

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

**Atvaldo Fernandes Ribeiro Júnior**

**ANÁLISE FENOTÍPICA DOS MECANISMOS DE IMUNORREGULAÇÃO  
INDUZIDOS PELAS CÉLULAS T<sub>REGS</sub>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup>FOXP3<sup>+</sup> NA HANSENÍASE**

**Belo Horizonte  
Faculdade de Medicina – UFMG  
2016**

**Atvaldo Fernandes Ribeiro Júnior**

**ANÁLISE FENOTÍPICA DOS MECANISMOS DE IMUNORREGULAÇÃO  
INDUZIDOS PELAS CÉLULAS T<sub>REGS</sub>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup>FOXP3<sup>+</sup> NA HANSENÍASE**

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

**Área de concentração:**

Infectologia e Medicina Tropical

**Orientadora:**

Dra. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau

**Coorientadores:**

Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha.

Dra. Ana Thereza Chaves

**Belo Horizonte**

**Faculdade de Medicina – UFMG**

**2016**

R484a Ribeiro Júnior, Atvaldo Fernandes.  
Análise fenotípica dos mecanismos de imunorregulação induzidos pelas células TREGSCD4+CD25HIGHFOXP3+ na Hanseníase [manuscrito]. / Atvaldo Fernandes Ribeiro Júnior. - - Belo Horizonte: 2016. 128f.: il.

Orientador (a): Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau.  
Coorientador (a): Manoel Otávio da Costa Rocha; Ana Thereza Chaves.  
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Hanseníase. 2. Linfócitos T Reguladores. 3. Imunossupressão. 4. Dissertações Acadêmicas. I. Estanislau, Juliana de Assis Gomes. II. Rocha, Manoel Otávio da Costa. III. Chaves, Ana Thereza. IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. V. Título.

NLM : WC 335

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:  
INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

Reitor: **Prof. Jaime Arturo Ramírez**

Vice-Reitora: **Profa. Sandra Regina Goulart Almeida**

Pró-Reitora de Pós-Graduação: **Profa. Denise Maria Trombert de Oliveira**

Pró-Reitora de Pesquisa: **Profa. Adelina Martha dos Reis**

Diretor da Faculdade de Medicina: **Prof. Tarcizo Afonso Nunes**

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina: **Prof. Humberto José Alves**

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: **Prof. Luiz Armando Cunha de Marco**

Subcoordenador do Centro de Pós-Graduação: **Prof. Edson Samesima Tatsuo**

Chefe do Departamento de Clínica Médica: **Profa. Valéria Maria Augusto**

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical: **Prof. Eduardo Antônio Ferraz Coelho**

Sub-coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical: **Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro**

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

**Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro**

**Profa. Denise Utsch Gonçalves**

**Prof. Eduardo Antônio Ferraz Coelho**

**Profa. Maria do Carmo Pereira Nunes**

**Prof. Unaí Tupinambás**

**Prof. Vandack Alencar Nobre Jr**

**Pollyana Anício Magalhães Gontijo – Representante Discente**

À minha família, por sua capacidade de acreditar e investir em minha formação científica. Mãe e Pai, o cuidado e dedicação que deram, em todos os momentos, foi o que me impulsionou a ter força para suportar, a fé para acreditar, o discernimento para fazer as escolhas certas e a perseverança para seguir.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao final deste trabalho fica evidente o quanto esse momento possui significância ímpar. Por isso, é importante agradecer as pessoas e instituições que, de diferentes formas, contribuíram para o êxito desse trabalho. A todos o meu OBRIGADO!

A Deus, pelo dom da vida, pelas infinitas bênçãos e por me guiar em um caminho onde os momentos e as pessoas são muito especiais.

Ao professor Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha, líder do nosso grupo de pesquisa em hanseníase, agradeço eternamente por acreditar e confiar em meu potencial. Há três anos, mesmo diante de uma pessoa com pouco conhecimento, mas com uma grande vontade em aprender, me acolheu e abriu as portas e possibilidades para minha formação profissional. Cada ensinamento foi de extrema importância. Obrigado por compartilhar conhecimentos que vão além da ciência.

À minha orientadora professora Dra. Juliana de Assis Gomes Silva Estanislau integrante dessa história, por auxiliar na consolidação dos meus conhecimentos e por despertar em mim o prazer de aprender a fazer pesquisa. Obrigado pelo cuidado em minha evolução no conhecimento sobre imunologia e por fazer de um assunto, outrora um tanto inexplorável, ser um caminho prazeroso a ser seguido.

À minha coorientadora Dra. Ana Thereza Chaves pela leveza, incentivo e solidariedade com que conduziu a consolidação desse trabalho. Obrigado pelos momentos de reflexão que me permitiu o exercício da liberdade intelectual e por me proporcionar o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação científica.

Às Instituições de Ensino e Pesquisa – Universidade Federal de Minas Gerais, Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ e ao Programa de Pós-Graduação em Infectologia e Medicina Tropical da UFMG – por proporcionarem meu aprendizado e minha formação acadêmica.

À Dra Sandra Lyon pelo acolhimento e por ter aberto as portas do Ambulatório de Dermatologia do Hospital Eduardo de Menezes. Obrigado por confiar nesse estudo e por compartilhar seu enorme conhecimento e verdadeiro amor á luta pela eliminação e controle da hanseníase. Obrigado pelo profissionalismo, e pelo exemplo de humanidade, sensibilidade e respeito ao próximo.

À Dra. Andréia Teixeira e ao Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira, pelo acolhimento e por terem aberto as portas dos seus respectivos laboratórios para que toda a parte experimental desse trabalho fosse realizada. Sem essa colaboração não seria possível sua realização e finalização.

Aos pacientes portadores da hanseníase, pois sem sua participação voluntária não seria possível a realização desse estudo. Todo o planejamento, reflexões e a luta diária, ao longo desses dois anos, foram por vocês e para vocês.

Aos meus colegas do Grupo de Pesquisa em Hanseníase Karina, Fábio, Maria Júlia, Edilamar e Ana Laura, pelos dias e dias de ajuda, pela amizade, parceria, pelo trabalho em equipe e por tudo que vivemos nestes últimos anos. Sem vocês este trabalho seria mais árduo e difícil.

Aos meus amigos do laboratório de Biologia das Interações Celulares, por tudo que vivemos juntos. Obrigado por me receberem tão bem, pelos momentos de reflexão e descontração, por estarem ao meu lado desde o meu primeiro treinamento diante da bancada e de um experimento imunológico. Vocês são muito especiais para mim!

À toda a equipe do Hospital Eduardo de Menezes, em especial à equipe de enfermagem e médicas residentes, que muito contribuíram para a consolidação desse trabalho.

À equipe da plataforma de Citometria de Fluxo do René Rachou/FIOCRUZ, em especial, a Ana Beatriz Ribeiro de Queiroz (Tiza), pela disponibilidade e presteza na leitura dos meus experimentos.

À minha família pelo apoio incondicional, mesmo sem ter o conhecimento aprofundado do que eu estava fazendo e mesmo separada por quilômetros de distância, sempre esteve ao meu lado incentivando-me para que este trabalho fosse realizado e finalizado.

Aos amigos, pela participação, interesse, inspiração, torcida e apoio. Diariamente ou eventualmente, pessoalmente ou por meio virtual, vocês tornaram o caminho menos árduo e mais prazeroso.

Aos órgãos de financiamento, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) - CBB- APQ-02332-13 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – nº: 485891/2013-1 pelo financiamento do projeto.



*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”*

*(Madre Tereza de Calcutá)*

## RESUMO

A hanseníase, causada pela bactéria não cultivável *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), possui manifestações clínicas variadas, que estão associadas com as respostas imunes do hospedeiro. A dicotomia entre as funções de células T e anticorpos são discutidas com base nas informações atuais sobre citocinas, subconjuntos de células T e células T reguladoras. As células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> (T<sub>REGS</sub>) apresentam capacidade para controlar a resposta imune pela supressão de células apresentadoras de antígenos e de células T efectoras. Alguns mecanismos induzidos por essas células foram propostos na infecção pela hanseníase. Entretanto, a importância dos mecanismos de imunorregulação das células T<sub>REGS</sub> ainda não foi completamente estabelecido nessa doença. No presente estudo objetou-se avaliar a expressão de marcadores de imunorregulação induzidos por células T<sub>REGS</sub>, presentes no sangue de pacientes nas formas clínicas polares da hanseníase, contatos domiciliares e indivíduos não infectados. Trata-se de estudo transversal, analítico, com abordagem quantitativa. Os sujeitos do estudo foram casos novos de hanseníase diagnosticados no Ambulatório de Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes, contatos domiciliares e indivíduos não infectados como grupo controle. Todos os pacientes foram estudados antes do tratamento e foram agrupados de acordo com a classificação de Ridley e Jopling. A quantificação de células T<sub>REGS</sub> e ensaios de imunofenotipagem foram realizados em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com as formas polares da hanseníase, contatos domiciliares e controles. Análises da quantificação de células T<sub>REGS</sub> e dos ensaios de imunofenotipagem foram realizados por meio da citometria de fluxo e do *software FlowJo*. Os testes estatísticos ANOVA, teste de normalidade de Shapiro-Wilk e os testes de Kruskal-Wallis, Mann-Whitney e correlação de Spearman foram realizados nesse estudo e analisados no *software SPSS* versão 18.1 e no programa Cytoscape™, respectivamente. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais e o termo de consentimento foi obtido de todos os participantes. Treze casos novos de hanseníase, 14 contatos domiciliares e 15 controles participaram desse estudo. A maioria dos pacientes foi agrupa na forma clínica polar VV (4 mulheres e 4 homens; idade média = 52 anos) ou como contatos domiciliares de pacientes com a forma clínica polar VV (5 mulheres e 5 homens; idade média = 25 anos). A frequência de células T<sub>REGS</sub> foi maior na forma clínica polar VV. Na análise dos mecanismos de imunorregulação induzidos pelas células T<sub>REGS</sub> observou-se que, na forma clínica polar TT, a supressão de células T efectoras pode estar relacionada com a ação dos mecanismos de citocinas inibitórias (IL-10), de anergia de APCs (CTLA-4) e de interrupção de via metabólica (CD39-CD73). A autoapoptose de células T<sub>REGS</sub>, presente nessa forma clínica polar, pode estar relacionada com o controle da resposta imune exacerbada. Entretanto, na forma clínica polar VV, a ação do mecanismo de indução de apoptose pela via CD95L e PD-1, associada com a maior frequência de células T<sub>REGS</sub> nessa forma clínica polar, pode estar relacionada com a indução de apoptose de células efectoras, contribuindo, deste modo, para a viabilidade do bacilo e persistência da doença.

**Palavras-chave:** Hanseníase; Células T reguladoras; Imunossupressão

## ABSTRACT

Leprosy, caused by the non-culturable bacteria, *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), has several clinical manifestations, which are associated with the host's immune responses. Dichotomy among the functions of T cells and antibodies is discussed based on current information on cytokines, subsets of T cells and regulatory T cells. Regulatory T cells CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> (TREGS) have been shown to be able to control the immune response by suppressing antigen-presenting cells and effector T cells. Some mechanisms induced by these cells have been proposed in leprosy infections. Nevertheless, the importance of immunoregulatory mechanisms of regulatory T cells still has not been completely established for this disease. The objective of the present study is to evaluate the expression of immunosuppression markers induced by regulatory T cells, present in the blood of patients with polar clinical forms of leprosy, household contacts and uninfected individuals. It is a cross-sectional analytical study with a quantitative approach. Individuals in the study were new cases of leprosy diagnosed at the Sanitary Dermatology Outpatient Service of "Hospital Eduardo de Menezes", household contacts and uninfected individuals as control group. All patients were studied before treatment and were grouped according to Ridley and Jopling classification. Regulatory T cells have been quantified and immunophenotyping assays have been carried out in peripheral blood mononuclear cells with polar forms of leprosy, household contacts and controls. Quantification analyses of Regulatory T cells, immunophenotyping assays were performed by means of flow cytometry and of FlowJo software. Statistical tests such as ANOVA, Shapiro-Wilk normality test and Kruskal-Wallis, Mann-Whitney tests and Spearman correlation test were carried out in this study and analyzed using the SPSS software version 18.1 and the Cytoscape™ program, respectively. The study was approved by the Committee of Ethics in Research of "Universidade Federal de Minas Gerais" and the consent term was obtained from all participants. Thirteen new cases of leprosy, 14 household contacts and 15 controls took part in this study. Most patients were grouped in the LL (Lepromatous leprosy) polar clinical form (4 females and 4 males, average age = 52 years) or in household contacts with the clinical form (5 females and 5 males; mean age = 25 years). Regulatory T cells were more frequent in the LL polar clinical form. In the analysis of the Regulatory T cells induced immunoregulation mechanisms, the suppression of effective T cells would be related to inhibiting mechanisms of cytokine (IL-10), to anergy induced by antigen-presenting cells (CTLA-4) and to the metabolic pathway interruption (CD39-CD73). Self-apoptosis of regulatory T cells, present in the polar clinical form, would be related to the control of an exacerbated immune response. Nevertheless, in the LL polar clinical form, the action of the apoptosis induction mechanism via CD95L and PD-1, associated with a higher frequency of regulatory T cells in this polar clinical form, would be related to apoptosis induction of effector cells, thus contributing to the viability of the bacillus and the persistence of the disease.

**Key-words:** Leprosy; Regulatory T cells; Immunosuppression

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1 -</b>	Modelo esquemático do envelope celular do <i>M. leprae</i> .....	28
<b>Figura 2 -</b>	Classificação clínica e imunológica da hanseníase.....	32
<b>Figura 3 -</b>	Mecanismo de imunorregulação de células T <sub>REGS</sub> por meio da ação de citocinas inibitórias.....	41
<b>Figura 4 -</b>	Mecanismo de imunorregulação de células T <sub>REGS</sub> por modulação da função de células efetoras e DCs pelas moléculas CTLA-4 e LAG3.....	42
<b>Figura 5 -</b>	Mecanismo de imunorregulação de células T <sub>REGS</sub> pela ação da molécula LAP.....	43
<b>Figura 6 -</b>	Mecanismo de imunorregulação de células T <sub>REGS</sub> por interrupção de via metabólica.....	44
<b>Figura 7 -</b>	Mecanismo de imunorregulação de células T <sub>REGS</sub> por citólise.....	45
<b>Figura 8 -</b>	Mecanismo de imunorregulação de células T <sub>REGS</sub> por indução de apoptose via CD95 e CD95L.....	46
<b>Figura 9 -</b>	Mecanismo de imunorregulação de células T <sub>REGS</sub> por indução de apoptose via PD-1 e PD-1L.....	47
<b>Quadro 1 -</b>	Caracterização, classificação e modo de resposta das variáveis clínicas dos pacientes com hanseníase.....	52
<b>Quadro 2 -</b>	Relação e caracterização dos anticorpos utilizados para a imunofenotipagem <i>ex vivo</i> de células T <sub>REGS</sub> .....	54
<b>Figura 10 -</b>	Estratégia de análise de células T <sub>REGS</sub> , no contexto <i>ex vivo</i> .....	56
<b>Figura 11 -</b>	Análise do percentual de células T <sub>REGS</sub> .....	60
<b>Figura 12 -</b>	Análise da expressão da citocina IL-10 em células T <sub>REGS</sub> .....	61
<b>Figura 13 -</b>	Análise da expressão da citocina TGF- $\beta$ 1 e sua forma latente (LAP) em células T <sub>REGS</sub> .....	62
<b>Figura 14 -</b>	Análise da expressão da molécula CTLA-4 em células T <sub>REGS</sub> .....	63

<b>Figura 15 -</b>	Análise da expressão das moléculas CD39 e CD73 em células T <sub>REGS</sub> ...	64
<b>Figura 16 -</b>	Análise da expressão dos fatores intracitoplasmáticos granzima A, granzima B e perforina em células T <sub>REGS</sub> .....	65
<b>Figura 17 -</b>	Análise da expressão das moléculas PD-1 e PD-1L em células T <sub>REGS</sub> .....	67
<b>Figura 18 -</b>	Análise da expressão das moléculas CD95 e CD95L em células T <sub>REGS</sub> .....	68
<b>Figura 19 -</b>	Rede de correlações entre as moléculas CD39, CD73, CTLA-4 e a citocina IL-10 em células T <sub>REGS</sub> .....	70
<b>Figura 20 -</b>	Rede de correlações entre as moléculas CD95, CD95L, PD-1, PD-1L em células T <sub>REGS</sub> .....	71

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Distribuição dos participantes do estudo, segundo a classificação de Ridley e Jopling (1966), HEM, Belo Horizonte, MG, 2016.....	58
<b>Tabela 2</b> - Análise descritiva da população estudada, HEM, Belo Horizonte, MG, 2016.....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>A<sub>2A</sub></b>	Receptor de adenosina
<b>ADP</b>	Difosfato de adenosina
<b>Akt</b>	Proteína quinase B
<b>AMP</b>	Monofosfato de adenosina
<b>AP1</b>	Fator de transcrição de proteína 1
<b>APC</b>	Aloficocianina
<b>APCCy7</b>	Aloficocianina-cianina 7
<b>APCs</b>	Células apresentadoras de antígenos
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>BCL-XL</b>	Proteína anti-apoptótica da família de Bcl2
<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina
<b>CCL</b>	Ligantes de quimiocina
<b>CCL1</b>	Ligante de quimiocina do tipo 1
<b>CCL17</b>	Ligante de quimiocina do tipo 17
<b>CCL5</b>	Ligante de quimiocina do tipo 5
<b>CCR</b>	Receptores de quimiocina
<b>CCR4</b>	Receptor de quimiocina do tipo 4
<b>CCR5</b>	Receptor de quimiocina do tipo 5
<b>CCR6</b>	Receptor de quimiocina do tipo 6
<b>CCR8</b>	Receptor de quimiocina do tipo 8
<b>CD</b>	Grupos de diferenciação
<b>CD1</b>	Marcador celular associado à apresentação de antígenos
<b>CD103</b>	Subunidade $\alpha_E$ da integrina
<b>CD25</b>	Cadeia $\alpha$ do receptor da citocina IL2
<b>CD28</b>	Receptor da célula T para a molécula co-estimulatória CD80/86
<b>CD3</b>	Marcador de superfície celular de células T
<b>CD39</b>	Ectoenzima responsável por degradar ATP
<b>CD4</b>	Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T
<b>CD40</b>	Proteína que fornece sinal co-estimulatório
<b>CD45RO</b>	Marcador de superfície de linfócitos de memória

<b>CD62L</b>	Molécula L-selectina de ativação e adesão de leucócitos
<b>CD73</b>	Ectoenzima responsável por degradar AMP
<b>CD8</b>	Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T
<b>CD80</b>	Proteína que fornece sinal co-estimulatório
<b>CD83</b>	Proteína marcadora de maturação de células dendríticas
<b>CD86</b>	Proteína que fornece sinal co-estimulatório
<b>CD95</b>	Receptor de morte celular
<b>CD95L</b>	Ligante do receptor de morte celular CD95
<b>COEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>CONT</b>	Indivíduos contatos
<b>CPqRR</b>	Centro de Pesquisas René Rachou
<b>CR</b>	Receptor da via de complemento
<b>CREB</b>	Fator de transcrição celular
<b>CTLA4</b>	Molécula de superfície inibidora da ativação celular
<b>DCs</b>	Células dendríticas
<b>DD</b>	Forma clínica dimorfa-dimorfa
<b>DISC</b>	Complexo de sinalização intracelular indutor de apoptose
<b>DIPSTICK</b>	Teste de fita simples
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>DT</b>	Forma clínica dimorfa-tuberculóide
<b>DV</b>	Forma clínica dimorfa-virchowiana
<b>ELISA</b>	Ensaio de imunoabsorbância ligado à enzima
<b>FAAD</b>	Molécula que liga o CD95 a outros receptores de apoptose
<b>FIOCRUZ</b>	Fundação Oswaldo Cruz
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>FL</b>	Fluorescência
<b>FOXP3</b>	Fator de transcrição da proteína P3 <i>forkhead box</i>
<b>FSC</b>	Tamanho relativo da célula
<b>GATA-3</b>	Fator de transcrição para a via Th2
<b>GITR</b>	Receptor induzido por glicocorticóide
<b>GITRL</b>	Ligante do receptor GITR
<b>GPAT</b>	Teste de aglutinação com partícula de gelatina
<b>HANS</b>	Indivíduos com hanseníase



<b>HEM</b>	Hospital Eduardo de Menezes
<b>IB</b>	Índice baciloscópico
<b>IDO</b>	Indolamina 2,3-deoxigenase
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IL10</b>	Interleucina 10
<b>IL-12</b>	Interleucina 12
<b>IL-15</b>	Interleucina 15
<b>IL-17</b>	Interleucina 17
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 beta
<b>IL-2</b>	Interleucina 2
<b>IL-21</b>	Interleucina 21
<b>IL-22</b>	Interleucina 22
<b>IL-23</b>	Interleucina 23
<b>IL-2R</b>	Receptor da interleucina 2
<b>IL-35</b>	Interleucina 35
<b>IL-4</b>	Interleucina 4
<b>IL-5</b>	Interleucina 5
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-7</b>	Interleucina 7
<b>IMF</b>	Intensidade média de fluorescência
<b>LAG3</b>	Proteína que regula negativamente a proliferação de células T
<b>LAM</b>	Lipoarabinomannan
<b>LAP</b>	Forma latente de TGF- $\beta$
<b>LM</b>	Lipomannan
<b>MB</b>	Multibacilar
<b>MFF</b>	Solução fixadora para citometria
<b>MHC</b>	Complexo principal de histocompatibilidade
<b>MIP</b>	Proteína inflamatória de macrófagos
<b>mL</b>	Mililitro
<b>NAFT</b>	Fator nuclear de ativação de células T
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Fator nuclear capa beta
<b>NI</b>	Indivíduos não infectados

<b>NK</b>	Natural <i>killer</i>
<b>NOD</b>	Receptores de reconhecimento de padrões do tipo NOD
<b>OMS/WHO</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PAMPs</b>	Padrões moleculares associados aos patógenos
<b>PB</b>	Paucibacilar
<b>PBS</b>	Solução tampão salina fosfatada
<b>PBS-P</b>	Solução tampão salina fosfatada a 0,5% de saponina
<b>PBS-W</b>	Solução tampão salina fosfatada a 0,5% de albumina sérica bovina
<b>PCR</b>	Proteína C reativa
<b>PD-1</b>	Receptor de morte celular programada 1
<b>PD-1L</b>	Ligante 1 do receptor de morte celular programada
<b>PDIM</b>	Ftiocerol dimicocerosato
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>PECy7</b>	Ficoeritrina cianina 7
<b>PGL-1</b>	Glicolípido fenólico 1
<b>PHA</b>	Teste de hemaglutinação passiva
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3 quinase
<b>PL</b>	Fosfolípidos
<b>PMI</b>	Manosídeo fosfatidilinositol
<b>PQT</b>	Poliquimioterapia
<b>PRRs</b>	Receptores de reconhecimento de padrões
<b>ROR<math>\gamma</math></b>	Fator de transcrição membro da família NR1
<b>SHP</b>	Proteína tirosina fosfatase do tipo 1
<b>SHP-2</b>	Proteína tirosina fosfatase do tipo 2
<b>SMAD3</b>	Proteína mediadora de sinais do TGF- $\beta$
<b>SPSS</b>	Pacote estatístico para as ciências sociais
<b>SSC</b>	Granulosidade ou complexidade interna da célula
<b>STAT5</b>	Proteína envolvida em sinalizações e expressão de genes
<b>T-bet</b>	Fator de transcrição para a via Th1
<b>TCLE</b>	Termo de consentimento livre e esclarecido
<b>TCR</b>	Receptor de células T
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de crescimento tumoral beta
<b>Th1</b>	Células T auxiliares 1

<b>Th17</b>	Células T auxiliares 17
<b>Th2</b>	Células T auxiliares 2
<b>Th3</b>	Célula T auxiliares 3
<b>TLRs</b>	Receptores de reconhecimento de padrões do tipo Toll
<b>TMM</b>	Monomicolato trealose
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>Tr1</b>	Célula T reguladora 1
<b>T<sub>REGS</sub></b>	Células T reguladoras
<b>TT</b>	Forma clínica tuberculóide
<b>UFMG</b>	Universidade Federal de Minas Gerais
<b>VV</b>	Forma clínica virchowiana
<b>ZAP-70</b>	Proteína quinase expressa por células linfócitos T e células NK
<b><math>\mu</math>l</b>	Microlitro

## SUMÁRIO<sup>1</sup>

<b>1</b>	<b>CONSIDERAÇÕES INICIAIS</b> .....	21
<b>2</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	26
3.1	A hanseníase.....	26
3.1.1	O agente etiológico.....	27
3.1.2	Fatores de infecção e transmissão.....	29
3.1.3	Situação epidemiológica da hanseníase.....	30
3.1.4	Classificação e manifestações clínicas.....	31
3.1.5	Métodos de diagnóstico.....	32
3.1.6	Tratamento.....	34
3.2	Imunologia da hanseníase.....	35
3.2.1	Imunologia inata.....	35
3.2.2	Imunologia adaptativa.....	36
3.3	Imunorregulação na hanseníase e células T reguladoras.....	38
3.3.1	Mecanismos de imunorregulação induzidos pelas células T <sub>REGS</sub> .....	40
3.3.1.1	Imunorregulação por citocinas inibitórias.....	40
3.3.1.2	Imunorregulação por modulação da função de APCs e células efectoras.....	42
3.3.1.3	Imunorregulação por interrupção de via metabólica.....	43
3.3.1.4	Imunorregulação por citólise.....	45
3.3.1.5	Imunorregulação por indução de apoptose.....	46
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	49
4.1	Objetivo geral.....	49
4.2	Objetivos específicos.....	49
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	50
5.1	Delineamento do estudo.....	50
5.2	Cenário do estudo.....	50
5.3	Caracterização da população do estudo.....	50
5.3.1	Cálculo amostral.....	51
5.3.2	Crítérios de inclusão.....	52
5.3.3	Crítérios de exclusão.....	52
5.4	Instrumento e coleta dos dados.....	52
5.5	Organização e análise dos dados.....	53

---

<sup>1</sup>FRANÇA, J.L.; VASCONCELOS, A.C. *Manual para normalização de publicações técnico-científicas*. 9. ed. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2013. 263p. Esse manual baseia-se nas normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas, seguindo as atualizações publicadas em 2011 e 2012 pelas NBR 6024, NBR 10719, NBR 14724 e NBR 15287, sendo utilizado para formatar o presente trabalho.

5.5.1	Análise de marcadores de imunorregulação induzidos por T <sub>REGS</sub> .....	53
5.5.2	Obtenção e estratégia de análise dos dados.....	55
5.6	Análise estatística.....	55
5.7	Aspectos éticos.....	57
5.8	Pesquisa bibliográfica.....	57
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>58</b>
6.1	Análise descritiva da população estudada.....	58
6.2	Análise do percentual das células T <sub>REGS</sub> , no contexto <i>ex vivo</i> .....	60
6.3	Análise fenotípica das células T <sub>REGS</sub> através da caracterização de marcadores indutores de imunorregulação.....	61
6.3.1	Caracterização das células T <sub>REGS</sub> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> FOXP3 <sup>+</sup> quanto à expressão de citocinas inibitórias.....	61
6.3.2	Caracterização das células T <sub>REGS</sub> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> FOXP3 <sup>+</sup> quanto à expressão da molécula (CTLA-4) indutora de modulação da função de APCs e células efectoras.....	63
6.3.3	Caracterização das células T <sub>REGS</sub> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> FOXP3 <sup>+</sup> quanto à expressão de moléculas indutoras de interrupção de via metabólica...	64
6.3.4	Caracterização das células T <sub>REGS</sub> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> FOXP3 <sup>+</sup> quanto à expressão de moléculas indutoras de citólise.....	65
6.3.5	Caracterização das células T <sub>REGS</sub> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> FOXP3 <sup>+</sup> quanto à expressão de moléculas indutoras de apoptose.....	66
6.4	Análise das correlações entre marcadores de imunossupressão induzidos por células T <sub>REGS</sub> , no contexto <i>ex vivo</i> .....	69
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>72</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>80</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>81</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>93</b>

## 1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O projeto “Análise fenotípica dos mecanismos de imunorregulação induzidos pelas células T<sub>REGS</sub>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> na hanseníase” foi desenvolvido na linha de pesquisa "Epidemiologia e Controle das Doenças Infecciosas e Parasitárias", e está inserido no grupo de pesquisa "Hanseníase", no qual se desenvolvem diversos trabalhos paralelos e complementares a este.

Os pacientes incluídos no estudo foram atendidos no Hospital Eduardo de Menezes, onde foi realizado o diagnóstico e a classificação clínica, sendo realizada, posteriormente, a classificação histopatológica pelo Dr. Marcelo Antônio Paschoal Xavier, do Departamento de Patologia, Laboratório de Patologia Molecular, Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Durante o desenvolvimento do estudo, o discente Atvaldo Fernandes Ribeiro Júnior participou de todas as etapas, bem como da orientação e seleção dos pacientes, acompanhamento da coleta da amostra (sangue periférico), realização do teste de ML-Flow, processamento da amostra, realização do protocolo de imunofenotipagem e análise dos resultados da citometria de fluxo e *FlowJo*. Os experimentos imunológicos foram desenvolvidos no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular e no Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR), unidade da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) de Minas Gerais. A leitura dos experimentos foi realizada na plataforma de citometria de fluxo do CPqRR.

A presente dissertação teve como objetivo apresentar os resultados obtidos durante o mestrado, tendo sido avaliada a expressão de marcadores de imunorregulação de células T<sub>REGS</sub>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> nas formas polares da hanseníase, contatos domiciliares e indivíduos não infectados. Para tanto, avaliou-se a expressão das moléculas CD39, CD73, CTLA-4, CD95, CD95L, PD-1, PD-1L, LAP; dos fatores intracelulares granzima A, granzima B, perforina, FOXP3; e das citocinas intracitoplasmáticas IL-10 e TGF- $\beta$ . A dissertação foi estruturada em nove partes principais: I) Considerações iniciais; II) Introdução; III) Revisão da literatura; IV) Objetivos; V) Métodos; VI) Resultados, VII) Discussão; VIII) Conclusão IX) Anexos, contendo o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e o parecer do Comitê de Ética e Pesquisa (COEP) da UFMG.

## 2 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença crônica, granulomatosa, causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), um bacilo intracelular obrigatório, que tem tropismo pelos macrófagos da pele e células de Schwann dos nervos periféricos (SHEPARD, 1962; SCOLLARD *et al.*, 2006).

A doença tem alto potencial de causar incapacidades físicas irreversíveis, decorrentes, principalmente, da resposta inflamatória crônica e granulomatosa (MIRANDA *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2013). As incapacidades físicas podem limitar as atividades que envolvem o uso de olhos, mãos e pés, além de restrições na participação social (VAN BRAKEL *et al.*, 2012).

A transmissão da doença associa-se a fatores individuais e sócio-econômicos. O convívio de pessoas susceptíveis com doentes sem tratamento e com alta carga bacilar propicia a transmissão do bacilo. Assim, os contatos domiciliares e sociais são considerados um importante meio de manutenção da endemia (DESSUNTI *et al.*, 2008).

Contato domiciliar é toda pessoa que resida ou tenha residido com o doente de hanseníase, em especial os contatos familiares (pais, irmãos, avós, tios), recentes ou antigos, já que estes indivíduos devem ser examinados, independentemente do tempo de convívio com o caso índice. O contato social é toda pessoa que conviva ou tenha convivido em relações familiares ou não (vizinhos, colegas de trabalho), de forma próxima e prolongada com o caso índice. Deve-se, portanto, avaliar anualmente, durante cinco anos, todos os tipos de contatos não doentes e, se após esse período não houver sinais sugestivos da doença, os contatos devem ser liberados da vigilância, mas serem esclarecidos sobre a possibilidade de aparecimento, no futuro, dos sintomas da doença (BRASIL, 2016).

Ao longo dos anos, as taxas de detecção e de prevalência da hanseníase vêm apresentando redução, devido às ações de controle e eliminação da doença, tais como a introdução da poliquimioterapia (PQT), prevenção de incapacidades, exame de contatos e descentralização do diagnóstico, tratamento e acompanhamento dos casos. Entretanto, a doença ainda é considerada um problema de saúde pública, já que, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2013, a taxa de detecção foi alta no mundo e no Brasil (WHO, 2015).

São vários os fatores que determinam o aparecimento de uma doença infecciosa, entre eles, aqueles próprios do hospedeiro, como genéticos e imunológicos, os intrínsecos ao agente causal e os ambientais (GELUK; OTTENHOF, 2006; REA; MODLIN, 2010). É fato amplamente conhecido que a baixa virulência do *M. leprae*, combinada a uma resposta imune efetiva, está associada à resistência para o desenvolvimento da hanseníase. Esta se manifesta em diferentes formas clínicas, que são determinadas pelo delineamento da resposta imune do indivíduo infectado (ALTER *et al.*, 2011).

O quadro clínico é polimorfo, tendo dado origem a diversas classificações clínicas. Diante disso, vários estudos buscam compreender os mecanismos envolvidos no controle e desenvolvimento das formas graves da doença, com intuito de encontrar marcadores de morbidade, prognóstico e resposta terapêutica. Esses marcadores auxiliariam na estratificação de risco, diagnóstico precoce e acompanhamento daqueles pacientes que demandem tratamento diferenciado.

Na hanseníase, a resposta imune contra o *M. leprae* inicia-se com a imunidade inata, pelo reconhecimento de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) presentes em macrófagos e células dendríticas (DCs) (MEDZHITOV; PRESTON-HURLBURT; JANEWAY, 1997). Essas células, uma vez ativadas, e na dependência do microambiente, podem produzir citocinas pró ou anti-inflamatórias (MOSSER; EDWARDS, 2008), as quais são fatores potenciais na condução da resposta imune adaptativa (MONTROYA *et al.*, 2009), já que podem influenciar na diferenciação de linfócitos do tipo Th1, produtores de citocinas pró-inflamatórias, ou em linfócitos do tipo Th2, produtores de citocinas anti-inflamatórias (BRADLEY, 2003).

Os linfócitos TCD4<sup>+</sup> podem, ainda, diferenciar-se em células com fenótipo imunorregulador e apresentar a capacidade de produzir citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF-β. Diversas células possuem propriedades reguladoras, como as células T<sub>R1</sub>, produtoras de IL-10; as células Th3, produtoras de TGF-β; linfócitos T CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> (CD8<sup>+</sup> T<sub>R</sub>); células NK/T; células T γδ; linfócitos T duplo-negativos (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>); linfócitos T CD8<sup>+</sup>Qa1; e células B CD1<sup>+</sup>, produtoras de IL-10 (STTROBER *et al.*, 1989; JIANG; CHESS, 2004).



