%)	20 (100%)	46

Imuno-histoquímica

Quanto à intensidade e distribuição da reatividade de CD4+, o grupo PB apresentou predominância da intensidade ausente (47,06%), enquanto o grupo MB obteve maior parte dos exames como intensidade moderada (51,81%). Quanto à distribuição da imunorreatividade em PB e MB, ambos os grupos apresentaram predominância de ausente, representando 47,06% e 31,03%, respectivamente (Tabela 4). A figura 6 apresenta imagens do estudo imuno-histoquímico de CD4.

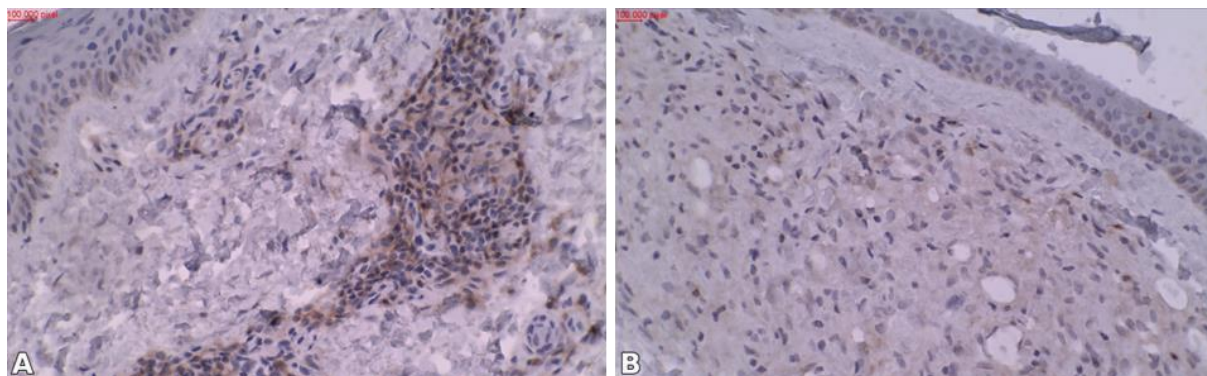


Figura 6. Microfotografias da imunorreatividade dos linfócitos T CD4+ nas amostras dos grupos Paucibacilar (A) e Multibacilar, aumento 40x (B), aumento 40x.

Tabela 4: Imunorreatividade dos linfócitos T CD4+ nas biópsias de pele.

CD4+	PB	MB	Total
	n (%)	n (%)	n
<i>Intensidade</i>			
Ausente	8 (47,06)	9 (31,03)	17
Leve (+)	0 (0,0)	1 (3,45)	1
Moderada (++)	5 (29,41)	15 (51,72)	20
Acentuada (+++)	4 (23,53)	4 (13,79)	8
Total	17 (100)	29 (100)	46
<i>Distribuição</i>			
Ausente	8 (47,06)	9 (31,03)	17
Esporádica (1 a 25%)	3 (17,65)	6 (20,69)	9
Focal (26 a 50%)	1 (5,88)	1 (3,45)	10
Multifocal (51 a 75%)	2 (11,76)	3 (10,34)	5
Difusa (76 a 100%)	3 (17,65)	2 (6,9)	5
Total	17 (100)	29 (100)	46

Em relação a intensidade da reatividade dos marcadores T-bet, observa-se predominância da expressão leve em PB (41,18%) e ausente em MB (41,38%). A intensidade acentuada é exclusiva do grupo MB. Quanto à distribuição, houve predominância de ausente nos MB (47,06%) e de esporádica nos PB (41,38%) (Tabela 5). A figura 7 apresenta imagens do estudo imuno-histoquímico de T-bet.

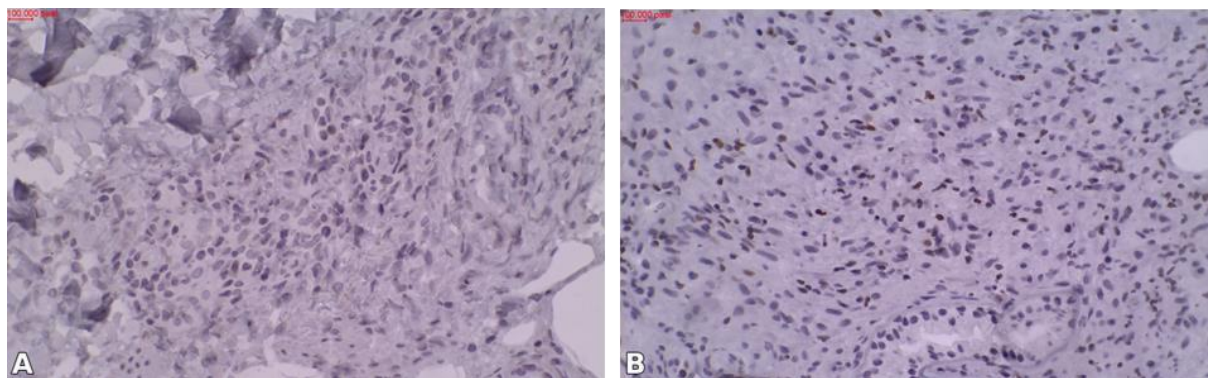


Figura 7. Microfotografias da imunorreatividade para T-bet nas amostras dos grupos Paucibacilar (A) e Multibacilar (B), aumento 40x.

