

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**Avaliação da produção de óxido nítrico, citocinas e expressão de
receptores Toll em leucócitos do sangue periférico de pacientes
com reações hansênicas e formas clínicas da hanseníase**

por

Jairo Campos de Carvalho

**Belo Horizonte
Fevereiro / 2016**

DISSERTAÇÃO MDIP – CPqRR J. C. CARVALHO

2016

Jairo Campos de Carvalho

Avaliação da produção de óxido nítrico, citocinas e expressão de receptores Toll em leucócitos do sangue periférico de pacientes com reações hansênicas e formas clínicas da hanseníase

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientação: Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo
Coorientação: Dr. Olindo de Assis Martins Filho

**Belo Horizonte,
Fevereiro/ 2016**

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

C331a Carvalho, Jairo Campos de.

2016 Avaliação da produção de óxido nítrico, citocinas e expressão de receptores Toll em leucócitos do sangue periférico de pacientes com reações hansênicas e formas clínicas da hanseníase / Jairo Campos de Carvalho. – Belo Horizonte, 2016.

xviii, 76 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 84 - 92

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Hanseníase/imunologia 2. *Mycobacterium leprae* /imunologia 3. Biomarcadores/análise I. Título. II. Araújo, Marcio Sobreira Silva (Orientação). III. Martins Filho, Olindo Assis (Coorientação).

CDD – 22. ed. – 616.998



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Ata da centésima nonagésima primeira defesa de dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, do aluno Jairo Campos de Carvalho sob a orientação do Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo.

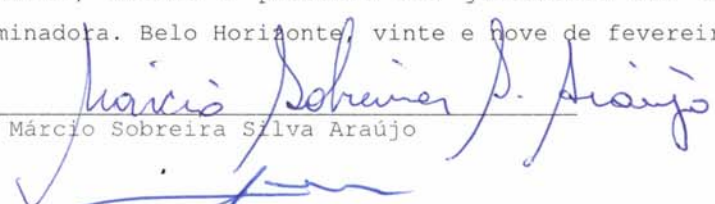
Aos vinte e nove dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e dezesseis, às quatorze horas, realizou-se no Auditório do Centro de Pesquisas René Rachou, o exame da centésima nonagésima primeira defesa de dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular. A dissertação do aluno Jairo Campos de Carvalho intitula-se "Avaliação da produção de óxido nítrico, citocinas e expressão de receptores Toll em leucócitos do sangue periférico de pacientes com reações hansênicas e formas clínicas da Hanseníase". A banca examinadora foi constituída pelos professores: Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo - CPqRR/FIOCRUZ (Orientador/Presidente), Dr. Marcelo Antonio Pascoal Xavier - CPqRR/FIOCRUZ (Titular) e Dra. Rachel Basques Caligiorne - Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte (Titular). Após exposição, o candidato foi arguido oralmente pelos membros da banca tendo como resultado:

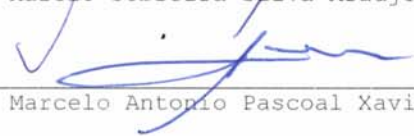
☒ APROVADO

☐ APROVADO CONDICIONALMENTE: Quando o trabalho final necessitar de elaboração adicional ou revisões parciais.

☐ NÃO APROVADO

Uma vez encerrado o exame, eu, Márcio Sobreira Silva Araújo, presidente da banca, assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora. Belo Horizonte, vinte e nove de fevereiro de 2016.


Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo


Dr. Marcelo Antonio Pascoal Xavier


Dra. Rachel Basques Caligiorne

Dedico este trabalho a minha esposa Luciana e ao meu filho Bernardo.

AGRADECIMENTOS

À Deus ao ouvir minhas orações me permitiu a perseverança, paciência e saúde para a concretização deste projeto.

À Lu e ao Bernardo por ter compreendido os momentos de ausência com a certeza de que tudo foi feito com o pensamento neles.

Ao meu mais que orientador, amigo Márcio Sobreira, obrigado pela amizade, incentivo, apoio e ensinamentos.

Ao Dr. Olindo Assis Martins Filho, co-orientador, por permitir participar do Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores (GIPB) do Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ.

Ao Dr. Marcelo Grossi e à equipe de residentes do Ambulatório de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, pela seleção dos pacientes, muito obrigado.

Ao aluno de iniciação científica, Claudio Caetano Álvares, pela paciência e constante contribuição em momentos importantes do trabalho.

A Dra. Jordana Reys, pela ajuda nas análises do trabalho.

À Dra. Andrea Teixeira, à Dra. Carolina Campi, à Dra. Vanessa Peruhype, pelas importantes sugestões ao longo do desenvolvimento do projeto.

Aos colegas estudantes do GIPB pelas agradáveis convivências.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou e à sua Diretora, Dra. Zélia Profeta Luz.

Ao Programa de Pós Graduação, nas pessoas do Dr. Edelberto e as secretárias Andréa e Patrícia pelo constante apoio dado durante o curso.

À toda equipe de Plataforma de Citometria do Centro de Pesquisas René Rachou, Bruna, Lorena e Tiza, pelo suporte dado durante as análises das amostras.

À equipe de apoio Técnico do Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores, Bruna, Heloísa, Rayane e Thaís, vocês foram muito importantes no decorrer dos experimentos, muito obrigado.

À direção da Casa de Saúde Santo Izabel - FHEMIG nas pessoas do Dr. Getúlio, Dr. Ricardo Shiguero, Maira e Valdirene, obrigado pelo incentivo e apoio.

Ao Núcleo de Ensino e Pesquisa da Casa de Saúde Santa Izabel pelo apoio.

À Gerência de Ensino e Pesquisa da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais, obrigado pelo apoio.

Aos colegas de Pós Graduação, em especial à Jessica e o Vitor.

Ao Programa de Capacitação de Recursos Humanos da Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Minas Gerais, pelo apoio financeiro.

*"O correr da vida embrulha tudo.
A vida é assim: esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem"*

Guimarães Rosa

Resumo

O objetivo deste estudo foi identificar biomarcadores associados com as distintas formas/manifestações da hanseníase. Características fenotípicas (TLR2; TLR4; HLA-DR) e funcionais (NO-DAF-2T; IL-8;TNF- α ; IL-4; IL-10;TGF- β) da imunidade inata (Neutrófilos-NEU; Monócitos-MON) e adaptativa (CD4⁺; CD8⁺T-cells) foram avaliadas *ex vivo* e sob estímulo de *M. leprae in vitro* (*). A população do estudo incluiu indivíduos com as forma Tuberculóide (DD/DT/T); Virchowiano (DV/V); reação hansênica Tipo-1; reação hansênica Tipo-2 e indivíduos saudáveis controle (NI). A análise dos dados demonstrou que independente da forma clínica, pacientes com hanseníase apresentaram baixo NEU TLR4⁺ e MON TGF- β ⁺, enquanto DV/V apresentou alto MON HLA-DR⁺. Ambos DD/DT/T e DV/V apresentou aumento de CD4⁺IL-10⁺, mas não somente DV/V apresentou aumento de CD8⁺TLR2⁺ e IL-10. Pacientes com reação Tipo-1 exibiram, no geral, uma baixa na regulação de TLR na imunidade inata e adaptativa (NEU: MON TLR2⁺ e NEU: CD4⁺TLR4⁺). Foi observada uma alta regulação de CD4⁺: CD8⁺IL-10⁺ nos indivíduos com reação hansênica, mas somente pacientes com reação do Tipo-2 mostrou aumento em MON IL-10⁺. Assinaturas de biomarcadores específicos para *M. leprae* (*) revelaram uma expansão das características fenotípicas e funcionais nos pacientes com hanseníase com aumento de *MON NO-DAF-2T⁺ em DD/DT/T e alta regulação de *NEU TLR2⁺ e *CD8⁺IL-10⁺ em DV/V. Foi evidenciado diminuição na expressão dos principais biomarcadores dos pacientes com reação hansênica particularmente na imunidade adaptativa. Um resumo dos dados trabalhados indicou que MON IL-10⁺ e *NEU TLR4⁺ podem ser considerados como biomarcadores universais da hanseníase juntamente com MON TGF- β ⁺; *MON TNF- α ⁺; *CD4⁺TGF- β ⁺; *CD8⁺TLR2⁺; *CD8⁺TNF- α ⁺; *CD8⁺IL-4⁺; *CD8⁺TGF- β ⁺ como um ensaio clínico relacionado com as características da hanseníase e *CD4⁺ como biomarcadores de reação hansênica. MON HLA-DR⁺; *CD8⁺IL-10⁺ foram biomarcadores polo seletivo para DV/V, NEU TLR2⁺; NEU TLR4⁺; CD4⁺TLR4⁺; *NEU NO-DAF-2T⁺; *MON

TLR2⁺; *MON HLA-DR⁺; *CD4⁺TLR2⁺; *CD4⁺TLR4⁺; *CD8⁺ para reação hansênica Tipo-1 e MONIL-10⁺; *CD8⁺IL-8⁺ para Tipo-2. Em conclusão, este estudo mostrou a existência de diferenças em marcadores imunológicos entre as formas/manifestações da hanseníase que poderão ser futuramente aplicados como biomarcadores para estudos clínicos.

Palavras-Chave: Hanseníase, Reação Hansênica, Resposta Imune

Abstract

The aim of this study was to identify biomarkers associated with distinct clinical forms/manifestations of leprosy. Phenotypic (TLR2;TLR4;HLA-DR) and functional features (NO-DAF-2T;IL-8;TNF- α ;IL-4;IL-10;TGF- β) of innate (Neutrophils-NEU;Monocytes-MON) and adaptive (CD4+;CD8+T-cells) immunity were evaluated at ex vivo and upon *M. leprae* stimuli in vitro (*). Study population included tuberculoid-(BB/BT/T); lepromatous-(BL/L); Type-1; Type-2 and healthy controls-(NI). Data analysis demonstrated that regardless of clinical forms, leprosy patients presented lower NEUTLR4+ and MONTGF- β +, while BL/L displayed higher MONHLA-DR+. Both BB/BT/T and BL/L showed enhanced CD4+IL-10+, but only BL/L presented increased CD8+TLR2+ and IL-10. Type-1 patients displayed an overall downregulation of TLR in innate/adaptive immunity (NEU:MONTLR2+ and NEU:CD4+TLR4+). An overall upregulation of CD4+:CD8+IL-10+ was observed in leprosy reactions, but only Type-2 patients displayed enhanced MONIL-10+. *M. leprae*-specific (*) biomarker signatures revealed an expansion of phenotypic and functional features in leprosy patients with enhanced *MONNO-DAF-2T+ in BB/BT/T and upregulation of *NEUTLR2+ and *CD8+IL-10+ in BL/L. Evident was the shrinkage of most biomarkers in leprosy reaction patients particularly in the adaptive immunity. A summary of data mining indicated MONIL-10+ and *NEUTLR4+ as universal leprosy biomarkers along with MONTGF- β +;*MONTNF- α +;*CD4+TGF- β +;*CD8+TLR2+;*CD8+TNF- α +;*CD8+IL-4+;*CD8+TGF- β + as clinical-related leprosy features and *CD4+ as leprosy reaction biomarker. MONHLA-DR+;*CD8+IL-10+ were pole-selective biomarkers for BL/L, NEUTLR2+;NEUTLR4+;CD4+TLR4+;*NEUNO-DAF-2T+;*MONTLR2+;*MONHLA-DR+;*CD4+TLR2+;*CD4+TLR4+; *CD8+ for Type-1 and MONIL-10+;*CD8+IL-8+ for Type-2. In conclusion, this study provided insights into the immunological features of leprosy forms/manifestations applicable as novel biomarkers for clinical studies.

Key-words: Leprosy, Leprosy Reactions, Immune Response

Lista de Figuras

Figura 1 - Distribuição da hanseníase no Mundo.....	21
Figura 2 - Mapa do Brasil representando os 10 primeiros clusters, áreas de alta detecção de hanseníase, identificados por meio de coeficiente de detecção de casos novos no período de 2011 a 2013.....	22
Figura 3 - Esquema representativo da classificação da hanseníase segundo Ridley e Jopling (1966).....	24
Figura 4 - Monofilamentos de Semmes-Weinstein	26
Figura 5 - Resumo Ilustrativo da Ativação do Sistema Imune inato e adaptativo pelo <i>M. leprae</i>	32
Figura 6 - Síntese do óxido nítrico a partir da L-arginina.....	34
Figura 7 - Sequência de procedimentos utilizados para avaliar a produção de óxido nítrico em monócitos e neutrófilos do sangue periférico.....	45
Figura 8 - Sequência de procedimentos utilizados para quantificar a intensidade média de fluorescência da expressão de HLA-DR em monócitos.....	46
Figura 9 - Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de monócitos citocina+, após o ensaio de imunofenotipagem.....	47
Figura 10 - Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de linfócios citocina positiva, após o ensaio de imunofenotipagem..	48
Figura 11 - Sequência de procedimentos utilizados para quantificar a intensidade média da expressão receptores do tipo Toll (TLR2 e TLR4) em monócitos.....	49
Figura 12 - Sequência de procedimentos utilizados para quantificar a intensidade média da expressão de receptores do tipo Toll em linfócitos.....	50
Figura 13 - Expressão de moléculas TRL2, TLR4, HLA-DR, Óxido Nítrico (DAF-2T) em Neutrófilos de Monócitos e as citocinas IL-8, TNF- α , IL-4, IL-10 e TGF- β em Monócitos do sangue periférico de pacientes com diferentes formas clínicas da Hanseníase.	54
Figura 14 - Expressão de moléculas TRL2, TLR4 e citocinas IL-8, TNF- α , IL-4, IL-10 e TGF- β em Linfócitos T CD4+ e T CD8+ com diferentes formas clínicas da Hanseníase.	56

Figura 15 - Expressão de moléculas TLR2, TLR4, HLA-DR, Óxido Nítrico (DAF-2T) em Neutrófilos e Monócitos e citocinas IL-8, TNF- α , IL-4, IL-10 e TGF- β em Monócitos do sangue periférico de pacientes com diferentes formas clínicas da hanseníase e reações hansênicas.....	59
Figura 16 - Expressão de moléculas TLR2, TLR4, HLA-DR, Óxido Nítrico (DAF-2T) e citocinas IL-8, TNF- α , IL-4, IL-10 e TGF- β em Linfócitos T CD4+ e T CD8+ do sangue periférico de pacientes com diferentes formas clínicas da hanseníase e reações hansênicas.....	61
Figura 17 - Perfil de biomarcadores da imunidade inata e adaptativa de leucócitos do sangue periférico de indivíduos com as formas clínicas da Hanseníase e pacientes com reação hansênica após estímulo in vitro com bacilo <i>Mycobacterium leprae</i>	64
Figura 18 - Sumário das alterações fenotípicas e funcionais observados em células da imunidade inata e adaptativa dos pacientes com hanseníase e reações hansênicas.....	66

Lista de Quadros

Quadro 1: Painel de anticorpos monoclonais utilizados para marcação das citocinas intracelulares e dos receptores do tipo Toll (TLR) e em linfócitos e monócitos.....	43
--	----

Lista de Abreviaturas

ANOVA - Análise de variância

AraLAM - Arabinose-lipoarabinomanana

BFA - Brefeldina A

BSA - Albumina sérica bovina

DAF-2 - 4,5-diaminofluoresceína

DAF-2DA - diacetato de 4,5-diaminofluoresceína

DAF-2T - Triazolofluoresceína

DD - Dimorfo-dimorfo

DT - Dimorfo-tuberculóide

DV - Dimorfo-virchowiano

EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid

FSC - Forward scatter

HLA-DR - Human Leukocyte Antigen - antigen D Related

IB - Índice Baciloscópio

IMF - Intensidade média de fluorescência

INOS - Inducible nitric oxide synthase

LAM - Manose-lipoarabinomanana

LPS - lipopolissacaride

MB - Multibacilares

MCP-1 - Monocyte chemoattractant protein-1

MCP-1 - Roteína-1 quimioatrativo de monócito

MFF - Max Facs Fix

MIP-1 - Macrophage inflammatory protein

NADPH - Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-hidrogênio

NO - Nitric Oxide

NO - Óxido Nítrico

NOS - Nitric Oxide sintase

O₂ - Oxigênio

OMS - Organização Mundial de Saúde

PAMPs - Pathogen-associated molecular pattern

PB - Paucibacilares

PBS - Tampão fosfato-salino / phosphate buffered saline

PGL-1 - Glicolípido fenólico-1

PI3K - Fosfatidil-inositol 3-quinase

PQT - Poliquimioterapia

PRRs - Pattern recognition receptors

ROS - Reativo de oxigênio

RR - Reação reversa

SSC - Side Scatter

T - Tuberculóide

TGF- β - Transforming growth factor beta

Thf - Células T auxiliares foliculares

TLR - Toll-like receptor

TNF- α - Tumor necrosis factor alpha

V - Virchowiano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Aspectos epidemiológicos da Hanseníase	21
1.2 Classificações clínicas da hanseníase	23
1.3 Diagnóstico da hanseníase	25
1.4 Tratamento da hanseníase.....	27
1.5 Reações hansênicas	28
1.6 Aspectos imunológicos da hanseníase	29
1.6.1 Papel dos monócitos na hanseníase	33
1.6.2 O óxido nítrico na hanseníase.....	34
2 OBJETIVOS	37
2.1. Objetivo geral	37
2.2. Objetivos específicos	37
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Grupos de estudo	39
3.2 Coleta das amostras	39
3.3 Avaliação dos parâmetros hematológicos	40
3.4 Bacilo do <i>Mycobacterium leprae</i> - Antígeno de Mitsuda	40
3.5 Avaliação da expressão de óxido nítrico intracelular em neutrófilos e monócitos do sangue periférico, após estimulação <i>in vitro</i> com o Bacilo do <i>M. leprae</i>	40
3.6 Avaliação do perfil de expressão de citocinas intracelulares e receptores do tipo Toll (TLR) em monócitos e linfócitos	41
3.7 Obtenção e análise de dados por citometria de fluxo.....	43
3.7.1 Aquisição e análise dos níveis de óxido nítrico intracelular em monócitos e neutrófilos do sangue periférico por citometria de fluxo.....	44
3.7.2 Aquisição e análise <i>ex vivo</i> do perfil de expressão de HLA-DR, em monócitos do sangue periférico por citometria de fluxo	46

3.7.3 Aquisição e análise do perfil de expressão de citocinas intracelulares em monócitos e linfócitos do sangue periférico	47
3.7.4 Aquisição e análise <i>ex vivo</i> do perfil de expressão dos marcadores TLR2 e TLR4 em monócitos, neutrófilos e linfócitos do sangue periférico por citometria de fluxo	49
3.8 Análise estatística dos dados	51
3.9 Diagrama de Venn	51
4. RESULTADOS	53
4.1 Expressão de moléculas TLR2, TLR4, HLA-DR, óxido nítrico (DAF-2T) em neutrófilos e monócitos e as citocinas IL-8, TNF- α , IL-4, IL-10 e TGF- β em monócitos do sangue periférico de pacientes com diferentes formas clínicas da hanseníase.....	53
4.2 Expressão de moléculas TLR2, TLR4 e citocinas IL-8, TNF- α , IL-4, IL-10 e TGF- β em linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ de pacientes com diferentes formas clínicas da Hanseníase.	55
4.3 Expressão de moléculas TLR2, TLR4, HLA-DR, óxido nítrico (DAF-2T) em neutrófilos e monócitos e citocinas IL-8, TNF- α , IL-4, IL-10 e TGF- β em monócitos do sangue periférico considerando as apresentações clínicas da hanseníase e as reações hansênicas.	57
4.4 Expressão de moléculas TLR2, TLR4, HLA-DR, óxido nítrico (DAF-2T) e citocinas IL-8, TNF- α , IL-4, IL-10 e TGF- β em linfócitos do sangue periférico considerando as apresentações clínicas da hanseníase e as reações hansênicas.	60
4.5 Perfil de biomarcadores da imunidade inata e adaptativa de leucócitos do sangue periférico de indivíduos com as formas clínicas da hanseníase e pacientes com reação hansênica após estímulo com bacilo <i>Mycobacterium leprae</i>	62
4.6 Resumo das alterações fenotípicas e funcionais observados em células da imunidade inata e adaptativa dos pacientes com hanseníase e reações hansênicas.	65
5 DISCUSSÃO	68
6 CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
Anexo 1	93

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica granulomatosa, de evolução insidiosa, causada pelo *Mycobacterium leprae*, um bacilo álcool-ácido resistente, intracelular obrigatório, que infecta principalmente macrófagos da derme e as células de Schwann dos nervos periféricos. A transmissão ocorre pelas vias aéreas superiores, de pessoa a pessoa, através do convívio de um indivíduo bacilífero positivo, não tratado, com um indivíduo susceptível. O bacilo, então, tem acesso à corrente sangüínea e atinge a pele e os nervos periféricos (Goulart *et al.*, 2002; Mendonça *et al.*, 2008). A doença tem um período de incubação de dois a sete anos e se manifesta por lesões de pele com alteração de sensibilidade e espessamento de nervos periféricos principalmente nos membros e que pode levar a sérias incapacidades físicas (Ministério da Saúde, 2010).

Tomando-se como referência as diretrizes do Ministério da Saúde para vigilância, atenção e controle da hanseníase é de fundamental importância o diagnóstico da hanseníase nas fases iniciais de sua evolução, para que o tratamento seja iniciado no momento oportuno, visando a evitar complicações clínicas (Ministério da Saúde, 2010).

O diagnóstico é essencialmente clínico e epidemiológico, ou seja, associa-se o exame dermatoneurológico, para identificar lesões ou áreas de pele com alteração de sensibilidade e comprometimento de nervos periféricos (sensitivo, motor e/ou autonômico) a uma análise da história das condições de vida do paciente. O diagnóstico laboratorial é auxiliar ao clínico e consiste na realização da biopsia da lesão podendo este estar presente o bacilo (Ministério da Saúde, 2010).

Embora existam na literatura inúmeros trabalhos que avaliam diferentes aspectos da resposta imune em pacientes acometidos pela hanseníase, ainda necessita ser esclarecidos os mecanismos imunológicos envolvidos nos episódios reacionais desta doença, buscando elucidar os eventos que poderiam influenciar na estabilização, ou até mesmo a regressão de um quadro de evolução da doença. Desta forma, esperamos que os resultados obtidos possam contribuir para o conhecimento de mecanismos imunológicos e o perfil

diferenciado da resposta imune desenvolvidos por pacientes com história clínica de hanseníase que apresentam episódios reacionais. Além disto, acreditamos que o estabelecimento de biomarcadores que possam ser empregados no diagnóstico, prognóstico da hanseníase e das reações hansênicas poderá ser importante para o desenvolvimento de medidas de detecção precoce da hanseníase.

1.1 Aspectos epidemiológicos da Hanseníase

As condições socioeconômicas são fatores determinantes para a doença. As precárias condições sanitárias, a privação de uma nutrição adequada e a situação de saúde que pode inclusive afetar o sistema imunológico são fatores de risco para a doença (Bhat & Prakash, 2012).

A hanseníase permanece ainda como um importante problema de saúde pública em algumas partes do mundo. Países do sudeste asiático, África e Américas, diagnosticam milhares de casos novos de hanseníase todos os anos (figura 1). A Índia é o país com o maior número de doentes, no ano de 2014 houveram 125.785 casos novos, seguido pelo o Brasil com 31.064 casos (WHO, 2015).

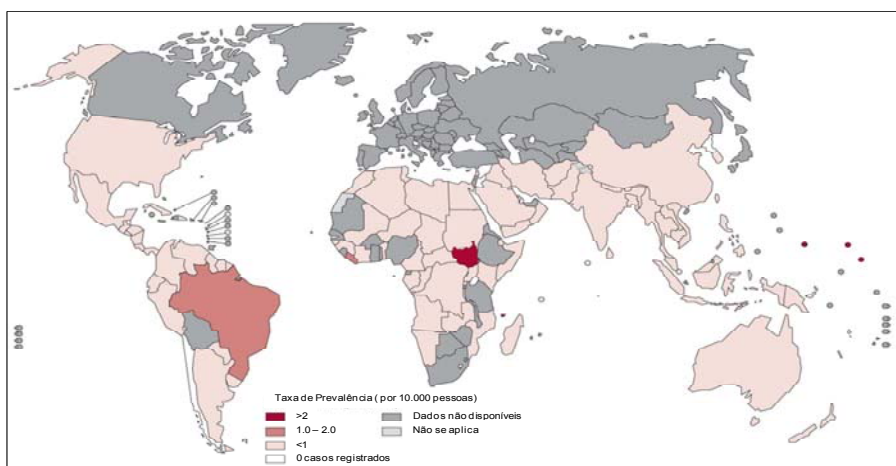


Figura 1 - Distribuição da hanseníase no Mundo (Fonte: Organização Mundial da Saúde)
Disponível no site http://www.who.int/lep/situation/Leprosy_PR_2011.pdf?ua=1 acessado em 08/02/2016

Em todas as regiões do Brasil possuem registros da ocorrência da hanseníase, mas as regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste são as mais endêmicas. Com o propósito de compreender o comportamento epidemiológico no país, Penna *et al.* (2009), realizou um estudo de espacialização com definição de áreas de maior risco para a ocorrência de casos de hanseníase. Estas áreas foram denominadas como "*clusters*" (figura 2).