Nos estudos imunológicos tem-se destaca as células T reguladoras de origem natural ( $T_{REGS}CD4^+CD25^{high}FOXP^+$ ). Essas células são uma subpopulação de linfócitos  $TCD4^+$  que expressam altos níveis da molécula CD25 (SAKAGUCHI *et al.*, 1995; MILLS, 2004), além do fator de transcrição FOXP3, o qual está associado com o seu desenvolvimento (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003; KHATTRI *et al.*, 2003). As células  $T_{REGS}$  podem suprimir a ativação, a proliferação e/ou a função efetora dos linfócitos  $TCD4^+$ ,  $TCD8^+$  e, possivelmente, células NK, NK/T, linfócitos B, macrófagos e DCs (CRUVINEL *et al.*, 2008; MESQUITA JUNIOR *et al.*, 2010).

Tem-se observado que as células  $T_{REGS}$  podem controlar a exacerbação da inflamação e o dano tecidual mas, também, auxiliar na persistência do patógeno (MILLS, 2004). O equilíbrio entre mecanismos efetores e reguladores pode determinar o progresso da infecção e, em alguns casos, ser benéfico para o parasito e para o hospedeiro (MENDEZ *et al.*, 2004).

Alguns autores acreditam que as células  $T_{REGS}$ , além da produção de citocinas anti-inflamatórias, necessitam da sinalização de receptores de células T (TCR) e contato entre células para exercer seu papel imunorregulador (DIECKMANN *et al.*, 2002). Outros, que a sinalização via TCR e bloqueio da IL-2 podem impedir a ativação de células efetoras e induzir a apoptose de células-alvo (THORNTON *et al.*, 2004; PANDIYAN *et al.*, 2007). Outros, ainda, sugerem que há regulação negativa da expressão de moléculas coestimulatórias em DCs (PAUST; CANTOR, 2005).

A resposta imune contra o *M. leprae* constitui um espectro que se expressa em diferentes formas clínicas. Com a resposta imune competente, o indivíduo evolui para a forma localizada e não contagiosa da doença; se esta competência não é efetiva, desenvolve-se a forma difusa e contagiosa (PINHEIRO *et al.*, 2011). Entretanto, não se sabe ainda como indivíduos desenvolvem formas graves da doença e nem como se dá a heterogeneidade das formas clínicas.

Estudos afirmam que a atividade imunossupressora mediada por células  $T_{REGS}$  apresenta uma nova dimensão na identificação dos mecanismos de regulação celular. Estudos *in vitro* utilizando células  $T_{REGS}$  de camundongos e humanos favorecem a hipótese de que os principais mecanismos pelo qual essas células exercem supressão dependem do contato celular e/ou produção de citocinas (WORKMAN *et al.*, 2009; SHEVACH, 2009; JOSEFOWICZ; LU; RUDENSKY, 2012). Outros trabalhos demonstram que a apoptose via granzima e perforina seria um possível mecanismo supressor (GONDEK *et al.*, 2005). Outros, ainda, acreditam

que a associação entre células T<sub>REGS</sub> e a apoptose seja importante para a indução de mecanismos que controlam a resposta fisiopatológica em diferentes doenças, sendo que ambos os fatores interferem no controle da resposta imune e de mecanismos que regulam a homeostase celular (QUARESMA *et al.*, 2014).

Em se tratando da frequência de células T<sub>REGS</sub> nas formas clínicas da hanseníase, observa-se que os estudos apresentam dados divergentes, sendo que alguns encontraram maior frequência dessas células em pacientes com forma clínica virchowiana (VV) (PALERMO *et al.*, 2012; FERNANDES *et al.*, 2013; KUMAR *et al.*, 2013; KUMAR *et al.*, 2014; SAINI; RAMESH; NATH, 2014; SADHU *et al.*, 2016), enquanto outros encontraram maior frequência em pacientes com a forma clínica tuberculóide (TT) (ATTIA *et al.*, 2010; ATTIA *et al.*, 2014; ABDALLAH *et al.*, 2014).

A despeito desses estudos, o papel das células T<sub>REGS</sub> na hanseníase ainda não foi completamente estabelecido. Atualmente, o que se acredita é que as células T<sub>REGS</sub>, para exercer seu papel imunorregulador, atuam em uma complexa rede de mecanismos regulatórios destinados a assegurar a modulação das respostas imunológicas diante dos diversos (CRUVINEL *et al.*, 2008). Assim, as investigações sobre a participação da resposta imune na hanseníase é importante para preencher lacunas do conhecimento sobre a ativação de mediadores que interferem na sobrevivência do bacilo (QUARESMA *et al.*, 2014).

Nesse sentido, este estudo buscou caracterizar os mecanismos de imunorregulação utilizados pelas células T<sub>REGS</sub> em pacientes nas formas polares da hanseníase, contatos domiciliares e indivíduos não infectados. Baseando-se nas informações mencionadas acima, este estudo tem como hipótese de que a caracterização fenotípica das células T<sub>REGS</sub> e seus mecanismos de imunorregulação diferenciam-se nas formas polares da hanseníase, sendo que as células T<sub>REGS</sub> de pacientes com a forma clínica TT apresentariam capacidade de regular a resposta imune induzida pelo bacilo, enquanto que os pacientes com a forma clínica VV apresentariam elevado percentual de células T<sub>REGS</sub>, o que poderia estar associado com a regulação de células efetoras e contribuir para a viabilidade do bacilo nas células infectadas e persistência da doença.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 A hanseníase

A hanseníase é uma doença que atinge principalmente a pele e nervos periféricos. O *M. leprae* possui tropismo por macrófagos e pelas células de Schwann, o que explica a patogênese do dano neural e as incapacidades físicas permanentes associadas à hanseníase (RIDLEY; JOPLING, 1966).

A complexidade desse agravo não só é avaliada pelo número de doentes existentes, o potencial de infectividade, os problemas psicossociais e o longo período de tratamento, mas também, pelo comprometimento dos nervos periféricos. Característica essa, principal da doença, o que lhe confere elevado risco para o desenvolvimento de incapacidades e deformidades físicas (MEIMA; RICHARDUS; HABBEMA, 2004; BRASIL, 2006).

Por ser uma doença complexa e de manifestações polimorfas é necessário que o diagnóstico, a classificação e a terapêutica sejam adequados, por parte dos profissionais de saúde, já que a hanseníase ainda é alvo de preconceito e estigma, provenientes da falta de informação por parte da população a seu respeito (TALHARI *et al.*, 2006; BORESTEIN *et al.*, 2008).

A fim de eliminar a doença, a OMS estabeleceu a meta de prevalência de menos de um caso por 10.000 mil habitantes e incentivou os países endêmicos a alcançá-la. A proposta para o ano de 2000, postergada para 2005 e após para 2010, não foi alcançada (BRASIL, 2016).

Diante dessa dificuldade em atingir as metas de controle da doença, a OMS lançou a “Estratégia Global Aprimorada para Redução Adicional da Carga da Hanseníase: 2011-2015”, que visa reduzir o número de casos novos da hanseníase e viabilizar a prestação de serviços de alta qualidade para todas as comunidades afetadas pela doença (WHO, 2010).

O alcance das metas propostas para eliminação da hanseníase depende da melhoria dos resultados de indicadores pactuados nas instâncias gestoras da saúde, quais seja a cura de todos os casos diagnosticados precocemente, vigilância de contatos, avaliação e monitoramento das incapacidades físicas, diagnóstico e terapêutica adequados (BRASIL, 2016).

### 3.1.1 O agente etiológico

O *M. leprae* é um bacilo gram-positivo, álcool ácido resistente, não cultivável e parasito intracelular obrigatório que infecta, preferencialmente, macrófagos e células de Schwann (HARBOE, 1994; REA; MODLIN, 2010).

O tempo de crescimento do bacilo é lento, variando de 11 a 16 dias, permanecendo viável no meio ambiente por até nove dias, o que explica a cronicidade da doença (OPROMOLLA, 2000). Não se cultiva o bacilo *in vitro*; entretanto, é possível a sua multiplicação pela inoculação de bactérias no coxim plantar de camundongos imunocompetentes (REES; YOUNG, 1985).

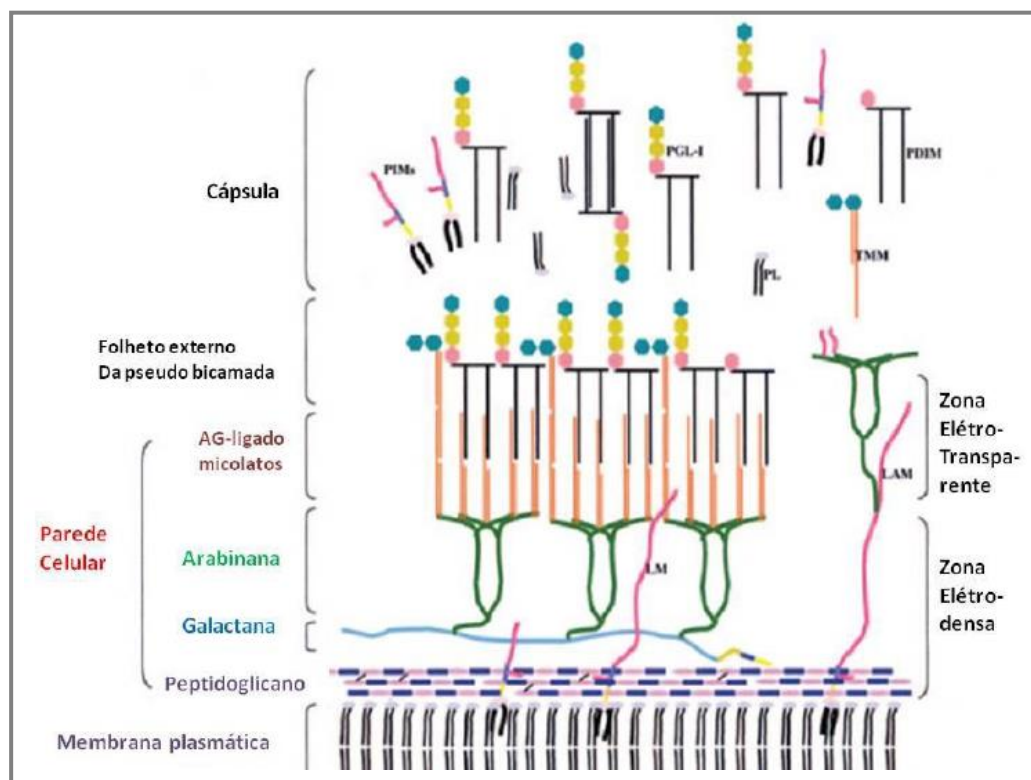
Antes da decodificação do genoma do *M. leprae*, a disponibilidade de novos antígenos era limitada devido ao fato do bacilo não ser cultivável. Vários microbiologistas tentaram obter o crescimento do bacilo em cultura axênica e somente após a decodificação do genoma foi possível entender que a perda maciça de genes reduziu sua capacidade metabólica, transformando-o em um bacilo intracelular obrigatório e altamente especializado (COLE *et al.*, 2001).

Além disso, estudos baseados na resposta imune celular na hanseníase têm indicado vários antígenos, proteínas recombinantes e peptídeos, com potencial aplicação diagnóstica. Embora o número de proteínas recombinantes do *M. leprae* testadas esteja aumentando, há uma longa lista de candidatos a ser avaliada, antes de se escolher o antígeno mais eficiente (STEFANI *et al.*, 2008).

O *M. leprae* apresenta-se nos tecidos infectados como bastonete reto ou ligeiramente encurvado, isolados ou em feixes paralelos, dispendo-se em globias e medindo oito micra de comprimento por 0,3 micra de largura. O *M. leprae* tem estrutura semelhante à de outras micobactérias, ainda que apresente alguns constituintes específicos (OPROMOLLA, 2000).

Segundo Vissa e Brennan (2001) o bacilo apresenta uma estrutura mais externa composta por: manosídeo fosfatidilinositol (PMI), monomicolato trealose (TMM), fosfolipídeos (PL), ftiocerol dimicocerosato (PDIM) e o glicolípido fenólico 1 (PGL-1), que é o antígeno específico do *M. leprae* (FIGURA 1). A parede celular é composta pelos ácidos micólicos-arabinano-galactano; o peptideoglicano; lipomannan (LM) e o lipoarabinomannan (LAM) (BRENNAN; NIKAIDO, 1995).

**Figura 1 - Modelo esquemático do envelope celular do *M. leprae***



Legenda: Uma cápsula composta em grande parte de PGL e outras moléculas, tais como PDIMs, PIMs, TMM e fosfolípidos rodeia a bactéria. Três cadeias ramificadas de arabinano são por sua vez ligadas ao galactano. A camada de peptidoglicano-arabino-galactano constitui a zona elétron-densa. Ácidos micólicos estão ligados aos terminais das cadeias arabinano para formar o folheto interno de uma pseudo bicamada lipídica que constitui a camada elétron-transparente.

Fonte: VISSA; BRENNAN, 2001, p. 3. (Modificado para fins didáticos).

O tropismo do *M. leprae* pela célula de Schwann determina-se, provavelmente, pela capacidade de trissacarídeos espécie-específicos do PGL-1, presente na parede celular do *M. leprae*, se ligar à laminina presente na membrana basal da célula de Schwann (NG *et al.*, 2000). O *M. leprae* acomete fibras sensitivas, motoras e autonômicas do sistema nervoso periférico. Na pele, acomete as fibras sensitivas e autonômicas, levando à diminuição da sensibilidade cutânea, hipoidrose ou anidrose. Após lesões nas fibras observa-se resposta diminuída a estímulos, levando à paralisia e à atrofia muscular (TALHARI *et al.*, 2006).

### 3.1.2 Fatores de infecção e transmissão

A transmissão do *M. leprae* ocorre, provavelmente, pela disseminação de aerossóis e secreções nasais das vias aéreas superiores. Acredita-se que a infecção ocorre por meio do contato íntimo e prolongado de indivíduos susceptíveis com pacientes com carga bacilar elevada e sem tratamento. Diante disso, contatos domiciliares de pacientes nesta situação clínica apresentam risco aumentado de desenvolver hanseníase em relação à população geral (BRITTON; LOCKWOOD, 2004; DESSUNTI *et al.*, 2008).

Na Índia e na Indonésia, tem sido encontrado ácido desoxirribonucleico (DNA) do *M. leprae* em secreções nasais de pacientes com a forma clínica mais tardia da hanseníase, bem como em 5% de indivíduos sem sinais e sintomas clínicos da doença. Estes, denominados portadores sadios, estariam atuando como fontes de disseminação da doença. Esse achado sugere que as infecções subclínicas são uma realidade presente em áreas endêmicas, como comprovado em estudos sorológicos (BRITTON; LOCKWOOD, 2004).

Em um estudo que analisou a soropositividade anti PGL-1 em contatos domiciliares de casos índices de hanseníase observou que 8,8% dos contatos de casos com baixa carga bacilar e de 18,2% em contatos de doentes com alta carga bacilar apresentavam a soropositividade anti PGL-1. Observou-se, também, que características clínicas do caso índice (forma clínica, grau de incapacidade física, sinais sugestivos da doença) apresentaram associação estatisticamente significativa com a soropositividade anti PGL-1 dos contatos domiciliares, sugerindo uma relação entre essas variáveis. O estudo afirma que a avaliação sorológica pode ser considerada uma estratégia para a identificação de indivíduos com maior risco de desenvolver hanseníase ou na fase inicial da doença (CARVALHO, 2012).

O homem é considerado o reservatório natural do bacilo, entretanto, tatus e macacos naturalmente doentes já foram encontrados, mas não há evidências de sua importância na cadeia de transmissão da doença (OPROMOLLA, 2000).

### 3.1.3 Situação epidemiológica da hanseníase

A detecção anual global de hanseníase tem mostrado tendência decrescente desde 2001 nos países endêmicos. Em 2004 detectou-se 407.791 casos novos, com redução para 228.474 em 2010, e para 219.075 em 2011, significando uma queda de 46% (WHO, 2015).

A prevalência da doença em cada região no mundo, no primeiro trimestre de 2014, foi de 180.618 pacientes, correspondendo a uma taxa de prevalência de 0,32 por 10 mil habitantes. Em relação à detecção de novos casos, observou-se 215.656 notificações, o que equivale a uma taxa de detecção de 3,81 por 100 mil habitantes (WHO, 2015a).

A maioria dos países, que eram altamente endêmicos para hanseníase, tem alcançado a eliminação da doença em proporções nacionais e se esforçam para atingir a meta proposta pela OMS, de se ter uma taxa de prevalência de menos de um caso por 10 mil habitantes, em proporções regionais e distritais. Entretanto, a alta endemicidade ainda permanece em alguns países como Angola, Brasil, Índia, Madagascar, Nepal, República Unida da Tanzânia, República Democrática do Congo e Moçambique (WHO, 2015).

A hanseníase na América acompanhou os parâmetros globais. Constatou-se, de 2006 a 2012, um declínio de 24% na detecção de casos novos. Até 2012, todos os países da região tinham alcançado a meta nacional de eliminação, exceto o Brasil. Na primeira instância administrativa subnacional cinco países ainda não tinham atingido a meta, a saber: Argentina, Bolívia, República Dominicana, Paraguai e Venezuela (PAHO, 2014).

No Brasil, o coeficiente de prevalência reduziu progressivamente nos últimos anos de 1,56 por 10mil habitantes em 2010 para 1,01 por 10mil habitantes em 2015. Entretanto, ainda mantêm-se elevado nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, com coeficiente de prevalência de 2,0, 1,58 e 3,49 por 10mil habitantes, respectivamente (BRASIL, 2015). A análise de agrupamento, estratégia para identificar áreas endêmicas, observou-se que, de 2011 a 2013, os municípios destas regiões possuíam maior risco de surgimento de novos casos da doença (WHO, 2015).

### 3.1.4 Classificação e manifestações clínicas

A hanseníase apresenta quadro clínico variado, relacionando-se ao tipo de resposta imunológica do hospedeiro. As manifestações clínicas podem variar, desde máculas hipocrômicas e placas eritematosas na pele à nódulos cutâneos, com ou sem acometimento neural (SAMPAIO; RIVITTI, 2007).

Ao longo dos anos, várias classificações das formas clínicas da hanseníase foram estabelecidas, a se saber: classificação de Madri; classificação de Ridley e Jopling; e classificação operacional da OMS.

A classificação de Madri baseia-se nas características imunológicas, bem como a tendência da resposta imune em evoluir para polos imunológicos com características dicotômicas. Nessa classificação encontram-se duas formas polares imunologicamente estáveis, denominadas de tuberculóide e virchowiana; e dois grupos imunologicamente instáveis, denominados de indeterminado e dimorfo (OPROMOLLA, 2000).

Ridley e Jopling (1966), com intuito de auxiliar os pesquisadores na classificação da doença e cientes que havia casos que se assemelhavam com os tuberculóides e virchowianos, mas que possuíam diferenças imunológicas e histológicas, propuseram uma classificação mais precisa e que se baseava em critérios clínicos, histológicos, bacteriológicos e imunológicos (FIGURA 2). Consideraram as formas clínicas como um espectro em que os extremos eram constituídos pelos tipos polares tuberculóide (TT) e virchowiano (VV), e a região interpolar correspondente as dimorfas ("borderline") foram subdivididas em dimorfa-tuberculóide (DT), dimorfa-dimorfa (DD) e dimorfa-virchowiana (DV). Essa classificação não inclui a forma indeterminada e é a mais utilizada em pesquisas.

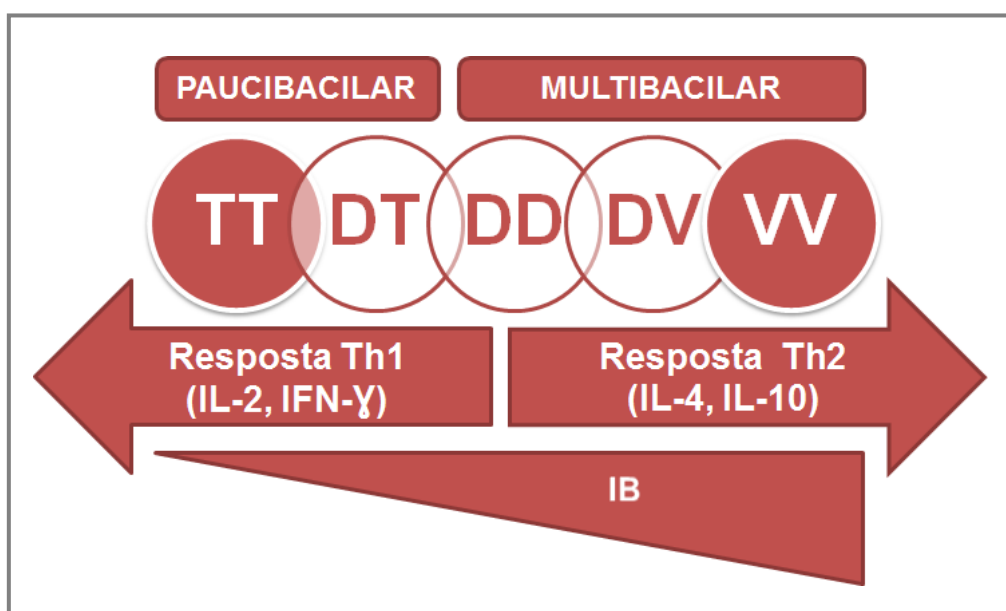
A classificação operacional da OMS é baseada na contagem de lesões cutâneas, com intuito de facilitar a aplicação dos protocolos terapêuticos e operacionais (FIGURA 2). Os casos com até cinco lesões de pele são classificados como paucibacilares (PB), e aqueles com seis ou mais como multibacilares (MB). A baciloscopia, um exame diagnóstico, quando for realizada e positiva, classifica o caso em MB, independente do número de lesões cutâneas (BRASIL, 2016).



A hanseníase pode, ainda, se manifestar através dos estados reacionais ou reações hansênicas (tipos 1 e 2), que são alterações do sistema imunológico que se exteriorizam como manifestações inflamatórias agudas e subagudas e ocorrerem mais frequentemente nos casos MB. Podem ocorrer antes, durante ou depois do tratamento com a PQT (BRASIL, 2016).

Em todas as formas clínicas da doença, exceto na indeterminada, podem ocorrer lesões graves de nervos periféricos e distúrbios sensitivos e motores, levando a diferentes graus de incapacidades (TALHARI *et al.*, 2006).

**Figura 2 - Classificação clínica e imunológica da hanseníase**



Legenda: As manifestações clínicas foram classificadas segundo Ridley-Jopling (TT, DT, DD, DV, VV) e esquema terapêutico da OMS (PB e MB). O tipo de resposta imune (Th1 e Th2) do hospedeiro e a carga bacilar foram descritos segundo o subtipo da hanseníase. A variação da resposta imune celular é inversamente proporcional ao índice baciloscópico (IB).

Fonte: ALTER *et al.*, 2011, p. 21. (Modificado para fins didáticos).

### 3.1.5 Métodos de diagnóstico

O diagnóstico da hanseníase é eminentemente clínico. Entretanto, utilizam-se os testes de sensibilidade, a avaliação neurológica simplificada e exames laboratoriais como ferramentas complementares para a confirmação diagnóstica da hanseníase (WHO, 2015).

Segundo Brasil (2016) define-se caso de hanseníase, um indivíduo que apresente uma ou mais das seguintes características, que necessita da PQT:

- a) lesão(ões) e/ou área(s) da pele com alteração de sensibilidade térmica e/ou dolorosa e/ou tátil; ou
- b) espessamento de nervo(s) periférico(s), associado a alterações sensitivas e/ou motoras e/ou autonômicas; ou
- c) presença de bacilos do *M. leprae*, confirmada na baciloscopia de esfregaço intradérmico ou na biopsia de pele.

A avaliação clínica busca identificar lesões de pele e sua sensibilidade; e a avaliação neurológica busca identificar neurites, comprometimento de nervos periféricos, incapacidades físicas e deformidades (BRASIL, 2016).

Na avaliação da sensibilidade utilizam-se os monofilamentos de Semmes-Weinstein em mãos, pés e lesões de pele para quantificar o limiar tato-pressão (HAGAMAN *et al.*, 2000). No exame neurológico palpa-se nervos periféricos e avalia-se a força muscular. O resultado determina o grau de incapacidade física, que é um indicador de precocidade no diagnóstico (CHEN *et al.*, 2006).

Exames laboratoriais são utilizados para auxiliar na correta classificação destes pacientes. Alguns testes laboratoriais são utilizados para confirmação diagnóstica de hanseníase, tais como a baciloscopia, teste de Mitsuda, exame histopatológico e o teste ML Flow (BUHRER-SEKULA *et al.*, 2003; BRASIL, 2016).

A baciloscopia é um método que investiga a presença do bacilo em esfregaço de raspados dérmicos, coletados em locais com alteração da sensibilidade, em lóbulos da orelha e cotovelos. É usada para diagnóstico e classificação da doença (BRASIL, 2010). O IB é a escala logarítmica de cada esfregaço, sendo a média dos índices dos esfregaços (RIDLEY; JOPLING, 1966).

O teste de Mitsuda é um método de avaliação da resposta imune celular do hospedeiro (OPROMOLLA, 2000), pela inoculação de antígenos do bacilo na face anterior do antebraço, com leitura após 28 dias. A formação de pápula igual ou superior a cinco milímetros confirma a positividade do teste (MITSUDA, 1919). É usado para classificação e como prognóstico, já que pacientes com teste positivo tendem a desenvolver as formas PB e os negativos MB (SAMPAIO; RIVITTI, 2007).

O exame histopatológico é um método de biópsia e caracterização histológica das lesões cutâneas. É utilizado para diagnóstico, classificação das formas clínicas e das reações hansênicas (BRITTON; LOCKWOOD, 2004; REA; MODLIN, 2010). O exame pode não ser característico, já que é examinador dependente, não sendo padrão-ouro (MOSCHELLA, 2004).

O teste ML Flow é método sorológico que detecta anticorpos da classe IgM contra o antígeno PGL-1 do *M. leprae*. É utilizado para classificação da hanseníase em PB ou MB (OSKAM; SLIM; BUHRER-SÉKULA, 2003). Geralmente os pacientes PB são soronegativos, enquanto que os MB são positivos (BUHRER-SEKULA *et al.*, 2003; BUHRER-SEKULA *et al.*, 2007).

Há outros testes de diagnóstico complementares, como os moleculares (proteína C reativa - PCR) e os sorológicos (ensaio de imunoabsorção enzimática - ELISA; teste de hemaglutinação passiva - PHA; teste de aglutinação com partícula de gelatina - GPAT; teste de fita simples - Dipstick). Entretanto, o seu uso está limitado a centros de pesquisa científica (BUHRER-SEKULA, 2007).

Assim, o desafio atual consiste no desenvolvimento de um teste simples e rápido para o executor em situações de campo, sensível, específico e de baixo custo para o diagnóstico da hanseníase (STEFANI, 2008).

### **3.1.6 Tratamento**

O tratamento da hanseníase abrange a utilização da PQT específica, prevenção de incapacidades e reabilitação física. A PQT é eficaz na interrupção da cadeia de transmissão, já que a primeira dose elimina em até 99,9% da carga bacilar de um indivíduo (OPROMOLLA, 2000; BRASIL, 2016).

O tratamento é ambulatorial e utiliza a rifampicina, dapsona e clofazimina de forma associada. Nos pacientes com forma clínica PB utiliza-se uma dose mensal supervisionada de rifampicina e dapsona; e doses diárias de dapsona administradas de seis a nove meses. Já nos pacientes com forma clínica MB utiliza-se uma dose mensal supervisionada de rifampicina, clofazimina e dapsona; e doses diárias de clofazimina e dapsona administradas de 12 a 18 meses (BRASIL, 2016).

A cada dose mensal realiza-se uma avaliação clínica do paciente para acompanhar a evolução das lesões cutâneas, do comprometimento neural e se há estados reacionais. Os pacientes recebem alta por cura, caso não haja nenhuma alteração nos exames realizados mensalmente. Esquemas terapêuticos substitutivos são utilizados nos casos de intolerância grave ou contraindicação a uma ou mais drogas do esquema-padrão PQT/OMS (BRASIL, 2016).

## 3.2 Imunologia da hanseníase

### 3.2.1 Imunologia inata

O desenvolvimento inicial da resposta imune mediante a infecção pelo *M. leprae* inicia-se com a resposta inata, pelo reconhecimento de PAMPs, através dos PRRs, presentes em células da imunidade inata, como os macrófagos e DCs (JANEWAY, 1989; MEDZHITOY; JANEWAY, 1997; POLTORAK *et al.*, 1998).

Entre os PRRs, os receptores do tipo Toll (TLRs), principalmente os TLR1, TLR2 e TLR4 reconhecem lipoproteínas da parede celular do *M. lepra* (MEDZHITOY; JANEWAY, 1997; POLTORAK *et al.*, 1998; AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; KAWAI; AKIRA, 2009) enquanto TLR9 intracelular reconhece CpG DNA bacteriano, participando na resposta imunológica contra micobactérias (BAFICA *et al.*, 2005). Os receptores do tipo NOD, em especial o NOD2, que reconhecem peptideoglicanos (GRINGHUIS *et al.*, 2007; JO, 2008); os receptores do tipo lectina C, que reconhecem carboidratos da parede celular da bactéria (KAWAI; AKIRA, 2009); e receptores do complemento (CR) do tipo 1, CR2 e CR3, sendo que este último reconhece o PGL-1 do *M. leprae* (SCHLESINGER; HORWITZ, 1991).

Estudos mostraram que polimorfismos existentes em TLR1 / TLR2 (MODLIN, 2010) e em NOD2 (ZHANG *et al.*, 2009) podem estar associado a susceptibilidade à hanseníase. Outros estudos propõem que polimorfismos em TLR4 podem gerar efeito protetor contra a doença (BOCHUD *et al.*, 2009). Outros, ainda, mostraram que polimorfismos em TLR8 associam-se à resistência à tuberculose, podendo, também, acontecer na hanseníase (MODLIN, 2010).

Após o reconhecimento e fagocitose do *M. leprae* observa-se possíveis mecanismos de evasão do bacilo contra a resposta imune, os quais podem estar associados a: bloqueios da via de sinalização de TLR (MODLIN, 2010); desvio do metabolismo de lipídeos e utilização destes para síntese de fatores de virulência (REED *et al.*, 2004; JAIN *et al.*, 2007) e inibição de reativos de oxigênio, impedindo sua destruição (KAPLAN *et al.*, 1987; MONTOYA *et al.*, 2009).

As células da imunidade inata produzem, ainda, citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 $\beta$ , IL-12 e TNF- $\alpha$ , que podem atuar na modulação da resposta imune adaptativa em Th1 (MODLIN, 2010). Entretanto, estudos mostraram que os macrófagos, em especial, podem secretar citocinas como a IL-4 e IL-10, podendo modular a resposta em Th2 (CRUZ *et al.*, 2008; MONTOYA *et al.*, 2009).

Acredita-se que o bacilo interfere na maturação das DCs (MAKINO *et al.*, 2006; MURRAY *et al.*, 2007; TABOURET *et al.*, 2010) e em consequência, altera a produção de citocinas pró-inflamatórias, reduz a atividade do NF- $\kappa$ B e a expressão de moléculas co-estimulatórias, como CD80, CD83, CD86 e CD40 (LEE *et al.*, 2007; TABOURET *et al.*, 2010).

Diante disso, dependendo do “gatilho” de estímulo, os macrófagos ativos podem imitar o paradigma Th1-Th2 da resposta imune adaptativa e desenvolver um fenótipo pró-inflamatório ou anti-inflamatório, influenciando o curso da resposta imune adaptativa (MOSMANN; COFFMAN, 1989; VERRECK *et al.*, 2004).

### 3.2.2 Imunologia adaptativa

Após o reconhecimento dos antígenos do *M. leprae* através da interação entre o complexo de histocompatibilidade (MHC) e TCR, os linfócitos TCD4<sup>+</sup>, iniciam o processo de proliferação e, na dependência do ambiente de citocinas presentes, se diferenciam linfócitos do tipo Th1, produtores de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-2 e IFN- $\gamma$ ; ou se diferenciam em linfócitos do tipo Th2, produtores de citocinas anti-inflamatórias, como a TGF- $\beta$ , IL-4 e IL-10. Observa-se, então, que os indivíduos saudáveis apresentam um balanço imunológico onde podem desenvolver uma resposta Th1 ou Th2 (BRADLEY, 2003).

Ao avaliar o espectro clínico da hanseníase e a produção de citocinas observa-se, no polo TT, predomínio de uma resposta imune celular e produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ). Nesse polo, anticorpos específicos de *M. leprae* estão normalmente ausentes ou estão presentes em níveis baixos. Entretanto, no polo VV observa-se predomínio de uma resposta imune humoral e produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10). Isso permite a proliferação do *M. leprae*, o aparecimento de muitas lesões e infiltrados inflamatórios (MENDONÇA *et al.*, 2008; DEGANG *et al.*, 2014; NATH; SAINI; VALLURI, 2015).

Em doentes com a forma clínica VV, observa-se ainda, uma resposta preferencial de células B. As respostas dos anticorpos ao PGL 1 têm mostrado estar presente em 90-95% de pacientes com a forma clínica VV e em 25-60% naqueles com a forma clínica TT (NATH *et al.*, 1977; YOUNG; BUCHANAN, 1983).

Em se tratando das formas interpolares DT, DD e DV estas são consideradas imunologicamente instáveis. Dentro destes grupos, há uma diminuição gradual na resposta imune celular de DT a DV, que é inversamente correlacionada com o aumento da carga bacilar (MENDONÇA *et al.*, 2008).

Tem-se discutido um padrão de células Th17 em humanos, que produz a citocina IL-17 e que tem o fator de transcrição ROR $\gamma$ . Essa subpopulação de linfócitos foi identificada pela primeira vez em encefalite experimental (BETTELLI; OUKKA; KUCHROO, 2007) e mais tarde na tuberculose (TORRADO; COOPER, 2010) e na leishmaniose (GONZALEZ-LOMBANA *et al.*, 2013). Um estudo observou maior expressão e liberação de citocinas Th17 (IL-17, IL-21, IL-22 e IL-23) no sobrenadante de sangue periférico de indivíduos contatos de pacientes sem sinais da doença ou no bordo de lesão de pele de pacientes com a forma clínica TT se comparadas a pacientes com a forma clínica VV (SAINI; RAMESH; NATH, 2013).

A associação de células com o padrão Th17 com a não polarização da resposta Th sugerem que essas células podem ser um terceiro tipo de Th na hanseníase, e pode ser uma via de resgate em pacientes incapazes de montar uma resposta Th ou quando a polarização de Th ainda não se definiu (NATH; SAINI; VALLURI, 2015).

Pesquisas sobre a expressão de citocinas em hanseníase descreveram parâmetros da polarização da doença, na qual as lesões TT podem ser consideradas manifestações de hipersensibilidade tardia enquanto que as VV são caracterizadas por evidente produção de anticorpos, mas com incapacidade de

montar uma resposta imune celular eficaz (SCOLLARD *et al.*, 2006). Entretanto os mecanismos envolvidos na polarização da resposta imune do tipo Th1 e Th2 e na modulação da resposta celular ao longo do espectro clínico da doença não foram ainda totalmente esclarecidos.