Tabela 5. Imunorreatividade do biomarcador T-bet nas biópsias de pele.

T-bet	PB	MB	Total
	n (%)	n (%)	n
<i>Intensidade</i>			
<u>Ausente</u>	6 (35.29%)	12 (41.38%)	18
Leve (+)	7 (41.18%)	8 (27.59%)	15
Moderada (++)	4 (23.53%)	4 (13.79%)	8
Acentuada (+++)	0 (0.0%)	5 (17.24%)	5
Total	17 (100%)	29 (100%)	46
<i>Distribuição</i>			
<u>Ausente</u>	6 (35.29%)	12 (41.38%)	18
<u>Esporádica</u> (1 a 25%)	8 (47.06%)	11 (37.93%)	19
Focal (26 a 50%)	3 (17.65%)	2 (6.9%)	5
Multifocal (51 a 75%)	0 (0.0%)	4 (13.79%)	4
<u>Difusa</u> (76 a 100%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0
Total	17 (100%)	29 (100%)	46

Sobre a imunorreatividade de GATA-3, no grupo MB, ocorreu predominância da expressão moderada (41,38%) e acentuada (31,03%). Em PB, a predominância foi da expressão moderada (41,18%) e leve (29,41%). Quanto a distribuição, PB apresentou predominância de esporádica (29,41%), enquanto em MB predominou a difusa (44,83%) (Tabela 6). A figura 8 apresenta imagens do estudo imuno-histoquímico de GATA-3.

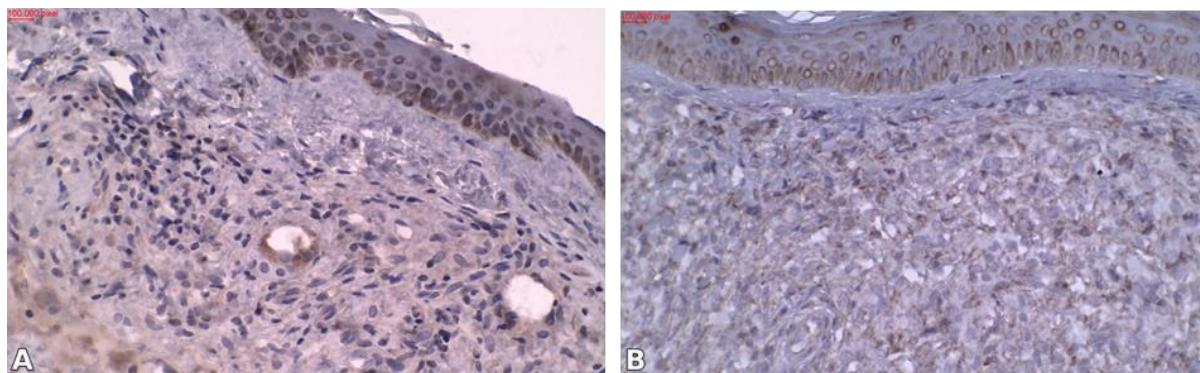


Figura 8. Microfotografias da imunorreatividade para GATA-3 nas amostras dos grupos Paucibacilar (A) e Multibacilar (B), aumento 40x.

Tabela 6: Imunorreatividade do biomarcador GATA-3 nas biópsias de pele.

GATA-3	PB	MB	Total
	%	%	n
<i>Intensidade</i>			
Ausente	3 (17.65%)	5 (17.24%)	8
Leve (+)	5 (29.41%)	3 (10.34%)	8
Moderada (++)	7 (41.18%)	12 (41.38%)	19
Acentuada (+++)	2 (11.76%)	9 (31.03%)	11
Total	17 (100%)	29 (100%)	46
<i>Distribuição</i>			
Ausente	3 (17.65%)	5 (17.24%)	8
Esporádica (1 a 25%)	5 (29.41%)	5 (17.24%)	8
Focal (26 a 50%)	3 (17.65%)	4 (13.79%)	7
Multifocal (51 a 75%)	3 (17.65%)	4 (13.79%)	7
Difusa (76 a 100%)	3 (17.65%)	13 (44.83%)	16
Total	17 (100%)	29 (100%)	46

Para o biomarcador ROR γ t, encontramos que em PB intensidade leve foi mais frequente (70,59%), enquanto que MB apresentou predominância de acentuada (37,93%), seguida por moderada (34,48%). A distribuição que mais ocorreu em PB foi de esporádica (70,59%), enquanto em MB foi a expressão difusa (34,58%) (Tabela 7). A figura 9 apresenta imagens do estudo imuno-histoquímico de ROR γ t.