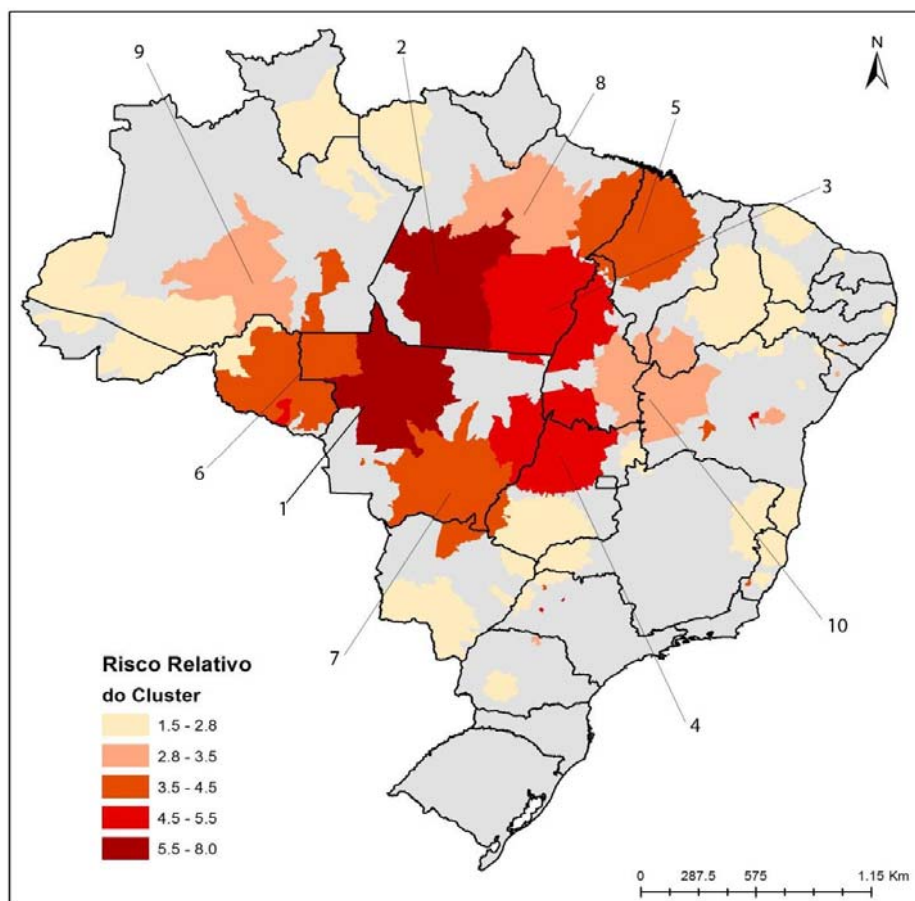


Figura 2 - Mapa do Brasil representando os 10 primeiros clusters, áreas de alta detecção de hanseníase, identificados por meio de coeficiente de detecção de casos novos no período de 2011 a 2013 (Fonte: MS/SVS/CGHDE-Sinan)

A identificação destes aglomerados permite determinar espaços geograficamente contínuos e de maior efetividade epidemiológica. Além disto, possibilita concentrar os esforços de atenção a programas de controle para áreas com maior transmissão e evita que áreas sejam ignoradas, por serem falsamente consideradas silenciosas, devido a um baixo esforço na detecção dos casos, ou que se priorize municípios com muitos casos devido ao tamanho

de sua população e não devido ao maior risco (Ministério da Saúde, 2008). Os dez prováveis "clusters" incluem atualmente 621 municípios, localizados nos estados do Mato Grosso, Pará, Maranhão, Tocantins, Goiás, Rondônia e Bahia, o que representa apenas 14% da população do país, mas que correspondeu a 44% dos casos novos detectados de hanseníase no período de 2011 a 2013.

O tratamento e a detecção precoce dos casos são apontados como as principais estratégias para a redução da carga e da incidência da hanseníase. O monitoramento da doença em menores de 15 anos, aumento na amplitude de descentralização dos programas, a vigilância dos contatos intradomiciliares e a avaliação do grau de incapacidade dos casos novos são metas prioritárias para o controle da doença (Ministério da Saúde, 2014)

1.2 Classificações clínicas da hanseníase

Os aspectos clínicos da hanseníase estão diretamente ligados à resposta imune do hospedeiro a antígenos do *M. leprae* (Modlin, 2010). O padrão da resposta imune desenvolvido pelo indivíduo é o que permite resistir a doença ou desenvolver suas diferentes formas clínicas. Considera-se como caso suspeito de hanseníase um indivíduo com lesão de pele e esta apresenta alteração de sensibilidade (Degang *et al.*, 2014).

Ao longo da sua história, a hanseníase tem adquirido diversas classificações. A Organização Mundial de Saúde, no ano de 1988, propôs uma classificação que visa a operacionalização para fins de tratamento e divide a hanseníase em duas formas: 1) Indivíduos paucibacilares (PB) para aqueles que apresentam até cinco lesões e 2) indivíduos multibacilares (MB) com mais de cinco lesões e/ou baciloscopia positiva (Ministério da Saúde, 2010). Outra forma de classificar a hanseníase é proposta por Ridley e Jopling (1966) (figura 3). A mais utilizada para fins de pesquisa, por apresentar estreita correlação entre as manifestações clínico-patológicas e o estado da resposta imunológica dos doentes, é adaptada a partir da classificação de Madri (1953). Segundo eles, a maioria das pessoas não adoecem com o contato do bacilo *M. leprae*.

Entre os pacientes que manifestam a doença, a forma inicial é denominada hanseníase indeterminada. Na vigência de uma resposta imunológica celular competente, caracterizado também pela produção de citocinas pró-inflamatórias que poderão participar da liquidez do bacilo, a forma indeterminada pode evoluir para a forma tuberculóide. No predomínio de uma resposta humoral, com uma resposta imune é caracterizada por citocinas imunossupressivas, os indivíduos podem adquirir a forma virchowiano da doença, fazendo ser, muitas vezes, uma resposta problemática para o paciente. Entre estes grupos, é subdividido três grupos intermediários imunologicamente instáveis dimorfo-tuberculóide (DT), dimorfo-dimorfo (DD), dimorfo-virchowiano (DV) (Ridley e Jopling, 1966).

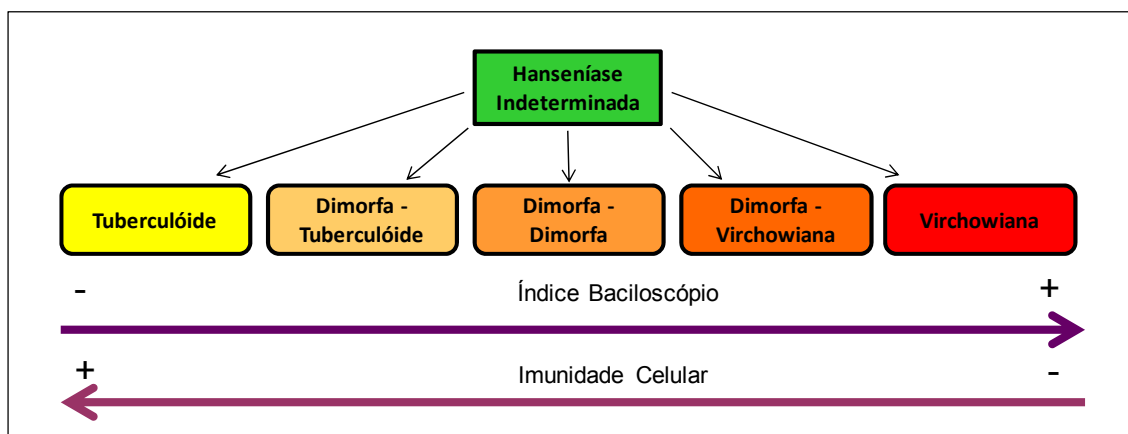


Figura 3 - Esquema representativo da classificação da hanseníase segundo Ridley e Jopling (1966) modificada.

A hanseníase indeterminada caracteriza-se por ser a forma mais precoce da doença. As lesões encontradas estão em pequeno número, em forma de máculas hipocrômicas com alteração na sensibilidade térmica, na sudorese e há perda de pêlos. Não há comprometimento de nervos periféricos e deformidades. Pode evoluir para a cura em 75% dos casos, ou para as outras formas da doença. A baciloscopia dérmica é geralmente negativa (Goulart *et al.*, 2002; Araújo, 2003).

Os pacientes que apresentam a hanseníase tuberculóide apresentam lesões que tendem a ser bem delimitadas, em número reduzido. São fracamente anestésicas e com distribuição assimétrica. As lesões estão sob a

forma de placas ou lesões anulares, com bordas papulosas da cor da pele, eritematosas ou hipocrômicas. Pacientes podem apresentar alteração de sensibilidade e lesões dermatológicas de difícil diagnóstico. Ao exame clínico nota-se alteração de sensibilidade nas lesões mais antigas. É comum a perda de pelos e a sudorese pode estar diminuída ou ausente (Araújo, 2003; Lockwood *et al.*, 2011; Degang *et al.*, 2014).

A forma clínica virchowiana da hanseníase caracteriza-se por infiltrações progressivas e difusas da pele, nas mucosas das vias aéreas superiores, nos olhos, nos testículos, nos nervos e há também comprometimento de outros órgãos como, fígado, baço e linfonodos. Há rarefação dos cílios e supercílios. O acometimento de nervos periféricos é lento, simétrico e progressivo e os pacientes não tratados sofrerão deficiências funcionais e sequelas tardias. A baciloscopia é fortemente positiva (Araújo, 2003; Lockwood *et al.*, 2007; Degang *et al.*, 2014).

Pacientes com hanseníase dimorfa caracteriza-se por grandes variações das manifestações clínicas na pele, nervos ou sistêmico. As lesões são numerosas e a morfologia destas mesclam aspectos das formas tuberculóide e virchowiana. É importante destacar que as bordas da lesão que se mostram internamente bem definidas, mas externamente são esmaecidas, caracterizando a ineficácia do sistema imune em conter a disseminação bacilar e o avanço da doença. A baciloscopia pode ser negativa ou positiva (Goulart *et al.*, 2002; Araújo, 2003; Lockwood *et al.*, 2007)

1.3 Diagnóstico da hanseníase

O diagnóstico da hanseníase é essencialmente clínico e epidemiológico. Associado ao exame dermatoneurológico, para identificar as lesões ou áreas da pele com alterações de sensibilidade e/ ou comprometimento de nervos, a análise da história e das condições de vida do paciente são levados também em consideração. A doença pode se manifestar por manchas hipocrômicas ou eritematosas, infiltradas e com perda de sensibilidade ao calor, frio, dor ou tato (Araújo, 2003).

Vários exames clínicos podem ser realizados para o diagnóstico da hanseníase. O teste de sensibilidade térmica, por exemplo, consiste em tocar sob a pele do paciente, com olhos vendados e após as instruções, tubos contendo água fria (em torno de 25°C) ou quente (37-45°C). Um algodão embebido de éter ou álcool e outro seco surte o mesmo resultado. A sensibilidade dolorosa pode ser testada utilizando uma agulha de seringa, por exemplo. O paciente também com os olhos vendados e após as orientações, deverá identificar se o que está tocando a sua pele é a ponta da agulha (sensação de dor) ou a base da agulha (Lyon & Grossi In: Alves *et al.*, 2014).

Os monofilamentos de Semmes-Weinstein (figura 4) podem ser usados no campo, nas unidades básicas de saúde e nos centros de referência. Seu emprego é realizado como um teste de sensibilidade tátil e consiste no emprego de monofilamento, de diferentes calibres. É realizado sobre a pele do paciente três toques, até se obter uma curvatura sem que haja um deslize sobre a pele. O primeiro filamento a ser usado deverá ser o mais fino e à medida que o paciente não sente o estímulo, o examinador deverá trocar por outro de maior calibre (Ministério da Saúde, 2010).

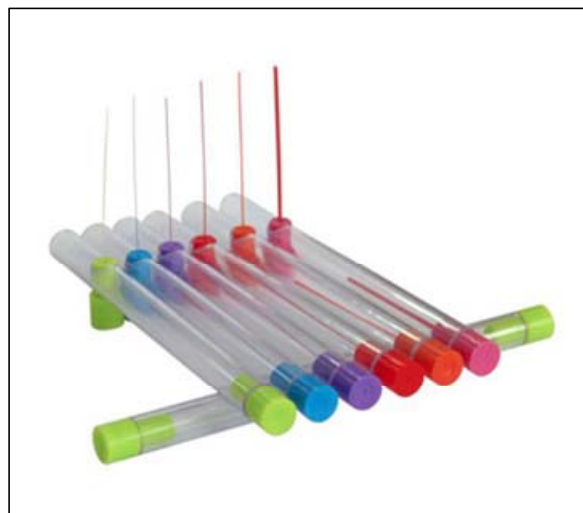


Figura 4 - Monofilamentos de Semmes-Weinstein

Sabe-se que as lesões provocadas pelo *M. leprae* pode alterar a sudorese devido ao comprometimento nervoso. A prova da pilocarpina consiste no pincelamento de tintura de iodo sobre a pele do paciente seguido da injeção

intradérmica de 0,1 a 0,2mL de pilocarpina (0,5% ou 1%) e consecutivamente polvilha-se amido. A sudorese produzirá uma cor azulada indicando a área que não foi afetada pelo bacilo (Lyon & Grossi In: Alves *et al.*, 2014).

A baciloscopia é um exame laboratorial, complementar ao clínico, muito útil para o diagnóstico da hanseníase. Consiste na realização um esfregaço proveniente do raspado dérmico de lesões cutâneas, lóbulos auriculares ou cotovelos do paciente. A lamina produzida é corada pelo método de Ziehl-Neelsen. O método tem uma especificidade de 100% porém uma baixa sensibilidade que varia entre 10-50%. O índice baciloscópico (IB) é determinado a partir da soma dos índices encontrados em cada local da coleta dividido pelo número de locais da coleta (Talhari *et al.*In: Talhari *et al.*, 2015).

Outro teste que pode ser empregado no diagnóstico da hanseníase é o teste de Mitsuda, ele avalia a integridade da imunidade celular de um indivíduo ao *M. leprae*. O método consiste na injeção intradérmica de 0,1mL do antígeno integral do Mitsuda-Hayashi na pele sadia da face anterior do antebraço. Será formado no local uma pápula de aproximadamente 1cm no momento da inoculação. A leitura é realizada após 28 dias e os resultados são expressos de acordo com a dimensão da lesão papulosa ou papulonecrótica que se forma. A ausência da reação o resultado é zero, lesões de 1 a 4 milímetros o resultado é duvidoso e acima de 5 milímetros o resultado é positivo. Este teste é recomendado para auxiliar na classificação do paciente com hanseníase neural pura e quando houver dúvida em relação ao diagnóstico, a classificação clínica, os resultados sorológicos e histológicos (Lyon & Grossi In: Alves *et al.*, 2014; (Talhari *et al.*In: Talhari *et al.*, 2015));

1.4 Tratamento da hanseníase

Segundo a Portaria 3.125 de 7 de outubro de 2010 do Ministério da Saúde, os pacientes com hanseníase, independentes de sua forma clínica, devem ser tratados em regime ambulatorial, nas unidades básicas de saúde. Em caso de intercorrências clínicas e ou cirúrgicas, ocasionadas ou não pela hanseníase, o paciente deverá ser atendido em serviço especializado

ambulatorial ou hospitalar dentro de uma rede de atenção integral. O tratamento consiste na administração de uma associação de medicamentos denominados de poliquimioterapia (PQT/OMS). Estes medicamentos são capazes de matar o bacilo e evitar as incapacidades e as deformidades por elas causadas, levando à cura. A PQT/OMS é fornecida em cartelas individuais, para adulto ou infantil, e contêm a dose mensal supervisionada e as doses diárias autoadministradas. Pacientes PB têm alta por cura após seis doses mensais supervisionadas de rifampicina e doses diárias autoadministradas de dapsona, em até 9 meses. Pacientes MB fazem uso durante doze doses mensais supervisionadas de rifampicina, clofazimina e dapsona e doses diárias autoadministradas de clofazimina e dapsona em até 18 meses. Efeitos diversos a estes medicamentos podem ocorrer e por isto os pacientes devem estar bem orientados quanto à sua possibilidade (Ministério da Saúde, 2010).

1.5 Reações hansênicas

Pacientes com hanseníase podem apresentar reações hansênicas, que são caracterizados por episódios inflamatórios que se intercalam no curso crônico da hanseníase. Estes episódios podem anteceder o diagnóstico ou ocorrer durante o tratamento e até mesmo após a alta. São considerados a principal causa de morbidade e incapacidade da função do nervo periférico. Os tipos mais importantes são a reação reversa (RR) ou reação tipo 1 e o eritema nodoso hansênico ou reação tipo 2. (Goulart *et al.*, 2002).

A reação do tipo 1 ocorre em pacientes na forma dimorfa e tende a surgir durante o tratamento. É uma característica marcante a resposta imune mediada por células contra antígenos de *M. leprae*. Clinicamente, há exacerbação das lesões pré-existentes, que se tornam edemaciadas e eritematosas, podendo chegar a ulceração. As neurites são frequentes, e o dano funcional do nervo pode se instalar sem quadro de dor e espessamento (Araújo, 2003).

A reação do tipo 2 ocorre, no geral, após seis meses de tratamento entre os pacientes que possuem as formas dimorfas e virchowianas. A deposição de imunocomplexos é uma característica marcante, também com aumento de TNF- α e INF- γ . Na pele, a lesão típica é o eritema nodoso que se caracteriza por lesões eritematosas, dolorosas, de tamanhos variados, incluindo pápulas e nódulos em qualquer parte do corpo. Pode evoluir levando a neurite, orquite, epididimite, irite, iridociclite, artrite, mão e pé reacionais, linfadenite, proteinúria e dano hepático (Araújo, 2003).

1.6 Aspectos imunológicos da hanseníase

As variações clínicas que os indivíduos com hanseníase apresentam estão intimamente ligadas ao tipo de resposta imune que este desenvolve no decorrer de sua infecção (Mendonça *et al.*, 2008). O sistema imune inato é a primeira linha de defesa contra patógenos microbianos e é capaz de reconhecer padrões associados aos patógenos (PAMPs) como os ácidos nucléicos, proteínas específicas dos microrganismos lipídios e carboidratos complexos que não são encontrados em mamíferos (Modlin, 2010).

As células do sistema imune inato apresentam em suas membranas receptores de reconhecimento padrões ("*pattern recognition receptors*" ou PRRs) que são capazes de identificar os padrões antigênicos moleculares associados aos patógenos ("*pathogens-associated molecular patterns*" ou PAMPs). Entre os PRRs encontram-se os receptores do tipo Toll (Toll-like receptors - TLR) que são capazes de reconhecer um grande número de microrganismos e levar a ativação de diversas vias de sinalização que induzem a expressão de genes, regulados por NF- κ B, cujos produtos são importantes para o desenvolvimento de respostas inflamatórias com produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas co-estimulatórias requeridas pela ativação das células T (Krutzik *et al.*, 2003; Hart & Tapping, 2012).

O bacilo *M. leprae* e outras espécies de micobactérias são ricos em agonistas de vários membros da família TLR (TLR1, 2, 4, 6 e 9). O TLR1, por exemplo, ao formar heterodímero com o TLR2 é capaz de reconhecer fatores de virulência na membrana do bacilo (lipoglicana lipomanana - LAM e

lipoarabinomanana com manose ou arabinose - ManLAM e AraLAM) levando a ativação de macrófago (Means *et al.*, 1999; Tapping & Tobias, 2003). Apesar do bacilo *M. leprae* não apresentar lipopolisacarides (LPS), ligante clássico de TLR4, ele é capaz de ser reconhecido por este receptor. O TLR9 está localizado em compartimentos do retículo endoplasmático e é capaz de reconhecer parte do DNA proveniente da degradação da bactéria (Hart & Tapping, 2012).

O reconhecimento do patógeno (figura 5) pelos receptores do tipo Toll leva a uma cascata de sinalizações que culmina na expressão de genes que irão controlar a resposta imune inata do indivíduo (Takeda & Akira, 2015). As citocinas IFN- γ , IL-2, IL12 e TNF- α relacionam-se com perfil de resposta imune celular e estão presentes nos granulomas característicos da forma tuberculóide da doença. A citocina IFN- γ age sobre macrófagos estimulando a fagocitose e favorecendo a produção de reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio. A IL-2 ativa linfócitos T CD4⁺ estimulando a proliferação celular e promovendo manutenção de citocinas que potencialarão os efeitos do IFN- γ (Foss, 1997) e em conjunto com a IL-6 atuam no hepatócito estimulando a produção de proteínas inflamatórias como a proteína C-reativa. A IL-12 potencializa a secreção de IFN- γ e TNF- α favorecendo a atividade antimicrobiana de macrófagos pra destruir o bacilo invasor (Goulart *et al.*, 2002). O TNF- α é uma citocina crucial para a imunidade contra *M. leprae*, pois sob influência do IFN- γ potencializa todo o processo acima descrito mantendo o macrófago ativado durante o processo da formação do granuloma (Silva & Foss, 1989).

A resposta imune adaptativa característico do pólo virchowiano da doença, caracteriza-se por apresentar mecanismos que se baseiam no reconhecimento específico de antígenos, mediado por receptores presentes nas membranas dos linfócitos T e B (Moraes *et al.*, 2006). Ela pode ter uma tendência imunoregulatória com produção de citocinas que irão favorecer a multiplicação do bacilo. A IL-4, por exemplo, tem efeito imunoregulatório negativo sobre a imunidade mediada por célula porque suprime a atividade dos macrófagos bloqueando a ação do TNF- α , IL-2, IFN- γ e IL-1 β (Salgame *et al.*, 1991; Sieling & Modlin, 1994a). Também a IL-10 apresenta o papel imune

supressor uma vez que inibe a produção de citocinas das células T CD4⁺, na ausência de IFN- γ e IL-2. O bacilo *M. leprae* é capaz de estimular a produção de IL-10 favorecendo sua multiplicação (Sieling & Modling, 1994a e b). A citocina TGF- β , é um dos mais potentes fatores imunossupressores endógenos, está altamente expresso em macrófagos de lesões virchowiano e ausente nestas células de lesões tuberculóides. Apresenta como característica de contrapor os efeitos da IFN- γ . O bacilo *M. leprae* também é capaz de estimular a produção de TGF- β da mesma forma que faz com IL-10 (Goulart *et al.*, 1996).

