



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Giovanna Valle Germano

**Avaliação da capacidade estimulatória de células
dendríticas em pacientes com hanseníase**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Niéto Brito de Souza

Botucatu

Giovanna Valle Germano

Avaliação da capacidade estimulatória de
células dendríticas em pacientes com
hanseníase

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Niéto Brito de Souza

Botucatu
2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Germano, Giovanna Valle.

Avaliação da capacidade estimulatória de células dendríticas em pacientes com hanseníase / Giovanna Valle Germano. - Botucatu, 2022

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Vânia Niéto Brito de Souza

Capes: 21100004

1. Células dendríticas. 2. Hanseníase. 3. Mycobacterium leprae. 4. Linfócitos T.

Palavras-chave: Células dendríticas; Hanseníase; Imunologia celular; Linfócitos T; Mycobacterium leprae.

O presente trabalho foi desenvolvido no Instituto Lauro de Souza Lima da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Bauru, São Paulo, com apoio financeiro da FAPESP (Processo #2015/23256-6).

RESUMO

A hanseníase é considerada ainda um problema de saúde pública com mais de 200.000 novos casos detectados em 2019, sendo 27.863 no Brasil. Causada pelo *Mycobacterium leprae*, patógeno intracelular obrigatório, a hanseníase quando não tratada pode resultar em incapacidades físicas permanentes devido a tropismo do bacilo por células de Schwann dos nervos periféricos. É uma doença espectral com duas formas polares estáveis e três intermediárias instáveis, sendo o polo tuberculoide caracterizado pelo predomínio de resposta imune celular e doença localizada, enquanto o polo virchowiano apresenta elevada resposta humoral e doença disseminada. As células dendríticas (DCs) ativam a resposta imune específica, portanto a expressão de moléculas coestimulatórias e as citocinas liberadas pelas DCs durante a infecção pelo *M. leprae* determinam o perfil de resposta imune gerado e podem prevenir ou favorecer sua sobrevivência e disseminação. O objetivo deste estudo foi analisar o perfil de ativação de DCs derivadas de pacientes com hanseníase infectadas por *M. leprae* viável bem como sua capacidade de ativar linfócitos (LFs) autólogos. DCs foram diferenciadas a partir de monócitos de sangue periférico de controles saudáveis (CS), pacientes tuberculoides (6 tuberculoide-tuberculoides e 2 dimorfo-tuberculoides) e virchowianos (5 virchowiano-virchowianos e 5 dimorfo-virchowianos) empregando GM-CSF e IL-4. As DCs foram estimuladas por (i) *M. leprae* vivo na multiplicidade de 10:1 (bacilos:DC, MLDCs); (ii) coquetel de maturação padrão (CQM) composto por IL-1 β , IL-6, TNF, PGE2 (mDCs); ou (iii) permaneceram não estimuladas (iDCs) por 48 horas. Após o estímulo, as DCs foram co-cultivadas com LFs por cinco dias. O estímulo de DCs com *M. leprae* viável não induziu expressão de moléculas coestimulatórias e levou à produção de baixos níveis de IL-1 β , IL-6, TNF e IL-23 tanto em pacientes quanto em controles. DCs de pacientes virchowianos produziram mais IL-1 β frente ao *M. leprae* do que aquelas de

pacientes tuberculoides e maiores quantidades de IL-23 e IL-10 comparado aos controles. Independente da forma clínica da hanseníase, DCs de pacientes produziram menos IL-12p70 em resposta ao *M. leprae* do que DCs de controles saudáveis. Quanto à ativação dos LFs, verificamos que pacientes virchowianos apresentaram menor proliferação e produziram níveis menores de IL-2 após estímulo com *M. leprae*. A produção de IFN- γ , TNF, IL-9 e IL-22 nas culturas de MLDCs e LFs foi semelhante à encontrada quando iDCs foram empregadas e menor do que observado em culturas com mDCs. Nos pacientes virchowianos a frequência de LFs IL-4+ foi maior em paralelo com menor número de LFs expressando IFN- γ e IL-17A nas culturas estimuladas com MLDCs quando comparados com controles saudáveis. Em conjunto, nossos dados sugerem que o *M. leprae* é um fraco ativador de DCs, o que compromete a capacidade destas células induzirem a ativação de LFs autólogos. Pacientes com hanseníase virchowiana apresentam menor frequência de LFs produtores de citocinas de perfil Th1 e Th17 após estímulo com *M. leprae* o que pode contribuir para a persistência do bacilo.

Palavras-chave: Hanseníase; *Mycobacterium leprae*; Células Dendríticas; Linfócitos

ABSTRACT

Leprosy is still considered a public health problem with more than 200,000 new cases detected in 2019, being 27,863 registered in Brazil. Caused by *Mycobacterium leprae*, an obligate intracellular pathogen, leprosy can result in permanent physical disabilities when untreated due to the tropism of the bacillus by Schwann cells from peripheral nerves. It is a spectral disease presenting two polar stable forms and three intermediate unstable forms. Tuberculoid pole is characterized by the predominant cell-mediated immune response and localized disease while lepromatous pole shows prevalent humoral response and disseminated disease. Dendritic cells (DCs) activate specific immune responses, so the pattern of costimulatory molecules expressed, and the cytokines released by DCs during *M. leprae* infection determine the profile of immune response generated that can prevent or favor its survival and dissemination. This study aimed to analyze the profile of DCs derived from leprosy patients infected with viable *M. leprae* as well as their ability to activate autologous lymphocytes. DCs were differentiated from peripheral blood monocytes of healthy controls, tuberculoid (6 tuberculoid-tuberculoid and 2 borderline-tuberculoid) and lepromatous (5 lepromatous-lepromatous and 5 borderline-lepromatous) leprosy patients employing GM-CSF and IL-4. DCs were stimulated by (i) live *M. leprae* at a multiplicity of 10:1 (bacilli:DC, MLDCs); (ii) standard maturation cocktail (CQM) composed by IL-1 β , IL-6, TNF, PGE2 (mDCs); or (iii) remained unstimulated (iDCs) for 48 hours. After stimulation, DCs were cultured with lymphocytes for five days. Stimulation of DCs with viable *M. leprae* did not induce the expression of costimulatory molecules but stimulated the production of low levels of IL-1 β , IL-6, TNF and IL-23 in both patients and controls. DCs from lepromatous patients produced more IL-1 β against *M. leprae* than those from tuberculoid patients and greater amounts of IL-23 and IL-10 compared to healthy controls. Regardless of the clinical form of leprosy, DCs from leprosy patients produced fewer IL-12p70 in response to

M. leprae than DCs from healthy controls. Considering the activation of lymphocytes, we found that lepromatous patients showed lower proliferation and produced lower levels of IL-2 after stimulation with *M. leprae*. The production of IFN- γ , TNF, IL-9 and IL-22 in cultures of MLDCs and lymphocytes was similar to that found when iDCs were used and lower than that observed in cultures with mDCs. In lepromatous patients the frequency of IL-4+ lymphocytes were higher in parallel with a lower number of lymphocytes expressing IFN- γ and IL-17A in cultures stimulated with MLDCs when compared to healthy controls. Together, our data suggest that *M. leprae* is a weak activator of DCs, which compromises the ability of these cells to induce the activation of autologous lymphocytes. Lepromatous leprosy patients had a lower frequency of lymphocytes producing Th1 and Th17 cytokines after stimulation with *M. leprae*, which may contribute to the persistence of the bacillus.

Key-words: Leprosy; *Mycobacterium leprae*; Dendritic Cells; Lymphocytes

LISTA DE ABREVIATURAS

BB: *borderline-borderline*

BCG: Bacilo Calmette-Guérin

CCR7: *C-C chemokine receptor type 7* (receptor de quimiocina C-C do tipo 7)

CD: *cluster of differentiation* (grupo de diferenciação)

CD40L: *CD40 ligant* (ligante do CD40)

DCs: *dendritic cells* (células dendríticas)

DC-SIGN: *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*

DD: dimorfa-dimorfa

DNA: ácido desoxirribonucleico

DT: dimorfa-tuberculoide

DV: dimorfa-virchowiana

ELISA: *enzyme linked immuno sorbent assay* (ensaio de imunoabsorção enzimática)

FoxP3: *forkhead box P3* (Fator de transcrição FoxP3)

GM-CSF: *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos)

HLA: *human leucocyte antigen* (antígeno leucocitário humano)

iDCs: *imature dendritic cells* (células dendríticas imaturas)

IFN- γ : interferon gama

IL-1 β : interleucina-1 β

IL-10: interleucina-10

IL-12: interleucina-12

IL-12p70: interleucina-12p70

IL-17: Interleucina-17A

IL-13: interleucina-13

IL-2: interleucina-2

IL-22: interleucina-22

IL-23: interleucina-23

IL-4: interleucina-4

IL-5: interleucina-5

IL-6: interleucina-6

IL-9: interleucina-6

IMDM: *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (Meio Modificado Dulbecco's Iscove's)

LCs: *Langerhans cells* (células de Langerhans)

LFs: linfócitos

LL: lepromatoso-lepromatosos

M. leprae: *Mycobacterium leprae*

M. tuberculosis: *Mycobacterium tuberculosis*

M1: macrófago com perfil M1

M2: macrófago com perfil M2

MB: multibacilares

mDCs: células dendríticas estimuladas com coquetel padrão de maturação

MDT: multidrogaterapia

MHC: *major histocompatibility complex* (complexo principal de histocompatibilidade)

MHC I: molécula de MHC de classe I

MHC II: molécula de MHC de classe II

MLDCs: células dendríticas estimuladas com *Mycobacterium leprae* viável

MOI: multiplicidade de infecção

OMS: Organização Mundial da Saúde

PB: paucibacilares

PBMCs: *peripheral blood mononuclear cells* (células mononucleares do sangue periférico)

pDCs: *plasmacytoid dendritic cells* (células dendríticas plasmocitoides)

PGL-I: glicolípido fenólico I

PQT: poliquimioterapia

SNPs: *single nucleotide polymorphisms* (polimorfismos de base única)

TCD4+: linfócitos T auxiliares CD4 positivos

TGF- β : *transforming growth factor beta* (fator de crescimento e transformação beta)

Th1: T *helper* tipo 1 (T auxiliar tipo 1)

Th17: T *helper* tipo 17 (T auxiliar tipo 17)

Th2: T *helper* tipo 2 (T auxiliar tipo 2)

Th22: T *helper* tipo 22 (T auxiliar tipo 22)

Th9: T *helper* tipo 9 (T auxiliar tipo 9)

TNF: *tumor necrosis factor* (fator de necrose tumoral)

Treg: *regulatory T cells* (linfócitos T regulatórios)

TT: tuberculoide-tuberculoide

VV: virchowiano-virchowiano

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Expressão de marcadores de superfície em DCs representados pela intensidade média de fluorescência (MFI)	66
Figura 2:	Produção de citocinas por DCs.....	67
Figura 3:	Produção de IL-12p70 nos sobrenadantes de culturas de DCs.....	68
Figura 4:	Análise de proliferação de LFs usando CFSE.....	69
Figura 5:	Deteção de citocinas nos sobrenadantes de culturas LFs e DCs.....	70
Figura 6:	Porcentagem de LFs que expressam citocinas intracelulares após cultura com DCs.....	71
Figura complementar 1:	Diferenciação de DCs a partir de monócitos de sangue periférico.....	74

SUMÁRIO

1. Introdução	
1.1. Contexto histórico e atual da hanseníase.....	14
1.2. <i>Mycobacterium leprae</i>	15
1.3. Patogenia da hanseníase.....	17
1.4. Resposta imune na hanseníase.....	24
2. Objetivos	34
2.1. Objetivo geral.....	34
2.2. Objetivos específicos.....	34
3. Manuscrito	35
3.1. Introdução.....	37
3.2. Métodos.....	39
3.2.1. Casuística e aspectos éticos.....	39
3.2.2. Purificação dos monócitos e LFs.....	39
3.2.3. Diferenciação de DCs derivadas de monócitos.....	40
3.2.4. Isolamento do <i>M. leprae</i> do coxim plantar de camundongos nude.....	40
3.2.5. Infecção das DCs com <i>M. leprae</i> viável.....	41
3.2.6. Avaliação de marcadores de superfície em DCs.....	41
3.2.7. Estímulo com CD40-CD40 ligante (CD40L) para indução de IL- 12p70.....	42
3.2.8. Linfoproliferação induzida por DCs.....	42
3.2.9. Detecção de citocinas intracelulares em LFs.....	43
3.2.10. Avaliação de citocinas.....	43
3.2.11. Análise estatística dos dados.....	44
3.3. Resultados.....	44
3.3.1. A diferenciação das DCs de monócitos foi alcançada em pacientes com hanseníase como em controles saudáveis.....	44
3.3.2. <i>M. leprae</i> vivo não induziu ativação/maturação de DCs <i>in vitro</i> ...	45

3.3.3. <i>M. leprae</i> não induz DCs a produzirem um perfil proinflamatório de citocinas.....	45
3.3.4. Pacientes virchowianos apresentam baixa produção de IL-12p70.....	46
3.3.5. Pacientes virchowianos apresentam resposta linfoproliferativa reduzida quando estimulada por DCs previamente infectadas por <i>M. leprae</i>	47
3.3.6. Pacientes virchowianos apresentaram menor porcentagem de LFs secretores de IFN- γ e IL-17 em paralelo com maior número de LFs IL-4+ após estímulo com DCs infectadas com <i>M. leprae</i>	47
3.4. Discussão.....	48
3.5. Referências (manuscrito)	54
Legendas das figuras	63
Material suplementar	72
4. Conclusões	75
Resumo gráfico	76
5. Referências	77

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONTEXTO HISTÓRICO E ATUAL DA HANSENÍASE

A hanseníase é considerada uma das doenças mais antigas da humanidade que persiste até os dias atuais, pois seus primeiros registros datam de 4 mil anos antes de Cristo. A partir do seu surgimento na África Oriental, pode ter sido disseminada para outras regiões do Planeta pelas grandes migrações comerciais, e chegou ao Brasil com a vinda dos povos africanos no período colonial (MONOT et al., 2009).

Após afetar a população humana por muitos anos, sendo associada a estigmas e preconceitos religiosos, seu agente etiológico foi identificado em 1874 pelo médico norueguês Gerhard Henrick Armauer Hansen, sendo a primeira vez que um microrganismo foi associado a ocorrência de uma doença (BECHLER, 2012). Hansen observou formações semelhantes a bactérias em forma de bastonetes em células originadas de nódulos de pessoas com hanseníase, porém não conseguiu relacionar a bactéria com a causa da doença devido a impossibilidade de cultivo (BECHLER, 2012). Apenas em 1960, Shepard (1960) desenvolveu um método que possibilitou o isolamento do *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) da mucosa nasal de pacientes virchowianos através da inoculação no coxim plantar de camundongos por período de 9 a 12 meses, a qual resultou em lesão característica de hanseníase. A partir daí, começaram muitos avanços no estudo dessa patologia.

A hanseníase ocorre predominantemente em países tropicais com baixo nível econômico e social, e apresenta mais de 200 mil novos casos por ano, ocorrendo em mais de 120 países do mundo. Apesar de ser uma doença milenarmente conhecida, o grande número de casos ainda registrados representa um problema de saúde pública, pois essa patologia acarreta deformidades físicas incapacitantes que diminuem a qualidade de vida dos indivíduos acometidos. Mesmo com o advento da poliquimioterapia

(PQT), a qual é eficaz para a cura microbiológica da doença, o número de casos novos permanece elevado, o que se acredita que seja devido a ineficiência dos sistemas para detecção e tratamento (WHO, 2020). Em 2019, o continente americano apresentou 29.936 novos casos de hanseníase, sendo que 27.863 casos foram registrados no Brasil. Além disso, a detecção de 2.351 casos apresentando incapacidades físicas visíveis revela um crescente número de indivíduos com a perda de funções motoras devido a hanseníase. No contexto global da doença, a Índia, o Brasil e a Indonésia apresentam os maiores índices de detecção de hanseníase representando 56,6%, 14,0%, e 8,6%, respectivamente, do número total de casos detectados em 2019 e por isso são consideradas áreas endêmicas de disseminação do *M. leprae* (WHO, 2020).

O uso da PQT reduziu o número de casos de hanseníase após sua introdução, mas teve pouco impacto na erradicação da doença e, com isso, novas estratégias de intervenção devem ser adotadas de acordo com a nova estratégia global (2021-2030), como a profilaxia por dose única de rifampicina após a exposição de contatos. Somado a isso, é importante reforçar o rastreamento para detecção de novos casos da doença, principalmente no início da infecção, com o objetivo de impedir a ocorrência de incapacidades físicas (WHO, 2020).

1.2. *Mycobacterium leprae*

A hanseníase decorre da infecção pelo *M. leprae*, um parasita intracelular obrigatório, classificado como bacilo álcool-ácido resistente pois não perde a cor dada pela fucsina quando lavado por solução álcool-ácida. Este bacilo não possui mobilidade autônoma nem forma estruturas de resistência como esporos e, microscopicamente, pode ser observado como bacilos individuais ou agrupamentos bacilares formando globias (agregados bacterianos). A multiplicação do *M. leprae* acontece por fissão binária com tempo de geração entre 12 e 14 dias, caracterizando-o como

um bacilo de crescimento lento (SCOLLARD et al., 2006). A temperatura ideal para sua multiplicação está entre 27 e 30°C, por isso tem preferência em se alojar nas áreas do corpo com temperaturas mais amenas como de pele, mucosa nasal e nervos periféricos (JACOBSON; KRAHENBUHL, 1999).

O *M. leprae* não é cultivável *in vitro*, sendo necessária sua inoculação em animais experimentais para multiplicação, conforme a técnica desenvolvida por Shepard (1960) e ainda hoje utilizada, para obtenção bacilos viáveis, pesquisa de resistência a drogas e como modelo para estudo de dano neural.

A parede celular do *M. leprae* é formada por peptidoglicanos ligados a cadeias polissacarídicas que formam a base sustentadora para os ácidos micólicos que caracterizam o gênero das micobactérias e conferem hidrofobicidade. As áreas mais externas da parede contém tiocerol dimicoceratos, fosfatidil-inositol, manosídeos, lipomanana, lipoarabinomananas e são ricas no glicolípido fenólico I (PGL-I), componente antigênico específico do *M. leprae* e principal alvo da resposta imune do hospedeiro (SCOLLARD et al., 2006). Além disso, o PGL-I participa na interação do bacilo com as células de Schwann do sistema nervoso periférico (RAMBUKKANA, 2000).

