



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CAMPUS ANÁPOLIS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS APLICADAS A
PRODUTOS PARA SAÚDE

**Células T reguladoras em diferentes formas de hanseníase e reações
hansênicas**

CHÁLITA PATRÍCIA DE LIMA

ANÁPOLIS - GO

2017

CHÁLITA PATRÍCIA DE LIMA

**Células T reguladoras em diferentes formas de hanseníase e reações
hansênicas**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde da Universidade Estadual de Goiás como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde.

Área de concentração: Pesquisa e Obtenção de Produtos Naturais e Sintéticos.

Linha de Pesquisa 1: Pesquisa e Desenvolvimento de Produtos para a Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Henrique Ferreira Sampaio.

ANÁPOLIS – GO

2017

Chálita Patrícia de Lima

“Células T regulares em diferentes formas de hanseníase e reações hanseníacas”

Dissertação defendida no Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde da Universidade Estadual de Goiás, para a obtenção do título de Mestre, aprovada em 01 de agosto de 2017, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:


Prof. Dr. Lucas Henrique Ferreira Sampaio
Presidente da Banca
UEG


Profa. Dra. Thais Leite Nascimento

Membro Interno
UEG


Profa. Dra. Patrícia de Sousa Lima

Membro Externo
UEG

Dedico este trabalho aos meus pais José e Francisca, pelo incalculável esforço, dedicação e capacidade de acreditarem e investirem no meu crescimento pessoal e profissional. Ao meu irmão Charles pelo afeto e apoio. E a todos que acreditaram no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus** pelo dom da vida, pelo seu amor infinito e pela oportunidade de estar concretizando mais um sonho. Sem ele nada seríamos!

Aos meus pais, **José e Francisca**, meus alicerces e meus maiores exemplos, que mesmo diante das dificuldades, foram guerreiros lutando e trabalhando arduamente para que eu pudesse estar concluindo mais esta etapa da minha vida. Obrigada pela preocupação, incentivo e orientação.

Ao meu irmão **Charles** e aos meus irmãos de coração **Dim, Luiz e Flávio**. Obrigada pelos conselhos, pelas conversas e risadas nos fins de semana. Com vocês tudo se torna mais alegre.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Lucas Sampaio**, pela orientação, dedicação e conhecimentos repassados. Pelos períodos de sua atenção e paciência ao ensinar, principalmente por sempre acreditar na minha capacidade de ir além. Obrigada pela sua conduta ética e extremamente humana, pelos conselhos e incentivos que muito acrescentaram em minha carreira profissional e em minha vida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), pelo suporte financeiro que possibilitou a realização deste estudo.

Obrigada a cada um que de alguma forma contribuiu para que eu pudesse subir mais esse degrau.

“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante.”

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa crônica, causada pelo *Mycobacterium leprae*. A doença se caracteriza por manifestações dermatoneurológicas e exibe padrões dinâmicos de resposta imunológica frente à infecção pelo patógeno intracelular. Embora as células T reguladoras (Treg) sejam fundamentais na imunorregulação de diversos processos patológicos, o seu papel na imunologia da hanseníase foi abordado em poucos estudos. Nesse contexto, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de determinar o número de FoxP3, principal marcador das células Treg, nas diferentes formas de hanseníase e reações hansênicas. Os seguintes grupos de estudo foram avaliados: pacientes diagnosticados com Hanseníase Paucibacilar (PB); Hanseníase Multibacilar (MB); Reação Hansênica tipo 1 (RT1); Reação Hansênica tipo 2 (RT2) e Controles endêmicos saudáveis (CES). A expressão de células T reguladoras foi investigada usando o método de ELISA para a medição do marcador FoxP3 no plasma e no sobrenadante de PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*). A medição de FoxP3 no plasma foi realizada na ausência de estímulo, imediatamente após a coleta sanguínea. A medição de células Tregs no sobrenadante de PBMCs foi realizada após a incubação com 10 µg/ml de sonicação de células de *M. leprae* (MLCS) a 37 °C, 5 % CO₂ por 72 horas. Os resultados mostraram que não houve qualquer diferença na expressão de FoxP3 medido diretamente no plasma, na ausência de estímulos, entre os grupos estudados. Após estímulos com MLCS, as PBMCs de todos os grupos demonstraram aumento estatisticamente significativo na expressão de FoxP3 quando comparados com indivíduos saudáveis. Foi observado um aumento significativo ($p < 0,0001$) da expressão de células Treg em pacientes MB, com cerca de 16 ng/ml de FoxP3, quando comparados com PB (6,83 ng/ml). Indivíduos RT1 foi o grupo que apresentou maior expressão de FoxP3, com mediana de 33,3 ng/ml. A quantidade de Treg FoxP3+ em pacientes RT1 foi cerca de seis vezes maior que a de indivíduos saudáveis e mais que o dobro que dos indivíduos RT2. Assim, nossos dados sugerem papel importantíssimo das Tregs na etiopatogenia da hanseníase. Estas células regulariam o processo inflamatório agudo, evitando uma inflamação exacerbada comum na RT1, que poderia ocasionar lesões graves e incapacitantes nos tecidos e nervos.

Palavras-chaves: *Mycobacterium leprae*; Episódio reacional; Treg; FoxP3.

ABSTRACT

Leprosy is a chronic infectious contagious disease caused by *Mycobacterium leprae*. The disease is characterized by dermatoneurological manifestations and exhibits dynamic patterns of immune response to infection by the intracellular pathogen. Although regulatory T cells are fundamental in the immunoregulation of various pathological processes, their role in the immunology of leprosy has been addressed in few studies. In this context, this work was developed with the objective of determining the number of FoxP3, the main marker of Treg cells, in the different forms of leprosy and leprosy reaction. The following study groups were evaluated: patients diagnosed with Paucibacillary Leprosy (PB); Multibacillary Leprosy (MB); Type 1 leprosy reaction (TR1); Type 2 leprosy reaction (TR2); Healthy endemic controls (HEC). The regulatory T cells expression was investigated using the ELISA method for the measurement of the FoxP3 marker in plasma and supernatant of PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cell). Measurement of FoxP3 in plasma was performed in the absence of stimulation immediately after blood collection. Measurement of Tregs cells in the PBMCs supernatant was performed after incubation with 10 µg/ml *M. leprae* cells sonicated (MLCS) at 37 °C, 5 % CO₂ for 72 hours. The results showed that there was no difference in FoxP3 expression measured directly in the plasma, in the absence of stimuli, between the studied groups. After stimulation with MLCS, PBMCs from all groups demonstrated a statistically significant increase in FoxP3 expression when compared to healthy subjects. A significant increase ($p < 0,0001$) in Treg cell expression in MB patients, with about 16 ng/ml FoxP3, was observed when compared to PB (6,83 ng/ml). TR1 individuals was the group that presented higher FoxP3 expression, with a median of 33,3 ng/ml. The amount of Treg FoxP3+ in TR1 patients was about six times that of healthy individuals and more than twice that of TR2 individuals. Thus, our data suggest a very important role of Tregs in the etiopathogenesis of leprosy. These cells would regulate the acute inflammatory process, avoiding a common exacerbated inflammation in TR1, which could lead to severe and incapacitating lesions on the tissues and nerves.

Key-words: *Mycobacterium leprae*; Reaction episode; Treg; FoxP3.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- APC - *Antigen Presenting Cell* (Célula Apresentadora de Antígeno)
- BAAR - Bacilo Álcool Ácido Resistente
- BB - Borderline-Borderline
- BCG - Bacilo *Calmette-Guerin*
- BL - Borderline Lepromatosa
- BT - Borderline Tuberculóide
- CD - *Cluster of Differentiation* (moléculas marcadoras da superfície celular)
- CEP - Comitês de Ética em Pesquisa
- CES - Controle Endêmico Saúdavel
- CO₂ - Dióxido de Carbono
- CONEP - Conselho Nacional de Ética em Pesquisa
- CRDT - Centro de Referência em Diagnóstico e Terapêutica
- CTLA-4 - *Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen-4*
- DO - Densidade Óptica
- ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
- ENH - Eritema Nodoso Hansênico
- FoxP3 - Fator Nuclear *Forkhead Box P3*
- GITR - *Glucocorticoid-induced Tumor Necrosis Factor Receptor* (receptor de fator de necrose tumoral induzido por glicocorticoide)
- HIV - *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)
- IB - Índice Baciloscópio
- IFN- γ - Interferon Gama
- Ig - Imunoglobulina
- IL - Interleucina
- IPEX - Síndrome de Imunodisfunção Poliendocrinopática Enteropática Ligada ao X
- IPTSP - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
- LL - Lepromatosa
- MB - Multibacilar
- MDT - Multidrogaoterapia
- MHC - *Major Histocompatibility Complex* (Complexo Principal de Histocompatibilidade)
- MLCS - *M. leprae Cell sonicate* (Sonicado Celular de *M. leprae*)
- ML-Flow - Sorologia Rápida para Hanseníase

NK - Célula *Natural Killer*

OMS - Organização Mundial da Saúde

PAMP - *Pathogen-associated Molecular Pattern* (Padrão Molecular Associado ao Patógeno)

PB - Paucibacilar

PBMC - *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (Célula Mononuclear do Sangue Periférico)

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PGL-I - *Phenolic glycolipid - I* (Glicolípido Fenólico I)

PQT - Poliquimioterapia

RPMI - meio de cultura celular *Roswell Park Memorial Institute*

RR - Reação Reversa

RT1 - Reação Tipo 1

RT2- Reação Tipo 2

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

TB - Tuberculose

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGF- β - *Transforming Growth Factor Beta* (Fator de Crescimento e Transformação Beta)

Th - *T helper* (Célula T Auxiliar)

TMB - Tetrametil Benzidina

TNF- α - *Tumor Necrosis Factor Alpha* (Fator de Necrose Tumoral Alfa)

Treg - Célula T Reguladora

TT - Tuberculoide

UFG - Universidade Federal de Goiás

WHO - World Health Organization

°C - Grau Celsius

% - Por cento (porcentagem)

< - Menor

= - Igual

mg - Miligrama

ml - Mililitro

nm - Nanômetro

ng/ml - Nanograma por mililitro

μ l - Microlitro

μ g/ml - Micrograma por mililitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação da hanseníase.....	20
Figura 2. Formas clínicas da hanseníase e a relação com a imunidade do hospedeiro.....	21
Figura 3. Cartelas com medicamentos dos esquemas padrões de multidrogaterapia para adultos.....	24
Figura 4. Reação hansênica tipo 1.....	28
Figura 5. Reação hansênica tipo 2.....	29
Figura 6. Principais mecanismos pelos quais os linfócitos Treg podem suprimir a resposta de células T efetoras.....	31
Figura 7. Quantificação de células Treg FoxP3+ no plasma.....	41
Figura 8. Número de células Treg FoxP3+ em PBMCs de pacientes versus indivíduos saudáveis após estímulo.....	42
Figura 9. Número de células Treg FoxP3+ em PBMCs de pacientes PB versus pacientes MB após estímulo.....	43
Figura 10. Número de células Treg FoxP3+ em PBMCs de pacientes MB versus pacientes com RT2 após estímulo.....	43
Figura 11. Número de células Treg FoxP3+ em PBMCs de pacientes RT1 versus controles saudáveis e pacientes RT2 após estímulo.....	44

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Classificação da hanseníase e suas características clínicas.....	20
Tabela 1. Principais características dos grupos de estudo e controle.....	41

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iv
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	xi
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 Hanseníase	17
3.1.1 Agente etiológico e transmissão	17
3.1.2 Manifestações clínicas	18
3.1.3 Classificação clínica.....	18
3.1.4 Imunologia.....	20
3.1.5 Diagnóstico	22
3.1.6 Tratamento.....	23
3.1.7 Epidemiologia	24
3.1.8 Vacina BCG como prevenção da doença.....	25
3.2 Reações Hansênicas	26
3.2.1 Reação Tipo 1.....	27
3.2.2 Reação Tipo 2.....	28
3.3 Células T reguladoras.....	30
3.3.1 Células Treg e hanseníase	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1 Grupo de pacientes e controles	36
4.1.1 Critérios de inclusão	36
4.1.2 Critérios de exclusão	37
4.2 Consulta clínica, entrevista e coleta sanguínea	37

4.3	Determinação da reatividade por estímulo de células mononucleares de sangue periférico - PBMCs	37
4.4	Detecção de Treg FoxP3+ por ELISA.....	38
4.5	Análise estatística	38
4.6	Aspectos éticos.....	39
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	Características dos pacientes com hanseníase, reação hansênica e controles endêmicos saudáveis	40
5.2	Determinação do número de células Treg FoxP3+	41
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa de evolução crônica, causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae*, caracterizada por neurites periféricas e lesões de pele com perda da sensibilidade tátil, térmica e dolorosa (BRATSCHI *et al.*, 2015). Mesmo sendo uma enfermidade que acompanha a humanidade há milênios, a hanseníase ainda é considerada uma doença negligenciada, de grande impacto sobre a saúde global com cerca de 214.000 novos casos detectados no mundo em 2014 (WHO, 2015).

Na década de 1990 a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu para a hanseníase o uso de uma classificação baseada na contagem do número de lesões de pele (WHO, 1994). De acordo com esta classificação os pacientes são divididos em dois grupos: Paucibacilares (PB), que são pacientes que apresentam até cinco lesões de pele, e Multibacilares (MB), nos quais são observados mais do que cinco lesões de pele.

Embora seja uma doença de evolução crônica, podem surgir ao longo do percurso patológico da hanseníase episódios agudos graves, as chamadas reações hansênicas ou episódios reacionais. Existem dois tipos de reações hansênicas: Reação tipo 1 (RT1) ou Reação Reversa (RR) e Reação tipo 2 (RT2), cuja principal manifestação é o Eritema Nodoso Hansênico (ENH). Estes episódios são resultados de complexas interações entre o sistema imune e o agente patológico *M. leprae* e se caracterizam por manifestações inflamatórias agudas que podem ocorrer antes, durante ou após tratamento medicamentoso em qualquer das formas clínicas (SCOLLARD *et al.*, 1994; NERY *et al.*, 2006; KAMATH *et al.*, 2014).

As células T reguladoras (Treg) são um subtipo de linfócito T CD4+ caracterizadas pela expressão do fator nuclear FoxP3 (Forkhead box P3) e alta expressão da molécula CD25. As Treg são especializadas e essenciais na modulação do sistema imune e manutenção da homeostasia do mesmo. Esta modulação ocorre pela supressão da ativação de respostas imunológicas ante aos antígenos exógenos ou próprios, ou após o final de toda resposta imune, após a eliminação do patógeno (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003; HORI; NOMURA; SAKAGUCHI, 2003).