Além de padrões de citocinas bem definidos, em lesões de pacientes com a forma clínica TT, observasse o dobro de células TCD4<sup>+</sup> em relação a células TCD8<sup>+</sup>. Já em pacientes com a forma clínica VV observa-se o dobro de células TCD8<sup>+</sup> em relação a TCD4<sup>+</sup>. As células TCD4<sup>+</sup> encontradas em lesões de pacientes do polo TT secretam principalmente IFN- $\gamma$ , enquanto que em lesões de pacientes do polo VV, estas células secretam IL-4 que suprime a resposta imune inibindo a ativação de macrófagos (SALGAME *et al.*, 1991).

Recentemente descobriu-se, também, uma subpopulação de linfócitos TCD4<sup>+</sup> com fenótipo imunorregulador em infiltrado inflamatório de pacientes com hanseníase. Acredita-se que essas células podem estar relacionadas com o controle da resposta imune na hanseníase (MASSONE *et al.*, 2010).

### 3.3 Imunorregulação na hanseníase e células T reguladoras

A capacidade de distinção entre antígenos próprios e não próprios é definida como tolerância imunológica e é fundamental para evitar respostas autoimunes. O sistema imune elimina, por deleção clonal, células autorreativas que reconhecem antígenos próprios, mas algumas células evadem desse mecanismo e se tornam potenciais para gerar autoimunidade (CRUVINEL *et al.*, 2008).

A imunidade adaptativa requer um equilíbrio finamente controlado entre a geração da imunidade protetora contra patógenos e a manutenção da autotolerância periférica. O sistema imune possui mecanismos, entre eles a participação de linfócitos TCD4<sup>+</sup> com características reguladoras, que suprimem as células T autorreativas e atenua a ação efetora dos mecanismos de eliminação dos patógenos (PICCIRILLO, 2008; JOSEFOWICZ; LU; RUDENSKY, 2012).

As células com função imunorreguladora têm como característica principal a capacidade de produzir citocinas imunossupressoras, assegurando a modulação das respostas imunológicas frente aos diversos antígenos provenientes de agentes infecciosos, autoantígenos e alérgenos (MESQUITA JUNIOR *et al.*, 2010).

Embora haja vários tipos de células com características imunorreguladoras, ainda não se sabe a importância hierárquica de cada uma delas. A diferença primordial entre essas células refere-se, não apenas aos tecidos onde ocorre a diferenciação, mas também a seus fenótipos e aos mecanismos utilizados para promover a supressão da resposta imune (CUROTTO DE LAFAILLE; LAFAILLE, 2009; HARIBHAI *et al.*, 2011).

Estudos destacam o papel das células reguladoras de origem natural ( $T_{REGS}CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$ ). Essa subpopulação de linfócitos  $CD4^+$  caracteriza-se por expressar a molécula CD25, uma cadeia do receptor da IL-2 e marcador de ativação das células T. Assim, apenas as células que expressam altos níveis de CD25 possuem um perfil regulador, o que corresponde de 1% a 3% (MILLS, 2004).

As células  $T_{REGS}$  desenvolvem-se no timo, durante os eventos de seleção negativa a partir da diferenciação de clones de linfócitos T  $CD4^+$  autorreativos (FEUERER *et al.*, 2009; CARPENTER; BOSSELUT, 2010; VON BOEHMER; MELCHERS, 2010). Estes eventos requerem uma forte interação entre TCR e MHC de células epiteliais tímicas, sob co-estimulação da molécula CD28 e sinalização via IL-2, IL-15 e TGF- $\beta$  o que, provavelmente, confere a essas células maior resistência à deleção clonal (FEUERER *et al.*, 2009; VON BOEHMER; MELCHERS, 2010).

Além da molécula CD25, outras moléculas são utilizadas para caracterizar as células  $T_{REGS}$  e seu fenótipo regulador. Destacam-se as moléculas CTLA-4, CD103, CD62L, CD45RO (BAECHER-ALLAN *et al.*, 2001); o receptor induzido por glicocorticóide (GITR) (SHIMIZU *et al.*, 2002; YI *et al.*, 2006); a baixa expressão de uma subunidade do receptor de IL-7 (CD127); e o fator de transcrição FOXP3 (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003; KONDĚLKOVÁ *et al.*, 2010).

A alta expressão de FOXP3 em células  $CD4^+CD25^{high}$  sugerem que esse fator de transcrição é determinante no desenvolvimento e função dessas células (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003; KHATTRI *et al.*, 2003; HORI; SAKAGUCHI, 2004), sendo demonstrada em animais “knockout” para FOXP3, que desenvolveram doença autoimune (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003).

A expressão de FOXP3 é induzida em linfócitos pela sinalização via TCR e TGF- $\beta$  (RELLAND *et al.*, 2009). A região promotora de FOXP3 possui sítios de ligação para moléculas de SMAD3, STAT5 e CREB, bem como para NFAT (MARSON *et al.*, 2007; LAL; BROMBERG, 2009). O FOXP3 controla a expressão de



outros fatores de transcrição nuclear como T-bet, GATA-3 e ROR- $\gamma$  e, dessa forma, controla a plasticidade dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> (MARSON *et al.*, 2007; LU; RUDENSKY, 2009; CAMPBELL; KOCH, 2011).

As células T<sub>REGS</sub> expressam, também, receptores de quimiocinas, como CCR4, CCR5 e CCR8, que lhes permitem migrar para tecidos inflamados, em resposta a um gradiente de quimiocinas como CCL1, CCL5, MIP-1, CCL17 (CAMPBELL; KOCH, 2011). A molécula CD103 permite que estas células possam ser retidas nos tecidos periféricos na inflamação (FEUERER *et al.*, 2009).

Os estudos que avaliam células T<sub>REGS</sub> em hanseníase mostram-se contraditórios. O estratégia de definição dessas células, o número reduzido de participantes em alguns estudos, a escolha de um número reduzido de moléculas para caracterizar as células T<sub>REGS</sub>, a inclusão de pacientes com as formas clínicas dimorfas nos grupos polares da doença e a falta de uniformidade metodológica, podem ser uma possível explicação para a divergência nos resultados (ATTIA *et al.*, 2010; MASSONE *et al.*, 2010; PALERMO *et al.*, 2012; ABDALLAH *et al.*, 2014).

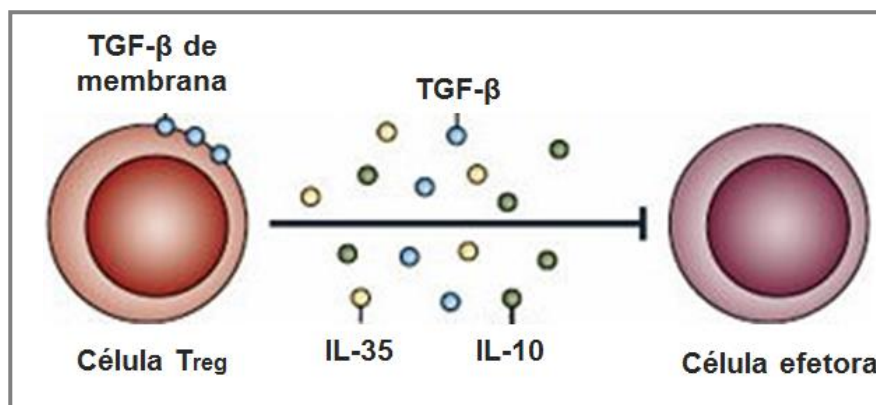
### **3.3.1 Mecanismos de imunorregulação induzidos pelas células T<sub>REGS</sub>**

Atualmente tem-se postulado que as células T<sub>REGS</sub> utilizam vários mecanismos de supressão. Estes podem ser divididos em mecanismos de ação, tais como: citocinas inibitórias, interrupção de via metabólica, modulação da função das células apresentadoras de antígenos (APCs) e células efectoras, citólise e indução de apoptose (WORKMAN *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2009).

#### **3.3.1.1 Imunorregulação por citocinas inibitórias**

As citocinas inibitórias IL-10, TGF- $\beta$  e IL-35 são expressas pelas células T<sub>REGS</sub> e atuam inibindo a ação de citocinas pró-inflamatórias, além de inibir a proliferação de células que induzem uma resposta imune do tipo Th1. Esse processo diminui a ação citolítica dessas células e facilita a proliferação de células que induzem uma resposta do tipo Th2 (FIGURA 3) (WORKMAN *et al.*, 2009).

**Figura 3 - Mecanismo de imunorregulação de células T<sub>REGS</sub> por meio da ação de citocinas inibitórias**



Legenda: As citocinas IL-10, TGF- $\beta$  e IL-35 agem inibindo a proliferação de células efetoras e induzindo uma resposta imune do tipo Th2.

Fonte: VIGNALLI; COLLISON; WORKMAN, 2008, p.19. (Modificado para fins didáticos).

A IL-10 pode ser sintetizada por diversas células, como as DCs, macrófagos, linfócitos B e NK. Diversos patógenos, como *Bordetella pertussis*, *L. major*, *S. Mansoni* e *T. gondii* induzem a produção de IL-10 pelas DCs e, dessa forma, induzem a conversão de células T CD4<sup>+</sup> em células T<sub>REGS</sub> (BELKAID, 2007).

A TGF- $\beta$  é uma citocina de ação pleotrópica sobre diversas células da imunidade inata e adaptativa e sua sinalização atua na indução de células T<sub>REGS</sub>, principalmente nas mucosas (BELKAID, 2007; TANG; BLUESTONE, 2008).

A IL-35, heterodímera da IL-12, foi descoberta a pouco tempo e também é sintetizada pelas células T<sub>REGS</sub>. É formada pelas subunidades p35 (comum à IL-27) e Ebi3 (produto do gene induzido por Epstein-Barr), sendo a expressão desta última proteína regulada por FOXP3 (SHEVACH, 2009).

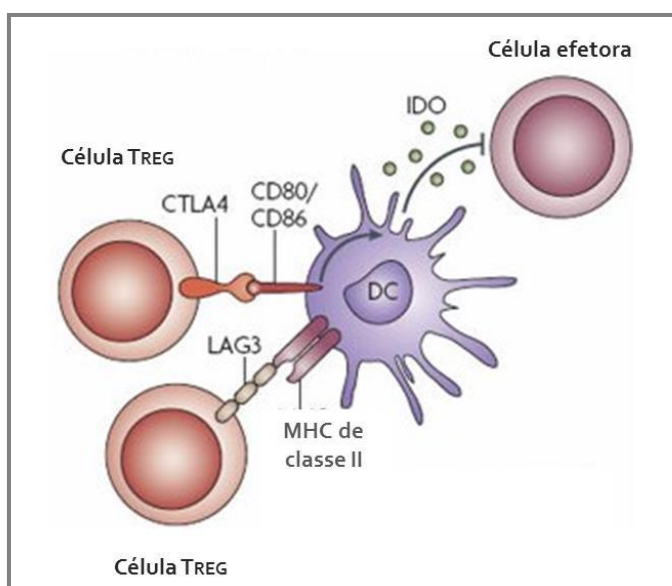
As células T<sub>REGS</sub> são capazes, também, de secretar IL-17 e manter a sua função imunossupressora, mediante ação de células T<sub>REGS</sub> que co-expressam CCR6, FOXP3 e o fator de transcrição ROR $\gamma$ , críticos para diferenciação e função de células T<sub>REGS</sub> e células Th17 (VOO *et. al.*, 2009).

### 3.3.1.2 Imunorregulação por modulação da função das APCs e células efetoras

Esse mecanismo depende do contato das células T<sub>REGS</sub> com células TCD4<sup>+</sup> efetoras ou APCs. A molécula CTLA-4 é expressa nas células T<sub>REGS</sub> e leva a inibição da ativação de células efetoras, ao bloquear a transmissão de sinal via TCR. A alta afinidade de CTLA-4 com as moléculas CD80/CD86, presente nas APCs, cria um sinal que aumenta a produção da indolamina 2,3-deoxigenase (IDO), enzima que degrada triptofano em quinurenina, um imunossupressor que modula a ação de células efetoras (FIGURA 4) (TANG, BLUESTONE; 2008; SHEVACH, 2009).

As células T<sub>REGS</sub> expressam, também, a molécula LAG-3 que é capaz de promover a endocitose das moléculas de MHC-II quando em contato com DCs e isso interfere no processo de maturação das APCs e enfraquece a capacidade destas para, subsequentemente, ativar células T efetoras (FIGURA 4). Isso indica que, *in vivo*, as células T<sub>REGS</sub> podem inibir a resposta das células T pela modulação das APCs (TANG *et al.*, 2006; SHEVACH, 2009).

**Figura 4 - Mecanismo de imunorregulação de células T<sub>REGS</sub> por modulação da função de células efetoras e DCs pelas moléculas CTLA-4 e LAG3**

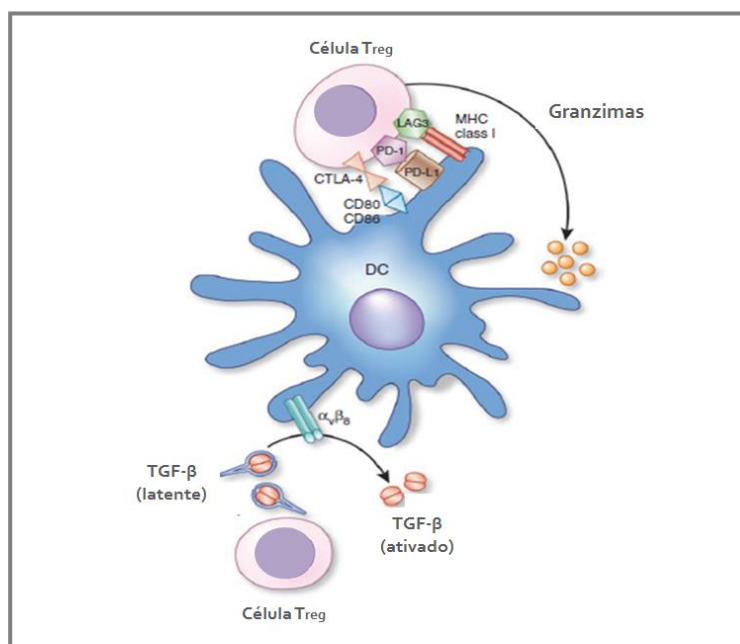


Legenda: A ação das moléculas LAG3 e CTLA-4 atuam na regulação da sinalização das DCs, causando um estado de anergia em DCs.

Fonte: VIGNALLI; COLLISON; WORKMAN, 2008, p.19. (Modificado para fins didáticos).

A expressão da molécula LAP (TGF- $\beta$  em sua forma latente) nas células T<sub>REGS</sub> também aumenta a capacidade de supressão dessas células (FIGURA 5). As células T<sub>REGS</sub> estimuladas pelas DCs liberam a molécula LAP que se liga ao receptor  $\alpha$ V $\beta$ 8 expressa na superfície de DCs e se tornam a citocina TGF- $\beta$ , a qual terá ação em várias células efectoras (BANCHEREAU *et al.*, 2012).

**Figura 5 - Mecanismo de imunorregulação de células T<sub>REGS</sub> pela ação da molécula LAP**



Legenda: Depois de ter sido estimulada por DCs, as células T<sub>REGS</sub> podem secretar a LAP, forma latente de TGF- $\beta$ , o qual é ativado por  $\alpha$ V $\beta$ 8 expressa na superfície de DCs. O TGF- $\beta$  ativado pode sinalizar DCs e outros tipos de células.

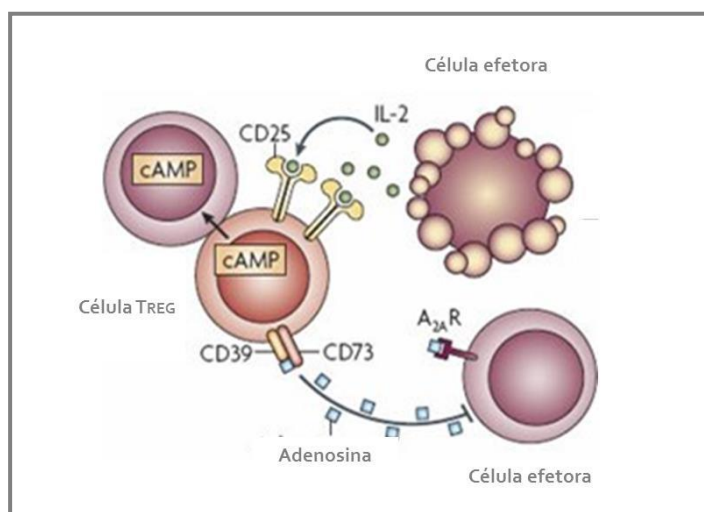
Fonte: BANCHEREAU; PASCUAL; O'GARRA, 2012, p. 926. (Modificado para fins didáticos).

### 3.3.1.3 Imunorregulação por interrupção de via metabólica

A molécula CD25, uma subunidade do receptor de IL-2 (IL-2R), está presente em células T efectoras, mas é altamente expressa em células T<sub>REGS</sub>. A elevada expressão de IL-2R em células T<sub>REGS</sub> pode privar as células T efectoras de IL-2, e dessa forma inibir a proliferação destas e provocar sua apoptose (FIGURA 6) (JOSEFOWICZ, LU, RUDENSKY, 2012).

As células T<sub>REGS</sub> também expressam altos níveis das ectoenzimas ou moléculas de superfície CD39 e CD73 (JOSEFOWICZ, LU, RUDENSKY, 2012). A molécula CD39 é responsável pela hidrólise de trifosfato de adenosina (ATP) extracelular, formando difosfato de adenosina (ADP), enquanto que molécula CD73 é responsável por degradar AMP formando adenosina. A interação entre adenosina e o receptor de adenosina A<sub>2A</sub>, presente nas APCs e linfócitos T efetores, inibe a sinalização via TCR, da fosforilação de ZAP-70 e da ativação do fator de transcrição ativador de proteína 1 (AP1)(FIGURA 6). A redução na sinalização diminui a produção de IL-2, expressão de CD25 e proliferação de células T efetoras (HASKÓ *et. al.*, 2008; SCHMIDT; OBERLE; KRAMMER, 2012).

**Figura 6 - Mecanismo de imunorregulação de células T<sub>REGS</sub> por interrupção de via metabólica**



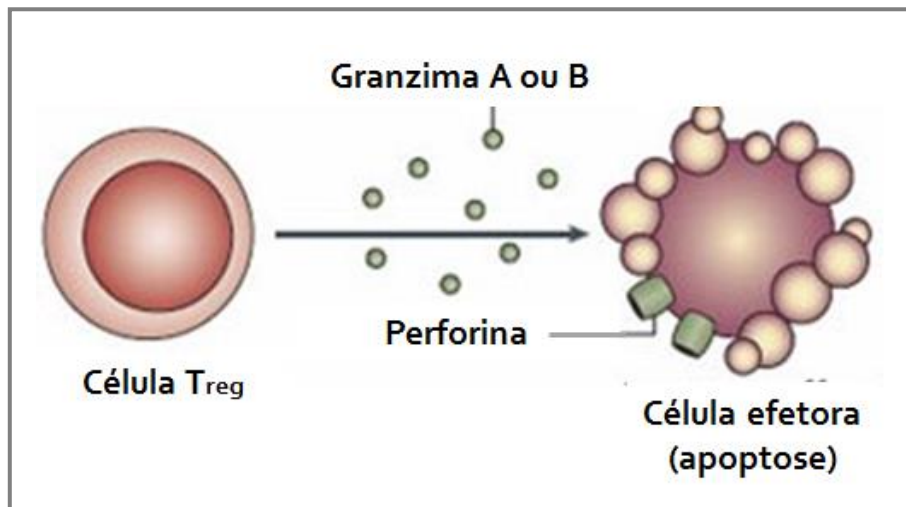
Legenda: A interrupção da via metabólica induz apoptose pela privação de IL-2 dependente de CD25, inibição mediada por AMP cíclico e imunorregulação mediada pelo receptor 2A (A<sub>2A</sub>R) de adenosina, produzida por CD39 e CD73.

Fonte: VIGNALLI; COLLISON; WORKMAN, 2008, p.19. (Modificado para fins didáticos).

### 3.3.1.4 Imunorregulação por citólise

Estudos recentes mostraram que células  $CD4^+$  humanas também são capazes de sintetizar granzimas e perforina. Outros estudos demonstraram a alta expressão de granzimas em células  $T_{REGS}$  ativadas (GONDEK *et. al.*, 2005; ZHOU, 2010). As granzimas estão envolvidas na apoptose de células alvo, tendo como substrato as caspases 2, 3, 7, 8, 9 e 10, as quais podem amplificar e conduzir a via de sinalização apoptótica. Já a perforina atua criando poros na membrana da célula, permitindo que substâncias citotóxicas, como as granzimas, possam entrar o interior da célula (FIGURA 7). Entretanto, a apoptose não pode ser completamente bloqueada utilizando inibidores, sugerindo que existe uma via apoptótica independente de caspase (ZHOU, 2010).

**Figura 7 - Mecanismo de imunorregulação de células  $T_{REGS}$  por citólise**



Legenda: A perforina cria poros na membrana das células para que as granzimas A e B possam agir no interior da célula, induzindo a apoptose.

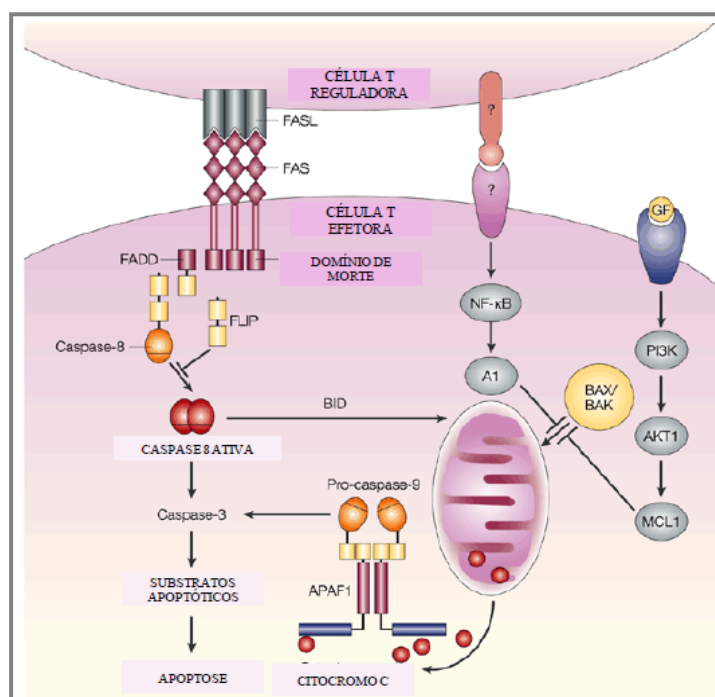
Fonte: VIGNALLI; COLLISON; WORKMAN, 2008, p.19. (Modificado para fins didáticos).

### 3.3.1.5 Imunorregulação por indução de apoptose

As moléculas CD95 (FAS) e CD95L (FAS-L) estão associadas com a função das células T<sub>REGS</sub> em induzir apoptose de células efetoras por meio de ativação de caspases 3, 7, 8 e 10 (FIGURA 8). As células T<sub>REGS</sub> podem se tornar susceptíveis a apoptose, mediada pela interação de CD95 e CD95L durante a interação com células T efetoras (STRAUSS; BERGMANN; WHITESIDE, 2009).

A interação entre CD95-CD95L causa rapidamente a junção de um complexo de sinalização intracelular indutor de apoptose (DISC), que contém protease de cisteína aspartato específica, adaptador/ativador da molécula FADD e seu modulador c-FLIP. Assim, a sinalização mediante a interação entre CD95-CD95L promove a ativação da caspase 8 que ativará caspases efetoras causando a proteólise de proteínas celulares vitais, tais como componentes estruturais e também podem ativar certos processos que desmontam constituintes celulares não proteicos (GUICCIARDI;GORES, 2009; STRASSER; JOST; NAGATA, 2009).

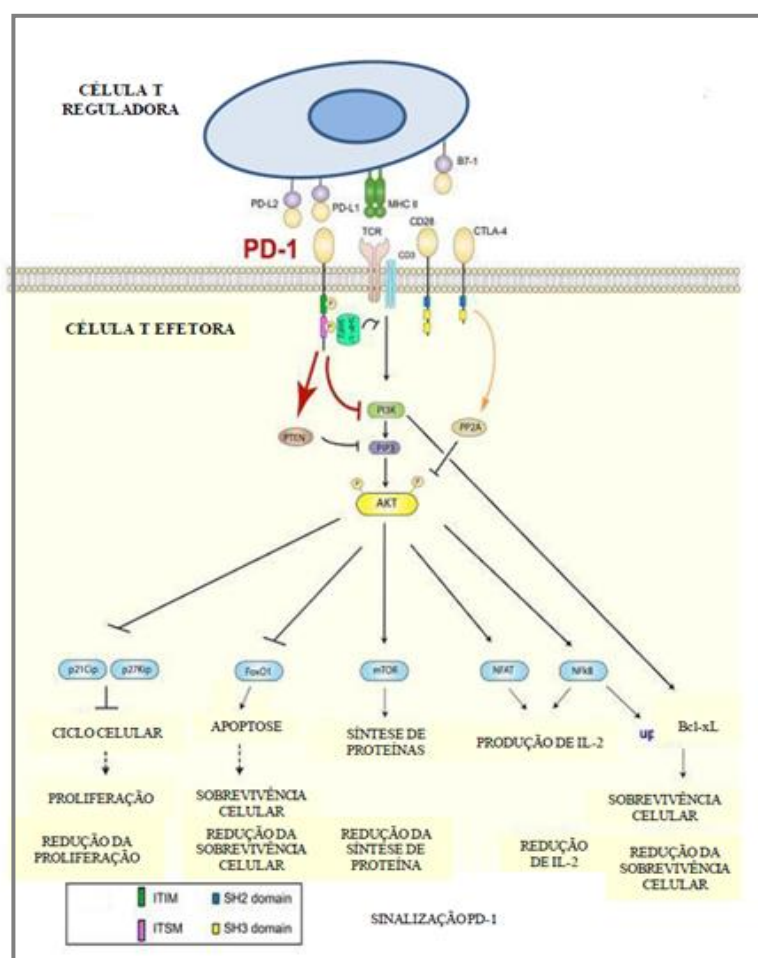
**Figura 8 - Mecanismo de imunorregulação de células T<sub>REGS</sub> por indução de apoptose via CD95 e CD95L**



Legenda: A interação CD95-CD95L leva a ativação da caspase 8 que irá clivar outras caspases efetoras. Ocorrerá ruptura de proteínas celulares causando a apoptose da célula.  
Fonte: POPE, 2002, p. 4. (Modificado para fins didáticos).

A molécula PD-1, expressa por células T<sub>REGS</sub>, após a interação com seus ligantes, o recrutamento das fosfatases SHP-1 e SHP-2, que agem na sinalização do TCR, diminui o sinal via TCR, ocasionando redução na ativação de células T e produção de citocinas IL-2 e IFN- $\gamma$  (FIGURA 9). Ocorre, também, supressão da enzima PI3K, o que pode diminuir a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-xL. Além disso, reduz a ação de Akt, levando a deficiência na produção de IL-2, síntese proteica e proliferação celular, induzindo um estado de anergia e apoptose de células efetoras (WANG *et. al.*, 2009; GUTIERREZ *et. al.*, 2011). A regulação positiva de PD-1 e seus ligantes está relacionada a persistência de patógenos em infecções crônicas e evasão da resposta imune (WANG, *et. al.*, 2009).

**Figura 9 - Mecanismo de imunorregulação de células T<sub>REGS</sub> por indução de apoptose via PD-1 e PD-1L**



Legenda: A via de sinalização de PD-1 pode resultar na diminuição da proliferação de células T, indução de apoptose, além de redução na síntese de proteínas e de IL-2.

Fonte: FRANCISCO; SAGE; SHARPE, 2010, p. 223. (Modificado para fins didáticos).



Os mecanismos de supressão citados não podem ser considerados individualmente no controle da imunidade mediada por células T<sub>REGS</sub>. Além disso, o programa supressor dependente de FOXP3 implementado pelas células T<sub>REGS</sub> mantém a verificação de vários tipos de resposta imune efetora a antígenos próprios e patógenos. Contudo, não está claro se essas células implementam um programa universal para limitar diferentes tipos de imunidade ou modulam programas de supressão adaptados para inibir uma classe particular de resposta imune. Evidências experimentais sugerem que distintos mecanismos supressores são característicos em tecidos específicos e reações inflamatórias (JOSEFOWICZ, LU, RUDENSKY, 2012).

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão de marcadores de imunossupressão induzidos por células T<sub>REGS</sub>, presentes no sangue de pacientes nas formas clínicas polares da hanseníase, contatos domiciliares e indivíduos não infectados.

### 4.2 Objetivos específicos

- Avaliar, no sangue periférico de pacientes nas formas clínicas polares da hanseníase, contatos domiciliares e indivíduos não infectados:
  - a frequência das células T<sub>REGS</sub>;
  - a expressão de moléculas de superfície (CD4, CD25, CTLA-4, CD39, CD73, CD95, CD95L, PD-1, PD-1L, LAP);
  - a expressão de citocinas (TGF- $\beta$ , IL-10) e de fatores intracitoplasmáticos (granzima A, granzima B, perforina, FOXP3);
  - a coexpressão de moléculas indutoras de apoptose e seus ligantes, em células T<sub>REGS</sub>(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup>);
- Analisar a relação entre as moléculas de superfície, citocinas e fatores intracitoplasmáticos em pacientes nas formas clínicas polares da hanseníase, contatos domiciliares e indivíduos não infectados.

## **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 Delineamento do estudo**

Estudo observacional, transversal, analítico e quantitativo.

### **5.2 Cenário do estudo**

O presente estudo foi realizado no Centro de Referência Estadual em Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes (HEM), que atende pacientes de Minas Gerais e de Estados próximos. Possui equipe multidisciplinar que inclui médicos dermatologistas, oftalmologista, fisioterapeutas, psicólogos e assistentes sociais. Nele, são atendidos cerca de 30 pacientes de hanseníase por dia, incluindo casos novos, acompanhamento de episódios reacionais, prevenção de incapacidades e reabilitação.

### **5.3 Caracterização da população do estudo**

Participaram deste estudo pacientes casos novos que apresentavam as formas polares da hanseníase, contatos domiciliares e indivíduos não infectados. As formas clínicas de todos os pacientes com hanseníase foram determinadas segundo os critérios propostos por Ridley e Jopling (1966).

Na avaliação clínica, buscou-se a presença de lesões de pele e, nestas, avaliou-se a presença ou ausência de sensibilidade. Todos os pacientes foram examinados pela Dra Sandra Lyon, médica dermatologista responsável pelo seu atendimento clínico.

Para a baciloscopia, utilizou-se o IB, conforme escala logarítima de Ridley, que varia de zero a seis, através da coleta de esfregaço dérmico em quatro sítios: lesão cutânea, cotovelo contralateral e lóbulos auriculares.

Na avaliação histopatológica, realizaram-se biópsias da lesão de pele e do tecido contralateral para caracterização histológica. A classificação histológica foi posteriormente realizada pelo Prof. Dr. Marcelo Antônio Paschoal Xavier, do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG.

O teste de ML-Flow foi utilizado, em todos os pacientes, como ferramenta auxiliar na definição das formas clínicas, sendo registrado de modo qualitativo (positivo ou negativo).

Os participantes foram distribuídos em grupos e os pacientes com hanseníase divididos segundo a classificação de Ridley e Jopling (1966).

- **Grupo polar TT (HANS):** constituído por pacientes com diagnóstico positivo para hanseníase e classificados nas formas clínicas TT e DT.
- **Grupo polar VV (HANS):** constituído por pacientes com diagnóstico positivo para hanseníase e classificados nas formas clínicas VV e DV.
- **Grupo de indivíduos não infectados (NI):** constituído por indivíduos saudáveis, que não apresentavam sinais clínicos da doença.
- **Grupo de contatos domiciliares (CONT):** constituído por indivíduos saudáveis, que não apresentavam sinais clínicos da doença, mas que conviviam com pessoas com diagnóstico positivo para hanseníase.

### 5.3.1 Cálculo amostral

De acordo com o desenho e objetivo geral do presente estudo, realizou-se o cálculo amostral mediante a comparação das diferenças máximas existentes entre médias ponderadas do fator de transcrição FOXP3 em sua avaliação de intensidade média de fluorescência (IMF). Escolheu-se o FOXP3 por ser uma molécula crítica na determinação da função e características das células T<sub>REGS</sub>. Consideraram-se, para a comparação das médias de FOXP3 (IMF), os cinco grupos do estudo: pacientes TT (n=5), pacientes VV (n=8), contatos de TT (n=4), contatos de VV (n=10) e indivíduos não infectados (n=15).

O teste utilizado foi o ANOVA One Way e o *software* Mini Tab 14. Considerou-se o nível de significância de 95% ( $\alpha = 0,05$ ) e o poder do estudo de 80% ( $\beta = 0,20$ ), tendo os dados de desvio padrão baseado na literatura ( $\sigma = 68,6$ ).

A máxima diferença entre as médias ponderadas de FOXP3 (IMF) entre os cinco grupo foi de 100 unidades de IMF. Diante disso, quando houvesse a comparação entre os cinco grupos e existisse uma diferença máxima que superasse valores de 100 unidades de IMF, o resultado seria considerado significativo.

A comparação das médias ponderadas dos cinco grupos determinaria o N amostral necessário para detectar diferenças significativas a partir do valor de 100 unidades de IMF, caso essa diferença exista na população. O N amostral mínimo necessário para se obter diferenças significativas foi de 13 participantes por grupo.

### 5.3.2 Critérios de inclusão

- Caso novo virgem de tratamento ( $\geq 18$  anos /  $\leq 75$  anos).
- Caso diagnosticado ou referenciado ao HEM, entre 2014 e 2015.
- Assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.
- Contato domiciliar de paciente caso novo de hanseníase.

### 5.3.3 Critérios de exclusão

- Pacientes com surto reacional no momento da coleta.
- Pacientes com comorbidade ou tratamento imunossupressor

## 5.4 Instrumento e coleta dos dados

Os dados do estudo foram padronizados por meio de um protocolo informatizado, criado no programa *MedQuest*. As variáveis clínicas foram determinadas mediante revisão da literatura dos estudos que envolviam a imunorregulação na hanseníase (QUADRO 1).