Os mecanismos evolutivos bacterianos incluem a redução genômica que pode alterar o estilo de vida livre para o modo intracelular resultando numa relação íntima e dependente de seu hospedeiro. Ao se tornarem parasitas intracelulares obrigatórios, microrganismos sofrem desintegrações/deleções gênicas, recombinações intracromossômicas em sequências repetitivas e acumulam uma proporção elevada de pseudogenes culminando na perda de genes e suas respectivas funções (CHAVARRO-PORTILLO, SOTO & GUERRERO, 2019). O sequenciamento do genoma e análises genéticas comparativas confirmam que o *M. leprae* sofreu um processo de redução evolutiva tendo como

resultado mudanças no seu hábito de vida bem como a capacidade de adaptação a diferentes ambientes, sendo que muito dos genes eliminados são homólogos ao do hospedeiro que ele acomete. O genoma do bacilo é composto por 3 milhões de pares de bases (Mpb) e possui a menor quantidade de GC dentre as micobactérias (CHAVARRO-PORTILLO, SOTO & GUERRERO, 2019). A comparação com o genoma do *M. tuberculosis* confirma a redução evolutiva, sendo que 50% dos genes do *M. leprae* são considerados pseudogenes, e apenas grupos de genes considerados essenciais para sua sobrevivência como parasita intracelular obrigatório foram conservados resultando na eliminação de vias metabólicas relevantes (CHAVARRO-PORTILLO, SOTO & GUERRERO, 2019). Tal perda funcional gênica pode explicar a multiplicação bacilar lenta bem como as dificuldades relacionadas com seu cultivo (COLE et al., 2001; MONOT et al., 2009). Quatro cepas que predominam em regiões geográficas distintas foram sequenciadas e identificadas: TN (Índia), Tahi-53 (Tailândia), NHDP63, (Estados Unidos) e Br4923 (Brasil) (SINGH; COLE, 2012). Estas apresentam 99.995% de similaridade genética, sendo que a diferença de 0.005% resulta de polimorfismos genéticos como os polimorfismos de base única (SNPs) e pequenas regiões de inserção e deleção (MONOT et al., 2009; SINGH; COLE, 2012), revelando a baixa variabilidade genética do *M. leprae*.

1.3. PATOGENIA DA HANSENÍASE

Apesar das vias de transmissão da hanseníase ainda não serem bem esclarecidas, acredita-se que ocorra por meio do contato íntimo e prolongado de pessoas suscetíveis com pacientes com altas cargas bacilares do *M. leprae*, principalmente através de gotículas de aerossóis liberadas em tosses e espirros, mas também não se exclui a transmissão pelo contato direto (Revisto por PLOEMACHER et al., 2020) com a pele

ulcerada de pessoas acometidas pela infecção (JOB et al., 2008). Observa-se também a presença de bacilos em secreções produzidas pelo corpo humano infectado como suor, urina, fezes, fluidos genitais, entre outros, mas essas não são consideradas fontes relevantes de transmissão (YAWALKAR, 2009).

Em territórios americanos, como no sul dos Estados Unidos, o tatu de nove bandas da espécie *Dasybus novemcinctus* tem sido apontado como reservatório natural do agente causador da hanseníase (Revisto por PLOEMACHER et al., 2020). Estudos anteriores demonstraram que as cepas provenientes de tatus selvagens e pacientes hansenianos eram iguais (TRUMAN; FINE, 2010; TRUMAN et al., 2011) e questiona-se a possível ocorrência da transmissão por essa via zoonótica. Em ilhas britânicas, o DNA do *M. leprae* também foi detectado em lesões exibidas por esquilos vermelhos (*Sciurus vulgaris*) o que não era esperado uma vez que a hanseníase foi erradicada no Reino Unido e é considerada uma doença humana, exceto pela sua ocorrência em tatus (AVANZI et al., 2016). Ainda que os humanos sejam considerados o principal reservatório do *M. leprae*, recentemente foi observado a presença de lesões semelhantes àsquelas causadas pela hanseníase em duas populações de chimpanzés selvagens da espécie *Pan troglodytes verus* na Guiné-Bissau africana. Interessante ressaltar que, ao observar esses animais ao longo do tempo, eles revelaram a progressão dos sintomas clínicos compatível com o que é observado na hanseníase humana (HOCKINGS et al., 2021). Porém, apesar do *M. leprae* ter sido isolado desses animais, vale ressaltar que esses registros foram identificados em países que exibem poucos casos de hanseníase e, portanto, não são fontes consideradas relevantes na manutenção da cadeia de transmissão e endemia da doença.

Reservatórios ambientais como água, solo, vegetais, entre outros também são questionados como fonte desse microrganismo (TRUMAN; FINE, 2010). Contudo, para que o papel como reservatório seja confirmado

é necessária a comprovação da multiplicação bacilar, o que não parece ser viável dada a dependência do bacilo pelo meio intracelular (COLE et al., 2001). Assim, parece mais plausível que esses ambientes representem uma ocorrência acidental do bacilo devido a sua eliminação por pacientes com altas cargas bacilares, que disseminam elevadas quantidades dessas bactérias no ambiente, as quais podem permanecer viáveis por algum tempo, mas sem a capacidade de se multiplicar (DESIKAN; SREEVATSA, 1995). Com isso, o modo de transmissão é definido pelo contato íntimo e prolongado principalmente entre pessoas que compartilham a mesma residência (BAKKER et al., 2006) e por isso os contatos domiciliares de pacientes hansenianos são considerados o maior grupo de risco da doença.

Além do ambiente compartilhado, outros fatores estão associados com o desenvolvimento clínico da hanseníase pelos contatos como características genéticas que tornam o hospedeiro predisposto à infecção pelo *M. leprae* (MIRA et al., 2004). Na hanseníase, estima-se que a minoria da população (aproximadamente 5%) exposta ao *M. leprae* é infectada efetivamente e 20% desses indivíduos exibem os sintomas clínicos da infecção (NUNZI; MASSONE, 2012). Estudos genéticos de associação como *Genome-wide association studies* - GWASs e de genes candidatos (*Candidate gene association studies* – CGASs) têm confirmado que o *background* genético do hospedeiro exerce grande influência na determinação da hanseníase ao contrário do *M. leprae* (Revisto por PREVEDELLO; MIRA, 2007) que é caracterizado por sua baixa diversidade genética (MONOT et al., 2009).

Após a entrada do bacilo no organismo e a evolução para os sintomas clínicos da infecção, as manifestações da hanseníase se apresentam de forma espectral como reflexo da resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro frente ao *M. leprae*. Uma vez que este patógeno se encontra no organismo, tende a se alojar em células de Schwann dos nervos periféricos bem como em macrófagos dermais

resultando em diferentes fenótipos clínicos (SCOLLARD et al., 2006). Com isso, Ridley e Jopling (1966) propuseram um sistema de classificação para a hanseníase baseada em achados clínicos, histopatológicos, imunológicos e baciloscópicos que contempla dois polos estáveis e três formas intermediárias instáveis.

O polo de resistência à doença agrupa os pacientes com a forma tuberculoide-tuberculoide (TT) que apresentam alto grau de imunidade mediada por células, reações de hipersensibilidade tardia e teste cutâneo positivo ao antígeno bacilar (reação de Mitsuda). As lesões são caracterizadas por máculas hipocrômicas consideravelmente grandes na pele com bordas bem definidas que podem ser infiltradas e espessadas. Essas lesões são isoladas e podem se apresentar com baixa sensibilidade, ou até perda total da sensibilidade, resultante do dano neural na região da pele afetada, e estão associadas com o acometimento sensorial e motor dos pacientes (Revisto por REIBEL et al., 2015). A histopatologia revela reação granulomatosa acentuada onde raramente são encontrados bacilos, (SCOLLARD et al., 2006). A intensa resposta imune celular presente exibe um perfil T *helper* tipo 1 (Th1) com produção das citocinas interleucina(IL)-2 (IL-2), fator de necrose tumoral (TNF) e interferon gama (IFN- γ); e resulta na contenção da multiplicação do *M. leprae* (YAMAMURA et al., 1991; SIELING; MODLIN, 1994; SCOLLARD et al., 2006; MENDONÇA et al., 2008).

O outro polo é representado pelos pacientes virchowiano-virchowianos (VV) ou lepromatoso-lepromatosos (LL) que são caracterizados pela ausência da imunidade celular e apresentam a forma disseminada da doença. Inicialmente, aparecem pequenas máculas hipocrômicas com bordas indistintas que, se não tratadas, formam pápulas ou nódulos avermelhados que se distribuem na superfície cutânea de todo o corpo e contém número elevado de bacilos (SCOLLARD et al., 2006; revisto por REIBEL et al., 2015). Essas lesões são simétricas e distribuem-

se de modo bilateral, sendo mais frequentes no rosto, lóbulos das orelhas, dedos das mãos e dos pés (Revisto por REIBEL et al., 2015). O acometimento dos nervos é intenso e, histopatologicamente, notam-se inúmeros macrófagos contendo em seu interior grande quantidade de bacilos e lipídeos que conferem um aspecto espumoso a essas células, as quais são denominadas células de Virchow (SCOLLARD et al., 2006; MISCH et al., 2010). A produção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 resulta em intensa resposta imune humoral e inibição da atividade microbicida de macrófagos (YAMAMURA et al., 1991; SIELING; MODLIN, 1994; SCOLLARD et al., 2006; MENDONÇA et al., 2008).

A hanseníase *borderline* ou dimorfa é definida por características de transição imunológica entre os polos tuberculoide e virchowiano e inclui as formas clínicas dimorfa-tuberculoide (DT) ou *borderline-tuberculoid* (BT); dimorfa-dimorfa (DD) ou *borderline-borderline* (BB) e dimorfa-virchowiana (DV) ou *borderline-lepromatosa* (BL). Os pacientes DT possuem lesões com perfil histopatológico semelhante aos pacientes TT porém são mais numerosas e representadas por máculas periféricas distribuídas assimetricamente ou infiltração da pele. É possível observar pequenas lesões localizadas próximo das lesões maiores (BOURÉE & CASALARDE, 2012). Diferente dos TT, os pacientes DT podem possuir baciloscopia positiva (RIDLEY; JOPLING, 1966) contudo, o perfil de citocinas é predominantemente Th1, semelhante ao polo TT (VENTURINI et al., 2011). Os DD são caracterizados pela presença de placas infiltradas de tamanhos variáveis com bordas internas bem definidas e bordas externas vagamente bem delimitadas e centro hipocrômico. Máculas, pápulas e nódulos são usualmente encontrados em combinação com lesões típicas avermelhadas e acobreadas que estão frequentemente distribuídas de modo simétrico com várias dimensões. A hanseníase DD é menos frequente e é considerada a parte mais instável do espectro uma vez que as características imunológicas variam rapidamente entre as formas polares

tuberculoide e virchowiana e apresenta um misto de citocinas de ambos os polos e baciloscopia positiva variando entre 2+ e 4+. O envolvimento neural é variável e mais grave durante episódios de reações do tipo 1 (Revisto por TALHARI; TALHARI; PENNA, 2015). Na forma dimorfa-virchowiana (DV) as lesões são numerosas, e os pacientes tendem a exibir máculas, placas, pápulas e nódulos, porém sem distribuição simétrica nas regiões afetadas e não demonstram características como ulcerações nasais, características de pacientes VV (RIDLEY; JOPLING, 1966). O perfil de citocinas, assim como observado nos pacientes LL, tende ao padrão Th2 (VENTURINI et al., 2011).

Sobrepondo-se ao curso normal da doença, até 30% dos pacientes podem apresentar reações imunológicas agudas que são responsáveis por complicações da hanseníase e podem ocorrer antes ou durante o tratamento, e até mesmo após a alta por cura da hanseníase. A reação hansênica do tipo 1 é considerada uma reação de hipersensibilidade do tipo tardia, resultante de aumento abrupto de imunidade celular contra os antígenos do *M. leprae* e mostra características de transição para o polo tuberculoide. Afeta principalmente pacientes DT, DD e DV e clinicamente apresenta início súbito de edema urticariforme das lesões cutâneas e, frequentemente, está associada a neurites agudas e muito dolorosas com perda da função sensorial e motora (FISCHER, 2017). Por outro lado, a reação hansênica do tipo 2, conhecida como eritema nodoso hansênico, é ocasionada pela formação e deposição de complexos imunes com antígenos do bacilo que leva a vasculite e sintomas sistêmicos como glomerulonefrite, linfadenite, iridociclite e orquite. A ocorrência desse tipo de reação é observada nas formas clínicas onde o bacilo encontra-se em maior quantidade como DV e VV após o início do tratamento, e características como mialgia, artralgia e dor óssea são sintomas associados a essa reação (FISCHER, 2017).

Um esquema de classificação simplificado para a hanseníase foi criado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a fim de facilitar o tratamento. Esse sistema organiza os pacientes em dois grupos, sendo considerados paucibacilares (PB) aqueles que apresentam até cinco lesões de pele e/ou até um tronco nervoso afetado com baciloscopia negativa e correspondem, em geral, às formas DT e TT. Já os multibacilares (MB) agrupam pacientes com mais de cinco lesões de pele ou pelo menos dois troncos nervosos acometidos somado a baciloscopia positiva e representam, predominantemente, às formas DD, DV e VV (WHO, 2012). O tratamento da hanseníase engloba uma combinação de antibióticos chamada de multidrogaterapia (MDT) ou poliquimioterapia (PQT) que é constituída de rifampicina, clofazimina e dapsona, e distribuída gratuitamente a população de países endêmicos desde 1995 (WHO, 2000).

Embora durante muitos anos tenha sido proposto um tratamento diferente para pacientes MB e PB (FISHER, 2017), desde de 2021 todos os pacientes passaram a receber o chamado esquema único de tratamento para a hanseníase (MDT-U) composto pela administração supervisionada de rifampicina (600 mg), clofazemina (300 mg) e dapsona (100 mg) uma vez ao mês e o uso diário autoadministrado de clofazemina (50 mg) e dapsona (100 mg) (CONITEC, 2018). Os pacientes PB são tratados pelo período total de seis meses ou por seis doses mensais supervisionadas dentro de até 9 meses, enquanto pacientes MB devem receber doze doses de tratamento em um período máximo de 18 meses. Esse tratamento possibilita a cura da doença quando completado o número de doses orientadas pelo esquema terapêutico.

Após a conclusão do tratamento, os pacientes devem ser submetidos a exames dermatológicos e neurológicos e avaliação do grau de incapacidade física para que recebam alta por cura. Nesse caso, o paciente não é mais considerado um caso de hanseníase mesmo que ainda apresente reações imunológicas como reação reversa ou eritema nodoso

hansênico que podem ocorrer mesmo após a cura da infecção (WHO, 1994). Quando constatados sinais clínicos de doença ativa o paciente poderá ser submetido a um novo ciclo de tratamento.

Em 2019, o Brasil apresentou o maior número de casos de recidiva e necessidade de retratamento de hanseníase da série histórica (WHO, 2020). Com isso, vale ressaltar que mesmo após 5 anos da alta por cura o paciente pode voltar apresentar a doença ativa seja por reinfecção quando mantém contato com pessoas bacilíferas (não tratadas), resistência medicamentosa ou insuficiência do tratamento. Por isso, o acompanhamento dos pacientes é necessário para o diagnóstico e manejo das reações, neurites e sequelas da hanseníase, e, além disso, também é importante monitorar os contatos para evitar novas infecções. A resistência medicamentosa pelo *M. leprae* tem sido cada vez mais relatada com o surgimento de cepas multirresistentes para dapsona, rifampicina e ofloxacina que são atribuídas às mutações que ocorrem em regiões gênicas determinantes (DRDR) dos genes *folP1*, *rpoB* e *gyrA*, respectivamente (BENJAK et al., 2018).

1.4. RESPOSTA IMUNE NA HANSENÍASE

A imunidade inata na hanseníase é representada principalmente pela atuação de macrófagos e células dendríticas (DCs). Os macrófagos são derivados de monócitos do sangue periférico que se deslocam até as áreas teciduais infectadas, e de acordo com seu perfil atuam na eliminação dos microrganismos ou no reparo do tecido injuriado (MONTROYA; MODLIN, 2010). O fenótipo M1 é ativado classicamente por IFN- γ e TNF e assume um papel inflamatório e microbicida, contribuindo para eliminação dos bacilos. O fenótipo anti-inflamatório M2 é influenciado pela IL-4 e é mais importante para o reparo tecidual do que para eliminação patogênica uma vez que leva a secreção de componentes da matriz extracelular (MOSSER; EDWARDS, 2008). Essas células secretam IL-10 e inibem a ativação de

macrófagos fagocíticos e com funções microbidas que auxiliam na eliminação do patógeno, e assim impedem que o perfil Th1 se desenvolva e contribuem para manutenção de perfil de resposta Th2 através da secreção de imunossupressores como a prostaglandina E_2 (Revisto por DEGANG et al., 2014).

Os pacientes tuberculóides apresentam macrófagos epitelióides com fenótipo M1 identificados pela expressão de CD68 e ausência de CD163, enquanto macrófagos do perfil M2 (CD68+CD163+) são detectados em granulomas do polo VV (FACHIN ET AL., 2017). Isso significa que os macrófagos microbidas e secretores de citocinas inflamatórias predominam no polo de resistência a multiplicação bacilar, em contrapartida os macrófagos que atuam na regeneração tecidual estão relacionados com o polo da doença disseminada pois não contribuem para eliminação do agente etiológico da doença. Foi observado que células endoteliais não estimuladas podem ativar a diferenciação de macrófagos M2 ao contrário das células endoteliais ativadas com $IFN-\gamma$ que levaram a diferenciação do perfil M1 dependente de Jagged-1 (JAG-1) (KIBBIE et al., 2016). Isso mostra que a ausência de estímulos dados pelo *M. leprae*, como a falta da habilidade de induzir a secreção de $IFN-\gamma$, possibilita a ocorrência de macrófagos M2 que secretam citocinas anti-inflamatórias e resulta na doença disseminada.