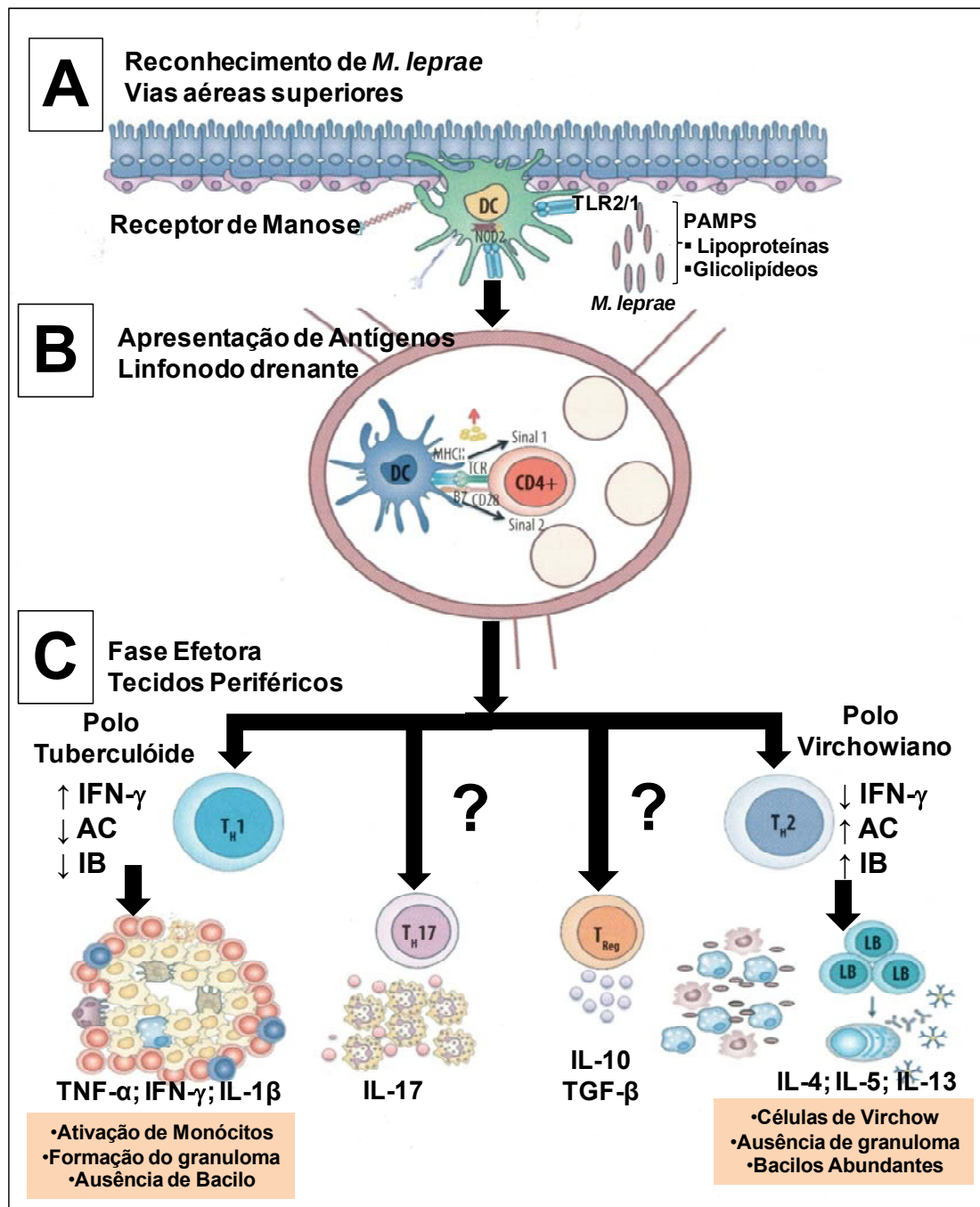


Figura 5 - Resumo Ilustrativo da Ativação do Sistema Imune inato e adaptativo pelo *M. leprae*. Abreviações: TLR: Toll-Like Receptors, PAMP: Pathogen-Associated molecular patterns; NOD: Nucleotide-binding oligomerization domain-2; DC: Célula Dendrítica; MHC II: Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe II; TCR: T cell receptor; B7: Molécula coestimuladora para ativação do linfócito T; CD28: Cluster of Differentiation 28/ receptor de célula T para moléculas coestimulatórias B7-1 e B7-2; CD4+: Cluster of differentiation 4/ Co-receptor para sinalização e adesão na ativação induzida por antígeno das células T restritas ao MHC II; IFN- γ : Interferon gamma; Ac: Anticorpo; IB: Índice Bacilar; Th1: T helper type 1 cells; Th17: T helper type 17 cells; Treg: Regulatory T cells; Th2: T helper type 2 cells; LB: linfócito B; TNF- α : Tumor necrosis factor-alfa; IL: Interleucina; TGF- β : Transforming growth factor- β . Figura adaptada de Stefani & Machado 2015.

1.6.1 Papel dos monócitos na hanseníase

Os monócitos são células do sistema imune que, através da corrente sanguínea, têm acesso aos tecidos e se diferenciam, em células dendríticas ou macrófagos. As células dendríticas realizam o elo entre a resposta imune inata e a adquirida ao apresentar o antígeno para linfócitos T naíve, ativando-os. Os macrófagos, ao fagocitarem microrganismos patogênicos e células em apoptose, promovem o processamento dos antígenos e podem estimular o sistema imune com liberação de citocinas (Ziegler-Heitbrock, 2000).

Pela técnica de citometria de fluxo, conforme a expressão de marcadores, CD14 e CD16, Ziegler-Heitbrock (2010) propôs subpopulações de monócitos classificando-os como: monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), não-clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺) e intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺). Wong *et al.* (2012) relatam em sua revisão a função destas subpopulações. Os monócitos clássicos, que são os majoritários por representarem cerca de 85% do total destas células, têm como função principal a fagocitose. Os não-clássicos, 10%, patrulham o ambiente e promovem a estimulação e proliferação de células T. Os intermediários, são os minoritários, com 5% do total, realizam estímulo a células T, atuam na angiogênese e na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).

É descrito que o bacilo *M. leprae* possui uma fraca capacidade de ativar macrófagos e células dendríticas. Monócitos "naíve" estimulados por bacilos mortos ou vivos produzem baixos níveis de citocinas (Suzuki *et al.*, 1993). Os macrófagos, quando infectados com este patógeno expressa pouco antígeno em sua superfície e, por isto, a estimulação das células T fica prejudicada. Hashimoto *et al.* (2002) afirma que o bacilo de Hansen não é capaz de usar as células dendríticas como hospedeiro, da mesma forma que faz com os macrófagos, um dos motivos podem estar associados à não alteração acentuada da expressão de CD86 e HLADR durante a infecção. Esta célula é também capaz de expressar o glicolípido fenólico-1 (PGL-1) em sua membrana e apresentá-lo para as células T estimulando a produção de IFN- γ (Hashimoto *et al.*, 2002).

O bacilo de *M. leprae* possui ainda a habilidade de controlar a resposta imune ao estimular a produção de IL-10, induzir a secreção de moléculas antagonistas de IL-1 (IL-1Ra), diminuir a expressão da proteína-1 quimioatrativo de monócito (MCP-1) e suprimir a produção de IL-6, pela via fosfatidil-inositol 3-quinase (PI3K), pela inibição da ativação da caspase-1 e do fator nuclear κ -B (NF- κ B) resultando em baixos níveis de IL-1 β e IL-18 (Sinsimer *et al.*, 2010).

1.6.2 O óxido nítrico na hanseníase

O Óxido Nítrico (NO) é um radical livre gasoso, com meia vida biológica curta devido à sua rápida oxidação em nitrito e nitrato. Apresenta importante papel em várias funções fisiológicas e na resposta inflamatória (Marletta, 1993).

A síntese desta molécula (figura 6) é resultado de duas etapas de reações químicas em que a L-arginina é transformada em uma molécula intermediária, N^G-hidroxi-L-arginina, na presença de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-hidrogênio (NADPH) e oxigênio (O₂). A reação química se completa quando, na presença de outra molécula NADPH e O₂, ocorre a formação da L-citulina e uma molécula de NO (Dusse *et al.*, 2003).

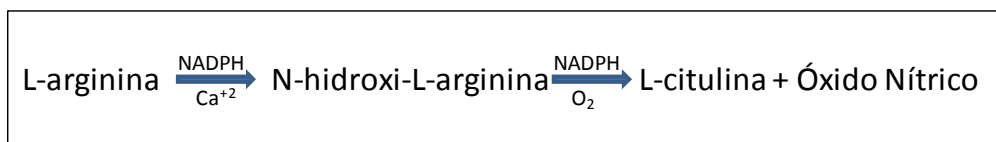


Figura 6 - Síntese do óxido nítrico a partir da L-arginina

Muitas células são capazes de sintetizar o NO através de hemeoproteínas da família NO sintase (NOS). Até o momento há descritas três isoenzimas desta família: cNOS, eNOS e iNOS. A primeira isoforma pode ser encontrada em células do cérebro de camundongo e de suínos, a segunda é constitutivamente produzida em células endoteliais e a terceira é induzida em macrófagos e neutrófilos ao receber estímulo pela presença de um patógeno ou de uma célula tumoral (Filho & Zilberstein, 2000).

O NO é uma molécula que está relacionada na patogenia de diversas doenças, tais como o esclerose múltipla, mal de Parkinson, Alzheimer e diabetes (Roy & Pahan, 2013; Radi et al., 2014; Salemm et al., 2016; Fetterman et al., 2016). Por ser citotóxico e citostático, esta molécula tem a importante função na resposta imune celular durante a infecção de vários microorganismos intracelulares (Arturo et al., 2010).

O NO, nos macrófagos e nos neutrófilos, contribui para a morte do microrganismo pela combinação com reativos de oxigênio intermediário no fagolisossomo ao produzir altos níveis de peroxinitrito tóxico (Hart & Tapping, 2012).

Macrófagos ativados pelas citocinas IFN- γ e TNF- α , ou estimulados por moléculas que se ligam a receptores do tipo *Toll* ocorre aumento da expressão da enzima iNOS, direcionando para síntese de NO e eliminação do parasito (Goulart et al., 2002). Em contrapartida, segundo os mesmos autores, a presença de *M. leprae* no macrófago promove a produção de IL-10 e TGF- β , citocinas que tem a capacidade de inibir a atividade do macrófago e diminuir níveis intracelulares de NO.

Na hanseníase, a ativação de TLR2 e TLR1 por *M. leprae* induz a transcrição de arginase-1, pelo fator de regulação gênica CEBP- β , o que inibe a explosão oxidativa e promove à redução e a produção de reativos de oxigênio favorecendo a sobrevivência do bacilo (Hart & Tapping, 2012).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Avaliar a produção de óxido nítrico, citocinas e expressão de receptores Toll (TLR) em leucócitos do sangue periférico de pacientes com diferentes formas clínicas da hanseníase e reação hansênica, após estímulo *in vitro* com bacilo de *Mycobacterium leprae*.

2.2 Objetivos Específicos:

Avaliar a produção de óxido nítrico em neutrófilos e monócitos do sangue periférico de pacientes com reação hansênica e diferentes formas clínicas da hanseníase após estímulo *in vitro* com bacilo de *M. leprae*;

Avaliar o perfil da expressão de TLR2 e TLR4 em monócitos e linfócitos do sangue periférico de pacientes com reação hansênica e diferentes formas clínicas da hanseníase após estímulo *in vitro* com bacilo de *M. leprae*;

Avaliar o perfil da expressão de HLA-DR em monócitos do sangue periférico de pacientes com reação hansênica e diferentes formas clínicas da hanseníase, após estímulo *in vitro* com bacilo de *M. leprae*;

Avaliar o perfil de expressão de citocinas intracelulares (IL-4, IL-8, IL-10, TNF- α e TGF- β) em leucócitos do sangue periférico de indivíduos com reação hansênica e diferentes formas clínicas da hanseníase, após estímulo *in vitro* com bacilo de *M. leprae*.

Identificar elementos da imunidade inata e adaptativa de Leucócitos circulantes como biomarcadores de pólos, formas e apresentações clínicas da hanseníase.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Grupos de estudo

Os voluntários do grupo de estudo residem em várias cidades do estado de Minas Gerais e foram selecionados pela equipe médica do Ambulatório de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais sob a coordenação do Dr. Marcelo Grossi Araújo. Os indivíduos, de ambos os sexos, apresentaram a faixa etária entre 18-60 anos, não houve seleção por etnia, classes e grupos sociais. O recrutamento ocorreu por meio de contatos verbais e todos os participantes receberam explicações a respeito da pesquisa e dos riscos da coleta de sangue. Não foram incluídos na pesquisa indivíduos em uso de imunossupressores a mais de dois meses. Após entrevista os indivíduos, que concordaram em participar do estudo, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Voluntários saudáveis foram selecionados usando os mesmos critérios. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas René Rachou (anexo 2).

Os voluntários foram divididos em quatro grupos de indivíduos, sendo:

- Grupo 1: (n=13) Indivíduos sem história clínica de hanseníase - Controle
- Grupo 2: (n=5) Pacientes com hanseníase Tuberculóide - Dimorfo-Dimorfo Dimorfo-Tuberculóide e Tuberculóide (DD/DT/T)
- Grupo 3: (n=4) Pacientes com hanseníase Virchowiano - Dimorfo-Virchowiano e Virchowiano (DV/V)
- Grupo 4: (n=5) Pacientes com reação hansênica tipo 1 ou Reação Reversa (Tipo 1);
- Grupo 5: (n=9) Pacientes com reação hansênica tipo 2 ou Eritema Nodoso Hansênico (Tipo 2)

3.2 Coleta das amostras

Amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos de coleta de sangue a vácuo contendo heparina (9mL) e EDTA (5mL). As amostras coletadas em heparina foram utilizadas para quantificação da produção de óxido nítrico e de citocinas intracitoplasmáticas em leucócitos pós-estimulação antígeno-específica *in vitro*, já as

amostras de sangue coletadas em EDTA foram utilizadas para a realização do hemograma.

3.3 Avaliação dos parâmetros hematológicos

O perfil hematológico dos voluntários foi determinado por meio do hemograma completo, realizado por técnicas convencionais, utilizando um analisador automático de células sanguíneas (Advia™60, Bayer HealthCare, Tarrytown, NY, USA).

3.4 Bacilo do *Mycobacterium leprae* - Antígeno de Mitsuda

O antígeno empregado nos experimentos trata-se de uma suspensão de 40.000.000 de bacilos de *M. leprae*/mL usado para teste de intradermoreação (Antígeno de Mitsuda). As ampolas foram gentilmente cedidas pelo Dr. João Carlos Minozzo do Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná.

3.5 Avaliação da expressão de óxido nítrico intracelular em neutrófilos e monócitos do sangue periférico, após estimulação *in vitro* com o Bacilo do *M. leprae*

Para avaliação dos níveis de óxido nítrico (NO) intracelular foi utilizado uma metodologia que emprega a utilização do reagente diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2DA) (Havenga *et al.*, 2001; Strijdom *et al.*, 2004). O DAF-2DA possui capacidade de penetrar no citoplasma celular, onde é convertido em 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2). Esse composto, na presença de NO, sofre processo de oxidação, levando a formação do triazolofluoresceína (DAF-2T) que emite fluorescência na cor verde (FL-1), cuja intensidade é proporcional à concentração intracelular de NO e pode ser quantificada no citômetro de fluxo (Schachnik *et al.*, 2009).

A partir das amostras do sangue periférico coletadas em tubos contendo anticoagulante heparina sódica, o plasma foi retirado e cada suspensão celular ajustada para a concentração de 1×10^7 leucócitos/mL, pela adição de PBS suplementado com 2% de albumina sérica bovina (BSA). Em seguida, 100µL dessa

suspensão celular foram distribuídos em tubos de polipropileno de 5mL (FALCON® – BECTON DICKINSON), contendo ou não bacilo de *M. leprae* na proporção previamente estabelecida de 1:1 parasito/leucócito e os tubos foram incubados em estufa a 37°C e 5% CO₂ durante uma hora. Após este período, em cada cultura foi adicionado o DAF-2-DA em uma concentração final de 2 µM e a incubação seguiu por mais 3 horas.

Após a cultura de curta duração, os tubos foram transferidos imediatamente para o gelo e foram adicionados 3 µL de anticorpo monoclonal para identificação da população de monócitos anti-CD14 conjugado com fluorocromo PE (detalhes do anticorpo na tabela 1). As amostras foram novamente incubadas por 30 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz e seguiram para a etapa de lise dos eritrócitos, utilizando-se 2 mL de solução de lise comercial (FACS LISING SOLUTION – BECTON DICKINSON) diluída dez vezes em água destilada, sob agitação no vórtex, e incubados por 10 minutos nas mesmas condições descritas. Em seguida, 1 mL de PBS foi adicionado e os tubos foram centrifugados a 400 x g, 4°C por 7 minutos. O sobrenadante foi, então, desprezado, as células ressuspensas levemente em vórtex e mais 1 mL de PBS foi adicionado. Finalmente os tubos foram centrifugados a 400 x g, 18°C por 7 minutos, os sobrenadantes desprezados e, às células já ressuspensas, adicionou-se 200 µL de solução fixadora para citometria – Max Facs Fix (MFF). Os tubos foram acondicionados em geladeira a 4-8°C por até 24 horas, e para aquisição dos dados um total de 100.000 eventos foram avaliados com o auxílio do citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickson - BD, E.U.A.). É importante ressaltar que foram feitos tubos controles sem adição de DAF-2-DA, na presença ou ausência de estímulo, com intuito de avaliar possíveis reações inespecíficas e autofluorescência.

3.6 Avaliação do perfil de expressão de citocinas intracelulares e receptores do tipo Toll (TLR) em monócitos e linfócitos

Inicialmente, após a contagem do valor global de leucócitos pelos hemogramas, foram calculados os ajustes necessários para obtenção de preparações celulares com 1×10^7 leucócitos/mL, a partir das amostras coletadas em tubos com heparina sódica. Após o ajuste, a suspensão celular (volume de 500µL) obtida de cada indivíduo foi incubada com Bacilo *M. leprae* (Antígeno de Mitsuda) na proporção previamente estabelecida de 1:1 bacilo/leucócito, na presença de 500 ul com meio RPMI na presença de 2% soro fetal bovino, em tubos de cultura de polipropileno de 14

mL (FALCON® – BECTON DICKINSON), durante 16 horas, em estufa a 37°C, contendo 5% de CO₂. Além disso, foram feitas culturas controle nas mesmas condições descritas acima, entretanto na ausência do antígeno. Após esse período, foi adicionada Brefeldina A (BFA - Sigma, E.U.A.) em todos os tubos em concentração final de 10µg/mL e a incubação seguiu por mais quatro horas nas mesmas condições descritas acima. Finalmente, foram adicionados a cada tubo 110 µL de EDTA 20 mM (Sigma, E.U.A.) obtendo concentração final de 2mM, e as amostras foram incubadas por mais 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

O volume de 7 µL de cada um dos anticorpos monoclonais anti-CD14 (para marcação de monócitos), anti HLA-DR, anti CD4 e anti CD8 (para identificação de linfócitos) foram adicionados (detalhes dos anticorpos Tabela 1). As amostras foram, então, homogeneizadas cuidadosamente e após 30 minutos de incubação dos tubos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, estas foram submetidas à lise dos eritrócitos, para a qual foram utilizados 4 mL de solução de lise comercial (FACS LISYNG SOLUTION – BECTON DICKINSON) previamente diluída dez vezes em água destilada e sob agitação no vórtex e posteriormente incubados por 10 minutos, nas mesmas condições descritas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 400 x g a temperatura de 18°C por 7 minutos, os sobrenadantes foram desprezados, as células ressuspensas em vórtex a baixa velocidade. Foram adicionados 3 mL de PBS-P (PBS contendo 0,5% BSA, 0,5% saponina e 0,1% de azida sódica) com o intuito de permeabilizar as células. Os tubos foram fechados, homogeneizados por inversão e incubados por 10 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Decorrido este período, as suspensões celulares foram centrifugadas a 400 x g e 18°C, por 7 minutos, o sobrenadante foi desprezado, as células foram ressuspensas novamente em 300µL de PBS-P. Em seguida, alíquotas de 40 µL foram transferidas para placa de 96 poços de fundo em U contendo 1 µL de anticorpos monoclonais anti-citocinas (IL-4, IL-8, IL-10, TNF-α e TGF-β) e anti-receptores toll (TLR2 e TLR4) previamente diluídos 1:10 em PBS-P (detalhes dos anticorpos tabela 1). As amostras foram incubadas durante 30 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente, 130 µL de PBS-P foram adicionados a cada poço e homogeneizados levemente. A placa foi submetida à centrifugação a 400 x g, temperatura de 18°C por 7 minutos, os sobrenadantes foram, então, desprezados e as células ressuspensas em vórtex a baixa rotação. Aos poços foram adicionados 180 µL de PBS-W, levemente homogeneizados e a placa foi novamente centrifugada a 400 x g, 18°C por 7 minutos. Finalmente, o sobrenadante foi desprezado, as células ressuspensas em vortex e fixadas com 200 µL de solução fixadora –(MFF) e as suspensões celulares foram

transferidas para microtubos de poliestireno de 500 μ L (FALCON® – BECTON DICKINSON). Os tubos foram acondicionados a 4-8°C por até 24 horas e posteriormente submetidos a aquisição dos dados, onde um total de 30.000 eventos foram avaliados e a análise dos parâmetros morfométricos e imunofenotípicos foi determinada com o auxílio do citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickson - BD, E.U.A.). Em todos os experimentos foram analisados para cada amostra os controles das reações, que são importantes para avaliação da qualidade do perfil celular e detecções de eventual ocorrência de fluorescências inespecíficas.

Quadro 1: Pannel de anticorpos monoclonais utilizados para marcação das citocinas intracelulares e dos receptores do tipo Toll (TLR) e em linfócitos e monócitos.

Marcador	Fluorocromo	Clone	Marca
Anti -CD4	FITC	RPA-T4	BD
Anti -CD8	PercP	SK1	BD
Anti -CD14	FITC	M ϕ P9	BD
Anti -HLA-DR	APC	G46-6	BD
Anti -TLR2	PE	TL2.1	Ebioscience
Anti -TLR4	PE	610015	R&D Systems
Anti -IL-4	PE	8F-12	IQ products
Anti -IL-8	PE	G265-8	BD biosciences
Anti -IL-10	PE	JES3-19F1	BD biosciences
Anti -TNF- α	PE	MAbM	BD biosciences
Anti -TGF- β	PE	TB21	IQ products

3.7 Obtenção e análise de dados por citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica de análise celular automatizada, que permite a avaliação simultânea de múltiplas propriedades físicas e bioquímicas individuais de uma célula suspensa em meio líquido (Joroszeski & Radcliff, 1999). A caracterização fenotípica, por citometria de fluxo, inclui a análise básica de três parâmetros celulares: tamanho (determinado pela difração do raio laser – “Forward scatter” - FSC), granulosidade ou complexidade interna (determinada pela refração e reflexão do raio laser – “Side Scatter” - SSC), e intensidade relativa de fluorescência (exemplos: FL1, FL2 e FL3). Estas características são detectadas utilizando-se

sistema ótico e eletrônico acoplados, que avalia a emissão de fluorescência e a dispersão do raio laser incidente sobre uma célula, hidrodinamicamente focalizada. Esses sinais óticos e eletrônicos podem ser medidos e armazenados, para posterior análise.

Após a obtenção dos dados, o primeiro passo para a análise consistiu na identificação da população celular de interesse (R), de acordo com os parâmetros tamanho (FSC), granulosidade (SSC) e/ou fluorescências (FL1, FL2, FL3 e FL4). Em seguida, a análise dos aspectos fenotípicos de cada população considerou duas abordagens distintas: em gráficos de dispersão pontual de fluorescência, por meio do percentual de células positivas para cada marcador avaliado ou em gráficos do tipo histograma em escala logarítmica, através da intensidade média de fluorescência (IMF) equivalente à densidade de expressão de cada marcador. A primeira abordagem é empregada para quantificar fenótipos celulares que apresentam distribuição bimodal, ou seja, caracterizadas por apresentarem populações positivas e negativas para o referido marcador fenotípico. Na segunda abordagem foi utilizada uma análise semi-quantitativa da expressão de marcadores fenotípicos que possuem distribuição unimodal, ou seja, toda a população celular de interesse expressa constitutivamente o referido marcador fenotípico. Nessas situações, alterações na densidade de expressão podem ocorrer, o que irá promover o deslocamento da população celular ao longo do eixo da intensidade de fluorescência.

3.7.1 Aquisição e análise dos níveis de óxido nítrico intracelular em monócitos e neutrófilos do sangue periférico por citometria de fluxo

Após todo o procedimento de avaliação da produção de óxido nítrico intracelular pelos fagócitos (conforme seção 3.5) e da análise no citômetro FACSCalibur (BECTON DICKINSON, San Jose, CA, EUA), o software FlowJo foi utilizado para a identificação da população celular de interesse e determinação da intensidade média e fluorescência dos marcadores fenotípicos avaliados.

A avaliação da expressão de óxido nítrico intracelular considerou a intensidade média de fluorescência (IMF) emitida. Assim, o estímulo provocado pelo contato com o bacilo de *M. leprae* (antígeno de Mitsuda) promoveu o deslocamento da população celular ao longo do eixo da intensidade de fluorescência e a diferença média entre os grupos estimulados e sem estímulo pode ser medida.

A figura 6 representa a metodologia empregada na análise da fluorescência de DAF-2T+ na população de interesse. Conforme representado na figura 7A, a

população de monócito foi selecionada por uma janela (R1) - “gate”, através da construção de gráficos de densidade de fluorescência-2 (FL2, CD14-PE) versus granulosidade celular (Side Scatter - SSC). Em seguida, para avaliação da emissão de DAF-2T+ foram construídos histogramas de marcador FL1 *versus* número de células para determinar a IMF da população selecionada, como mostrado nas Figuras 7B e 6C.

Da mesma forma, a população de neutrófilos foi selecionada por uma janela (R2) - “gate”, através da construção de gráficos de densidade de fluorescência-2 (FL2, CD14-PE) *versus* granulosidade celular (Side Scatter - SSC), como representado na figura 7D. Para avaliação da emissão de DAF-2T⁺ foram construídos histogramas de marcador FL1 *versus* número de células para determinar a IMF da população selecionada (R2), como mostrado nas Figura 7E e 7F.