### Quadro 1 - Caracterização, classificação e modo de resposta das variáveis clínicas dos pacientes com hanseníase

Variável	Classificação	Resposta
Sexo	dicotômica	masculino / feminino
Idade	dicotômica	< 15 anos / > 15 anos
Classificação operacional	dicotômica	PB / MB
Forma clínica	qualitativa	I / TT / DT / DD / DV / VV
Índice baciloscópico	contínua	0 / 1+ / ... / 5+ / 6+
Baciloscopia	dicotômica	positiva / negativa
Teste de ML Flow	dicotômico	positivo / negativo

## 5.5 Organização e análise dos dados

### 5.5.1 Análise de marcadores de imunorregulação induzidos por células T<sub>REGS</sub>

O sangue periférico dos participantes foi coletado em tubo Vacuntainer estéril contendo heparina (Becton Dickinson, CA, USA). Alíquotas de 100µl de sangue total foram adicionadas em tubos de polipropileno de 5 mL (Falcon, E.U.A) previamente identificados e com os anticorpos correspondentes, como mostrado no Quadro 2 e, em seguida, incubados por 30 minutos à temperatura ambiente. Após incubação, as amostras foram lisadas e fixadas em 2mL de solução de lise comercial (FLS - BD, E.U.A) por 10 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. As células foram lavadas com 1mL de PBS-W e centrifugadas a 400g, por 10 minutos a 18°C.

Para detectar as moléculas intracelulares, foram acrescentados aos tubos 2,5mL de PBS-P (PBS, pH 7,4 contendo 0,5% de BSA, 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina) por 30 minutos à temperatura ambiente. Seguiu-se a adição de 20µL de anticorpos antimoléculas intracelulares (QUADRO 2) em PBS-P aos respectivos tubos, com incubação posterior por 60 minutos à temperatura ambiente, na ausência de luz. Após a incubação, as células foram lavadas com 1mL de PBS-W. No final, foram adicionados 300µl de solução fixadora (MFF). As amostras contendo suspensão celular foram utilizadas para aquisição de dados em citômetro de fluxo (FORTESSA - BD, E.U.A). Foram analisados cerca de 70.000 eventos totais.

**Quadro 2 - Relação e caracterização dos anticorpos utilizados para a imunofenotipagem *ex vivo* de células T<sub>REGS</sub>**

Nome	Fluorescência	Concentração	Clone	Função
CD4	V450	2,0uL	RPA-74	Identificação de linfócitos T auxiliares
CD25	APC	2,0uL	M-A251	Receptor de IL-2 e caracterização de T <sub>REGS</sub>
FOXP3	PECy7	3,0uL	236 <sup>a</sup> /E7	Fator de transcrição expresso por T <sub>REGS</sub>
CD39	PE	2,0uL	TÜ66	Ectoenzima que degrada ATP a AMP
CD73	FITC	2,0uL	AD2	Ectoenzima que degrada AMP em adenosina
CTLA-4	PE	2,0uL	BNI3	Molécula de superfície e modula ação de APC
PD-1	APCCy7	2,0uL	EH12.1	Receptor de PD-1L e indução de apoptose
PD-1L	PE	2,0uL	MIH1	Ligante de PD-1 e indução de apoptose
CD95	FITC	2,0uL	DX2	Receptor de CD95L e indução de apoptose
CD95L	PE	3,0uL	G247-4	Ligante de CD95 e indução de apoptose
Granzima A	PE	0,5uL	CB9	Fator intracelular e indução de apoptose
Granzima B	FITC	1,0uL	GB11	Fator intracelular e indução de apoptose
Perforina	PE	0,5uL	δG9	Fator intracelular e indução de apoptose
LAP	FITC	2,0uL	-	TGF-β em sua forma latente
TGF-β	PE	0,5uL	-	Citocina com ação inibitória
IL-10	PE	0,5uL	JES3-19F1	Citocina com ação inibitória

### 5.5.2 Obtenção e estratégia de análise dos dados

O citômetro de fluxo (FORTESSA - BD, E.U.A) utilizado neste trabalho é equipado com três lasers: azul (488nm), vermelho (640nm) e violeta (405nm). Isso permite a avaliação de 11 parâmetros: tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), fluorescência do tipo 1 (FL1); do tipo 2 (FL2); do tipo 3 (FL3); do tipo 4 (FL4); do tipo 5 (FL5); do tipo 6 (FL6); do tipo 7 (FL7); do tipo 8 (FL8); do tipo 9 (FL9). As FL1, FL2, FL3, FL4, FL5, FL6, FL7, FL8 e FL9 correspondem a sinais luminosos emitidos pela excitação de fluorocromos específicos. A identificação da população celular de interesse e seu percentual, foram feitas através do *software* FlowJo. Foram coletados cerca de 70.000 eventos totais para análise dos dados.

A análise de células T<sub>REGS</sub>, apresentada na Figura 10, foi realizada segundo o protocolo de Baecher-Allan *et. al.* (2001). Inicialmente, selecionou-se a população de linfócitos totais (R1) baseada em gráficos de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) (FIGURA 10A). Em seguida, gráficos de SSC versus CD4 (V450) foram construídos para determinar a população de linfócitos TCD4<sup>+</sup> (R2) (FIGURA 10B). Após a caracterização da população de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, criou-se gráficos de FOXP3 (PeCy7) versus CD25 (APC) e caracterizando, em seguida, as células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> (R3), a qual é alvo das investigações do presente estudo (FIGURA 10C). Por fim, foi pedido o gráfico de histograma dentro de R3 para os seguintes marcadores: CD39, CD73, CTLA-4, PD-1, PD-1L, CD95, CD95L, LAP, TGF-β, IL-10, granzima A, granzima B e perforina (FIGURA 10D).

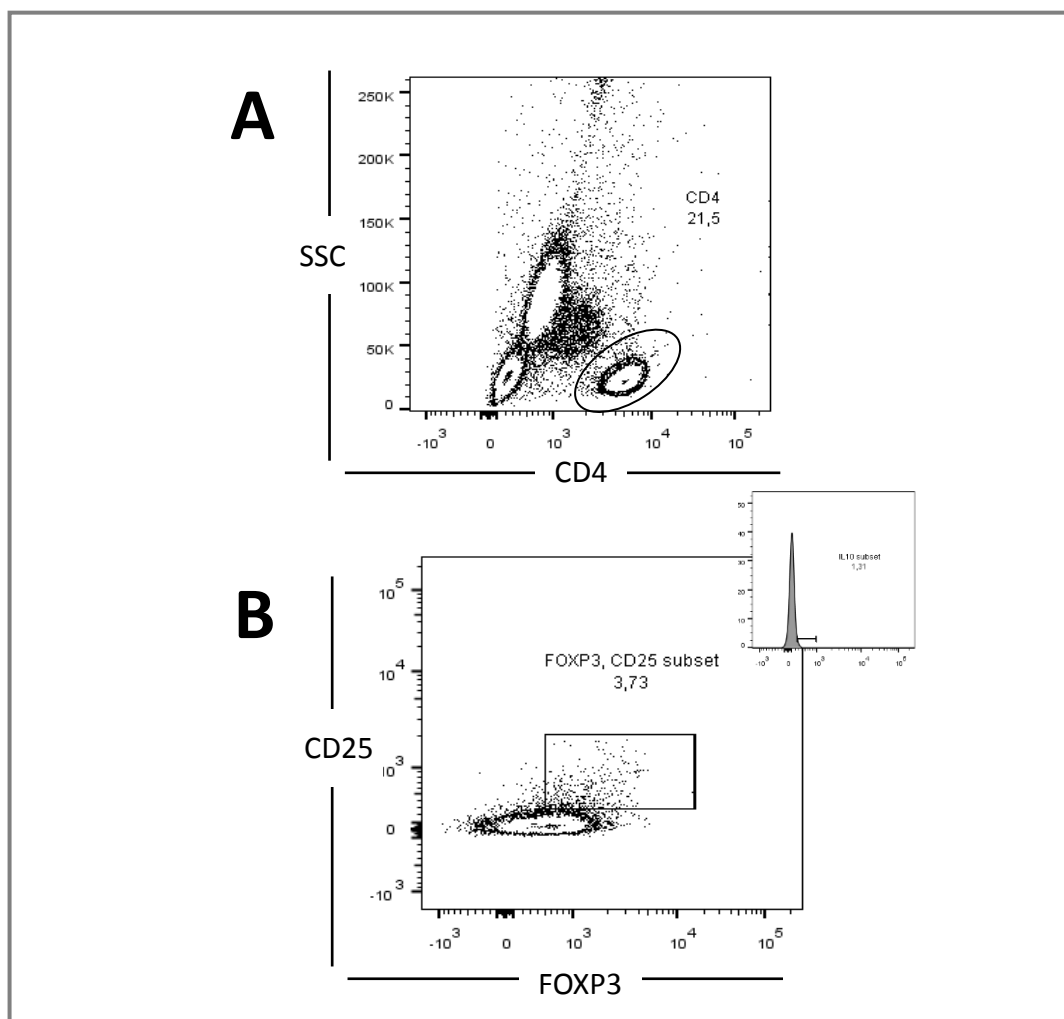
### 5.6 Análise estatística

Para garantir a confiabilidade dos resultados, todos os dados foram analisados por estatístico do Núcleo de Apoio em Bioestatística do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, da UFMG.

Inicialmente, foram realizadas análises descritivas das variáveis categóricas (sexo, classificação operacional, forma clínica, ML Flow e baciloscopia) e das variáveis contínuas (idade, IB), sendo descritos seus resultados em frequências e porcentagens.



**Figura 10 - Estratégia de análise de células T<sub>REGS</sub>, no contexto *ex vivo***



Legenda: a figura 10A representa o perfil celular de linfócitos obtido no contexto *ex vivo* em um gráfico de SSC versus CD4 (V450). A figura 10B representa um perfil celular obtido em um gráfico de distribuição pontual de CD25 (APC) versus FOXP3 (PECy7), abordagem utilizada para delimitar a população celular de interesse e mostra, também, o gráfico de histograma para verificar os níveis de expressão das moléculas.

Fonte: BAECHER-ALLAN *et al.*, 2001, p. 1247.

Para as moléculas, citocinas e fatores intracitoplasmáticos (variáveis contínuas) aplicou-se o Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk para determinar quais eram paramétricas ou não paramétricas. O teste ANOVA, que leva em consideração a média para comparações entre mais de dois grupos, foi realizado nas moléculas CD73 (%) e CD28 (IMF), consideradas paramétricas.

O Teste de Kruskal-Wallis, que leva em consideração a mediana para realizar comparações para mais de dois grupos, foi realizado nas moléculas não

paramétricas CD25/FOXP3, PD-1, PD-1L/PD-1 e GRANZIMA A, em sua avaliação de percentual, e para as moléculas CD25, FOXP3, IL-10, PD-1, PD-1L/PD-1, CD73, CD39/CD73, CD95L, CD95/95L e CTLA-4, em sua avaliação de IMF. Com intuito de realizar comparações múltiplas entre pares, para detectar diferenças significativas entre medianas, realizou-se o Teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni. Utilizou-se o programa estatístico SPSS versão 18.1 e considerou-se como resultados significativos o valor de  $p < 0,05$ .

Para as análises de correlações, realizou-se o cálculo do  $r$  de Spearman, sendo selecionados apenas os valores estatisticamente significativos, que foram transferidos para uma matriz de correlação. Esta matriz, além de calcular a intensidade da correlação e caracterizá-la como positiva ou negativa, também gera as tabelas para a leitura pelo programa *Cytoscape*<sup>TM</sup>, onde as redes de correlação são geradas e tratadas.

## 5.7 Aspectos éticos

A pesquisa foi aprovada pelo COEP da UFMG sob o parecer n° CAAE: 14887414.0.0000.5149 (ANEXO A), atendendo aos aspectos fundamentais da resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, que dispõe sobre as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas que envolvem seres humanos.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi assinado por todos os participantes do estudo, com intuito de esclarecer sobre os aspectos da pesquisa, bem como assegurar a confidencialidade das informações obtidas, cuja utilidade dar-se-á apenas para fins científicos (ANEXO B).

## 5.8 Pesquisa bibliográfica

A pesquisa bibliográfica foi realizada nas bases de dados do PubMed, Bireme, Scielo. Os Descritores em saúde/ *MeSH terms* utilizados nessas bases foram: “regulatory T cells”; “treg cells”; “leprosy” e “imunorregulation”. Os *sites* da OMS, WHO e Ministério da Saúde foram consultados para dados epidemiológicos.

## 6 RESULTADOS

Os dados obtidos no presente estudo serão apresentados na seguinte ordem: a) análise descritiva da população do estudo; b) análise de células T<sub>REGS</sub> no sangue periférico de indivíduos HANS nas formas clínicas polares, CONT e NI, no contexto *ex vivo*; c) análise do perfil fenotípico de células T<sub>REGS</sub> pela caracterização de moléculas associadas aos mecanismos imunorregulatórios de indivíduos HANS nas formas clínicas polares, CONT e NI, no contexto *ex vivo*; e) análise das correlações entre marcadores de imunossupressão induzidos por células T<sub>REGS</sub> em indivíduos HANS nas formas clínicas polares, CONT e NI, no contexto *ex vivo*.

### 6.1 Análise descritiva da população estudada

Participaram do estudo 42 indivíduos (TABELA 1). A classificação clínica dos casos novos de hanseníase foi baseada segundo os parâmetros de Ridley e Jopling (1966), que utiliza critérios clínicos, histológico, imunológicos e bacteriológicos. Dessa forma, a maioria dos pacientes foi incluída no grupo polar VV (n=8 / 19%). Em relação aos contatos domiciliares, a maior parte (n=10/ 23,8%) convivia com doentes que apresentavam a forma clínica VV ou a limítrofe DV.

Para compor o grupo controle, foram inclusos 15 indivíduos (35,8%) que não apresentavam sinais e sintomas clínicos da hanseníase. Compuseram este grupo, militares do Corpo de Bombeiros do Estado de Minas Gerais, os quais foram selecionados mediante parecer, da assessoria de assistência à saúde da referida Instituição, de estarem hígidos em relação à sua saúde.

**Tabela 1 - Distribuição dos participantes do estudo, segundo a classificação de Ridley e Jopling (1966), HEM, Belo Horizonte, MG, 2016**

<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Doentes TT	5	11,9
Doentes VV	8	19,0
Contatos de TT	4	9,5
Contatos de VV	10	23,8
Não infectados	15	35,7
<b>TOTAL</b>	<b>42</b>	<b>100</b>

Fonte: Hospital Eduardo de Menezes, 2014-2016.

A análise descritiva da população do estudo está apresentada na Tabela 2. As variáveis analisadas foram sexo, idade, classificação operacional, IB, baciloscopia e resultado do ML Flow, as quais foram coletadas no formulário-ficha dos participantes. A análise dos dados mostrou pareamento na variável sexo. A idade no grupo de doentes variou entre 51 e 60 anos (TT- n=1 / 2,3% e VV- n=3 / 7,1%); nos contatos domiciliares entre 21 e 30 anos (contato de VV- n=4 / 9,5%) e entre 41 e 50 anos (contato de VV- n=3 / 7,1%); e nos indivíduos NI entre 21 e 30 anos (NI- n=10 / 23,8%). A classificação operacional predominante foi a MB (n=8 / 19%), tendo o IB negativo predomínio nos pacientes (TT- n=4 / 9,5 e VV- n=3 / 7,1%). A maioria dos doentes (TT- n=3 / 7,1% e VV-5 / 11,9%) e contatos domiciliares (contato de TT- n=4 / 9,5 e contato de VV- n=10 / 23,8%) apresentou o teste de ML Flow negativo.

**Tabela 2 - Análise descritiva da população estudada, HEM, Belo Horizonte, MG, 2016**

Variável	Doente TT (N / %)	Doente VV (N / %)	Contato de TT (N / %)	Contato de VV (N / %)	Não infectados (N / %)
<b>Sexo</b>					
Masculino	3 (7,1)	4 (9,5)	2 (4,7)	5 (11,9)	8 (19,0)
Feminino	2 (4,7)	4(9,5)	2 (4,7)	5 (11,9)	7 (16,6)
<b>Idade</b>					
16-20	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (2,3)	1 (2,3)
21-30	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (9,5)	10 (23,8)
31-40	1 (2,3)	1 (2,3)	0 (0,0)	1 (2,3)	4 (9,5)
41-50	2 (4,7)	1 (2,3)	1 (2,3)	3 (7,1)	0 (0,0)
51-60	1 (2,3)	3 (7,1)	1 (2,3)	1 (2,3)	0 (0,0)
61-70	0 (0,0)	3 (7,1)	2 (4,7)	0 (0,0)	0 (0,0)
>70	1 (2,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<b>Class. Oper.</b>					
PB	5 (11,9)	0 (0,0)	-	-	-
MB	0 (0,0)	8 (19,0)	-	-	-
<b>IB</b>					
0	4 (9,5)	3 (7,1)	-	-	-
1	0 (0,0)	2 (4,7)	-	-	-
2	0 (0,0)	1 (9,4)	-	-	-
3	1(9,4)	0 (0,0)	-	-	-
4	0 (0,0)	2 (4,7)	-	-	-
<b>Baciloscopia</b>					
Negativa	4 (9,5)	3 (7,1)	-	-	-
Positiva	1 (2,3)	5 (11,9)	-	-	-
<b>ML Flow</b>					
Negativo	3 (7,1)	5 (11,9)	4 (9,5)	10 (23,8)	-
Positivo	2 (4,7)	3 (7,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	-

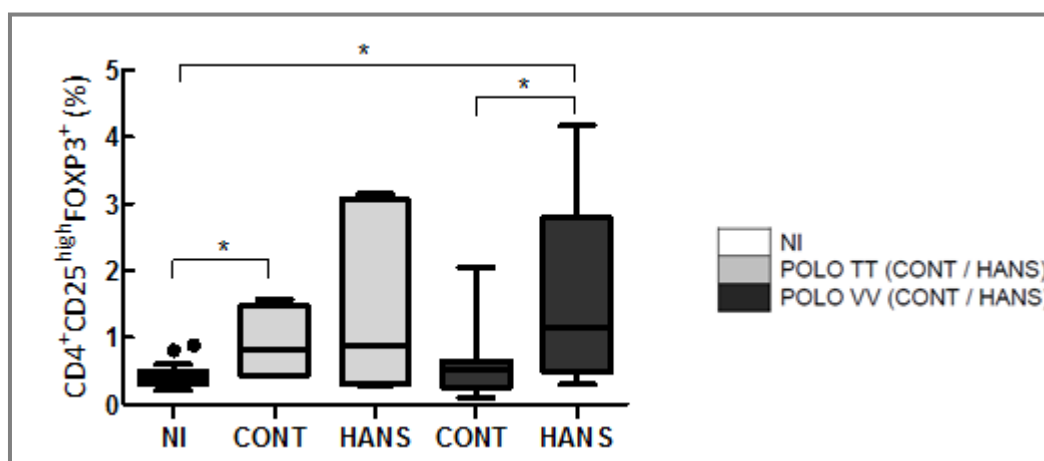
Fonte: Hospital Eduardo de Menezes, 2014-2016.

## 6.2 Análise do percentual de células T<sub>REGS</sub>, no contexto *ex vivo*

Observou-se associação entre diagnóstico positivo para hanseníase, independentemente da forma clínica e de ser contato domiciliar de caso índice, e maior frequência de células T<sub>REGS</sub> no sangue periférico (FIGURA 12).

A análise dos dados representados na Figura 12 mostra maior percentual de células T<sub>REGS</sub> no sangue periférico de indivíduos HANS do polo VV ( $p=0,007$ ) quando comparado aos indivíduos NI. Observou-se, também, maior quantidade de células T<sub>REGS</sub> em indivíduos CONT do polo TT ( $p=0,045$ ) em relação aos indivíduos NI. Verificou-se, ainda, que o percentual de T<sub>REGS</sub> foi significativamente maior nos indivíduos HANS do polo VV ( $p=0,041$ ) em relação a seus contatos domiciliares.

**Figura 11 - Análise do percentual de células T<sub>REGS</sub>**



Legenda: A análise do percentual de células T<sub>REGS</sub> foi realizada no sangue periférico de indivíduos HANS nas formas clínicas polares (HANS - TT,  $n=5$ ) e (HANS - VV,  $n=8$ ), indivíduos CONT (CONT - TT,  $n=4$ ) e (CONT - VV,  $n=10$ ), e de indivíduos NI (NI,  $n=15$ ), no contexto *ex vivo*. Os dados foram apresentados como porcentagem de células T<sub>REGS</sub>. Os gráficos destacam a mediana, o intervalo interquartil e os pontos destacam os valores considerados *outliers*. As diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas por linhas e pelo símbolo (\*).

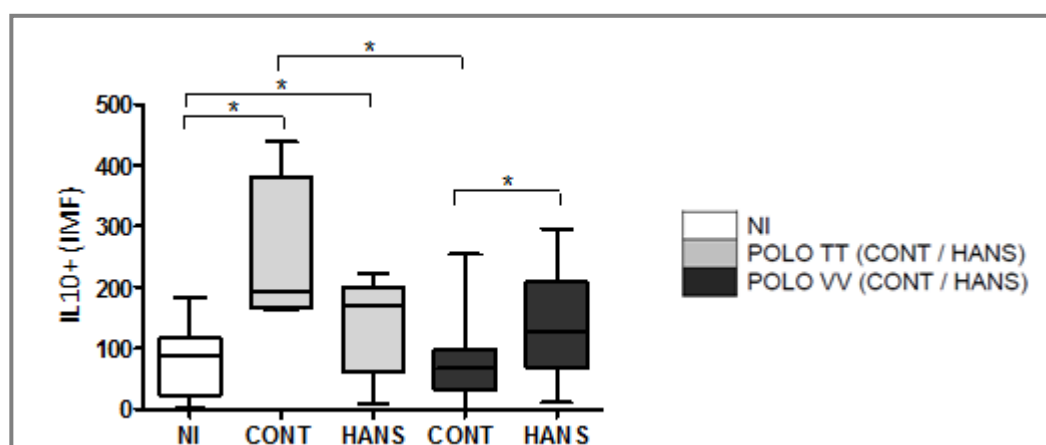
Fonte: Elaborada pelo autor, 2016.

### 6.3 Análise fenotípica de células T<sub>REGS</sub> através da caracterização de marcadores indutores de imunorregulação

#### 6.3.1 Caracterização das células T<sub>REGS</sub>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> quanto à expressão de citocinas inibitórias

Pela análise da intensidade média de fluorescência (IMF) de IL-10, observou-se que, de forma geral, ter hanseníase, independentemente da forma clínica, e ser contato domiciliar de indivíduos com hanseníase, associou-se com maior expressão dessa citocina pelas células T<sub>REGS</sub>. Notou-se, também, maior expressão de IL-10 em células T<sub>REGS</sub> de indivíduos HANS (p=0,016) e CONT (p=0,016) do polo TT em relação a indivíduos NI. Observou-se, ainda, maior expressão de IL-10 em células T<sub>REGS</sub> de indivíduos HANS do polo VV (p=0,021) em relação aos seus contatos. Por fim, houve maior expressão de IL-10 em células T<sub>REGS</sub> de indivíduos CONT do polo TT (p=0,016) em relação a indivíduos CONT do polo VV (FIGURA 12).

**Figura 12 - Análise da expressão da citocina IL-10 em células T<sub>REGS</sub>**

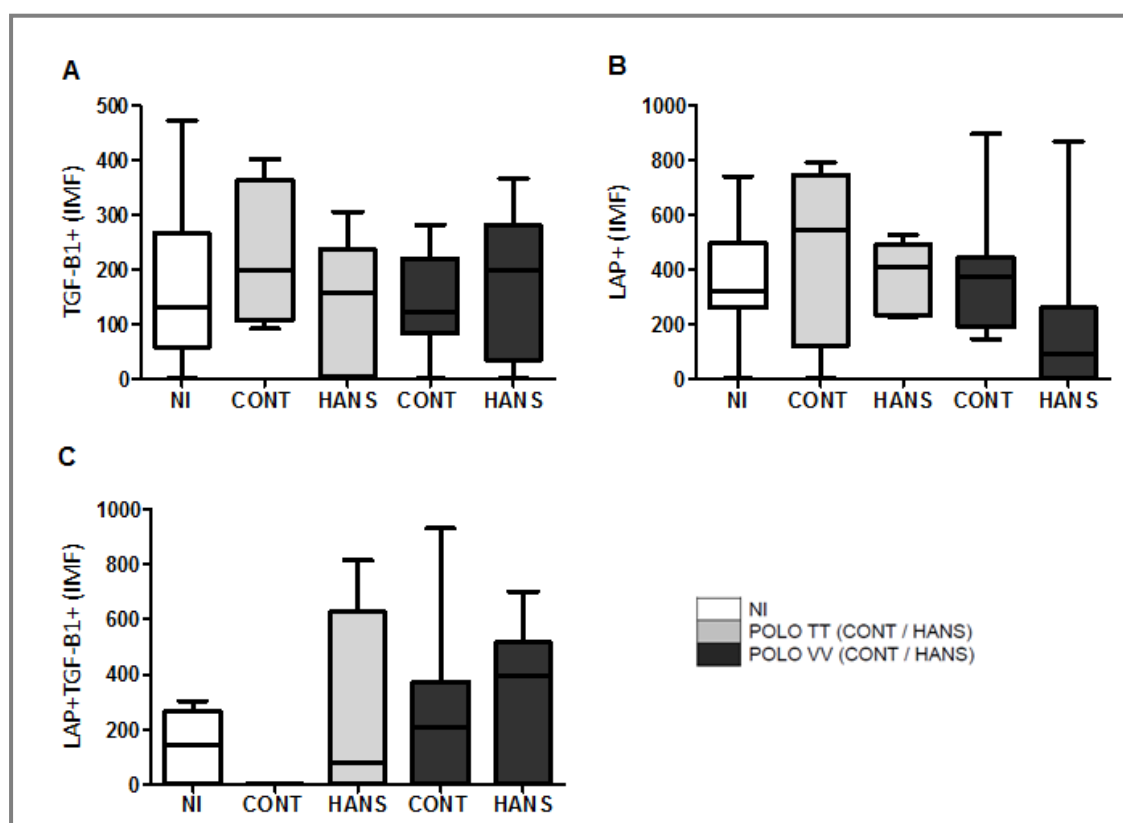


Legenda: A análise da expressão de IL-10 em células T<sub>REGS</sub> foi realizada no sangue periférico de indivíduos HANS nas formas clínicas polares (HANS - TT, n=5) e (HANS - VV, n=8), indivíduos CONT (CONT - TT, n=4) e (CONT - VV, n=10), e de indivíduos NI (NI, n=15), no contexto *ex vivo*. Os dados foram apresentados como IMF de IL-10 em células T<sub>REGS</sub>. Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças estatísticas significativas (p<0,05) estão representadas por linhas e pelo símbolo (\*).

Fonte: Elaborada pelo autor, 2016.

Pela análise da expressão da citocina TGF- $\beta$ 1 pelas células T<sub>REGS</sub>, observou-se que ter hanseníase, independentemente da forma clínica, e ser contato domiciliar de um caso índice associou-se com maior expressão dessa citocina (FIGURA 13A). Na avaliação da molécula LAP, forma latente da TGF- $\beta$ 1, observou-se maior expressão em células T<sub>REGS</sub> de indivíduos CONT e HANS do polo TT (FIGURA 13B). Já a avaliação de células T<sub>REGS</sub> duplo positivas para a molécula LAP e para a citocina TGF- $\beta$ 1 mostrou que ser indivíduo HANS e CONT do polo VV está relacionado com maior expressão de ambas (FIGURA 13C). Nenhuma avaliação apresentou resultados significativos.

**Figura 13 - Análise da expressão da citocina TGF- $\beta$ 1 e sua forma latente (LAP) em células T<sub>REGS</sub>**



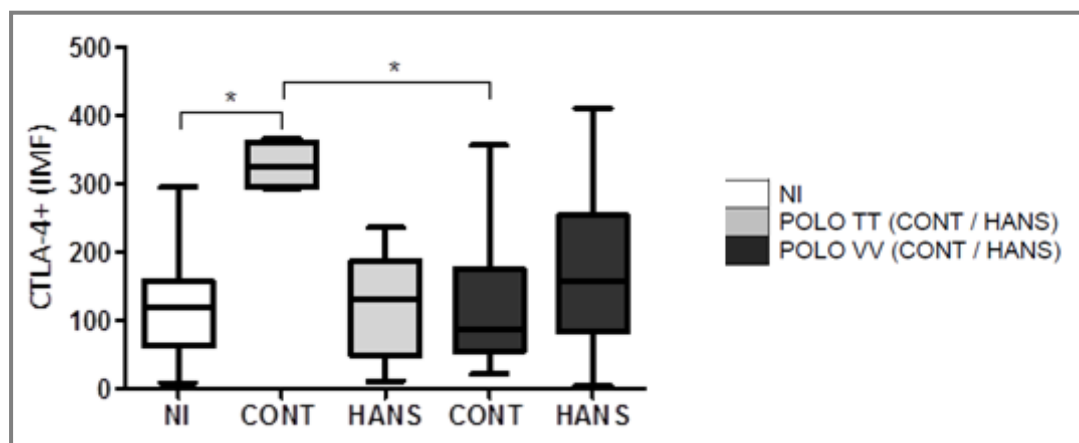
Legenda: A análise da expressão de TGF- $\beta$ 1 e de LAP em células T<sub>REGS</sub> foi realizada no sangue periférico de indivíduos HANS nas formas clínicas polares (HANS - TT, n=5) e (HANS - VV, n=8), indivíduos CONT (CONT - TT, n=4) e (CONT - VV, n=10), e de indivíduos NI (NI, n=15), no contexto *ex vivo*. (A) Representa a expressão de TGF- $\beta$  em células T<sub>REGS</sub>. (B) Representa a expressão da molécula LAP na superfície de células T<sub>REGS</sub>. (C) Representa as células T<sub>REGS</sub> duplo positivas para TGF- $\beta$  e LAP. Os dados foram apresentados como IMF de TGF- $\beta$  e LAP em células T<sub>REGS</sub>. Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas por linhas e pelo símbolo (\*).

Fonte: Elaborada pelo autor, 2016.

### 6.3.2 Caracterização das células $T_{REGS}$ $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$ quanto à expressão da molécula (CTLA-4) indutora de modulação da função de APCs e células efectoras

Na análise da expressão da molécula CTLA-4 na superfície de células  $T_{REGS}$ , verificou-se que, de modo geral, ter hanseníase, independentemente da forma clínica, e ser contato de um caso índice, associou-se com maior expressão dessa molécula. Notou-se que a expressão da molécula CTLA-4 foi significativamente maior em indivíduos CONT do polo TT ( $p=0,004$ ) em relação a indivíduos NI. Houve, também, maior expressão dessa molécula em indivíduos CONT do polo TT ( $p=0,016$ ) em relação a indivíduos CONT do polo VV (FIGURA 14).

**Figura 14 - Análise da expressão da molécula CTLA-4 em células  $T_{REGS}$**



Legenda: A análise da expressão da molécula CTLA-4 na superfície células  $T_{REGS}$  foi realizada no sangue periférico de indivíduos HANS nas formas clínicas polares (HANS - TT,  $n=5$ ) e (HANS - VV,  $n=8$ ), indivíduos CONT (CONT - TT,  $n=4$ ) e (CONT - VV,  $n=10$ ), e de indivíduos NI (NI,  $n=15$ ), no contexto *ex vivo*. Os dados foram apresentados como IMF de CTLA-4 em células  $T_{REGS}$ . Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas por linhas e pelo símbolo (\*).

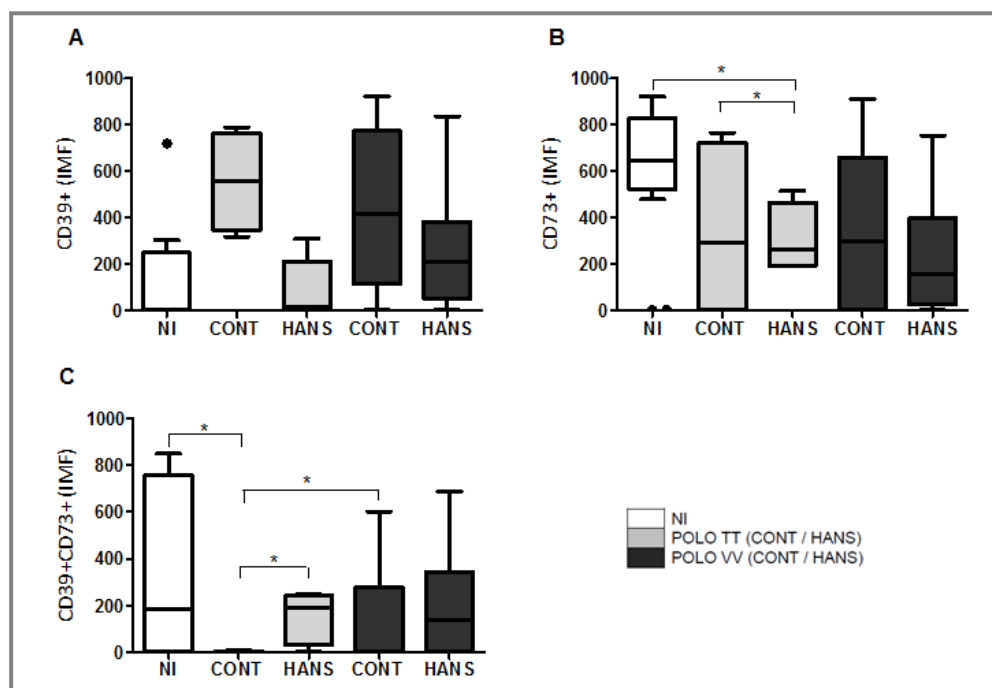
Fonte: Elaborada pelo autor, 2016.



### 6.3.3 Caracterização das células T<sub>REGS</sub> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> quanto à expressão de moléculas indutoras de interrupção de via metabólica

Na avaliação da expressão da molécula CD39 na superfície de células T<sub>REGS</sub>, observou-se associação de maiores valores com a forma clínica VV e ser contato de indivíduo com hanseníase, embora sem valores significativos (FIGURA 15A). Já em relação à expressão da molécula CD73, observou-se valor maior em indivíduos NI (p=0,001) e CONT do polo TT (p=0,014) em relação a indivíduos HANS do polo TT (FIGURA 15B). A análise de células T<sub>REGS</sub> duplo positivas para as moléculas CD39 e CD73 mostrou maior expressão em indivíduos NI (p=0,016), HANS do polo TT (p=0,027) e CONT do polo VV (p=0,023) em relação a indivíduos CONT do polo TT (FIGURA 15C).