Apesar das células Treg serem fundamentais na imunorregulação, o seu papel na imunopatologia da hanseníase foi abordado em poucos estudos e estes trabalhos ainda apresentam resultados controversos em relação à quantidade e função destas células na doença. Alguns estudos demonstraram um aumento da quantidade de células Treg nas formas paucibacilares (ATTIA *et al.*, 2010; ABDALLAH *et al.*, 2014). Entretanto outros

pesquisadores obtiveram resultados contrários e observaram níveis elevados de Treg nas formas multibacilares quando comparados com paucibacilares e indivíduos saudáveis (PALERMO *et al.*, 2012; COSTA, 2014).

Desta forma, é crucial que haja uma melhor compreensão sobre o real papel das células Treg na hanseníase, especialmente em casos de reação, o que poderá contribuir não só para o entendimento da imunopatogênese como também indicar potenciais alvos ou abordagens terapêuticas para esta doença.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o número de FoxP3, principal marcador das células Treg, nas diferentes formas de hanseníase e reações hansênicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a eficácia do kit ELISA (kit FoxP3 humano - LifeSpan BioSciences - Seattle, Washington) em quantificar FoxP3 no sobrenadante de culturas de células sanguíneas, pois apesar deste kit já estar comercialmente disponível, ainda não haviam sido realizados estudos sobre a sua sensibilidade.
- Quantificar a expressão de FoxP3 no sobrenadante de culturas de células sanguíneas de pacientes com hanseníase paucibacilar após estímulo com antígeno bruto de *M. leprae*;
- Quantificar a expressão de FoxP3 no sobrenadante de culturas de células sanguíneas de pacientes com hanseníase multibacilar após estímulo com antígeno bruto de *M. leprae*;
- Quantificar a expressão de FoxP3 no sobrenadante de culturas de células sanguíneas de pacientes com reação tipo 1 após estímulo com antígeno bruto de *M. leprae*;
- Quantificar a expressão de FoxP3 no sobrenadante de culturas de células sanguíneas de pacientes com reação tipo 2 após estímulo com antígeno bruto de *M. leprae*;
- Comparar o número de FoxP3 entre as diferentes formas de hanseníase, pacientes com reação e indivíduos saudáveis, após estímulo com antígeno bruto de *M. leprae*;

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Hanseníase

3.1.1 Agente etiológico e transmissão

A hanseníase, conhecida desde os tempos bíblicos como lepra, é uma doença infectocontagiosa de evolução crônica causada pelo agente etiológico *Mycobacterium leprae*. Este bacilo foi descrito em 1873, pelo médico norueguês Gerhard Henrick Armauer Hansen. A hanseníase caracteriza-se por manifestações na pele e nos nervos periféricos, uma vez que o *M. leprae* tem predileção por macrófagos e células de Schwann (BRATSCHI *et al.*, 2015). O *M. leprae* é uma bactéria intracelular obrigatória, com forma de bastonete, gram-positiva, álcool-ácido resistente, que se cora em vermelho pela fucsina, não cultivável em meios de cultura artificiais, sendo isolada por técnicas de laboratório que utilizam modelos animais como camundongos ou tatus para sua inoculação e multiplicação (TOMIMORI-YAMASHITA & FLORIANO, 2006).

O tempo de geração do bacilo se dá de forma muito lenta, levando em média 12,5 dias, com uma divisão binária de 12 a 21 dias, tempo relativamente longo em comparação com outras bactérias (REES, 1976). E é exatamente o fato de ser tão fastidiosa que impede que o *M. leprae* seja cultivado em meios de culturas artificiais. Nas preparações para exames bacterioscópicos, os bacilos podem ser vistos isolados ou em agrupamentos variados, como por exemplo arranjos paralelos semelhantes a um maço de cigarros. O *M. leprae* é a única micobactéria que apresenta esse tipo de disposição (NEVES, 2001; RIVITTI, 2014).

O mecanismo de transmissão da hanseníase ainda não é bem elucidado. Devido ao grande número de bacilos excretados da cavidade nasal de pacientes multibacilares não tratados, a teoria mais difundida é a de que as vias aéreas superiores destes pacientes sejam a principal via de eliminação dos bacilos, assim como o trato respiratório também é o principal meio de entrada do agente no organismo (BRASIL, 2010). Porém, é necessário que haja uma estreita associação ou proximidade prolongada do indivíduo com os pacientes infectados com formas bacilíferas de hanseníase, situação observada nos contatos intradomiciliares. O risco dos contatos intradomiciliares contraírem a doença é cerca de 4 vezes maior do que outros indivíduos de uma população geral (BRATSCHI *et al.*, 2015). Outras possibilidades de transmissão também são relatadas, como através de hansenomas ulcerados, urina, fezes, suor, leite materno, secreções vaginais, esperma e animais como insetos, tatus e chimpanzés (NEVES, 2001; TRUMAN, 2005; SUZUKI *et al.*, 2010).

O bacilo possui alta infectividade e baixa patogenicidade, ou seja, muitas pessoas se infectam em áreas endêmicas, mas somente uma minoria adoece. A evolução da infecção é lenta, levando ao aparecimento das manifestações muito tempo depois do contágio. Isto ocorre devido ao longo período de incubação ou período pré-clínico que varia, geralmente, de 3 a 7 anos (BRASIL, 2010).

3.1.2 Manifestações clínicas

A doença se manifesta através de lesões de pele com alterações de sensibilidade térmica, tátil e dolorosa em qualquer região do corpo. As lesões mais comuns são manchas e placas hipopigmentadas ou eritematosas, infiltrações e nódulos (ALVES; FERREIRA; NERY, 2014). Os distúrbios sensitivos nas lesões podem ser decorrentes tanto da ação do bacilo nos nervos quanto pela reação do sistema imune ao bacilo. Quando o aspecto neural da doença predomina em relação ao da pele, as primeiras evidências observadas são nervos periféricos espessados, com entorpecimento, formigamento ou dor. Neste caso, em que a doença se manifesta apenas por lesões nos nervos periféricos, sem lesão cutânea, denomina-se hanseníase neural pura (YAWALKAR, 2009). Os nervos periféricos mais comumente afetados, por ordem de frequência, são tibial posterior, ulnar, mediano, poplíteo lateral, facial, radial e trigêmeo (WALKER; WITHINGTON; LOCKWOOD, 2013).

Complicações secundárias da neuropatia podem resultar em deformidades e incapacidades físicas, como atrofia muscular, articulações anquilosadas (sem movimento) e em garras, alopecia (perda de cabelo), madarose (perda dos cílios e/ou sobrancelhas), triquíase (desvio dos cílios para dentro do globo ocular), entrópico (inversão da pálpebra para dentro do globo ocular) e logoftalmo (incapacidade de fechar o olho) (WALKER & LOCKWOOD, 2007; YAWALKAR, 2009). Devido ao comprometimento dos mecanismos de defesa, como a capacidade de sentir dor, a visão e o tato, os indivíduos com hanseníase tornam-se mais vulneráveis aos riscos de acidentes, queimaduras, feridas e infecções que podem causar necrose, levando à amputação da região, ou até mesmo osteomielite com um processo de reabsorção das extremidades ósseas, particularmente dedos dos pés e das mãos (BRASIL, 2008).

3.1.3 Classificação clínica

Geralmente, a manifestação inicial da hanseníase é a forma indeterminada, que apresenta resposta do hospedeiro e manifestações clínicas indiferenciadas, não permitindo a

classificação clínica ou prognóstico de evolução da doença. Pode evoluir para cura espontânea ou vir a ser um prelúdio para as formas determinadas (RIDLEY & JOPLING, 1966). É caracterizada por uma mancha hipopigmentada, mal definida, com uma superfície lisa ou escamosa, com a sensibilidade e o nervo proximal prejudicados ou não (SCOLLARD *et al.*, 2006).

Na década de 1960, os pesquisadores Ridley e Jopling criaram o sistema de classificação da hanseníase, que é considerado o método mais completo e criterioso de categorização das diferentes manifestações da doença. O sistema usa o conceito de hanseníase espectral baseado em critérios clínicos, histopatológicos e imunológicos (RIDLEY & JOPLING, 1966). Segundo esse sistema foram estabelecidos cinco grupos para a classificação, sendo dois polares (nas extremidades do espectro) e três intermediários. Em uma extremidade está o polo da forma TT, onde se encontram os pacientes que apresentam forte resposta imune celular, a qual retarda a multiplicação do *M. leprae*, limitando a doença a poucas e definidas lesões ou troncos nervosos. No outro polo, a hanseníase LL, estão os pacientes com ausência de resposta imune celular específica com abundante multiplicação bacilar, resultando em muitas lesões e infiltração extensa de pele e nervos. Entre os polos encontra-se a forma borderline, dividida em BT, BB e BL. Tais formas são manifestadas por pacientes imunologicamente instáveis, variando de acordo com a maior proximidade a um dos polos, ou seja, de moderada (BT) a pouca imunidade celular (BL).

Na década de 1990, a OMS estabeleceu o uso de uma classificação operacional simplificada para a hanseníase (Figura 1 e Quadro 1), puramente clínica, baseada na contagem do número de lesões de pele (WHO, 1988). De acordo com esta classificação os pacientes são subdivididos em:

PB – possuem até cinco lesões de pele. Inclui as formas indeterminada, TT e BT.

MB – são observadas mais do que cinco lesões de pele. Entram neste grupo as formas BB, BL, LL.



Figura 1. Classificação da hanseníase: A. Hanseníase indeterminada. B. Hanseníase Paucibacilar. C. Hanseníase Multibacilar. Fonte: Adaptado de Guide to Eliminate Leprosy as a Public Health Problem (WHO, 2000).

Quadro 1. Classificações da hanseníase e suas características clínicas.

Quadro Clínico	Classificação	
	Ridley & Jopling	Operacional
Áreas de hipo ou anestesia, parestesias, manchas hipocrômicas e/ou eritemo hipocrômicas, com ou sem diminuição da sudorese e rarefação de pelos.	Indeterminada (I)	Paucibacilar (PB)
Placas eritematosas, hipocrômicas, até 05 lesões de pele bem delimitadas, hipo ou anestésicas, podendo ocorrer comprometimento de nervos.	Tuberculoide (TT)	
Lesões eritematosas planas com o centro claro. Lesões foveolares (eritematopigmentares de tonalidade ferruginosa ou pardacenta), apresentando alterações de sensibilidade. Mais de 05 lesões de pele.	Borderline (BT*, BB, BL)	Multibacilar (MB)
Eritema e infiltração difusos, placas eritematosas de pele infiltradas e de bordas mal definidas, tubérculos e nódulos, madarose, lesões das mucosas, com alteração de sensibilidade.	Lepromatosa (LL)	

*A forma BT se enquadra na fase Paucibacilar da classificação operacional. Fonte: Adaptado de Brasil, Ministério da Saúde, Guia de Vigilância em Saúde (2014).

3.1.4 Imunologia

O desenvolvimento de diferentes formas da hanseníase está diretamente relacionado com a resposta imunológica do hospedeiro (Figura 2), na qual células como linfócitos T e macrófagos exercem papéis fundamentais. Dessa forma, o predomínio de resposta imune celular ou humoral, frente à infecção pelo bacilo, pode influenciar a evolução da doença e

estar associado com as características clínicas observadas nos pacientes com hanseníase TT e LL, respectivamente (MORAES *et al.*, 2006).

Indivíduos com uma predominância de resposta imune Th1 desenvolverão um alto grau de imunidade mediada por células, com formação de granuloma que destruirá os bacilos levando à cura ou ao desenvolvimento da doença localizada, característica da forma TT. Nestes pacientes, há um aumento das citocinas interleucina-2 (IL-2), interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (MODLIN, 1994; SIELING & MODLING, 1994; SAMPAIO *et al.*, 2012).

Ao contrário, indivíduos com uma predominância de resposta Th2 tem anergia ao *M. leprae*, ou seja, ausência de imunidade mediada por células exibindo insuficiência das células T específicas e disfunção de macrófagos. Não há formação de uma resposta granulomatosa eficaz, uma vez que os macrófagos englobam os bacilos, mas só são capazes de destruí-los parcialmente. Os pacientes são caracterizados pela forte imunidade humoral, a qual exibe altas concentrações de anticorpos específicos ao *M. leprae* no soro, como o anti PGL-1 (glicolípido-fenólico-1). Nota-se também um aumento das citocinas isoleucina-4 (IL-4), isoleucina 5 (IL-5) e isoleucina 10 (IL-10) que possibilitam a sobrevivência e proliferação do bacilo, levando à doença sistêmica, com a presença de muitas lesões e infiltrações extensas na pele e nos nervos, caracterizando assim a forma LL (SIELING *et al.*, 1993; SIELING & MODLING, 1994).

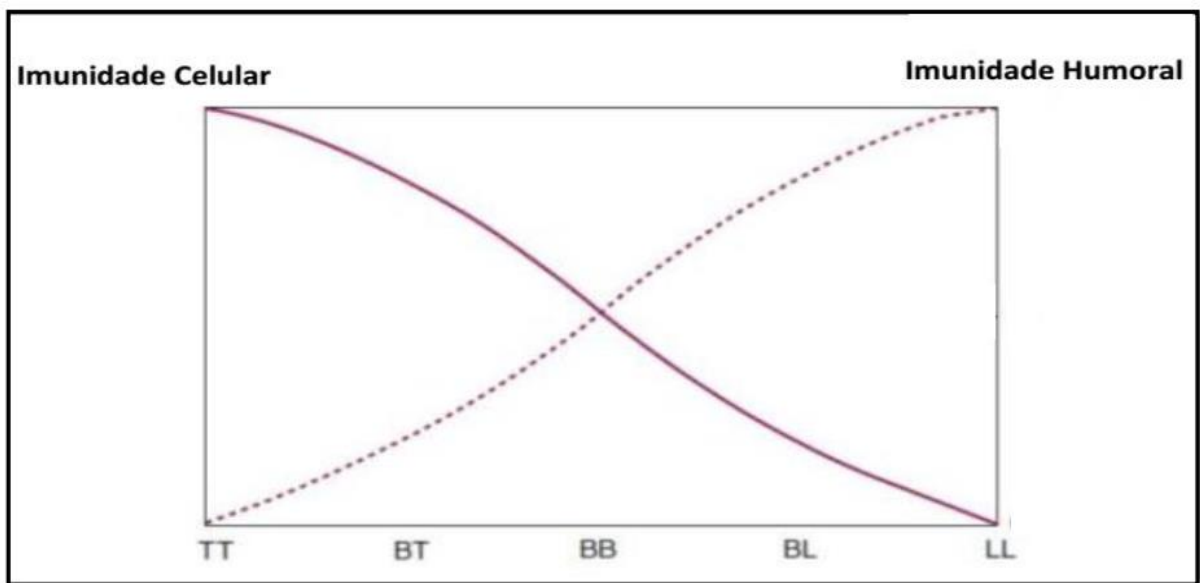


Figura 2. Formas clínicas da hanseníase e a relação com a imunidade do hospedeiro. Fonte: Adaptado de Lockwood (2003).