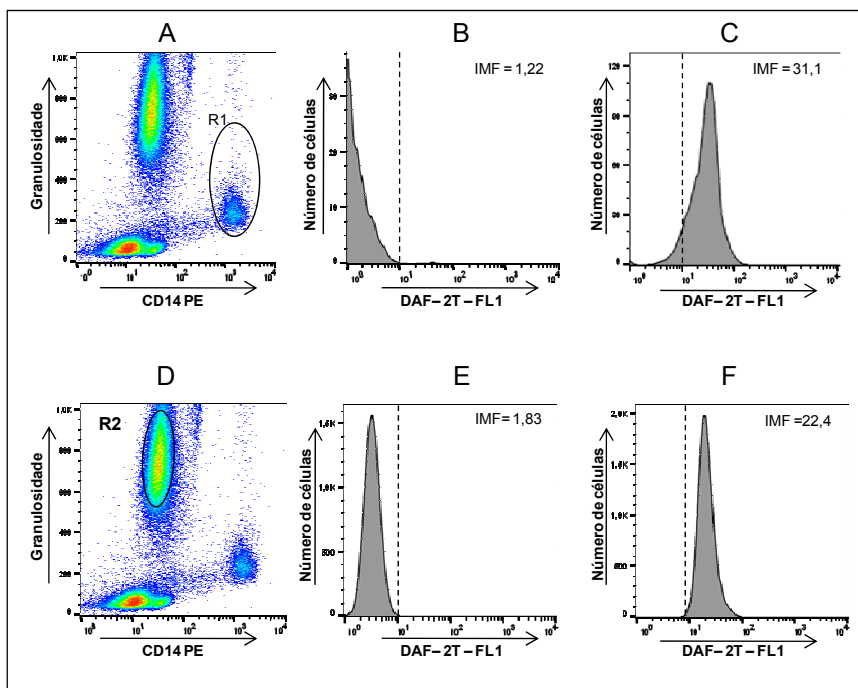


Figura 7 - Sequência de procedimentos utilizados para avaliar a produção de óxido nítrico em monócitos e neutrófilos do sangue periférico. (A) Gráfico de distribuição pontual CD14-PE/FL2 *versus* SSC utilizado para a seleção da população de monócito - R1 com fenótipo CD14-SSC^{intermediário}. (B) Histograma de Intensidade Média de Fluorescência (IMF) de DAF-2T/FL1 *versus* número de células selecionadas na região R1 em cultura de sangue de paciente sem estímulo do antígeno; (C) Histograma de Intensidade Média de Fluorescência (IMF) de DAF-2T/FL1 *versus* número de células selecionadas na região R1, em cultura de sangue de paciente com estímulo do antígeno de Mitsuda. (D) Gráfico de distribuição pontual CD14-PE/FL2 *versus* SSC utilizado para a seleção da população de neutrófilos - R2 com fenótipo CD14+SSC^{intermediário}. (E) Histograma de Intensidade Média de Fluorescência (IMF) de DAF-2T/FL1 *versus* número de células selecionadas na região R2 em cultura de sangue de paciente sem estímulo do antígeno; (F) Histograma de Intensidade Média de Fluorescência (IMF) de DAF-2T/FL1 *versus* número de células selecionadas na região R2, em cultura de sangue de paciente que recebeu estímulo do antígeno de Mitsuda. A linha vertical é uma referência para melhor visualização do deslocamento da intensidade média de fluorescência.

3.7.2 Aquisição e análise *ex vivo* do perfil de expressão de HLA-DR, em monócitos do sangue periférico por citometria de fluxo

Após todo o procedimento de fenotipagem dos leucócitos (seção 3.6) e da análise no citômetro FACSCalibur (BECTON DICKINSON, San Jose, CA, EUA), o software FlowJo foi utilizado para a identificação da população celular de interesse e determinação da expressão do HLA-DR após o estímulo com o bacilo *M. leprae* (antígeno de Mitsuda). O anticorpo anti-CD14-FITC foi empregado nos ensaios para facilitar a seleção da população de monócitos.

A população de monócitos foi selecionada por uma janela (R1) - “gate”, através da construção de gráficos de densidade de fluorescência-1 (FL1, CD14-FITC) *versus* granulosidade celular (Side Scatter - SSC), como representado na figura 8A. Em seguida, foi construído o histograma de HLA-DR-APC/FL4 *versus* número de células para determinar a IMF da expressão de cada molécula na população selecionada, como representado na figura 8B.

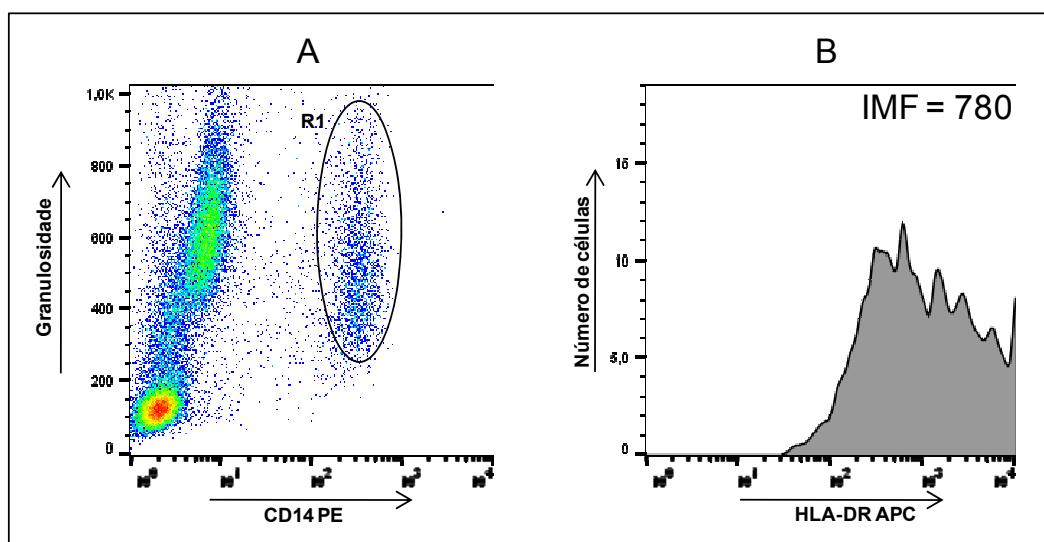


Figura 8 - Sequência de procedimentos utilizados para quantificar a intensidade média de fluorescência da expressão de HLA-DR em monócitos. (A) Gráfico de distribuição pontual CD14-FITC/FL1 *versus* SSC utilizado para a seleção da população de monócitos - R1 com fenótipo CD14+. (B) Histograma de Intensidade Média de Fluorescência (IMF) de HLA-DR-APC/FL4 *versus* número de células selecionadas na região R1.

3.7.3 Aquisição e análise do perfil de expressão de citocinas intracelulares em monócitos e linfócitos do sangue periférico

Após todo o procedimento de marcação de citocinas intracelulares dos leucócitos conforme descrito na seção 3.6 e da análise no citômetro FACSCalibur (BECTON DICKINSON, San Jose, CA, EUA), o software FlowJo foi utilizado para a identificação das populações celulares de interesse e avaliação da expressão dos marcadores. O anticorpo anti-CD14-FITC foi empregado nos ensaios para facilitar a seleção da população de monócitos (figura 9A), os anticorpos anti-CD4-FITC e anti-CD8-PercP foram utilizados para a seleção da população de linfócitos (figura 10). Inicialmente, a população de monócitos foi selecionada por uma janela-“gate” (R1) através da construção de gráficos de densidade de fluorescência-1 (FL1, CD14-FITC) *versus* granulosidade celular (Side Scatter - SSC), como mostrado na figura 9A. Após a seleção da população de interesse, foram construídos histogramas de citocinaPE/FL2 *versus* número de células para determinar a IMF da expressão de cada molécula na população selecionada, como representado na figura 9B.

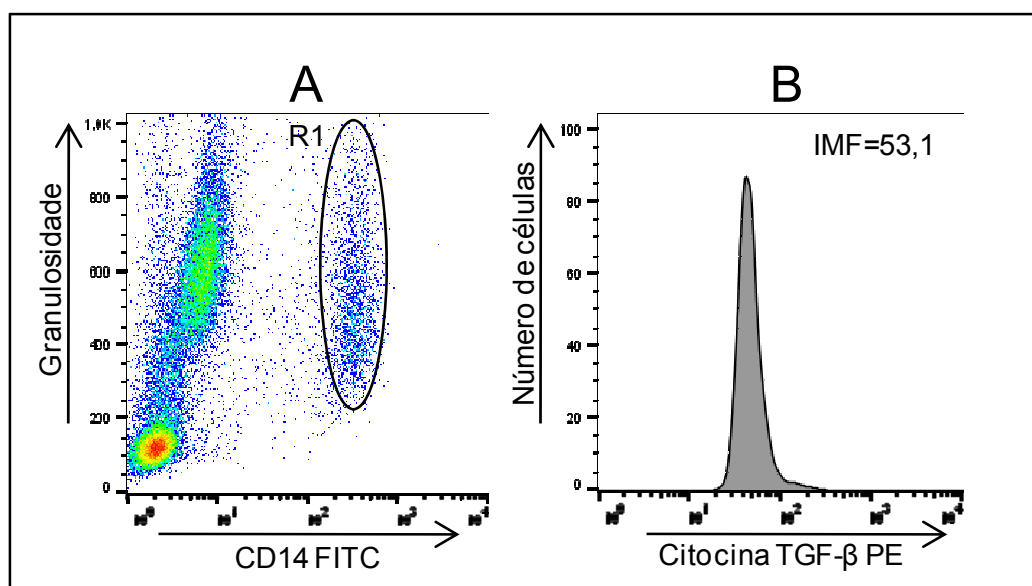


Figura 9 - Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de monócitos citocina+, após o ensaio de imunofenotipagem. (A) Gráfico de distribuição pontual CD14-FITC/FL1 *versus* SSC utilizado para a seleção da população de monócitos - R1 com fenótipo CD14⁺. (B) Histograma de intensidade média de fluorescência (IMF) de citocina/FL2 (TGF-β) *versus* número de células selecionadas na região R1.

Por outro lado, a população de linfócitos (figura 10A) foi selecionada por uma janela-“gate” R1, através da construção de gráfico pontual de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC). Após a seleção de interesse, R1, foram construídos gráficos

(figuras 10B e 10D) de densidade de fluorescência, CD4-FITC/FL1 e CD8-PercP/FL3 *versus* granulidade (SSC) para determinar o percentual de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ (R2 e R3, respectivamente). Para cada uma destas populações, foram construídos histogramas de citocinaPE/FL2 *versus* número de células para determinar a IMF da expressão de cada molécula na população selecionada, como representado nas Figuras 10C e 10E.

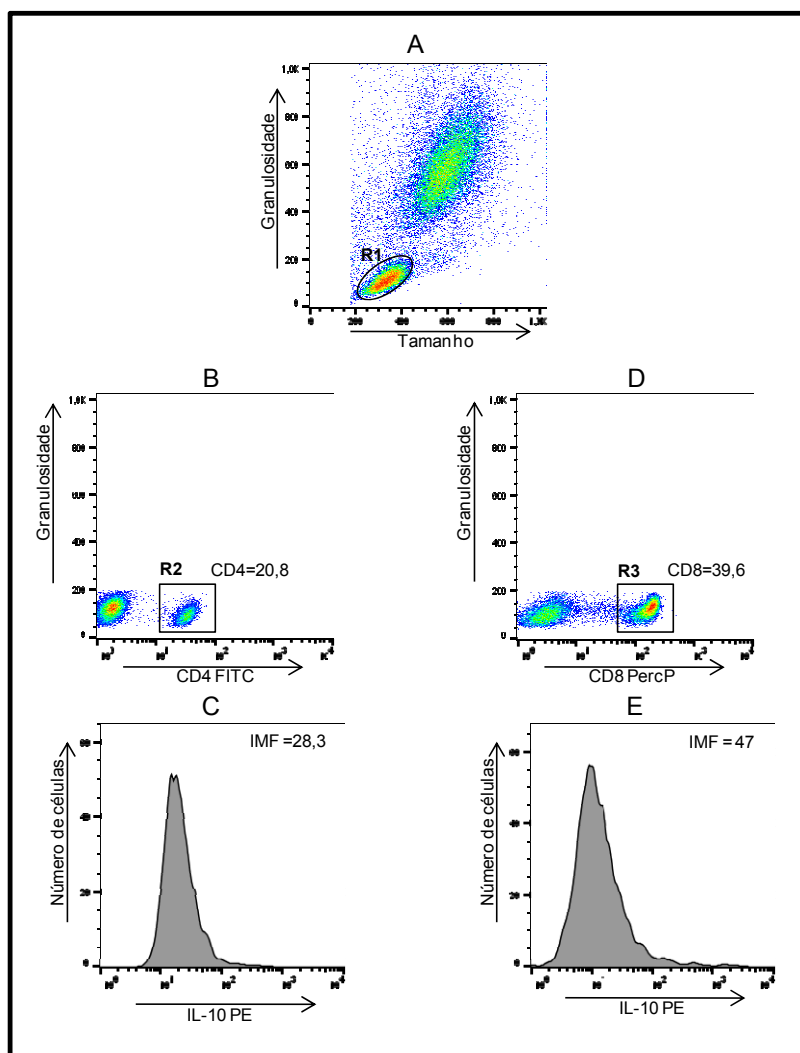


Figura 10 - Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de linfócitos citocina positiva, após o ensaio de imunofenotipagem. (A) Gráfico de distribuição pontual de tamanho (FSC) *versus* SSC utilizado para a seleção da população de linfócitos - R1. (B) Gráfico de distribuição pontual de CD4-FITC/FL1 *versus* SSC de células selecionadas na região R1. (C) Histograma unidimensional de fluorescência citocina-PE/FL2 (IL10) *versus* número de células selecionadas na região R2 para analisar a intensidade média de fluorescência das células presentes neste gate. (D) Gráfico de distribuição pontual de CD8-PercP/FL3 *versus* de SSC de células selecionadas na região R1. (E) Histograma unidimensional de fluorescência citocina-PE/FL2 (IL10) *versus* número de células selecionadas na região R3 para analisar a intensidade média de fluorescência das células presentes neste gate.

3.7.4 Aquisição e análise *ex vivo* do perfil de expressão dos marcadores TLR2 e TLR4 em monócitos, neutrófilos e linfócitos do sangue periférico por citometria de fluxo

Após todo o procedimento de fenotipagem dos leucócitos (seção 3.6) e da análise no citômetro FACSCalibur (BECTON DICKINSON, San Jose, CA, EUA), o software FlowJo foi utilizado para a identificação da população celular de interesse e determinação dos receptores TLR2 e TLR4 após o estímulo com bacilo da *M. leprae*. Os anticorpos anti-CD14-FITC foi empregado no ensaio para selecionar a população de monócitos e os anticorpos anti-CD4-FITC e anti-CD8-PercP para a selecionar a população de linfócitos.

A população de monócitos foi selecionada por uma janela (R1) - “gate”, através da construção de gráficos de densidade de fluorescência-1 (FL1, CD14-FITC) *versus* granulosidade celular (Side Scatter - SSC), como representado na figura 11A. Em seguida foi construído um histograma TLR2-PE/FL2 e TLR4-PE/FL2 *versus* número de células para determinar a intensidade média de fluorescência de expressão de cada molécula na população selecionada como representado na figura 11B.

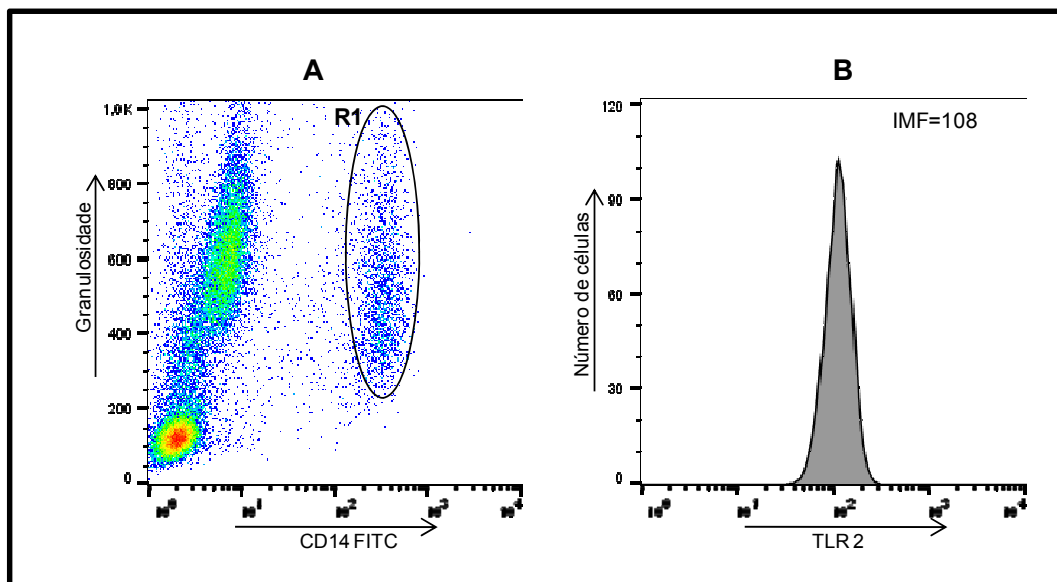


Figura 11 - Sequência de procedimentos utilizados para quantificar a intensidade média da expressão receptores do tipo Toll (TLR2 e TLR4) em monócitos. (A) Gráfico de distribuição pontual CD14-FITC/FL1 *versus* SSC utilizado para a seleção da população de monócitos - R1 com fenótipo CD14⁺. (B) Histograma de Intensidade Média de Fluorescência (IMF) de TLR-PE/FL2 (TLR2) *versus* número de células selecionadas na região R1.

A população de linfócitos foi selecionada por uma janela (R1) - “gate”, através da construção de gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC)

versus granulosidade celular (Side Scatter - SSC), como representado na figura 12A. Em seguida, foi construído gráficos de densidade de fluorescência CD4 FITC/FL1 e CD8 PercP/FL3, figuras 12B e 12D, para determinar o percentual de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ (R2 e R3, respectivamente). Finalmente, foram construídos histograma, figura 12C e 12E, para determinar IMF da expressão de cada molécula de TLR na população selecionada.

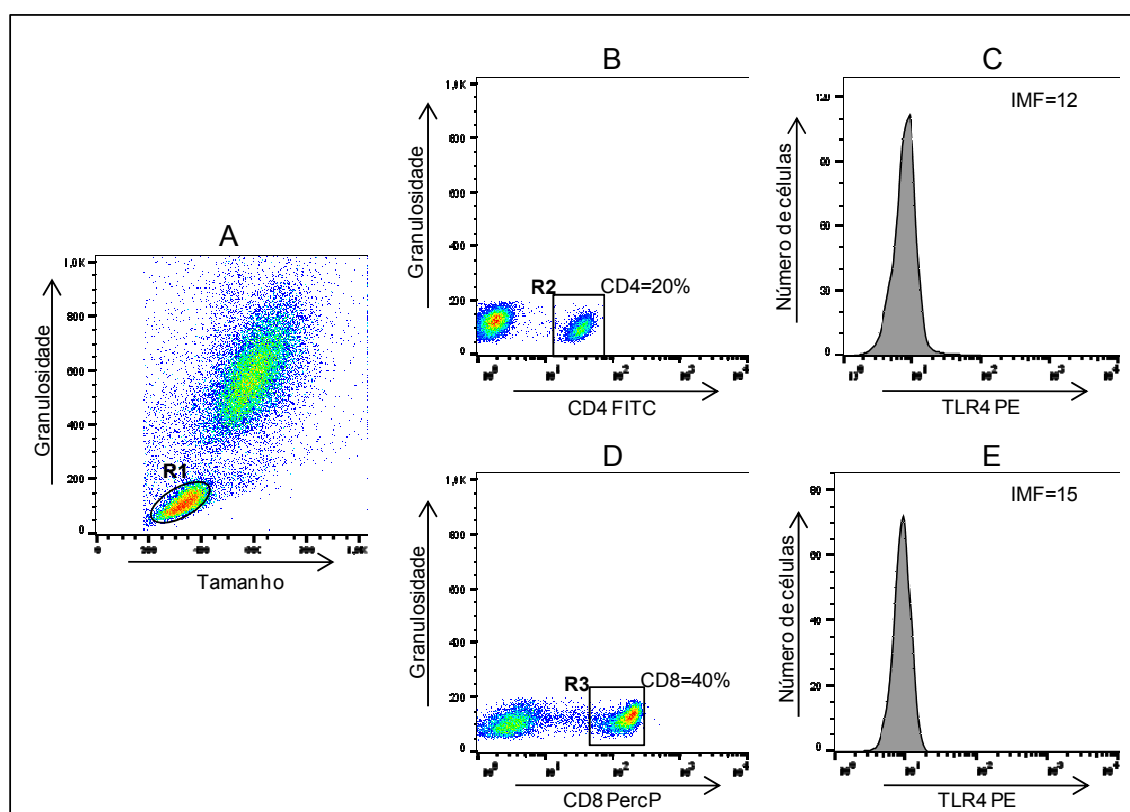


Figura 12 - Sequência de procedimentos utilizados para quantificar a intensidade média da expressão de receptores do tipo Toll em linfócitos. (A) Gráfico de distribuição pontual de FSC *versus* SSC utilizado para a seleção da população de linfócito - R1. (B) Gráfico de distribuição pontual de CD4⁺ *versus* SSC células selecionadas na região R1. (C) Histograma unidimensional de fluorescência de TLR-PE /FL2 (TLR4) *versus* número de células selecionadas na região R2 para analisar a IMF das células presentes neste gate. (D) Gráfico de distribuição pontual de CD8⁺ *versus* SSC células selecionadas na região R1.(E) Histograma unidimensional de fluorescência de TLR-PE/FL2 (TLR4) *versus* número de células selecionadas na região R3 para analisar a IMF das células presentes neste gate

3.8 Análise estatística dos dados

Inicialmente, a natureza paramétrica ou não paramétrica dos dados foi avaliada considerando-se o seu grau de independência, normalidade e variância, empregando-se o programa estatístico Minitab versão 11.0 (San Diego, USA). As demais análises estatísticas foram realizadas, empregando-se o software GraphPad Prism 5.03. As análises comparativas entre os grupos foi empregado o Test T student. Empregando o prisma também foi calculados os quartis (25% e 75%). Em todas as análises, as diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

3.9 Diagrama de Venn

O Diagrama de Venn é uma ilustração das relações entre os grupos de objetos que compartilham algo em comum. Geralmente, estes diagramas são usados para descrever conjunto de interseções ($\cap$). Para análise de intercessão-Diagrama de Venn entre os grupos paciente os grupos de pacientes do pólo tuberculóide (DD/DT/T), pacientes do pólo virchowiano (DV/V), pacientes com reação hansênica tipo 1 (Tipo 1) e pacientes com reação hansênica tipo 2 (Tipo 2) foi utilizado o software Bioinformatics & Evolutionary Genomics, disponível em <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>. Através do software foi possível gerar uma tabela e um gráfico sob a forma de diagrama simétrico, indicando quais elementos estão em intercessão entre conjuntos/grupos ou são exclusivos de um determinado conjunto/grupo.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados de acordo com a sequência dos objetivos específicos propostos. Desta forma os primeiros resultados apresentados serão relativos aos aspectos fenotípicos e funcionais da imunidade inata e adaptativa em leucócitos circulantes considerando às diferentes formas clínicas da hanseníase.

4.1 Expressão de moléculas TLR2, TLR4, HLA-DR, óxido nítrico (DAF-2T) em neutrófilos e monócitos e as citocinas IL-8, TNF- α , IL-4, IL-10 e TGF- β em monócitos do sangue periférico de pacientes com diferentes formas clínicas da hanseníase.

A análise imunofenotípica das células, no contexto ex vivo, por citometria de fluxo, permite avaliar e quantificar a expressão de diversos marcadores de superfície celular e a identificação dos diferentes fenótipos celulares.

Ao avaliar os resultados da expressão da molécula TLR2 em neutrófilos e monócitos dos pacientes com as formas clínicas Tuberculóide (DD/DT/T) e Virchowiano (DV/V) não foi observado diferenças na expressão quando comparados ao grupo de pacientes controles “saudáveis”. Já a análise da expressão da molécula TLR4 mostrou que indivíduos com hanseníase, tanto da forma Tuberculóide quanto Virchowiano, apresentaram uma redução na expressão desta molécula em neutrófilos, mas esta redução não foi observada quando o TLR4 foi avaliado em monócitos (figura 13).

As análises relativas à expressão da molécula HLA-DR em monócitos, mostraram que as células de pacientes Virchowiano (DV/V) apresentavam maior expressão que os monócitos dos pacientes Tuberculóide (DD/DT/T) e pacientes controles “saudáveis” (figura 13).

Em relação ao parâmetro de atividade funcional de resposta imune avaliado, como a produção de óxido nítrico, em neutrófilos e monócitos através do emprego de uma metodologia que usa uma sonda (DAF-2T) que revela a presença de óxido nítrico intracelular, mostrou que tanto neutrófilos quanto

monócitos dos pacientes com hanseníase (DD/DT/T e DV) não apresentaram diferenças na expressão desta molécula quando comparados ao grupo de pacientes controle (Figura13).

Os resultados relativos a expressão de citocinas intracitoplasmáticas em monócitos, dentre elas, as de perfil inflamatório como a IL-8 e TNF- α , e também citocinas de perfil regulador, a IL-4, IL-10 e TGF- β , demonstrou que apenas a expressão do TGF- β , apresentou uma redução em monócitos dos grupos de pacientes com hanseníase Tuberculóide (DD/DT/T) e Virchowiano (DV/V) quando comparados ao grupo de pacientes controle “saúdáveis”.