**FIGURA 15 - Análise da expressão das moléculas CD39 e CD73 em células T<sub>REGS</sub>**



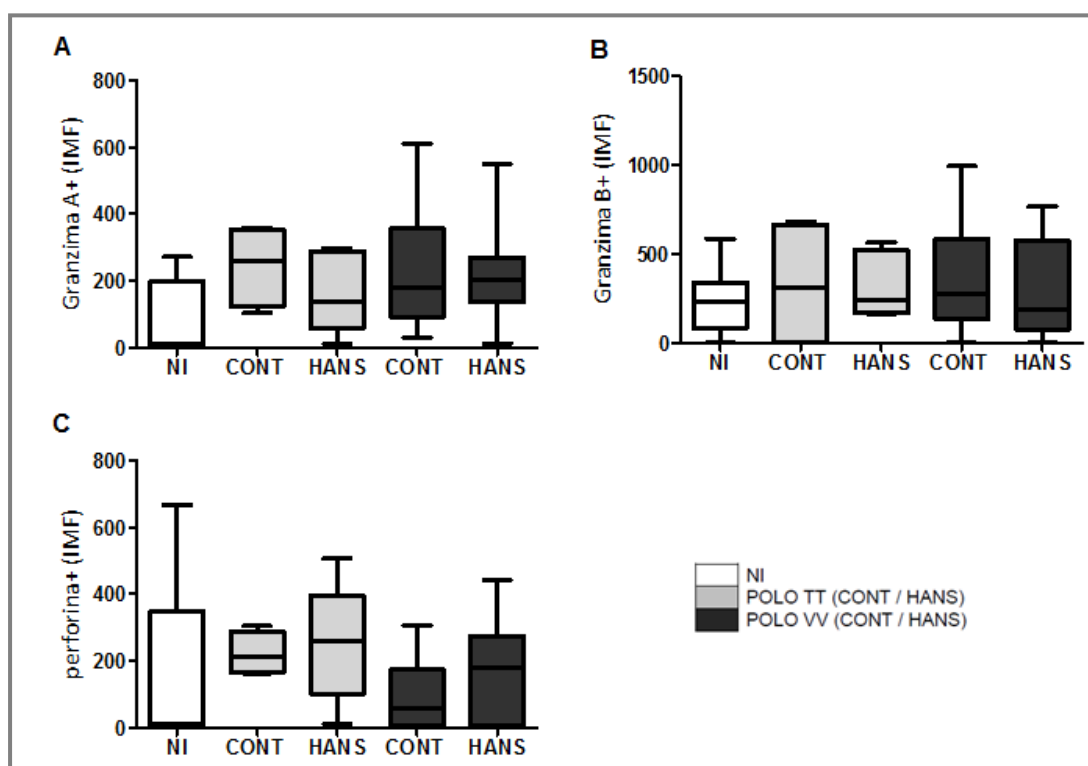
Legenda: A análise da expressão das moléculas CD39 e CD73 em células T<sub>REGS</sub> foram realizadas no sangue periférico de indivíduos HANS nas formas clínicas polares (HANS - TT, n=5) e (HANS - VV, n=8), indivíduos CONT (CONT - TT, n=4) e (CONT - VV, n=10), e de indivíduos NI (NI, n=15), no contexto *ex vivo*. A expressão das moléculas em células T<sub>REGS</sub> foi representada em (A) pela molécula CD39; em (B) pela molécula CD73 e em (C) pela expressão de células T<sub>REGS</sub> duplo positivas para CD39 e CD73. Os dados foram apresentados como IMF de CD39 e CD73 em células T<sub>REGS</sub>. Os gráficos destacam a mediana, o intervalo interquartil e os pontos destacam os valores considerados *outliers*. As diferenças significativas (p<0,05) estão representadas por linhas e pelo símbolo (\*).

Fonte: Elaborada pelo autor, 2016.

### 6.3.4 Caracterização das células $T_{REGS}$ $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$ quanto à expressão de moléculas indutoras de citólise

A avaliação da expressão dos fatores intracitoplasmáticos granzima A (FIGURA 16A), granzima B (FIGURA 16B) e perforina (FIGURA 16C) pelas células  $T_{REGS}$  mostrou que ter hanseníase, independentemente da forma clínica, e ser contato domiciliar de indivíduos com a doença associou-se com maior expressão desses fatores intracitoplasmáticos, mas sem nenhum resultado significativo na comparação entre os grupos.

**Figura 16 - Análise da expressão dos fatores intracitoplasmáticos granzima A, granzima B e perforina em células  $T_{REGS}$**



Legenda: A análise da expressão dos fatores intracitoplasmáticos granzima A, granzima B e perforina em células  $T_{REGS}$  foi realizada no sangue periférico de indivíduos HANS nas formas clínicas polares (HANS - TT, n=5) e (HANS - VV, n=8), indivíduos CONT (CONT - TT, n=4) e (CONT - VV, n=10), e de indivíduos NI (NI, n=15), no contexto *ex vivo*. A expressão dos fatores intracitoplasmáticos em células  $T_{REGS}$  foram representados em (A) pela granzima A; em (B) pela granzima B e em (C) pela perforina. Os dados foram apresentados como IMF de granzima A, granzima B, perforina em células  $T_{REGS}$ . Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas por linhas e pelo símbolo (\*).

Fonte: Fonte: Elaborada pelo autor, 2016.

### 6.3.5 Caracterização das células $T_{REGS}$ $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$ quanto à expressão de moléculas indutoras de apoptose

Pela avaliação da expressão da molécula PD-1L na superfície das células  $T_{REGS}$ , observou-se que em indivíduos CONT do polo TT a expressão dessa molécula é maior, quando se comparado a indivíduos NI; e em indivíduos HANS do polo VV a expressão dessa molécula aproxima-se da expressão vista em indivíduos NI, embora não se tenha encontrado resultados significativos (FIGURA 17A).

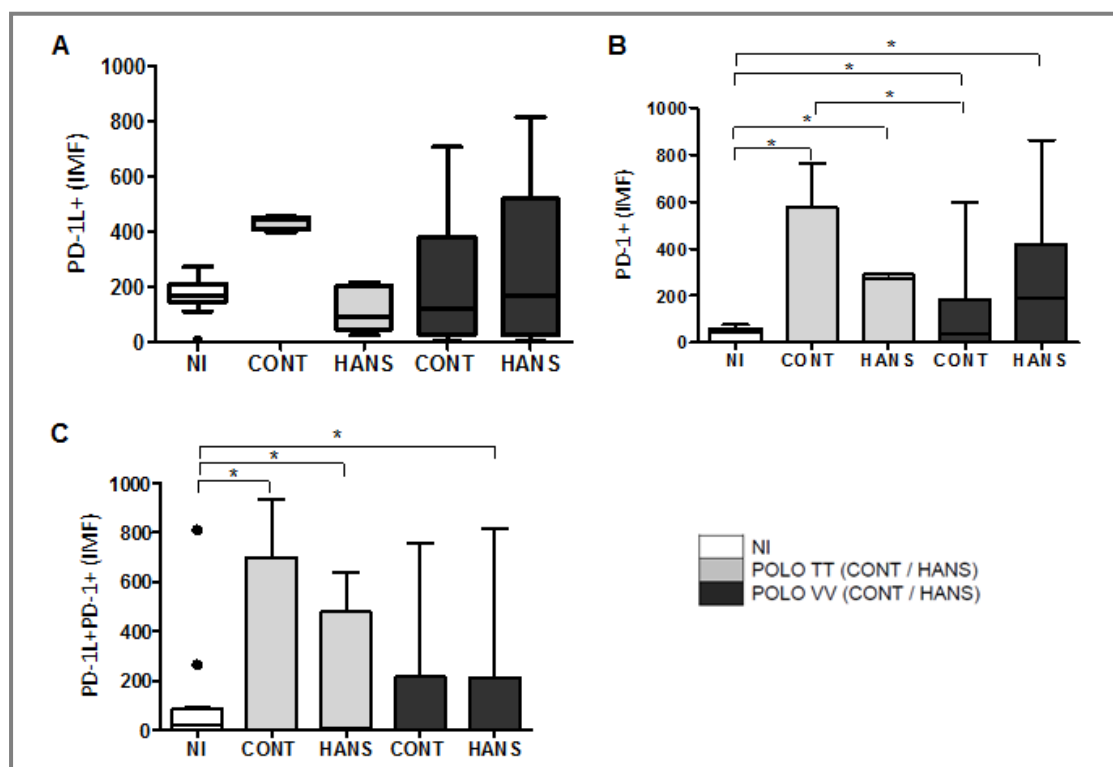
Já quanto à molécula PD-1, observou-se sua maior expressão em indivíduos HANS ( $p=0,000$ ) e CONT ( $p=0,020$ ) do polo VV, e HANS ( $p=0,001$ ) e CONT ( $p=0,002$ ) do polo TT em relação a indivíduos NI. Houve, ainda, maior expressão dessa molécula em indivíduos CONT do polo TT ( $p=0,011$ ) em relação a indivíduos CONT do polo VV (FIGURA 17B).

Na avaliação das células  $T_{REGS}$  duplo positivas para as moléculas PD-1 e PD-1L, observou-se maior expressão em indivíduos HANS do polo TT ( $p=0,002$ ) e VV ( $p=0,000$ ) em relação a indivíduos NI. Houve, também, maior expressão em indivíduos CONT do polo TT ( $p=0,002$ ) em relação a indivíduos NI (FIGURA 17C).

Na avaliação da expressão da molécula CD95 na superfície de células  $T_{REGS}$  não foram encontrados resultados significativos, quando comparado os grupos (FIGURA 18A).

Já para molécula CD95L, observou-se que, independentemente da forma clínica, ter hanseníase associou-se com maior expressão dessa molécula em indivíduos HANS do polo TT ( $p=0,008$ ) e VV ( $p=0,003$ ) em relação a indivíduos NI (FIGURA 18B). Verificou-se, também, maior expressão dessa molécula em indivíduos CONT do polo TT ( $p=0,046$ ) em relação aos NI, assim como em indivíduos HANS do polo VV ( $p=0,050$ ) em relação a indivíduos CONT do polo VV.

**Figura 17 - Análise da expressão das moléculas PD-1 e PD-1L em células T<sub>REGS</sub>**

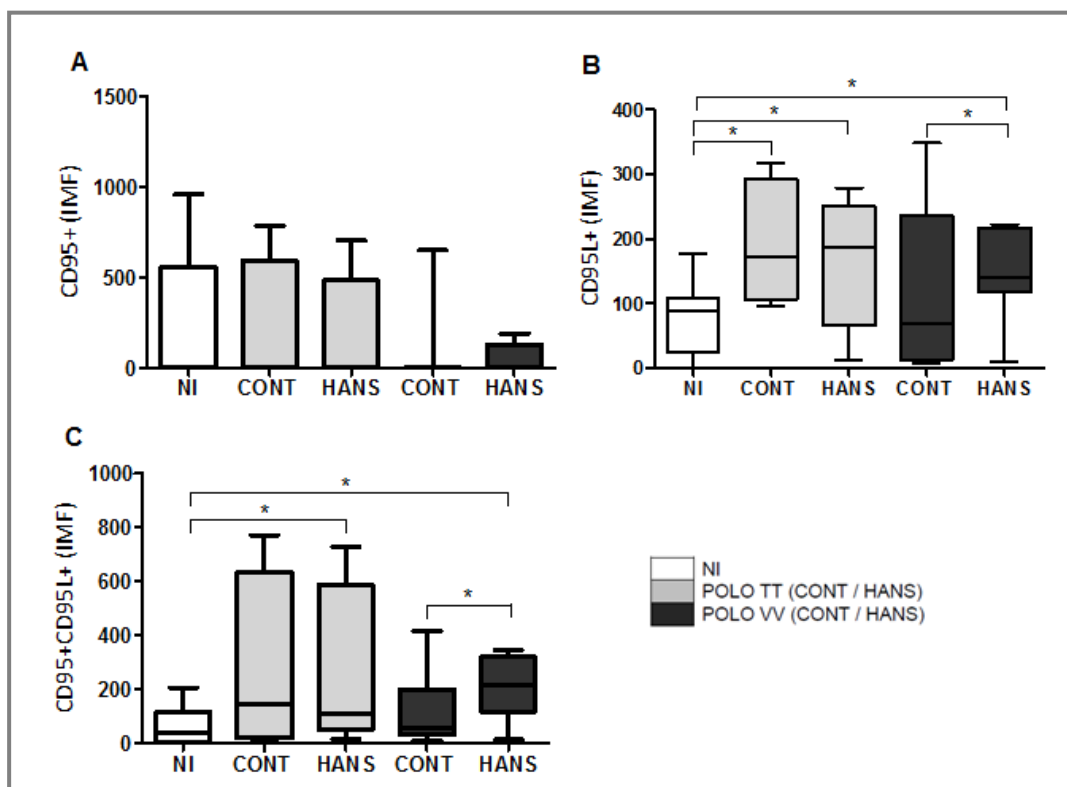


Legenda: A análise da expressão das moléculas PD-1 e PD-1L na superfície de células T<sub>REGS</sub> foi realizada no sangue periférico de indivíduos HANS nas formas clínicas polares (HANS - TT, n=5) e (HANS - VV, n=8), indivíduos CONT (CONT - TT, n=4) e (CONT - VV, n=10), e de indivíduos NI (NI, n=15), no contexto *ex vivo*. A expressão das moléculas em células T<sub>REGS</sub> foram representados em (A) por PD-1L; em (B) por PD-1 e em (C) por células T<sub>REGS</sub> duplo positivas para PD-1 e PD-1L. Os dados foram apresentados como IMF de PD-1 e PD-1L em células T<sub>REGS</sub>. Os gráficos destacam a mediana, o intervalo interquartil e os pontos destacam os valores considerados *outliers*. As diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas por linhas e pelo símbolo (\*).

Fonte: Elaborada pelo autor, 2016.

Na análise de células T<sub>REGS</sub> duplo positivas para as moléculas CD95 e CD95L verificou-se que, independentemente da forma clínica, ter a hanseníase associou-se com maior expressão dessas moléculas em indivíduos HANS do polo TT ( $p=0,020$ ) e VV ( $p=0,001$ ) em relação a indivíduos NI (FIGURA 18C). Houve, também, maior expressão dessas moléculas em indivíduos HANS do polo VV ( $p=0,033$ ) em relação a indivíduos CONT do polo VV.

Figura 18 - Análise da expressão das moléculas CD95 e CD95L em células T<sub>REGS</sub>



Legenda: A análise da expressão de CD95 e CD95L na superfície de células T<sub>REGS</sub> foi realizada no sangue periférico de indivíduos HANS nas formas clínicas polares (HANS - TT, n=5) e (HANS - VV, n=8), indivíduos CONT (CONT - TT, n=4) e (CONT - VV, n=10), e de indivíduos NI (NI, n=15), no contexto *ex vivo*. A expressão das moléculas em células T<sub>REGS</sub> foram representados em (A) pela molécula CD95; em (B) pela molécula CD95L e em (C) por células T<sub>REGS</sub> duplo positivas para CD95 e CD95L. Os dados foram apresentados como IMF de CD95 e CD95L em células T<sub>REGS</sub>. Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. As diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas por linhas e pelo símbolo (\*).

Fonte: Elaborada pelo autor, 2016.

#### 6.4 Análise das correlações entre marcadores de imunossupressão induzidos por células T<sub>REGS</sub>, no contexto *ex vivo*

A análise de correlação permite avaliar os dados de uma forma conjunta, integrando resultados de diversas análises para a geração de redes de intercâmbio de dados. Isto significa que, apesar da subjetividade inerente a este tipo de análise, as redes possibilitam uma visão geral da interação entre resultados de diferentes abordagens. A construção das redes é feita com base nos valores de  $r$  do Teste de Spearman que apresentaram significância estatística na análise de correlação de dados. Foram correlacionados dados da imunofenotipagem *ex vivo* e citocinas intracitoplasmáticas.

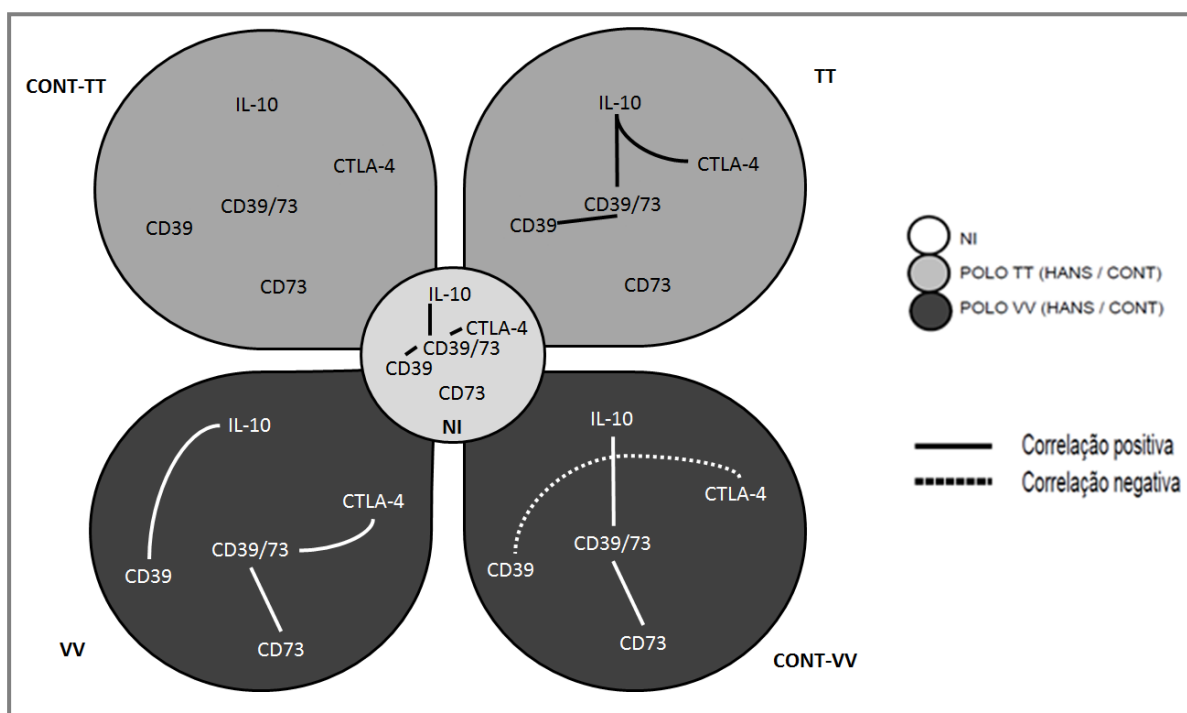
A Figura 19 apresenta a análise das correlações dos marcadores de imunorregulação de células T<sub>REGS</sub> (IL-10, CD39, CD73, CTLA4) entre os grupos estudados. Esses marcadores representam os mecanismos de: ação de citocinas inibitórias, interrupção de via metabólica e indução de anergia de APCs.

Na avaliação de indivíduos NI, observou-se que houve correlação positiva e significativa entre a citocina IL-10 e as moléculas CD39-CD73 ( $p=0,014$ ) e, destas, com a molécula CTLA-4 ( $p=0,033$ ).

Na avaliação do polo TT, observou-se que apenas os indivíduos HANS apresentaram correlações positivas e significativas entre a citocina IL-10 e as moléculas CD39-CD73 ( $p=0,037$ ) e CTLA-4 ( $p=0,037$ ). Entretanto, na avaliação do polo VV, somente parte desses mecanismos que apresentaram correlações significativas, tendo correlação entre IL-10 e CD39-CD73 ( $p=0,042$ ) em indivíduos CONT; e correlação entre CD39-CD73 e CTLA4 ( $p=0,028$ ) em indivíduos HANS.

Diante dos resultados, parece-nos ser possível pensar que, no polo TT, as células T<sub>REGS</sub> utilizariam mecanismos para limitar a ação de células efectoras, regulando a ação dessas células, mas não a intensidade de resposta. Por outro lado, a associação das correlações dessas moléculas com o alto percentual de células T<sub>REGS</sub>, presente nesse polo VV, poderia estar relacionado com a supressão das células efectoras, o que permitiria a viabilidade do bacilo na célula infectada e a persistência da doença.

**Figura 19 - Rede de correlações entre as moléculas CD39, CD73, CTLA-4 e a citocina IL-10 em células T<sub>REGS</sub>**

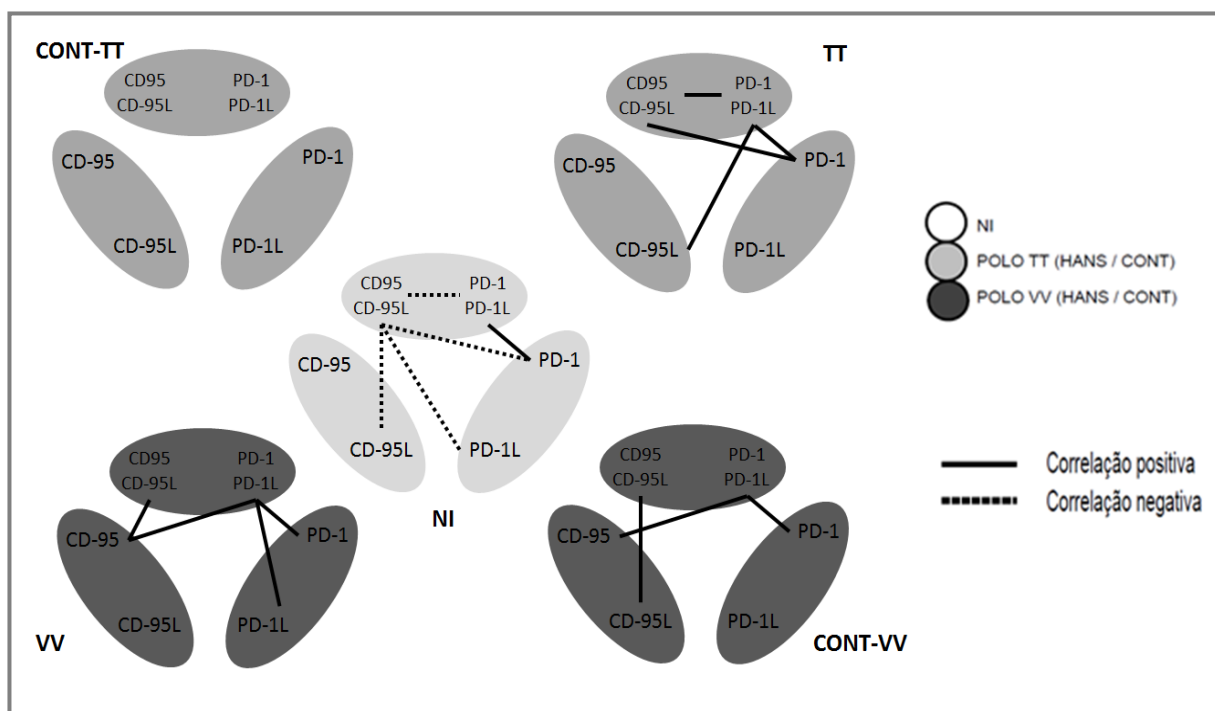


Legenda: A análise da rede de correlações entre as moléculas CD39, CD73, CTLA-4 e a citocina IL-10 na superfície de células T<sub>REGS</sub> foi realizada no sangue periférico de indivíduos HANS nas formas clínicas polares (HANS - TT, n=5) e (HANS - VV, n=8), indivíduos CONT (CONT - TT, n=4) e (CONT - VV, n=10), e de indivíduos NI (NI, n=15), no contexto *ex vivo*. As linhas contínuas representam as correlações positivas e estatisticamente significativas. As linhas tracejadas representam as correlações negativas e estatisticamente significativas.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

A Figura 20 apresenta a análise das correlações dos marcadores de imunorregulação de células T<sub>REGS</sub> (CD95, CD95L, PD-1, PD-1L) entre os grupos estudados. Esses marcadores representam o mecanismo de indução de apoptose.

**Figura 20 - Rede de correlações entre as moléculas CD95, CD95L, PD-1, PD-1L em células T<sub>REGS</sub>**



Legenda: Rede de correlações entre marcadores de apoptose CD95, CD95L, PD-1 e PD-1L em células T<sub>REGS</sub> no sangue periférico de pacientes com hanseníase nas formas polares (HANS - TT, N=5) e (HANS - VV, N=8), contatos domiciliares (CONT - TT, n=4) e (CONT - VV, N=10) e indivíduos não infectados (NI, N=15), no contexto *ex vivo*. As linhas contínuas representam correlações positivas e as tracejadas representam as negativas. Todas as correlações representadas apresentaram diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

Na avaliação do polo TT pode-se observar que somente indivíduos HANS que apresentaram correlações significativas entre as moléculas CD95L-CD95 e PD-1-PD-1L ( $p=0,037$ ), CD95-CD95L e PD-1 ( $p=0,037$ ), CD95 e PD-1-PD-1L ( $p=0,037$ ) e PD-1 e PD-1-PD-1L ( $p=0,037$ ).



## 7 DISCUSSÃO

A hanseníase é uma doença multifatorial e que apresenta manifestações imunológicas e clínicas bem distintas. É influenciada por fatores genéticos do hospedeiro, fatores ambientais e pelo tempo de exposição ao bacilo, o qual induz uma vigorosa resposta imune (SCOLLARD *et al.*, 2006; MORAES *et al.*, 2006).

O tipo de resposta imune montada frente à infecção pelo bacilo é fundamental para determinar o curso da doença (REA; MODLIN, 2010). Na infecção pelo *M. leprae*, a variedade da expressão da resposta imune associa-se ao desenvolvimento de formas clínicas com distribuição espectral, sendo que, no polo TT ocorre predomínio de resposta imune do tipo Th1 e produção de citocinas pró-inflamatórias, enquanto que o polo VV associa-se à resposta do tipo Th2 e produção de citocinas anti-inflamatórias (MENDONÇA *et al.*, 2008).

Além da polarização em Th1 / Th2 observada entre as formas clínicas, estudos mais recentes mostram que células T<sub>REGS</sub> podem estar relacionadas à hiporresponsividade imune observada em pacientes da forma clínica VV (BRITTON; LOCKWOOD, 2004; ROOK *et al.*, 2004).

As células T<sub>REGS</sub> compõem de 1% a 2% de linfócitos TCD4+ (BAECHER-ALLAN *et al.*, 2001). São células que coexpressam altos níveis da molécula CD25 (SAKAGUCHI *et al.*, 1995) e o fator de transcrição FOXP3, o qual está relacionado com o desenvolvimento e sua função das células T<sub>REGS</sub> (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003).

As células T<sub>REGS</sub> são responsáveis pela manutenção da tolerância periférica e da homeostasia. A primeira consiste em um estado de tolerância imunológica alcançada pela supressão de células auto-reativas e pela indução de hiper-responsividade em linfócitos que encontram antígenos, mas não há sinais co-estimulatórios. A segunda consiste na capacidade de reconhecimento de antígenos próprios e em criar uma resposta imune competente para antígenos não próprios.

Em infecções crônicas, a ativação de células T<sub>REGS</sub> é importante para prevenir o dano tecidual que pode ser provocado pela resposta imune. Por outro lado, caso o controle por células T<sub>REGS</sub> seja exacerbado, isso pode contribuir para o crescimento e persistência do patógeno (BELKAID *et al.*, 2008).

As células T<sub>REGS</sub> utilizam vários mecanismos para manter sua função imunorreguladora. Entretanto, não está claro se essas células utilizam programas universais ou adaptados para limitar a resposta imune (JOSEFOWICZ, LU, RUDENSKY, 2012). Na hanseníase, apesar de indícios da participação das T<sub>REGS</sub> na imunorregulação da resposta imune, o seu papel ainda não foi completamente estabelecido. Assim, no presente estudo buscou-se avaliar a expressão de marcadores de imunossupressão induzidos por células T<sub>REGS</sub> no sangue de pacientes com formas clínicas polares da hanseníase, contatos domiciliares e indivíduos não infectados.

Observou-se maior frequência de células T<sub>REGS</sub> em indivíduos HANS do polo VV (p=0,007) e indivíduos CONT TT (p=0,045) quando comparado a indivíduos NI, corroborando os estudos de Attia *et al.* (2010), Kumar *et al.* (2013, 2014), Abdallah *et al.* (2014) e de Attia *et al.* (2014), que observaram maior frequência de células T<sub>REGS</sub> em indivíduos com forma clínica VV.

Já na comparação entre as formas clínicas, observou-se maior percentual de células T<sub>REGS</sub> em indivíduos HANS do polo VV do que em indivíduos HANS do polo TT, apesar de não haver diferenças significativas entre as formas clínicas. Dados semelhantes foram encontrados por Kumar *et al.* (2013, 2014), Palermo *et al.* (2012), Fernandes *et al.* (2013), Saini *et al.* (2014) e Sadhu *et al.* (2016), que observaram maior frequência de células T<sub>REGS</sub> em pacientes com forma clínica VV. A presença de células T<sub>REGS</sub> em pacientes com forma clínica VV, sugere que essas células influenciam a supressão da resposta imune e, conseqüentemente, a hiporresponsividade nesses pacientes.

Entretanto, os estudos de Attia *et al.* (2010, 2014) e Abdallah *et al.* (2014) mostraram maior frequência de células T<sub>REGS</sub> em pacientes com forma TT, quando comparados com pacientes com forma VV.

Nossos dados sugerem que ter diagnóstico positivo para hanseníase, independentemente da forma clínica, e ser contato domiciliar de um caso índice associe-se com maior frequência dessas células. Estudos epigenéticos relacionados a alterações no gene do FOXP3 mostraram que o *M. leprae* pode induzir alterações na expressão desse gene, refletindo em maior expressão e estabilidade do FOXP3 em células T<sub>REGS</sub> (CHEN *et al.*, 2006a; LI *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2009a; KUMAR *et al.*, 2014).

Vários mecanismos imunossupressores utilizados pelas células T<sub>REGS</sub> tem sido descritos tais como citocinas inibitórias, modulação de APCs e células efectoras, interrupção de via metabólica, citólise e indução de apoptose (VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008). A melhor definição desses mecanismos é importante, fornecendo informações sobre os processos de controle da tolerância periférica e possíveis alvos terapêuticos.

Com relação ao mecanismo de imunorregulação induzido pela secreção de citocinas, avaliamos, neste estudo, a expressão de IL-10, TGF- $\beta$  e a molécula LAP (forma latente de TGF- $\beta$ ). Não observamos diferença estatística na expressão de TGF- $\beta$  e LAP nos grupos avaliados.

Attia *et al.* (2014) observaram maior frequência de células T<sub>REGS</sub> expressando TGF- $\beta$  em indivíduos HANS, independentemente da forma clínica, quando comparados com indivíduos NI. Por outro lado, Saini *et al.* (2014) e Kumar *et al.* (2013) notaram maior frequência de células T<sub>REGS</sub>TGF- $\beta$ <sup>+</sup> em pacientes HANS do polo VV, quando comparados aos pacientes HANS do polo TT e contatos domiciliares, sugerindo que o ambiente enriquecido com TGF- $\beta$ , uma citocina inibitória, possa estar envolvido na alteração da sinalização da resposta imune efectora, ao modular a função de células efectoras, e auxiliando, assim, na sobrevivência do *M. leprae* e persistência da doença.

Quanto à expressão de IL-10 em células T<sub>REGS</sub>, observou-se que indivíduos HANS e indivíduos CONT do polo TT apresentam maior expressão dessa citocina em relação aos indivíduos NI. Attia *et al.* (2014) encontraram maior expressão de IL-10 em T<sub>REGS</sub> de pacientes com hanseníase, quando comparados a indivíduos NI, sugerindo que níveis elevados dessa citocina possa contribuir para o desenvolvimento da doença. Apesar de não termos observado diferenças entre as formas clínicas, indivíduos HANS do polo TT apresentam maior tendência das células T<sub>REGS</sub> expressarem IL-10 quando comparados aos indivíduos HANS do polo VV. Esses dados sugerem que as células T<sub>REGS</sub>IL-10<sup>+</sup> exercem papel importante no controle da resposta imune efectora induzida pelo *M. leprae*, ao inibir a proliferação e a ação citolítica de células que induzem uma resposta imune do tipo Th1.

Dados de Palermo *et al.* (2012), Saini *et al.* (2014) e Sadhu *et al.* (2016) divergem dos dados apresentados, já que, após estímulo, observaram elevação na expressão de IL-10 por células T<sub>REGS</sub> em pacientes com a forma clínica VV, quando comparados aos pacientes TT e contatos domiciliares, sugerindo que o aumento na expressão de IL-10 no polo VV possa estar relacionado com a característica imunossuprimida dessa forma clínica.

Outro mecanismo de imunorregulação mediado pelas células T<sub>REGS</sub> relaciona-se com a indução da modulação de APCs e em células efetoras através da expressão de CTLA-4. Não verificamos diferença significativa em células T<sub>REGS</sub> expressando CTLA-4 de indivíduos HANS, quando comparados aos indivíduos NI.

Indivíduos HANS do polo TT apresentaram maior frequência de células T<sub>REGS</sub> expressando CTLA-4 quando comparados aos indivíduos NI e CONT do polo VV. Os dados sugerem que as células T<sub>REGS</sub> desses indivíduos estão preparadas para montar uma resposta imune mais efetiva e autorregulada no caso da presença do bacilo. Apesar de não termos observado diferença na expressão dessa molécula nas células T<sub>REGS</sub>, verificamos correlação significativa e positiva entre IL-10 e CTLA-4 no polo TT (HANS e CONT). Os dados sugerem que essas moléculas atuam conjuntamente, induzindo a modulação em células efetoras e APCs.

Nossos achados discordam dos relatos de Kumar *et al.* (2011) e de Palermo *et al.* (2012) que, ao avaliarem a expressão de CTLA-4 em tecido lesionado, encontraram maior expressão dessa molécula em pacientes com a forma clínica VV, quando comparados a pacientes com forma clínica TT. Além disso, Kumar *et al.* (2011) observaram que a maior expressão de TGF- $\beta$  e CTLA-4 relacionava-se com aumento de CBL-B (proteína que atua na regulação negativa de células T) em pacientes com forma clínica VV, sugerindo que as células T<sub>REGS</sub>, coexpressando essas moléculas, contribui para a hiporresponsividade de células T no polo VV.

Em relação ao mecanismo de imunorregulação por interrupção de via metabólica, através da expressão das moléculas CD39 e CD73, leva como produto final à formação de adenosina que se liga ao receptor A2A em células efetoras, reduzindo a sinalização via TCR e produção de IL-2. Para que as células T<sub>REGS</sub> exerçam essa função supressora, é necessária a ação concomitante das duas moléculas, uma vez que a molécula CD39 é responsável pela hidrólise de ATP

extracelular, formando ADP ou AMP, enquanto a molécula CD73 é responsável por degradar AMP, formando adenosina (VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008).

Dyer *et al.* (2007) afirmam que células T<sub>REGS</sub> de ratos deficientes na expressão de CD39 tem disfunção reguladora manifestando-se como uma diminuição de 50% na capacidade de modular a função das células T efetoras *in vitro* e *in vivo*, sugerindo que a molécula CD39 seria a principal ectonucleotidase responsável pela geração de adenosina e que a sinergia do eixo CD39/CD73 pode contribuir para a função imunorreguladora das células T<sub>REGS</sub>.

No presente estudo, não se observou diferença significativa na expressão isolada de CD39 e de CD73 em células T<sub>REGS</sub> de indivíduos HANS. Contudo, ao se analisar a coexpressão dessas moléculas nas células T<sub>REGS</sub>, observou-se que indivíduos com HANS do polo TT expressavam níveis elevados. Vale ressaltar, ainda, que nesses indivíduos, observamos correlação positiva entre a expressão de IL-10 e CD39<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> em células T<sub>REGS</sub> dos pacientes TT. Esses dados sugerem outro mecanismo exercido pelas células T<sub>REGS</sub> para controlar a exacerbação da resposta imune induzida, presente no polo TT da doença, já que segundo Geluk *et al.* (2014) a redução da expressão de CD39 em células T<sub>REGS</sub> de indivíduos com HANS associava-se com a presença de surtos reacionais pela perturbação da regulação e indução de citocinas inflamatórias.