Acredita-se que a internalização do *M. leprae* pelos macrófagos ocorre através dos receptores do tipo lectina-C como CD209 e receptores de manose (SCHLESINGER, 1993) e, depois de internalizado, o bacilo é capaz de se evadir dos mecanismos microbidas do macrófago de diversas formas, entre elas impedindo a fusão do fagossomo com o lisossomo (FREHEL; RASTOGI, 1987). A formação do fagolisossomo é essencial para liberação das enzimas digestivas, bem como as espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (NO), e sua inibição contribui para a sobrevivência do *M. leprae* no meio intracelular onde o bacilo passa a se

multiplicar. Além disso, o *M. leprae* pode induzir a produção de citocinas inibitórias e, como um mecanismo de escape, levar a supressão da resposta imune do hospedeiro contra ele (SINSIMER et al., 2010).

Assim como os macrófagos, as DCs atuam na primeira linha de defesa contra patógenos reconhecendo padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) por meio de receptores específicos. Essas células têm origem na medula óssea e migram para tecidos como pele, fígado e intestino, e vão realizar um papel de vigilância imunológica. O reconhecimento e internalização de antígenos oriundos de patógenos pelas DCs ainda imaturas (iDCs) induz sua migração e maturação tornando-as aptas para a apresentação de antígenos para linfócitos (LFs) T nos linfonodos regionais através das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) definido como HLA (*Human Leucocyte Antigen*) nos humanos. Além disso, as DCs passam a produzir citocinas e expressar moléculas coestimulatórias que contribuem como sinais para a ativação dos LFs TCD4⁺ virgens (STEINMAN; YOUNG, 1991; MERAD; MANZ, 2009). O reconhecimento antigênico pelos LFs T virgens e sua interação com DCs ativadas desencadeiam as respostas imunes específicas na quais esses LFs ativados produzem citocinas, que levam à expansão de clones antígeno-específicos e promovem a diferenciação de LFs T efetores e de memória. De acordo com o perfil de expressão de moléculas co-estimulatórias e citocinas produzidas pelas DCs diferentes tipos de resposta imune podem ser ativados (KALINSKI, 1999).

As DCs podem ser caracterizadas em subpopulações em função da localização e expressão de moléculas em sua superfície. As células de Langerhans (LCs) são residentes da epiderme e expressam moléculas apresentadoras de lipídeos CD1a e CD207 (Langerina) e são mais abundantes em lesões tuberculoides (HIRAI et al., 2016). O aumento no número de LCs foi observado em reações do tipo 1 e tipo 2 e sugere

participação nas reações inflamatórias agudas que podem ocorrer na hanseníase (Revisto por MI et al., 2020).

Outras subpopulações de DCs incluem as chamadas plasmocitoides (pDCs) que expressam CD123 e dendrócitos dermais (DDs) caracterizados pela presença do marcador FXIIIa. Semelhante as LC, são mais numerosos em lesões tuberculoides em comparação com lesões virchowianas (HIRAI et al., 2016). Sendo assim, a atuação dessas células pode contribuir com a predominância da resposta imune celular encontrada no polo de resistência a doença devido ao seu papel de captura e apresentação antigênica nos linfonodos regionais bem como ativação dos LFs (revisto por Mi et al., 2020). Alguns subgrupos de DCs, juntamente com macrófagos, expressam em sua superfície um receptor de lectina do tipo C chamado DC-SIGN que funciona como receptor de entrada para patógenos (ZHANG, ZEN e ZUO, 2014), e ao contrário do que foi visto para LCs e pDCs, a sua detecção foi maior nas lesões de pacientes virchowianos (KRUTZIK et al., 2005; SOILLEUX et al., 2006). Além disso, as DCs que expressam DC-SIGN mostraram funções imunossupressoras relacionadas a secreção da IL-10 (KUMAR et al., 2013). Assim, já que a resposta imune adquirida se desenvolve em resposta ao estímulo dado primeiramente pelas DCs, o conjunto de moléculas expressas bem como citocinas que são secretadas nesse microambiente de ativação é determinante para o curso da resposta imunológica no hospedeiro.

Durante o processo de ativação dos LFs TCD4⁺ virgens, a produção de interleucina 12 (IL-12) pelas DCs induz a diferenciação da subpopulação Th1 que resulta na secreção de IL-2 responsável pela expansão clonal desses LFs bem como na secreção de IFN- γ que por sua vez promove a ativação clássica dos macrófagos, tornando-os microbicidas. Na ausência da IL-12 e presença da IL-4 há desenvolvimento de um perfil antagônico de resposta com indução da subpopulação Th2 caracterizada pela produção de IL-4 e IL-10 que tem como resultado uma resposta predominantemente

humoral baseada na secreção de altos níveis de anticorpos e inibição da atividade microbicida de macrófagos (LIPSCOMB; MASTEN, 2002). Além desses dois perfis, as DCs também exercem influência na diferenciação de outras subpopulações de LFs T induzindo respostas Th17 pela secreção de TGF- β (fator de crescimento e transformação beta), IL-6 (interleucina 6), IL-1 (interleucina 1) (HUANG; WANG; CHI, 2012). Deste modo, as DCs possuem habilidade crucial para o direcionamento do perfil de resposta que se desenvolverá a partir do contato com o patógeno. Já que o *M. leprae* possui baixa variabilidade genética, considera-se que o principal fator de susceptibilidade ou resistência a hanseníase é determinado pela resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro frente à infecção.

Na hanseníase, observa-se que as moléculas do MHC bem como moléculas coestimulatórias se encontram alteradas na presença de *M. leprae*. A infecção de DCs derivadas de indivíduos saudáveis pelo BCG leva ao aumento na expressão de MHC I e II e CD86 e proliferação de LFs T, enquanto o *M. leprae* promove diminuição da expressão do MHC I e II e não induz aumento significativo da expressão da molécula CD86, sendo necessárias altas doses do bacilo para estimular a produção de IFN- γ por LFs T (HASHIMOTO et al., 2002). Foi visto também que DCs derivadas de indivíduos saudáveis infectadas com *M. leprae* não foram capazes de estimular a proliferação de LFs T comparado ao BCG e *M. tuberculosis*, e as culturas estimuladas por *M. leprae* apresentaram maiores níveis de citocinas do perfil Th2 do que as outras micobactérias (MURRAY et al., 2006). DCs derivadas de monócitos de indivíduos saudáveis e pacientes com hanseníase, independente da forma clínica, apresentaram aumento na expressão de moléculas coestimulatórias como CD40, CD80, CD86 e HLA-DR quando estimuladas com antígeno sonicado do *M. leprae*. Porém, não foi observada a expressão do marcador mais importante de maturação de DCs, a molécula CD83 (BRAGA et al., 2015). Somado a isso, pacientes virchowianos, mostram baixa produção de IL-12p70, a forma bioativa da IL-

12, o que pode estar diretamente relacionado com a incapacidade destes indivíduos em produzirem uma resposta Th1 eficiente contra o bacilo (Braga et al., 2015). Em lesões dos pacientes observa-se a predominância de IL-12 no polo tuberculoide, o que contribui para manutenção da população Th1, ao contrário da forma virchowiana (SIELING; MODLIN, 1994). Ao considerar que a produção de IL-12 pelas DCs depende da interação de sua molécula coestimulatória CD40 com o ligante de CD40 (CD40L) presente na superfície dos LFs, esses componentes foram mais detectados nas lesões tuberculoideas do que nas virchowianas (YAMAUCHI et al., 2000). Esse contexto leva a considerar que o *M. leprae* é um fraco indutor da maturação de DCs e isso interfere na indução da imunidade adquirida.

O modelo Th1/Th2 descrito na década de 1980 (MOSMANN et al., 1986) caracterizou duas subpopulações de LFs T responsáveis pela produção de diferentes perfis de citocinas com funções antagônicas e mutuamente excludentes. Os LFs Th1 produzem IL-2, IFN- γ e TNF que ativam a imunidade mediada por células e a sua diferenciação é estimulada pela citocina IL-12 e pelo próprio IFN- γ e mediada pelo fator de transcrição *T-bet* (*T box expressed in T cells*) (STEINMAN, 2007). A produção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 caracteriza a subpopulação Th2 que ativa produção de anticorpos não-opsonizantes e resposta contra-helmintos, sendo esse perfil diferenciado sob influência da IL-4 com a participação do fator de transcrição *GATA-3* (*GATA Binding Protein 3*) (STEINMAN, 2007).

Na hanseníase, o polo tuberculoide exibe predomínio de citocinas do perfil Th1 como IFN- γ , TNF e IL-2 que favorece apresentação de antígenos pelo aumento da expressão de MHC II e induz a secreção de reativos intermediários do oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) pelos macrófagos elevando seu poder microbicida e assim restringe a multiplicação bacilar (MODLIN, 1994). Por outro lado, os virchowianos exibem abundância de citocinas Th2 como IL-4, IL-5 e IL-10, e a produção elevada de IL-4 induz a secreção de altos níveis de anticorpos e inibe a atividade microbicida de

macrófagos e a diferenciação de LFs Th1 (MODLIN, 1994), contexto que favorece a multiplicação do *M. leprae*.

As características do perfil Th1 e Th2 nos polos tuberculoides e virchowianos (YAMAMURA et al., 1991; MOURA et al., 2007) encontram-se bem caracterizadas na literatura, porém não ocorrem de forma absoluta. Foi relatado que o estímulo de células mononucleares de sangue periférico com o bacilo resultou em perfil misto de citocinas com produção concomitante de IFN- γ e IL-4 em metade dos pacientes (MISRA et al., 1995), independente da forma clínica. Um estudo com clones isolados do sangue relatou que os pacientes virchowianos algumas vezes produzem níveis significantes de IFN- γ mas não de IL-4 e IL-6 frente ao *M. leprae* (MUTIS et al., 1993). De modo semelhante, foi observada a heterogeneidade na produção de citocinas, sem correlação direta com as formas clínicas da doença em clones isolados de lesões de pele e do sangue (HOWE et al., 1995) e foram detectados clones com perfil Th0, Th1 e Th2 em pacientes com hanseníase DT e DV (VERHAGEN et al., 1998). Em conjunto, esses estudos sugerem que a resposta imune na hanseníase é complexa e deve envolver outros elementos além dos tradicionais perfis Th1 e Th2. Após alguns anos da descrição do paradigma Th1/Th2 outros perfis de LFs têm sido relatados como T regulatórios (Treg), Th9, Th17 e Th22 e sua importância na patogênese de doenças infecciosas é alvo de estudos atuais, o que pode contribuir para que estratégias terapêuticas mais assertivas sejam desenvolvidas.

Os LFs Treg constituem uma população heterogênea que modula as respostas imunes promovendo a tolerância periférica contra antígenos próprios e evitando a exacerbação de respostas contra patógenos, mas pode suprimir respostas efetivas contra agentes infecciosos, facilitando sua permanência no hospedeiro (BOER, JOOSTEN, & OTTENHOFF, 2015). Os LFs Treg podem se diferenciar na periferia a partir de LFs T CD4+ por influência do TGF- β , e tem como principais características a produção de

IL-10 e do próprio TGF- β e a expressão do fator de transcrição *FoxP3* (Forkhead box protein P3) (SEHRAWAT; ROUSE, 2011). A ocorrência de células supressoras antígeno específicas na hanseníase é descrita há muito tempo, e parece estar associada com a forma disseminada da doença representada pelos pacientes virchowianos (PALERMO et al., 2012; QUARESMA et al., 2014; BOBOSHA et al., 2014).

A subpopulação Th17 foi descrita mais recentemente, diferencia-se por influência de TGF- β , IL-6, IL-1 β e IL-23 e tem como fator de transcrição *ROR γ t* (*Retinoic acid-related orphan receptor gamma t*) (VOLPE et al., 2008; TERHUNE; BERK; CZERNIECKI, 2013). A citocina chave desse perfil é a IL-17A que estimula a expressão de mediadores inflamatórios em macrófagos e células endoteliais. Além disso, outras citocinas tais como IL-17F, IL-22, IL-26 e IL-8 são produzidas por esses LFs e contribuem para suas funções efetoras (AKDIS et al., 2012). Essa resposta parece ter um papel importante na defesa contra vários patógenos, em especial nas mucosas, além de participar de processos auto-imunes como a esclerose múltipla (MURANSKI; RESTIFO, 2013). Os níveis de IL-17 estão diminuídos em pacientes com hanseníase (ATTIA et al., 2014) em especial na forma virchowiana (SAINI, RAMESH & NATH, 2013; SAINI, RAMESH & NATH, 2014; DE ALMEIDA-NETO et al., 2014), mas se mostraram aumentados na reação de eritema nodoso hansênico (MARTINIUK et al., 2012), o que sugere um papel da IL-17 na resposta contra o bacilo. A vacinação com BCG aumenta a produção de IL-17 em pacientes com hanseníase independente da forma clínica, e reforça a participação desta citocina na resposta contra as micobactérias (ZENHA et al., 2012).

Outra população descrita recentemente é a Th9, cuja diferenciação depende de IL-4 e TGF- β e envolve o fator de transcrição *PU.1* (*Purine Rich Box-1*). Esses LFs que produzem grandes quantidades de IL-9 e IL-21 e estimulam a produção de anticorpos, embora possuam características similares a subpopulação Th2 não produzem IL-4, IL-5 e IL-13 (AZIZI et al.,

2015). O papel de LFs Th9 na hanseníase ainda não foi estabelecido. Um estudo *in vitro* mostra que a IL-9, em conjunto com IFN- γ , está envolvida na geração de LFs T citotóxicos induzidos pelo *M. leprae* (FINIASZ ET AL., 2006). Análises de imuno-histoquímica revelaram a detecção de IL-9 significativamente maior do que IL-4 e TGF- β em lesões do polo tuberculoide e uma tendência de correlação negativa entre a IL-9 e IL-4 e TGF- β o que sugere funções antagônicas desses componentes (DE SOUSA et al., 2016).

Os LFs Th22 expressam o fator de transcrição *Ahr* (*Aryl hydrocarbon receptors*) e são caracterizadas pela produção de IL-22, IL-13, TNF e Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF- β) (revisto por QUARESMA, 2019). Essas células se diferenciam em presença de TNF e IL-6 e atuam nas barreiras epiteliais contribuindo para a cicatrização e ativando a resposta imune inata (AZIZI et al., 2015). Em lesões de pele da hanseníase, a citocina IL-22 parece ser mais abundante em pacientes com a forma virchowiana (DE LIMA SILVEIRA et al., 2015). Entretanto, *in vitro*, foi observado que a produção de IL-22 é maior em controles do que em pacientes com hanseníase, e dentre os pacientes, aqueles com a forma virchowiana produzem menos IL-22. Por outro lado, durante a resposta antibacteriana, a IL-22 mostrou interferência no processo de maturação do fagolisossomo e inibiu a capacidade lítica de macrófagos frente a infecção pelo *M. tuberculosis*. Curiosamente, foi sugerido que o aumento da participação dessa citocina na hanseníase virchowiana parece ter um papel potencializador da atividade lítica dos macrófagos, na possível tentativa de reverter a susceptibilidade desta forma clínica da infecção (DE SOUSA; SOTTO; SIMÕES QUARESMA, 2017). Além da IL-22, a secreção de IL-13 que também ocorre pelos LFs Th22, induz resposta imune humoral inefetiva para eliminação de patógenos intracelulares como o *M. leprae* o que facilita a doença disseminada (DE SOUSA; SOTTO; SIMÕES QUARESMA, 2017).

Portanto, a atuação da resposta imune na hanseníase é complexa e não está limitada somente ao paradigma Th1/Th2 e é possível que haja a participação de outras subpopulações de LFs T que foram mais recentemente descritas. Evidências crescentes têm suportado a ideia de que as primeiras etapas da interação patógeno-hospedeiro influenciam diretamente na resistência ou suscetibilidade à hanseníase, bem como no espectro de manifestações clínicas que podem ocorrer. Tendo em vista que a resposta imune do hospedeiro é preponderante para o estabelecimento e apresentação clínica da doença, urge a necessidade do melhor entendimento da imunologia da hanseníase, principalmente no que tange a interação entre a imunidade inata e a adquirida e o desenvolvimento de diferentes perfis de respostas. A compreensão desses mecanismos pode contribuir para a identificação de indivíduos susceptíveis entre os contatos de pacientes multibacilares, que são a principal população de risco para o desenvolvimento da doença, favorecendo o diagnóstico precoce o que previne a ocorrência de incapacidades. Além disso, pode abrir novos horizontes para o desenvolvimento de vacinas capazes de estimular o desenvolvimento de imunidade protetora nos indivíduos de maior risco.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo avaliar a interação entre DCs e LFs de pacientes com hanseníase no desencadeamento da resposta imune específica.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A partir da diferenciação de DCs de pacientes com formas polares da hanseníase *in vitro* e estímulo com *M. leprae* viável, os objetivos desse estudo foram avaliar sua capacidade de estimular a proliferação e diferenciação de LFs autólogos. Especificamente foram considerados:

- Expressão de marcadores de diferenciação e maturação de DCs (CD1c, CD11c, CD40, CD80, CD83, CD86, MHC I, MHC II e CCR7).
- Produção de citocinas pró e anti-inflamatórias por DCs (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF, IL-12p40, IL-4, IL-23 e TGF- β).
- Proliferação de LFs CD4+ autólogos induzida por DCs.
- Produção de citocinas características dos perfis Th1, Th2, Th17, Th9, Th22 e Treg em co-culturas de LFs autólogos e DCs.

3. MANUSCRITO

CÉLULAS DENDRÍTICAS INDUZEM DIFERENTES PERFIS DE ATIVAÇÃO FRENTE AO *MYCOBACTERIUM LEPRAE* DE ACORDO COM A FORMA CLÍNICA DA HANSENÍASE

GV Germano^{1,2}, BBG Carra^{1,2}, VC Dos Santos³, D. Bertoluci², ASAA Barbosa², BC Sartori², P. Rosa², AP Campanelli⁴, PK Das⁵, VN Brito de Souza^{1,2@}

¹ Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

² Divisão de Pesquisa e Ensino, Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, Estado de São Paulo, Brasil.

³ Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Bauru, Estado de São Paulo, Brasil

⁴ Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, Estado de São Paulo, Brasil.