3.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico precoce e o tratamento são essenciais para minimizar as incapacidades trazidas pela doença. O diagnóstico é basicamente clínico, realizado por meio de anamnese com análise histórica e condições de vida do paciente e de exame dermatoneurológico, para verificar a presença de lesões de pele com perda sensorial ou nervos periféricos espessados (BRASIL, 2014). Exames complementares, como baciloscopia, histopatologia e sorologia ajudam no diagnóstico da doença e na correta classificação dos pacientes. A baciloscopia consiste na observação microscópica do *M. leprae* em esfregaços de pele e é importante para auxiliar no diagnóstico diferencial com outras doenças dermatoneurológicas, casos suspeitos de recidiva e na classificação em PB ou MB para fins de tratamento. Um resultado positivo classifica o caso como MB, independentemente do número de lesões, mas um resultado negativo não exclui o diagnóstico de hanseníase, pois o exame é de baixa sensibilidade para pacientes PB (BRASIL, 2010). Já no exame histopatológico ou biópsia de pele verifica-se a presença e distribuição de infiltrado inflamatório, células epitelioides e células gigantes, linfócitos, formação de granuloma, presença e quantidade de bacilos álcool-ácido resistentes, envolvimento neural, entre outras pesquisas (RIDLEY & JOPLING, 1966).

Outra ferramenta empregada no diagnóstico da hanseníase é o teste sorológico, que consiste na detecção de anticorpos IgM anti-PGL-1, e não deve ser utilizado isoladamente, mas sim como um auxiliar juntamente com os dados clínicos (CHO *et al.*, 1983; MOURA *et al.*, 2008). Entretanto, o teste sorológico não tem um grau satisfatório de sensibilidade. Na hanseníase PB ele possui baixa sensibilidade com soropositividade de 30% a 60%, visto que esses pacientes apresentam sorologia negativa ou baixo nível de anticorpos. Este teste é mais aplicável no diagnóstico de hanseníase MB com soropositividade de 80% a 100% (MOURA *et al.*, 2008). A concentração desses anticorpos em MB é alta devido à ativação da resposta humoral, que aumenta com o decorrer do tempo em função da multiplicação do bacilo e a dificuldade dos macrófagos na eliminação do antígeno PGL-1 do organismo (MILLER; GORDER; HARNISCH, 1987).

Em 2003 Bühner-Sékula e colaboradores descreveram um método chamado ML-Flow, como alternativa à sorologia por ELISA para detecção de anticorpos anti PGL-1 para auxiliar na classificação de pacientes em PB e MB após diagnóstico clínico. Tal método possui especificidade e sensibilidade semelhantes ao de ELISA, porém é um teste rápido de até 10 minutos, de fácil execução, não requer equipamentos especiais ou refrigeração e é menos invasivo que a baciloscopia (BÜHRER-SÉKULA *et al.*, 2003).

Testes cutâneos também já foram utilizados para estimar a intensidade da resposta imune celular específica ao *M. leprae*, sendo o mais comum o teste de Mitsuda. Tal teste baseia-se principalmente na reatividade do paciente à injeção intradérmica com lepromina, uma suspensão de bacilos de *M. leprae* mortos pelo calor (CONVIT *et al.*, 1975). A reação à lepromina é medida em aproximadamente 4 semanas e reflete a indução da resposta imune celular frente ao *M. leprae*, manifestada pela formação de um granuloma celular epitelial organizado. Caso ocorra a reação granulomatosa o teste é dado como positivo, associando-se com hanseníase TT. Do contrário, é tido como negativo, ou seja, a ausência da reatividade imunológica é associada com o polo LL (HARBOE, 1985). Porém o teste de Mitsuda não deve ser utilizado como diagnóstico, devido à reação cruzada com outras micobactérias, especialmente com a vacina BCG (*Mycobacterium bovis*), possuindo apenas valor prognóstico já que estabelece o perfil imunológico do indivíduo frente ao *M. leprae* (BRENNAN, 2000).

Com o avanço da bioinformática e da biologia molecular e devido à falta de um diagnóstico eficaz, vários estudos vêm sendo desenvolvidos em busca de novas alternativas que possam detectar a doença de forma precoce e facilitar na escolha do tratamento, principalmente com proteínas recombinantes do *M. leprae*. Alguns estudos investigaram e revelaram a potencial aplicação diagnóstica de antígenos do *M. leprae* em ensaios baseados em resposta imune celular ou em ensaios sorológicos, ou seja, testes que possam diagnosticar tanto hanseníase PB quanto MB, respectivamente (REECE *et al.*, 2006; DUTHIE *et al.*, 2008; STEFANI, 2008; GELUK; DUTHIE; SPENCER, 2011; SAMPAIO *et al.*, 2011; SPENCER *et al.*, 2012).

3.1.6 Tratamento

A hanseníase tem cura e o tratamento consiste na associação de medicamentos, a multidrogaterapia (MDT) ou poliquimioterapia, recomendada pela OMS em 1981 (WHO, 1994). Os fármacos utilizados são uma combinação de rifampicina, dapsona e clofazimina, conforme ilustrado na Figura 3.

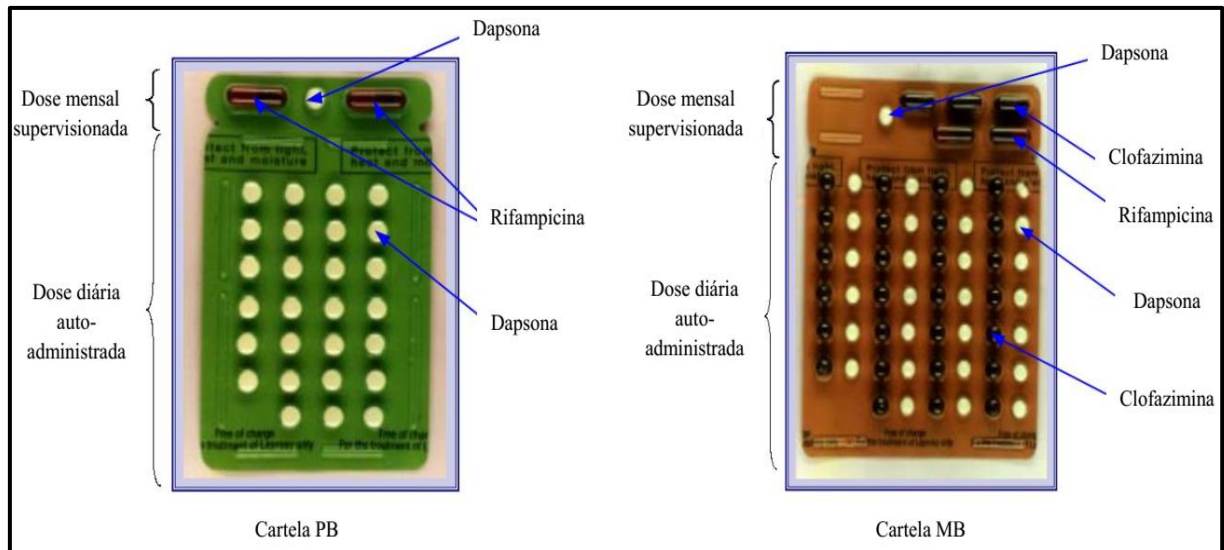


Figura 3. Cartelas com medicamentos dos esquemas padrões de multidrogaterapia para adultos. Fonte: Brasil, Ministério da Saúde, Guia para o Controle da hanseníase, 2002.

A administração é feita pelo esquema padrão de acordo com o diagnóstico e a classificação clínica do paciente. Para o tratamento de adultos PB usa-se rifampicina 600 mg (01 dose mensal supervisionada – 02 cápsulas de 300 mg) e dapsona 100 mg (01 dose mensal supervisionada e 01 dose diária auto-administrada), com duração de seis doses supervisionadas de rifampicina em até nove meses. Já para MB, tem-se rifampicina 600 mg (01 dose mensal supervisionada – 02 cápsulas de 300 mg), dapsona 100 mg (01 dose mensal supervisionada e 01 dose diária auto-administrada) e clofazimina (01 dose mensal de 300 mg – 03 cápsulas de 100 mg – supervisionada e 01 dose diária de 50 mg auto-administrada), com duração de doze doses supervisionadas de rifampicina em até dezoito meses (WHO, 2000). A alta por cura é dada após a administração do número de doses preconizado pelo esquema terapêutico dentro do prazo recomendado (BRASIL, 2010).

3.1.7 Epidemiologia

A introdução da MDT na década de 80 e da decisão da OMS na década de 90 para eliminação da hanseníase como um problema de saúde pública, estabelecendo como meta a redução da taxa global de prevalência para 1 caso a cada 10.000 habitantes (WHO, 1991), foram eventos marcantes que contribuíram no controle da doença com notável redução do número de casos.

O número de casos a nível mundial diminuiu drasticamente nas últimas décadas, após a introdução da MDT. De 5.351.408 casos registrados na década de 80, este número reduziu para 175.554 casos no ano de 2014 (WHO, 2015). Dados da OMS mostram que em 1995 a

prevalência mundial da hanseníase era de 2,3/10.000 habitantes (WHO, 1996). Atualmente, a taxa de prevalência é registrada em 0,31/10.000 habitantes (WHO, 2015).

Apesar do declínio apresentado na prevalência, a incidência da doença tem caído lentamente. Um total de 213.899 novos casos foi detectado no mundo em 2014 indicando que, apesar do sucesso do tratamento, a transmissão da doença está ativa e a prevalência é um parâmetro inadequado para se avaliar o controle da infecção. Ainda em 2014 treze países foram considerados endêmicos, com mais de 1000 novos casos: Bangladesh, Brasil, República Democrática do Congo, Etiópia, Índia, Indonésia, Madagascar, Myanmar, Nepal, Nigéria, Filipinas, Sri Lanka e Tanzânia. Juntos, eles representam 94% da prevalência global (WHO, 2015).

O Brasil, a Índia e a Indonésia são responsáveis por 81% dos casos novos de hanseníase no mundo todo. E o Brasil ainda continua como o segundo país mais afetado do mundo, com 31.064 casos novos, representando aproximadamente 92% do total de casos novos constatados nas Américas durante 2014 (WHO, 2015). Em 2005 tinha-se registrado um total de 30.693 casos no Brasil, com uma taxa de prevalência de 1,7 por 10.000 habitantes. Em 2014 esse número diminuiu para 25.738 casos, com um coeficiente de prevalência de 1,27. Ou seja, ainda acima da meta determinada pela OMS (WHO, 2005; WHO, 2015).

Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) no Brasil as regiões mais endêmicas em ordem decrescente são Centro-Oeste, Norte e Nordeste, com taxas de prevalência acima da meta definida pela OMS. O Centro-Oeste possui a maior taxa de prevalência, 3,93 casos para cada 10 mil habitantes. Ainda referente a 2014, Goiás é o oitavo estado brasileiro com maior índice de endemia apresentando 1.351 casos de hanseníase notificados, com coeficiente de prevalência de 2,07 e um total de 1.890 novos casos detectados (BRASIL, 2014).

3.1.8 Vacina BCG como prevenção da doença

Os atuais programas de controle da hanseníase estão focados principalmente na detecção e tratamento da doença. Não se tem ainda a existência de uma vacina específica capaz de impedir a disseminação da hanseníase. O desenvolvimento de tal vacina é um desafio devido à impossibilidade de se cultivar o *M. leprae in vitro* (STEFANI, 2008). Como profilaxia é utilizada a imunização com a bactéria atenuada derivada de *Mycobacterium bovis* (vacina BCG – bacilo Calmette-Guérin), inicialmente empregada no controle da tuberculose e que confere proteção cruzada contra *M. leprae* (SETIA *et al.*, 2006; ZODPEY, 2007).

A presença da cicatriz deixada pela BCG no braço direito, na altura da inserção inferior do músculo deltoide, tem sido reconhecida como um fator de proteção contra a infecção por *M. leprae* (BRASIL, 2014). Porém, estudos demonstram que a eficácia da vacina tem um grau de proteção bastante variável: de 41% em estudos experimentais a 60% em estudos observacionais (MERLE; CUNHA; RODRIGUES, 2010). Além disso, a proteção oferecida pela BCG é maior em indivíduos mais jovens e diminui ao longo do tempo (RODRIGUES *et al.*, 2007). Estudos também sugerem que há uma baixa proteção para a hanseníase PB, cerca de 62%, enquanto que para a forma MB parece haver maior proteção com 76% (MERLE; CUNHA; RODRIGUES, 2010).

3.2 Reações Hansênicas

A hanseníase, apesar de ser uma doença de evolução crônica e insidiosa, pode ser acometida por episódios agudos, denominados reações hansênicas ou estados reacionais. Essas reações se caracterizam por exacerbados quadros inflamatórios localizados ou sistêmicos decorrentes de complexas interações entre o sistema imune e antígenos do *M. leprae*. Elas podem ocorrer antes do diagnóstico da doença, durante ou depois do tratamento com MDT (BRASIL, 2014).

As reações hansênicas acometem cerca de 30 a 50% dos pacientes com hanseníase, podendo ocorrer em quase todas as formas clínicas da doença, exceto a indeterminada. Esses episódios são mais frequentes durante o primeiro ano de tratamento e em casos MB, pois quanto mais bacilífero for o paciente, maior a chance de se ter surtos reacionais (SCOLLARD, 2006; BRITO; XIMENES; BÜHRER-SEKULA, 2008).

Os mecanismos que desencadeiam os episódios reacionais ainda não são totalmente esclarecidos. Porém, o aparecimento e a duração dos episódios reacionais estão associados a uma série de fatores, dentre eles resposta terapêutica, capacidade de resposta imunológica do hospedeiro, bem como idade, vacinação, gestação, estresses físico e emocional, infecções intercorrentes e uso de medicamentos, principalmente antibióticos e quimioterápicos (FOSS, 2003; KAHAWITA & LOCKWOOD, 2008; YAWALKAR, 2009; SCOLLARD *et al.*, 2015).

A gravidade dos estados reacionais decorre, principalmente, do comprometimento dos nervos periféricos. A reação inflamatória neural pode desencadear alterações permanentes das funções dos nervos acometidos e constitui elevado poder incapacitante, resultando em perda da sensibilidade, dor neuropática crônica, paresias e deformidades físicas irreversíveis (LOCKWOOD *et al.*, 1993; SCOLLARD *et al.*, 1994; BRITTON, 1998). Estas

consequências acabam por estigmatizar os pacientes e se associam com significativo prejuízo da sua qualidade de vida (MARTINS, 2008; VAN VEEN, 2009).

Existem dois tipos de reações classificadas de acordo com Ridley (1969): reação tipo 1 (RT1) ou reação reversa (RR) e reação tipo 2 (RT2), cuja principal manifestação é o eritema nodoso hansênico (ENH). As duas reações apresentam condições distintas inerentes à fisiopatologia, quadro clínico e terapêutica que ocorrem separadamente, mas podem surgir em momentos diferentes no mesmo paciente e ambas podem levar ao comprometimento da função neural.