Em se tratando do mecanismo de imunorregulação por citólise, por meio da indução de granzimas A, granzima B e perforina, não encontramos qualquer diferença significativa na expressão dessas moléculas em células T<sub>REGS</sub> dos indivíduos estudados. Esses dados podem sugerir que o mecanismo de citólise induzido pelas células T<sub>REGS</sub> no contexto *ex vivo* não seja tão efetivo para a supressão da resposta imune, já que não foram encontrados resultados significativos. Entretanto, ressalta-se que o N amostral do presente estudo possa ter influenciado na falta de resultados estatísticos significativos para essas moléculas.

A ação dessas moléculas para suprimir a resposta imune induzida pelo bacilo poderia ser mais efetiva ou evidenciada se essas células fossem estimuladas na presença do *M. leprae*, já que pela cronicidade da doença, os estímulos que as células recebem são reduzidos. Assim, ao reestimar as células com antígenos do *M. leprae* observaríamos uma resposta mais rápida e efetiva, já que estaríamos lidando com uma resposta imune secundária e células de memória. Nesse sentido, poderíamos notar influência dessas moléculas no controle da resposta imune.

De fato, DCs infectadas pelo *M. leprae* na presença de estimulação *in vitro* com antígeno de LipoK (um lipopeptídeo do bacilo) induz expressão elevada de granzima B e perforina em células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>, sugerindo que a Lipok pode direcionar a morte do bacilo *in vitro* por induzir a expressão das moléculas efetoras granzima B e perforina por células T (MAEDA *et al.*, 2011).

Sabe-se que a expressão de granzimas A, B e perforina são diferencialmente encontradas em sub-populações de linfócitos T (BADE *et al.*, 2005). Nesse sentido, Garcia-Laorden *et al.* (2015), mostraram que pacientes com tuberculose pulmonar apresentavam alta expressão de granzimas A e B em linfócitos TCD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, mas não em células NK, quando comparado a controles. Esses dados sugerem que as granzimas A e B participam da resposta imune na tuberculose. Por ser uma doença causada por uma micobactéria, pode-se acreditar que esse mecanismo, também, possa ser um meio de atuação das células T<sub>REGS</sub> na imunorregulação da resposta imune na hanseníase.

Por fim, tem-se investigado a possibilidade de as células T<sub>REGS</sub> utilizarem o mecanismo de imunorregulação por indução de apoptose mediante participação das moléculas CD95, PD-1 e seus ligantes. A apoptose, ou morte celular programada, impõe um grau de controle sobre as respostas imunes que se desenvolve após a estimulação antigênica, sendo que a integridade das vias apoptóticas é necessária para a manutenção da tolerância periférica (STRAUSS; BERGMANN; WHITESIDE, 2009; FRANCISCO; SAGE; SHARPE, 2010).

Quanto à apoptose induzida pelas células T<sub>REGS</sub>, observamos um perfil diferenciado entre as formas clínicas, sendo possível verificar que células T<sub>REGS</sub> de indivíduos HANS do polo VV expressam níveis maiores de PD-1 e CD95L quando comparados aos outros grupos, sugerindo um possível mecanismo de indução de supressão de células efetoras e, conseqüentemente, a hiporresponsividade característica desse grupo. De fato, Chattree *et al.* (2007) mostraram decréscimo de células TCD95<sup>+</sup>CD95L<sup>+</sup> em indivíduos com a forma clínica VV e aumento da molécula antiapoptótica BCL-X nessas células, sugerindo que, na presença do bacilo, ocorra aumento de células T anérgicas, o que poderia estar associado com a não responsividade de células efetoras.

Observamos que células T<sub>REGS</sub> de indivíduos HANS do polo TT também apresentam esse mecanismo, porém verificamos que as células T<sub>REGS</sub> coexpressam CD95<sup>+</sup>CD95L<sup>+</sup> e PD-1<sup>+</sup>PD-1L<sup>+</sup>, o que poderia sugerir uma indução de autoapoptose de células T<sub>REGS</sub>. Esse possível mecanismo poderia explicar a perda de células T<sub>REGS</sub> e excessiva resposta inflamatória encontrada nesse grupo.

Em relação às moléculas CD95 e CD95L, Mustafa *et al.* (2001), ao avaliarem a apoptose na tuberculose e na hanseníase, verificaram maior expressão da molécula CD95L em células de lesão em pacientes com tuberculose e com hanseníase MB. Esses autores sugerem que a expressão de CD95L, especialmente em macrófagos presentes nas lesões, seria um mecanismo de escape de doenças causadas por micobactéria. A desregulação da expressão CD95-CD95L pode contribuir para a patogenia da infecção, pois o microorganismo pode inibir a transdução do sinal para a ativação de CD95 e prolongar a sua sobrevivência no interior da célula ao prevenir a indução de apoptose nas células efectoras (DOCKRELL *et al.*, 2003).

Sadhu *et al.* (2016) observaram alta expressão da molécula PD-1 em células T<sub>REGS</sub> e alta expressão da molécula PD-1L em células efectoras de pacientes com a forma clínica VV, quando comparados com pacientes com forma clínica TT e contatos domiciliares. Esses dados sugerem que a interação entre PD-1 e PD-1L pode atuar na supressão de células efectoras, mediante ação de células T<sub>REGS</sub>, em pacientes com a forma clínica VV. Após estímulo com antígenos do *M. leprae* e bloqueio da via de PD-1, foi observado número significativamente maior de células T efectoras produtoras de citocinas pró-inflamatórias, IFN- $\gamma$  e IL-17, indicando que a interação PD-1 e PDL-1 inibe células efectoras Th1 e Th17 em pacientes VV. Palermo *et al.* (2012a) observaram que células TCD3<sup>+</sup> de pacientes tanto com forma clínica TT ou VV expressavam maior frequência de PD-1 em comparação com os contatos, tanto antes quanto após a estimulação *in vitro* com antígenos do bacilo.

Em síntese, a identificação e caracterização de biomarcadores que induzem resposta imune efectora modulada do hospedeiro são necessárias para monitorar a transmissão e para se criar ferramentas de diagnóstico precoce da doença (NATH; SAINI; VALLURI, 2015).

O papel das células T<sub>REGS</sub> na infecção pelo *M. leprae* ainda não foi plenamente estabelecido. Neste estudo, observamos diferenças quanto à frequência destas células e a expressão fenotípica de moléculas relacionadas à apoptose entre os grupos de pacientes com as formas clínicas polares ou entre as distintas formas clínicas e indivíduos não infectados. A expressão diferencial de cada molécula indutora de apoptose e seus receptores sugere que mecanismos supressores distintos possam estar atuando em cada forma clínica da hanseníase.



## 8 CONCLUSÃO

A partir dos dados mostrados neste trabalho, conclui-se que, células T<sub>REGS</sub> atuam diferencialmente nas formas polares da hanseníase. Na forma clínica polar TT, as células T<sub>REGS</sub> modula a resposta imune por meio da ação de mecanismos solúveis, como IL-10, e por contato através da expressão de CLTA-4, CD39 e CD73. Contudo, a imunossupressão induzida por células T<sub>REGS</sub> nesses pacientes provavelmente é autolimitada, uma vez que as células T<sub>REGS</sub> coexpressam altos níveis de CD95 e CD95L, sugerindo autoapoptose dessas células. Por outro lado, na forma clínica VV, a frequência de células T<sub>REGS</sub> é maior e estas utilizam de mecanismos que induzem a morte celular através da expressão das moléculas PD-1 e CD95L, o que levaria à apoptose de células efectoras, o que poderia estar associado a um estado hiporresponsivo presente nesse polo,

## 9 REFERÊNCIAS

- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, Suita, v. 124, n. 4, p. 783-801, fev. 2006.
- ALTER, A. *et al.* Leprosy as a genetic disease. *Mammalian Genome*, Canada, v. 22, n. 1, p. 19 -31, out. 2011.
- ABDALLAH, M. *et al.* Serum Th1/Th2 and macrophage lineage cytokines in leprosy: correlation with circulating CD4+ CD25highFoxP3+ T-regs cells. *Experimental Dermatology*, Cairo, v. 23, n. 10, p. 742-7, out. 2014.
- ATTIA, E.A.S. *et al.* Circulating CD4+ CD25highFoxP3+ T cells vary in different clinical forms of leprosy. *International Journal of Dermatology*, Cairo, v. 49, n. 10, p. 1152-8, out. 2010.
- ATTIA, E.A.S. *et al.* Serum Th17 cytokines in leprosy: correlation with circulating CD4(+) CD25 (high)FoxP3 (+) T-regs cells, as well as down regulatory cytokines. *Arch Dermatol Res*, Cairo, v. 306, n. 9, p. 793-801, nov. 2014.
- BAECHER-ALLAN, C. *et al.* CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol*, Boston, v. 167, n. 3, p. 1245-53, ago. 2001.
- BADE, B. *et al.* Differential expression of the granzymes A, K and M and perforin in human peripheral blood lymphocytes. *International Immunology*, Rodstock, v. 17, n. 11, p. 1419-28, abr. 2005.
- BAFICA, A. *et al.* TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosis. *J. Exp. Med.*, Bethesda, v. 202, n. 12, p. 1715-24, dez. 2005.
- BANCHEREAU, J. *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, Texas, v. 18, n. 1, p. 767-811, 2000.
- BANCHEREAU, J.; PASCUAL, V.; O'GARRA, A. From IL-2 to IL-37: the expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines. *Nature Immunology*, Texas, v. 13, n. 10, p. 925-31, out. 2012.
- BELKAID, Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol*, Maryland, v. 7, n. 11, p. 875-88, nov. 2007.
- BELKAID, Y. Role of foxp3-positive regulatory T cells during infection. *European Journal of Immunology*, Bethesda, v. 38, n. 4, p. 901-37, abr. 2008.
- BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V.K. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol*, Boston, v. 8, n. 4, p. 345-50, abr. 2007.

BOCHUD, P.Y. *et al.* Polymorphisms in Toll-like receptor 4 (TLR4) are associated with protection against leprosy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, Seattle, v. 28, n. 9, p. 1055-65, set. 2009.

BORENSTEIN, M.S. *et al.* Hanseníase: estigma e preconceito vivenciados por pacientes institucionalizados em Santa Catarina (1940-1960). *Rev. bras. Enferm*, Rio de Janeiro, v. 61, n. spe, p. 708-712, out. 2008.

BRADLEY, L.M. Migration and T-lymphocyte effector function. *Curr Opin Immunol*, San Diego, v.15, n. 3, p. 343-8, jun. 2003.

BRASIL. Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. *Sistemas de informação e deficiências físicas na hanseníase*, n. 27, 10, abril, 2006. Boletim Epidemiológico Paulista.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase*. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 54p.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Situação epidemiológica da hanseníase no Brasil*. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2015. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br>> Acesso em: 17 mai. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. *Portaria nº 149 de 3 de fevereiro de 2016: Aprova as diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da hanseníase como problema de saúde pública, com a finalidade de orientar os gestores e os profissionais dos serviços de saúde*. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 58p.

BRENNAN, P.; NIKAIIDO, H. The envelope of mycobacteria. *Annual Review Biochemical*, Colorado, v. 64, n. 1, p 29-63, 1995.

BRITTON, W.J.; LOCKWOOD, D.N.J. Leprosy. *Lancet*, Nova Iorque, v. 363, n. 9416, p. 1209-19, abr. 2004.

BUHRER-SEKULA, S. *et al.* Simple and fast lateral Flow Test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. *J Clin Microbiol*, Amsterdam, v. 41, n. 5, p. 1991-5, mai. 2003.

BUHRER-SEKULA, S. *et al.* The ML FLOW test as a point of care test for leprosy control programmes: potential effects on classification of leprosy patients. *Lepr. Rev*, Amsterdam, v.78, n. 1, p.70-9, mar. 2007.

CAMPBELL, D.J.; KOCH, M.A. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*, Seattle, v. 11, n. 2, p. 119-30, fev. 2011.

CARPENTER, A.C.; BOSSELUT, R. Decision checkpoints in the thymus. *Nat Immunol*, Marilândia, v. 11, n. 8, p. 666-73, ago. 2010.

CARVALHO, A.P.M. *Soropositividade anti PGL-I em contatos domiciliares de casos de hanseníase na microrregião de Almenara, Minas Gerais*. 2012. 99f. (Dissertação - Mestrado em Saúde e Enfermagem) - Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

COLE, S.T. *et al.* Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*, Londres, v. 409, n. 6823, p. 1007-11, fev. 2001.

CHEN, S. *et al.* Inter-observer reliability in assessment of sensation of skin lesion and enlargement of peripheral nerves in leprosy patients. *Lepr Rev*, Jinan, v. 77, n. 1, p. 371-6, ago. 2006.

CHEN, C. *et al.* Transcriptional regulation by Foxp3 is associated with direct promoter occupancy and modulation of histone acetylation. *J. Biol. Chem*, Philadelphia, v. 281, n. 48, p. 36828-34, dez. 2006a.

CRUVINEL, W.M. *et al.* Células T regulatórias naturais (TREGS) em doenças reumáticas. *Rev Bras Reumatol*, São Paulo, v. 48, n.6, p. 342-355, nov. 2008.

CRUZ, D. *et al.* Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy. *The Journal of clinical investigation*, Los Angeles, v. 118, n. 8, p. 2917-28, ago. 2008.

CUROTTO DE LAFAILLE, M.A.; LAFAILLE, J.J. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?. *Immunity*, Nova Iorque, v. 30, n. 5, p.626-35, mai. 2009.

DEGANG, Y. *et al.* Leprosy as a model of immunity. *Future Microbiol*, Tóquio, v. 9, n. 1, p. 43-54, jan. 2014.

DESSUNTI, E.M. Leprosy: control of household contacts in the municipality of Londrina-PR for a ten-year period. *Rev Bras Enferm*, Brasília, v. 61, n. esp, p. 689-93, out. 2008.

DIECKMANN, D. *et al.* Human CD4 (+) CD25 (+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells. *J Exp Med*, Erlangen, v. 196, n. 2, p. 247-53, jul. 2002.

DOKRELL, D.H. The multiple roles of Fas ligand in the pathogenesis of infectious diseases. *Clin Microbiol Infect.*, Sheffield, v. 9, n. 8, p. 766-79, ago. 2003.

DYER, M.K. *et al.* CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signalling*, Melbourne, v. 3, n. 1, p.171-180, mar. 2007.

FERNANDES, C. *et al.* Increased frequency of CD4 and CD8 regulatory T cells in individuals under 15 years with multibacillary leprosy. *Plos One*, Fortaleza, v. 8, n. 1, p. 1-9, nov. 2013.

FEUERER, M. *et al.* Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nat Immunol*, Boston, v. 10, n. 7, p. 689-95, Jul. 2009.

FONTENOT, J.D.; GAVIN, M.A.; RUDENSKY, A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*, Seattle, v. 4, n.4, p. 330-6, mar. 2003.

FRANCISCO, M.L.;SAGE, P.T.;SHARPE, A.H.The PD-1 Pathway in Tolerance and Autoimmunity.*Immunol Rev*, Boston, v. 236, n. 1, p. 219-42, jul. 2010.

GARCIA-LAORDEN, M.I. *et al.* Increased intra- and extracellular granzyme expression in patients with tuberculosis. *Tuberculosis*, Amsterdam, v. 95, n. 1, p.575-80, mai. 2015.

GELUK, A; OTTENHOFF, T.H.M. HLA and leprosy in the pre and postgenomic eras.*Hum Immunol.*, Leiden, v. 67, n. 6, p. 439-45, Jun. 2006.

GELUK, A. *et al.* Longitudinal immune responses and gene expression profiles in type 1 leprosy reactions. *J Clin Immunol.*, Leiden, v. 34, n. 2, p. 245-55, fev.2014.

GONDEK, D.C. *et al.* Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol*,Líbano, v. 174, n. 4, p. 1783-6, fev. 2005.

GONZALEZ-LOMBANA, C. *et al.* Mediates immunopathology in the absence of IL-10 following leishmania major infection. *PLoS Pathog*, Philadelphia, v. 9, n. 3, p. 1-14, mar. 2013.

GRINGHUIS, S.I. *et al.* Ctype lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB. *Immunity*, Amsterdam, v. 26, n. 5, p. 605-16, mai. 2007.

GUICCIARDI, M.E.; GORES, G.J. Life and death by death receptors.*FASEB J*, Rochester, v. 23, n. 6, p.1625-37, jun. 2009.

GUTIERREZ, F.R. *et al.* Regulation of Trypanosoma cruzi-induced myocarditis by programmed death cell receptor 1. *Infect Immun*, Ribeirão Preto, v. 79, n. 5, p. 1873-81, mai. 2011.

HAGAMAN, L.R. *et al.* LEAP program monofilaments: can they be used as an accurate disgnostic tool?.*Diabetes*, Denver, v. 49, n. supl 1, p. 393-94, mai. 2000.

HARIBHAI, D.*et al.* A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity. *Immunity*, Milwaukee, v. 35, n. 1, p. 109-22, Jul. 2011.

HARBOE, M. Overview of host-parasite relations. In: HASTINGS, R. C. *Leprosy*. 2. ed. New York: Churchill Livingstone, 1994. v. 1, cap. 5, p. 87-112.

HASKÓ, G. *et al.* Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov*, Nova Jersey, v. 7, n. 9, p. 759-70, set. 2008.

HORI, S.; SAKAGUCHI, S. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes Infect*, Yokohama, v. 6, n. 8, p. 745-51, jul. 2004.

JAIN, M. *et al.* Lipidomics reveals control of Mycobacterium tuberculosis virulence lipids via metabolic coupling. *Proc Natl Acad Sci USA*, São Francisco, v. 104, n. 12, p. 5133-8, mar. 2007.

JANEWAY, C.A., 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, Yale, v. 54, n. 1, p. 1-13, 1989.

JIANG, H; CHESS, L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest*, Nova York, v. 114, n. 9, p. 1198-208, nov. 2004.

JO, E.K. Mycobacterial interaction with innate receptors: TLRs, C-type lectins, and NLRs. *Curr Opin Infect Dis*, Daejeon, v. 21, n. 3, p. 279-86, jun. 2008.

JOSEFOWICZ, S.Z.; LU, L.F.; RUDENSKY, A.Y. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol*, Nova Iorque, v. 30, n. 1, p. 531-64, jan. 2012.

KAPLAN, G. *et al.* Cellular responses to the intradermal injection of recombinant human gamma-interferon in lepromatous leprosy patients. *Am. J. Pathol*, Nova Iorque, v. 128, n. 2, p. 345-53, ago. 1987.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol*, Suita, v. 21, n. 3, p. 317-37, abr. 2009.

KHATTRI, R. *et al.* An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol*, Chicago, v. 4, n. 4, p. 337-42, mar. 2003.

KONDĚLKOVÁ, K. *et al.* Regulatory T cells (TREG) and their roles in immune system with respect to immunopathological disorders. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, República Checa, v. 53, n. 2, p. 73-7, mar. 2010.

KUMAR, S. *et al.* Th3 Immune responses in the progression of leprosy via molecular cross-talks of TGF- $\beta$ , CTLA-4 and Cbl-b. *Clinical Immunology*, Nova Dheli, v. 141, n. 2, p. 133-42, jul. 2011.

KUMAR, S. *et al.* CD4+CD25+ T regs with acetylated FoxP3 are associated with immune suppression in human leprosy. *Molecular Immunology*, Nova Dheli, v. 56, n. 1, p. 513-20, ago. 2013.

KUMAR, S. *et al.* FoxP3 provides competitive fitness to CD4+CD25+ T cells in leprosy patients via transcriptional regulation. *Eur. J. Immunol*, Nova Dheli, v. 44, n. 1, p. 431-39, fev. 2014.

LAL, G.; BROMBERG, J.S. Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression. *Blood*, Nova Iorque, v. 114, n. 18, p. 3727-35, jun. 2009.

LEE, D.J. *et al.* LILRA2 activation inhibits dendritic cell differentiation and antigen presentation to T cells. *J Immunol*, Los Angeles, v. 179, n. 12, p.8128-36, dez. 2007.

LI, B. *et al.* FOXP3 interactions with histone acetyltransferase and classII histone deacetylases are required for repression. *Proc. Natl. Acad. Sci*, Philadelphia, v. 104, n. 11, p. 4571-6, mar. 2007.

LU, L.F.; RUDENSKY, A. Molecular orchestration of differentiation and function of regulatory T cells. *Genes Dev*, Nova Iorque, v. 23, n. 11, p. 1270-82, jun, 2009.

MAEDA, Y. *et al.* A lipopeptide facilitate induction of Mycobacterium leprae killing in host cells. *PLoS Negl Trop Dis*, Tóquio, v. 5, n. 1, p. 1-10, nov. 2011.

MAKINO, M. *et al.* Impaired maturation and function of dendritic cells by mycobacteria through IL-1beta. *Eur J Immunol*, Tokio, v. 36, n. 6, p. 1443-52, jun. 2006.

MARSON, A. *et al.* Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature*, Massachusetts, v. 445, n. 7130, p.931-5, fev. 2007.

MASSONE, C. *et al.* T regulatory cells and plasmacytoid dendritic cells in hansen disease: a new insight into pathogenesis?. *Am J Dermatopathol*, Graz, v. 32, n. 3, p. 251-6, mai. 2010.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C.A. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, New Haven, v. 388, n. 24, p. 388-394, jul. 1997.

MEIMA, A.; RICHARDUS, J.H.; HABBEMA, J.D.F. Trends in leprosy case detection worldwide since 1985. *Leprosy Review*, Rotterdam, v. 75, n. 1, p.19-33, mar. 2004.

MENDONÇA, V.A. *et al.* Imunologia da hanseníase. *An Bras Dermatol*, Belo Horizonte, v. 83, n. 4, p. 343-50, jun. 2008.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C.A. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol*, New Haven, v. 9, n. 1, p. 4-9, fev. 1997.

MENDEZ, S. *et al.* Role for CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *J Exp Med*, Washington, v. 200, n. 2, p. 201-10, jul. 2004.

MESQUITA JUNIOR, D. *et al.* Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Rev Bras Reumatol*, São Paulo, v. 50, n. 5, p. 552-80, out. 2010.

- MILLS, K.H. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol*, Dublin, v. 4, n. 11, p. 841-55, nov. 2004.
- MIRANDA, A.M. *et al.* Erythema multiforme in leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 107, n. suppl 1, p. 34-42, dez. 2012.
- MITSUDA, K. On the value of a skin reaction to a suspension of leprosy nodules. *JAP J Dermatol Urol*, Japão, v. 19, n. 1, p. 698-708, 1919.
- MODLIN, R.L. The innate immune response in leprosy. *Curr Opin Immunol*, Los Angeles, v. 22, n. 1, p. 48-54, fev. 2010.
- MONTOYA, D. *et al.* Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. *Cell Host Microbe*, Los Angeles, v. 6, n. 4, p.343-53, out. 2009.
- MORAES, M.O. *et al.* Genetics of host response in leprosy. *Lepr Rev*, Rio de Janeiro, v. 77, n. 3, p. 189-202, set. 2006.
- MOSCHELLA, S.L. An update on the diagnosis and treatment of leprosy. *J. Academy American Dermatology*, Burlington, v. 51, n. 3, p. 417-26, set. 2004.
- MOSSER, D.M.; EDWARDS, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Rev. Immunol*, Maryland, v. 8, n. 12, p. 958-69, dez. 2008.
- MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, Palo Alto, v. 7, n. 1, p. 145-173, 1989.
- MURRAY, R.A. *et al.* Mycobacterium leprae inhibits dendritic cell activation and maturation. *J Immunol*, Newark, v. 178, n. 1, p. 338-44, jan. 2007.
- MUSTAFA, T. *et al.* Increased expression of Fas ligand in human tuberculosis and leprosy lesions: a potential novel mechanism of immune evasion in Mycobacterial infection. *Scand. J. Immunol*, Bergen, v. 54, n. 1, p. 630-9, set. 2001.
- NATH, I. *et al.* Circulating T-cell numbers and their mitogenic potential in leprosy—correlation with mycobacterial load. *Clin Exp Immunol*, Nova Dheli, v. 29, n. 3, p. 393-400, set. 1977.
- NATH, I.; SAINI, C.; VALLURI, V.L. Immunology and challenges in leprosy. *Clinics in Dermatology*, Nova Dheli, v. 33, n.1, p. 90-98, jan. 2015.
- NG, V. *et al.* Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of Mycobacterium leprae. *Cell*, Nova Iorque, v.103, n. 3, p. 511-24, out. 2000.
- OLIVEIRA, D.T. *et al.* Clinical variables associated with leprosy reactions and persistence of physical impairment. *Rev Soc Bras Med Trop*. Aracaju, v. 46, n. 5, p. 600-4, set. 2013.



OSKAM, L.; SLIM, E.; BUHRER-SEKULA, S. Serology: recente developments, strengths, limitations and prospects: a state of the overview. *Lepr Rev*, Amsterdam, v. 74, n. 3, p. 196-205, set. 2003.

OPROMOLLA, D.V.A. *Noções de Hansenologia*. 1. ed. São Paulo: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 2000. 13p.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). *Key facts on neglected infectious diseases:leprosy*. n. 1, mar. 2014.

PALERMO, M.L. *et al.* Increased expression of regulatory T cells and down-regulatory molecules in lepromatous leprosy. *Am J Trop Med Hyg*, São Paulo, v. 86, n. 5, p. 878-83, mai. 2012.

PALERMO, M.L. *et al.* Differential expression of the costimulatory molecules CD86, CD28, CD152 and PD-1 correlates with the host-parasite outcome in leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, São Paulo, v. 107, n. suppl. 1, p. 167-173, jul. 2012a.

PANDIYAN, P. *et al.* CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol*, Bethesda, v. 8, n. 12, p. 1353-62, dez. 2007.

PICCIRILLO, C.A. Regulatory T cells in health and disease. *Cytokine*, Quebec, v. 43, n. 3, p. 395-401, set. 2008.

PINHEIRO, R.O. *et al.* Mycobacterium leprae-host-cell interactions and genetic determinants in leprosy: an overview. *Future Microbiol*, Rio de Janeiro, v. 6, n. 2, p. 217-30, fev. 2011.

POLTORAK, A. *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene, *Science*, Dalas, v. 282, n. 5396, p. 2085-8, dez. 1998.

POPE, R.M. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*, Chicago, v. 2, n. 7, p. 527-35, jul. 2002.

QUARESMA, J.A.S. *et al.* Apoptotic activity and Treg cells in tissue lesions of patients with leprosy. *Microbial Pathogenesis*, Belém, v. 76, n. 1, p. 84-8, nov. 2014.

REA, T.H.; MODLIN, R.L. Leprosy. In: FREEDBERG, I.M.; EISEN, A.Z.; WOLF, K.; AUSTEN, K.F.; GOLDSMITH, L.A.; KATZ, S. *Fitzpatrick's Dermatology in general Medicin*. 8. ed. Nova Iorque: Medicine & Health Science Books, 2010. v. 2, p.1787-96.

REED, M. B. *et al.* A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature*, Rockville, v. 431, n. 7004, p. 84-7, out. 2004.

REES, R.J.W.; YOUNG, D.B. The microbiology of leprosy. In: HASTINGS, R.C. *Leprosy*. 2. ed. Nova Iorque: Churchill Livingstone, 1994. v. 1, cap. 4, p. 49-83.

RELLAND, L.M. *et al.* Affinity based selection of regulatory T cells occurs independent of agonist-mediated induction of Foxp3 expression. *J Immunol*, Milwaukee, v. 182, n. 3, p. 1341-50, jun. 2009.

RIDLEY, D.S.; JOPLING, W.H. Classification of leprosy according to immunity: five group system. *Int. J. Lepr*, Londres, v. 34, n. 3, p. 255-73, jul. 1966.

ROOK, G.A.W. *et al.* Mycobacteria and other environmental organisms as immunomodulators for immunoregulatory disorders. *Springer Seminars in Immunopathology*. Londres, v. 25, n. 1, p. 237-55, ago. 2004.

SAKAGUCHI, S. *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*, Tóquio, v. 155, n. 3, p. 1151-64, ago. 1995.

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 neglected tropical diseases*, Nova Dheli, v. 9, n. 7, p. 1-13, jul. 2013.

SAINI, C.; RAMESH, V.; NATH, I. Increase in TGF- $\beta$  secreting CD4+CD25+ FOXP3+ T regulatory cells in anergic lepromatous leprosy patients. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, Nova Dheli, v. 8, n. 1, p. 1-14, jan. 2014.

SADHU, S. *et al.* Reciprocity between regulatory T cells and Th17 cells: relevance to polarized immunity in leprosy. *PLoS Negl Trop Dis*, Nova Dheli, v. 10, n. 1, p. 1-16, jan. 2016.

SAMPAIO, S.P.; RIVITTI, E.A. Hanseníase. In: SAMPAIO, S.P.; RIVITTI, E.A. *Dermatologia*. 3. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2007, cap 40, p. 625-51.

SALGAME, P. *et al.* Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science*, Nova Iorque, v. 254, n. 5029, p. 279-82, out. 1991.

SCHLESINGER, L.S.; HORWITZ, M.A. Phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* binds complement component C3 in serum and mediates phagocytosis by human monocytes. *J Exp Med*, Los Angeles, v. 174, n. 5, p. 1031-38, nov. 1991.

SCOLLARD, D.M. *et al.* The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev*, Louisiana, v. 19, n. 2, p. 338-81, abr. 2006.

SHEPARD, C.C. Multiplication of *Mycobacterium leprae* in the foot-pad of the mouse. *Int J Lepr*, Georgia, v. 30, n. 1, p. 291-306, jul. 1962.

SHEVACH, E.M. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*, Bethesda, v. 30, n. 5, p. 636-45, mai. 2009.

SHIMIZU, J. *et al.* Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol*, Tóquio, v. 3, n. 2, p. 135-42, fev. 2002.

SCHMIDT, A.; OBERLE, N.; KRAMMER, P.H. Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Front Immunol*, Heidelberg, v. 3, n. 1, p. 1-20, mar. 2012.

STEFANI, M.M.A. Desafios na era pós genômica para o desenvolvimento de testes laboratoriais para o diagnóstico da hanseníase. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, v. 41, n. supl. 2, p. 89-94, 2008.

STRAUSS, L.; BERGMANN, C.; WHITESIDE, T.L. Human circulating CD4+CD25highFoxp3+ regulatory T cells kill autologous CD8+ but not CD4+ responder cells by Fas-mediated apoptosis. *J Immunol*, Pittsburgo, v. 182, n. 3, p. 1469-80, fev. 2009.

STRAUSS, L.; BERGMANN, C.; WHITESIDE, T.L. Human circulating CD4+CD25highFoxp3+ regulatory T cells kill autologous CD8+but not CD4+ responder cells by Fas-mediated apoptosis. *J Immunol*, Pittsburgo, v. 182, n. 3, p. 1469-80, fev. 2009.

STRASSER, A.; JOST, P.J.; NAGATA, S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity*, Kyoto, v. 30, n. 2, p. 180-92, fev. 2009.

STTROBER, S. *et al.* Cloned natural supressor cell lines express CD3+ CD4- CD8- surface phenotype and the alpha, beta heterodimer of the T cell antigen receptor. *J Immunol*, California, v. 143, n. 4, p.1118-22, ago. 1989.

TABOURET, G. *et al.* Mycobacterium leprae phenolglycolipid-1 expressed by engineered M. bovis BCG modulates early interaction with human phagocytes. *PLoS Pathog*, Toulouse, v. 6, n. 10, p. 1-13, out. 2010.

TALHARI, S. *et al.* *Dermatologia Tropical: hanseníase*. 4.ed. Manaus: Di Livros Editora LTDA, 2006. 217p.

TANG, Q. *et al.* Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat Immunol*, São Francisco, v. 7, n. 1, p. 83-92, jan. 2006.

TANG, Q.; BLUESTONE, J.A. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol*, São Franscisco, v. 9, n. 3, p.239-44, fev. 2008.

THORNTON, A.M. *et al.* Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J Immunol*, Bethesda, v. 172, n. 11, p. 6519-23, jun. 2004.

TORRADO, E.; COOPER, A.M. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Rev*, Nova lorque, v. 21, n. 6, p.455-62, dez. 2010.

VAN BRAKEL, W.H. *et al.* Disability in people affected by leprosy: the role of impairment, activity, social participation, stigma and discrimination. *Glob Health Action*, Amsterdam, v.5, n. 1, p. 1-11, jul. 2012.

VERRECK, F.A. *et al.* Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco) bacteria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, Albinusdreef, v.101, n. 13, p. 4560-5, mar. 2004.

VIGNALI, D.A.A.; COLLISON, L.W.; WORKMAN, C.J. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*, Tennessee, v. 8, n. 7, p. 523-32, jul, 2008.

VISSA, D.V.; BRENNAM, P. The Genome of *Mycobacterium leprae* a minimal mycobacterial. *Genome Biology*, Colorado, v. 2, n. 8, p. 1-8, ago. 2001.

VON BOEHMER, H.; MELCHERS, F. Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease. *Nat Immunol*, Boston, v. 11, n. 1, p. 14-20, ago, 2010.

VOO, K.S. *et al.* Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, Texas, v. 106, n. 12, p. 4793-8, mar. 2009.

WANG. W. *et al.* PD1 blockade reverses the suppression of melanoma antigen-specific CTL by CD4+ CD25(Hi) regulatory T cells. *Int Immunol*, Florida, v. 21, n. 9, p. 1065-77, set. 2009.

WANG, Z. *et al.* Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes. *Cell*, Bethesda, v. 138, n. 5, p. 1019-31, set. 2009a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Estratégia global para aliviar a carga da hanseníase e manter as atividades de controle da hanseníase*, 2006-2010. 1. ed. Genebra: WHO, 2005. 27p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Leprosy*. Genebra: WHO, 2015. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs101/en/>. Acesso em: 17 mai. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global leprosy update. *Weekly epidemiological record*, Genebra, v. 90, n. 36, p. 461-76, set. 2015a.

WORKMAN, C.J. *et al.* The development and function of regulatory T cells. *Cell Mol Life Sci.*, Memphis, v. 66, n. 16, p. 2603-22, ago. 2009.

YI, H. *et al.* The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4+CD25+ T cells. *Cell Mol Immunol*, Rijswijk, v. 3, n. 3, p. 189-95, jun. 2006.

YOUNG, D.B.; BUCHANAN, T.M. A serological test for leprosy with a glycolipid specific for *Mycobacterium leprae*. *Science*, Seattle, v. 221, n. 4615, p. 1057-59, set. 1983.