⁵ Departamento de Imunologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas e Odontológicas, Universidade de Birmingham, Birmingham, Reino Unido.

@Corresponding author: vbrito@ilsl.br

RESUMO

A hanseníase, causada pelo *Mycobacterium leprae*, ainda figura como importante problema de saúde pública no Brasil devido ao elevado número de novos casos e incapacidades físicas decorrentes. Uma vez que o bacilo possui baixa variabilidade genética, as diferentes manifestações clínicas da hanseníase resultam da resposta imune ao bacilo. As células dendríticas (DCs) tem um papel crucial na ativação e direcionamento da resposta imune específica, com isso torna-se necessária a compreensão do seu papel na hanseníase. O objetivo do estudo foi avaliar o perfil de DCs infectadas por *M. leprae* viável bem como sua capacidade de ativar LFs T autólogos em pacientes com hanseníase. DCs foram diferenciadas a partir de monócitos do sangue periférico de pacientes (tuberculoides e virchowianos) e controles saudáveis, estimuladas com *M. leprae* vivo e co-cultivadas com LFs autólogos. O *M. leprae* não induziu maturação de DCs, que mostraram níveis de moléculas coestimulatórias semelhantes às DCs imaturas e baixa produção de citocinas pró-inflamatórias, além de fraca capacidade de induzir linfoproliferação, independente da forma clínica da hanseníase. DCs de pacientes virchowianos estimuladas com o bacilo apresentaram níveis maiores de IL-10 e baixa produção de IL-12p70 em comparação com controles saudáveis. Além disso quando essas DCs foram cultivadas com LFs autólogos houve menor produção de IL-2, e menos LFs expressando IFN- γ e IL-17. Pacientes tuberculoides apresentam um perfil de ativação intermediário entre controles saudáveis e pacientes virchowianos. Em conjunto, nossos dados sugerem que embora o *M. leprae* seja um fraco ativador das DCs, o perfil de LFs ativados *in vitro* apresenta diferenças de acordo com a forma clínica da hanseníase.

Palavras-chave: hanseníase, *Mycobacterium leprae*, células dendríticas

3.1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença negligenciada que continua sendo um problema de saúde pública, tendo mais de 200.000 novos casos detectados a cada ano no mundo (WHO, 2020). Embora a prevalência tenha diminuído após o estabelecimento da poliquimioterapia, o Brasil registrou mais de 27.000 novos casos em 2019 e é classificado como o segundo país com maior número de novos casos em todo o mundo (WHO, 2020). A doença afeta os nervos periféricos e a pele e, na ausência de tratamento precoce, resulta em incapacidades físicas que afetam a qualidade de vida dos pacientes (WHO, 2020).

A maioria dos indivíduos é naturalmente resistente à infecção pelo *Mycobacterium leprae*. Mas, por razões desconhecidas, relacionadas ao background genético e fatores ambientais, algumas pessoas desenvolvem a hanseníase (Fava et al., 2020; Cardoso et al., 2011) com diferentes manifestações clínicas que estão relacionadas à resposta imune contra o bacilo que apresenta baixa variabilidade genética e virulência (Cole et al., 2001). Os pacientes com hanseníase apresentam um padrão dicotômico da resposta imune específica que está bem descrito: pacientes tuberculóides apresentam resposta imune mediada por células predominante, resultando em doença localizada, enquanto pacientes virchowianos demonstram imunidade humoral e lesões disseminadas (Scollard, 2006). Embora características dos padrões clássicos Th1 e Th2 possam ser observadas no espectro da hanseníase, a ocorrência desses perfis não parece ser exclusiva. Misra et al. (1995) relataram que a estimulação de células mononucleares de pacientes com hanseníase com antígenos do *M. leprae* resultou na secreção concomitante de IFN- γ e IL-4. Além disso, os clones de LFs T isolados do sangue de pacientes virchowianos produziram níveis significativos de IFN- γ enquanto IL-4 ou IL-6 não foram detectados em resposta ao *M. leprae* (Mutis et al., 1993). Assim, parece que a resposta imune à hanseníase é mais complexa

envolvendo outros elementos além dos perfis Th1 e Th2 tradicionais e a possível participação de subpopulações de LFs T mais recentemente descritas, como Treg, Th22, Th17 e Th9 não é totalmente caracterizada (Quaresma et al., 2014; Aarão et al., 2015; Silveira et al. 2015; Souza et al. 2017).

Evidências crescentes apoiam a ideia de que os primeiros passos na interação patógeno-hospedeiro são cruciais para determinar a resistência ou suscetibilidade à hanseníase assim como seu espectro clínico (Braga et al., 2015; De Toledo-Pinto et al., 2016; Pinheiro et al., 2018; Montoya & Modlin, 2010). Assim, é essencial ter o conhecimento de como essa interação contribui para o desencadeamento da resposta imune específica. O entendimento da ativação de células dendríticas (DCs) é um ponto chave que pode esclarecer como ocorre à polarização da resposta imune contra o *M. leprae*.

As DCs são responsáveis pelo reconhecimento, processamento e apresentação de antígenos aos LFs T CD4+, direcionando sua ativação e diferenciação de acordo com a produção de citocinas e expressão de moléculas coestimulatórias (Palucka & Banchereau 1999, Steinman & Hemmi 2006). Em estudo anterior, nosso grupo observou que DCs derivadas de monócitos de pacientes virchowianos estimulados com antígeno sonicado de *M. leprae* mostraram baixa produção de IL-12p70, uma citocina crucial para o desenvolvimento do perfil Th1, em paralelo com baixos níveis de expressão de CD80, uma molécula coestimuladora envolvida na ativação de LFs T (Braga et al., 2015). Além disso, outros estudos apontam o *M. leprae* como um ativador fraco de DCs de indivíduos saudáveis (Hashimoto et al., 2002; Murray et al., 2007). Assim, este estudo avaliou como o bacilo vivo interfere no fenótipo das DCs de pacientes com hanseníase e em sua capacidade de ativar LFs.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Casuística e aspectos éticos

Pacientes com hanseníase previamente tratados e curados há pelo menos um ano e livres de reações hansênicas foram selecionados no ambulatório do Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL), Bauru, estado de São Paulo, Brasil. O diagnóstico prévio de hanseníase foi confirmado por achados clínicos, histopatológicos e baciloscópicos e os pacientes foram classificados de acordo com os critérios de Ridley e Jopling (1966). Pacientes tuberculoide-tuberculoide (TT) e dimorfo-tuberculoide (DT) foram agrupados como pacientes tuberculóides, enquanto os pacientes virchowianos incluíram as formas virchowiana-virchowiana (VV) e dimorfo-virchowiana (DV) da hanseníase. Pacientes com diagnóstico de hanseníase indeterminada ou dimorfo-dimorfos não foram incluídos neste estudo. Indivíduos saudáveis na mesma faixa etária dos pacientes que trabalhavam no ILSL há pelo menos 5 anos, para garantir exposição prévia ao bacilo, foram selecionados como grupo controle. Um total de 29 indivíduos foram incluídos no estudo: 10 pacientes da faixa virchowiana (5 VV e 5 DV); 8 pacientes da faixa tuberculoide (6 TT e 2 DT) e 11 controles saudáveis (CS).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do ILSL (50529915.4.0000.5475) e segue os conceitos recomendados pela Declaração de Helsinki de 1975, revisada em 1983. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi obtido de todos os indivíduos participantes do estudo.

3.2.2. Purificação dos monócitos e LFs.

Aproximadamente 60ml de sangue total foram coletados em tubo contendo anticoagulante por punção venosa. As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram purificadas usando um gradiente de densidade (Histopaque 1077, Sigma Co., St. Louis, Mo) e, em seguida, os

monócitos foram isolados por seleção positiva empregando microesferas magnéticas revestidas com anticorpos anti-CD14 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Pureza >90% foi confirmada por citometria de fluxo usando CD14 como marcador. Para a obtenção da população de LFs, coletamos o primeiro eluato das colunas magnéticas antes da recuperação dos monócitos. A suspensão celular de LFs foi lavada e criopreservada a -80°C em meio Dulbecco modificado Iscove completo (IMDM) contendo 10% de DMSO até a diferenciação e ativação das DCs. A porcentagem média de LFs viáveis após o descongelamento foi de 70%.

3.2.3. Diferenciação das DCs derivadas de monócitos.

Para diferenciação de DCs, a concentração de monócitos foi ajustada para 5×10^5 células/ml em meio de cultura IMDM com 10% de soro fetal bovino e antibióticos na presença de GM-CSF (500U/ml) e IL-4 (250U/ml) humanos recombinantes (PeproTech Inc, Rock Hill, NJ, USA). As culturas foram feitas em placas de 24 poços (1 ml/poço) e mantidas por 6 dias a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. No terceiro dia de cultura, metade do meio foi cuidadosamente removido e substituído por um meio completo contendo duas vezes a concentração dos recombinantes. A diferenciação das DCs foi confirmada pela presença do marcador CD11c e ausência de CD14, verificada por citometria de fluxo de acordo com as instruções do fabricante dos anticorpos (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA).

3.2.4. Isolamento do *M. leprae* do coxim plantar de camundongos nude.

M. leprae foi obtido de camundongos previamente inoculados conforme descrito anteriormente (Trombone et al., 2014). Bacilos da cepa Thai-53 (gentilmente cedida pelo Dr. Yuji Yamamoto, NIH, Tóquio, JP)

foram inoculados no coxim plantar da pata de camundongos nude (1×10^7 a 1×10^8 bacilos/coxim plantar) e mantidos por pelo menos 6 meses para multiplicação bacilar. Os camundongos foram eutanasiados e os coxins plantares inoculados foram removidos, dissecados e processados em um homogeneizador de tecidos (Turrax-IKA) com solução salina; a suspensão obtida foi submetida à digestão enzimática com 0,05% de tripsina. Os bacilos foram quantificados após a coloração Ziehl-Nielsen a frio. A viabilidade bacilar foi detectada usando o kit *Live/Dead BacLight Bacterial Viability* (KIT L7007, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, EUA) e apresentou sempre acima de 90%.

3.2.5. Infecção das DCs com *M. leprae* viável.

Após a diferenciação, as DCs imaturas foram infectadas com bacilos viáveis com uma multiplicidade de infecção (MOI) de 10 bacilos:1 DC (MLDCs). Como controle positivo, DCs foram estimuladas com um coquetel padrão de maturação (mDCs) composto por citocinas recombinantes IL-1 β (25ng/ml), IL-6 (1000U/ml), TNF (50ng/ml) (Peprotech Inc, Rock Hill, NJ, EUA) e PGE2 (Sigma Co., St. Louis, MO, EUA) (10^{-6} M). Culturas de DCs imaturas não estimuladas foram mantidas e utilizadas como controle negativo (iDCs). As DCs foram estimuladas por 48 horas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ usando meio IMDM completo. Após o estímulo, as DCs foram submetidas a (i) análise de marcadores de superfície, (ii) cultivo com células da linhagem J588 expressando CD40L para avaliação da produção de IL-12p70 e (iii) cultivo com LFs autólogos. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80° C para dosagem de citocinas.

3.2.6. Avaliação dos marcadores de superfície em DCs.

O perfil fenotípico das DCs foi avaliado por citometria de fluxo com uso de anticorpos monoclonais (Tabela suplementar 1). Resumidamente,

as DCs foram coletadas, centrifugadas, lavadas em PBS e os sítios inespecíficos foram bloqueados com soro fetal bovino a 10% por 1 hora sob refrigeração. Em seguida, as DCs foram fixadas com formaldeído 1% em PBS por 10 minutos a 4°C, lavadas e incubadas com os anticorpos específicos por 1 hora no escuro, sob refrigeração. Controles de isotipo apropriados foram usados de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences). Após a marcação, as DCs foram lavadas em PBS e ressuspensas em um tampão de coloração (BD Biosciences). Os dados foram adquiridos em um citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences) e incluíram um mínimo de 10.000 eventos. A análise de dados utilizou o software FCS Express Versão 3 (De Novo Software, 2006).

3.2.7. Estímulo com CD40-CD40 ligante (CD40L) para indução de IL-12p70.

A produção de IL-12p70 por DCs em culturas isoladas é baixa. Para induzir uma produção elevada de IL-12p70 é necessária a ligação do CD40 presente na superfície das DCs ao ligante CD40 (CD40L) encontrado na membrana de LFs T (Cella et al. 1996). Esta interação foi mimetizada *in vitro* empregando células híbridas transfectadas da linhagem J558 expressando CD40L (gentilmente cedida pelo Dr. Peter Lane, University of Birmingham, UK) previamente descritas por Lane et al. (1995). Após estímulo com *M. leprae* por 48 horas, as MLDCs foram cultivadas em placas de 96 poços na concentração de 1×10^5 células/poço na presença de 5×10^5 células J588 CD40L+ por 24 horas. O sobrenadante foi recolhido e armazenado a -80°C para dosagem de IL-12p70.

3.2.8. Linfoproliferação induzida por DCs.

A capacidade das DCs para ativar LFs autólogos foi avaliada com base na linfoproliferação usando CFSE (éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) de

acordo com as instruções do fabricante. Os LFs (1×10^7 /ml) foram incubados com $10 \mu\text{M}$ de CFSE por 15 minutos a 37°C , protegidos da luz. Em seguida, foram lavados e cultivados com MLDCs diferenciadas conforme descrito anteriormente. As culturas foram realizadas em placas de fundo chato com 96 poços em um volume final de $200 \mu\text{l}$ de meio IMDM completo contendo 5×10^5 LFs e 1×10^5 DCs por 5 dias a 37°C em uma atmosfera úmida com 5% de CO_2 . O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C para avaliação da produção de citocinas. Os LFs foram colhidos, lavados, marcados com anticorpos anti-CD8 e anti-CD19 (BD Biosciences) e os dados adquiridos em equipamento FACScalibur (BD Biosciences). Os resultados foram analisados no software Flow Jo, considerando um mínimo de 10.000 eventos.

3.2.9. Detecção de citocinas intracelulares em LFs

Os LFs foram cultivados com MLDCs, MDCs ou iDCs na proporção de 5:1 (LFs:DCs) em placas de fundo chato com 96 poços em um volume final de $200 \mu\text{l}$ de meio IMDM completo contendo 5×10^5 LFs e 1×10^5 DCs por 5 dias a 37°C em uma atmosfera úmida com 5% de CO_2 . No 5º dia, os LFs foram ativados com um coquetel de ativação composto de Phorbol 12-miristato 13-acetato, ionóforo de cálcio e brefeldina A (GolgiPlug, BD Biosciences) cerca de 4 horas antes do final do experimento. As células foram coletadas, permeabilizadas usando um kit específico (BD Cytofix/Cytoperm, BD Biosciences) e coradas com anticorpos anti-IFN- γ , IL-4, IL-9, IL-17, IL-22 e FoxP3 conjugados com diferentes fluorocromos (Tabela suplementar 2), de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram lidos em equipamento FACScalibur (BD Biosciences) considerando um mínimo de 10.000 LFs. O software Flow Jo (BD Biosciences) foi usado para a análise da porcentagem de LFs expressando citocinas.

3.2.10. Dosagem de citocinas

Os níveis de citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-17, IFN- γ e TGF- β 1 foram detectados por CBA (*Cytometric Bead Array*, BD Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante. Após a coleta dos dados em equipamento FACScalibur (BD Biosciences) as concentrações de citocinas foram calculadas com base em curvas padrões usando o software FCAP Array versão 3.0 (BD Biosciences). Os níveis de IL-22 e IL-23 foram mensurados por ELISA usando kits comerciais seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante (Thermo Fisher, Bender MedSystems GmbH, Viena, Áustria).

3.2.11. Análise estatística dos dados

A comparação dos dados dentro de um mesmo grupo em diferentes condições experimentais foi feita pelo teste de Friedman seguido do pós-teste de Dunn nos casos em que havia 3 ou mais condições experimentais, ou pelo teste não paramétrico de Wilcoxon quando apenas duas condições experimentais foram avaliadas. Os dados obtidos nos diferentes grupos nas mesmas condições experimentais foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. O nível de significância adotado foi de 5% e todas as análises foram realizadas no GraphPad Prism versão 9.0.0 (121) (GraphPad Software, LLC, 2020).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. A diferenciação de DCs derivadas de monócitos foi alcançada tanto em pacientes com hanseníase como em controles saudáveis.

As DCs foram diferenciadas de monócitos de sangue periférico CD14+ usando citocinas recombinantes. Independentemente da forma clínica da hanseníase, o protocolo com GM-CSF e IL-4 foi eficiente para

induzir a diferenciação das DCs dos pacientes, comprovada pela ausência de CD14 e presença de CD11c da mesma forma que foi observado em controles saudáveis (Figura suplementar 1).

3.3.2. *M. leprae* vivo não induziu ativação/maturação de DCs *in vitro*.

Dado que as DCs ativadas podem induzir respostas imunes específicas a agentes estranhos (Worbs et al., 2017), avaliamos a expressão dos marcadores de ativação/maturação para verificar se o *M. leprae* vivo induz um perfil estimulador nas DCs. Foi observado que as MLDCs expressaram níveis de CD40, CD80, CD83, CD86, OX40L e HLA-DR semelhantes aos observados em iDCs (Figura 1). Da mesma forma, a expressão de PD-L2, associada a um perfil tolerogênico (Cruz-Aguillar, 2016) não apresentou elevação após o estímulo como o bacilo viável. Não houve diferença na expressão desses marcadores de ativação entre pacientes com hanseníase e controles saudáveis. Como esperado, mDCs de pacientes com hanseníase e controles saudáveis expressaram altos níveis de moléculas coestimulatórias que confirmam sua plena capacidade de maturação, independente da ocorrência da doença.

As DCs foram ainda analisadas quanto à expressão de moléculas MHC-I relacionadas à ativação da resposta citotóxica (Yarzabek, 2018). Níveis similares de MHC-I foram observados entre os diferentes estímulos, independentemente da condição de paciente ou controle (Figura 1), embora MLDCs de pacientes tuberculoídes tenham apresentado menor expressão em comparação com mDCs (Figura 1).