Os pacientes com hanseníase podem também apresentar reações mistas, ou seja, reações tipo 1 e 2 ao mesmo tempo (FOSS, 2003; GONÇALVES; SAMPAIO; ANTUNES, 2008). Pode ocorrer, ainda, episódio reacional com dor e espessamento de troncos nervosos, que alguns autores consideram um terceiro tipo de reação e denominam neurite isolada (NERY *et al.*, 2006; BRITO; XIMENES; BÜHRER-SEKULA, 2008).

3.2.1 Reação Tipo 1

A RT1 é a reação mais frequente e ocorre em qualquer forma clínica da hanseníase, embora seja mais comum nas formas borderline, que são imunologicamente instáveis, afetando de 15 a 30% destes pacientes (SCOLLARD, 2006). Também podem ser vistas, em menor frequência, nos pacientes com a forma TT, e raramente na LL (BECK-BLEUMINK & BERHE, 1992; FOSS, 2003). As RT1 podem ocorrer a qualquer momento, mas são observadas principalmente no início do tratamento ou durante o primeiro ano de MDT (VAN BRAKEL *et al.*, 1994; BRITTON, 1998).

Clinicamente a RT1 se manifesta como inflamação aguda nas lesões de pele, em nervos periféricos ou em ambos (Figura 4). Na pele é caracterizada pelo aparecimento de novas lesões e exacerbação de lesões pré-existentes com sinais de dor, eritema, infiltração, calor local e edema, principalmente na região da face e extremidades dos membros superiores e inferiores (BRASIL, 2002). Nos casos mais graves podem ocorrer ulceração profunda e necrose acentuada, levando a sequelas irreversíveis (NAAFS, 1992).

Embora as manifestações sejam localizadas e não haja comprometimento sistêmico, a RT1 é fortemente associada ao comprometimento dos nervos periféricos. O dano neural, presente nessa reação, decorre da tendência original do *M. leprae* em invadir as células de Schwann e da ação de citocinas Th1 que levam à degeneração axonal (RAMBUKKANA *et al.*, 1997). Nos nervos, em função da resposta granulomatosa, ocorre espessamento de um ou

mais nervos periféricos, acompanhadas ou não de dor aguda de intensidade variável, a chamada neurite. A neurite aguda, se não for tratada rapidamente e adequadamente, levará à perda permanente da função nervosa, com neuropatia periférica sensorial e motora, acarretando em incapacidades físicas como mão em garra, pé caído e paralisia facial (RAMBUKKANA, 2001; HARBOE; ASEFFA; LEEKASSA, 2005).

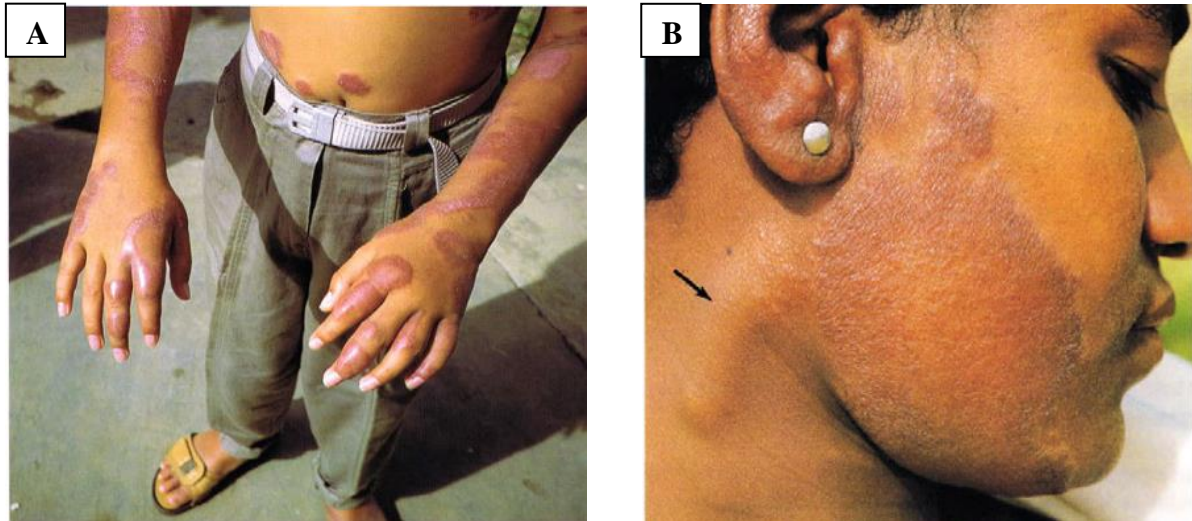


Figura 4. Reação hansênica tipo 1. **A.** Manchas avermelhadas, inchadas e dolorosas, nas mãos e dedos após tratamento com MDT. **B.** Extensa mancha na face e espessamento do nervo auricular no pescoço (seta). Fonte: Adaptado de O Novo Atlas de Hanseníase (MCDUGALL; YUASA, 2002).

Os mecanismos que levam a esse tipo de reação e os motivos de afetar ou não determinados pacientes ainda são desconhecidos, porém a RT1 tem sido associada a um súbito aumento da resposta imune do tipo Th1 contra os antígenos do *M. leprae*. Nessa reação evidencia-se o aumento do número de macrófagos e linfócitos T e redução do número de bacilos, indicando a atividade da reação na eliminação do agente patológico (KIRKALDY, 2003). Além disso, há uma maior produção de citocinas IFN- γ e IL-12 (SREENIVASAN *et al.*, 1998), IL-1 (SARNO *et al.*, 1991), IL-2, IL-6 e IL-8 (MORAES *et al.*, 1999) e TNF- α , sendo que esta última foi considerada uma das principais citocinas envolvidas na mediação do dano neural, uma vez que é capaz de deteriorar as células de *Schwann* que produzem mielina (KHANOLKAR-YOUNG *et al.*, 1995).

3.2.2 Reação Tipo 2

A reação tipo 2 ocorre principalmente em pacientes multibacilares (BL e LL) deficientes de imunidade celular contra os antígenos de *M. leprae* e com intensa resposta imune humoral, seguida do surgimento exacerbado de uma resposta imune celular, antes

muito fraca ou inexistente. Essa reação é caracterizada pela alteração da imunidade humoral e aumento da resposta imune celular, com forte reação inflamatória sistêmica relacionada à deposição de imunocomplexos na parede vascular (NAAFS, 1992; BRITTON, 1998).

A RT2 ocorre com maior frequência durante o tratamento com MDT, quando as lesões cutâneas estão em involução, afetando 41% dos pacientes neste período (FEUTH *et al.*, 2008). Em outros casos a RT2 pode ser a primeira manifestação da hanseníase, possibilitando o diagnóstico da doença, situação esta observada em um terço dos pacientes que desenvolvem essa reação (SAUNDERSON; GEBRE & BYASS, 2000.). Além disso, fatores como gravidez, lactação, ciclo menstrual, infecções intercorrentes, febre, vacinação e estresse psicológico podem precipitar o aparecimento do eritema nodoso (SCOLLARD *et al.*, 1994).

A manifestação clínica mais frequente da RT2 é o ENH, que são nódulos inflamatórios, eritematosos, dolorosos, de coloração rósea, tamanho variado, de surgimento súbito em qualquer região do corpo, que podem evoluir para pústulas e bolhas, com posterior ulceração e formação de necrose nas formas mais graves, conforme ilustrado na Figura 5 (BRASIL, 2002). Há comprometimento sistêmico do quadro podendo ocorrer febre, mal-estar, sudorese, caquexia, ataxia, náuseas, vômitos, edema na face, mãos e pés, que podem vir acompanhados de infartamento ganglionar generalizado, hepatoesplenomegalia, dores musculares e ósseas (geralmente dor tibial), artrite, irite (inflamação da íris), iridociclite (inflamação da parte anterior do olho, que inclui a íris e o corpo ciliar), orquite (inflamação do testículo), epididimite (inflamação do epidídimo) e neuropatia. A reação inflamatória neural pode estar presente, mas geralmente é menos agressiva que a observada na RT1 (MITCHELL & MEYERSON, 1996; KAHAWITA & LOCKWOOD, 2008).

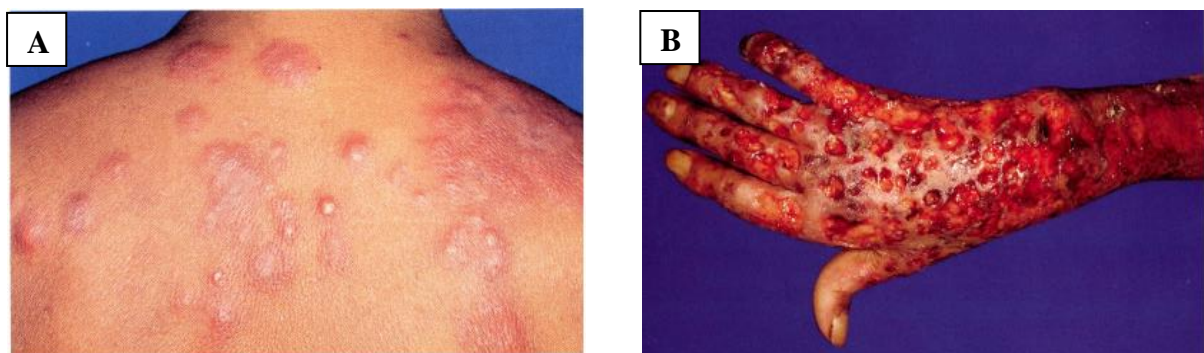


Figura 5. Reação hansênica tipo 2. **A.** Eritema nodoso hansênico: nódulos e placas eritematosas, alguns com centro violáceo, outros com pústulas. **B.** Eritema nodoso hansênico necrotizante com inúmeras lesões ulceradas. Fonte: Adaptado de Atlas de Hanseníase (OPROMOLLA; URA, 2002).

A etiologia da RT2 não é completamente conhecida, mas é associada à formação de imunocomplexos que circulam pelo sangue periférico e a exposição repentina de novos antígenos do *M. leprae*, antes não reconhecidos pelo sistema imune do paciente. Com o tratamento da MDT há destruição bacilar acentuada, liberação de frações antigênicas de *M. leprae* e indução da formação do anticorpo anti PGL-1, resultando na síndrome do imunocomplexo circulante, com depósito do complexo antígeno-anticorpo nos espaços teciduais e em vasos sanguíneos e linfáticos (FOSS; CALLERA; ALBERTO, 1993; STEFANI *et al.*, 1998; BÜHRER-SÉKULA, 2008).

Na RT2 também se observa uma hiperatividade imunológica transitória e repentina da resposta imune Th1 (MODLIN *et al.*, 1986), com altos níveis de TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-10, além de infiltração de neutrófilos, indicando uma tendência mista à respostas Th1 e Th2. Porém, a elevação dos níveis de TNF- α é associada a altas concentrações de IFN- γ , que atuando simultaneamente sobre os macrófagos irão estimular também a resposta imune celular (SARNO *et al.*, 1991; FOSS; OLIVEIRA; SILVA, 1993; MORAES *et al.*, 1999; SANTOS *et al.*, 2002).

3.3 Células T reguladoras

O equilíbrio entre a imunidade e a tolerância é fundamental para manter a homeostasia do sistema imune. Um dos mecanismos utilizados para manter esse equilíbrio é a presença e atuação de células Treg (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003). Essas células são uma subpopulação de linfócitos T CD4+ responsáveis pelo papel imunossupressor da atividade de outros linfócitos e de outras células inflamatórias ao inibir suas funções efetoras (SAKAGUCHI *et al.*, 1995; THORNTON & SHEVACH, 1998).

As Treg foram descritas primeiramente nos anos 70 (GERSHON & KONDO, 1970) e representam de 5 a 10% do total dos linfócitos T CD4+ periféricos (SAKAGUCHI *et al.*, 1995). Têm papel essencial na manutenção da auto-tolerância imunológica ao suprimir a ativação de linfócitos T reativos a antígenos próprios, bloqueando assim o desenvolvimento de doenças autoimunes. Além disso, são responsáveis pela regulação da resposta imunológica frente às infecções virais, bacterianas e parasitárias, dentre outras fontes de antígenos exógenos, permitindo assim um retorno à homeostasia (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003).

Há vários tipos de células Treg, dentre eles as naturais e as induzidas ou adaptativas. As Treg naturais se originam no timo e adentram os tecidos periféricos para suprimir as

células efetoras. Já as células induzidas são aquelas geradas a partir de linfócitos T CD4+ *naïves* na periferia após estímulos antigênicos e condições de tolerância ao longo da vida (BLUESTONE & ABBAS, 2003; CHEN *et al.*, 2003). Outras subpopulações de células T, incluindo células T “natural killer” (NK), as células T $\gamma\delta$ e células T CD8+ também podem exercer funções de potentes supressores (SHEVACH & DAVIDSON, 2010).

Os mecanismos pelos quais os linfócitos Treg exercem sua função supressora ainda não estão muito bem elucidados. Diversos estudos indicam que as células Treg suprimem a resposta imune pela interação célula-célula, pela liberação de citocinas ou competição por fatores de crescimento (Figura 6).

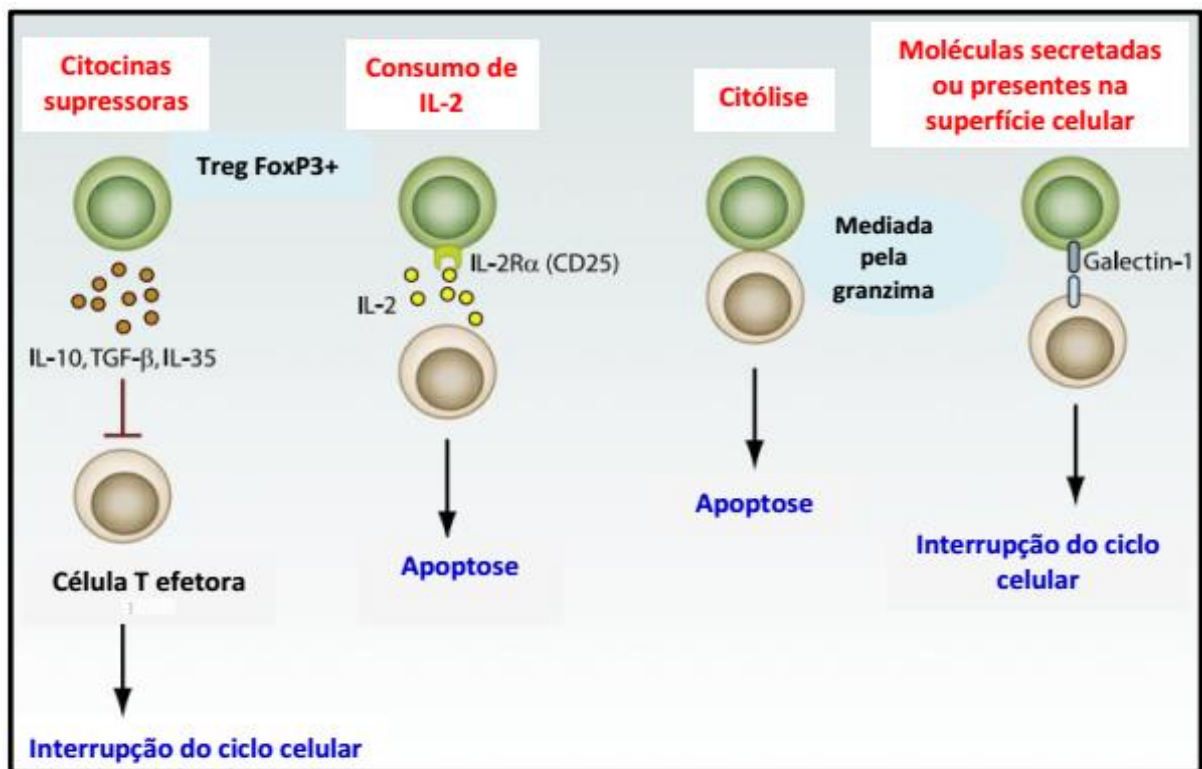


Figura 6. Principais mecanismos pelos quais os linfócitos Treg podem suprimir a resposta de células T efetoras. Fonte: Adaptado de Shevach (2009).