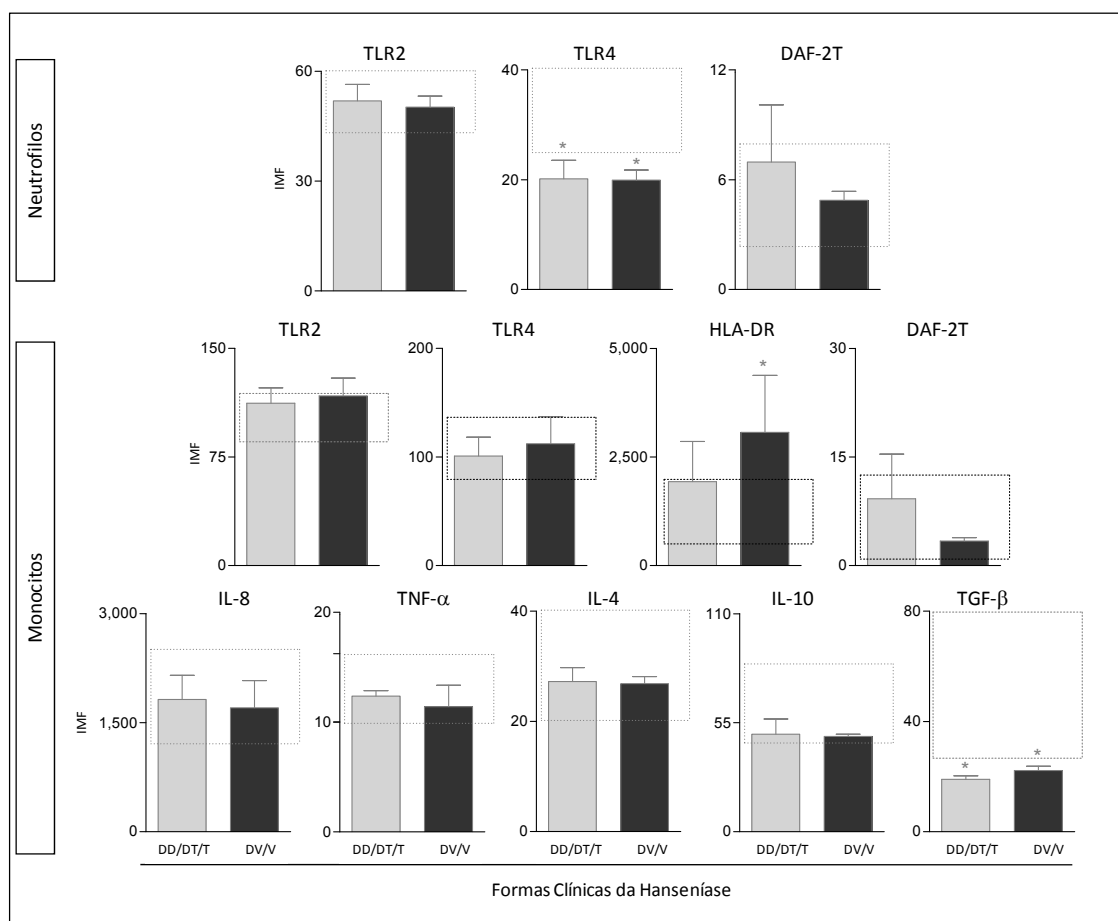


Figura 13 - Expressão de moléculas TLR2, TLR4, HLA-DR, óxido nítrico (DAF-2T) em neutrófilos de monócitos e as citocinas IL-8, TNF- α , IL-4, IL-10 e TGF- β em monócitos do sangue periférico de pacientes com diferentes formas clínicas da Hanseníase. Os gráficos estão representados em barras verticais, construídos com valores obtidos a partir da intensidade média de fluorescência (IMF) dos biomarcadores. Os indivíduos do grupo do polo tuberculóide (DD/DT/T) estão representados pela barra cinza claro, os indivíduos do polo virchowiano (DV/V) estão representados pela barra cinza escuro. Os retângulos com bordas pontilhadas () representam o intervalo de confiança de 95% dos valores observados nas células dos pacientes do grupo controle “saúdáveis”. As diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle estão representadas por asterisco (*).

4.2 Expressão de moléculas TLR2, TLR4 e citocinas IL-8, TNF- α , IL-4, IL-10 e TGF- β em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ de pacientes com diferentes formas clínicas da Hanseníase.

A avaliação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ no sangue periférico dos pacientes com as formas clínicas Tuberculóide (DD/DT/T) e também Virchowiano (DV/V) mostrou não haver diferenças dos percentuais destas células, quando comparados aos percentuais observados no grupo de pacientes controles “saúdáveis” (figura 14).

A avaliação da expressão da molécula TLR2 em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, mostrou que as células CD8⁺ do grupo de pacientes Virchowiano (DV/V) apresentaram um aumento em relação ao grupo da forma Tuberculóide (DD/DT/T) e pacientes controles. Por outro lado a expressão da molécula TLR4 em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ não apresentou diferenças entre os grupos (figura 14).

Em relação expressão de citocinas intracitoplasmáticas, foi observado que linfócitos T CD8⁺ do grupo de pacientes da forma Virchowiana (DV/V) apresentaram maior expressão da citocinas TNF- α e TGF- β quando comparados ao grupo de pacientes da forma Tuberculóide (DD/DT/T), embora a expressão destas citocinas não tivessem diferença em relação ao grupo controle. Também foi observado que tanto linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, do grupo Tuberculóide e Virchowiano, apresentaram maior expressão de IL-10 que linfócitos do grupo de pacientes controles. Em relação à expressão das citocinas IL-8 e IL-4, pelos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, não foram observadas diferenças entre grupo Virchowiano (DV/V) e Tuberculóide (DD/DT/T) em relação ao grupo controle (figura 14).

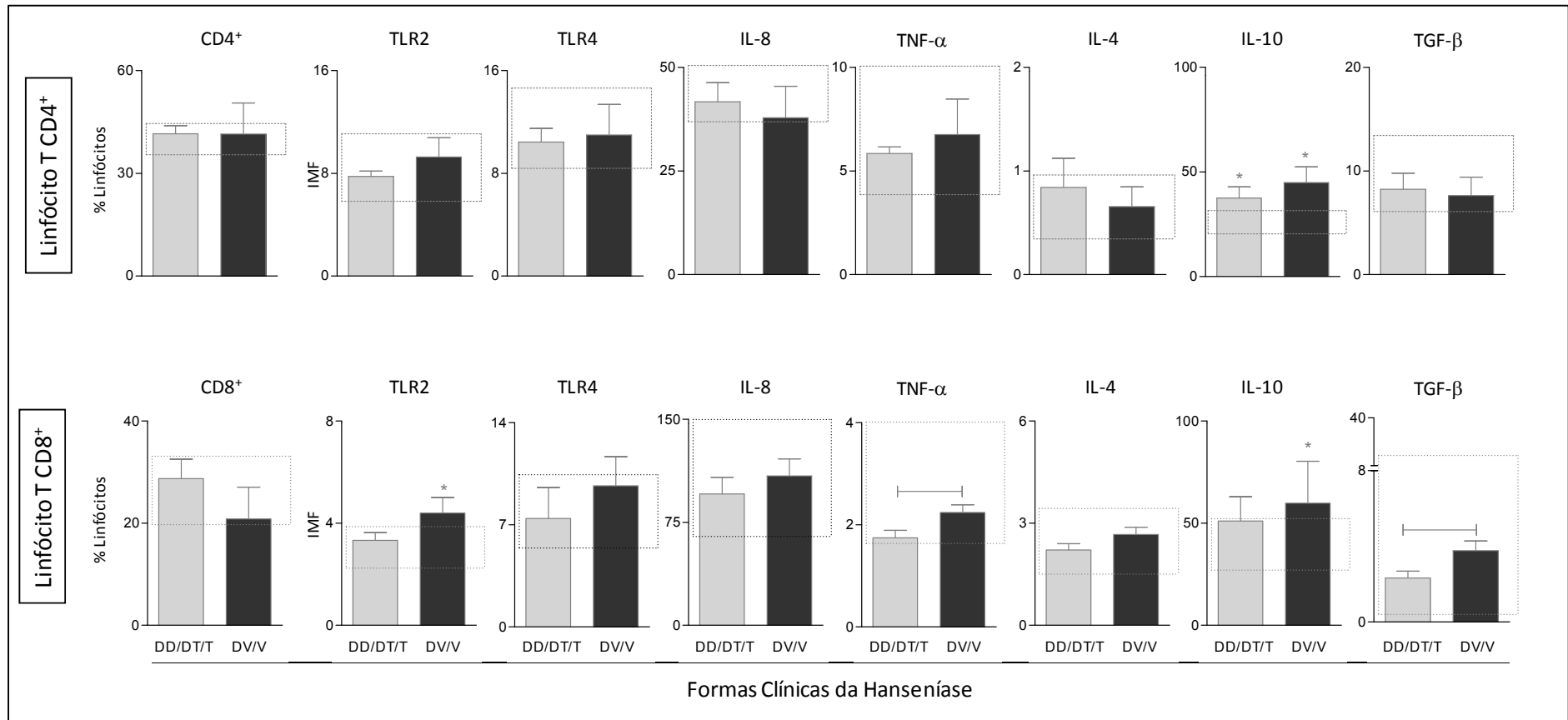


Figura 14 - Expressão de moléculas TLR2, TLR4 e citocinas IL-8, TNF- α , IL-4, IL-10 e TGF- β em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ com diferentes formas clínicas da hanseníase. Os gráficos à esquerda representam o percentual de Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Os demais gráficos foram construídos com valores obtidos a partir da intensidade média de fluorescência (IMF) dos biomarcadores. Os indivíduos do grupo Tuberculóide (DD/DT/T) estão representados pela barra cinza claro, os indivíduos da forma clínica Virchowiana (DV/V) estão representados pela barra cinza escuro. Os retângulos com borda pontilhada (□) representam o intervalo de confiança de 95% dos valores observados nos linfócitos dos pacientes do grupo controle “saúdáveis”. As diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle estão representadas por asterisco (*). A linha conectora (—) representa diferenças significativas entre os grupos Tuberculóide e Virchowiano.

A seguir serão apresentados os resultados relativos aos aspectos fenotípicos e funcionais da imunidade inata e adaptativa em leucócitos circulantes considerando as apresentações clínicas da hanseníase e as reações hansênicas.

4.3 Expressão de moléculas TLR2, TLR4, HLA-DR, óxido nítrico (DAF-2T) em neutrófilos e monócitos e citocinas IL-8, TNF- α , IL-4, IL-10 e TGF- β em monócitos do sangue periférico considerando as apresentações clínicas da hanseníase e as reações hansênicas.

Ao avaliar os resultados da expressão da molécula TLR2, foi observado que a mesma apresentou-se reduzida tanto em neutrófilos quanto em monócitos do sangue periférico dos pacientes com reação hansênica do Tipo 1 quanto comparados aos dos grupos das formas clínicas Tuberculóide (DD/DT/T) e Virchowiano (DV/V) e também aos pacientes controle; esta redução foi observada inclusive em relação ao grupo de indivíduos com reação hansênica Tipo 2 (figura 15).

Em relação a expressão de TLR4⁺, os resultados demonstraram que neutrófilos do grupo de pacientes com reação hansênica do Tipo 1 havia estatisticamente menor expressão quando comparados ao grupo controle, fato que não foi observado quando comparado aos demais grupos. Embora a expressão do TLR4 em monócitos do grupo de pacientes com a reação hansênica do Tipo 1 não tenha apresentado diferença em relação aos grupos de formas clínicas Tuberculóide (DD/DT/T) e Virchowiano (DV/V) e a pacientes do grupo controle "saudáveis", a sua expressão apresentou-se reduzida quando comparada ao grupo de pacientes com a reação hansênica do Tipo 2 (figura 15).

Os resultados da avaliação de óxido nítrico mostrou que não haver diferença de produção em neutrófilos quando avaliado entre os grupos estudados. Porém, quando a produção de NO foi avaliada em monócitos, observou-se que embora ela não tenha sido diferente entre os grupos Tuberculóide (DD/DT/T) e Virchowiano (DV/V) e ao grupo de paciente controle,

a mesma foi maior no grupo de pacientes com reação hansênica do Tipo 1 em relação ao grupo de com reação hansênica do Tipo 2 (figura 15).

A avaliação da expressão da molécula HLA-DR em monócitos não mostrou diferenças entre os grupos avaliados (figura 15).

Em relação expressão de citocinas intracitoplasmáticas, os resultados da avaliação da produção citocina, mostraram não haver diferenças na expressão das citocinas IL-8, TNF- α , IL-4 e TGF- β por monócitos nos diferentes grupos estudados, diferença foi observada somente na expressão da citocina IL-10, que se mostrou aumentada no grupo de reação hansênica do Tipo 2 quando comparado ao grupo Virchowiano (DV/V).

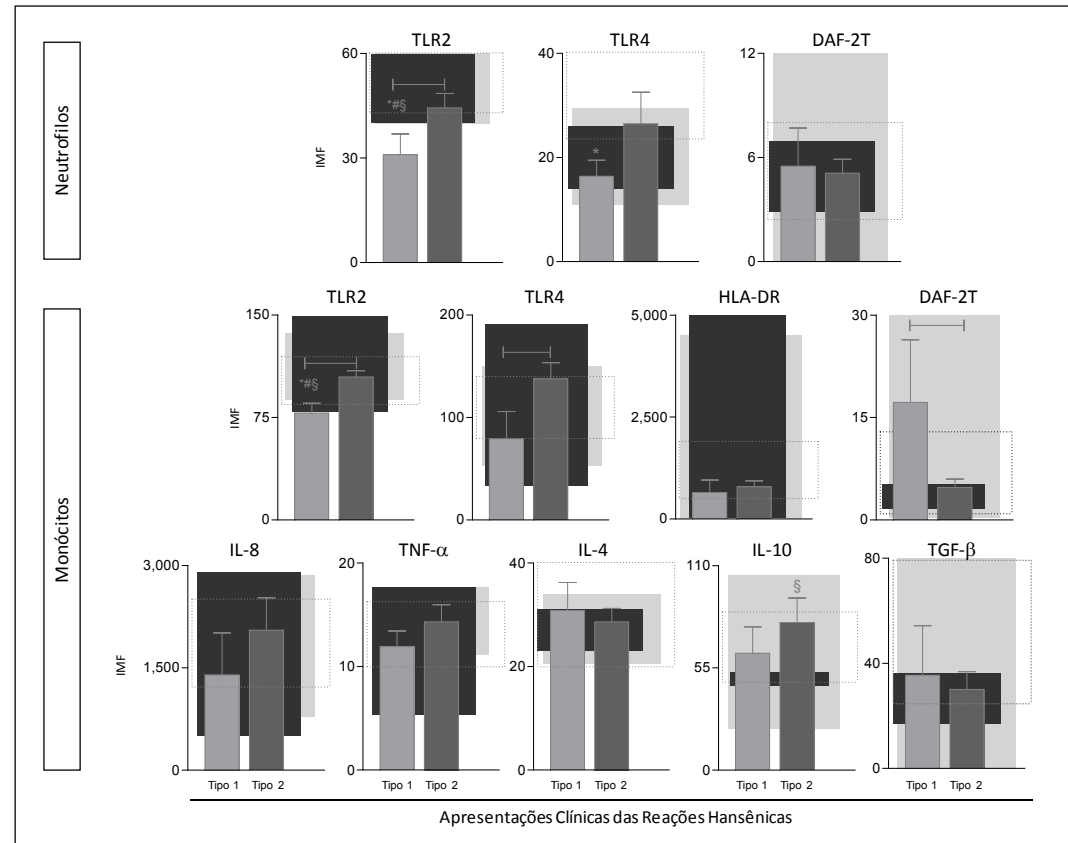


Figura 15 - Expressão de moléculas TLR2, TLR4, HLA-DR, Óxido Nítrico (DAF-2T) em Neutrófilos e Monócitos e citocinas IL-8, TNF- α , IL-4, IL-10 e TGF- β em Monócitos do sangue periférico de pacientes com diferentes formas clínicas da hanseníase e reações hansênicas. Os indivíduos do grupo de reação hansênica Tipo 1 estão representados pela barra cinza claro e os indivíduos do grupo de reação hansênica Tipo 2 estão representados pela barra cinza escuro. Os retângulos com borda pontilhada (□) representam o intervalo de confiança de 95% do grupo controle. Os retângulos na cor cinza (■) representam o intervalo de confiança de 95% do grupo de pacientes Tuberculóide e os retângulos pretos (■) representam o intervalo de confiança de 95% do grupo de pacientes do grupo Virchowiano. As diferenças estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle estão representados por asterisco (*), as diferenças estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo Tuberculóide estão representados por "number sign" (#), as diferenças estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo Virchowiano está representado por "section sign" (§) e as diferenças estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) em relação aos grupos de reações hansênicas Tipo 1 e Tipo 2 estão representados por linhas conectoras (—).

4.4 Expressão de moléculas TLR2, TLR4, HLA-DR, óxido nítrico (DAF-2T) e citocinas IL-8, TNF- α , IL-4, IL-10 e TGF- β em linfócitos do sangue periférico considerando as apresentações clínicas da hanseníase e as reações hansênicas.

Os resultados relativos a avaliação da porcentagem de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ no sangue periférico dos pacientes com as formas clínicas Tuberculóide (DD/DT/T) e Virchowiano (DV/V) e também reações hansênicas do Tipo 1 e Tipo 2 não apresentaram diferenças quando comparadas entre se e ao grupo de pacientes controles "saudáveis" (figura 16).

A avaliação da expressão da molécula TLR2 em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ mostrou que apenas os linfócitos T CD8⁺ do grupo de pacientes com reação hansênica do Tipo 2 apresentou aumento de expressão em relação aos grupos de pacientes Tuberculóide (DD/DT/T) e ao grupo de pacientes do grupo controle (figura 16). A avaliação da expressão do receptor TLR4 mostrou que apenas os linfócitos T CD4⁺ do grupo de pacientes com reação hansênica do Tipo 1 apresentou uma diminuição quando comparado ao grupo de pacientes grupo controle.

Em relação expressão de citocinas intracitoplasmáticas nos linfócitos, foi observado que os linfócitos T CD8⁺ do grupo de pacientes com reações hansênicas do Tipo 2 apresentaram maior expressão da citocina TNF- α quando comparado ao grupo de pacientes Tuberculóide (DD/DT/T). Verificou-se também que a expressão da IL-10 estava aumentada tanto nos linfócitos T CD4⁺ quanto nos linfócitos T CD8⁺ dos grupos com reações hansênicas (Tipo 1 e Tipo 2) quando comparadas ao grupo de pacientes controle, embora não apresentassem diferenças aos grupos forma clínica tuberculóide (DD/DT/T) e virchowiana (DV/V). A expressão de TGF- β mostrou um aumento nos linfócitos T CD8⁺ nos grupos de reações hansênicas do Tipo 1 e Tipo 2, sendo que do grupo de reações do Tipo 1 foi maior que todos os grupos avaliados, enquanto que o aumento na expressão desta citocina no grupo de reação hansênica Tipo 2 foi maior que a observada nos grupos Tuberculóide (DD/DT/T) e Virchowiana (DV/V), mas não do grupo controle (figura 16).

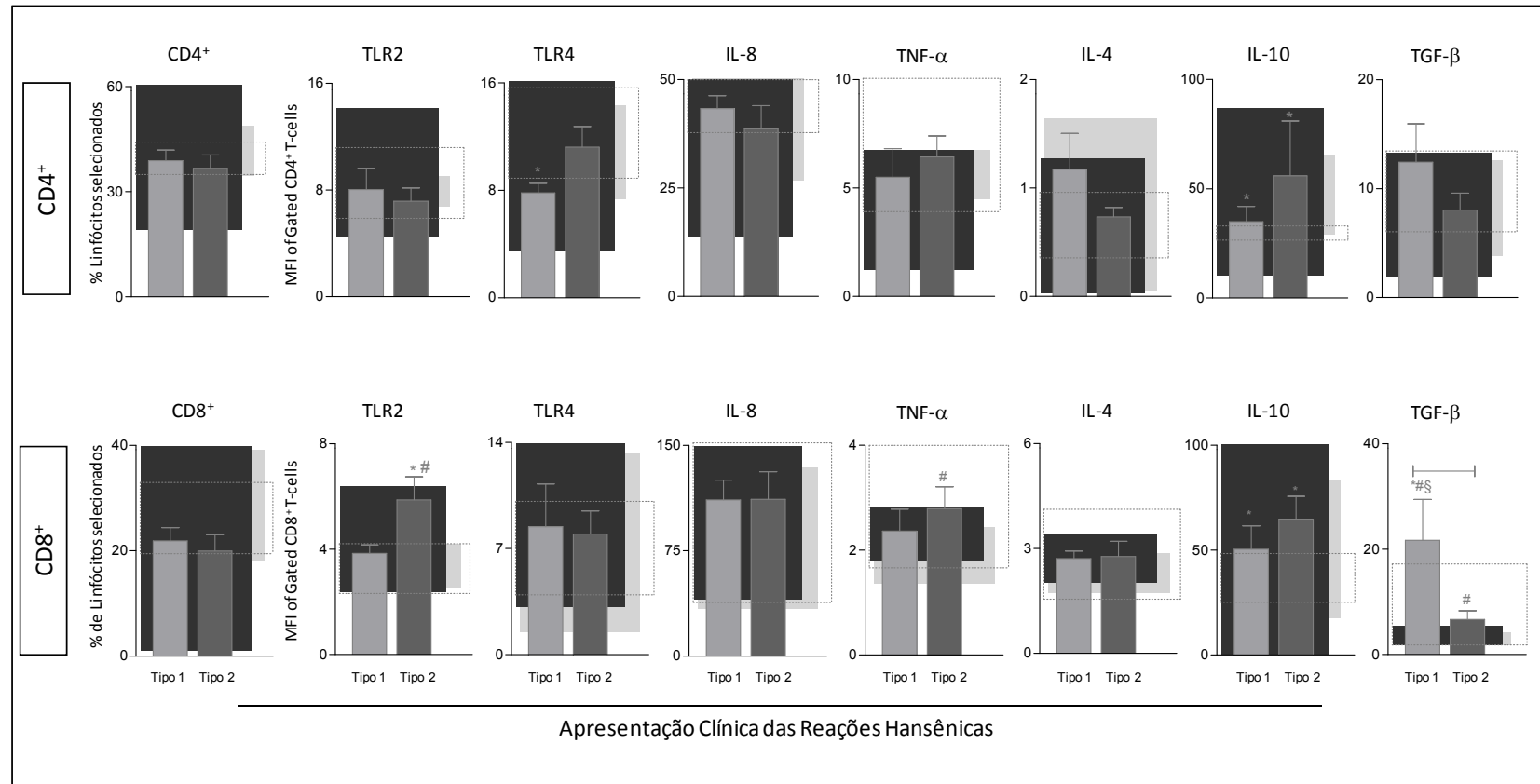


Figura 16 - Expressão de moléculas TLR2, TLR4, HLA-DR, Óxido Nítrico (DAF-2T) e citocinas IL-8, TNF- α , IL-4, IL-10 e TGF- β em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ do sangue periférico de pacientes com diferentes formas clínicas da hanseníase e reações hanseníacas. Os indivíduos do grupo de reação hanseníaca do Tipo 1 estão representados pela barra cinza claro e os indivíduos do grupo de reação hanseníaca do Tipo 2 estão representados pela barra cinza escuro. Os retângulos com borda pontilhada (□) representam o intervalo de confiança de 95% do grupo controle. Os retângulos na cor cinza (■) representam o intervalo de confiança de 95% do grupo de pacientes do grupo tuberculóide e os retângulos pretos (■) representam o intervalo de confiança de 95% do grupo de pacientes do grupo Virchowiano. As diferenças estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle estão representados por asterisco (*), as diferenças estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo Tuberculóide estão representados por "number sign" (#), as diferenças estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo Virchowiano está representado por "section sign" (§) e as diferenças estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) em relação aos grupos de reações hanseníacas Tipo 1 e Tipo 2 estão representados por linhas conectoras (—).

4.5 Perfil de biomarcadores da imunidade inata e adaptativa de leucócitos do sangue periférico de indivíduos com as formas clínicas da hanseníase e pacientes com reação hansênica após estímulo com bacilo *Mycobacterium leprae*.

Para apresentação destes resultados, os dados obtidos foram normalizados com o intuito de evitar possível viés de interpretação inerente a característica dos resultados quando avaliados individualmente. Sendo assim, os valores usados na construção dos gráficos da figura 17, foram obtidos a partir de valores de *baseline folds* (valor obtido a partir da razão da intensidade média de fluorescência dos biomarcadores obtidos nas células da cultura "*in vitro*" na presença do estímulo do *M. leprae*, pelo valor obtido da cultura controle, sem estímulo). Esta forma de análise torna possível eliminar qualquer diferença individual que possa haver entre a expressão do biomarcador na célula estimulada ou não, pois leva em consideração o nível basal de expressão do biomarcador e como comporta a resposta imune na presença do bacilo.

Os resultados desta análise estão representados por gráficos de radar referente a assinaturas de biomarcadores, gerados a partir da porcentagem de indivíduos que apresentaram um valor de *baseline folds* acima da mediana global. Os gráficos de radar construídos apresentam como ponto de corte a porcentagem de 50% e cada raio representa um tipo de célula e o biomarcador por ele expresso.