Quanto ao CCR7, que atua no recrutamento de leucócitos durante o desenvolvimento da resposta imune secundária (Foster, 1999), não houve aumento da expressão em mDCs e MLDCs comparadas com iDCs. Também investigamos a expressão do ligante de ICOS (ICOSL) que desempenha um papel estimulador em LFs T (Nurieva, 2003), mas não detectamos sua expressão em nosso estudo (dados não mostrados).

3.3.3. *M. leprae* não induz perfil pró-inflamatório de citocinas em DCs

A produção de citocinas pró-inflamatórias é importante para o desenvolvimento de uma resposta imune eficaz que elimine microrganismos patogênicos e, por isso, avaliou-se o perfil de citocinas produzidas por MLDCs. A infecção com *M. leprae* não induziu a produção de níveis elevados de IL-1 β , TNF, IL-6, IL-23 em DCs (Figura 2). Por outro lado, mDCs exibiram alta produção dessas citocinas, comprovando a ativação efetiva de DCs tanto em pacientes com hanseníase quanto em controles saudáveis. Comparando os níveis de citocinas entre os diferentes grupos, verificamos que MLDCs de pacientes virchowianos produziram quantidades maiores de IL-1 β em comparação com MLDCs de tuberculoides e a mesma diferença foi observada em iDCs (Figura 2). Além disso, MLDCs de pacientes virchowianos produzem níveis elevados de IL-23 quando comparados a controles saudáveis (Figura 2).

Em relação às citocinas anti-inflamatórias, verificamos que os níveis de IL-10, que apresenta papel imunossupressor sobre as DCs (Steinbrink, 1997), e TGF- β 1 foram maiores em MLDCs de pacientes virchowianos em comparação com controles saudáveis (Figura 2). Os níveis de IL-4, a citocina chave para a diferenciação Th2 que resulta na produção de anticorpos ineficientes contra patógenos intracelulares (Ho e Miaw, 2016), foram maiores em iDCs de pacientes virchowianos em comparação com iDCs de pacientes tuberculoides, mas não houve diferenças significativas frente ao estímulo com *M. leprae* (Figura 2).

3.3.4. Pacientes virchowianos apresentam baixa produção de IL-12p70.

A IL-12 é essencial para a diferenciação de LFs T secretores de IFN- γ e atua como um indutor potente da resposta imune celular antígeno-específica eficiente para a eliminação de patógenos intracelulares como o *M. leprae* (Modlin e Barnes, 1995). Foi verificado que apenas DCs

derivadas de controles saudáveis foram capazes de produzir IL-12p70 após a infecção com *M. leprae* (Figura 3).

3.3.5. Pacientes virchowianos apresentam resposta linfoproliferativa reduzida quando estimulada por DCs previamente infectadas com *M. leprae*.

Após avaliar a ativação/maturação de DCs em resposta ao *M. leprae* viável por meio da expressão de marcadores de superfície celular e produção de citocinas, avaliamos sua capacidade de ativar LFs T autólogos. Comparando a proliferação induzida por MLDCs entre pacientes com hanseníase e controles saudáveis, observamos que tanto os LFs totais quanto LFs T CD8+ e LFs B de pacientes virchowianos apresentaram resposta proliferativa menor do que a resposta observada em pacientes tuberculóides (Figura 4).

3.3.6. Culturas de LFs com DCs de pacientes virchowianos estimuladas por *M. leprae* apresentaram baixos níveis de IL-2

Em relação à produção de citocinas nas coculturas de DCs e LFs autólogos, observamos que a produção de IL-2, que leva à proliferação e diferenciação de LFs T efetores e de memória, foi menor em pacientes virchowianos em comparação com controles saudáveis quando MLDCs ou iDCs foram usadas para ativar os LFs (Figura 5). A produção de IFN- γ , TNF, IL-9 e IL-22 por LFs cultivados com MLDCs foi fraca e semelhante à observada nas culturas de LFs com iDCs, mas menor que aquele observado quando as mDCs foram empregadas, tanto em pacientes com hanseníase quanto em controles saudáveis. Os níveis de IL-4 foram menores nas culturas de LFs com MLDCs se comparadas às iDCs, mas não houve diferença entre pacientes e controles. As citocinas IL-5, IL-10 e IL-17A foram secretados em pequenas quantidades independente do estímulo e não houve diferenças significantes entre os grupos.

3.3.7. Pacientes virchowianos apresentaram menor porcentagem de LFs secretores de IFN- γ e IL-17 em paralelo com maior número de LFs IL-4+ após estímulo com DCs infectadas por *M. leprae*.

Considerando a expressão de marcadores-chave de diferenciação de *T helper*, verificamos uma menor frequência de LFs positivos para IFN- γ em pacientes virchowianos em comparação com controles saudáveis, independente do estímulo usado para ativar as DCs (Figura 6). Além disso, pacientes virchowianos também apresentaram diminuição da porcentagem de LFs que expressam IL-17A em coculturas com MLDCs em comparação com controles saudáveis na mesma condição. Em contraste, os LFs IL-4 positivos foram mais frequentes em pacientes virchowianos em comparação com controles saudáveis quando MLDCs foram usadas. Em culturas de controles saudáveis, MLDCs induziram menor frequência de LFs positivos para IL-4 em comparação com mDCs. A frequência de LFs expressando IL-9, IL-22 e FOxP3 foi baixa em todos os grupos e não apresentou diferenças significativas quando MLDCs foram utilizadas nas coculturas.

3.4. DISCUSSÃO

As DCs são consideradas sentinelas por sua função de patrulhamento contra possíveis agentes estranhos (Rescigno, 2015). Uma vez que os patógenos são detectados pelas DCs, são internalizados, processados e apresentados para os LFs T, desencadeando respostas imunes antígeno específicas (Palucka & Banchereau 1999, Steinman & Hemmi 2006). O padrão de moléculas coestimulatórias expressas por DCs em associação com o microambiente de citocinas secretadas induz a ativação de LFs T virgens e subsequente diferenciação em subconjuntos especializados. Assim, as DCs têm um papel preponderante no início da resposta imune do hospedeiro (Steinman & Hemmi 2006) e podem

influenciar diretamente no desfecho clínico da hanseníase, pois o *M. leprae* apresenta baixa variabilidade genética devido à sua evolução reducionista (Monot et al., 2009). Desta forma, a manifestação clínica da hanseníase é determinada por fatores de suscetibilidade genéticos e ambientais inerentes ao hospedeiro e por isso pacientes tratados/curados e livres de reações imunológicas foram considerados para este estudo na tentativa de mimetizar a condição inicial do momento da infecção pelo *M. leprae*.

Tendo em vista que as DCs são capazes de internalizar o *M. leprae* vivo (Hashimoto et al. 2002), neste estudo avaliamos como a infecção pelo bacilo influencia a expressão de moléculas de MHC e coestimulatórias que caracterizam a maturação das DCs (Remondo et al., 2008) em pacientes com hanseníase. Nossos resultados demonstram que o *M. leprae* não induziu expressão de marcadores de maturação (CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DR). Resultados semelhantes foram obtidos em um estudo que relatou a ineficiência de *M. leprae* viável para induzir a maturação de DCs quando comparado ao *M. tuberculosis* e *M. bovis bacillus Calmette-Guerin* (BCG) (Murray et al., (2007). Da mesma forma, Hashimoto et al. (2002) mostraram que a expressão de marcadores de ativação como CD86 e CD83 só foi alcançada quando MOIs elevados do bacilo (160:1) foram usados. Em nosso estudo, optamos por adotar o MOI 10:1 que representa uma condição ideal em experimentos para estimular DCs imaturas sem induzir morte significativa de células hospedeiras (Murray et al., 2007). Esta parece também ser uma condição mais próxima do que ocorre na infecção natural, uma vez que é improvável que existam cerca de 160 bacilos/DC na infecção *in vivo*. Além disso, *M. bovis* e *M. tuberculosis* foram capazes de ativar DCs em MOIs tão baixos quanto 5:1 (Murray et. al, 2007). Por outro lado, estudos baseados no estímulo de DCs derivadas de monócitos (Braga et al., 2015), monócitos (Palermo et al., 2012) e PBMCs (Sridevi et al., 2014) com antígenos do *M. leprae* demonstraram ativação e expressão de moléculas coestimulatórias, revelando desfechos distintos em resposta a

antígenos derivados do bacilo e o bacilo vivo. Este é um ponto relevante: como o *M. leprae* não é cultivável *in vitro*, a maioria dos estudos envolvendo sua interação com células do sistema imune utiliza antígenos isolados que não são capazes de mimetizar a infecção natural, a qual deve atuar modulando o desenvolvimento da resposta imune específica.

As MLDCs produziram baixas quantidades de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF, IL-23) em comparação com mDCs, em pacientes com hanseníase e controles saudáveis. Da mesma forma, Murray et al. (2007) não detectaram indução de IL-10, IL-12 e TNF, nem a expressão de genes relacionados à ativação/maturação por DCs ativadas com *M. leprae*. Sinsimer et al. (2010), avaliando a interação de monócitos de pessoas saudáveis com o *M. leprae* também relataram produção de níveis baixos de IL-1 β , IL-6, TNF, IL-18, IL-12p40 e IL-10. Assim, além de não induzir a expressão de marcadores de ativação nas DCs, o bacilo não estimulou a secreção de um perfil pró-inflamatório de citocinas. Em conjunto, esses dados sugerem que *M. leprae* é um baixo ativador de maturação de DCs. Essa característica, associada à lenta multiplicação do *M. leprae*, pode contribuir para o desenvolvimento insidioso da hanseníase.

Pacientes virchowianos produziram maiores quantidades de IL-1 β frente infecção pelo *M. leprae*. Embora esta seja uma citocina pró-inflamatória que influencia a polarização de LFs Th1 e Th17 (Bent, 2018), o pré-tratamento de monócitos ou DCs imaturas com baixas doses de IL-1 β mostrou um efeito negativo em sua maturação por prejudicar as funções de APC, reduzindo a expressão de HLA-ABC, HLA-DR e CD1a e diminuindo sua capacidade de ativar LFs TCD4+ quando estimuladas por compostos de *M. leprae* (Makino et al., 2006). Assim, a produção de IL-1 β por pacientes virchowianos poderia contribuir para a redução da maturação e prejudicar a função de APC das DCs nesses indivíduos. Ademais, esta citocina pode apresentar um papel pró-apoptótico como demonstrado no processo de degeneração de células do núcleo pulposo, nos quais o

tratamento com IL-1 β induziu a produção de proteína pró-apoptótica Bax e diminuição dos níveis da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Shen et al., 2017).

Uma elevada produção das citocinas supressoras IL-10 e TGF- β foi encontrada entre as MLDCs de pacientes virchowianos quando comparadas a controles saudáveis. A IL-10 traz um perfil tolerogênico às DCs imaturas ao inibir a expressão de moléculas coestimulatórias e, conseqüentemente, diminuir a capacidade de ativação dos LFs T (Steinbrink, 1997). Além disso, essa citocina tem efeito direto sobre os LFs TCD4+ inibindo a proliferação e produção de IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5 e TNF e limitando o processo de ativação e diferenciação nos linfonodos (Couper et al., 2008). Kumar et al. (2013) relataram aumento da produção de IL-10 pelas DCs de pacientes virchowianos após estímulo com lipoarabinomanana do *M. leprae* e relacionaram esse fato à ativação de DC-SIGN que favorece a sobrevivência do bacilo (Barreiro 2006; Soilleux, 2006). Além da influência sobre os LFs, a IL-10 induz a expressão da molécula apresentadora de antígeno não clássica do tipo I HLA-G a qual foi associada com mecanismos de escape viral (Amiot e Samsam., 2014) e tumoral, e mostra efeito supressor sobre a resposta imunológica bem como influencia na inibição dos perfis Th1 e Th17 e favorece o desenvolvimento de Th2 (Agaugué et al., 2011). Um estudo recente relata a presença de HLA-G em lesões de pacientes hansenianos, mas não em biópsias de controles saudáveis (da Silva et al., 2020), sugerindo que esta via pode estar contribuir para o desenvolvimento da doença. Estudos futuros são necessários para avaliar essa possibilidade.

A baixa produção de IL-12p70 por MLDCs de pacientes tuberculoides e virchowianos em comparação aos controles saudáveis confirma nossos resultados anteriores que demonstraram baixa produção de IL-12p70 por DCs de pacientes virchowianos quando ativados por antígeno sonicado de *M. leprae* (Braga et al., 2015). No entanto, no presente estudo, os pacientes tuberculoides também apresentaram baixos

níveis dessa citocina após estímulo com bacilo viável, mesmo na presença de CD40L. A IL-12p70 é a citocina responsável pela polarização Th1, promovendo o desenvolvimento da resposta imune mediada por células que é eficaz contra o *M. leprae* (Modlin e Barnes, 1995; Maeda et al., 2005). Embora, após o estabelecimento da hanseníase, pacientes tuberculoides apresentem produção significativa de IL-12p70 e um alto grau de resposta imune celular contra o bacilo (Modlin, 1994; Modlin e Barnes, 1995), a baixa produção de IL-12p70 pelas DCs logo após a infecção pode contribuir para suscetibilidade ao desenvolvimento da hanseníase. Por outro lado, as lesões cutâneas de pacientes virchowianos mostram uma predominância de IL-10 e IL-4 (Modlin e Barnes, 1995) que regulam negativamente os níveis de IL-12p70 e contribuem para a prevalência de imunidade mediada por anticorpos que é ineficiente para controlar a proliferação de *M. leprae* e caracteriza esse grupo de pacientes (Modlin e Barnes, 1995; Scollard et al., 2006).

Estudos anteriores relataram baixa proliferação de LFs em resposta às DCs estimuladas com *M. leprae* (Murray, 2007; Hashimoto, 2002) mesmo quando grandes quantidades de bacilos foram empregadas (Hashimoto, 2002). Nossos dados demonstram ainda que pacientes virchowianos apresentaram níveis menores de linfoproliferação em resposta ao estímulo do *M. leprae* em comparação aos tuberculoides. Essa baixa capacidade linfoproliferativa foi identificada anteriormente nos pacientes virchowianos quando antígenos de *M. leprae* ou bacilos mortos foram usados (Chaduvula, 2012; Dua, 2019).

Os LFs de pacientes virchowianos produziram baixos níveis de IL-2 após ativação por MLDCs, o que deve contribuir para a composição de um ambiente permissivo para a sobrevivência bacilar, uma vez que IL-2 é necessária para a proliferação e diferenciação de LFs T efetores e de memória (Spolski et al. 2018). A baixa resposta linfoproliferativa frente à ativação por MLDCs pode estar diretamente relacionada a essa baixa

produção de IL-2 pelos pacientes virchowianos, uma vez que essa citocina é um elemento chave para proliferação de linfócitos. A secreção de IL-2 também é essencial para o desenvolvimento da resposta Th1 que elimina patógenos intracelulares (Kaplan et al., 1989). Independentemente da condição de paciente ou de controle saudável, nossos resultados mostraram que o estímulo de DCs com o bacilo viável não induziu a secreção de citocinas-chave Th1 como IFN- γ e TNF pelos LFs, o que tem sido relatado também em outros estudos (Murray, 2007; Hashimoto 2002), mostrando que o bacilo não é um bom ativador da resposta imune celular.

A menor frequência de LFs expressando IFN- γ e IL-17 juntamente com uma maior ocorrência de LFs IL-4+ após estímulo com MLDCs em pacientes virchowianos saudáveis em comparação com controles saudáveis sugere a incapacidade desses pacientes em compor um cenário imunológico favorável ao desenvolvimento da resposta imune celular. Entre os grupos de pacientes, não observamos diferenças significativas, embora pacientes tuberculoides tendam a apresentar maior frequência de LFs expressando IFN- γ e IL-17. Martins et al. (2012) verificaram que PBMCs estimulados com peptídeos de *M. leprae* apresentam diferentes níveis de resposta IFN- γ de acordo com o *status* da hanseníase: contatos domiciliares de pacientes paucibacilares produziram os níveis mais altos da citocina; contatos domiciliares de pacientes multibacilares apresentaram níveis intermediários, enquanto os pacientes paucibacilares produziram menos IFN- γ e multibacilares apresentaram quantidades ainda menores, sugerindo resposta diferencial desses indivíduos ao antígenos bacilares. O aumento da expressão de IL-17 foi relatado na hanseníase tuberculóide (Saini et al. 2013) e parece contribuir para o desenvolvimento de mecanismos microbicidas (Martiniuk et al., 2012), embora possa resultar em danos neurais (Aarão et al., 2015). Não foram observadas diferenças significantes na porcentagem de LFs T regulatórios, caracterizados pela expressão de FoxP3, entre os diferentes grupos, sugerindo que nesta fase inicial da

interação pacientes hansenianos e controles saudáveis possuem níveis semelhantes dessas células.

As limitações desse estudo incluem a baixa quantidade de pacientes participantes devido as dificuldades para o recrutamento de pacientes dentro dos critérios de inclusão no tempo previsto para a execução do estudo. Além disso, nas análises por citometria de fluxo não foi possível a utilização de um marcador de viabilidade devido ao número limitado de canais de fluorescência do equipamento utilizado, também não foi possível a identificação dos linfócitos TCD4+ por dificuldades técnicas.

Nós acreditamos que a avaliação das etapas iniciais de ativação imune contra o *M. leprae* seja o melhor modelo para entender o desenvolvimento da resposta imune espectral na hanseníase para proposição de novas estratégias profiláticas e terapêuticas. Nossos resultados demonstraram que embora o *M. leprae* seja um estímulo fraco para a maturação das DCs, em controles saudáveis essas células são capazes de induzir a ativação de LFs e a produção de um perfil heterogêneo de citocinas incluindo citocinas chaves dos perfis Th1 e Th17. Por outro lado, enquanto pacientes virchowianos apresentam tendência ao desenvolvimento de resposta tipo Th2 na ausência dos padrões Th1 e Th17, os pacientes tuberculoides parecem apresentar um atraso na ativação e polarização imunológica em comparação com controles saudáveis que pode favorecer a sobrevivência do *M. leprae* e o desenvolvimento da hanseníase. Vale ressaltar que, embora as DCs de pacientes tuberculoides e virchowianos não apresentem diferenças significantes quanto à expressão marcadores de ativação e demonstrem discreta produção de citocinas em resposta ao *M. leprae*, é possível que existem diferenças metabólicas entre essas células bem como outros mediadores e moléculas não investigadas que influenciem diferentemente na ativação dos LFs. Além disso, a participação de outras populações celulares como LFs B não pode ser descartada.