As células Treg são capazes de secretar altas quantidades de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β , capazes de inibir diretamente as células T efetoras (SAKAGUCHI *et al.*, 2010; SHEVACH, 2009). Além disso, a alta expressão de CD25 (receptor da IL-2) torna as células Treg capazes de atuar como grandes captadoras de IL-2 e competidoras, levando assim as células T efetoras a apoptose (THORNTON & SHEVACH, 1998). Os linfócitos Treg podem também funcionar como células citotóxicas, ao liberar perforinas/granzimas resultando em interrupção do ciclo celular das T efetoras. Além disso,

Treg podem expressar moléculas em sua superfície ou secretá-las, como por exemplo, a Galectina-1 capaz de inibir a proliferação celular dos linfócitos T CD4+ (SHEVACH, 2009).

Todos estes mecanismos podem também ser utilizados por células Treg para inibir a função de células apresentadoras de antígeno (APC). Estudos apontam que a interação de CTLA-4 (*Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen-4*) em células Treg com CD80 e CD86 em células dendríticas seja uma via importante pela qual as células Treg possam mediar as suas funções supressoras *in vitro* (SERRA *et al.*, 2003; MISRA *et al.*, 2004).

Além da alta expressão da molécula CD25, as Treg expressam outros marcadores moleculares como CTLA-4, GITR (receptor induzido por glicocorticoide) e o marcador intracelular FoxP3, este último considerado um dos mais importantes (FONTENOT *et al.*, 2005; HORI; NOMURA; SAKAGUCHI, 2003). O FoxP3 é também o principal marcador molecular para Treg largamente utilizado na identificação dessas células (BACCHETTA; GAMBINERI; RONCAROLO, 2007; RONCAROLO & GREGORI, 2008).

O FoxP3 parece ser o gene regulador principal da função supressora das células T CD4+ CD25+. Camundongos deficientes de FoxP3 morrem com 3-4 semanas de vida, devido a uma síndrome linfo proliferativa autoimune fatal e rápida. Além disso, esses mesmos camundongos são incapazes de gerar Treg (FONTENOT *et al.*, 2005; HORI; NOMURA; SAKAGUCHI, 2003; YAGI *et al.*, 2004). Outros estudos demonstraram também que mutações no gene FoxP3 em humanos interferem no desenvolvimento de células Treg e são responsáveis pela chamada síndrome de imunodisfunção poliendócrinopática enteropática ligada ao X (IPEX), doença autoimune associada a desordens como enteropatia, diabetes tipo 1, tireoidite, bem como doença intestinal inflamatória e alergias (WILDIN; SMYK-PEARSON; FILIPOVICH, 2002; O'GARRA & VIEIRA 2003).

3.3.1 Células Treg e hanseníase

A atividade funcional das células do sistema imune deve estar em condições equilibradas para manter a homeostase imunológica do organismo. Anormalidades no número e na função das células Treg prejudicam o controle deste mecanismo de regulação imune e podem contribuir e determinar o progresso de doenças infecciosas crônicas (BELKAID & ROUSE, 2005). As células Treg têm sido alvo de investigações em diferentes doenças como lúpus eritematoso, doenças reumáticas, dermatite, psoríase, sarcoidose, leishmaniose, tuberculose e câncer cutâneo (CHEN *et al.*, 2007, DE BOER *et al.*, 2007, CRUVINEL *et al.*, 2008, CHIACCHIO *et al.*, 2009).

A contribuição dos Treg para a imunopatologia das doenças infecciosas é complexa. Uma depleção de Treg pode levar a uma reação inflamatória exacerbada do sistema imune na tentativa de eliminar o micro-organismo e sua presença pode suprimir a resposta imunológica, auxiliando na persistência do patógeno (BELKAID & ROUSE, 2005; SAKAGUSHI *et al.*, 2010). Recentemente, vários estudos têm mostrado esse duplo papel das células Treg. Pesquisas realizadas em camundongos infectados com *Candida albicans* mostram que a redução de células Treg induz um melhor controle da infecção, entretanto, aumenta a inflamação patológica gastrointestinal (MONTAGNOLI *et al.*, 2002). Por outro lado, estudos demonstram que em camundongos portadores da infecção por *Leishmania major* a produção de IL-10 por células Treg contribui diretamente para a persistência do parasito através da modulação da função das APCs ou inibição da produção de citocinas por células do tipo Th1 (BELKAID *et al.*, 2002; BELKAID, 2003).

Os dados na literatura a respeito do papel dos linfócitos Treg na imunopatologia da hanseníase são escassos, além de os trabalhos usarem metodologias distintas (estudos “*in situ*” com imunohistoquímica versus estudos em sangue periférico por citometria de fluxo) e mostrarem resultados controversos. Em um estudo envolvendo 38 casos de hanseníase (9 TT, 6 BT, 4 BL, 8 LL, 3 BB e 6 ENH) e 38 controles saudáveis, utilizando citometria de fluxo, Attia e colaboradores (2010) analisaram a expressão de FoxP3 de linfócitos Treg circulantes e verificaram um aumento desses na forma TT, comparado com controles. Além disso, houve um aumento da expressão de FoxP3 nos casos de RT2. Os resultados desse estudo sugerem que a atividade das Treg pode ser benéfica para os doentes com hanseníase ao controlar a disseminação do patógeno, pois a resposta imune tenderia para o polo caracterizado pelo predomínio da imunidade celular da doença.

Resultados semelhantes foram encontrados em outro trabalho. Um estudo avaliando o número de Treg CD4+CD25+FoxP3+ circulantes por citometria de fluxo em 43 pacientes com hanseníase não tratados e 40 controles, verificou que o nível de Treg foi significativamente maior na forma TT em relação ao grupo controle, correlacionando o achado com a alta imunidade mediada por células nesses pacientes (ABDALLAH *et al.*, 2014).

Esses dados diferem dos resultados de outro grupo que avaliou a expressão de células Treg na circulação por citometria de fluxo e em lesões de pacientes com hanseníase, com imunohistoquímica, bem como controles saudáveis. Uma maior frequência de Treg foi observada em pacientes multibacilares comparados com paucibacilares e contatos, sugerindo

que essas células podem desempenhar um papel patogênico na hanseníase, permitindo a proliferação incontrolada do bacilo (PALERMO *et al.*, 2012).

Fernandes e colaboradores (2013) também avaliaram as frequências de células FoxP3+ em pacientes hansênicos menores de 15 anos e em contatos. Os dados da avaliação por citometria de fluxo mostraram que as células dos pacientes multibacilares apresentaram frequências de Treg cerca de duas vezes maiores do que nos contatos.

Um estudo analisando células Treg em culturas de PBMCs e em lesões cutâneas de pacientes com hanseníase mostrou números significativamente mais elevados de células T CD8+CD25+FoxP3+ em LL em comparação com pacientes BT, enquanto a microscopia de biópsias cutâneas revelou um aumento no número de células FoxP3+ nas lesões de LL em comparação com as lesões TT e BT, inferindo que as células Treg desempenham um papel na incapacidade de resposta Th1 ao *M. leprae* em pacientes com a forma LL (BOBOSHA *et al.*, 2014).

Em estudos com análises de culturas de PBMC estimuladas com antígeno e de lesões cutâneas de pacientes com hanseníase foi observado um aumento da porcentagem de células Treg e maior expressão gênica para FoxP3 nas formas LL em comparação com pacientes TT (SAINI *et al.*, 2016). Resultados semelhantes foram verificados pelo mesmo grupo em um estudo anterior, em que também houve maior expressão de Treg em LL quando comparado com BT (SAINI; RAMESH; NATH, 2014).

Em relação aos estudos com reações hansênicas, pesquisadores avaliaram a expressão imunohistoquímica de FoxP3 em biópsias de pele de 20 casos de hanseníase, incluindo diferentes formas clínicas e reações hansênicas. Não houve diferença estatística da expressão do FoxP3 entre as formas TT, BT, BL e LL. Entretanto, foi encontrado um aumento estatisticamente significativo da expressão de FoxP3 nos pacientes portadores de reação tipo 1, quando comparada com a RT2 e em pacientes sem reação, sugerindo que as células Treg poderiam ter papel relevante na etiopatogenia da hanseníase (MASSONE *et al.*, 2010).

Em outro estudo recente Parente e colaboradores (2015) verificaram a frequência e distribuição de células Treg em diferentes formas clínicas e episódios reacionais de hanseníase utilizando ensaios imunohistoquímicos. Foi observado um aumento significativo da expressão de FoxP3 em pacientes com RT1 quando comparados com pacientes não reacionais (I, BT e LL). Porém não houve significância estatística entre as outras formas clínicas.

Achados semelhantes foram descritos por Vieira e colaboradores (2016). Os pesquisadores analisaram a frequência de Treg circulantes em pacientes com RT1 e RT2 e também a frequência *in situ* de células Tregs e verificaram que os doentes com RT2 apresentaram um número marcadamente menor de Treg circulantes e *in situ* quando comparados com pacientes RT1 e controles, levando à hipótese de que em pacientes com RT2 a modulação de Treg pode favorecer o desenvolvimento de episódios reacionais.

Apesar de já ser bastante estudado em outros modelos de doenças infecciosas, ainda há poucos estudos abordando células Treg/hanseníase. Além do mais, os estudos realizados até o momento trazem resultados conflitantes e não esclareceram em definitivo qual o papel das Treg na imunopatogênese da doença. Por isso é muito importante a realização de novos trabalhos que visem esclarecer qual é a real função das células Tregs na hanseníase, especialmente em casos de reação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Grupo de pacientes e controles

Para a análise do número de células Treg no sangue periférico foram recrutados cinco grupos de estudo:

Os grupos 1 e 2 eram constituídos por pacientes com hanseníase PB (n=10) e MB (n=10), respectivamente. O recrutamento desses pacientes foi realizado no Centro de Referência em Diagnóstico e Terapêutica (CRDT) e no Hospital Anuar Auad, Goiânia, Goiás, Brasil, no período compreendido entre janeiro e setembro de 2016.

Os grupos 3 e 4 foram compostos por pacientes com reação RT1 e RT2, respectivamente, com n=10 em cada grupo. Todos os pacientes RT1 e RT2 foram submetidos a exames dermatoneurológicos e classificados por um dermatologista com experiência em diagnóstico de hanseníase. O recrutamento de pacientes com reação foi realizado no Centro de Referência em Diagnóstico e Terapêutica e no Hospital Anuar Auad, Goiânia, Goiás, Brasil, no período compreendido entre janeiro e setembro de 2016. Todos os pacientes com reação estavam em MDT. As amostras foram coletadas durante a ocorrência do episódio reacional.

No grupo 5 (n=10) encontravam-se os controles endêmicos saudáveis (CES), representados por indivíduos saudáveis sem histórico clínico ou familiar de hanseníase ou tuberculose. Eles foram selecionados após responderem questionário padronizado. O recrutamento e coleta sanguínea do grupo CES foram realizados no laboratório de Imunologia da AIDS e Hanseníase do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP - UFG), no período compreendido entre os meses de junho e julho de 2016.

4.1.1 Critérios de inclusão

Grupo 1 (PB): Pacientes paucibacilares classificados como TT e BT, segundo critérios clínicos e histopatológicos de Ridley & Jopling (1966). Foram recrutados para este estudo pacientes com hanseníase PB recém-diagnosticados e virgens de tratamento específico para hanseníase.

Grupo 2 (MB): Pacientes multibacilares, classificados como BB, BL, ou LL, segundo critérios clínicos e histopatológicos de Ridley & Jopling (1966). Foram recrutados para este

estudo pacientes com hanseníase MB recém-diagnosticados e virgens de tratamento específico para hanseníase.

Grupos 3 (RT1): Indivíduos com episódio reacional tipo 1, classificados segundo critérios clínicos e histopatológicos de Ridley (1969). Foram recrutados para este estudo pacientes com reação hansênica tipo 1, durante tratamento com MDT.

Grupo 4 (RT2): Indivíduos com episódio reacional tipo 2, classificados segundo critérios clínicos e histopatológicos de Ridley (1969). Foram recrutados para este estudo pacientes com reação hansênica tipo 2, durante tratamento com MDT.

Grupo 5 (CES): Indivíduos saudáveis residentes em Goiânia (área endêmica para hanseníase), sem histórico de exposição previa à hanseníase e tuberculose.

4.1.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo pacientes com hanseníase classificados com a forma indeterminada ou neural pura; indivíduos com sorologia sabidamente positiva para HIV; gestantes e pacientes com idade inferior a dezoito anos.

4.2 Consulta clínica, entrevista e coleta sanguínea

Todos os pacientes com hanseníase foram submetidos à avaliação dermatoneurológica e testes de sensibilidade tátil, térmica e dolorosa. Os testes de sensibilidade e a avaliação dermatoneurológica foram realizados por dermatologista com comprovada experiência em diagnóstico clínico de hanseníase.

Após a avaliação clínica e explicação sobre estudo, os voluntários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e responderam a um questionário padronizado para a obtenção de dados sócio-demográficos. Em seguida realizou-se a coleta de sangue por punção venosa em tubos secos (BD Vacutainer® - Franklin Lakes, NJ, USA) e em tubos com heparina (BD Vacutainer® - Franklin Lakes, NJ, USA).

4.3 Determinação da reatividade por estímulo de células mononucleares de sangue periférico - PBMCs

Culturas de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram preparadas a partir de sangue total heparinizado não diluído venoso. Para a separação das PBMCs, o sangue total foi diluído em solução salina 0,9% estéril (1:2) em seguida pipetado cuidadosamente em 3 vezes o volume em solução de FicollPaque™ (Amersham

Biosciences) sendo posteriormente centrifugado a 1000 g por 20 minutos a 4°C formando assim uma interface entre os líquidos (anel branco), onde foi coletado o anel leucocitário usando pipeta pasteur. Após a transferência para um novo tubo de poliestireno foi adicionado salina 0,9%, e os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 1000 xg a 4°C. As PBMC foram, então, ressuspensas em RPMI-1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado com 50000 U de penicilina/estreptomicina (BioWhittaker, Walkerville, MD) e 10% de soro humano inativado pelo calor (Valley Biomedical Inc., Winchester, VA) e 2×10^5 células foram adicionadas a cada poço de uma placa de 96 poços (200 µl volume total por poço - Corning Inc., Corning, NY) e estimuladas com antígeno de sonicado de células de *M. leprae* (MLCS). Após 3 dias de incubação a 37 °C, 5% CO₂, então ~ 100 µl de sobrenadante foram recolhidos e armazenados a - 20 °C até realização de ensaios por ELISA, para quantificar Treg. Para cada ensaio, as estimulações foram conduzidas com 1 ml de MLCS sob uma concentração de 10 µg/ml.