ZHANG, F.R. *et al.* Genomewide association study of leprosy. *The New England journal of medicine*, Hefei, v. 361, n. 27, p. 2609-18, dez. 2009.

ZHOU, F. Expression of multiple granzymes by cytotoxic T lymphocyte implies that they activate diverse apoptotic pathways in target cells. *Int Rev Immunol*, Brisbane, v. 29, n. 1, p. 38-55, abr. 2010.

## ANEXO A

## PARECER CONSUBSTANCIADO DO COEP DA UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 14887414.0.0000.5149

Interessado(a): Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha  
Departamento de Clínica Médica  
Faculdade de Medicina - UFMG

## DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 12 de março de 2014, o projeto de pesquisa intitulado **"Caracterização dos mecanismos imunológicos de pacientes infectados pelo Mycobacterium leprae e a sua correlação com a expressão clínica, prognóstico e resposta terapêutica da hanseníase"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.



Prof. Maria Teresa Marques Amaral  
Coordenadora do COEP-UFMG

## ANEXO B

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### Projeto de Pesquisa

**TÍTULO:** “Caracterização dos mecanismos imunológicos de pacientes infectados pelo *Mycobacterium leprae* e sua correlação com a expressão clínica, prognóstico e resposta terapêutica da hanseníase”.

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa clínica, e antes de aceitar é necessário que você leia e compreenda a seguinte explicação sobre o que se propõe a ser feito. Esta declaração descreve o objetivo, procedimentos, benefícios, riscos e desconfortos do estudo.

**DESCRIÇÃO DO ESTUDO:** Você está sendo convidado a participar desta pesquisa científica como voluntário (você pode escolher se quer participar ou não). Para isso, deverá ler este documento todo e perguntar aos pesquisadores tudo o que não entendeu antes de aceitar participar da pesquisa. Esta pesquisa irá estudar a Hanseníase, uma doença que acomete pele e nervos e que pode causar grandes deformidades. O objetivo da pesquisa é entender melhor essa doença, podendo ajudar na prevenção, no tratamento das deformidades provocadas pela doença e melhora da qualidade de vida do paciente. **Será colhida uma pequena amostra de sangue (35 mL) em tubos estéreis para as dosagens bioquímicas e imunológicas.** Os exames de sangue têm como propósito a realização do hemograma e caracterização das células de defesa do organismo para auxiliar no entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na doença. Se você concordar em participar, você estará ajudando diversos pesquisadores a entender melhor a hanseníase e como se pode melhorar seu tratamento e a cura dos doentes. Assim, poderá ajudar muitas pessoas que, como você, hoje estão com essa doença ou que podem vir a ficar doentes no futuro. Você não terá nenhuma despesa e nem receberá pagamento nenhum para participar da pesquisa; a qualquer momento, você poderá desistir de fazer parte dela, sem qualquer prejuízo.

“Depois de ter lido este documento todo e ter resolvido minhas dúvidas com um dos pesquisadores, eu declaro que concordo com seus termos e aceito participar desta pesquisa.”

**O TCLE será assinado em duas vias e uma delas, será entregue ao voluntário da pesquisa.**

**BENEFÍCIOS:** Os participantes terão seu estado imunológico avaliado através do hemograma e de outros exames a serem realizados. Além disso, a participação nesse estudo poderá contribuir para o conhecimento dos mecanismos envolvidos na Hanseníase, podendo colaborar para a melhoria do tratamento desta doença. Os resultados das avaliações clínicas e laboratoriais serão fornecidos e explicados para cada participante do estudo, incluindo os indivíduos saudáveis que constituirão o grupo controle.

**RISCOS EM POTENCIAL:** Os riscos para os participantes são mínimos. Existe a possibilidade de ocorrer desconforto pela picada da agulha no momento da retirada do sangue; no entanto, a coleta será realizada por profissional enfermeiro treinado e experiente, que poderá auxiliar o participante no caso de ocorrência de algum desconforto.

**PERMISSÃO PARA A REVISÃO DOS DADOS (CONFIDENCIALIDADE):** Todas as informações, incluindo dados clínicos e de exames complementares coletados do prontuário do paciente e gerados por este estudo, serão tratadas de modo confidencial e sigiloso, ficando restritas aos pesquisadores e ao participante, se assim desejar.

**CONFIDENCIALIDADE:** Os resultados de seus exames serão analisados em sigilo até onde é permitido pela lei. No entanto, o pesquisador, supervisor da pesquisa e, sob certas circunstâncias, o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG e do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) - FIOCRUZ, poderão ter acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará. Ao assinar este formulário de consentimento, você autoriza o pesquisador a fornecer seus registros para o orientador e para o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG e do CPqRR-FIOCRUZ.

**DESLIGAMENTO:** A sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar do estudo não acarretará penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Você poderá cessar sua participação a qualquer momento, sem prejuízo para a continuidade de seu acompanhamento.

**EQUIPE RESPONSÁVEL:**

Coordenador: Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha (UFMG) – (31) 3409-9547

Coordenadora\_supervisão clínica: Dra. Sandra Lyon (Médica Coordenadora do Serviço de Dermatologia no Hospital Eduardo de Menezes)

Pós-doutoranda: Dra. Ana Thereza Chaves (UFMG/FIOCRUZ) \_ (31) 3349-7778

Colaboradores:

Profa. Dra. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau (UFMG) –  
(31) 3409-3006

Dra. Silvia Helena Lyon (Hospital Eduardo de Menezes) \_ (31) 9202-9920



Dra. Ana Cláudia Lyon (Hospital Eduardo de Menezes)\_ (31) 9113-7776  
Giovane Rodrigo de Sousa – (31) 9208-1702

Se precisar de mais informações sobre o trabalho que está sendo realizado, você deverá entrar em contato com Professor Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha no CTR-DIP Orestes Diniz, às terças e sextas feiras pela manhã, ou pelo telefone (31) 3409-9547. Caso tenha alguma dúvida sobre os seus direitos como paciente de pesquisa, informações podem ser obtidas no Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) na Av. Antônio Carlos, 6627 Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005 Campus Pampulha Belo Horizonte, MG - Brasil 31.270-901 ou pelo telefone (31) 3409 4592, ou no Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ) pelo telefone (31) 3349-7825. Caso haja necessidade, poderá ser solicitada cópia do projeto.

**CONSENTIMENTO:** Com base no exposto, estou ciente que a minha participação é voluntária e será restrita à doação de amostras de sangue. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Fui informado de que poderei, a qualquer momento, me retirar do projeto de pesquisa, por qualquer motivo, sem que isso acarrete qualquer prejuízo ao prosseguimento de meu acompanhamento médico no Ambulatório de Referência em doença de Chagas do CTR-DIP.

Belo Horizonte, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

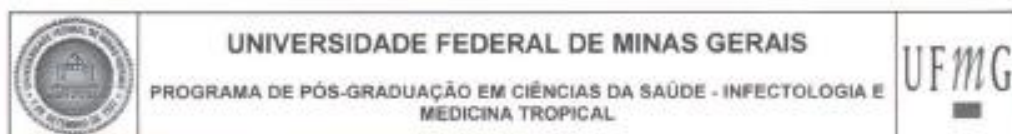
Ass. do paciente ou responsável: \_\_\_\_\_

Ass. da testemunha: \_\_\_\_\_

Ass. do orientando \_\_\_\_\_

Ass. do pesquisador responsável (orientador) \_\_\_\_\_

## ANEXO C



### ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DO ALUNO ATVALDO FERNANDES RIBEIRO JUNIOR

Realizou-se, no dia 14 de junho de 2016, às 14:00 horas, sala 029 - andar térreo da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a 294ª defesa de dissertação, intitulada *"Análise fenotípica dos mecanismos de imunoregulação induzidos pelas células TREGSCD4+CD25HIGHFOXP3+ na Hanseníase"*, apresentada por ATVALDO FERNANDES RIBEIRO JUNIOR, número de registro 2014656180, graduado no curso de ENFERMAGEM, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, à seguinte Comissão Examinadora: Profa. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau - Orientador (UFMG), Prof. Manoel Otavio da Costa Rocha – Coorientador (UFMG), Dra. Ana Thereza Chaves – coorientadora (UFMG), Prof. Ricardo Toshio Fujiwara (UFMG) e Profa. Fernanda Fortes de Araujo (FIOCRUZ).

A Comissão considerou a dissertação:

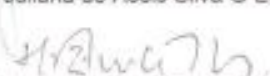
Aprovada

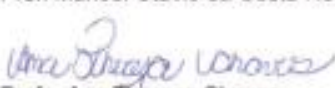
Reprovada


Finalizados os trabalhos, foi lavrada a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 14 de junho de 2016.

  
Prof. Juliana de Assis Silva G Estanislau

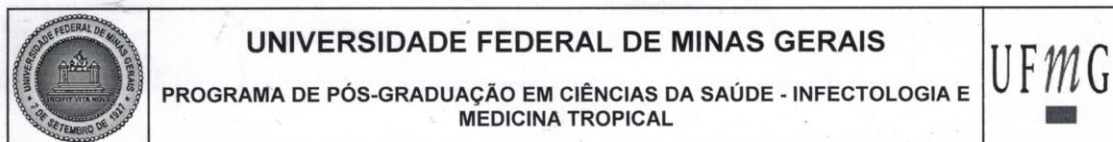
  
Prof. Manoel Otavio da Costa Rocha

  
Prof. Ana Thereza Chaves

  
Prof. Ricardo Toshio Fujiwara

  
Prof. Fernanda Fortes de Araujo

## ANEXO D



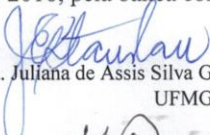
## FOLHA DE APROVAÇÃO

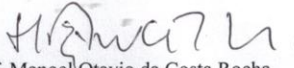
**"Análise fenotípica dos mecanismos de imunorregulação induzidos pelas células TREGSCD4+CD25HIGHFOXP3+ na Hanseníase"**

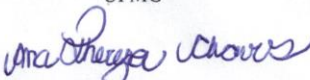
**ATVALDO FERNANDES RIBEIRO JUNIOR**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL.


Aprovada em 14 de junho de 2016, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof. Juliana de Assis Silva G Estanislau - Orientador  
UFMG

  
Prof. Manoel Otavio da Costa Rocha  
UFMG

  
Dra. Ana Thereza Chaves  
UFMG

  
Prof. Ricardo Toshio Fujiwara  
UFMG

  
Profa. Fernanda Fortes de Araujo  
FIOCRUZ

Belo Horizonte, 14 de junho de 2016.

**ANEXO E****Distinct apoptosis pathways markers in regulatory T cells are associated with worse immune response in Leprosy patients**

Ana T. Chaves<sup>a</sup>, Atvaldo F. Ribeiro-Junior<sup>a</sup>, Sandra Lyon<sup>b</sup>, Nayara I. Medeiros<sup>c,d</sup>, Fábio Cassirer-Costa<sup>a</sup>, Karina S. Paula<sup>a</sup>, Edilamar S. Alecrim<sup>a,b</sup>, Cristiane A. S. Menezes<sup>f</sup>, Rodrigo Correa-Oliveira<sup>c,e</sup>, Manoel O. C. Rocha<sup>a</sup>, Juliana A. S. Gomes<sup>a,d</sup>.

Ana Thereza Chaves<sup>a</sup>

Email: [chaves.anathereza@gmail.com](mailto:chaves.anathereza@gmail.com)

Atvaldo Fernandes Junior<sup>a</sup>

Email: [tivasjunior@hotmail.com](mailto:tivasjunior@hotmail.com)

Sandra Lyon<sup>b</sup>

Email: [sandrallyon2@yahoo.com.br](mailto:sandrallyon2@yahoo.com.br)

Nayara Ingrid de Medeiros<sup>c,d</sup>

Email: [nayara.medeiros@cpqrr.fiocruz.br](mailto:nayara.medeiros@cpqrr.fiocruz.br)

Fábio Cassirer<sup>a</sup>

Email: [cassirer\\_biomed08@yahoo.com.br](mailto:cassirer_biomed08@yahoo.com.br)

Karina de Souza Paula<sup>a</sup>

Email: [Karinaspaula@hotmail.com](mailto:Karinaspaula@hotmail.com)

Edilamar Silva de Alecrim<sup>a,b</sup>

Email: [edilamarenf@yahoo.com.br](mailto:edilamarenf@yahoo.com.br)

Rodrigo Correa-Oliveira<sup>c,e</sup>

Email: [correa@cpqrr.fiocruz.br](mailto:correa@cpqrr.fiocruz.br)

Cristiane Alves Silva Menezes<sup>f</sup>

Email: [menezescristiane1@gmail.com](mailto:menezescristiane1@gmail.com)

Manoel Otávio Costa Rocha<sup>a</sup>

Email: [rochamoc@terra.com.br](mailto:rochamoc@terra.com.br)

Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau<sup>a,d</sup>

Email: [estanislau.juliana@gmail.com](mailto:estanislau.juliana@gmail.com)

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Infectologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil. <sup>b</sup>Departamento de Dermatologia, Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais, Hospital Eduardo de Menezes, Belo Horizonte, Brasil. <sup>c</sup>Laboratório de Imunologia Celular e Molecular Centro de Pesquisa René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG, Brasil. <sup>d</sup>Laboratório de Biologia das Interações Celulares, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil. <sup>e</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais - INCT-DT. <sup>f</sup>Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

**\*Corresponding author:** Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627. Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-010, Brasil. Phone: +553134093006. E-mail: [juliana@icb.ufmg.br](mailto:juliana@icb.ufmg.br) (JASG)

**Short title:** Apoptosis markers of regulatory T cells in Leprosy.

**Abstract**

Regulatory T cells (Treg) have been shown to be cable to control the immune response by suppressing antigen-presenting cells and effector T cells. Some mechanisms induced by these cells have been proposed in *Mycobacterium* sp infections. Nevertheless, in *M. leprae* infection, known Leprosy or Hansen's disease, the role of Tregs in has still not been completely established. We evaluate the expression of different apoptosis pathways markers in Tregs from peripheral blood of patients with leprosy using multicolor flow cytometry. Thirteen new cases of leprosy were grouped according to the Ridley–Jopling classification in paucibacillary (PB) and multibacillary (MB) before any treatment. Fifteen non-infected individuals (NI) were included as control group. Tregs were higher in MB than NI group, also expressed higher amounts of PD1/PDL-1, indicating that these cells may induce apoptosis of effector cells and simultaneously prevent their own apoptosis. Conversely, our data showed that PB group expressed high levels of CD95L compared to NI group, which may related with other apoptosis pathway that is efficient to decrease Treg in these patients. Correlation analysis reinforce that PD1/CD95L are efficient apoptosis' pathway that explain decreased levels of Tregs in NI and PB groups. We also observed significant differences in cytokine expression of Tregs in PB and MB groups. Tregs from MB patients showed increased IL-17 expression compared to NI, while IL-10 were decreased than in PB group, suggesting worse control of inflammation. Therefore, we concluded that different apoptotic pathways directs apoptosis and/or self-apoptosis of Tregs in leprosy. Moreover, Tregs seems to worse in regulation of inflammation through IL-10 and IL-17 expression in leprosy patients.

**Keywords:** Regulatory T cells; Apoptosis pathways; Leprosy; Immune regulation; Cytokines.

**Abbreviations** Multibacillary (MB); Non-infected individuals (NI); Paucibacillary (PB); Regulatory T cells (Treg).

## Introduction

Leprosy or Hansen's disease is a chronic granulomatous disease caused by *Mycobacterium leprae*, an obligate intracellular bacillus, which has a predilection for skin macrophages and Schwann cells of the peripheral nerves (Shepard, 1962; Scollard *et al.*, 2006). In 2015, a total of 211,973 new cases were reported from 108 countries worldwide; the majority of cases were reported from a select few countries. India had 60% of the global case load, followed by Brazil and Indonesia (WHO, 2016).

Leprosy is best understood as two combined diseases. The first is a chronic mycobacterial infection that elicits an extraordinary range of cellular immune responses in humans. The second is a peripheral neuropathy that is initiated by the infection and its accompanying immunologic events, but of which the course and sequelae often extend many years beyond the cure of the infection, and may have severely debilitating physical, social, and psychological consequences (Scollard *et al.*, 2006).

There are several factors that determine the appearance of clinical symptoms that affect patients, including those specific to the host, such as genetic and immunological factors, plus those intrinsic to the causal agent and to the environment (Geluk & Ottenhof, 2006; Modlin, 2010). It is widely known that the low virulence of *M. leprae*, combined with an effective immune response, is associated with resistance to the development of leprosy. This is manifested in different clinical forms, which are determined by the delineation of the immune response of infected individuals (Alter *et al.*, 2011).

Due to the unique clinical spectrum of this disease, leprosy studies have provided a better opportunity for immunologists to unveil the bridging between innate and adaptive immunological signaling mechanisms. Patients with leprosy with a high cell-mediated immunity (CMI), relatively resistant to the pathogen, and unique expression of Th1 cytokines, localized infection, central hypopigmentation, and hypoesthesia are classified as

paucibacillary (PB). On the other hand, patients with defective CMI, no apparent resistance to *M. leprae*, presenting numerous but poorly demarcated lesions, raised or nodular lesions on all parts of the body, foamy macrophages in the dermis, are classified as multibacillary (MB), owing to very large numbers of bacilli (Kaplan & Cohn, 1986; Walker & Lockwood, 2007; Gaschignard et al., 2016).

The balance of Th1/Th2 responses alone, however, cannot fully explain the immune response leprosy. Other T cell subsets, such as T regulatory (Treg) and Th17 cells, have been identified as having important roles in determining host immunity. FOXP3+ Tregs producers of TGF- $\beta$  can suppress effector T cell function and were increased in stable MB patients, which explain the anergy associated with this clinical form (Sadhu et al., 2016). Studies claim that the immunosuppressive activity mediated by Tregs presents a new dimension in the identification of cellular regulatory mechanisms. *In vitro* studies using mouse and human Tregs favor the hypothesis that the major mechanisms by which these cells exert suppression depend on cell contact and/or cytokine production (Workman *et al.*, 2009; Shevach, 2009; Josefowicz *et al.*, 2012; Quaresma *et al.*, 2014). Other studies have shown that apoptosis via granzyme and perforin might be a possible suppressor mechanism (Gondek *et al.*, 2005). Nonetheless, others believe that a combination of Tregs and apoptosis is important to induce mechanisms that control the pathophysiological response in different diseases, which both factors intervene to control immune responses and mechanisms that regulate cell homeostasis (Quaresma *et al.*, 2014).

In terms of the frequency of Tregs in the clinical forms of leprosy, studies have presented conflicting data: some found a higher frequency of Tregs in patients with lepromatous leprosy (LL) (Palermo *et al.*, 2012; Fernandes *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2014; Saini *et al.*, 2014; Sadhu *et al.*, 2016), while others found Tregs more



frequently in patients with the tuberculoid clinical form (TT) (Attia *et al.*, 2010; Attia *et al.*, 2014; Abdallah *et al.*, 2014).

Despite these studies, the role of Tregs in leprosy has not yet been fully established. Currently, it is believed that Tregs may act in a complex network of regulatory mechanisms to ensure the modulation of immune responses. Therefore, investigation into the involvement of the immune response in leprosy is important to elucidate the mechanisms of the activation of mediators that interfere with the survival of the bacillus (Quaresma *et al.*, 2014). Here, we evaluated the contribution of different apoptotic pathways in Tregs are involved in the development of leprosy.

## **Patients, Materials and Methods**

### **Study population**

Patients recruited in the study were new cases of leprosy admitted to the Center of Reference in Sanitary Dermatology of the *Hospital Eduardo de Menezes*, Belo Horizonte, Brazil. The study included twenty-eight subjects, of which thirteen patients were newly diagnosed with leprosy and classified according to Ridley and Jopling (Ridley & Jopling, 1966) as well as fifteen non-infected (NI) individuals who were age- and sex-matched. Patients were subsequently divided in two different groups: patients classified as PB (BT/TT; n=5); and patients classified as MB (BL/LL; n=8). The Ridley–Jopling classification is meant mainly for research purposes and for the classification of leprosy for therapeutic purposes. Additionally, WHO proposed a simple system based on the number of *M. leprae* present in an individual (WHO, 1982), classified based on the bacilloscopy index (BI). The PB polar group comprised patients with a positive diagnosis of leprosy and was classified in the BT and TT clinical forms; the MB polar group comprised patients with a positive leprosy diagnosis, and was classified in the BL and LL clinical forms; the group NI comprised healthy individuals

who showed no clinical signs of leprosy. By defining MB and PB forms, the implicit phenotype was the contrast between these two forms. We defined this implicit phenotype as leprosy polarization, i.e., the process that drives the development of leprosy subtypes, which needs to be differentiated from factors that impact only one subtype. Here, we will refer to polarization whenever PB and MB forms are opposed, irrespective of the criteria used to define PB and MB leprosy.

All patients were studied before the beginning of the specific therapy or beginning any kind of immunomodulatory or immunosuppressive therapy likely to affect the results of the study, such as systemic corticosteroids. Patients below 18 years of age, pregnant women, and those presenting clinical evidence of anemia or other infections such as tuberculosis, HIV, or helminthic infestation were excluded.

In the clinical evaluation, the presence of skin lesions and the presence or absence of sensitivity were assessed. All patients were examined by Dr. Sandra Lyon, a medical dermatologist responsible for the clinical care of the patients. Sputum smear microscopy was conducted using the BI according to Ridley's logarithmic scale, ranging from zero to six, by collecting dermal smears at four sites: skin lesions, contralateral lesions, elbow, and earlobes. In the histopathological evaluation, biopsies of skin lesions and contralateral tissues were performed for histological characterization. The ML Flow test was used on all patients as an auxiliary tool to define clinical forms, with the qualitative mode being recorded (positive or negative).

### **Ethics Statement**

Written informed consent was obtained from all individuals prior to including them in the study. Independent of their participation, all individuals enrolled were submitted to a standard screening protocol, follow up, and clinical treatment. This study was carried out in

full accordance with institutional ethic committee approval and in Resolution 466/12 of the National Health Council (#14887414.0.0000.5149).

### **Analysis of immunoregulatory markers induced by Tregs**

Peripheral blood was collected from the participants in a sterile Vacutainer tube containing heparin (Becton Dickinson, CA, USA), and 100  $\mu$ L aliquots of whole blood were added to 5-mL polypropylene tubes (Falcon, USA) with 2  $\mu$ L of undiluted human monoclonal antibodies: anti-CD4 (RPA-T4) – labeled with V450; anti-CD25 (M-A251) – labeled APC; anti-CD279 (PD-1) (EH12.1) – labeled with APCCy7; anti-CD95 (Fas/APO-1) (DX2) and anti-CD73 (AD2) – labeled with FITC; and anti-CD39 (TÜ66), anti-CD178 (CD95L) (G247-4), anti-CD152 (CTLA-4) (BNI3), and anti-CD274 (PD-L1) (MIH1) – labeled with PE; to identify surface molecules, for 30 min at room temperature. After incubation, samples were lysed and fixed in 2 mL of commercial lysis solution (FACS Lysing Solution-BD, San Diego, CA, USA) for 10 min at room temperature in the absence of light. Samples were washed using phosphate-buffered saline (PBS) with 1% bovine serum albumin (BSA), permeabilized using PBS with 0.5% saponin, and incubated with 1  $\mu$ L of undiluted human monoclonal antibodies: anti-IL-10 (JES3-19F1), anti-IL-17A (N49-653), anti-granzyme A (CB9), anti-granzyme B (GB11), and anti-perforin ( $\delta$ G9) – labeled with PE; and anti-FOXP3 (236a/E7) – labeled with PECy7. Samples were washed and fixed with 2% formaldehyde solution, and analyzed acquired on flow cytometer Fortessa (BD Biosciences, Breda, Netherlands). All antibodies used were from BD Pharmingen™ combined in a multicolor panel. Compensation controls for each fluorochrome were only used to set compensation. Analyses were performed using FlowJo 10.2 software (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA). The phenotypic profile of Tregs and their molecules was determined as previously described (De Araujo *et al.*, 2011) (Figure 1A, B).

### **Biomarker network assembly**

The Spearman rank correlation test was performed to assess the association between levels of immunological biomarkers in each group. In all cases, significance was considered at  $p < 0.05$ . All analyses were performed using GraphPad Prism version 5.0 (San Diego, CA, USA). Biomarker networks were constructed using a circle layout. Connecting edges represent correlation scores categorized as strong positive ( $r \geq 0.68$ ; thick continuous line), moderate positive ( $0.36 \geq r \leq 0.67$ ; thin continuous line), strong negative ( $r \leq -0.68$ ; thick dashed line), or moderate negative ( $-0.36 \geq r \leq -0.67$ ; thin dashed line) as proposed by Taylor (TAYLOR, 1990).

### **Statistical analyses**

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 5.0 software package. Since data files assume a non-Gaussian distribution, statistical comparisons were carried out using the nonparametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test. In order to compare the intergroup of NI and leprosy groups, we used the Mann-Whitney test for each variable. Clinical data assume a Gaussian distribution and statistical comparisons were carried out using the Student's  $t$  test. Correlation analysis was performed using Spearman's correlation coefficient using JMP software (Cary, NC, USA). In all cases, significance was considered at  $p < 0.05$ .

## Results

### **Patients with PB and MB present different expressions of Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup>)**

To further characterize the frequency of Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup>), flow cytometry analysis was performed both in leprosy (PB and MB) and NI individuals. Figure 1A and 1B show the strategy used to validate antibodies and manual gating used in this study. NI individuals presented a higher mean intensity of fluorescence of CD25 in CD4<sup>+</sup> cells than patients with leprosy (Figure 1C). Data analysis showed that MB patients had a higher mean of intensity of fluorescence of FOXP3 in CD4<sup>+</sup> cells, also a higher percentage of Tregs when compared to the NI group (Figure 1D and 1E).

Regarding cytokine expression, Tregs of PB patients showed a higher frequency of IL-10<sup>+</sup> expression when compared to the group of MB patients (Figure 1F). Our data showed higher frequencies of Tregs expressing IL-17A in MB patients ( $p < 0.05$ ) when compared to the group of NI individuals (Figure 1G). The transcription factor Helios is expressed in a subset of Foxp3<sup>+</sup> Tregs and is a marker of thymus-derived Tregs (tTreg) (CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup>) (Thornton *et al.*, 2016), for which no differences were observed between the analyzed groups (Figure 1H).

### **Expression of apoptosis-inducing molecules and their ligands in Tregs of leprosy patients and NI individuals**

Figure 2 presents results from the expression of apoptosis-inducing molecules and their ligands in Tregs of peripheral blood of leprosy patients (PB and MB) and NI individuals in an *ex vivo* context.

Our results have shown a significant increase in the frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> cells in the group of patients with leprosy (PB and MB) ( $p < 0.05$ ) when compared to the NI group (Figure 2A). No differences were observed in PD-L1 expression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells of the analyzed groups (Figure 2B). Interestingly, a higher frequency of Tregs co-expressing PD-L1<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> was observed in MB patients ( $p < 0.05$ ) when compared to the group of NI individuals (Figure 2C).

Furthermore, no differences were observed in CD95 expression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells between the analyzed groups (Figure 2D). A higher frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup>CD95L<sup>+</sup> cells was observed in the peripheral blood of PB patients ( $p < 0.05$ ) when compared to the group of NI individuals (Figure 2E). There were no differences in the frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells co-expressing CD95<sup>+</sup>CD95L<sup>+</sup> between the analyzed groups (Figure 2F).

### **Expression of function markers in Tregs of patients with leprosy (PB and MB) and of NI individuals**

Figure 3 presents the analysis of the molecular expression of CD39, CD73, CTLA-4, CD28, TGF- $\beta$ , granzyme A, granzyme B, and perforin in Tregs of patients with leprosy (PB and MB) and NI individuals. Through analysis of the results, no differences were observed in CD39 expression (Figure 3A) or CD73<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup> co-expression (Figure 3C) of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> between the analyzed groups. However, a higher frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> was observed in the peripheral blood of NI individuals ( $p < 0.05$ ) when compared to patients with leprosy (PB and MB) (Figure 3B). In relation to the expression of the modulatory molecules CTLA-4 and CD28, and the cytokine TGF- $\beta$ , by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup>, no differences were found between the analyzed groups (Figure 3D-F). Finally, the expression of the cytotoxic molecules granzyme A, B, and perforin by

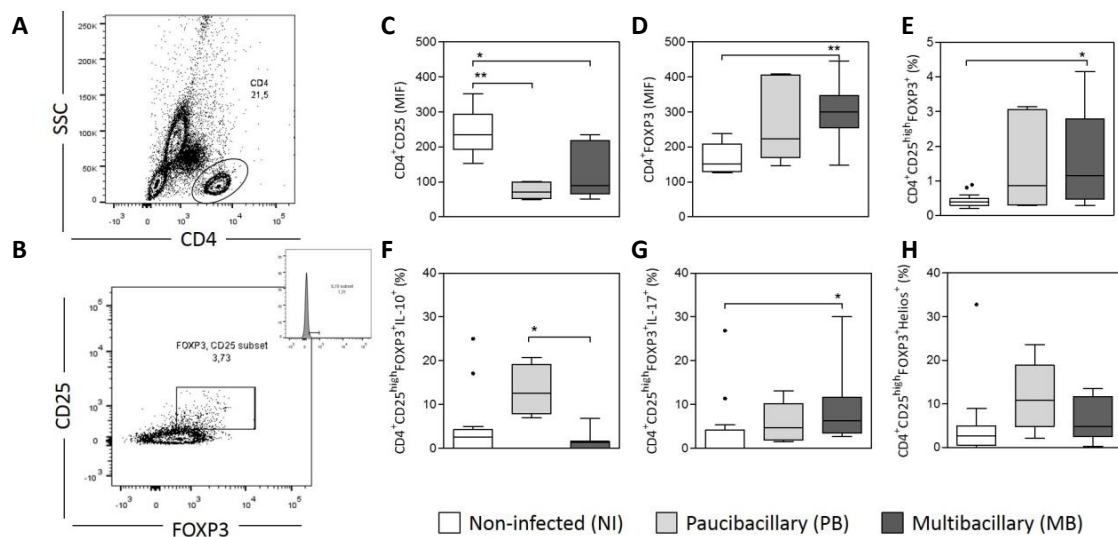
CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> of leprosy and NI individuals were evaluated. The expression of granzyme A by Tregs was higher in the NI group than in the group of patients with leprosy (Figure 3G). There were no differences in granzyme B (Figure 3H) or perforin (Figure 3I) expression in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells between the analyzed groups.

### **Correlation network analysis of molecules and cytokines evaluated in Treg of patients with leprosy and NI individuals**

Figure 4 presents correlations among surface and intracellular molecules evaluated in Tregs of patients with leprosy and NI individuals. Our data showed that CD28 presented a positive and significant correlation with IL-10 in Tregs from the group of NI individuals. A positive and significant correlation was observed between PD-1 and perforin ( $r=0.00$ ) and between CD95L and IL-17A ( $r=0.00$ ) in NI individuals. Nevertheless, IL-17A produced by Tregs showed negative correlations with CD39 ( $r=0.00$ ), CD39CD73 co-expression ( $r=0.00$ ), and TGF- $\beta$  ( $r=0.00$ ) in the NI group (Figure 4). Regarding CD39, a positive correlation was observed with Tregs co-expressing CD39CD73 ( $r=0.00$ ). We also showed a positive correlation between granzyme A and TGF- $\beta$  in the NI group (Figure 4).

Tregs from the PB group showed a positive correlation between CTLA-4 with granzyme A ( $r=0.00$ ) and TGF- $\beta$  ( $r=0.00$ ). Our analyses also showed a positive correlation between TGF- $\beta$  and granzyme A in the PB group (Figure 4). Nevertheless, IL-17A expressed in Tregs in the PB group was negatively correlated with TGF- $\beta$  ( $r=0.00$ ) and granzyme A ( $r=0.00$ ) (Figure 4). Our data demonstrated a positive correlation between IL-10 and CD95L ( $r=0.00$ ), while CD39 showed a positive correlation with CD39CD73 co-expression ( $r=0.00$ ) and between CD73 and granzyme B ( $r=0.00$ ) in Tregs in the PB group (Figure 4).

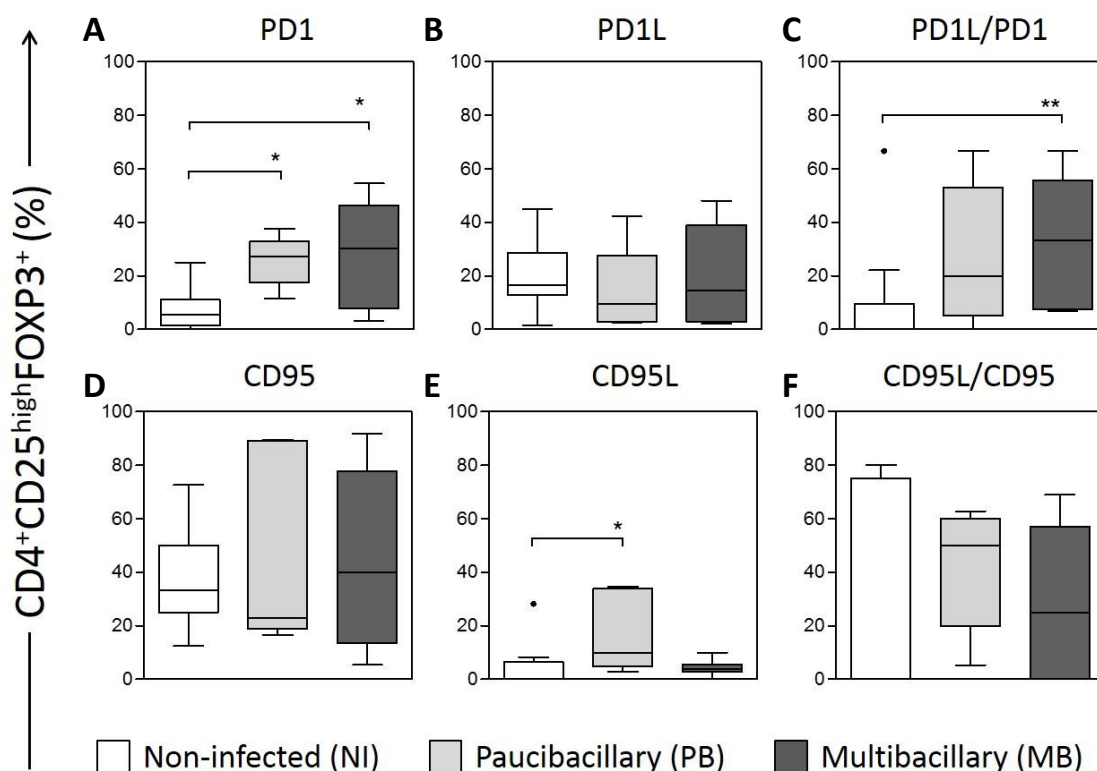
Moreover, the MB group showed a positive correlation between CD73 expression and granzyme B ( $r=0.00$ ), and a negative correlation between CD73 and CD39CD73 co-expression ( $r=0.00$ ) in Tregs (Figure 4).