Uma análise do gráfico radar que envolve a resposta imune dos pacientes do grupo controle foi possível observar um equilíbrio entre a área da resposta imune inata (lado esquerdo do gráfico A, da figura 17) e da resposta imune adaptativa (lado direito do gráfico A, da figura 17).

Em relação a análise dos resultados da resposta imune de pacientes no grupo Tuberculóide e Virchowiano, pode-se observar que há uma expansão nas áreas imunidade inata e adaptativa, em relação ao grupo controle, mas com predomínio do padrão da resposta imune adaptativa (gráfico C e D, figura 17, respectivamente). Considerando o ponto de corte 50%, observou-se prevalência de expressão dos biomarcadores: CD4⁺TLR4⁺, CD4⁺TNF- α ⁺,

CD4⁺TGF-β⁺, CD4⁺TLR4⁺, CD8⁺TLR2⁺, CD8⁺TLR4⁺, CD4⁺TNF-α⁺, CD8⁺IL4⁺, CD4⁺TGF-β⁺, Neutrófilos TLR4⁺, Monócitos DAF-2T⁺, Monócitos TNF-α⁺, Monócitos IL-4⁺, Monócitos IL-10⁺ estava presente no grupo de pacientes com a forma Tuberculóide (gráfico B, figura 17). No grupo Virchowiano (gráfico C, da figura 17), os biomarcadores que tiveram acima do ponto de corte foram: CD4⁺IL-8⁺, CD4⁺TNF-α⁺, CD4⁺IL-4⁺, CD4⁺TGF-β⁺, CD8⁺TLR2⁺, CD8⁺TNF-α⁺, CD8⁺IL-4⁺, CD8⁺IL-10⁺, CD8⁺TGF-β⁺.

Em relação a análise dos resultados relativos a resposta imune dos indivíduos dos grupos de reação hansênica Tipo 1 e do Tipo 2 (gráfico D e E, figura 17, respectivamente), em uma visão geral o que se observa é que há uma redução tanto da imunidade inata quanto da adaptativa em ambos os grupos. Pode ser observado nos gráficos, que a maior redução ocorreu na área da resposta imune adaptativa, portanto, estes grupos apresentaram um predomínio da resposta imune inata. Os biomarcadores que apresentaram ponto de corte acima de 50% no grupo de pacientes com reação do Tipo 1 foram: Neutrófilo TLR2⁺, Neutrófilo TLR4⁺, Neutrófilo DAF-2T⁺, Monócitos HLA-DR⁺, Monócitos TGF-β⁺, CD4⁺, CD4⁺TLR2⁺, CD4⁺TNF-α⁺, CD4⁺IL-4⁺, CD8⁺ (gráfico D, da figura 17). Os biomarcadores que apresentaram ponto de corte acima de 50% no grupo de pacientes com reação do Tipo 2 foram: Neutrófilo TLR4⁺, Monócito DAF-2T⁺, Monócito IL-4⁺, Monócito IL-10⁺, CD4⁺, CD4⁺TLR4⁺, CD4⁺IL-8⁺, CD8⁺TLR4⁺, CD8⁺IL-8⁺ (gráfico E, da figura 17).

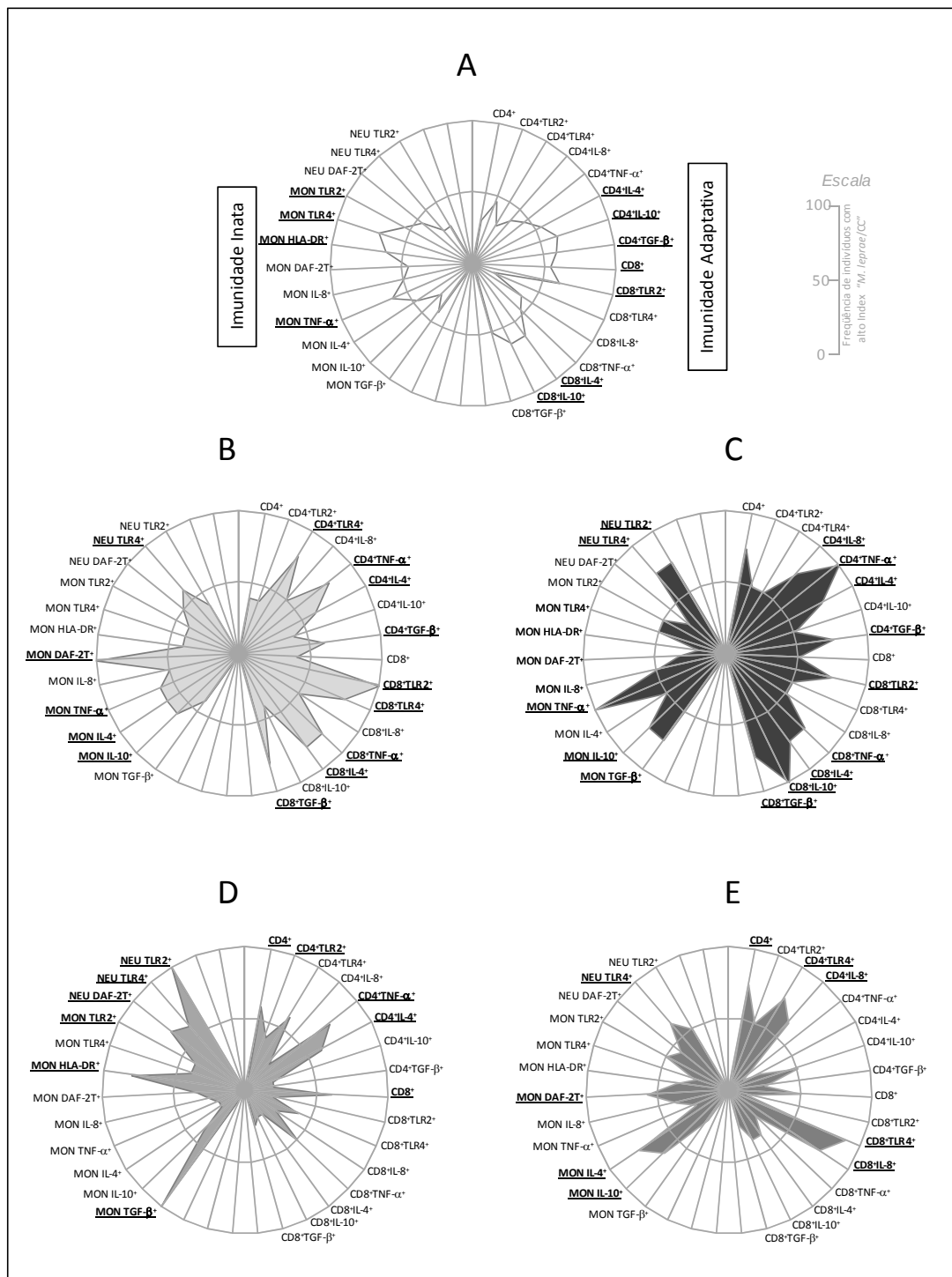


Figura 17 - Perfil de biomarcadores da imunidade inata e adaptativa de leucócitos do sangue periférico de indivíduos com as formas clínicas da Hanseníase e pacientes com reação hansênica após estímulo *in vitro* com bacilo *Mycobacterium leprae*. Os gráficos representam a porcentagem de indivíduos que apresentaram níveis de biomarcadores acima da mediana global, sendo que a linha central é o ponto de corte, fixado em 50% e a linha externa representa 100% e cada raio representa um biomarcador avaliado. A) Grupo de pacientes controles "saúdáveis"; B) Grupo de Pacientes da forma Tuberculóide; C) Grupo de Pacientes da forma Virchowiana; D) Grupo de pacientes com reação hansênica do tipo 1; E) Grupo de pacientes com reação hansênica do tipo 2. Os valores apresentados em Negrito e sublinhado, corresponde a valores acima da linha central que é o ponto de corte, fixado em 50%

4.6 Resumo das alterações fenotípicas e funcionais observados em células da imunidade inata e adaptativa dos pacientes com hanseníase e reações hansênicas.

A seguir serão apresentados de forma sumária os resultados que foram obtidos nas análises dos biomarcadores observados em leucócitos circulantes imunidade inata e adaptativa em todos os grupos avaliados que foram: formas clínicas da hanseníase, grupos Tuberculóide e Virchowiano e reações hansênicas, Tipo 1 e Tipo 2.

Primeiramente foi realizada uma síntese das principais alterações dos biomarcadores encontrados nos leucócitos, conforme pode ser visualizado na figura 18A. A partir da análise dos resultados observados nesta figura, foi construído o diagrama de Venn, que simboliza os grupos de pacientes estudados e permite representar as relações existentes entre eles (figura 18B).

Ao analisar o diagrama de Venn foi observado que não houve biomarcador exclusivo no grupo de pacientes do grupo Tuberculóide (DD/DT/T). Os biomarcadores exclusivos do grupo Virchowiano (DV/V) foram dois: aumento de MON HLA-DR e de linfócitos T $CD8^+IL10^+$. Os biomarcadores exclusivos dos pacientes do grupo com reação hansênica Tipo 1 foram: diminuição de NEU $TLR2^+$, MON $TLR2^+$, $CD4^+ TLR4^+$ e aumento de NEU $NO-DAF-2T^+$, MON $TLR2^+$, MON $HLA-DR^+$, $CD4^+ TLR2^+$ e $CD8^+$. Os biomarcadores exclusivos do grupo de pacientes com reação hansênica Tipo 2 foram: aumento de MON $IL-10^+$ e de $CD8^+IL-8^+$. Os biomarcadores em comum, interseção, entre o grupo de pacientes Tuberculóide e Virchowiano foram: diminuição de MON $TGF-\beta^+$ e aumento de MON $TNF-\alpha^+$, $CD4^+ TGF-\beta^+$, $CD8^+ TLR2^+$, $CD4^+ TGF-\beta^+$, $CD8^+ TNF-\alpha^+$, $CD8^+ IL-4^+$, $CD8^+ TGF-\beta^+$. O biomarcador em comum entre o grupo de pacientes com reação hansênica do Tipo 1 e do Tipo 2 foi o aumento de linfócitos T $CD4^+$. Os biomarcadores que se mostraram universais, ou seja, compartilhados entre todos os grupos estudados foram os aumentos de expressões de MON $IL-10^+$ e NEU $TLR-4^+$.

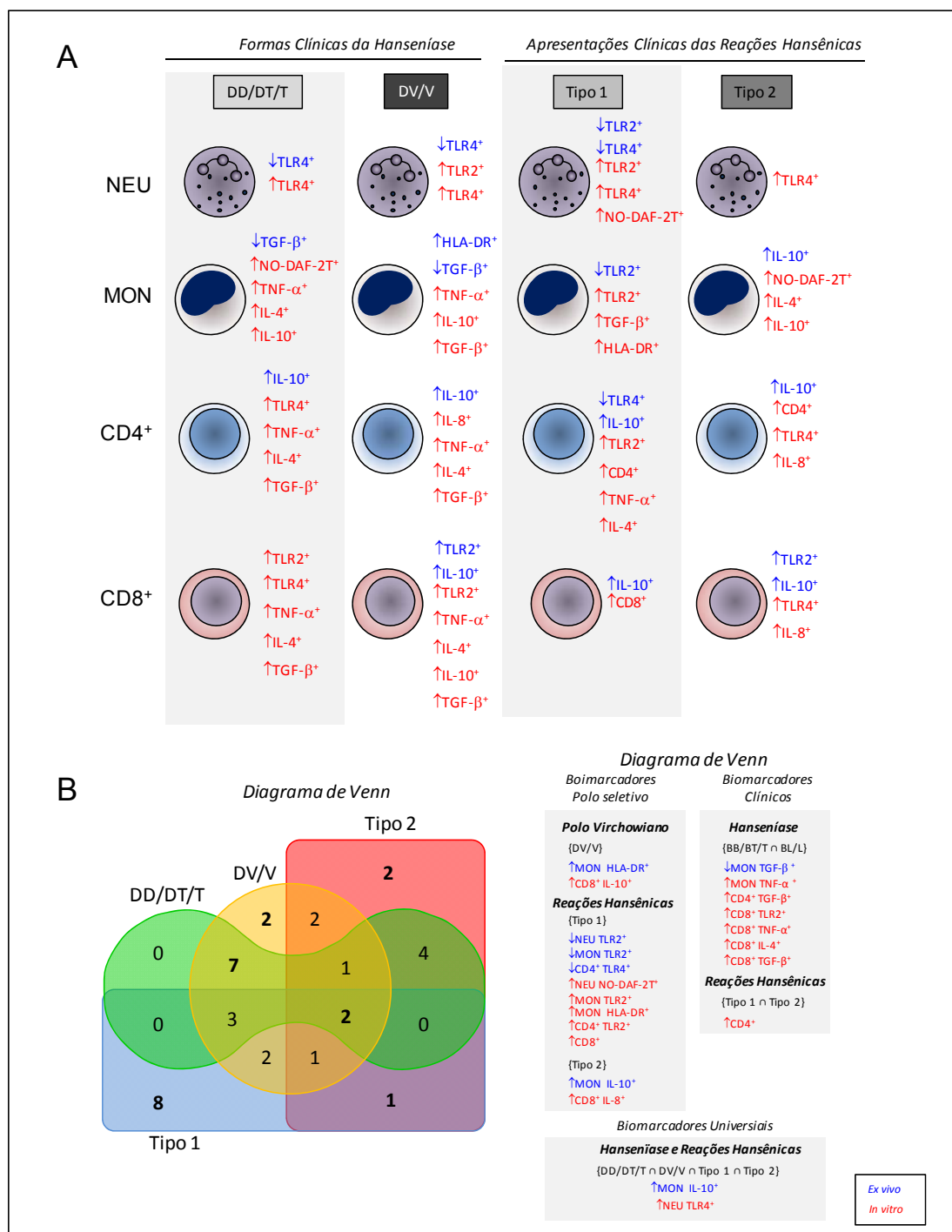


Figura 18 Sumário das alterações fenotípicas e funcionais observados em células da imunidade inata e adaptativa dos pacientes com hanseníase e reações hansênicas. (A) Síntese das alterações dos biomarcadores observados nos leucócitos que apresentaram alterações quando avaliados empregando protocolos de avaliação *ex vivo* (azul) e em cultura na presença do estímulo de *M. leprae*, *in vitro* (vermelho). As setas (↑ ↓) representam aumento ou diminuição de expressão. (B) Representação gráfica do Diagrama de Venn assimétrico expressando, sob a forma de conjuntos de diferentes cores, os grupos de pacientes do pólo Tuberculóide (DD/DT/T, ●●), pacientes do pólo Virchowiano (DV/V, ●), pacientes com reação hansênica Tipo 1 (Tipo 1, ■) e pacientes com reação hansênica Tipo 2 (Tipo 2, ■). As intercessões dos grupos foram representadas pela sobreposição das cores dos respectivos grupos. Os valores internos no diagrama representam o número de biomarcadores exclusivos ou compartilhados (representados pelas interseções) dos grupos estudados e este biomarcadores estão descritos na parte inferior direita da figura.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *M. leprae*, um bacilo intracelular que infecta primariamente fagócitos (células dendríticas, monócitos e macrófagos) e células de Schwann (Araújo, 2003; Manca *et al.*, 2012). Esta doença pode apresentar diferentes formas clínicas no homem e a resposta imune do hospedeiro é um fator crucial para o curso da hanseníase (Jarduli *et al.*, 2013). O intrigado espectro das manifestações clínicas existentes para a doença demonstra duas formas polares, tuberculóide e virchowiana, e as formas intermediárias denominadas dimorfas (dimorfa tuberculóide, dimorfa-dimorfa e dimorfa-virchowiana). A manifestação tuberculóide é a menos severa, apresenta-se sob a forma de lesões hipopigmentadas com poucos nervos espessados levando a uma diminuição da sensibilidade das extremidades da pele (Araújo, 2003). Está associada à resposta imune celular, caracterizado pela produção de citocinas pró-inflamatórias que podem participar na eliminação do bacilo. A baixa carga de bacilos existentes nas lesões e, quando presentes, contidos nos granulomas são características desta forma clínica. A forma virchowiana constitui o oposto da primeira forma descrita, a carga bacteriana é difusa podendo causar placas, nódulos e numerosas zonas anestésicas na pele, devido a danos nos nervos periféricos. A resposta imune é caracterizada por citocinas de perfil imunossupressivo, fazendo ser uma resposta problemática para o paciente (Ridley & Jopling, 1966).

Durante o curso crônico da hanseníase podem ocorrer episódios reacionais imunologicamente agudos que leva prejuízos nos nervos e as inabilidades. As reações hansênicas são fenômenos inflamatórios que podem acontecer devido a alterações no balanço imunológico entre o hospedeiro e o bacilo e que estão diretamente envolvidos com a morbidade e incapacidade da função do nervo periférico. Estes episódios, podem acontecer antes do diagnóstico e até mesmo após o término do tratamento (Goulart, 2002; Araújo, 2003) e estas reações podem ser classificadas em Tipo 1 (Reação Reversa - RR) e Tipo 2 (Eritema Nodoso Hansênico - ENH).

A reação do Tipo 1 ocorre geralmente no início do tratamento, devido provavelmente, à lise dos microrganismos e a liberação de antígenos que

levam a uma resposta imunológica, com aumento de citocinas com características de resposta imune celular, por exemplo TNF- α . A reação do tipo 2 acontece quase que exclusivamente na forma virchowiana da doença e se caracteriza por elevados níveis de TNF- α e formação de imunocomplexos (Yamamura *et al.*, 1992).

Pires *et al.* (2015), ao estudar as co-morbididades HIV-hanseníase, verificaram que há uma diminuição na frequência da ocorrência de reações hansênicas nos indivíduos acometidos por ambas as doenças. Quando acontecem, a reação do tipo 1 é a mais comum. Segundo estes autores, a ocorrência dos surtos reacionais da hanseníase nos indivíduos co-infectados tem sido associado a melhora da imunossupressão causada pelo vírus.

O tropismo celular para *M. leprae* inclui principalmente os macrófagos residentes nos tecidos da pele e do trato respiratório superior e as células de Schwann do sistema nervoso periférico. A habilidade do sistema imune inato de reconhecer os patógenos é mediado por famílias de padrões de receptores de reconhecimento altamente conservados que ativam as vias de defesa do hospedeiro. Uma destas famílias é compreendida como *Toll Like Receptors* (TLR) são expressas por uma variedade de células com cada membro da família dotado de habilidade para reconhecer distintas classes de moléculas conservadas de patógenos (Takeuchi *et al.*, 2000; Blander & Medzhittov, 2004). Existem diferentes mecanismos de ativação de TLR que podem contribuir para a defesa do hospedeiro e serem diretamente mediada pela resposta imune inata, na regulação de fagócitos, induzindo atividade antimicrobica (Blander & Medzhitov, 2004; Doyle *et al.*, 2004; Thoma-Uszynski *et al.*, 2001). Mas há também pela indução da liberação de citocinas com diferenciação de células dendríticas imaturas tornando-as maduras, permitindo o sistema imune inato, instruir uma resposta imune adaptativa (Medzhitov *et al.*, 1997; Brightbill *et al.*, 1999). Os TLRs possuem a função de iniciar uma cascata, que em última análise, ativa genes regulados por NF- κ B, um fator de transcrição das citocinas pro-inflamatórias, das quimiocinas e também das moléculas co-estimulatórias requeridas para ativação de células T.

Membros da subfamília de TLR2 que inclui TLR1, 2, 6 e 10, são os únicos com habilidade de formar complexos heterodímeros. O TLR2, por

exemplo, ao formar heterodímero com TLR1 é capaz de reconhecer lipoproteínas triaciladas de bactérias gram positivas, gram negativas e ácidos resistentes (Aliprantis *et al.*, 1999; Takeuchi *et al.*, 2002). São também capazes de reconhecer manose-lipoarabinomanana (LAM) ou arabinose-lipoarabinomanana (AraLAM) do bacilo *M. leprae* (Means *et al.*, 1999; Tapping & Tobias, 2003). A ligação desta lipoproteína pode promover apoptose das células de Schwann quando em ligação com TLR2 (Oliveira *et al.*, 2003). Portanto, este receptor é considerado imunorregulador porque possui a capacidade de ativar macrófagos. É também sabido que ele está claramente envolvido na resposta imune inata contra micobactérias e, quando ativado tem a capacidade de iniciar uma resposta protetora relacionada com a secreção de IL-12/23 e a diferenciação de macrófagos e células dendríticas (Krutzik *et al.*, 2003; Verreck *et al.*, 2004). Estas células, por sua vez, têm a função de apresentar o antígeno e ativar células T virgens através da secreção de IL-12 (Demangel & Britton, 2000), podendo levar à expansão e diferenciação de células Th1 produtoras de interferon (IFN- γ), que induz os elementos da resposta imune responsáveis pela eliminação do bacilo, controlando a evolução da doença (Mendonça *et al.*, 2008).

Apesar da maioria dos estudos que envolvem TLR terem como foco sua caracterização nas células do sistema imune inato (neutrófilos e monócitos), há evidências de que estes receptores são importantes para as células com função na resposta adaptativa, o receptor TLR2 por exemplo, também pode ser expresso em linfócitos T (Reynolds & Dong, 2013). Em nosso trabalho, o receptor TLR2 não se apresentou alterado nos neutrófilos, monócitos e nos linfócitos T CD4⁺ ("*in vivo*") dos pacientes do grupo Tuberculóide e Virchowiano, mas se mostrou alterado nas células T CD8⁺, sendo superior no grupo de pacientes Virchowiano em relação aos grupos controle e Tuberculóide. De acordo com Oliveira *et al.* (2003), ao avaliar a expressão de TLR2 em células de Schwann verificou que este receptor, como em nosso trabalho, não apresentou mudança de expressão após sua ativação com a lipoproteína sintética de 19kDa de *M. leprae* e sugere que seu aumento estaria ligado a apoptose destas células nervosas causando danos neurais.

Mostramos também que nos grupos de pacientes com reações

hansênicas, o TLR2 foi inferior em monócitos e neutrófilos do grupo de pacientes com reação Tipo 1 em relação a todos os outros grupos estudados. Nos linfócitos T CD8⁺ este receptor se mostrou superior no grupo de reação hansênica do Tipo 2 em relação aos grupos controle e de pacientes do grupo Tuberculóide. Lee *et al.* (2010) ao estimular monócitos com peptídeo de 19kDa de *M. leprae* verificou um aumento deste receptor no grupo de pacientes com reação do tipo 2 em comparação aos pacientes com a forma clínica virchowiana. Segundo eles, o aumento de TLR2 provavelmente regularia a expressão de selectina nas células endoteliais para ligação dos neutrófilos, contribuindo no processo inflamatório. Segundo Bochud *et al.* (2008) polimorfismos existentes nos genes de TLR2 podem influenciar na ocorrência de reação hansênica e os dados do seu trabalho sugerem que a expressão de TLR2 pode ter um significativo papel na mudançada resposta imune e que influencia na ocorrência das reações hansênicas.

O receptor TLR4 também tem sido relacionado à função de reconhecimento de micobactérias. O ligante clássico para este receptor é o lipopolissacarides (LPS), derivado de membranas de bactéria gram negativa. Mesmo sendo o LPS ausente em membranas de micobactérias, estudos em células transfectadas e macrófagos murinos tem mostrado que os bacilos *M. leprae* e *Mycobacterium tuberculosis* são reconhecidos por TLR4 (Means *et al.*, 1999a e b). O TLR4 é capaz de induzir maturação e secreção de citocinas pro-inflamatórias nas células dendríticas (Jung *et al.*, 2011). Em nosso trabalho, a expressão de TLR4, em neutrófilos e monócitos, nos grupos de hanseníase, Tuberculóide e Virchowiano, foi inferior em relação ao grupo controle, mas não se mostrou alterada entre as células T CD4⁺ e CD8⁺. Entre os grupos de indivíduos com reação hansênica, a expressão deste receptor foi menor nos neutrófilos e linfócitos T CD4⁺ do grupo de pacientes com reação do Tipo 1. Nos monócitos, a expressão de TLR4 apresentou diferença entre os grupos de reação do Tipo 1 e do Tipo 2, sendo maior no segundo grupo. Existem poucos trabalhos na literatura que relacionam TLR4 à hanseníase, embora Bochud *et al.* (2009) não tenha associado o receptor a uma forma clínica da hanseníase ele sugere que o seu polimorfismo poderia interferir na suscetibilidade à

doença e acrescentam ainda que a sinalização de *M. leprae* pode mediar a nível celular a modulação de TLR4.