4.4 Detecção de Treg FoxP3+ por ELISA

A concentração de Treg FoxP3+, a partir de plasma e sobrenadantes da cultura de PBMC estimulados com o antígeno, foi determinada por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), em duplicata, com o kit FoxP3 humano, de acordo com as instruções do fabricante (LifeSpan BioSciences - Seattle, Washington). Resumidamente, adicionou-se 100 µl de cada amostra em poços apropriados na placa de ELISA, pré-sensibilizada de fábrica com anticorpos anti FoxP3. Após duas horas e meia de incubação à temperatura ambiente, lavou-se a placa. Em seguida, adicionou-se 100 µl de anticorpo biotilado preparado em cada poço. A placa foi incubada durante 1 hora à temperatura ambiente. Após nova lavagem, adicionou-se 100 µl de solução de estreptavidina em cada poço. A placa foi então incubada durante 45 minutos à temperatura ambiente. Após nova lavagem, adicionou-se 100 µl de TMB a cada poço. A placa foi incubada, novamente, durante 30 minutos à temperatura ambiente. Finalmente adicionou-se 50 µl de solução de parada a cada poço. A densidade óptica (DO) foi lida a 450 nm. De acordo com o fabricante o limite mínimo de detecção (sensibilidade) do kit FoxP3 Humano era de 0,313 ng/ml.

4.5 Análise estatística

O software *GraphPad Prism v.5* foi utilizado para o cálculo da mediana e valores médios de DO e para realização dos gráficos *box plot*. A significância estatística foi avaliada

pela análise de Kruskal-Wallis para comparação de grupos múltiplos e Mann-Whitney U para comparação entre dois grupos. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando valores de $p \leq 0,05$ foram obtidos.

4.6 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas/UFG e Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (protocolo #12962). Todos os participantes foram informados sobre os objetivos do estudo e os procedimentos envolvidos e, em seguida, foram incluídos somente após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com a Resolução 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde, com as alterações 466/2012 e 510/2016.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características dos pacientes com hanseníase, reação hansênica e controles endêmicos saudáveis

O presente estudo avaliou um total de 50 participantes. Desses, 20 eram portadores de formas polares da hanseníase e 20 de reações hansênicas constituindo os grupos de estudo. O grupo controle foi representado por 10 participantes que eram indivíduos sadios residentes em área endêmica da doença. Dos 40 pacientes que participaram dos grupos de estudo, 19 (47,5%) eram do sexo feminino e 21 (52,5%) do sexo masculino. Dos 10 pacientes que participaram do grupo controle, 04 eram do sexo feminino e 06 do sexo masculino.

O grupo PB foi constituído por 04 pacientes do sexo masculino e 06 do sexo feminino. O grupo MB foi constituído por 04 indivíduos do sexo masculino e 06 do sexo feminino. O grupo RT1 foi composto por 10 pacientes, sendo 05 de cada sexo. Já para o grupo RT2 foram recrutados 06 homens e 04 mulheres.

A idade variou de 18 a 86 anos nos grupos de estudo com média de 49,7 (\pm 15,7) e de 18 a 76 anos no grupo controle com média de 43,0 (\pm 19,2). A diferença entre essas médias não se mostrou significativa ($p = 0,2505$). As medianas de idade dos grupos de estudo distribuídos de acordo com o diagnóstico clínico foram: PB 36,8 (variação de 19 a 78 anos); MB 38,0 (variação de 18 a 81 anos); RT1 37,1 (variação de 18 a 77 anos); RT2 37,5 (variação de 19 a 86 anos); Controle 37,3 (variação de 18 a 76 anos). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as medianas de idade para os grupos, com $p = 0,6873$.

No grupo dos pacientes com hanseníase PB todos apresentaram baciloscopia negativa, sendo a maioria deles classificados como forma BT, segundo critérios de Ridley-Jopling. Para o grupo de pacientes com hanseníase MB a mediana do índice baciloscópico foi 2,1, com proporção de 07 indivíduos classificados como forma BL e 03 como LL, segundo critérios de Ridley-Jopling. A mediana do índice baciloscópico no grupo RT1 foi igual a 0,5 (variação de 0 a 2) e no grupo RT2 de 2,1 (variação de 0,5 a 3,0), sendo a maioria dos pacientes classificados como BL e LL, respectivamente.

A Tabela 1 mostra as principais características dos pacientes com hanseníase PB e MB, com reação tipo 1 ou tipo 2 e do grupo de controles.

Tabela 1. Principais características dos grupos de estudo com hanseníase, reação hansênica e controles.

	PB	MB	RT1	RT2	CES
Sexo	6 F / 4 M	4 F / 6 M	5 F / 5 M	4 F / 6 M	4 F / 6 M
Idade	36,8 (19-78)	38 (18-81)	37,1 (18-77)	37,5 (19-86)	37,3 (18-76)
Índice Baciloscópico	0	2,1 (0,5-4,0)	0,5 (0-2)	2,1 (0,5-3,0)	n.a.
Forma clínica (Ridley-Jopling)	3 TT/ 7 BT	7 BL/ 3 LL	1 BT/ 7 BL/ 2 LL	1 BB/ 4 BL/ 5 LL	n.a.

F - feminino; M - masculino; TT - forma tuberculóide; BT- forma borderline-tuberculóide; BB - forma borderline-borderline; BL - forma borderline-lepromatosa; LL - forma lepromatosa; n.a.- não aplicável. A idade e o índice baciloscópico estão expressos em mediana (mínimo-máximo).

5.2 Determinação do número de células Treg FoxP3+

A expressão de células Treg nos grupos de estudo e controle foi investigada usando o método de ELISA para a medição do marcador FoxP3 no plasma e no sobrenadante de PBMCs.

Conforme demonstrado na Figura 7, não houve qualquer diferença na expressão de FoxP3+ medido diretamente no plasma, na ausência de estímulos, entre os grupos analisados. Ou seja, a quantidade de células Treg circulantes foi similar quando se comparou os níveis de FoxP3 do grupo de indivíduos saudáveis com pacientes, com ou sem reação.

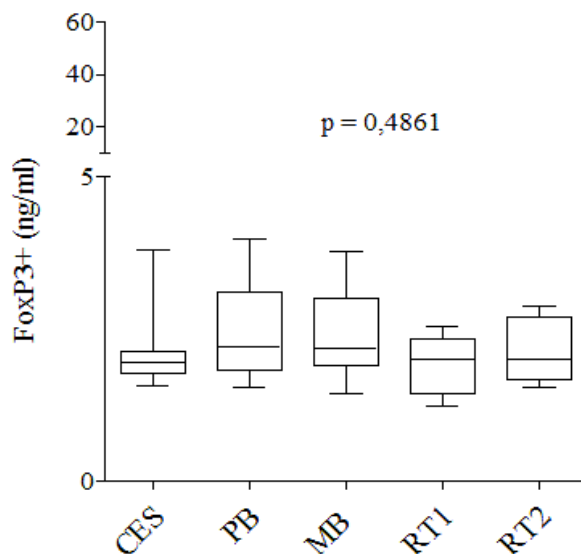


Figura 7. Quantificação de células Treg FoxP3+ no plasma. O número de Treg FoxP3 no plasma de pacientes com hanseníase e controles foi determinado por ELISA. CES – controles endêmicos saudáveis; PB – hanseníase paucibacilar; MB – hanseníase multibacilar; RT1 – reação tipo 1; RT2 - reação tipo 2. Os resultados são apresentados como box plot, interquartil (25-75%) e a linha preta dentro de cada caixa indica o valor da mediana, n = 10 por grupo. P < 0,05 foi considerado como significativo.

Após estimulados com o antígeno MLCS, as PBMCs de todos os grupos demonstraram aumento estatisticamente significativo na expressão de FoxP3 quando comparados com indivíduos saudáveis. A mediana do número de FoxP3 no grupo de indivíduos saudáveis foi de 5,38 ng/ml (Figura 8).

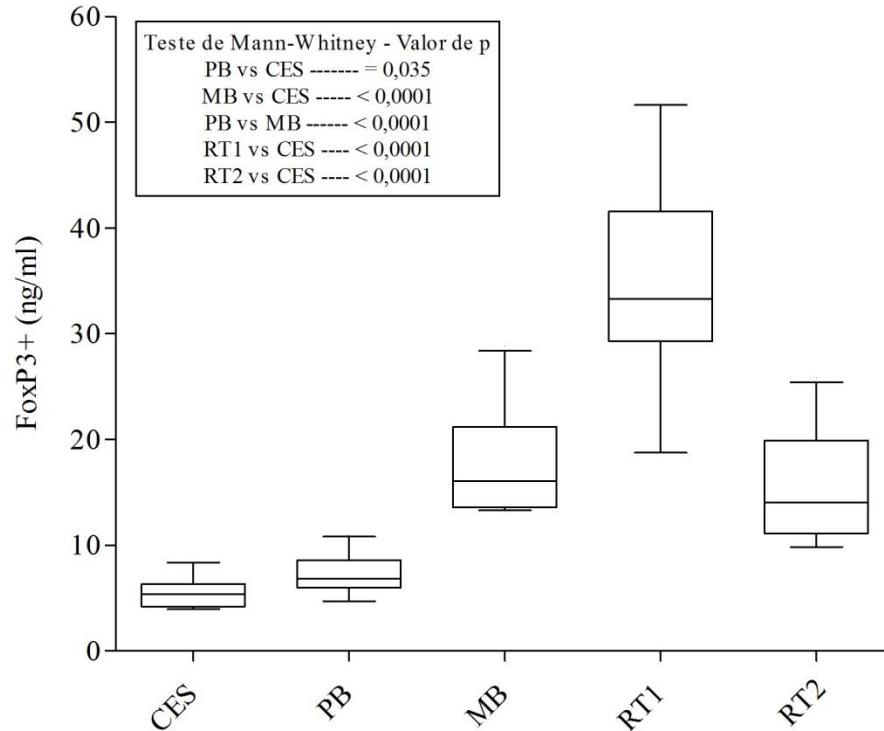


Figura 8. Número de células Treg FoxP3+ em PBMCs de pacientes versus indivíduos saudáveis após estímulo. As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes com hanseníase e controles foram estimuladas *in vitro* com sonicação celular do *M. leprae* (“*M. leprae* cell sonicate” - MLCS). O número total de células Treg FoxP3 foi determinado por ELISA. CES – controles endêmicos saudáveis, PB – hanseníase paucibacilar, MB – hanseníase multibacilar, RT1 - reação tipo 1, RT2 - reação tipo 2. Os resultados são apresentados como box plot, interquartil (25-75%) e a linha preta dentro de cada caixa indica o valor da mediana, n = 10 por grupo. P < 0,05 foi considerado como significativo.

Conforme ilustrado na Figura 9, ao analisar as amostras de pacientes com as formas polares da hanseníase foi observado um aumento significativo (cerca de 2,5 vezes mais) da expressão de células Treg em pacientes MB, com 16 ng/ml de Foxp3, quando comparados com PB que apresentaram mediana de 6,83 ng/ml, (p < 0,0001).

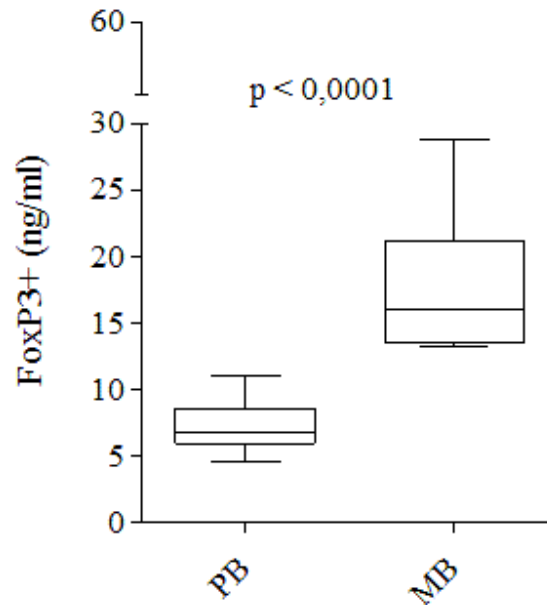


Figura 9. Número de células Treg FoxP3+ em PBMCs de pacientes PB versus pacientes MB após estímulo. As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes com Hanseníase foram estimuladas *in vitro* com sonicação celular do *M. leprae* (“*M. leprae* cell sonicate” - MLCS). O número total de células Treg FoxP3 foi determinado por ELISA. PB – Hanseníase paucibacilar, MB – Hanseníase multibacilar. Os resultados são apresentados como box plot, interquartil (25-75%) e a linha preta dentro de cada caixa indica o valor da mediana, n = 10 por grupo. P < 0,05 foi considerado como significativo.

Ao se comparar as respostas de pacientes MB e pacientes RT2, verificou-se que não houve diferença estatística entre os grupos (p = 0,2176), que demonstraram uma expressão de 14,1 e 16,1 ng/ml de Foxp3, respectivamente, após o estímulo com MLCS (Figura 10).

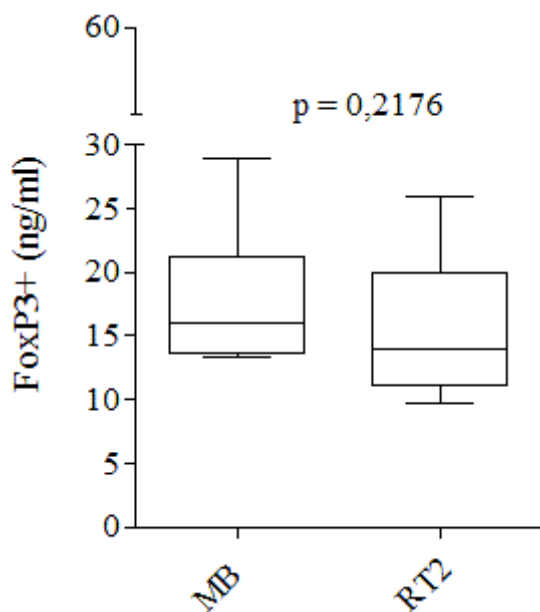


Figura 10. Número de células Treg FoxP3+ em PBMCs de pacientes MB versus pacientes com RT2 após estímulo. As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes com Hanseníase foram estimuladas *in vitro* com sonicação celular do *M. leprae* (“*M. leprae* cell sonicate” - MLCS). O número total de células Treg FoxP3 foi determinado por ELISA. MB – Hanseníase multibacilar; RT2 - reação tipo 2. Os resultados são apresentados como box plot, interquartil (25-75%) e a linha preta dentro de cada caixa indica o valor da mediana, n = 10 por grupo. P < 0,05 foi considerado como significativo.