**Figure 1.** Regulatory T cell (Treg) expression in peripheral blood of individuals with paucibacillary and multibacillary leprosy (PB and MB, respectively) and of non-infected (NI) individuals, in an *ex vivo* context. The groups were comprised by PB (gray, n=5), MB (dark gray, n=8), and NI (white, n=15). **A.** Representative dot plot showing the cell gating based on the CD4 expression profile versus granularity (SSC). **B.** Expression of CD25 (APC) versus FOXP3 (PECy7), in CD4<sup>+</sup> T cells obtained from SSC versus the CD4 plot, an approach used to demarcate Tregs. **C.** Mean intensity of fluorescence (MFI) of CD25 molecules on the surface of TCD4<sup>+</sup> cells. **D.** MFI of FOXP3 molecules in TCD4<sup>+</sup> cells. **E.** Percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells. **F.** Percentage of IL-10-expressing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells. **G.** Percentage of IL-17A-expressing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells. **H.** Percentage of Helios-expressing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells. Plots show highlighted the median, the interquartile

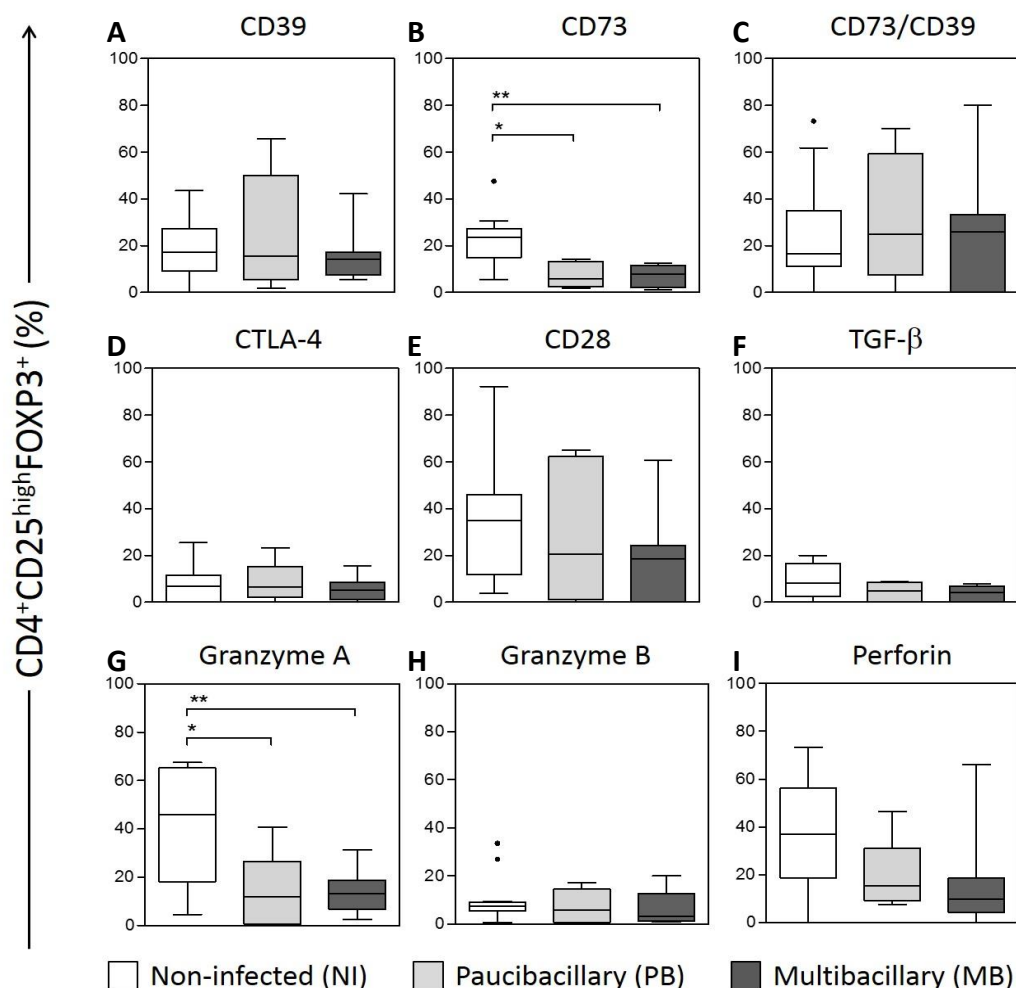


range, and dots highlight values considered as outliers. Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) are represented by lines and by the asterisk symbol (\*). Two asterisks (\*\*)  $p < 0.01$ .



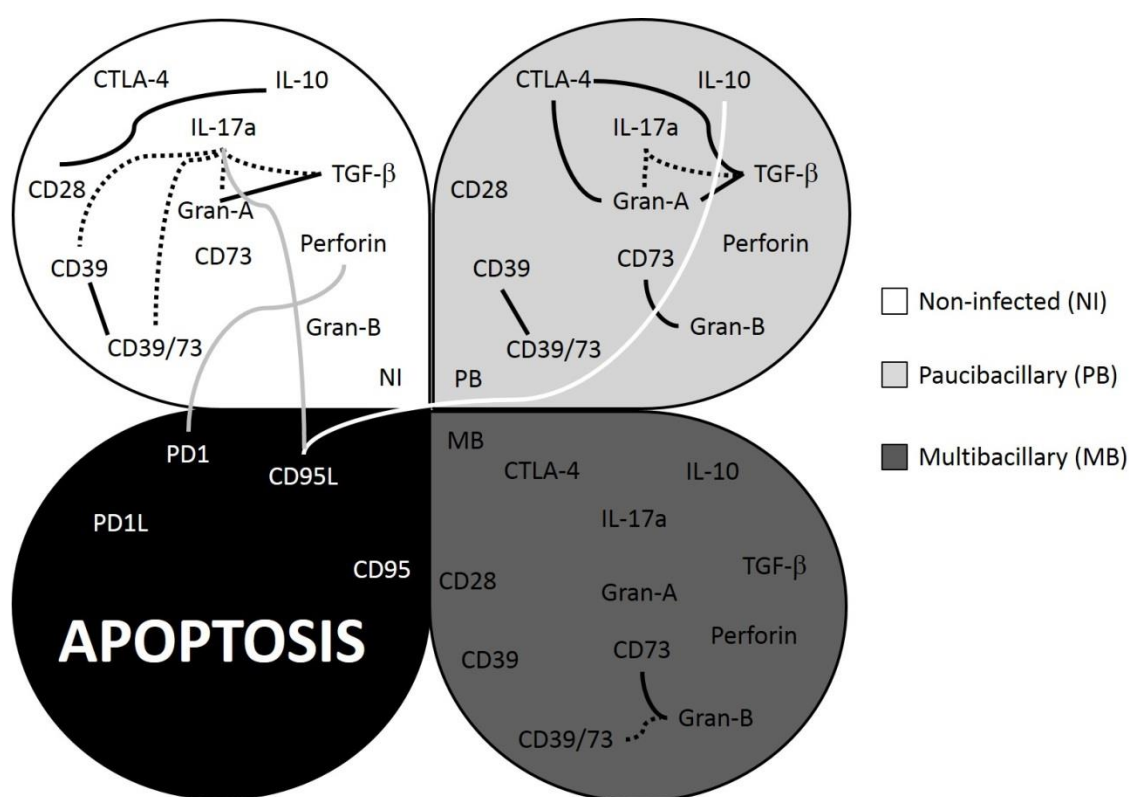
**Figure 2.** Expression of apoptosis-inducing molecules and their ligands in regulatory T cells (Tregs) of peripheral blood of patients with paucibacillary and multibacillary leprosy (PB and MB, respectively) and of non-infected (NI) individuals, in an *ex vivo* context. The groups were comprised by PB (gray, n=5), MB (dark gray, n=8), and NI (white, n=15). **A.** Percentage of PD-1-expressing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells. **B.** Percentage of PD-L1-expressing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells. **C.** Percentage of PD-L1/PD-1-co-expressing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells. **D.** Percentage of CD95-expressing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells. **E.** Percentage of CD95L-expressing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells. **F.** Percentage of CD95L/CD95-co-expressing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells. Data are presented as percentage of Tregs. Plots show highlighted the median, the interquartile range, and dots highlight values

considered as outliers. Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) are represented by lines and the asterisk symbol (\*).



**Figure 3.** Expression of function markers in regulatory T cells (Tregs) of peripheral blood of patients with paucibacillary and multibacillary leprosy (PB and MB, respectively) and of non-infected (NI) individuals, in an *ex vivo* context. The groups were comprised by PB (gray, n=5), MB (dark gray, n=8), and NI (white, n=15). **A.** Percentage of CD39-expressing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells. **B.** Percentage of CD73-expressing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells. **C.** Percentage of CD73/CD39-co-expressing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells. **D.** Percentage of CTLA-4-expressing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells. **E.** Percentage of CD28-expressing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells. **F.** Percentage of TGF-β-expressing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup>

cells. **G.** Percentage of granzyme A-expressing  $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$  cells. **H.** Percentage of granzyme B-expressing  $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$  cells. **I.** Percentage of perforin-expressing  $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$  cells. Data are presented as percentage of Tregs. Plots show highlighted the median, the interquartile range, and dots highlight values considered as outliers. Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) are represented by lines and the asterisk symbol (\*).



**Figure 4.** Correlation network analysis of molecules and cytokines evaluated in regulatory T cells (Tregs) of peripheral blood of patients with paucibacillary and multibacillary leprosy (PB and MB, respectively) and of non-infected (NI) individuals, in an *ex vivo* context. The groups were comprised by PB (gray,  $n=5$ ), MB (dark gray,  $n=8$ ), and NI (white,  $n=15$ ). Continuous lines represent positive correlations. Dotted lines represent negative correlations. Significant Spearman correlations with  $p < 0.05$  are represented by connecting edges to highlight positive [strong ( $r \geq 0.68$ ; thick continuous line) or moderate correlations

( $0.36 \geq r \leq 0.67$ ; thin continuous line)], and negative [strong ( $r \leq -0.68$ ; thick dashed line) or moderate correlations ( $-0.36 \geq r \leq -0.67$ ; thin dashed line)].

## Discussion

The role of Tregs in the infection with *M. leprae* has not been completely defined. In the present study, differences have been observed regarding the frequency and the phenotypic expression of molecules related to apoptosis among the groups of patients with polar clinical forms or among leprosy patients and NI individuals.

Several suppressive mechanisms of Tregs have been described such as inhibitory cytokines, modulation of antigen-presenting cells (APCs) and effector cells, interruption of metabolic pathways, cytolysis, and induction of apoptosis (Vignali *et al.*, 2008). In this context, the expression of immunosuppressive markers induced by Tregs was also evaluated, since it is hypothesized that Tregs do not use only one suppressive mechanism, but that they have an arsenal of regulatory mechanisms available.

Although humoral and cellular immune responses are simultaneously present in the response to leprosy, the cellular response predominates, since *M. leprae* is an obligate intracellular bacillus. Owing to the importance of cellular immunity, the distinction in the behavior of this response in patients with polar forms of leprosy has been identified. In this study, we observed differential expression of Treg molecules, suggesting that distinct suppressive mechanisms may act in each clinical form of leprosy.

In support of the results described above, we showed that MB patients have a higher intensity of FOXP3 in CD4<sup>+</sup> cells as well as a higher percentage of Tregs when compared to the group of NI individuals. A possible explanation for this observation has already been provided in previous epigenetic studies related to changes in the FOXP3 gene where authors suggest that *M. leprae* induces changes in the expression of this gene, thus reflecting a higher

expression and stability of FOXP3 in Tregs (Chen *et al.*, 2006a; Li *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009a; Kumar *et al.*, 2014). The fact that bacillary growth is observed in MB patients corroborates this idea. On the other hand, Attia *et al.* detected a greater frequency of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> population in *ex vivo* samples of adult patients with the tuberculoid form of leprosy when compared to controls. However, the gating strategy used by those authors to define CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> differed from ours, which could explain these discrepant results at least in part.

The inhibitory cytokines IL-10 and TGF- $\beta$  are expressed by Tregs and are considered to be involved in the main suppressive mechanism used by these cells (Workman *et al.*, 2009). The present study showed a higher frequency of CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> cells in the PB group when compared to the group of MB patients. The final result would be an effective immune response capable of limiting bacillary multiplication and the dissemination of lesions without causing immune pathology in the PB group. It is known that in the TT polar form, specific antibodies against *M. leprae* are usually absent or are present but in low levels. Nevertheless, in the LL polar form, a predominance of the humoral immune response and the production of anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-5, IL-6, and IL-10) are observed (Walker & Lockwood, 2006). Therefore, proliferation of *M. leprae* is observed as well as the appearance of several lesions and inflammatory infiltrates (Degang *et al.*, 2014; Nath *et al.*, 2015). Conversely, Attia *et al.* (2014) identified a higher expression of IL-10 in Tregs of patients with leprosy than in Tregs of NI individuals, suggesting that high levels of this cytokine may contribute to growth of the bacillus and consequently to the worsening of the disease. It is possible that the difference between clinical classification and genetic background of analyzed individuals contribute to these contrary findings.

The expression of IL-17 by Tregs in inflammatory conditions has been reported previously, and in that study, it was observed that IL-17-producing Tregs retain a suppressive

function (Beriou *et al.*, 2009). Interestingly, here we observed that Tregs from the MB patient group are able to produce high levels of IL-17 in comparison to NI individuals. In relation to the PB group, Tregs of MB individuals produced lower amounts of IL-10. Our data suggest that inflammation driven by *M. leprae* may lead Tregs of MB patients to secrete IL-17 and low levels of IL-10. The concomitant expression of IL-17 and the regulatory phenotype may result in a function shift, where in the inflammatory environment is favored rather than a regulated one, favoring tissue damage. However, it is possible that there is sequential involvement and different functions of IL-17 and Th1 subsets, rather than an exclusive role of these subsets during the development of autoimmune diseases and other cases of tissue inflammation (Bettelli *et al.*, 2007). We can conclude from these data that IL-17-producing Tregs may represent a significant subset of human CD4 cells that display the functional features of both Treg and Th17 cells. Further investigation regarding this cellular type would be necessary to confirm this hypothesis in the context of leprosy.

Tregs induced by the programmed death-1 (PD-1) pathway, which assists in maintaining immune homeostasis and preventing autoimmune attack (Francisco *et al.*, 2010), may also lead to cellular anergy in LL. Apoptosis requires a degree of control of the immune responses that are developed after antigenic stimulation, wherein integrity of the apoptotic pathways is required to maintain the peripheral tolerance (Strauss *et al.*, 2009; Francisco *et al.*, 2010). Additionally, the engagement of PD-1 on the T cell surface with its ligands, such as PD-L1, may result in an inhibited function of the T cell, with reduced proliferation, cytokine production, and survival ratio (Buchbinder *et al.*, 2016). In a study conducted by Sadhu *et al.* (2016), high expression of the PD-1 molecule was observed in Tregs, and high expression of PD-L1 was observed in APC of patients with the PB clinical form in comparison to patients with the MB clinical form and their household contacts. These data suggest that the interaction between PD-1 and PD-L1 in the PB clinical form may have a role

in immune impairment in affected patients. We did not evaluate the expression of PD-L1 in APC of the analyzed groups; however, we investigated the expression behavior of these molecules in leprosy Tregs. Our results showed that there was a higher frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> cells in the groups of patients with leprosy (MB and PB) when compared to the group of NI individuals. Interestingly, a higher frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells co-expressing PD-L1<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup> was observed in MB patients than in the group of NI individuals. Therefore, Tregs of both leprosy groups may have their functions regulated through PD-1, and this may impair the regulatory functions of those cells. Tregs of the MB group co-expressing PD-1 and PD-L1 may also regulate the function of other T cells. The PD-1/PD1-L pathway may be used by Tregs of the MB group to regulate effector cells, impairing its functions and, at the end, leading to difficulties in the control of the infection in these patients. Taken together, these results may indicate the effect of the PD-1 and PD-L1 interaction as important for co-inhibition during the Treg cellular initiation of an immune response.

Regarding CD95, no differences were observed in CD95 expression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> cells between the analyzed groups. A higher frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup>CD95L<sup>+</sup> cells was observed in the peripheral blood of PB patients than in the group of NI individuals.

CD95 (Apo-1/Fas)-bearing cells are sensitive towards apoptosis, which is mediated by CD95 ligand (CD95L) cross-linking (Krammer, 2000). We propose that the higher frequency of CD95L in Tregs of PB patients may be associated with the induction of apoptosis of effector cells present in this clinical form, related to the control of the exacerbated immune response.

The activities of the CD39 and CD73 pathways modulate the persistence and degree of purinergic signals conveyed to immune cells. The changes achieved lead to a conversion from an ATP-proinflammatory context to an anti-inflammatory environment induced by

adenosine (Antonioli *et al.*, 2013). Dwyer *et al.*, (2007) stated that Tregs of CD39-deficient mice show regulatory dysfunction that is manifested as a 50% decrease in the capacity modulating the function of effector T cells *in vitro* and *in vivo*; this suggested that CD39 would be the main ectonucleotidase responsible for producing adenosine, and that synergy between CD39 and CD73 may contribute to the immunoregulatory function of Tregs. We observed that Tregs of patients with leprosy presented lower expression of CD73 than Tregs of the NI group. This may indicate an impairment of the regulatory function in those patients via the purinergic pathway.

Granzymes A and B and perforin are known to be found in differential subpopulations of T lymphocytes and are involved in cytotoxic function (Bade *et al.*, 2005). Garcia-Laorden *et al.* (2015) showed that patients with pulmonary tuberculosis had high expression of granzymes A and B in TCD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes, but not in NK cells, in comparison to controls. These data suggest that granzymes A and B participate in the immune response of tuberculosis. Since leprosy is a disease caused by a mycobacterium, these mechanisms are suggested to also be a means of operation of Tregs in immunoregulation of the leprosy immune response. Contradictorily, our results showed a decreased expression of granzyme A by Tregs of patients with leprosy when compared to NI individuals, indicating that the infection with *M. leprae* diverts Tregs to other mechanisms of immune modulation than cytotoxicity through granzyme A action.

In summary, the higher frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup>CD95L<sup>+</sup> cells observed in the peripheral blood of PB patients may indicate that this is the preferential mechanism of apoptosis used by Tregs. Moreover, this mechanism may be related to the impairment of the exacerbated immune response. Importantly, the correlation network showed a positive correlation between IL-10 and CD95L in PB patients. This may suggest that, besides the apoptotic pathway, Tregs of PB patients use IL-10 in immunoregulation, thus allowing a



balanced effective immune response to be reached, i.e., control of the parasite burden without causing immune pathology.

Nevertheless, our results showed that in the MB clinical form, the apoptosis induction via PD-L1 was observed to be associated with a higher frequency of Tregs in this polar clinical form; this may be associated with the induction of apoptosis of effector cells, therefore contributing to the viability of the bacillus and to the persistence of leprosy disease. Consequently, patients develop a disseminated multibacillary disease. Additionally, Tregs of MB patients express IL-17. The expression of this cytokine by Tregs in leprosy requires further investigation. The correlation network in MB patients did not show many interactions between effector and apoptotic molecules. This might be a reflex of an uncontrolled immune response in this group.

In conclusion, different apoptotic mechanisms and cytokines expressed are used by Tregs of PB and MB patients, and these differences are suggested to contribute to distinct immune responses, which are reflected in the development of polar forms of leprosy. It is important to mention that no mechanism of suppression previously mentioned may be considered individually in the control of immunity mediated by Tregs. Furthermore, the FOXP3-dependent suppression implemented by  $CD4^+CD25^{\text{high}}$  T cells verifies several types of effector immune responses to antigens and pathogens (Josefowicz *et al.*, 2012). Nevertheless, it is not clear whether Tregs implement a universal program to limit different types of immunity or modulate suppression programs adapted to inhibit a specific immune response.

### **Competing interests**

The authors have declared that no competing interests exist.

**Acknowledgements**

We thank the staff at the Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, CPqRR-FIOCRUZ/MG for technical assistance. RCO, MOCR, and JASG thank CNPq for the fellowships (PQ). ATC thanks CNPq for PDJ and CAPES for PNPd fellowships.

**Funding**

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (grant number 474796/2012-4), the Fundação de Amparo Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (grant number PPM-00501-13), the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), the National Institute of Science and Technology on Tropical Diseases (INCT-DT), and the National Institutes of Health.

## References

- [1] Shepard, C.C., 1962. Multiplication of *Mycobacterium leprae* in the foot-pad of the mouse. *Int. J. Lepr.* 30, 291–306. PubMed PMID: 13976752.
- [2] Scollard, D.M., Adams, L.B., Gillis, T.P., Krahenbuhl, J.L., Truman, R.W., Williams, D.L., 2006. The continuing challenges of leprosy. *Clin. Microbiol. Rev.* 19(2), 338–381. Review. PubMed PMID: 16614253; PubMed Central PMCID: PMC1471987.
- [3] World Health Organization. Weekly epidemiological record. Available from: <http://www.who.int/wer/en/>; 2016. 35, 405e420.
- [4] Geluk, A., Ottenhoff, T.H., 2006. HLA and leprosy in the pre and postgenomic eras. *Hum. Immunol.* 67(6), 439–445. Epub 2006 Apr 3. Review. PubMed PMID: 16728267.
- [5] Modlin, R.L., 2010. The innate immune response in leprosy. *Curr. Opin. Immunol.* 22(1), 48–54. doi: 10.1016/j.coi.2009.12.001. Epub 2010 Jan 7. Review. PubMed PMID: 20060279; PubMed Central PMCID: PMC2882026.
- [6] Alter, A., Grant, A., Abel, L., Alcaïs, A., Schurr, E., 2011. Leprosy as a genetic disease. *Mamm. Genome.* 22(1-2), 19–31. doi: 10.1007/s00335-010-9287-1. Epub 2010 Oct 9. Review. PubMed PMID: 20936290.
- [7] Kaplan, G., Cohn, Z.A., 1986. The immunobiology of leprosy. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 28, 45–78. Review. PubMed PMID: 3516911.
- [8] Walker, S.L., Lockwood, D.N., 2007. Leprosy. *Clin. Dermatol.* 25(2), 165–172. Review. PubMed PMID: 17350495.
- [9] Gaschignard, J., Grant, A.V., Thuc, N.V., Orlova, M., Cobat, A., Huong, N.T., Ba, N.N., Thai, V.H., Abel, L., Schurr, E., Alcaïs, A, 2016. Pauci- and multibacillary leprosy: two distinct, genetically neglected diseases. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10(5), e0004345. doi: 10.1371/journal.pntd.0004345. eCollection 2016 May. Review. PubMed PMID: 27219008; PubMed Central PMCID: PMC4878860.

- [10] Sadhu, S., Khaitan, B.K., Joshi, B., Sengupta, U., Nautiyal, A.K., Mitra, D.K., 2016. Reciprocity between regulatory T cells and Th17 cells: relevance to polarized immunity in leprosy. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10(1), e0004338. doi: 10.1371/journal.pntd.0004338. eCollection 2016 Jan. PubMed PMID: 26751584; PubMed Central PMCID: PMC4709061.
- [11] Workman, C.J., Szymczak-Workman, A.L., Collison, L.W., Pillai, M.R., Vignali, D.A., 2009. The development and function of regulatory T cells. *Cell Mol. Life Sci.* 66(16), 2603–2622. doi: 10.1007/s00018-009-0026-2. Epub 2009 Apr 24. Review. PubMed PMID: 19390784; PubMed Central PMCID: PMC2715449.
- [12] Shevach, E.M., 2009. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity.* 30(5), 636–645. doi: 10.1016/j.immuni.2009.04.010. Review. PubMed PMID: 19464986.
- [13] Josefowicz, S.Z., Lu, L.F., Rudensky, A.Y., 2012. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 531–564. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623. Epub 2012 Jan 6. Review. PubMed PMID: 22224781.
- [14] Quaresma, J.A., Esteves, P.C., de Sousa, Aarão T.L., de Sousa, J.R., da Silva Pinto, D., Fuzii, H.T., 2014. Apoptotic activity and Treg cells in tissue lesions of patients with leprosy. *Microb. Pathog.* 76, 84–88. doi: 10.1016/j.micpath.2014.07.005. Epub 2014 Aug 12. PubMed PMID: 25128092.
- [15] Gondek, D.C., Lu, L.F., Quezada, S.A., Sakaguchi, S., Noelle, R.J., 2005. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J. Immunol.* 174(4), 1783–1786. PubMed PMID: 15699103.

- [16] Palermo, M.L., Pagliari, C., Trindade, M.A., Yamashitafuji, T.M., Duarte, A.J., Cacere, C.R., Benard, G., 2012. Increased expression of regulatory T cells and down-regulatory molecules in lepromatous leprosy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 86(5), 878–883. doi: 10.4269/ajtmh.2012.12-0088. PubMed PMID: 22556091; PubMed Central PMCID: PMC3335697.
- [17] Fernandes, C., Gonçalves, H.S., Cabral, P.B., Pinto, H.C., Pinto, M.I., Câmara, L.M., 2013. Increased frequency of CD4 and CD8 regulatory T cells in individuals under 15 years with multibacillary leprosy. *PLoS One.* 8(11), e79072. doi: 10.1371/journal.pone.0079072. eCollection 2013. PubMed PMID: 24244424; PubMed Central PMCID: PMC3828331.
- [18] Kumar, S., Naqvi, R.A., Khanna, N., Pathak, P., Rao, D.N., 2011. Th3 immune responses in the progression of leprosy via molecular cross-talks of TGF- $\beta$ , CTLA-4 and Cbl-b. *Clin. Immunol.* 141(2), 133–142. doi: 10.1016/j.clim.2011.06.007. Epub 2011 Jun 11. PubMed PMID: 21807564.
- [19] Kumar, S., Naqvi, R.A., Ali, R., Rani, R., Khanna, N., Rao, D.N., 2013. CD4+CD25+ T regs with acetylated FoxP3 are associated with immune suppression in human leprosy. *Mol. Immunol.* 56(4), 513–520. doi: 10.1016/j.molimm.2013.04.015. Epub 2013 Aug 1. PubMed PMID: 23911408.
- [20] Saini, C., Ramesh, V., Nath, I., 2014. Increase in TGF- $\beta$  secreting CD4+CD25+ FOXP3+ T regulatory cells in anergic lepromatous leprosy patients. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8(1), e2639. doi: 10.1371/journal.pntd.0002639. eCollection 2014. PubMed PMID: 24454972; PubMed Central PMCID: PMC3894184.
- [21] Attia, E.A., Abdallah, M., Saad, A.A., Afifi, A., El Tabbakh, A., El-Shennawy, D., Ali, H.B. 2010. Circulating CD4+ CD25 high FoxP3<sup>+</sup> T cells vary in different clinical forms of leprosy. *Int. J. Dermatol.* 49(10), 1152–1158. doi: 10.1111/j.1365-4632.2010.04535.x. PubMed PMID: 20883403.

[22] Attia, E.A., Abdallah, M., El-Khateeb, E., Saad, A.A., Lotfi, R.A., Abdallah, M., El-Shennawy, D. 2014. Serum Th17 cytokines in leprosy: correlation with circulating CD4(+)CD25 (high)FoxP3 (+) T-regs cells, as well as down regulatory cytokines. *Arch. Dermatol. Res.* 306(9), 793–801. doi: 10.1007/s00403-014-1486-2. Epub 2014 Jul 14. PubMed PMID: 25018055.

[23] Abdallah, M., Attia, E.A., Saad, A.A., El-Khateeb, E.A., Lotfi, R.A., Abdallah, M., El-Shennawy, D. 2014. Serum Th1/Th2 and macrophage lineage cytokines in leprosy; correlation with circulating CD4(+) CD25(high) FoxP3(+) T-regs cells. *Exp. Dermatol.* 23(10):742–747. doi: 10.1111/exd.12529. PubMed PMID: 25109693.

[24] Ridley, D.S., Jopling, W.H. 1966. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int. J. Lepr. Other. Mycobact. Dis.* 34(3), 255–273. PubMed PMID: 5950347.

[25] de Araújo, F.F., da Silveira, A.B., Correa-Oliveira, R., Chaves, A.T., Adad, S.J., Fiuza, J.A., Fares, R.C., Ferreira, K.S., Fujiwara, R.T., Silva Gomes, J.A. 2011. Characterization of the presence of Foxp3(+) T cells from patients with different clinical forms of Chagas' disease. *Hum. Pathol.* 42(2), 299–301. doi: 10.1016/j.humpath.2010.10.002. PubMed PMID: 21238788.

[26] Taylor, R. 1990. Interpretation of the correlation coefficient: a basic review. *J. Diagn. Med. Sonogr.* 6(1), 35–39.

[27] Thornton, A.M., Kilaru, G., Burr, P., Rieder, S., Muljo, S.A., Shevach, E.M. 2016. Helios expression defines two distinct populations of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *J. Immunol.* 196, 125.6.

[28] Vignali, D.A., Collison, L.W., Workman, C.J. 2008. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* 8(7), 523–532. doi: 10.1038/nri2343. Review. PubMed PMID: 18566595; PubMed Central PMCID: PMC2665249.

[29] Chen, S., Wang, Q., Chu, T., Zheng, M. 2006. Inter-observer reliability in assessment of sensation of skin lesion and enlargement of peripheral nerves in leprosy patients. *Lepr. Rev.* 77(4), 371–376. PubMed PMID: 17343224.

- [30] Li, B., Samanta, A., Song, X., Iacono, K.T., Bembas, K., Tao, R., Basu, S., Riley, J.L., Hancock, W.W., Shen, Y., Saouaf, S.J., Greene, M.I. 2007. FOXP3 interactions with histone acetyltransferase and class II histone deacetylases are required for repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104(11), 4571–4576. Epub 2007 Mar 7. PubMed PMID: 17360565; PubMed Central PMCID: PMC1838642.
- [31] Wang, W., Lau, R., Yu, D., Zhu, W., Korman, A., Weber, J. 2009. PD1 blockade reverses the suppression of melanoma antigen-specific CTL by CD4<sup>+</sup> CD25(Hi) regulatory T cells. *Int. Immunol.* 21(9), 1065–1077. doi: 10.1093/intimm/dxp072. Epub 2009 Aug 3. PubMed PMID: 19651643; PubMed Central PMCID: PMC2731790.
- [32] Kumar, S., Naqvi, R.A., Ali, R., Rani, R., Khanna, N., Rao, D.N. 2014. FoxP3 provides competitive fitness to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells in leprosy patients via transcriptional regulation. *Eur. J. Immunol.* 44(2), 431–439. doi: 10.1002/eji.201343649. Epub 2013 Dec 4. PubMed PMID: 24214631.
- [33] Workman, C.J., Szymczak-Workman, A.L., Collison, L.W., Pillai, M.R., Vignali, D.A. 2009. The development and function of regulatory T cells. *Cell. Mol. Life. Sci.* 66(16), 2603–2622. doi: 10.1007/s00018-009-0026-2. Epub 2009 Apr 24. Review. PubMed PMID: 19390784; PubMed Central PMCID: PMC2715449.
- [34] Walker, S.L., Lockwood, D.N. 2006. The clinical and immunological features of leprosy. *Br. Med. Bull.* 77-78, 103–121. Epub 2006 Nov 7. Review. PubMed PMID: 17090777.
- [35] Degang, Y., Nakamura, K., Akama, T., Ishido, Y., Luo, Y., Ishii, N., Suzuki, K. 2014. Leprosy as a model of immunity. *Future. Microbiol.* 2014. 9(1), 43–54. doi: 10.2217/fmb.13.140. PubMed PMID: 24328380.
- [36] Nath I, Saini C, Valluri VL. Immunology of leprosy and diagnostic challenges. *Clin Dermatol.* 2015 Jan-Feb;33(1), 90–8. doi: 10.1016/j.clindermatol.2014.07.005. Review. PubMed PMID: 25432814.

- [37] Attia, E.A., Abdallah, M., El-Khateeb, E., Saad, A.A., Lotfi, R.A., Abdallah, M., El-Shennawy, D. 2014. Serum Th17 cytokines in leprosy: correlation with circulating CD4(+) CD25 (high)FoxP3 (+) T-regs cells, as well as down regulatory cytokines. *Arch. Dermatol. Res.* 306(9), 793–801. doi: 10.1007/s00403-014-1486-2. Epub 2014 Jul 14. PubMed PMID: 25018055.
- [38] Beriou, G., Costantino, C.M., Ashley, C.W., Yang, L., Kuchroo, V.K., Baecher-Allan, C., Hafler, D.A. 2009. IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood.* 113(18), 4240–4249. doi: 10.1182/blood-2008-10-183251. Epub 2009 Jan 26. PubMed PMID: 19171879; PubMed Central PMCID: PMC2676084.
- [39] Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V.K. 2007. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat. Immunol.* 8(4), 345–350. PubMed PMID: 17375096.
- [40] Francisco, L.M., Sage, P.T., Sharpe, A.H. 2010. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol. Rev.* 236, 219–242. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00923.x. Review. PubMed PMID: 20636820; PubMed Central PMCID: PMC2919275.
- [41] Strauss, L., Bergmann, C., Whiteside, T.L. 2009. Human circulating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells kill autologous CD8<sup>+</sup> but not CD4<sup>+</sup> responder cells by Fas-mediated apoptosis. *J Immunol.* 182(3), 1469–1480. PubMed PMID:19155494; PubMed Central PMCID: PMC3721355.
- [42] Buchbinder, E.I., Desai, A. 2016. CTLA-4 and PD-1 pathways: similarities, differences, and implications of their inhibition. *Am. J. Clin. Oncol.* 39(1), 98–106. doi: 10.1097/COC.0000000000000239. Review. PubMed PMID: 26558876; PubMed Central PMCID: PMC4892769.
- [43] Krammer, P.H., 2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature.* 407, 789–795.
- [44] Antonioli, L., Pacher, P., Vizi, E.S., Haskó, G., 2013. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol. Med.* 19, 355–367.



[45] Dwyer, K.M., Deaglio, S., Gao, W., Friedman, D., Strom, T.B., Robson, S.C., 2007. CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signal*. 3, 171–180.

[46] Bade, B., Boettcher, H.E., Lohrmann, J., Hink-Schauer, C., Bratke, K., Jenne, D.E., Virchow, J.C. Jr., Luttmann, W, 2005. Differential expression of the granzymes A, K and M and perforin in human peripheral blood lymphocytes. *Int. Immunol*. 17, 1419–1428.

[47] Garcia-Laorden, M.I., Blok, D.C., Kager, L.M., Hoogendijk, A.J., van Mierlo, G.J., Lede, I.O., Rahman, W., Afroz, R., Ghose, A., Visser, C.E., Md Zahed, A.S., Husain, M.A., Alam, K.M., Chandra Barua, P., Hassan, M., Hossain, A., Tayab, M.A., Day, N., Dondorp, A.M., de Vos, A.F., van der Poll, T, 2015. Increased intra- and extracellular granzyme expression in patients with tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 95, 575–580.