Um mecanismo imuno-regulatório dependente de TLR, principalmente TLR2, é a produção de iNOS pelas células do sistema imune inato (Hart & Tapping, 2012). Ativação de macrófagos leva a produção de citocinas como IL-12, IFN- γ e TNF- α que induz produção de óxido nítrico (NO) através de iNOS (Boga *et al.*, 2010). O NO, combina com reativos de oxigênio intermediário no fagolisossomo e produz altos níveis de peroxinitrito tóxico. Esta molécula está diretamente associada com resposta imune mediada por células uma vez que participa diretamente da morte da micobactéria (Das *et al.*, 2010; Talaue *et al.*, 2006; Lockwood *et al.*, 2011). Na hanseníase, a expressão de iNOS tem sido relatado localmente em biopsias da pele usando anticorpos monoclonais (Lockwood *et al.*, 2011). Em alguns estudos, o produto final do óxido nítrico, nitrato (NO₃) e nitrito (NO₂), têm sido avaliados a partir do soro de pacientes usando a reação de Griess (Boga *et al.*, 2010). Em nosso trabalho para avaliação da produção de oxido nítrico, empregamos uma metodologia que utiliza uma sonda, o diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2DA). A metodologia se baseou na capacidade que o NO tem de oxidar esta sonda não-fluorescente para uma forma fluorescente (DAF-2T). A medida desta fluorescência é realizada pela leitura da amostra no citômetro de fluxo que será proporcional à concentração de NO nas células (Schachnik *et al.*, 2009)

Os estudos de Lockwood *et al.* (2011) mostraram altos níveis de iNOS em macrófagos e células epiteliais provenientes de biopsias da derme, granuloma e zona subepitelial das lesões de pacientes com a forma clínica tuberculóide e dimorfo-tuberculóide. Nas lesões dimorfo-virchowiana a detecção foi inferior aos grupos anteriormente citado e, nas lesões virchowiana não houve detecção desta enzima. Estes dados confirmam que a expressão de iNOS está associada a resposta imune mediada por células. Boga *et al.* (2010) compararam em seu trabalho os metabólitos de NO, NO₃ e NO₂, no soro de pacientes com hanseníase clinicamente classificados em paucibacilares (PB) e multibacilares (MB), e grupos dos tipos de reações causadas por esta doença, Tipo 1 e Tipo 2, separados em grupos tratados e não tratados com poliquimioterapia (PQT) por no mínimo seis meses. Das análises realizadas,

verificaram que os metabólitos de NO do grupo de indivíduos MB, não tratados com PQT, e indivíduos com reação do Tipo 1, foi superior ao grupo de indivíduos saudáveis. Pacientes MB, em tratamento de PQT teve redução nos níveis de nitrito. Similarmente, houve redução dos níveis de nitrito nos pacientes com reação do Tipo 1 em tratamento de PQT e prednisona. Pacientes com reação do Tipo 1, multibacilares (MB), em tratamento, apresentaram um valor de NO mais alto do que indivíduos paucibacilares (PB). O autor cita que o tratamento com esteróides inibe NF- κ B que por sua vez impede a produção citocinas e isto tem como consequência a redução de níveis de NO. Os resultados que obtivemos, não corroboram com os descritos anteriormente por Boga *et al.* (2010), visto que não encontramos diferença na produção de NO quando avaliados nos neutrófilos e monócitos nos grupos de pacientes com hanseníase, Tuberculóide e Virchowiano e com reação hansênica, Tipo 1 e Tipo 2, este fato que pode ter ocorrido devido ao emprego de uma metodologia diferente que avalia o NO intracitoplasmático e também o protocolo experimental, pois avaliamos em cultura de leucócitos sob estímulo do bacilo.

Lockwood *et al.* (2011) relata em seu artigo que a classificação proposta pela OMS, usado para separar os grupos de pacientes do trabalho de Boga *et al.* (2010), é muito heterogênea em relação a proposta de classificação de Ridley & Joplin (1966). E reafirmam que por levar em consideração aspectos imunológicos na forma de classificar a hanseníase, estes últimos autores devem ser a referência para a determinação das formas clínicas da hanseníase nos trabalhos científicos.

A moléculas de HLA tem importante papel na apresentação de peptídeos derivados de *M. leprae* para os linfócitos T do hospedeiro e então promover a ativação linfocitária e conseqüentemente a imunorregulação (Jarduli *et al.*, 2013). Escamilla-Tilch *et al.* (2013) ao investigar a associação de genes de HLA-DRB1 com a hanseníase em uma população mexicana identificou apenas 2 alelos que exibiam diferença significativa na frequência entre pacientes e controle; observaram uma frequência significativamente alta no alelo HLA-DRB1*01 do grupo de MB comparado entre controles. Esta associação foi confirmada quando realizaram uma análise nos grupos

baseados na classificação clínica e associaram o alelo HLA-DRB1*01 com formas virchowiana e dimorfas da hanseníase. O alelo HLA-DRB1*07 esteve associado com a hanseníase dimorfa. Segundo estes autores (Escamilla-Tilch *et al.*, 2013), os dados confirmam o papel do HLA na suscetibilidade genética para o desenvolvimento da hanseníase em várias populações do mundo e também confirmam o papel do HLA-DR na evolução da doença. Os autores citam ainda, que o locus de HLA-DRB1*01 e HLA-DR*08 podem ser um novo marcador genético para a suscetibilidade ou proteção contra a hanseníase. Considerando também que ele possa ser empregada como um biomarcador devido sua expressão ter sido aumentada nos pacientes do grupo Virchowiano e no grupo de pacientes com reação hansênica do tipo 1. Em nosso trabalho, a avaliação da expressão da molécula HLA-DR nos monócitos do grupo de pacientes Virchowiano foi estatisticamente superior ao grupo controle e não observamos diferença na expressão desta molécula nos monócitos do grupo de paciente Tuberculóide quando comparada com o grupo Virchowiano. Também não foi encontrado diferença na expressão da molécula quando comparado com os monócitos dos grupos de pacientes com as reação hansênica e grupos de pacientes com hanseníase. Mas a análise que leva em consideração o nível basal do indivíduo através do calculo do índice (figura 16, letra D), verificamos um aumento da expressão de HLA-DR no grupo de indivíduos com reação reversa (Tipo 1). Estes dados corroboram com os observados por Shibuya (2014) que encontrou em monócitos clássicos destes mesmos grupos de pacientes o aumento na expressão de MHC II. Segundo o autor este biomarcador pode contribuir para as neurites destes indivíduos.

O bacilo *M. leprae* é um microorganismo que possui uma fraca capacidade de ativar monócitos, células dendríticas e desencadear a liberação de citocinas pró-inflamatórias. É um bacilo que estimula a produção de TNF- α e IL-10, mas inibe a indução de IL-1 β em resposta a um segundo estímulo (Manca *et al.*, 2012). Braga *et al.* (2015) citam em seu trabalho que a diferenciação de monócitos em células dendríticas não é alterada devido a presença produtos derivado de sonicação do bacilo mas que a expressão de HLA-DR, CD40, CD80, CD86 pode estar aumentada e a citocina IL-12 pode ser diminuída. Sinsimer *et al.* (2010), com o objetivo de entender o processo de

ativação celular em resposta ao patógeno, avaliaram a capacidade de expressão de citocinas na presença do bacilo. Foram realizadas interações de monócitos isolados de sangue de indivíduos saudáveis com *M. leprae* e foi usado *M. bovis* (BCG) como controle positivo, um potente estimulador de resposta imune inata usado na vacinação contra tuberculose em humanos. Os dados dos autores sugeriram que *M. leprae* desempenhou um papel no controle da produção de citocinas de monócitos pelo fornecimento de sinais regulatórios tanto positivamente quanto negativamente via múltiplas sinalizações envolvendo NF- κ B, PI3K e enzima conversora de IL-1 β e (ICE)-Caspases. Foi possível observar que o bacilo de Hansen induz altos níveis moléculas reguladoras negativas de IL-1 (IL-1Ra) e MCP-1, e que, embora seja um fraco estimulador, possui a capacidade de influenciar no aumento de expressão de TNF- α e IL-10 em resposta a forte indução de um estímulo secundário.

Segundo Tarique *et al.* (2015), pacientes com hanseníase apresentam um estado onde as variações na produção das citocinas irão determinar as formas clínicas da doença. Resumidamente, o curso clínico da hanseníase ocorre pela presença de citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias. Pacientes Tuberculóide apresentam um padrão de citocinas de perfil pro-inflamatório, que é caracterizado pela produção de citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-7, IL-12, IL-15 e IL-18 nas lesões de pele. Ao contrário, pacientes Virchowiano apresentam resposta regulador com alta produção de TGF- β , IL-4, IL-5 e IL-10 (Jarduli *et al.*, 2013).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que pode ser produzida por células tumorais ou outras células em resposta a um estímulo inflamatório, infecção ou stress (Jarduli *et al.*, 2013). Há evidências que seu envolvimento seja benéfico para o paciente com hanseníase, uma vez que está envolvido na formação de granulomas. Pode ser produzida por macrófagos ativados na forma tuberculóide (Lockwood *et al.*, 2011; Jarduli *et al.*, 2013) mas em altos níveis tem a possibilidade de causar dano tecidual e neural (Vanderborcht *et al.*, 2004). Esta citocina possui a capacidade de promover ativação de macrófagos, para a destruição intracelular de *M. leprae* e potencializar os efeitos do IFN- γ (Jarduli *et al.*, 2013). Lockwood *et al.* (2011), detectaram

TNF- α em 78% das biopsias da pele. Segundo os autores a citocina estava presente em macrófagos de células epitelióides e de granulomas e sua expressão foi detectada predominantemente em macrófagos de pacientes com as formas dimorfo-tuberculóide, mas também pode ser encontrados em pacientes dimorfo-virchowiano, virchowiano e com reação hansênica do Tipo 1. Esta citocina não foi observada na derme ou em nervos da derme destes pacientes. Nos pacientes com reação hansênica do Tipo 2 a alta presença desta citocina em macrófagos se destacou diante dos outros grupos estudados. Stefani *et al.* (2009) avaliando níveis de TNF- α no plasma empregando a metodologia de "*multiplex bead assay*", citam que apesar de existirem vários estudos indicando um importante papel da citocina nas reações hansênicas, especialmente nos pacientes com eritema nodoso hansênico, os seus resultados indicaram que os níveis foram baixos entre os pacientes com reação hansênica do Tipo 2 e não foram diferentes dos pacientes sem reação. Nossos resultados corroboram com os encontrados neste trabalho uma vez que a expressão desta citocina não apresentou diferença nos monócitos e linfócitos T CD4⁺, entre os grupos com hanseníase (Tuberculóide e Virchowiano) em relação o grupo controle. Além disto, nos linfócitos T CD8⁺, expressão de TNF- α nos pacientes do grupo Virchowiano foi superior ao grupo Tuberculóide. Nos monócitos de pacientes com reação do Tipo 2, a expressão foi superior aos pacientes do grupo Virchowiano. Nos linfócitos T CD4⁺ dos pacientes com reação hansênica não houve diferença de expressão da citocina entre os grupos estudados e, nos linfócitos T CD8⁺, a expressão foi superior no grupo de pacientes com reação do tipo 2 em relação a pacientes do grupo Tuberculóide.

Como sabido, a citocina IL-4 possui atividade imunoreguladora negativa sobre a imunidade mediada por células, o que pode levar ao aumento da proliferação bacteriana. Dentre as suas propriedades pode citar que são capazes de bloquear a proliferação dependente de IL-2 de células T humanas, por inibir receptores de IL-2, bloquear a ativação de monócitos mediados pelo IFN- γ , inibir a expressão de CD14 sobre monócitos na produção de IL-1 β e TNF- α e bloquear a geração de óxido nítrico, necessário para a destruição de patógenos intracelulares (Salgame *et al.*, 1991; Sieling & Modlin, 1994a). Na

Hanseníase, a IL-4 pode contribuir para o aumento de anticorpos anti-PGL-1 em pacientes virchowiano e em sobrenadantes de cultura de células T CD8⁺ (Salgame *et al.*, 1991; Sieling *et al.*, 1993). No soro destes pacientes podem ter também um papel na diferenciação e mudança de classe de imunoglobulinas de células B, bem como na habilidade para estimular proliferação células Th2 (Sieling *et al.*, 1993). Sampaio *et al.* (2012), sugere que a IL-4 possa ser usado como um biomarcador que auxilie na identificação de uma possível tendência do indivíduo evoluir para o pólo virchowiano da hanseníase. Em nosso trabalho, embora a IL-4 não tenha apresentado diferenças na expressão entre os tipos celulares dos pacientes com hanseníase e com reação hansênica, ela talvez possa ser um marcador indicativo de evolução. Em nossa abordagem que emprega o índice e avalia os níveis de biomarcadores da população, considerando a mediana global de cada grupo, a expressão desta citocina mostrou-se acima da mediana nos grupos de pacientes com hanseníase (Tuberculóide, Virchowiano e reação hansênica, Tipo 1 e 2), e esteve aumentada em Monócitos e linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, conforme pode ser visto nos radares da figura 17 (A, B, C, D e E).

A IL-10, assim como a IL-4, é outra citocina que está envolvida na regulação inflamatória e nas respostas imunológicas. Ela pode ser produzida por monócitos e por células T ativadas. Sua ação não somente afeta o sistema imune, mas pode influenciar também em alguns processos fisiológicos incluindo a angiogênese, tumorigênese e infecção (Jarduli *et al.*, 2013). Uma ativação crônica local de IL-10 pode levar a uma diferenciação de células TCD4⁺, originando uma subpopulação de células T regulatórias que produzem altos níveis de IL-10, mantendo a supressão da resposta imune antígeno-específica (Asseman & Powrie, 1998). Madan *et al.* (2011) em seu trabalho descrevem que a citocina IL-10 é expressa em plasma de indivíduos paucibacilar e multibacilar, sendo a maior expressão nesta última forma clínica. Não houve diferença nos níveis da expressão desta citocina entre indivíduos dimorfo-tuberculóide e tuberculóide em relação aos indivíduos dimorfo-virchowiano e virchowiano. Indivíduos com reação hansênica apresentou uma expressão maior em comparação aos indivíduos com hanseníase. Comparando os dois grupos com reação hansênica, os pacientes com reação

do tipo 2 apresentou maior expressão de IL-10 em relação a pacientes com reação do tipo 1. Estes mesmos autores citam que a esta citocina desempenha um papel importante na patogênese da reação hansênica do tipo 2. O seu alto nível pode aumentar a resposta de células B e consequentemente aumenta a formação de anticorpos, o que potencializa a formação de imunocomplexos. E ainda acrescentam que com os resultados encontrados no trabalho, levam a uma conclusão de que o aumento de IL-10 pode predizer a ocorrência de reação do Tipo 1 ou do Tipo 2. Resultados obtidos por Tarique *et al.* (2015) corroboram com os obtidos por Madan *et al.* (2011) quando relataram que IL-10 esteve presente tanto na forma tuberculóide quanto na forma virchowiana mas o alto nível encontrado foi em pacientes multibacilares em comparação com indivíduos paucibacilar. Palermo *et al.* (2012), ao combinar duas técnicas empregados para avaliar a resposta imune de pacientes com hanseníase mostram em seu trabalho que tanto em culturas de células mononucleares de sangue periférico (PBMC), estimulado com MLCwA, antígeno proveniente de uma preparação da parede celular de *M. leprae*, quanto em imunohistoquímica, a produção da citocina IL-10 foi superior em pacientes com as formas Virchowiano do que em pacientes com a forma Tuberculóide da hanseníase confirmando a idéia do papel supressivo da citocina nas lesões Virchowiana e na capacidade que ela possui de inibir a resposta pró-inflamatória permitindo a proliferação bacilar. Os resultados que obtivemos, em um contexto geral corroboram com os anteriores descritos uma vez que embora a avaliação a expressão da IL-10, nos monócitos de pacientes com hanseníase Tuberculóide e Virchowiano, não tenha sido observado alteração em relação ao grupo controle, em contra partida, nos linfócitos T CD4⁺ a citocina se mostrou aumentada em relação aos indivíduos sem a doença. E também, nos linfócitos T CD8⁺ a expressão da citocina IL-10 apresentou-se aumentada no grupo de pacientes Virchowiano em relação ao grupo controle. Nos monócitos de pacientes com reação do tipo 2 a expressão se mostrou aumentada em relação ao grupo Virchowiano. Nos linfócitos T estudados, CD4⁺ e CD8⁺, a citocina de ambos os grupos de reação hansênica, Tipo 1 e Tipo 2, se mostrou aumentada em relação ao grupo dos indivíduos controle.

A citocina TGF- β possui propriedade pro e anti-inflamatória. Ela é capaz de induzir a angiogênese e controlar mediadores inflamatórios e por isto auxilia na cicatrização de lesões por atuar na quimio-atração de monócitos e leucócitos. Seus efeitos anti-inflamatórios incluem antagonismo da proliferação de célula T e IFN- γ , como também regulação na produção de iNOS e TNF- α . Estudos imuno-histoquímicos têm mostrado que TGF- β está presente nas lesões de pele de pacientes com hanseníase com a forma virchowiana. (Lockwood *et al.*, 2011). Estes mesmos autores descrevem em seu trabalho que TGF- β foi detectável em todas as formas clínicas da hanseníase. No grupo de indivíduos com hanseníase indeterminado, houve baixos níveis de TGF- β ficando localizado apenas nos granulomas sem nervo dérmico. Descrevem ainda que a citocina se mostrou mais acentuada nos macrófagos e nas células epitelióides localizados nos granulomas e nervos da derme. Em todas as biopsias do grupo virchowiano tiveram marcação para TGF- β e não houve diferença entre pacientes com ou sem reação do Tipo 2. Em biopsias da pele com reação do Tipo 1 e do Tipo 2, esta associação foi mais forte nos pacientes com a forma dimorfa-tuberculóide do que na forma dimorfa-virchowiana. Muito destes achados são semelhantes aos encontrados em nosso trabalho. Conforme hipótese descrita por Lockwood *et al.*, acreditamos também que o papel de TGF- β seria o de controlar a inflamação, talvez como uma resposta protetiva na derme de uma intensa inflamação que é característica da hanseníase. Tarique *et al.*, (2015) defendem que a alta expressão de TGF- β e IL-10 podem ocasionar a presença de macrófagos imaturos e células T reguladoras. Segundo os mesmos autores, a alta expressão desta citocina em um determinado microambiente pode favorecer a proliferação *M. leprae* nas lesões dos pacientes. Nossos achados estão condizentes aos destes trabalhos citados anteriormente, uma vez que mostraram que os monócitos de pacientes do grupo Tuberculóide e do grupo Virchowiano, apresentaram expressão de TGF- β inferior ao grupo de indivíduos controle. Quando avaliadas nos linfócitos T CD8+, a expressão de TGF- β no grupo dos pacientes Virchowiano foi superior ao grupo de pacientes Tuberculóide. A expressão de TGF- β neste mesmo tipo celular, porém em pacientes com reação do Tipo 1, mostrou-se superior a todos os grupos estudados e nos pacientes com reação do Tipo 2 foi

superior apenas ao grupo de pacientes Tuberculóide. Estes dados por nós encontrados, da mesma forma que a citocina IL-10, reforçam a idéia do papel regulador da citocina e da sua capacidade em promover um microambiente próprio para a multiplicação do bacilo o que possibilita sua disseminação e portando uma evolução mais grave da doença.

A citocina quimiotática IL-8 é um importante recrutador de neutrófilos para os sítios de infecção. Na hanseníase, as quimiocinas de leucócitos como IL-8, MCP-1, MIP-1 estão envolvidos no recrutamento celular na fase inicial da infecção e há evidências de que ela possa estar também presente na fase crônica da doença (Hasan *et al.* 2004). Procurando entender a expressão da IL-8 e estabelecer um paralelo de expressão desta citocina com a expressão TGF- β e TNF- α nos monócitos infectados com *M. leprae* e BCG de pacientes com hanseníase virchowiana e compará-los com pacientes saudáveis, Hasan *et al.* (2004) observaram que a expressão de IL-8 apresentava-se alta em concomitância com o aumento de TGF- β , o que não aconteceu com TNF- α em pacientes com hanseníase virchowiana. Os mesmos autores acrescentam que o contato com *M. leprae* e BCG foi capaz de ativar uma resposta de IL-8, mas não significativamente diferente do nível basal. A expressão desta citocina foi baixa nos doadores saudáveis, enquanto que nos pacientes virchowianos esteve significativamente elevado, aproximadamente de três a cinco vezes mais alta do que nos pacientes controle. Em contrapartida, monócitos, tanto do grupo controle quanto o de pacientes mostraram ser significativamente mais alto a produção de TNF- α em resposta a estimulação do BCG quando comparado com *M. leprae*. Estes resultados demonstram claramente que o aumento de IL-8 em pacientes virchowianos é independente da resposta de TNF- α e que a quimiocina quando ativa podem contribuir na patologia da doença. O mesmo trabalho, ainda nos mostra que enquanto outras citocinas pro-inflamatórias podem estar reduzidas nos pacientes virchowiano, a resposta imune do hospedeiro envolve quimioatrativos de leucócitos, a IL-8 por exemplo, de forma contínua e isto contribui para o recrutamento celular de forma severa da hanseníase resultando em doença ao invés de proteção na fase crônica da hanseníase. Embora esteja clara a participação da citocina IL-8, na hanseníase, em nossos resultados a sua expressão não mostrou-se alterada

em nenhuma das subpopulações de leucócitos avaliados (monócitos, linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺) dos grupos de hanseníase e de reação hansênica.

Em resumo, nosso estudo mostrou diferenças em biomarcadores imunológicas das formas/manifestações da hanseníase. Acreditamos que os resultados aqui obtidos poderão, futuramente, auxiliar na busca de ferramentas mais eficazes de prognóstico da doença, diagnóstico, tratamento e prevenção da hanseníase e dos episódios reacionais. Vale salientar também, que estudos mais recentes vem demonstrando que além do clássico conceito da imunidade mediada por células e da resposta humoral, é importante ser citado que novas populações celulares que incluem células Th17, Th22, Th9, Th3, células T auxiliares foliculares (Thf), células T invariantes associadas à mucosa (MAIT), células T restritas por MHC Ib e subpopulações de células T reguladoras (Treg) podem participar da resposta contra *M. leprae* ou por outras micobactérias (Kumar *et al.*, 2011; Palermo *et al.*, 2012; de Lima Silveira *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2015; Sadhu *et al.*, 2016) que podem futuramente ser foco de estudo para a busca de biomarcadores imunológicas das formas/manifestações da hanseníase.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Uma vez obtidos os resultados e realizado uma análise em conjunto de todos os marcadores da imunidade inata e adaptativa dos leucócitos foi possível identificar biomarcadores que poderão ser empregados para discriminar as formas clínicas da hanseníase e as reações hansênicas. As principais conclusões relativas ao estudo foram:

- Independente da forma clínica, grupo de pacientes com hanseníase apresentou baixo NEUTLR4⁺ e MONTGF-β⁺, enquanto DV/V mostrou alto MONHLA-DR⁺.

- Ambos grupos de pacientes DD/DT/T e DV/V apresentaram aumento de CD4⁺IL-10⁺, mas não somente DV/V apresentou aumento de CD8⁺TLR2⁺ e IL-10.

- Grupo de pacientes com reação Tipo-1 exibiu, no geral, uma baixa na regulação de TLR na imunidade inata e adaptativa (NEU:MONTLR2⁺ e NEU:CD4⁺TLR4⁺).

- Foi observado alta regulação de CD4⁺: CD8⁺IL-10⁺ no grupo de indivíduos com reação hansênica, mas somente o de pacientes com reação do Tipo-2 mostrou aumento em MONIL-10⁺.

- Assinaturas de biomarcadores específicos para *M. leprae* (*) revelaram uma expansão das características fenotípicas e funcionais nos pacientes com hanseníase com aumento de *MONNO-DAF-2T⁺ em DD/DT/T e alta regulação de *NEUTLR2⁺ e *CD8⁺IL-10⁺ em DV/V.

- Na análise de assinaturas de biomarcadores foi evidenciado uma redução na expressão dos principais biomarcadores dos pacientes com reação hansênica particularmente na imunidade adaptativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIPRANTIS, A. O.; YANG, R. B.; MARK, M. R.; SUGGETT, S.; DEVAUX, B.; RADOLF, J. D.; KLIMPEL, G. R.; GODOWSKI, P.; ZYCHLINSKY, A. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. **Science**, v.285, n.5428, p.736-739. 1999.

ARAÚJO, M. G. Leprosy in Brazil, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 3, p. 373-382, 2003.

ARTURO, A.; WILKINS-RODRIGUEZ, A. A.; ESCALONA-MONTAÑO, A. R.; AGUIRRE-GARCÍA M.; BECKER, I.; GUTIÉRREZ-KOBEH, L. Regulation of the expression of nitric oxide synthase by *Leishmania Mexicana* amastigotes in murine dendritic cells. **Experimental Parasitology**, v. 126, p. 426-434, 2010

ASSEMAN, C.; POWRIE, F. Interleukin 10 is a growth factor for a population of regulatory T cells. **Gut**, v.42, n.2, p.157-158, 1998.

BHAT, R. M.; PRAKASH, C. Leprosy: An Overview of Pathophysiology. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Disease** 2012; 2012:181089. doi: 10.1155/2012/181089, 6 pages, Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3440852/pdf/IPID2012-81089.pdf> acessado em 20/10/2015.