Em contrapartida, o grupo de indivíduos com episódios reacionais do tipo 1 apresentou a maior expressão de Foxp3, com mediana de 33,3 ng/ml. A quantidade de Treg Foxp3+ em pacientes RT1 foi cerca de seis vezes maior que a de indivíduos saudáveis e mais que o dobro que dos indivíduos RT2 (Figura 11).

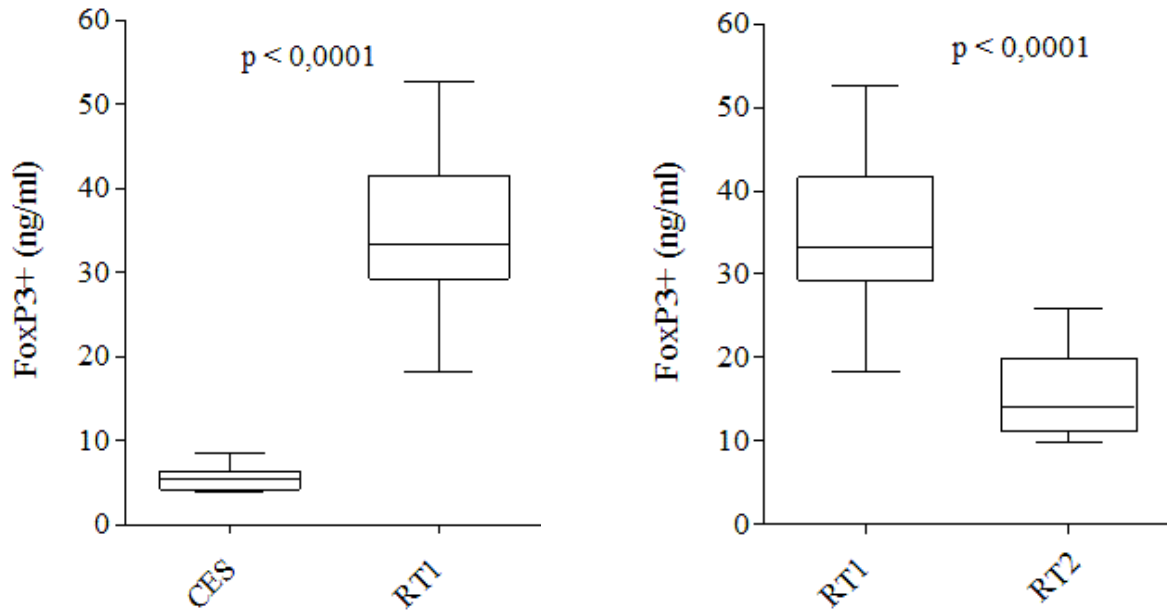


Figura 11. Número de células Treg FoxP3+ em PBMCs de pacientes RT1 versus controles saudáveis e pacientes RT2 após estímulo. As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes com hanseníase foram estimuladas *in vitro* com sonicação celular do *M. leprae* (“*M. leprae* cell sonicate” - MLCS). O número total de células Treg FoxP3 foi determinado por ELISA. CES – controles endêmicos saudáveis, RT1 - reação tipo 1, RT2 - reação tipo 2. Os resultados são apresentados como box plot, interquartil (25-75%) e a linha preta dentro de cada caixa indica o valor da mediana, n = 10 por grupo. P < 0,05 foi considerado como significativo.

A hanseníase é caracterizada por um amplo espectro de formas clínicas. A susceptibilidade ou resistência à infecção por *M. leprae* vai depender do tipo de resposta imune (Th1 ou Th2) gerada pelo sujeito infectado. Enquanto pacientes PB são caracterizados por uma forte resposta Th1 com expressão de citocinas IL-2, IFN- γ e TNF- α , do outro lado do polo, nos MB, há fraca imunidade mediada por células, levando à predominância de resposta Th2 e produção de citocinas IL-4, IL-10, dentre outras (MODLIN, 1994; SAMPAIO *et al.*, 2012).

A imunidade celular específica é mediada principalmente pelos linfócitos T. As células Treg são um subtipo de linfócito T CD4+ caracterizadas pela expressão da molécula CD25+ e alta expressão do fator nuclear FoxP3 (Forkhead box P3). As Tregs são essenciais na modulação do sistema imune através da supressão da ativação de respostas imunológicas

ante a antígenos exógenos ou próprios (auto-tolerância) (SAKAGUCHI *et al.*, 1995; BLUESTONE & ABBAS, 2003).

Tregs também desempenham um papel essencial no controle da resposta imune excessiva contra antígenos microbianos, especialmente contra patógenos que estabelecem infecções persistentes. E embora a existência de uma população de células supressoras tenha sido descrita em pacientes com hanseníase há muitos anos (REA, 1983; BLOOM & MEHRA, 1984), o papel das Tregs foi abordado em poucos estudos e ainda há controvérsias sobre a sua função na doença e suas diferentes formas clínicas.

Neste estudo o papel e a frequência de células Treg CD25⁺FoxP3⁺ foram avaliados nas diferentes formas de hanseníase. Nós observamos que, na ausência do estímulo MLCS, o número de Treg FoxP3⁺ foi similar em todos os grupos analisados. E após estimulada, essa população de linfócitos FoxP3⁺ foi observada em número crescente nas PBMCs de todos os pacientes, independente da forma clínica. Este resultado corrobora com trabalhos anteriores que demonstraram que, independentemente da doença infecciosa, a quantidade de células Tregs circulantes é semelhante quando comparamos indivíduos doentes e saudáveis. A diferença na quantidade de células Treg, em indivíduos doentes e saudáveis só é observada no local da infecção ou em condições *ex vivo* após estímulo com antígenos específicos (LUO *et al.*, 2017; ZEWDIE *et al.*, 2016; BAHRAMI *et al.*, 2014).

Nossos resultados são fortemente divergentes de outros trabalhos que mostram as células Treg aumentadas em pacientes PB quando comparados com pacientes MB (ABDALLAH *et al.*, 2014; ATTIA *et al.*, 2010). Essa divergência de resultados pode ser devido a diferenças genéticas das populações estudadas. Estudos com antígenos com potencial aplicação diagnóstica para a hanseníase demonstraram que populações geneticamente diferentes podem apresentar distintos padrões de resposta imune celular a uma mesma proteína recombinante (ARAOZ *et al.*, 2006, e DOCKERELL *et al.*, 2000, GELUK & OTTENHOFF, 2006).

Entretanto corroboram com estudos anteriores, em que foi observado um aumento significativo de Treg em pacientes MB quando comparados com PB e indivíduos saudáveis (FERNANDES *et al.*, 2013; KUMAR *et al.*, 2013; BOBOSHA *et al.*, 2014; SADHU *et al.*, 2016). Acreditamos que este aumento está supostamente relacionado com a anergia das células T observada na forma MB da doença. As células Treg teriam, então, um papel patogênico crucial nesses indivíduos MB, pois o aumento da expressão de Treg poderia

aumentar a supressão de resposta Th1, reduzindo a liberação de IFN- γ , o que favorece a sobrevivência e proliferação do bacilo.

Reações hansênicas ou episódios reacionais são resultados de complexas interações entre o sistema imune e o agente patológico *M. leprae*, caracterizados por manifestações inflamatórias agudas, com maior frequência em pacientes MB e que podem ocorrer antes, durante ou após tratamento com MDT (SCOLLARD *et al.*, 1994). Neste estudo determinamos a quantidade de células Treg FoxP3+ em culturas de PBMCs durante os episódios reacionais, RT1 ou RT2, de pacientes em tratamento com MDT. Foi observado que ambos os tipos reacionais tiveram um aumento do número de Treg em comparação com pacientes PB e CES ($p < 0,001$), mostrando concordância parcial com um estudo recente em que foi observada uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em pacientes com RT1 em comparação com pacientes sem reação (PARENTE *et al.*, 2015). A evidência de aumento de Treg também foi observada em pacientes RT1 quando comparados com formas não reacionais da doença (TT, BT, BL, LL) (MASSONE *et al.*, 2010).

Além disso, ao se comparar os dois grupos reacionais, o número de Treg FoxP3+ foi significativamente maior em RT1 do que em RT2. O grupo de pacientes com RT1 apresentou maior expressão de FoxP3, com mediana de 33,3 ng/ml, mais que o dobro dos pacientes RT2. A mesma tendência de maior quantidade de células Treg em TR1 também foi observada em estudos anteriores (ABDALLAH *et al.*, 2014; COSTA, 2014; VIEIRA *et al.*, 2016). O aumento de Tregs durante o episódio reacional do tipo I parece estar relacionado com o dano neural que ocorre nesse tipo de reação devido a produção de citocinas Th1 (IL-2 e IFN- γ) e de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α (ABDALLAH *et al.*, 2014). Assim, sugere-se que o aumento das células FoxP3+ no grupo RT1 possa decorrer da tentativa de proteção tissular em um contexto de um processo inflamatório agudo e exacerbado.

Da mesma forma, a menor expressão de células Treg FoxP3+ observada em pacientes com RT2 está associada com o mecanismo imunopatológico da reação, que se baseia na hiperativação da resposta imune humoral.

Além de determinar o número de células FoxP3+ e correlacioná-lo com as formas clínicas de hanseníase e reações hansênicas, o presente trabalho apresentou algumas vantagens em relação a trabalhos anteriores que tinham o mesmo objetivo. Nós trabalhamos com o método de ELISA, enquanto a maioria dos trabalhos (SAINI *et al.*, 2016; BOBOSHA *et al.*, 2014; KUMAR *et al.*, 2013; FERNANDES *et al.*, 2013; PALERMO *et al.*, 2012; ATTIA *et al.*, 2010) pesquisaram FoxP3 em hanseníase utilizando ensaios mais sofisticados,

como citometria de fluxo. A metodologia por citometria de fluxo é uma técnica onerosa e pouco acessível. Dessa forma, nossos resultados demonstram a eficácia do teste de ELISA na medição de células Treg FoxP3+, além de ser um teste simples e mais barato.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados aqui apresentados fornecem informações importantes sobre a participação de células Treg nas diferentes formas de hanseníase e em reações hansênicas, demonstrando o papel relevante destas células na imunopatologia da doença. Nossos resultados sugerem que o maior número de Treg em pacientes com RT1 poderia ser benéfico para o hospedeiro como um mecanismo de proteção para tentar regular a resposta imune contra o *M. leprae* e atenuar a ativação da resposta crônica, limitando a patologia. Ou seja, as células Treg regulariam o processo inflamatório agudo, evitando uma inflamação muito robusta comum na RT1, que poderia ocasionar lesões graves e incapacitantes nos tecidos e nervos.

Os resultados deste estudo sugerem ainda que a forte resposta de células Treg FoxP3⁺ diminui a resposta imune Th1 em pacientes MB e RT2, o que permite a sobrevida e dispersão dos bacilos nestas formas de hanseníase.

Além disso, o estudo também provou a eficiência do teste de ELISA em medir células T reguladoras FoxP3⁺. Estudos com um número maior de pacientes e controles, usando inclusive outros marcadores de células Treg, como CD25 e a citocina TGF- β , devem ser realizados para análise de Treg em hanseníase. Outras populações endêmicas e não endêmicas, prioritariamente de outros países, também devem ser testadas para confirmar o potencial uso e eficácia do teste de ELISA na medição de células FoxP3⁺.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, M.; ATTIA, E. A.; SAAD, A. A.; EL-KHATEEB, E. A.; LOTFI, R. A.; ABDALLAH, M.; EL-SHENNAWY, D. Serum Th1/Th2 and macrophage lineage cytokines in leprosy; correlation with circulating CD4⁺ CD25^{high} FoxP3⁺T-regs cells. **Exp. Dermatol.** v. 23, p. 742–747, 2014.

ALVES, E. D.; FERREIRA, T. L.; NERY, I. **Hanseníase: avanços e desafios**. Brasília: Coronário Gráfica e Editora Ltda., 2014, 492 p.

ARAOZ, R.; HONORE, N.; BANU, S.; DEMANGEL, C.; CISSOKO, Y.; ARAMA, C.; UDDIN, M. K.; HADI, S. K.; MONOT, M.; CHO, S. N.; JI, B.; BRENNAN, P. J.; SOW, S.; COLE, S. T. Towards an immunodiagnostic test for leprosy. **Microb. Infec.**, v. 8, p. 2270-2276, 2006.

ATTIA, E. A.; ABDALLAH M.; SAAD, A. A.; AFIFI, A.; TABBAKH, A. E.; EL-SHENNAWY, D.; ALI, H.B. Circulating CD4⁺ CD25^{high} FoxP3⁺ t cells vary in different clinical forms of leprosy. **Int. J. Dermatol.**, v. 49, n. 10, p. 1152-8, 2010.

BACCHETTA, R.; GAMBINERI, E.; RONCAROLO, M. G. Role of regulatory T cells and FoxP3 in human diseases. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 120, n. 2, p. 227-35, 2007.

BAHRAMI, F.; DARABI, H.; RIAZI-RAD, F.; KHAZE, V.; AJDARY, S.; ALIMOHAMMADIAN, M. H. FOXP3 expression and frequency of regulatory T cells in healed individuals from *Leishmania major* infection and the asymptomatic cases. **Hum. Immunol.**, v. 75, n. 10, p. 1026-33, 2014.

BECK-BLEUMINK, M. & BERHE, D. Occurrence of reactions, their diagnosis and management in leprosy patient treated with multidrug therapy. Experience in the leprosy control programmer of the all Africa leprosy and reabiliation Training center (ALERT) in Ethiopia. **Int. J. Lepr.**, v. 60, p. 173-84, 1992.

BELKAID Y. The role of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in *Leishmania* infection. **Exp. Opin. Biol. Ther.**, v. 3, p. 875-85, 2003.

BELKAID, Y. & ROUSE, B. T. Natural regulatory T cells in infectious disease. **Nat. Immunol.**, v. 6, n. 4, p. 353-360, 2005.

BELKAID, Y.; PICCIRILLO, C. A.; MENDEZ, S.; SHEVACH, E. M.; SACKS, D. L. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, v. 42, p. 502-07, 2002.

BLOOM, B. R. & MEHRA, V. Immunological unresponsiveness in leprosy. **Imm. Rev.**, v. 80, p. 5, 1984.

BLUESTONE, J. A. & ABBAS, A. K. Natural versus adaptive regulatory T cells. **Nat. Immunol.**, v. 3, p. 253-257, 2003.