3.5. REFERÊNCIAS

1. Global leprosy (Hansen disease) update, 2019: time to step-up prevention initiatives. *Wkly Epidemiol Rec.* 2020;95(36):417–40.
2. Fava VM, Dallmann-Sauer M, Schurr E. Genetics of leprosy: today and beyond [Internet]. Vol. 139, *Human Genet.* Springer; 2020 [cited 2020 Aug 23]. p. 835–46.
3. Cardoso CC, Pereira AC, de Sales Marques C, Moraes MO. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. *Future Microbiol* [Internet]. 2011 May [cited 2019 Sep 29];6(5):533–49.
4. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* [Internet]. 2001/03/10. 2001;409(6823):1007–11.
5. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2006/04/15. 2006;19(2):338–81
6. Misra N, Murtaza A, Walker B, Narayan NP, Misra RS, Ramesh V, et al. Cytokine profile of circulating T cells of leprosy patients reflects both indiscriminate and polarized T-helper subsets: T-helper phenotype is stable and uninfluenced by related antigens of *Mycobacterium leprae*. *Immunology* [Internet]. 1995/09/01. 1995;86(1):97–103.
7. Mutis T, Kraakman EM, Cornelisse YE, Haanen JB, Spits H, de Vries RR, et al. Analysis of cytokine production by *Mycobacterium*-reactive T cells. Failure to explain *Mycobacterium leprae*-specific nonresponsiveness of peripheral blood T cells from lepromatous leprosy patients. *J Immunol* [Internet]. 1993/05/15. 1993;150(10):4641–51.

8. Howe RC, Wondimu A, Demissew A, Frommel D. Functional heterogeneity among CD4+ T-cell clones from blood and skin lesions of leprosy patients. Identification of T-cell clones distinct from Th0, Th1 and Th2. *Immunology* [Internet]. 1995/04/01. 1995;84(4):585–94.
9. Braga AF, Moretto DF, Gigliotti P, Peruchi M, Vilani-Moreno FR, Campanelli AP, et al. Activation and cytokine profile of monocyte derived dendritic cells in leprosy: In vitro stimulation by sonicated *Mycobacterium leprae* induces decreased level of IL-12p70 in lepromatous leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2015;110(5):655–61.
10. Pinheiro RO, Schmitz V, de Andrade Silva BJ, Dias AA, de Souza BJ, de Mattos Barbosa MG, et al. Innate Immune Responses in Leprosy. *Front Immunol* [Internet]. 2018 Mar 28 [cited 2021 Dec 16];9(MAR).
11. de Toledo-Pinto TG, Ferreira ABR, Ribeiro-Alves M, Rodrigues LS, Batista-Silva LR, Silva BJDA, et al. STING-Dependent 2'-5' Oligoadenylate Synthetase-Like Production Is Required for Intracellular *Mycobacterium leprae* Survival. *J Infect Dis* [Internet]. 2016 Jul 15 [cited 2021 Dec 16];214(2):311–20.
12. Montoya D, Modlin RL. Learning from Leprosy. Insight into the human innate immune response. *Adv Immunol*; 2010. 105:1–24.
13. Palucka K, Banchereau J. Dendritic cells: a link between innate and adaptive immunity. *J Clin Immunol* [Internet]. 1999 [cited 2021 Dec 16];19(1):12–25.
14. Steinman RM, Hemmi H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* [Internet]. 2006 [cited 2021 Dec 16];311:17–58.
15. Hashimoto K, Maeda Y, Kimura H, Suzuki K, Masuda A, Matsuoka M, et al. *Mycobacterium leprae* Infection in Monocyte-Derived Dendritic Cells and Its Influence on Antigen-Presenting Function *Mycobacterium leprae* Infection in Monocyte-Derived Dendritic Cells and Its Influence on Antigen-Presenting

Function. *Infect Immun*. 2002;70(9):5167–76.

16. Murray RA, Siddiqui MR, Krahenbuhl J, Kaplan G, Murray RA, Siddiqui MR, et al. *Mycobacterium leprae* Inhibits Dendritic Cell Activation and Maturation. *J Immunol*; 2007. 178(1):338-44.

17. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* [Internet]. 1966;34(3):255–73.

18. Trombone APF, Pedrini SCB, Diório SM, Belone A de FF, Fachin LRV, do Nascimento DC, et al. Optimized protocols for *Mycobacterium leprae* strain management: frozen stock preservation and maintenance in athymic nude mice. *Journal of visualized experiments: JoVE* [Internet]. 2014 Jan [cited 2015 Jul 20];(85).

19. Cella, M et al. "Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation." *The Journal of experimental medicine*. 1996;184(2): 747-52.

20. Lane P, Burdet C, McConnell F, Lanzavecchia A, Padovan E. CD40 ligand-independent B cell activation revealed by CD40 ligand-deficient T cell clones: evidence for distinct activation requirements for antibody formation and B cell proliferation. *Eur J Immunol*. 1995 Jun;25(6):1788-93.

21. Worbs T, Hammerschmidt SI, Förster R. Dendritic cell migration in health and disease. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2021 Dec 16];17(1):30–48.

22. Cruz-Aguilar M, Castillo-Rodal AI, Schcolnik-Cabrera A, Bonifaz LC, Molina G, López-Vidal Y. TLR4 and DC-SIGN receptors recognized *Mycobacterium scrofulaceum* promoting semi-activated phenotype on bone marrow dendritic cells. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2021 Dec 16];99:31–40.

23. Yarzabek B, Zaitouna AJ, Olson E, Silva GN, Geng J, Geretz A, et al.

Variations in HLA-B cell surface expression, half-life and extracellular antigen receptivity. eLife [Internet]. 2018 Jul 10 [cited 2021 Dec 16];7.

24. Förster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Müller I, Wolf E, et al. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell*. 1999 Oct 1;99(1):23–33.

25. Nurieva RI, Mai XM, Forbush K, Bevan MJ, Dong C. B7h is required for T cell activation, differentiation, and effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2003 Nov 25 [cited 2021 Dec 16];100(24):14163–8.

26. Steinbrink K, Wöfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol (Baltimore, Md: 1950)* [Internet]. 1997 Nov 15 [cited 2019 May 27];159(10):4772–80.

27. Ho IC, Miaw SC. Regulation of IL-4 Expression in Immunity and Diseases. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2021 Dec 16];941:31–77.

28. Modlin RL, Barnes PF. IL12 and the human immune response to mycobacteria. *Res Immunol* [Internet]. 1995 [cited 2021 Dec 16];146(7–8):526–31.

29. Rescigno M. Dendritic cell functions: Learning from microbial evasion strategies. *Semin Immunol* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2021 Dec 16];27(2):119–24.

30. Monot M, Honore N, Garnier T, Zidane N, Sherafi D, Paniz-Mondolfi A, et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nat Genet*. 2009;41(12):1282-U39.

31. Hashimoto K, Maeda Y, Kimura H, Suzuki K, Masuda A, Matsuoka M, et al. *Mycobacterium leprae* infection in monocyte-derived dendritic cells and its influence on antigen-presenting function. *Infect Immun* [Internet]. 2002 Sep [cited 2015 Oct 20];70(9):5167–76.

32. Remondo C, Cereda V, Mostböck S, Sabzevari H, Franzusoff A, Schlom J,

et al. Human dendritic cell maturation and activation by a heat-killed recombinant yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) vector encoding carcinoembryonic antigen. *Vaccine* [Internet]. 2009 Feb 11 [cited 2021 Dec 16];27(7):987–94.

33. Murray RA, Siddiqui MR, Mendillo M, Krahenbuhl J, Kaplan G. *Mycobacterium leprae* inhibits dendritic cell activation and maturation. *J Immunol* [Internet]. 2006/12/22. 2007;178(1):338–44.

34. Palermo Mde L, Trindade MA, Duarte AJ, Cacere CR, Benard G. Differential expression of the costimulatory molecules CD86, CD28, CD152 and PD-1 correlates with the host-parasite outcome in leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2013/01/11. 2012;107 Suppl:167–73.

35. Sridevi K, Neena K, Chitralkha KT, Arif AK, Tomar D, Rao DN. Expression of costimulatory molecules (CD80, CD86, CD28, CD152), accessory molecules (TCR alphabeta, TCR gammadelta) and T cell lineage molecules (CD4+, CD8+) in PBMC of leprosy patients using *Mycobacterium leprae* antigen (MLCWA) with murabutide and T cel. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2004/02/21. 2004;4(1):1–14.

36. Sinsimer D, Fallows D, Peixoto B, Krahenbuhl J, Kaplan G, Manca C. *Mycobacterium leprae* actively modulates the cytokine response in naive human monocytes. *Infect Immun* [Internet]. 2009/10/21. 2010;78(1):293–300.

37. Bent R, Moll L, Grabbe S, Bros M. Interleukin-1 Beta-A Friend or Foe in Malignancies? *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2021 Dec 16];19(8).

38. Makino M, Maeda Y, Mukai T, Kaufmann SHE. Impaired maturation and function of dendritic cells by mycobacteria through IL-1beta. *Eur J Immunol*. [Internet]. 2006 Jun [cited 2021 Dec 16];36(6):1443–52.

39. Shen J, Xu S, Zhou H, Liu H, Jiang W, Hao J, et al. IL-1 β induces apoptosis and autophagy via mitochondria pathway in human degenerative nucleus pulposus cells. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Jan 25 [cited 2021 Dec 16];7.

40. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol* (Baltimore, Md : 1950) [Internet]. 2008 May 1 [cited 2021 Dec 16];180(9):5771–7.
41. Kumar S, Naqvi RA, Bhat AA, Rani R, Ali R, Agnihotri A, et al. IL-10 production from dendritic cells is associated with DC SIGN in human leprosy. *Immunobiology* [Internet]. 2013 Dec [cited 2018 Nov 22];218(12):1488–96.
42. Barreiro LB, Quach H, Krahenbuhl J, Khaliq S, Mohyuddin A, Mehdi SQ, et al. DC-SIGN Interacts with *Mycobacterium leprae* but Sequence Variation in This Lectin Is Not Associated with Leprosy in the Pakistani Population. *Hum Immunol*. 2006;67(1–2):102–7.
43. Soilleux EJ, Sarno EN, Hernandez MO, Moseley E, Horsley J, Lopes UG, et al. DC-SIGN association with the Th2 environment of lepromatous lesions: cause or effect? *J Pathol* [Internet]. 2006/04/04. 2006;209(2):182–9.
44. Amiot L, Vu N, Samson M. Immunomodulatory properties of HLA-G in infectious diseases. *J Immunol Res*. [Internet]. 2014 [cited 2021 Dec 16];2014.
45. Agaugué S, Carosella ED, Rouas-Freiss N. Role of HLA-G in tumor escape through expansion of myeloid-derived suppressor cells and cytokinic balance in favor of Th2 versus Th1/Th17. *Blood* [Internet]. 2011 Jun 30 [cited 2021 Dec 16];117(26):7021–31.
46. da Silva CR, Sampaio LHF, Costa MB, de Paula Carneiro Cysneiros MA, Sadissou IA, de Oliveira Rodrigues Castilho ML, et al. Analysis of HLA-G protein expression in leprosy. *Immunogenetics* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2021 Dec 16];72(5):333–7.
47. Maeda Y, Mukai T, Spencer J, Makino M. Identification of an Immunomodulating Agent from *Mycobacterium leprae*. 2005;73(5):2744–50.
48. Modlin RL. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. *J Invest Dermatol* [Internet]. 1994/06/01. 1994;102(6):828–32.

49. Dua B, Upadhyay R, Natrajan M, Arora M, Kithiganahalli Narayanaswamy B, Joshi B. Notch signaling induces lymphoproliferation, T helper cell activation and Th1/Th2 differentiation in leprosy. *Immunol Lett* [Internet]. 2019 Mar [cited 2019 May 28];207:6–16.
50. Chaduvula M, Murtaza A, Misra N, Narayan NPS, Ramesh V, Prasad HK, et al. Lsr2 Peptides of *Mycobacterium leprae* Show Hierarchical Responses in Lymphoproliferative Assays, with Selective Recognition by Patients with Anergic Lepromatous Leprosy. McCormick BA, editor. *Infect Immun* [Internet]. 2012 Feb [cited 2019 May 28];80(2):742–52.
51. Spolski R, Li P, Leonard WJ. Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2021 Dec 16];18(10):648–59.
52. Kaplan G, Kiessling R, Teklemariam S, Hancock G, Sheftel G, Job CK, et al. The reconstitution of cell-mediated immunity in the cutaneous lesions of lepromatous leprosy by recombinant interleukin 2. *J Exp Med* [Internet]. 1989 Mar 1 [cited 2019 May 29];169(3):893–907.
53. Martins M v, Guimaraes MM, Spencer JS, Hacker MA, Costa LS, Carvalho FM, et al. Pathogen-specific epitopes as epidemiological tools for defining the magnitude of *Mycobacterium leprae* transmission in areas endemic for leprosy. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2012/05/01. 2012;6(4):e1616.
54. Saini C, Ramesh V, Nath I. CD4+ Th17 cells discriminate clinical types and constitute a third subset of non Th1, Non Th2 T cells in human leprosy. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2013 Jan [cited 2015 Jul 22];7(7):e2338.
55. Martiniuk F, Giovinnazzo J, Tan AU, Shahidullah R, Haslett P, Kaplan G, et al. Lessons of leprosy: the emergence of TH17 cytokines during type II reactions (ENL) is teaching us about T-cell plasticity. *J Drugs Dermatol* [Internet]. 2012/04/25. 2012;11(5):626–30.
56. Aarão TL de S, de Sousa JR, Botelho BS, Fuzii HT, Quaresma JAS.

Correlation between nerve growth factor and tissue expression of IL-17 in leprosy.
Microb pathog [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2021 Dec 16];90:64–8.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1: Expressão de marcadores de superfície em DCs representada pela intensidade média de fluorescência (MFI). As DCs foram diferenciadas a partir de monócitos do sangue periférico com GM-CSF e IL-4 e estimuladas por 48 horas com coquetel padrão de maturação (mDC), *M. leprae* (10 bacilos:1 DC, MLDC) ou permaneceram não estimuladas (iDC). Os valores representam a mediana, o intervalo interquartil e os valores máximo e mínimo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ de acordo com a análise não paramétrica de variância de Friedman seguida pelo teste de comparação múltipla de Dunn. PV: pacientes virchowianos, PT: pacientes tuberculoides, CS: controles saudáveis.

Figura 2: Produção de citocinas por DCs. As DCs foram diferenciadas de monócitos do sangue periférico com GM-CSF e IL-4 e estimuladas por 48 horas com coquetel padrão de maturação (mDC), *M. leprae* (10 bacilos:1 DC, MLDC) ou permaneceram não estimuladas (iDC). Os valores representam a mediana, o intervalo interquartil e os valores máximo e mínimo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância não paramétrica de Friedman e o teste de comparações múltiplas de Dunn. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ de acordo com a análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis seguida pelo teste de comparação múltipla de Dunn. PV: pacientes virchowianos, PT: pacientes tuberculoides, CS: controles saudáveis.

Figura 3: Produção de IL-12p70 em sobrenadantes de culturas de DCs.

As DCs foram diferenciadas de monócitos do sangue periférico com GM-CSF e IL-4 e estimuladas por 48 horas com *M. leprae* (10 bacilos:1 DC, MLDC) ou permaneceram não estimuladas (iDC), após esse período foram cultivadas por 24 horas com células da cepa J588 transfectadas com CD40L para mimetizar a interação CD40-CD40L. Os valores representam a mediana, o intervalo interquartil e os valores máximo e mínimo. * $p < 0,05$; de acordo com o teste de Wilcoxon para amostras pareadas. # $p < 0,05$ de acordo com a análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis seguida pelo teste de comparação múltipla de Dunn. PV: pacientes virchowianos; PT: pacientes tuberculoides, CS: pacientes saudáveis.

Figura 4: Análise da proliferação de linfócitos usando CFSE.

Análise da proliferação de linfócitos de pacientes virchowianos (PV), pacientes tuberculoides (PT) e controles saudáveis (CS) cultivados com DCs autólogas previamente estimuladas com *M. leprae* (MLDC). Os linfócitos foram marcados com CFSE e cultivados por 5 dias com DCs autólogas. Os resultados são apresentados em intensidade média de fluorescência (MFI) e a diminuição da intensidade de fluorescência atesta a proliferação de linfócitos. Os valores representam a mediana, o intervalo interquartil e os valores máximo e mínimo. # $p < 0,05$ de acordo com a análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis seguida pelo teste de comparação múltipla de Dunn.

Figura 5: Detecção de citocinas em sobrenadantes de coculturas de DC e linfócitos autólogos. Os linfócitos foram cultivados por 5 dias com DCs autólogas diferenciadas de monócitos de sangue periférico com GM-CSF e IL-4 e estimuladas por 48 horas com coquetel padrão de maturação (mDC), *M. leprae* (10 bacilos:1 DC, MLDC) ou DCs não estimuladas (iDC). Os valores representam a mediana, o intervalo interquartil e os valores máximo e mínimo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância não paramétrica de Friedman e o teste de comparações múltiplas de Dunn. # $p < 0,05$ de acordo com a análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis seguida pelo teste de comparação múltipla de Dunn. PV: pacientes virchowianos, PT: pacientes tuberculoides, CS: controles saudáveis.

Figura 6: Porcentagem de linfócitos que expressam citocinas intracelulares após cultura com DCs autólogas. Os linfócitos foram cultivados por 5 dias com DCs autólogas diferenciadas de monócitos de sangue periférico com GM-CSF e IL-4 e estimuladas por 48 horas com coquetel padrão de maturação (mDC), *M. leprae* (10 bacilos:1 DC, MLDC) ou DCs não estimuladas (iDC). Os valores representam a mediana, o intervalo interquartil e os valores máximo e mínimo. * $p < 0,05$ de acordo com a análise de variância não paramétrica de Friedman e o teste de comparação múltipla de Dunn. # $p < 0,05$ de acordo com a análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis seguida pelo teste de comparação múltipla de Dunn. PV: pacientes virchowianos, PT: pacientes tuberculoides, CS: controles saudáveis.