BLANDER, J.M.; MEDZHITOV, R. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. **Science**, v.304, n.5673, p.1014-1018, 2004.

BOCHUD, P. Y.; SINSIMER, D.; ADEREM, A.; SIDDIQUI, M. R.; SAUNDERSON, P.; BRITTON S.; ABRAHAM, I.; TADESSE ARGAW, A.; JANER, M.; HAWN, T. R.; KAPLAN G. Polymorphisms In Toll-Like Receptor 4 (TLR4) are Associated with Protection Against Leprosy. **European Journal Clinical Microbiology & Infection Disease**, v.28, n.9, p.1055-1065, 2009.

BOCHUD, P.; HAWN, T.R.; SIDDIQUI, M. R.; SAUNDERSON, P.; BRITTON, S.; ABRAHAM, I.; ARGAW, A. T.; JANER, M.; ZHAO, L. P.; KAPLAN, G.; ADEREM, A. Toll-Like Receptors 2 (TLR2) Polymorphisms Are Associated with Reversal Reaction in Leprosy, **J. Infect Disease**, v.197, n.2, p.253-261, 2008.

BOGA, P.; SHETTY, V. P.; KHAN, Y. Nitric oxide metabolites in sera patients across the spectrum of leprosy, **Indian Journal Leprosy**, v.82, p.123-129, 2010.

Brasil. Ministério da Saúde. Vigilância em Saúde: Dengue, Esquistossomose, Hanseníase, Malária, Tracoma e Tuberculose. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

Brasil. Ministério da Saúde. Saúde Brasil 2013: uma análise da situação de saúde e das doenças transmissíveis relacionadas à pobreza, Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

Brasil. Ministério da Saúde. Doenças infecciosas e parasitárias : guia de bolso Brasília, Ministério da Saúde, 2010.

BRIGHTBILL, H.D.; LIBRATY, D. H.; KRUTZIK, S. R.; YANG, R. B.; BELISLE, J. T.; BLEHARSKI, J. R.; MAITLAND, M.; NORGARD, M. V.; PLEVY, S. E.; SMALE, S. T.; BRENNAN, P. J.; BLOOM, B. R.; GODOWSKI, P. J.; MODLIN, R. L. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. **Science**, v.285, n.5428, p.732-736, 1999.

DAS, P.; LAHIRI, A.; LAHIRI, A.; CHAKRAVORTTY, D. Modulation of the arginase pathway in the context of microbial pathogenesis: a metabolic enzyme moonlighting as an immune modulator. **PLoS Pathogens**. 2010; 6(6):e1000899 doi: 10.1371/journal.ppat.1000899, 7 pages, Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2887468/pdf/ppat.1000899.pdf> acessado em 05/01/2016

DE LIMA SILVEIRA, E.; DE SOUSA, J. R.; DE SOUSA AARÃO, T. L.; FUZII, H. T.; DIAS JUNIOR, L. B.; CARNEIRO, F. R.; QUARESMA, J. A. New immunologic pathways in the pathogenesis of leprosy: role for Th22 cytokines in the polar forms of the disease. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.72, n.4, p.729-30, 2015.

DEGANG, Y.; NAKAMURA, K.; AKAMA, T.; ISHIDO, Y.; LUO, Y.; ISHII, N.; SUZUKI, K. Leprosy as a model of immunity, **Future Microbiology**, v.9, n.1, p.43-54, 2014.

DEMANGEL, C.; BRITTON, W. J. Interaction of dendritic cells with mycobacteria: where the action starts. **Immunology and Cell Biology**, v.78, n.4, p.318-324, 2000.

DOYLE, S.E.; O'CONNELL, R. M.; MIRANDA, G. A.; VAIDYA, S. A.; CHOW, E. K.; LIU, P. T.; SUZUKI, S.; SUZUKI, N.; MODLIN, R. L.; YEH, W. C.; LANE, T. F.; CHENG, G. Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38. **The Journal of Experimental Medicine**, v.199, n.1, p.81-90, 2004.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Nitric oxide revision, **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.39, n.4, p.343-350, 2003.

ESCAMILLA-TILCH, M.; TORRES-CARRILLO, N. M.; PAYAN, R. R.; AGUILAR-MEDINA, M.; SALAZAR, M. I.; FAFUTIS-MORRIS, M.; ARENAS-GUZMAN, R.; ESTRADA-PARRA, S.; ESTRADA-GARCIA, I.; GRANADOS, J. Association of genetic polymorphism of HLA-DRB1 antigens with the susceptibility to lepromatous leprosy, **Biomedical Reports**, v.1, p.945-949, 2013.

FETTERMAN, J. L.; HOLBROOK, M.; FLINT, N.; FENG, B.; BRETON-ROMERO, R.; LINDER, E. A.; BERK, B. D.; DUESS, M. A.; FARB, M. G.; GOKCE, N.; SHIRIHAI, O. S.; HAMBURG, N. M.; VITA, J. A. Restoration of autophagy in endothelial cells from patients with diabetes mellitus improves nitric oxide signaling. **Atherosclerosis**, n.247, p.207-217, 2016.

FILHO, R. F.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções, **Revista da Associação Médica do Brasil**, v.46, n.3, p.265-271, 2000.

FOSS, N. T. Immunological Aspects of Leprosy, **Medicina**, v.30, p.335-339, 1997.

GOULART, I. M. B.; FIGUEIREDO, F.; COIMBRA, T.; FOSS, M. T. Detection of transforming growth factor- β 1 in the dermal lesions of different clinical forms of leprosy. **American Journal of Pathology**, v.148, p. 911-917, 1996.

GOULART, I. M. B.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.4, p.365-375, 2002.

HART, B. E.; TAPPING, R. I. Genetic Diversity of Toll-Like Receptors and Immunity to *M. leprae* Infection, **Journal of Tropical Medicine**. 2012; 2012:415057, doi: 10.1155/2012/415057, 12 pages, Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3317006/pdf/JTM2012-415057.pdf> acessado em 20/10/2015.

HASAN, Z.; MAHMOOD, A.; ZAFAR, S.; KHAN, A. A.; HUSSAIN, R. Leprosy patients with lepromatous disease have an up-regulated IL-8 response that is unlinked to TNF-alpha responses, **International Journal Leprosy other Mycobacterial Disease**, v.72, n.1, p.35-44, 2004.

HASHIMOTO, K.; MAEDA, Y.; KIMURA, H.; SUZUKI, K.; MASUDA, A.; MATSUOKA, M.; MAKINO, M. Mycobacterium leprae infection in monocyte-derived dendritic cells and its influence on antigen-presenting function. **Infection and Immunity**, v.70, n.9, p.5167-5176, 2002.

HAVENGA, M.J.; VAN DAM, B.; GROOT, B. S.; GRIMBERGEN, J. M.; VALERIO, D.; BOUT, A.; QUAX, P. H. Simultaneous detection of NOS-3 protein expression and nitric oxide production using a flow cytometer. **Analytical Biochemistry**, v.290, p.283-91, 2001.

JARDULI, L. R.; SELL, A. M.; REIS, P. G.; SIPPERT, E. A.; AYO, C. M.; MAZINI, P. S.; ALVES, H. V.; TEIXEIRA, J. J.; VISENTAINER, J. E. Role of HLA, KIR, MICA, and cytokines genes in leprosy. **Biomed Research International**, 2013; 2013:989837, doi: 10.1155/2013/989837, 17 pages, Disponível em

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3722889/pdf/BMRI2013-989837.pdf> acessado em 10/10/2015.

JAROSZESKI, M. J.; RADCLIFF, G. Fundamentals of flow cytometry. **Molecular Biotechnology**, v.11, n.1, p.37-53, 1999.

JUNG, I. D.; JEONG, S. K.; LEE, C. M.; NOH, K. T.; HEO, D. R.; SHIN, Y. K.; YUN, C. H.; KOH, W. J.; AKIRA, S.; WHANG, J.; KIM, H. J.; PARK, W. S.; SHIN, S. J.; PARK, Y. M. Enhanced efficacy of therapeutic cancer vaccines produced by co-treatment with Mycobacterium tuberculosis heparin-binding hemagglutinin, a novel TLR4 agonist. **Cancer Research**, v.71, n.8, p.2858-2870, 2011.

KRUTZIK, S.R.; OCHOA, M.T; SIELING, P.A.; UEMATSU, S.; NG, Y. W.; LEGASPI, A.; LIU, P. T.; COLE, S. T.; GODOWSKI, P.J.; MAEDA, Y.; SARNO, E. N.; NORGARD, M. V.; BRENNAN, P.J.; AKIRA, S.; REA, T. H.; MODLIN, R.L. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. **Nature Medicine**, v.9, n.5, p.525-532, 2003.

KUMAR, N. P.; ANURADHA, R.; SURESH, R.; GANESH, R.; SHANKAR, J.; KUMARASWAMI, V.; NUTMAN, T. B.; BABU, S. Suppressed type 1, type 2, and type 17 cytokine responses in active tuberculosis in children. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.18, n.11, p.1856-1864, 2011.

LEE, D. J.; LI, H.; OCHOA, M. T.; TANAKA, M.; CARBONE, R. J.; DAMOISEAUX, R.; BURDICK, A.; SARNO, E. N.; REA, T. H.; MODLIN, R. L. Integrated pathways for neutrophil recruitment and inflammation in leprosy. **The Journal Infectious Disease**, v.201, n.4, p.558-569, 2010.

LOCKWOOD, D. N.; SARNO, E.; SMITH, W. C. Classifying leprosy patients - searching for the perfect solution. **Leprosy Review**, v.78, n.4, p.317-320, 2007.

LOCKWOOD, D. N.; SUNEETHA, L.; SAGILI, K. D.; CHADUVULA, M. V.; MOHAMMED, I.; VAN BRAKEL, W.; SMITH, W. C.; NICHOLLS, P.; SUNEETHA, S. Cytokine and protein markers of leprosy reactions in skin and nerves: baseline results for the North Indian INFIR cohort. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 2011; 5(12):e1327 doi: 10.1371/journal.pntd.0001327, 16 pages, Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3236729/pdf/pntd.0001327.pdf> acessado em 15/09/2015.

LYON, S.; GROSSI, M. A. F. Diagnóstico e tratamento da hanseníase In: Alves, E. D.; Ferreira, T. L. F. I. N. Hanseníase avanços e desafios Brasília 1ª ed. Brasília : NESPROM, 2014. Cap. 8, p.141-150

MADAN, N. K.; AGARWAL, K.; CHANDER, R. Serum cytokine profile in leprosy and its correlation with clinico-histopathological profile. **Leprosy Review**, v.82, n.4, p.371-382, 2011.

MANCA, C.; PEIXOTO, B.; MALAGA, W.; GUILHOT, C.; KAPLAN, G. Modulation of the Cytokine Response in Human monocytes by *Mycobacterium leprae* Phenolic glycolipid-1. **Journal of Interferon Cytokine Research**, v.32, n.1, p.27-33, 2012.

MARLETTA, M. A. Nitric Oxide Synthase Structure and Mechanism. **Journal Biological Chemistry**, v.268, n.17, p.12231-12234, 1993.

MEANS, T. K.; LIEN, E.; YOSHIMURA, A.; WANG, S.; GOLENBOCK, D. T.; FENTON, M. J. The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. **Journal of Immunology**, v.163, n.12, p.6748-6755, 1999.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A. JR. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 388, n.6640, p.394-397, 1997.

MENDONÇA, V. A.; MELO, G. E. B. A.; TEIXEIRA, A. L.; COSTA, R. D.; ANTUNES, C. M. Immunology of Leprosy. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.83, n.4, p.343-350, 2008

MODLIN, R.L. The innate immune response in leprosy. **Current Opinion in Immunology**. v.22, n.1, p. 48-54, 2010

MORAES, M. O.; CARDOSO, C. C.; VANDERBORGHT, P. R.; PACHECO, A. G. Genetics of host response in leprosy. **Leprosy Review**, v.77, n.3, p.189-202, 2006.

OLIVEIRA, R. B.; OCHOA, M. T.; SIELING P. A.; REA T. H, RAMBUKKANA, A.; SARNO E. N, MODLIN, R. L . Expression of Toll-Like Receptor 2 on Human Schwann Cells: a Mechanism of Nerve Damage in Leprosy. **Infection and Immunity**, v.71, n.3, p.1427–1433, 2003.

PALERMO, M. L.; PAGLIARI, C.; TRINDADE, M. A.; YAMASHITAFUJI, T. M.; DUARTE, A. J.; CACERE, C. R.; BENARD, G. Increased expression of regulatory T cells and down-regulatory molecules in lepromatous leprosy. **The American Journal of Tropical medicine and Hygiene**, v.86, n.5, p.878-83, 2012.

PENNA, M. L.; DE OLIVEIRA, M. L.; PENNA, G. O. The epidemiological behaviour of leprosy in Brazil. **Leprosy Review**, v.80, n.3, p.332-344, 2009

RADI, E.; FORMICHI, P.; BATTISTI, C.; FEDERICO, A. Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Journal of Alzheimer's Disease**. v.42 n. 3, p.125-152, 2014

REYNOLDS, J. M.; DONG, C. Toll-like receptor regulation of effector T lymphocyte function. **Trends Immunology**, v.34, n.10, p.511-519, 2013.

RIBEIRO, F. M.; GOMEZ, V. E.; ALBUQUERQUE, E. M.; KLUMB, E. M.; SHOENFELD, Y. Lupus and leprosy: beyond the coincidence. **Immunology Research**, v.61, n.1, p.160-163, 2015.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. International Journal of Leprosy and Other. **Mycobacterial Diseases**, v.34, n.3, p.255-273, 1966.

ROY, A.; PAHAN, K. Myelin Basic Protein-primed T Helper 2 Cells Suppress Microglial Activation via AlphaV Beta3 Integrin: Implications for Multiple Sclerosis. **Journal of Clinical & Cellular Immunology**. 2013;7:158. doi: 10.4172/2155-9899.1000158 Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3932617/pdf/nihms528263.pdf> acessado em 21/12/2015.

SADHU, S.; KHAITAN, B. K.; JOSHI, B.; SENGUPTA, U.; NAUTIYAL, A. K.; MITRA, D. K. Reciprocity between Regulatory T Cells and Th17 Cells: Relevance to Polarized Immunity in Leprosy. **PLoS Neglected Tropical Disease**. 2016 10(1):e0004338. doi: 10.1371/journal.pntd.0004338, 19 pages, Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3932617/pdf/nihms528263.pdf> acessado em 05/02/2016

SALEMME, A.; TOGNA, A. R.; MASTROFRANCESCO, A.; CAMMISOTTO, V.; OTTAVIANI, M.; BIANCO, A.; VENDITTI, A. Anti-inflammatory effects and antioxidant activity of dihydroasparagusic acid in lipopolysaccharide-activated microglial cells. **Brain Res Bulletin**, v.120, p.151-158, 2016

SALGAME, P.; ABRAMS, J. S.; CLAYBERGER, C.; GOLDSTEIN, H.; CONVIT, J.; MODLIN, R. L.; BLOOM, B. R. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. **Science**, v.254, n.5029, p.279-82, 1991

SAMPAIO, L. H.; SOUSA, A. L.; BARCELOS, M. C.; REED S. G.; STEFANI, M. M.; DUTHIE, M. S. Evaluation of various cytokines elicited during antigen-specific recall as potential risk indicators for the differential development of

leprosy. **European Journal of clinical microbiology Infectious diseases**, v.31, n.7, p.1443-51, 2012.

SCHACHNIK, N. C.; PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; PAULA, G. M.; LUCAS, F. JR, FREITAS, V. M.; MARTINS-FILHO, O. A.; DUSSE, L. M. Intracellular nitric oxide assessment in whole blood leukocytes by flow cytometry: optimization and applicability to monitor patients with chronic graft nephropathy. **Journal of Immunological Methods**, v.343, n.2, p.103-111, 2009.

SHIBUYA, Mayume Dias. Avaliação de subpopulações de monócitos e marcadores de ativação na hanseníase e nas reações hansênicas. / Mayume Dias Shibuya. – Salvador, 2014. 82 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Instituto de Ciências da Saúde, Salvador, 2014.

SELING, P. A.; ABRAMS, J. S.; YAMAMURA, M.; SALGAME, P.; BLOOM, B. R.; REA, T. H.; MODLIN, R. L. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. In vitro modulation of T cell responses in leprosy. **The Journal of Immunology**, v.150, n.12, p.5501-5510, 1993.

SELING, P. A.; MODLIN, R. L. Cytokine patterns at the site of Mycobacterial infection. **Immunobiology**, v.191, p.378-387, 1994a

SELING, P. A.; MODLIN, R. L. Regulation of cytokine patterns in leprosy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.730, p.42-52, 1994b

Silva, C. L.; Foss, N. T. Tumor necrosis factor in leprosy patients. **The Journal of Infection Disease**, v.159, n.4, p.787-790, 1989

SINSIMER, D.; FALLOWS, D.; PEIXOTO, B.; KRAHENBUHL, J.; KAPLAN, G.; MANCA C. leprae actively modulates the cytokine response in naïve human monocytes. **Infection and Immunity**, v.78, n.1, p.293-300, 2010

STEFANI, M. M.; GUERRA, J. G.; SOUSA, A. L.; COSTA, M. B.; OLIVEIRA, M. L.; MARTELLI, C. T., SCOLLARD, D. M. Potential plasma markers of Type 1 and Type 2 leprosy reactions: a preliminary report, **BMC Infectious Diseases**. v.27, n.9, 2009.

STRIJDOM, H.; MULLER, C.; LOCHNER, A. Direct intracellular nitric oxide detection in isolated adult cardiomyocytes: flow cytometric analysis using the fluorescent probe, diaminofluorescein. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.37, p.897-902, 2004.

SUZUKI, K.; FUKUTOMI, Y.; MATSUOKA, M.; TORII, K.; HAYASHI, H.; TAKII, T.; OOMOTO, Y.; ONOZAKI, K. Differential production of interleukin 1 (IL-1), IL-6, tumor necrosis factor, and IL-1 receptor antagonist by human monocytes

stimulated with *Mycobacterium leprae* and *M. bovis* BCG. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Disease**, v.61, n.4, p.609-618, 1993.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Current Protocols in Immunology**,. 2015, doi: 10.1002/0471142735.im1412s109. Disponível em <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142735.im1412s109/abstract;jse ssionid=557AA287E3FF2188DD46976A583684B4.f04t03> acessado dia acessado em 26/11/2015.

TAKEUCHI, O.; HOSHINO, K.; AKIRA, S. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. **Journal Immunology**, v.165, n.10, p.5392-5396, 2000.

TAKEUCHI, O.; SATO, S.; HORIUCHI, T.; HOSHINO, K.; TAKEDA, K.; DONG, Z.; MODLIN, R. L.; AKIRA, S. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. **Journal of Immunology**, v.169, n.1, p.10-14, 2002.

TALAUÉ, M.T.; VENKETARAMAN, V.; HAZBÓN, M. H.; PETEROY-KELLY, M.; SETH. A.; COLANGELI, R.; ALLAND, D.; CONNELL, N. D. Arginine homeostasis in J774.1 macrophages in the context of *Mycobacterium bovis* BCG infection. **Journal Bacteriology**, v.188, n.13, p.4830-4840, 2006.

TALHARI, S.; GONÇALVES, H. S.; PONTES, M. A. A.; SILVEIRA, M. I. S.; ORSI, A. T.; Diagnóstico In: TALHARI, S.; PENNA, G. O.; GONÇALVES, H. S.; OLIVEIRA, M. L. W. HANSENÍASE 5.a. ed Manaus: Divilivros, 2015 cap. 13, p.157-172.

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

TARIQUE, M.; NAQVI, R. A.; SANTOSH. K. V.; KAMAL, V. K.; KHANNA N, RAO, D. N. Association of TNF- α -(308(GG)), IL-10(-819(TT)), IL-10(-1082(GG)) and IL-1R1(+1970(CC)) genotypes with the susceptibility and progression of leprosy in North Indian population, **Cytokine**. v.73, n.1, p.61–65, 2015.

THOMA-USZYNSKI, S.; STENGER, S.; TAKEUCHI, O.; OCHOA, M. T.; ENGELE, M.; SIELING, P. A.; BARNES, P. F.; ROLLINGHOFF, M.; BOLCSKEI, P. L.; WAGNER, M.; AKIRA, S.; NORGARD, M. V.; BELISLE, J. T.; GODOWSKI, P. J.; BLOOM, B. R.; MODLIN, R. L. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. **Science**, v.291, n.5508, p.1544-1547, 2001.

VANDEBORGHT, P. R.; MATOS, H.J.; SALLES, A. M.; VASCONCELLOS, S. E.; SILVA-FILHO, V. F.; HUIZINGA, T. W.; OTTENHOFF, T. H.; SAMPAIO, E. P.; SARNO, E. N.; SANTOS, A. R.; MORAES, M. O. Single nucleotide

polymorphisms (SNPs) at -238 and -308 positions in the TNF-alpha promoter: clinical and bacteriological evaluation in leprosy. **International Journal of Leprosy and other Mycobacterial Disease**, v.72, n.2, p.143-148, 2004.

VERRECK, F. A.; DE BOER, T.; LANGENBERG, D. M.; HOEVE, M.A.; KRAMER, M.; VAISBERG, E.; KASTELEIN, R.; KOLK, A.; DE WAAL-MALEFYT, R.; OTTENHOFF, T. H. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.30, n.13, p.4560-1565, 2004.

WONG, K. L.; YEAP, W. H.; TAI, J. J.; ONG, S. M.; DANG, T. M.; WONG, S. C. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. **Immunologic Research**, v.53, n.1-3, p.41-57 2012.

World Health Organization Weekly Epidemiological Record, v. 90, n. 36, pp. 461-4764 sept. 2015 Disponível no site: <http://www.who.int/wer/2012/wer8734/en/index.html> Acesso dia: 04/11/2015

YAMAMURA M.; WANG, X. H.; OHMEN, J. D.; UYEMURA, K.; REA, T.H.; BLOOM, B. R.; MODLIN, R. L. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. **Journal of Immunology**, v.149, n.4, p.1470-1475, 1992.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. Definition of human blood monocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, v.67, n.5, p.603-606, 2000.

ZIEGLER-HEITBROCK, L.; ANCUTA, P.; CROWE, S.; DALOD, M.; GRAU, V.; HART, D. N.; LEENEN, P. J.; LIU, Y. J.; MACPHERSON, G.; RANDOLPH, G. J.; SCHERBERICH, J.; SCHMITZ, J.; SHORTMAN, K.; SOZZANI, S.; STROBL, H.; ZEMBALA, M.; AUSTYN, J. M.; LUTZ, M. B. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. **Blood**. 2010; 116(16):e74-80. doi: 10.1182/blood-2010-02-258558. 8 pages, Disponível em <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/116/16/e74.full.pdf> acesso em 15/12/2015.

Anexo 1

Tabela Suplementar 1- Relatório do Diagrama de Venn

Grupos	Nº de Interseções	Elementos
<i>Ex vivo</i>		
<u>BL/L*</u>	1	{↑MON HLA-DR*}
<u>Type 1*</u>	3	{↓NEU TLR2*, ↓MON TLR2*, ↓CD4* TLR4*}
<u>Type 2*</u>	1	{↑MON IL-10*}
<u>BB/BT/T ∩ BL/L*</u>	1	{↓MON TGF-β*}
BL/L ∩ Type 2	1	{↑CD8* TLR2*}
<u>BL/L ∩ Type 1 ∩ Type 2*</u>	1	{↑CD8* IL-10*}
BB/BT/T ∩ BL/L ∩ Type 1	2	{↓NEU TLR4*}
<u>BB/BT/T ∩ BL/L ∩ Type 1 ∩ Type 2*</u>	1	{↑CD4* IL-10*}
<i>In vitro</i>		
<u>BL/L*</u>	1	{↑CD8* IL-10*}
<u>Type 1*</u>	5	{↑NEU NO-DAF-2T*, ↑MON TLR2*, ↑MON HLA-DR*, ↑CD4* TLR2*, ↑CD8*}
<u>Type 2*</u>	1	{↑CD8* IL-8*}
<u>BB/BT/T ∩ BL/L*</u>	6	{↑MON TNF-α*, ↑CD4* TGF-β*, ↑CD8* TLR2*, ↑CD8* TNF-α*, ↑CD8* IL-4*, ↑CD8* TGF-β*}
BB/BT/T ∩ Type 2	4	{↑MON NO-DAF-2T*, ↑MON IL-4*, ↑CD4* TLR4*, ↑CD8* TLR4*}
BL/L ∩ Type 1	2	{↑NEU TLR2*, ↑MON TGF-β*}
BL/L ∩ Type 2	1	{↑CD4* IL-8*}
<u>Type 1 ∩ Type 2*</u>	1	{↑CD4*}
BB/BT/T ∩ BL/L ∩ Type 1	2	{↑CD4* TNF-α*, ↑CD4* IL-4*}
BB/BT/T ∩ BL/L ∩ Type 2	1	{↑MON IL-10*}
<u>BB/BT/T ∩ BL/L ∩ Type 1 ∩ Type 2*</u>	1	{↑NEU TLR4*}

*Interseções selecionadas da Figura 6