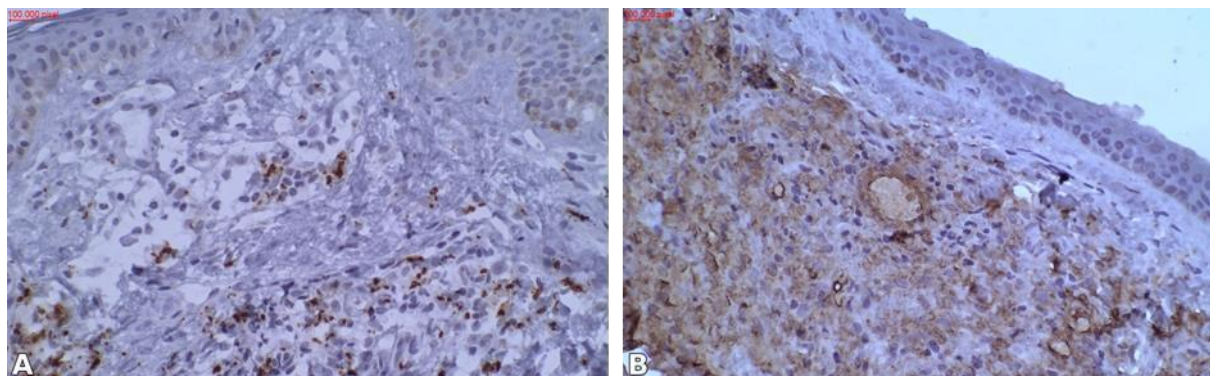


Figura 9. Microfotografias da imunorreatividade do biomarcador ROR γ t nas amostras dos grupos Paucibacilar (PB) e Multibacilar (MB), aumento 40x.

Tabela 7: Imunorreatividade do biomarcador ROR γ t nas biópsias de pele.

ROR γ t	PB	MB	Total
	%	%	n
<i>Intensidade</i>			
Ausente	3 (17.65%)	4 (13.79%)	7
Leve (+)	12 (70.59%)	4 (13.79%)	16
Moderada (++)	1 (5.88%)	10 (34.48%)	11
Acentuada (+++)	1 (5.88%)	11 (37.93%)	12
Total	17 (100%)	29 (100%)	46
<i>Distribuição</i>			
Ausente	3 (17.65%)	4 (13.79%)	7
Esporádica (1 a 25%)	12 (70.59%)	6 (20.69%)	18
Focal (26 a 50%)	1 (5.88%)	5 (17.24%)	6
Multifocal (51 a 75%)	0 (0.0%)	4 (13.79%)	4
Difusa (76 a 100%)	1 (5.88%)	10 (34.48%)	11
Total	17 (100%)	29 (100%)	46

A hiperexpressão de T-bet, ROR γ T e GATA-3 foi estatisticamente maior nos pacientes MB em relação a PB. Não houve diferença estatisticamente significativa para a expressão de CD4+ entre PB e MB (Tabela 8).

Tabela 8. Escore de expressão imuno-histoquímica dos grupos PB e MB. Considerou-se hiperexpressão escore igual ou superior a cinco. Diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) estão indicadas com um asterisco.

Marcador/ Escore	Escore	PB	MB	Total (n)	p-valor
CD4+	Basal	12 (70.59%)	22 (75.86%)	34	-
	Hiper	5 (29.41%)	7 (24.14%)	12	0,698
Tbet	Basal	17 (100.00%)	23 (79.31%)	40	-
	Hiper	0 (0.00%)	6 (20.69%)	6	0,006*
GATA-3	Basal	12 (70.59%)	12 (41.38%)	24	-
	Hiper	5 (29.41%)	17 (58.62%)	22	0,042*
ROR γ t	Basal	16 (94.12%)	13 (44.83%)	29	-
	Hiper	1 (5.88%)	16 (55.17%)	17	<0,001*

Ao comparar apenas amostras de pacientes com expressão basal de CD4, o grupo MB teve maior proporção de hiperexpressos para GATA-3 e ROR γ t, sendo essa diferença estatisticamente significativa. Quanto a T-bet, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Tabela 9).

Tabela 9: Escore de expressão imuno-histoquímica dos grupos PB e MB de pacientes com expressão basal de CD4. Considerou-se a hiperexpressão dos pacientes com escore igual ou superior a cinco. Diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) estão indicadas com um asterisco.

Marcador/ Escore	Escore	PB	MB	Total (n)	p-valor
Tbet	Basal	12 (100.00%)	17 (77.27%)	29	0,137
	Hiper	0 (0.00%)	5 (22.73%)	5	0,137
GATA-3	Basal	8 (66.67%)	7 (31.82%)	15	0,039*
	Hiper	4 (33.33%)	15 (68.18%)	19	0,039*
ROR γ t	Basal	11 (91.67%)	10 (45.45%)	21	0,001*
	Hiper	1 (8.33%)	12 (54.55%)	13	0,001*

6 DISCUSSÃO

O presente estudo apresenta evidência de participação das células linfóides inatas na resposta imune à hanseníase, e aponta que tal participação pode ser variável conforme a classificação clínica da doença.