FIGURAS

Figura 1

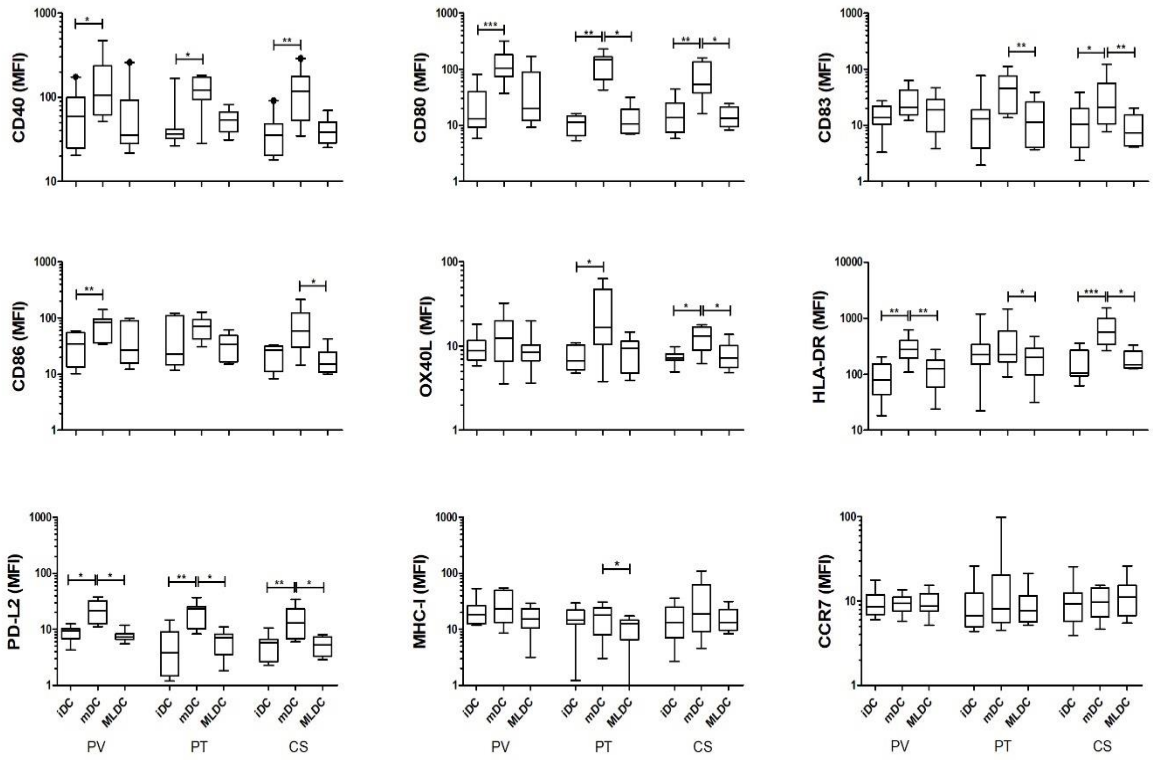


Figura 2

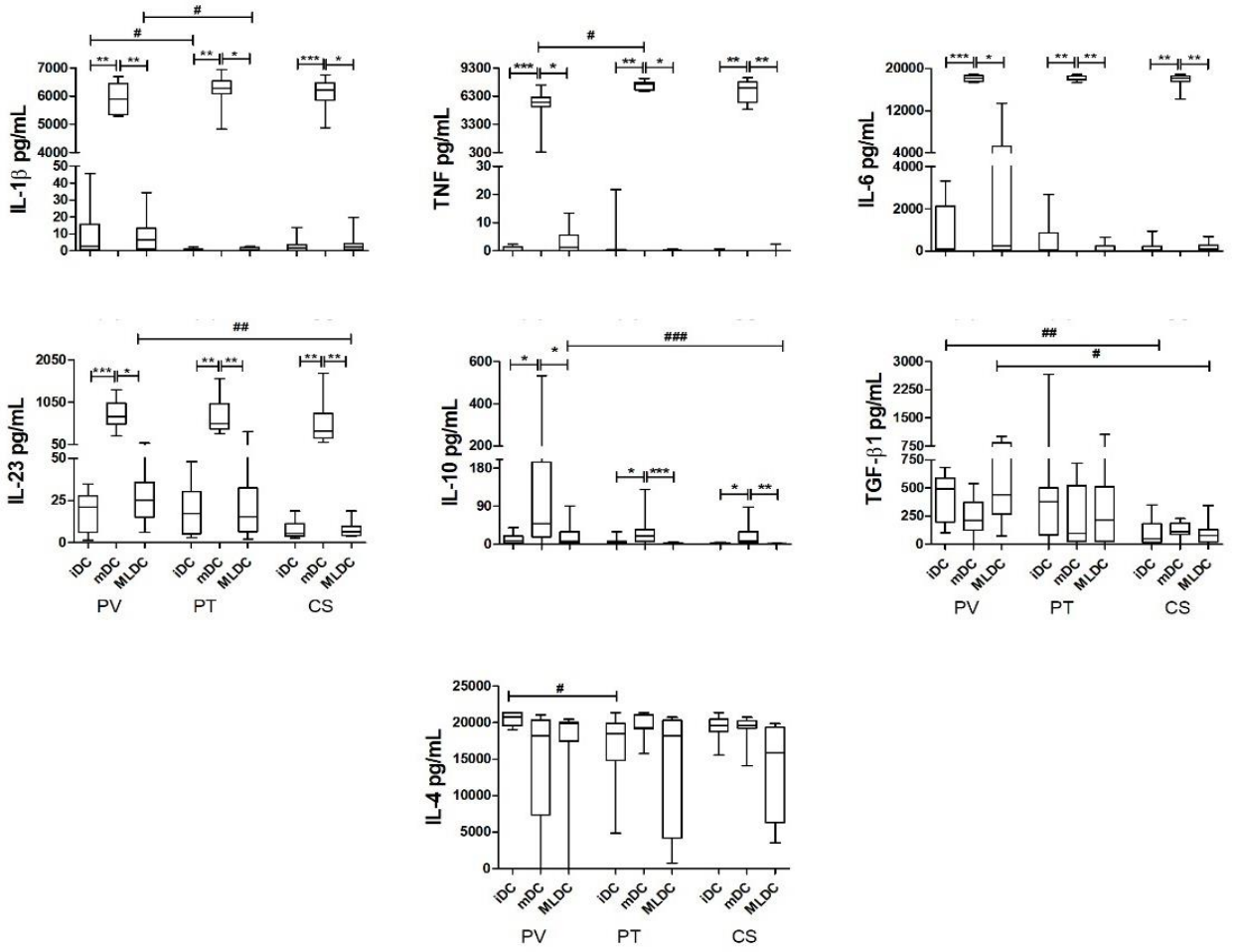


Figura 3

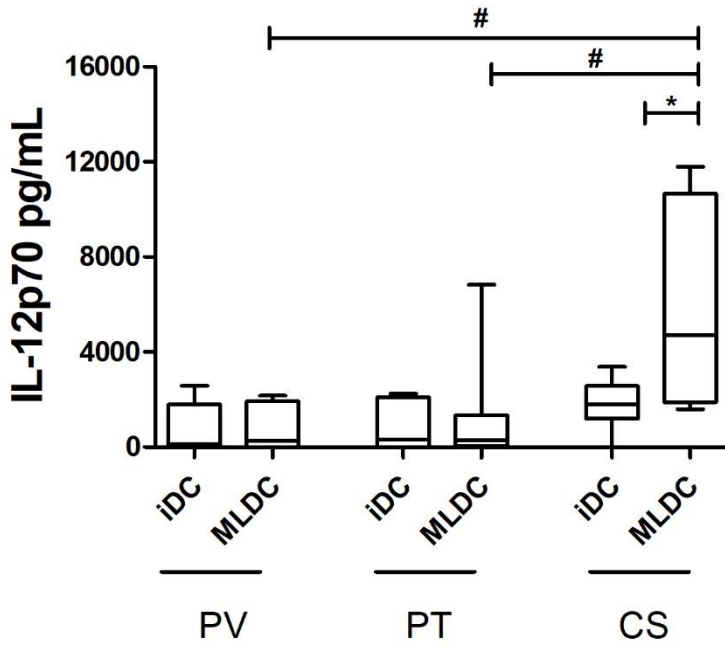


Figura 4

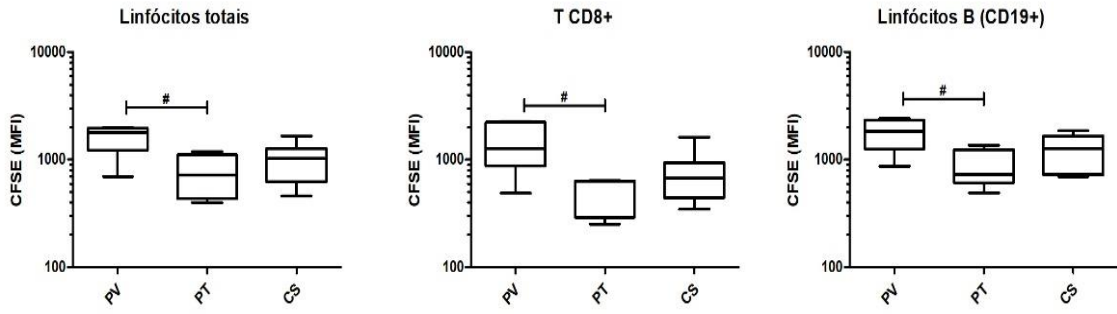


Figura 5

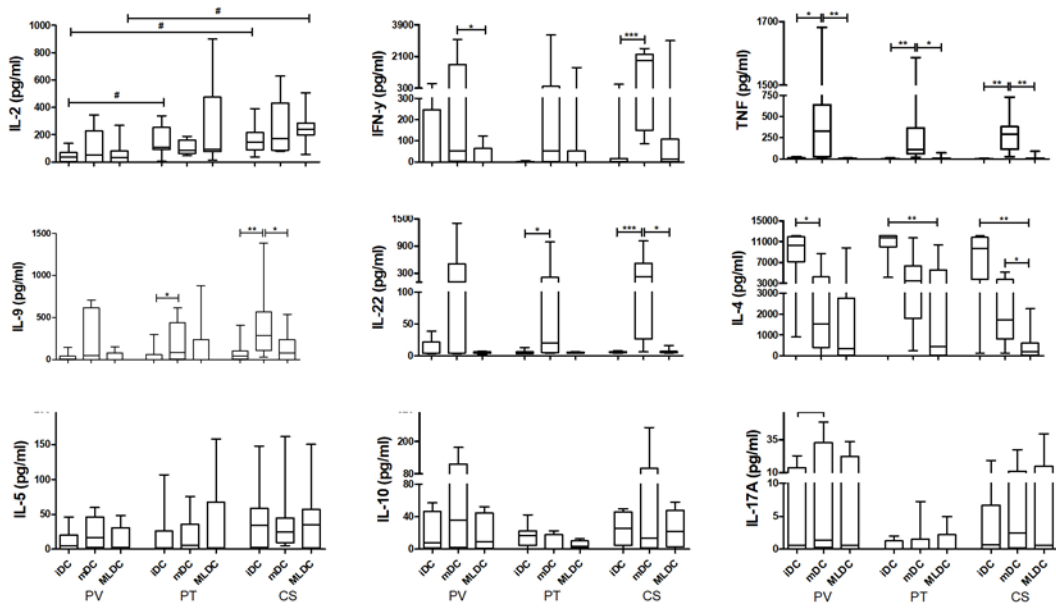
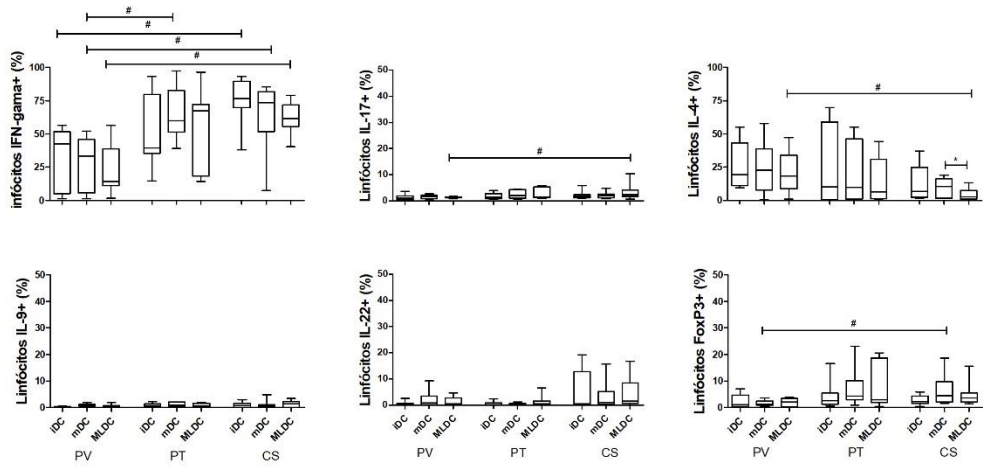


Figura 6



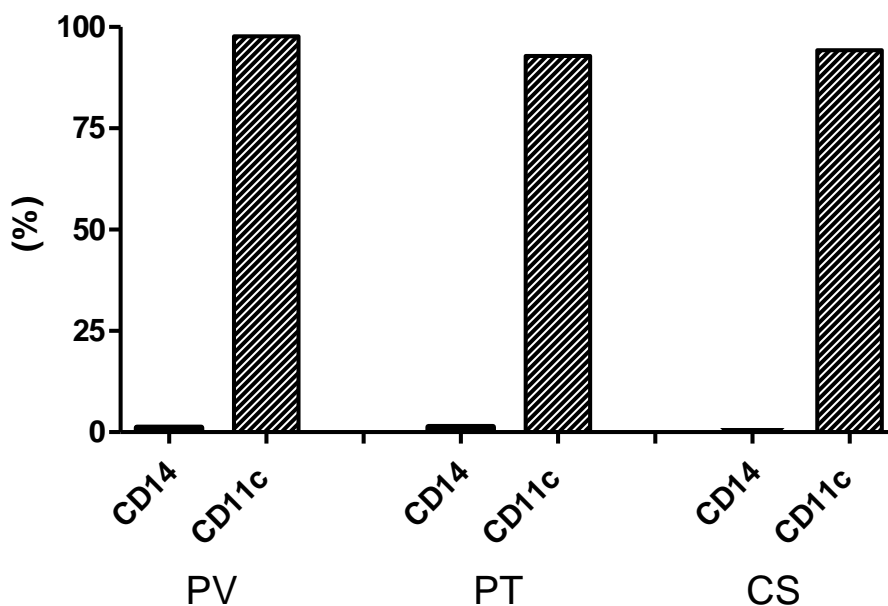
MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela suplementar 1. Anticorpos usados para a caracterização das DCs.

Marcador	Clone	Fluorocromo	Fabricante	Referência
CCR7 (CD197)	150503	PerCP-Cy5.5	BD Biosciences	Ativação/Maturação
CD1c	F10/21A3	BB515	BD Biosciences	Diferenciação
CD11c	B-ly6	PerCP-Cy5.5	BD Biosciences	Diferenciação
CD40	5C3	BB515	BD Biosciences	Ativação/Maturação
CD80	L307.4	PE	BD Biosciences	Ativação/Maturação
CD83	HB15e	APC	BD Biosciences	Ativação/Maturação
CD86	2331	PERCP- CY5.5	BD Biosciences	Ativação/Maturação
HLA-DR	G46-6	BB515	BD Biosciences	Ativação/Maturação
HLA-ABC	G46-2.6	APC	BD Biosciences	Ativação/Maturação
ICOSL (CD275)	2D3/B7- H2	PE	BD Biosciences	Ativação/Maturação
OX40L (CD252)	ik-1	PE	BD Biosciences	Ativação/Maturação
PD-L2 (CD273)	MIH18	APC	BD Biosciences	Ativação/Maturação

Tabela suplementar 2: Anticorpos usados para identificar citocinas intracelulares e fator de transcrição

Marcador	Clone	Fluorocromo	Fabricante	Referência
FoxP3	236A / E7	PE	BD Biosciences	Fator de transcrição
IL-9	MH9A3	PERCP- CY5.5	BD Biosciences	Citocina
IL-4	8D4-8	APC	BD Biosciences	Citocina
IL-22	2G12A41	PE	Biolegend	Citocina
IL-17^a	N49-653	PERCP- CY5.5	BD Biosciences	Citocina
IFN- γ	B27	APC	BD Biosciences	Citocina

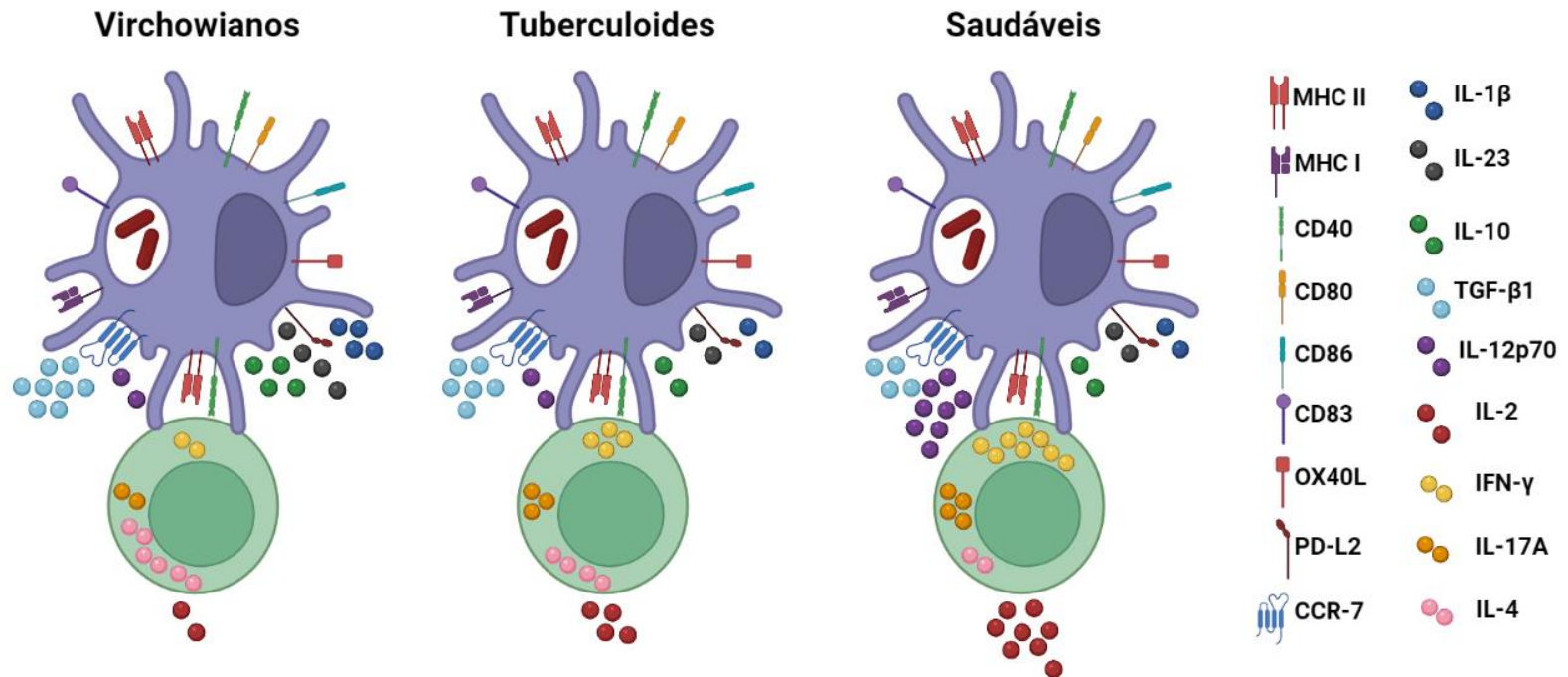


4. **Figura suplementar 1. Diferenciação de DCs a partir de monócitos de sangue periférico.** A diferenciação de monócitos em DCs *in vitro* foi feita empregando-se GM-CSF e IL-4 e comprovada pela expressão de CD11c e perda da expressão do marcador CD14. PV: pacientes virchowianos, PT: pacientes tuberculoides, CS: controles saudáveis. Os histogramas representam a mediana dos valores encontrados.