A reação imunológica orquestrada contra o *M.leprae* é o principal determinante da forma de hanseníase desenvolvida. Pacientes mais próximos ao polo tuberculoide apresentam doença limitada e predomínio de imunidade tipo celular (th1), enquanto pacientes mais próximos ao polo virchowiano apresentam doença disseminada e predomínio de imunidade tipo humoral (th2) (SADHU e MITRA, 2018). Para efeito de comparação, optamos por classificar a doença utilizando a classificação operacional, que divide os pacientes em dois grupos. Assim, os pacientes PB representam o grupo mais próximo do polo tuberculoide, enquanto os MB se encontram mais próximos do polo virchowiano (FROES JR et al., 2020).

Quanto ao fator de transcrição GATA3, ocorreu maior proporção de hiperexpressão no grupo MB em relação aos PB, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p = 0,042$). O fator de transcrição GATA3 é essencial na diferenciação de linfócitos th2 e de ILC2s (TINDEMANS et al., 2014). Portanto, tal resultado é esperado, e pode ser explicado pelo predomínio da imunidade th2 em pacientes MBs em relação aos PBs.

Ao analisar apenas amostras de pacientes com expressão basal de CD4, também foi observada maior proporção de hiperexpressos para GATA3 nos MB ($p=0,039$). Esse resultado indica maior participação de ILC2s no infiltrado inflamatório dos pacientes MB em relação aos PB. Tal resultado vai de encontro a literatura, que mostra evidências de maior participação dessas células em doenças com predomínio da resposta imune do tipo 2. MASHIKO et al. (2017) demonstraram aumento de ILC2s na pele de pacientes com dermatite atópica em relação a pacientes com psoríase utilizando citometria de fluxo para identificar as células em biópsias de pele. SALIMI et al. (2013), por sua vez, evidenciaram maior número de ILC2s em biópsias de pele de pacientes com dermatite atópica em comparação com indivíduos saudáveis, destacando ainda a predominância dessas células sobre ILC1s e ILC3s.

Quanto a T-bet, o resultado mostra um maior número de amostras com hiperexpressão no grupo MB em relação ao PB ($p 0,006$). A princípio, este resultado não era esperado. O T-bet atua na

diferenciação das células Th1 (OH e HWANG, 2014) e é essencial para função das ILC1s (VIVIER et al., 2018). Sendo assim, esperava-se maior expressão desse marcador nos PBs, grupo com maior imunidade tipo 1. SCHINNER et al. (2023) demonstraram por imunofluorescência predominância de linfócitos T-bet positivos em relação a GATA3 positivos em amostras de pacientes com liquen plano, doença com predominância da imunidade tipo 1. Ao analisar as apenas amostras com expressão de CD4⁺ basal, não houve diferença significativa quanto a hiperexpressão de T-bet entre os grupos. Sendo assim, este estudo não pode sugerir qual grupo apresenta maior participação de ILC1s.

Ao analisar RORyT, observamos maior quantidade de hiperexpressos no grupo MB em relação aos PBs ($p < 0,001$). O RORyT é um fator de transcrição essencial para o desenvolvimento e função das ILC3s (FIANCETTE et al., 2021), além de desempenhar um papel central na função, desenvolvimento e diferenciação dos linfócitos Th17 (MICKAEL et al., 2020). A imunopatologia da hanseníase é centrada principalmente na dicotomia entre a imunidade 1 e 2. Entretanto, estudos prévios sugerem maior participação da imunidade tipo 3 no polo PB da doença. SAINI, RAMESH e NATH (2013) demonstraram maior participação de linfócitos Th17 e citocinas associadas a imunidade tipo 3 em pacientes tuberculoides em relação aos virchowianos. Resultado semelhante foi apontado por SANTOS et al. (2017). Sendo assim, este resultado contraria a literatura prévia, uma vez que encontramos maior hiperexpressão de GATA3 no grupo MB. Ao excluir os pacientes com hiperexpressão de CD4, tal resultado se manteve, o que pode apontar para uma maior prevalência de ILC3s nos pacientes MB.

Em relação ao CD4, não houve diferença significativa entre os grupos. Tal resultado aponta que a diferença de hiperexpressão dos demais marcadores nas amostras de pele não pode ser explicada por um maior número de linfócitos T auxiliares em um dos grupos.

Os resultados aqui presentes devem ser interpretados levando em consideração algumas limitações do trabalho. Primeiramente, o estudo foi realizado utilizando apenas imuno-histoquímica. Tal metodologia é examinador-dependente e produz dados semiquantitativos. Para reduzir ao máximo o impacto dessa característica, as lâminas foram examinadas por patologista experiente e especializado neste método.

Além disso, a análise por imuno-histoquímica pode sofrer interferência das características histopatológicas de cada forma de hanseníase. Pacientes próximos ao polo tuberculóide apresentam predomínio de granuloma tuberculóide com linfócitos na periferia, enquanto nos pacientes próximos ao polo virchowiano, os linfócitos se apresentam distribuídos difusamente

no infiltrado (MASSONE, BELACHEW e SCHENTTINI, 2105). Como a distribuição das células marcadas é critério para calcular o escore imuno-histoquímico, é possível que os pacientes do grupo MB tendem a ter uma nota maior.

Quanto aos anticorpos contra os fatores de transcrição T-bet, ROR γ T e GATA3, embora utilizados para identificar diferentes tipos de linfócitos T helper e células linfóides inatas, também podem marcar outras células e estruturas nos tecidos. Neste estudo, observamos na epiderme, expressão importante de GATA-3 e, em pequena escala, de T-bet. Os dados da utilização desses anticorpos na literatura são escassos no contexto da imunologia, mas há estudos que utilizaram anti-GATA3 na avaliação de tumores mamários (DEFTEREOS et al., 2015) e uroteliais (PLAGE et al., 2022).

Em relação à divisão dos grupos, a heterogeneidade dos grupos PB e MB pode ter tido influência nos resultados. Pacientes dimorfos apresentam resposta imune com padrão misto th1/th2 ao bacilo. Entretanto, na classificação operacional, os pacientes MHDD são sempre considerados MB devido às características dessa forma clínica da doença (baciloscopia positiva e mais de 5 lesões cutâneas). A comparação entre diferentes formas de hanseníase seria mais precisa ao dividir os pacientes apenas levando em consideração a classificação de Ridley e Joplin. No entanto, um estudo com tal divisão exige um número mais elevado de participantes, uma vez que os pacientes seriam distribuídos em 5 grupos diferentes.

Por fim, não há outro estudo que se proponha a avaliar células linfóides inatas na hanseníase, não sendo possível comparar diretamente os resultados aqui descritos com dados prévios da literatura.

Embora este trabalho tenha fornecido evidências preliminares sobre a participação das células linfóides inatas na hanseníase, avanços metodológicos podem ampliar significativamente o entendimento sobre o papel dessas células na doença. Estudos futuros devem considerar o uso de metodologias complementares, como a citometria de fluxo, que permite avaliar múltiplos marcadores em uma mesma célula com maior precisão. Essa abordagem proporcionaria uma caracterização mais detalhada e quantitativa das ILCs nos diferentes polos da hanseníase, complementando os achados obtidos por imuno-histoquímica. Além disso, técnicas como RNA-seq em células individuais poderiam fornecer informações sobre o perfil transcricional específico das ILCs, abrindo novas perspectivas sobre sua funcionalidade na hanseníase.

Por fim, além de contribuir para o entendimento da imunopatologia da hanseníase, esse trabalho utilizou metodologia inédita para avaliação das ILCs. Os fatores de transcrição T-bet, GATA3

e RORyt foram estudados conjuntamente para identificar diferentes células no infiltrado inflamatório por imuno-histoquímica. Essa abordagem é particularmente relevante, pois a imuno-histoquímica é uma técnica amplamente disponível e de custo mais acessível em comparação à citometria de fluxo à imunofluorescência, o que pode viabilizar estudos semelhantes em outras doenças no contexto de limitação de recursos.

7 REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, M. G. Hanseníase no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 3, p. 373-382, 2003
- AZEVEDO, M. C. S. *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. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 206, n. 6, p. 429-439. Dez 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00430-017-0519-9>.
- BAHIA EL IDRISSEI, N. *et al.* *M. leprae* components induce nerve damage by complement activation: identification of lipoarabinomannan as the dominant complement activator. **Acta Neuropathologica**, v. 129, n. 5, p. 653-67, Mai 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1404-5>.
- BAHIA EL IDRISSEI, N. *et al.* *In situ* complement activation and T-cell immunity in leprosy spectrum: an immunohistological study on leprosy lesional skin. **PLoS One**, v. 12, n. 5, 15 Mai 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177815>.
- BIELECKI, P. *et al.* Skin-resident innate lymphoid cells converge on a pathogenic effector state. **Nature**, v. 592, p. 128–132, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03188-w>.
- BOEHNCKE, W. H., & SCHÖN, M. P. Psoriasis. **Lancet**, v. 386, p. 983–994, 5 Set 2015. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61909-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61909-7).
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia Prático sobre a Hanseníase**. Brasília: MS, 2017. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_hanseniase.pdf. Acesso em: 30 jan. 2025.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Hanseníase**. Brasília: MS, 2022. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo_clinico_diretrizes_terapeuticas_hanseniase.pdf. Acesso em: 30 jan. 2025.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. **Leprosy Epidemiological Record**. Boletim Epidemiológico. Número Especial, Jan 2024.
- BRITTON, W. J.; LOCKWOOD, D. N. Leprosy. **The Lancet**, v. 363, n. 9416, p. 1209-19, 2004. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)15952-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15952-7).
- CHIRICOZZI, A. *et al.* Integrative responses to IL-17 and TNF- α in human keratinocytes account for key inflammatory pathogenic circuits in psoriasis. **The Journal of investigative dermatology**, v. 131, n. 3, p. 677–687, Mar 2011. DOI: <https://doi.org/10.1038/jid.2010.340>.
- CLOTTU, A. S.; HUMBEL, M.; FLUDER, N.; KARAMPETSOU, M. P.; COMTE, D. Innate lymphoid cells in autoimmune diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021. DOI: <http://doi.org/10.3389/fimmu.2021.789788>.