5. CONCLUSÕES

Conclui-se a partir deste trabalho que quando o *M. leprae* viável foi empregado como estímulo, as DCs não mostraram um perfil de ativação e maturação completa *in vitro*, e o bacilo não foi capaz de induzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias por essas células. Especificamente, pacientes com hanseníase produziram níveis menores de IL-12p70 frente ao *M. leprae* do que controles saudáveis. A capacidade linfoproliferativa de pacientes virchowianos foi menor quando esses LFs foram ativados por DCs previamente ativadas pelo bacilo, as quais também não induziram a secreção elevada de IL-2 nesses pacientes. Pacientes virchowianos mostraram ainda menor frequência de LFs IFN- γ + e IL-17+ e maior frequência de IL-4+ em culturas de LFs e DCs infectadas pelo *M. leprae*. Em conjunto, nossos dados sugerem que o *M. leprae* não induz ativação completa de DCs e que os pacientes com hanseníase virchowiana são incapazes de induzir uma resposta Th1 frente ao bacilo, o que deve favorecer a disseminação da hanseníase.

6. RESUMO GRÁFICO



Resumo gráfico: *M. leprae* não induz a maturação de células dendríticas (DCs). DCs de pacientes virchowianos produzem citocinas anti-inflamatórias tais como TGF-β1 and IL-10 em resposta ao *M. leprae* e induzem a diferenciação de linfócitos IL-4+ produzindo baixas quantidades de IL-2. DCs de controles saudáveis, por outro lado, produzem IL-12p70 quando estimuladas com *M. leprae* e ativam linfócitos que produzem IL-2 e expressam IFN-γ e IL-17A intracelulares. Pacientes tuberculoides apresentam um padrão intermediário entre controles saudáveis e pacientes virchowianos. (Criado em BioRender.com)

7. REFERÊNCIAS

ATTIA EAS, ABDALLAH M, EI-KHATEEB E, SAAD AA, LOTFI RA, EI-SHENNAWY D. Serum Th17 cytokines in leprosy: correlation with circulating CD4(+) CD25 (high)FoxP3 (+) T-regs cells, as well as down regulatory cytokines. **Arch Dermatol Res**, v. 306, n. 9, p. 793–801, 2014.

AKDIS, M. et al. TH17 and TH22 cells: A confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection. **J Allergy Clin Immunol**, v. 129, n. 6, p. 1438–1449, 2012.

AVANZI, C. et al. Red squirrels in the British Isles are infected with leprosy bacilli. **Science**, v. 354, n. 6313, p. 744–747, 2016.

AZIZI G.; RASTEGAR P. M.; NAVABI S. S.; YAZDANI R.; KIAEE F.; MIRSHAFIEY A. The Newly Identified T Helper 22 Cells Lodge in Leukemia. **Int J Hematol Oncol Stem Cell Res**, v. 9, n. 3, p. 143-54, 2015.

BAKKER, M. I. et al. Risk factors for developing leprosy – a population-based cohort study in Indonesia. **Lepr Rev**, v. 77, n. 1, p. 48–61, 2006.

BECHLER, R. G. Hansen versus Neisser: controvérsias científicas na “descoberta” do bacilo da lepra. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 19, n. 3, p. 815–842, 2012.

BOBOSHA, K. et al. T-Cell Regulation in Lepromatous Leprosy. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 4, p. e2773, 2014.

BOER, M. C.; JOOSTEN, S. A.; OTTENHOFF, T. H. M. Regulatory T-Cells at the Interface between Human Host and Pathogens in Infectious Diseases and Vaccination. **Front Immunol**, v. 6, 2015.

BOURÉE, P.; de CARSALADE, G. Y. Aspects actuels de la lèpre [Current status of leprosy]. **La Revue du praticien**, v. 62, n. 6, p. 751–755, 2012.

CHAVARRO-PORTILLO, B.; SOTO, C. Y.; GUERRERO, M. I. *Mycobacterium leprae's* evolution and environmental adaptation. **Acta Trop**, v. 197, p. 105041, 2019.

COLE, S. T. et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, n. 6823, p. 1007–1011, 2001.

DESIKAN, K. V.; SREEVATSA. Extended studies on the viability of *Mycobacterium leprae* outside the human body. **Lepr Rev**, v. 66, n. 4, 1995.

DE ALMEIDA-NETO, F. B. et al. TH 17 cells, interleukin-17 and interferon- γ in patients and households contacts of leprosy with multibacillary and paucibacillary forms before and after the start of chemotherapy treatment. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 29, n. 7, p. 1354–1361, 2014.

DE LIMA SILVEIRA, E. et al. New immunologic pathways in the pathogenesis of leprosy: Role for Th22 cytokines in the polar forms of the disease. **J Am Acad Dermatol**, v. 72, n. 4, p. 729–730, 2015.

DE SOUSA, J. R. et al. Th9 cytokines response and its possible implications in the immunopathogenesis of leprosy. **J Clin Pathol**, v. 70, n. 6, p. 521–527, 2016.

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

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

FACHIN L. R.; SOARES C. T.; BELONE A.F.; TROMBONE A.P.; ROSA P. S.; GUIDELLA C. C.; FRANCO, M. F. Immunohistochemical assessment of cell populations in leprosy spectrum lesions and reactional forms. **Histol Histopathol**. v. 32, n.4, p. 385–96, 2017.

FINIASZ, M. R. et al. IL-9 promotes anti-*Mycobacterium leprae* cytotoxicity: involvement of IFN γ . **Clin Exp Immunol**, v. 147, n. 1, p. 139–147, 2006.

FISCHER, M. Leprosy - an overview of clinical features, diagnosis, and treatment. **J Dtsch Dermatol Ges**, v. 15, n. 8, p. 801–827, 2017.

FREHEL, C.; RASTOGI, N. *Mycobacterium leprae* surface components intervene in the early phagosome-lysosome fusion inhibition event. **Infect Immun**, v. 55, n. 12, p. 2916–2921, 1987.

HASHIMOTO, K. et al. *Mycobacterium leprae* Infection in Monocyte-Derived Dendritic Cells and Its Influence on Antigen-Presenting Function. **Infect Immun**, v. 70, n. 9, p. 5167–5176, 2002.

HIRAI, K. E. et al. Langerhans cells (CD1a and CD207), dermal dendrocytes (FXIIIa) and plasmacytoid dendritic cells (CD123) in skin lesions of leprosy patients. **Microb Pathog**, v. 91, p. 18–25, 2016.

HOCKINGS, K. J. et al. Leprosy in wild chimpanzees. **Nature**, v. 598, n. 7882, p. 652–656, 2021.

HOWE, R.C.; WONDIMU, A.; DEMISSEE A.; FROMMEL D. Functional heterogeneity among CD4+ T-cell clones from blood and skin lesions of leprosy patients. Identification of T-cell clones distinct from Th0, Th1 and Th2. **Immunology**. v. 84, n. 4, p. 585–94, 1995.

HUANG, G.; WANG, Y.; CHI, H. Regulation of T H 17 cell differentiation by innate immune signals. **Cell Mol Immunol**, v. 9, n. 4, p. 287–295, 2012.

JOB, C. K. et al. Transmission of leprosy: study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. **Am J Trop Med Hyg**, v. 78, n. 3, p. 518-521, 2008.

KALIŃSKI, P. et al. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. **Immunol Today**, v. 20, n. 12, p. 561–567, 1999.

KIBBIE, J. et al. Jagged1 Instructs Macrophage Differentiation in Leprosy. **PLOS Pathog**, v. 12, n. 8, p. e1005808, 2016.

KRUTZIK, S. R. et al. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. **Nat Med**, v. 11, n. 6, p. 653–660, 2005.

KUMAR, S. et al. IL-10 production from dendritic cells is associated with DC SIGN in human leprosy. **Immunobiology**, v. 218, n. 12, p. 1488–1496, 2013.

LIPSCOMB, M. F.; MASTEN, B. J. Dendritic Cells: Immune Regulators in Health and Disease. **Physiol Rev**, v. 82, n. 1, p. 97–130, 2002.

MARTINIUK, F. et al. Lessons of leprosy: the emergence of TH17 cytokines during type II reactions (ENL) is teaching us about T-cell plasticity. **J Drugs Dermatol**, v. 11, n. 5, p. 626-30, 2012.

MERAD, M.; MANZ, M. G. Dendritic cell homeostasis. **Blood**, v. 113, n. 15, p. 3418–3427, 2009.

MIRA, M. T. et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. **Nature**, v. 427, n. 6975, p. 636–640, 2004.

MISRA, N et al. “Cytokine profile of circulating T cells of leprosy patients reflects both indiscriminate and polarized T-helper subsets: T-helper phenotype is stable and uninfluenced by related antigens of *Mycobacterium leprae*.” **Immunology**, v. 86, n. 1, p. 97-103, 1995.

MODLIN, R. L. Th1-Th2 Paradigm: Insights from Leprosy. **J Invest Dermatol**, v. 102, n. 6, p. 828–832, 1994.

MONOT, M. et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. **Nat Genet**, v. 41, n. 12, p. 1282–1289, 2009.

MONTOYA, D.; MODLIN, R. L. Learning from Leprosy. **Adv Immunol**, p. 1–24, 2010.

MOSMANN, T. R. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J Immunol**, v. 136, n. 7, p. 2348–2357, 1986.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 12, p. 958–969, 2008.

MOURA, D. F. et al. Long-term culture of multibacillary leprosy macrophages isolated from skin lesions: a new model to study *Mycobacterium leprae* human cell interaction. **Br J Dermatol**, v. 157, n. 2, p. 273–283, 2007.

MURANSKI, P.; RESTIFO, N. P. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. **Blood**, v. 121, n. 13, p. 2402–2414, 2013.

MURRAY, R. A. et al. *Mycobacterium leprae* Inhibits Dendritic Cell Activation and Maturation. **J Immunol**, v. 178, n. 1, p. 338–344, 2006.

MUTIS, T. et al. Analysis of cytokine production by *Mycobacterium*-reactive T cells. Failure to explain *Mycobacterium leprae*-specific nonresponsiveness of peripheral blood T cells from lepromatous leprosy patients. **J Immunol**, v. 150, n. 10, p. 4641–4651, 1993.

NUNZI, E.; MASSONE, C. (EDS.). **Leprosy**. Milano: Springer Milan, 2012.

PALERMO, M. L. et al. Increased Expression of Regulatory T Cells and Down-Regulatory Molecules in Lepromatous Leprosy. **Am J Trop Med Hyg**, v. 86, n. 5, p. 878–883, 2012.

PLOEMACHER, T. et al. Reservoirs and transmission routes of leprosy; A systematic review. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 14, n. 4, p. e0008276, 2020.

PREVEDELLO, F. C.; MIRA, M. T. Hanseníase: uma doença genética? **An Bras Dermatol**, v. 82, n. 5, p. 451–459, 2007.

PROPOSTA DE ESQUEMA TERAPÊUTICO PARA O TRATAMENTO DA HANSENÍASE MULTIDROGATERAPIA ÚNICA (MDT-U). [s.l: s.n.].

Disponível em:
<http://conitec.gov.br/images/Consultas/2018/Relatorio_EsquemaMultidro gaterapiaUnicaparaHanseniose.pdf>. Acesso em: 13 jan. 2022.

QUARESMA, J. A. S. et al. Apoptotic activity and Treg cells in tissue lesions of patients with leprosy. **Microb Pathog**, v. 76, p. 84–88, 2014.

QUARESMA, J. A. S. Organization of the Skin Immune System and Compartmentalized Immune Responses in Infectious Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 4, 2019.

RAMBUKKANA, A. Molecular basis of the interaction of Mycobacterium leprae with peripheral nerve: implications for therapeutic strategies. **Lepr Rev**, v. 71 Suppl, p. S168-169, 2000.

REIBEL, F.; CAMBAU, E.; AUBRY, A. Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 45, n. 9, p. 383–393, 2015.

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 Neg Trop Dis**, v. 7, n. 7, p. e2338, 2013.

SAINI, C.; RAMESH, V.; NATH, I. Increase in TGF- β Secreting CD4+CD25+ FOXP3+ T Regulatory Cells in Anergic Lepromatous Leprosy Patients. **PLoS Neg Trop Dis**, v. 8, n. 1, p. e2639, 16 jan. 2014.

SCHLESINGER, L. S. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of Mycobacterium tuberculosis is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. **J Immunol**, v. 150, n. 7, p. 2920–2930, 1 abr. 1993.

SEHRAWAT, S.; ROUSE, B. T. Tregs and infections: on the potential value of modifying their function. **J Leukoc Biol**, v. 90, n. 6, p. 1079–1087, 2011.

SELING, P. A.; MODLIN, R. L. Cytokine Patterns at the Site of Mycobacterial Infection. **Immunobiology**, v. 191, n. 4-5, p. 378–387, 1994.

SINGH, P.; COLE, S. T. The Genomics of Leprosy. **Adv Microb Ecol**, p. 39–49, 2012.

SINSIMER, D. et al. *Mycobacterium leprae* Actively Modulates the Cytokine Response in Naïve Human Monocytes. **Infect Immun**, v. 78, n. 1, p. 293–300, 2010.

SOILLEUX, E. et al. DC-SIGN association with the Th2 environment of lepromatous lesions: cause or effect? **J Pathol**, v. 209, n. 2, p. 182–189, 2006.

STEINMAN, R. M.; YOUNG, J. W. Signals arising from antigen-presenting cells. **Curr Opin Immunol**, v. 3, n. 3, p. 361–372, 1991.

STEINMAN, L. A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. **Nat Med**, v. 13, n. 2, p. 139–145, 2007.

TALHARI, C.; TALHARI, S.; PENNA, G. O. Clinical aspects of leprosy. **Clin Dermatol**, v. 33, n. 1, p. 26–37, 2015.

TERHUNE, J.; BERK, E.; CZERNIECKI, B. Dendritic Cell-Induced Th1 and Th17 Cell Differentiation for Cancer Therapy. **Vaccines**, v. 1, n. 4, p. 527–549, 21 nov. 2013.

TRUMAN, R.; FINE, P. E. M. “Environmental” sources of *Mycobacterium leprae*: issues and evidence. **Lepr Rev**, v. 81, n. 2, p. 89–95, 2010.

TRUMAN, R. W. et al. Probable Zoonotic Leprosy in the Southern United States. **N Engl J Med**, v. 364, n. 17, p. 1626–1633, 2011.

VENTURINI, J. et al. In vitro and skin lesion cytokine profile in Brazilian patients with borderline tuberculoid and borderline lepromatous leprosy. **Lepr Rev**, v. 82, n. 1, p. 25–35, 2011.

VERHAGEN, C. E. et al. Type 1- and type 2-like lesional skin-derived *Mycobacterium leprae*-responsive T cell clones are characterized by coexpression of IFN-gamma/TNF-alpha and IL-4/IL-5/IL-13, respectively. **J Immunol**, v. 160, n. 5, p. 2380–2387, 1998.

VOLPE, E. et al. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. **Nat Immunol**, v. 9, n. 6, p. 650–657, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Expert Committee on Leprosy. **World Health Organ Tech Rep Ser**, n. 968, p. 1–61, 1 p following 61, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guide to Eliminate Leprosy as a Public Health Problem. **World Health Organ**, v. 14, p. 5–38, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global leprosy (Hansen disease) update, 2019: time to step-up prevention initiatives. **Wkly Epidemiol Rec.** n. 36, v. 95, p. 417–440, 2020.

YAMAMURA, M. et al. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. **Science**, v. 254, n. 5029, p. 277–279, 1991.

YAMAUCHI, P. S. et al. A Role for CD40-CD40 Ligand Interactions in the Generation of Type 1 Cytokine Responses in Human Leprosy. **J Immunol**, v. 165, n. 3, p. 1506–1512, 2000.

YAWALKAR, S. J. **Leprosy: for medical practitioners and paramedical workers**. In: 8. ed. Editor: Novartis, p-1-152, 2009.

ZENHA et al. Clinical and immunological evaluation after BCG-id vaccine in leprosy patients in a 5-year follow-up study. **Journal of Inflammation Research**, p. 125, 2012.