COLONNA, M. Innate Lymphoid Cells: Diversity, Plasticity, and Unique Functions in Immunity. **Immunity**, v. 48, n. 6, p. 1104-1117, 2018. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.05.013>.

DIEFENBACH, A.; COLONNA, M.; KOYASU, S. Development, differentiation, and diversity of innate lymphoid cells. **Immunity**, v. 41, n. 3, p. 354-365, 2014. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.09.005>.

DEFTEREOS, G.; SANGUINO, A.M.S.; SILVERMAN, J.F.; KRISHNAMURTI, U. GATA3 immunohistochemistry expression in histologic subtypes of primary breast carcinoma and metastatic breast carcinoma cytology. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 39, n. 9, p.1282-9, 2015. DOI: <http://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000505>.

DUPNIK, K. M. *et al.* Transcriptional changes that characterize the immune reactions of leprosy. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 10, p. 1658-76, 15 Mai 2015. DOI: <http://doi.org/10.1093/infdis/jiu612>.

DUTTON, E.E. *et al.* Peripheral lymph nodes contain migratory and resident innate lymphoid cell populations. **Sci. Immunol.**, v. 4, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aau8082>.

EBBO, M.; CRINIER, A; VÉLY, F; VIVIER, E. Innate lymphoid cells: major players in inflammatory diseases. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 11, p. 665-678, nov. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/nri.2017.86>.

FACHIN, L.R. *et al.* Immunohistochemical assessment of cell populations in leprosy-spectrum lesions and reactional forms. **Histol Histopathol.**, v. 34, n. 4, p. 385-396, 2017. DOI: <http://doi.org/10.14670/HH-11-804>.

FIANCETTE, R. *et al.* Reciprocal Transcription Factor Networks Govern Tissue-Resident ILC3 Subset Function and Identity. **Nature Immunology**, v. 22, n. 10, p. 1245-1255, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41590-021-01024-x>.

FROES JR, Luis Alberto Ribeiro; TRINDADE, Maria Angela Bianconcini; SOTTO, Mirian Nacagami. Immunology of leprosy. **International Reviews of Immunology**, v. 41, n. 2, p. 72-83, 2020. DOI: <http://doi.org/10.1080/08830185.2020.1851370>.

GAHEDI, M.; TAKEI, F. Innate Lymphoid Cell Development. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 147, n. 5, p. 1549-1560, 2021. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.03.009>.

GASTEIGER, G. *et al.* Tissue residency of innate lymphoid cells in lymphoid and nonlymphoid organs. **Science**, v. 350, p. 981-985, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aac9593>.

HALIM, T. Y. *et al.* Group 2 innate lymphoid cells license dendritic cells to potentiate memory TH2 cell responses. **Nature immunology**, v. 17, n.1, p. 57–64, Jan 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/ni.3294>.

JACQUELOT, N.; SEILLET, C.; VIVIER, E.; BELZ, G. T. Innate Lymphoid Cells and Cancer. **Nature Immunology**, v. 23, n. 3, p. 371-379, 2022. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41590-022-01127-z>.

JOHNSON, C. M. *et al.* Cutting edge: a common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. **Journal of Immunology**, v. 178, p.7520–4, 2007. DOI: <http://doi.org/10.4049/jimmunol.178.12.7520>.

KAREN, A. Innate lymphoid cells 3 induce psoriasis in xenotransplanted healthy human skin. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 142, n. 1, p. 305–308, Jul 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.02.015>.

KASHEM, S. W.; HANIFFA, M.; KAPLAN, D. H. Antigen-presenting cells in the skin. **Annual Review of Immunology**, v. 35, p. 469–99, 26 Abr 2017. DOI: <http://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052215>.

KIM, B. S. *et al.* Basophils promote innate lymphoid cell responses in inflamed skin. **Journal of immunology**, v. 193, n. 7, p. 3717–3725, 1 Out 2014. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401307>.

KOBAYASHI, T. *et al.* Homeostatic Control of Sebaceous Glands by Innate Lymphoid Cells Regulates Commensal Bacteria Equilibrium. **Cell**, v. 176, n. 5, p. 982–997, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.031>.

KOBAYASHI, T., RICARDO-GONZALEZ, R. R., & MORO, K. Skin-Resident Innate Lymphoid Cells - Cutaneous Innate Guardians and Regulators. **Trends in immunology**, v. 41, n. 2, p. 100–112, Fev 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.12.004>

KRUTZIK, S. R. *et al.* Activation and regulation of toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. **Nature Medicine**, v. 9, p. 525–32, 2003. DOI: <http://doi.org/10.1038/nm864>.

MASHIKO, S.; MEHTA, H.; BISSONNETTE, R.; SARFATI, M. Increased Frequencies of Basophils, Type 2 Innate Lymphoid Cells and Th2 Cells in Skin of Patients With Atopic Dermatitis but Not Psoriasis. **Journal of Dermatological Science**, v. 88, n. 2, p. 167-174. <http://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.07.003>.

MASSONE, C.; BELACHEW, W.A.; SCHETTINI, A. Histopathology of the lepromatous skin biopsy. **Clinics in Dermatology**, v. 33, p. 38-45, 2015. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2014.10.003>.

MEBIUS, R.E., RENNERT, P., WEISSMAN, I.L. Developing lymph nodes collect CD4+CD3- LTbeta+ cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells. **Immunity**, v. 7, p. 493–504, 1997. DOI: [http://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80371-4](http://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80371-4).

MENDES, A.L.G. *et al.* Expression of NLRP3 inflammasome in leprosy indicates immune evasion of *Mycobacterium leprae*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 115, 2020. <https://doi.org/10.1590/0074-02760190324>.

- MICKAEL, M.E., BHAUMIK, S., BASU, R. Retinoid-Related Orphan Receptor ROR γ t in CD4 T-Cell-Mediated Intestinal Homeostasis and Inflammation. **The American Journal of Pathology**, v. 190, n. 10, p. 1984-1999, 2020. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.07.010>.
- MORITA, H.; MORO, K.; KOYASU, S. Innate lymphoid cells in allergic and nonallergic inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 138, n. 5, p. 1253-1264, nov. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.09.011>.
- NAGAO, K. *et al.* Stress-induced production of chemokines by hair follicles regulates the trafficking of dendritic cells in skin. **Nature immunology**, v. 13, n. 8, p. 744–752, 24 Jun 2012. DOI: <https://doi.org/10.1038/ni.2353>.
- OCHOA, M.T.; ADLER, B.; DACSO, M. **Leprosy: Epidemiology, microbiology, clinical manifestations, and diagnosis**. UpToDate, REYN, C. Fordham von (editor); BARON, Elinor L. (editor). Disponível em: <https://www.uptodate.com>. Acesso em: 30 jan. 2025.
- OETJEN, L. K. *et al.* Sensory Neurons Co-opt Classical Immune Signaling Pathways to Mediate Chronic Itch. **Cell**, v. 171, n. 1, p. 217–228, 21 Set 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.006>.
- OH, S.; HWANG, E. S. The Role of Protein Modifications of T-Bet in Cytokine Production and Differentiation of T Helper Cells. **J Immunol Res**. 589762, 2014. DOI: <http://doi.org/10.1155/2014/589762>.
- O'LEARY, J. G., GOODARZI, M., DRAYTON, D. L., & von ADRIAN, U. H. T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. **Nature immunology**, v. 7, n. 5, p. 507–516, Mai 2006. DOI: <https://doi.org/10.1038/ni1332>.
- PINHEIRO, R. O. *et al.* Innate Immune Responses in Leprosy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 27 Mar 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00518>.
- PLAGE, H. *et al.* GATA3 expression loss is linked to stage progression but is unrelated to prognosis in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. **Human Pathology**, v. 128, p. 1-10, 2022. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.humpath.2022.09.011>.
- PONTILLO, A.; LAURENTINO, W.; CROVELLA, S.; PEREIRA, A. C. NLRP1 haplotypes associated with leprosy in Brazilian patients. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 19, p.274-279, Out 2013. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.06.006>.
- QUARESMA, T. C. Immunohistochemical Characterization of M1, M2, and M4 Macrophages in Leprosy Skin Lesions. **Pathogens**, v. 12, n. 10, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens12101225>.
- RAFEI-SHAMSABADI, D. A.; KLOSE, C. S. N.; HALIM, T. Y. F.; TANRIVER, Y.; JAKOB, T. Context dependent role of type 2 innate lymphoid cells in allergic skin inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 2591, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02591>.

RAK, G.D. *et al.* IL-33-Dependent Group 2 Innate Lymphoid Cells Promote Cutaneous Wound Healing. **The Journal of investigative dermatology**, v. 136, n. 2, p. 487–496, Feb 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/JID.2015.406>.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity: a five-group system. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 34, n. 3, p. 255-273, jul./set. 1966. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5950347/>.

SADHU, S.; MITRA, D. K. Emerging Concepts of Adaptive Immunity in Leprosy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 604, abr. 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00604>.

SAINI, C., RAMESH, V., NATH, I. CD4⁺ Th17 Cells Discriminate Clinical Types and Constitute a Third Subset of Non Th1, Non Th2 T Cells in Human Leprosy. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 7. n. 7, 25 Jul 2013. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002338>.

SALIMI, M. *et al.* A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. **J Exp Med.**, v. 210, n. 13, p. 2939-2950, Dec. 2013. DOI: <http://doi.org/10.1084/jem.20130351>.

SANTOS, M. B. *et al.* Distinct roles of Th17 and Th1 cells in inflammatory responses associated with the presentation of paucibacillary leprosy and leprosy reactions. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 86, n. 1, p. 40-49, 2017. DOI: <http://doi.org/10.1111/sji.12558>.

SCHINNER, J. *et al.* Skin-infiltrating T cells display distinct inflammatory signatures in lichen planus, bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris. **Front Immunol**, v. 14, 19 Jun 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1203776>.

SCHURING, R. P. *et al.* Polymorphism N248S in the human toll-like receptor 1 gene is related to leprosy and leprosy reactions. **Journal of Infectious Diseases**, v. 199, p. 1816–19, 2009. DOI: <http://doi.org/10.1086/599121>.

SCHWARTZ, C. *et al.* Spontaneous atopic dermatitis in mice with a defective skin barrier is independent of ILC2 and mediated by IL-1 β . **Allergy**, v. 74, n. 10, p. 1920-1933, Oct. 2019. DOI: <http://doi.org/10.1111/all.13801>.

SOUZA, C. D. F.; SILVA, S. D. S.; SILVA, R. V. M.; SANTOS, F. G. M.; GONÇALVES, R. A. O.; MARTINS-FILHO, P. R. S. Hanseníase: características clínicas e imunopatológicas. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 97, n. 3, p. 263-277, 2022.

TAKANO, K. *et al.* Expression of Inflammasome-Associated Proteins in Human Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. **Advances in oto-rhino-laryngology**, v. 77, p. 98–104, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1159/000441884>.

TALHARI, C.; TALHARI, S.; PENNA, G. O. Clinical aspects of leprosy. **Clinics in Dermatology**, v. 33, n. 1, p. 26-37, 2015. DOI: <http://doi.org/j.clindermatol.2014.10.005>.

TEUNISSEN, M.B.M. *et al.* Composition of innate lymphoid cell subsets in the human skin: enrichment of NCR(+) ILC3 in lesional skin and blood of psoriasis patients. **The Journal of investigative dermatology**, v. 134, n. 9, p. 2351–2360, Set 2014. DOI: <https://doi.org/10.1038/jid.2014.146>.

TINDEMANS, I.; SERAFINI, N.; DI SANTO, J.P.; HENDRIKS, R.W. GATA-3 Function in Innate and Adaptive Immunity. **Immunity**, v. 41, n. 2, p. 191-206, 2014. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.006>.

VIVIER, E. *et al.* Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. **Cell**, v. 174, n. 5, 2018. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.017>.

VON BUBNOFF, D. *et al.* Indoleamine 2,3 dioxygenase – expressing myeloid dendritic cells and macrophages in infectious and noninfectious cutaneous granulomas. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 65, p. 819–32. 2011. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jaad.2010.07.050>.

YANG, D. *et al.* Mycobacterium leprae-Infected Macrophages Preferentially Primed Regulatory T Cell Responses and Was Associated with Lepromatous Leprosy. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 1, 11 Jan 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004335>.

YASMIN, Hadida; VARGHESE, Praveen Mathews; BHAKTA, Sanjib; KISHORE, Uday. Pathogenesis and host immune response in leprosy. In: KISHORE, Uday (Ed.). **Microbial Pathogenesis: Infection and Immunity**. Cham: Springer, 2021. V. 1313 p. 155-180. DOI: http://doi.org/10.1007/978-3-030-67452-6_8.

WANG, Z. M.; ZHANG, J.; WANG, F.; ZHOU, G. The tipped balance of ILC1/ILC2 in peripheral blood of oral lichen planus is related to inflammatory cytokines. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 725169, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.725169>.

WHO. **Estratégia Global de Hanseníase 2021–2030 “Rumo à zero hanseníase”**. Nova Delhi: Organização Mundial da Saúde, Escritório Regional para o Sudeste Asiático; 2021.

WHO. World Health Organization. **Leprosy: number of new leprosy cases 2023**. 2024. Disponível em: https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leprosy/leprosy.html?. Acesso em: 30 de jan. de 2025.

ZHENG, M., & ZHU, J. Innate lymphoid cells and intestinal inflammatory disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, 23(3), p.1856, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23031856>.

ZHONG, Y.; KINIO, A.; SALEH, M. Functions of NOD-like receptors in human diseases. **Frontiers in Immunology**, 2013. DOI: <http://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00333>.