BOBOSHA, K.; WILSON, L.; VAN MEIJGAARDEN, K. E.; BEKELE, Y.; ZEWDIE, M.; VAN DER PLOEG VAN SCHIP, J. J.; ABEBE, M.; HUSSEIN, J.; KHADGE, S.; NEUPANE, K. D.; HAGGE, D. A.; JORDANOVA, E. S.; ASEFFA, A.; OTTENHOFF, T. H. M.; GELUK, A. T-cell regulation in lepromatous leprosy. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 8, e2773, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia para o Controle da hanseníase.** Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de prevenção de incapacidades,** 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso,** 8. ed. Brasília : Ministério da Saúde, 2010.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde,** vol. Único. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos Notificáveis/SINAN. **Registro ativo: número e percentual, Casos novos de hanseníase: número, coeficiente e percentual, faixa etária, classificação operacional, sexo, grau de incapacidade, contatos examinados, por estados e regiões.** Brasil, 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/julho/27/Dados-2014---final.pdf>>. Acesso em 19 de Outubro de 2016.

BRATSCHI, M.W.; STEINMANN, P.; WICKENDEN, A.; GILLIS, T. P. Current knowledge on *Mycobacterium leprae* transmission: a systematic literature review. **Lepr. Rev.,** v. 86, n. 2, p. 142-55, 2015.

BRENNAN, P. J. Skin test development in leprosy: progress with first-generation skin test antigens, and an approach to the second generation. **Lepr. Rev.,** 71: S50-S54, 2000.

BRITO, M. F. M; XIMENES, R. A. A.; BÜHRER-SEKULA, S. Associação entre reação hansênica após alta e a carga bacilar avaliada utilizando sorologia anti PGL-I e baciloscopia. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,** v. 41, n. 2, p. 67-72, 2008.

BRITTON, W. J. The management of leprosy reversal reactions. **Lepr. Rev.,** v. 69, p. 225-34, 1998.

BÜHRER-SÉKULA, S.; SMITS, H. L.; GUSSENHOVEN, G. C.; VAN LEEUWEN, J.; AMADOR, S.; FUJIWARA, T.; KLATSER, P. R.; OSKAM, L. Simple and Fast Lateral Flow Test for Classification of Leprosy Patients and Identification of Contacts with High Risk of Developing Leprosy. **J. Clin. Microbiol.,** v.41, p. 1991-95, 2003.

BÜHRER-SÉKULA, S. PGL-I leprosy serology. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41, Suppl 2: 3-5, 2008.

CHEN, W. J.; JIN, W. W.; HARDEGEN, N.; LEI, L.; MARINOS, N.; MCGRADY, G.; WAHL, S. M. Conversion of peripheral CD4+CD25+ naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. **J. Exp. Med.** v. 198, p. 1875–86, 2003.

CHEN, X.; ZHOU, B.; LI, M.; DENG, Q.; WU, X.; LE, X.; WU, C.; LARMONIER, N.; ZHANG, W.; ZHANG, H.; WANG, H.; KATSANIS, E. CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells suppress *Mycobacterium tuberculosis* immunity in patients with active disease. **Clin. Immunol.**, v. 123, p. 50-59, 2007.

CHIACCHIO, T.; CASETTI, R.; BUTERA, O.; VANINI, V.; CARRARA, S.; GIRARDI, E.; DI MITRI, D.; BATTISTINI, L.; MARTINI, F.; BORSELLINO, G.; GOLETTI, D. Characterization of regulatory T cells identified as CD4(+)CD25(high)CD39(+) in patients with active tuberculosis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 156, p. 463-70, 2009.

CHO, S. N.; YANAGIHARA, D. L.; HUNTER, S. W.; GELBER, R. H.; BRENNAN, P. J. Serological specificity of phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. **Infect. Immun.**, v. 41, n. 3, p. 1077-83, 1983.

CONVIT, J.; PINARDI, M. E.; AVILA, J. L.; ARANZAZU, N. Specificity of the 48-hour reaction to Mitsuda antigen: use of a soluble antigen from human and armadillo lepromin. **Bull. World Health Organ**, v.52, n. 2, p. 187-91, 1975.

COSTA, M. B. **Estudo *in situ* da heterogeneidade de mastócitos e células T reguladoras em pacientes com hanseníase, com e sem episódios reacionais e em outras dermatoses.** Dissertação (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Goiânia – Goiás, 156 f., 2014.

CRUVINEL, W. M.; MESQUITA, J. D.; ARAÚJO, J. A. P.; SALMAZI, K. C.; KÁLLAS, E. G.; ANDRADE, L. E. C. Natural regulatory T cells in rheumatic diseases. **Rev. Bras. Reumatol.** v. 48, p. 342-55, 2008.

DE BOER, O. J.; VAN DER LOOS, C. M.; TEELING, P.; VAN DER WAL, A. C.; TEUNISSEN, M. B. Immunohistochemical analysis of regulatory T cell markers FOXP3 and GITR on CD4+CD25+ T cells in normal skin and inflammatory dermatoses. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 55, p. 891-8, 2007.

DOCKRELL, H.M.; BLACK, G. F.; WEIR, R. E.; FINE, P. E. Whole blood assays for interferon-gamma: practicalities and potential for use as diagnostic tests in the field. **Lepr. Rev.**, 71: S60-S62, 2000

DUTHIE, M. S.; IRETON, G.C.; KANAUIA, G.V.; GOTO, W.; LIANG, H.; BHATIA, A.; BUSCETI, J.M.; MACDONALD, M.; NEUPANE, K.D.; RANJIT, C.; SAPKOTA, B.R.; BALAGON, M.; ESFANDIARI, J.; CARTER, D.; REED, S.G. Selection of Antigens and Development of Prototype Tests for Point-of-Care Leprosy Diagnosis. **Clin. Vac. Immunol.**, v.15, p.1590-97, 2008.

FERNANDES, C.; GONÇALVES, H. S.; CABRAL, P. B.; PINTO, H. C.; PINTO, M. I.; CAMARA, L. M. Increased Frequency of CD4 and CD8 Regulatory T Cells in Individuals under 15 Years with Multibacillary Leprosy. **PLoS One**. v. 8, n. 11:e79072, 2013.

FEUTH, M.; WIM BRANDSMA, J.; FABER, W. R.; BHATTARAI, B.; FEUTH, T.; ANDERSON, A. M. Erythema nodosum leprosum in Nepal: a retrospective study of clinical features and response to treatment with prednisolone or thalidomide. **Lepr Rev.**, v. 79, p. 254-69, 2008.

FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Nat. Immunol.**, v. 4, p. 330-36, 2003.

FONTENOT, J. D.; RASMUSSEN, J.P.; WILLIAMS, L. M.; DOOLEY, J. L.; FARR, A. G.; RUDENSKY, A. Y. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. **Immunity**, v.22, p. 329-41, 2005.

FOSS, N. T. Episódios reacionais na hanseníase. **Medicina - Ribeirão Preto**, v. 36, p. 453-59, 2003.

FOSS, N. T.; CALLERA, F.; ALBERTO, F. L. Anti-PGL1 levels in leprosy patients and their contacts. **Braz. J. Med. Biol. Res**, v. 26, p. 43-51, 1993.

FOSS, N. T.; OLIVEIRA, E. B.; SILVA, C. L. Correlation between TNF production, increase of plasma C-reactive protein level and suppression of T lymphocyte response to concanavalin A during erythema nodosum leprosum. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v. 61, n. 2, p. 218-26, 1993.

GELUK, A.; OTTENHOFF, T. H. HLA and leprosy in the pre and postgenomic eras. **Hum. Immunol.**, v. 67, p. 439-445, 2006.

GELUK, A.; DUTHIE, M. S.; SPENCER, J. Postgenomic *Mycobacterium leprae* antigens for cellular and serological diagnosis of *Mycobacterium leprae* exposure infection and leprosy disease. **Lepr. Rev.**, v.82, p. 402 -21, 2011.

GERSHON, R. K. & KONDO, K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. **Immunology**, v. 18, p. 723-37, 1970.

GONÇALVES, S. D.; SAMPAIO, R. F.; ANTUNES, C. M. F. Ocorrência de neurite em pacientes com hanseníase: análise de sobrevida e fatores preditivos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41, n. 5, p. 464-69, 2008.

HARBOE, M. **The immunology of leprosy**. In: Leprosy. HASTINGS, R. C. Ed. Churchill Livingstone New York, USA, p. 15-30, 1985.

HARBOE, M.; ASEFFA, A.; LEEKASSA, R. Challenges presented by nerve damage in leprosy. **Lepr Rev.**, v. 76, p. 5-13, 2005.

HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor FoxP3. **Science**, v. 299, n. 5609, p. 1057-61, 2003.

KAHAWITA, I. P. & LOCKWOOD, D. N. J. Towards understanding the pathology of erythema nodosum leprosum. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 102, n. 4, p. 329-37, 2008.

KAMATH, S.; VACCARO, S. A.; REA, T. H.; OCHOA, M. T. Recognizing and managing the immunologic reactions in leprosy. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 71, n. 4, p. 795-803, 2014.

KHANOLKAR-YOUNG, S.; RAYMENT, N.; BRICKELL, P. M.; KATZ, D. R.; VINAYAKUMAR, S.; COLSTON, M. J.; LOCKWOOD, D. N. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) synthesis is associated with the skin and peripheral nerve pathology of leprosy reversal reactions. **Clin. Exp. Immunol.**, n. 2, p. 196-202, 1995.

KIRKALDY, A. A.; MUSONDA, A. C.; KHANOLKHAR-YOUNG, S.; SUNEETHA, S.; LOCKWOOD, D. N. Expression of CC and CXC chemokines and chemokine receptors in human leprosy skin lesions. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 134, n.3, p. 447-453, 2003.

KUMAR, S.; NAQVI, R. A.; ALI, R.; RANI, R.; KHANNA, N.; RAO, D. N. CD4+CD25+ T regs with acetylated FoxP3 are associated with immune suppression in human leprosy. **Mol. Immunol.**, v. 56, p. 513-20, 2013.

LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy (Hansen's disease). In: WARRELL, D. A.; COX, T. M.; FIRTH, J. D.; BENZ, E. J. **Oxford Textbook of Medicine**. Oxford: Oxford University Press, 4th ed., 2003, p. 577.

LOCKWOOD, D. N. J.; VINAYAKUMAR, S.; STANLEY, J. N. A.; MCADAM, K. P. W. J.; COLSTON, M. J. The clinical features and outcome of reversal (type 1) reactions in Hyderabad, India. **Int. J. Lepr.**, v. 61, p. 8-15, 1993.

LUO, J.; ZHANG, M.; YAN, B.; ZHANG, K.; CHEN, M.; DENG, S. Imbalance of Th17 and Treg in peripheral blood mononuclear cells of active tuberculosis patients. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 21, n. 2, p. 155-161, 2017.

MARTINS, B. D. L.; TORRES, F. N.; OLIVEIRA, M. L. W. Impacto na qualidade de vida em pacientes com hanseníase: correlação do *Dermatology Life Quality Index* com diversas variáveis relacionadas à doença. **An. Bras. Dermatol.**, v. 83, n. 1, p. 39-43, 2008.

MASSONE, C.; NUNZI, E.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; TALHARI, C.; TALHARI, S.; SCHETTINI, A. P. M.; PARENTE, J. N. T.; BRUNASSO, A. M. G.; PUNTONI, M.; CLAPASSON, A.; NOTO, S.; CERRONI, L. T regulatory cells and plasmacytoid dendritic cells in hansen disease: a new insight into pathogenesis? **Am. J. Dermatopathol.**, v. 32, n. 3, p. 251-56, 2010.

MCDUGALL, A. C.; YUASA, Y. **O Novo Atlas de Hanseníase**. Um manual fotográfico para auxiliar os agentes de saúde e voluntaries na detecção, diagnostic e tratamento da hanseníase. Tradução: Jane e Wolfgang Hippke. Tokyo, Japão: Sasakawa Memorial Health Foundation, 2003.

MERLE, C. S.; CUNHA, S. S.; RODRIGUES, L. C. BCG Vaccination and Leprosy Protection: Review of Current Evidence and Status of BCG in Leprosy Control. **Exp. Rev. Vac.**, v. 9, n. 2, p. 209-22, 2010.

- MILLER, R. A.; GORDER, D.; HARNISCH, J. P. Antibodies to phenolic glycolipid 1 during long-term therapy: serial measurements in individual patients. **Int. J. Lepr.**, v.55, p. 633-36, 1987.
- MISRA, N.; BAYRY, J.; LACROIX-DESMAZES, S.; KAZATCHKINE, M. D.; KAVERI, S. V. Cutting edge: Human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. **J. Immunol.** v. 172, p. 4676- 4680, 2004.
- MITCHELL, S. & MEYERSON, M. D. Erythema Nodosum Leprosum. **Int. J. Dermatol.** v. 35, n. 06, p. 389-92, 1996.
- MODLIN, R. L. Th1-Th2 paradigm: Insights from Leprosy. **J. Invest. Dermatol.** v. 102, n. 6, p. 828-32, 1994.
- MODLIN, R. L.; MEHRA, V.; WONG, L.; FUJIMIYA, Y.; CHANG, W. C.; HORWITZ, D. A.; BLOOM, B. R.; REA, T. H.; PATTENGALE, P. K. Suppressor T lymphocytes from lepromatous leprosy skin lesions. **J. Immunol.** v. 137, p. 2831-34, 1986.
- MONTAGNOLI, C.; BACCI, A.; BOZZA, S.; GAZIANO, R.; MOSCI, P.; SHARPE, A. H.; ROMANI, L. B7/CD28-dependent CD4+CD25+ regulatory T cells are essential components of the memory-protective immunity to *Candida albicans*. **J. Immunol.**, v.169, n. 11, p. 6298-6308, 2002.
- MORAES, M. O.; CARDOSO, C. C.; VANDERBORGHT, P. R.; PACHECO, A. G. Genetics of host response in leprosy. **Lepr. Rev.**, v. 77, p. 189-202, 2006.
- MORAES, M. O.; SARNO, E. N.; ALMEIDA, A. S.; SARAIVA, B. C.; NERY, J. A.; MARTINS, R. C.; SAMPAIO, E. P. Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon-gamma and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). **Scand. J. Immunol.**, v. 50, p. 541-49, 1999.
- MOURA, R. S.; CALADO, K. L.; OLIVEIRA, M. L. W.; BUHRER-SEKULA, S. Sorologia da hanseníase utilizando PGL-I: revisão sistemática. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41 (Suplemento II), p. 11-18, 2008.
- NAAFS, B. & VAN HEES, C. L. Leprosy type 1 reaction (formerly reversal reaction). **Clin. Dermatol.** v.34, n. 1, p. 37-50, 2016.
- NAAFS, B. Reactions in leprosy: immunopatology. **The proceedings of the 18th World Congress of Dermatology**, p. 890-92, 1992.
- NERY, J. A. C.; SALES, A. M.; ILLARRAMENDI, X.; DUPPRE, N. C.; JARDIM, M. R.; MACHADO, A. M. Contribution to diagnosis and management of reactional states: a practical approach. **An. Bras. Dermatol.**, v. 81, p. 367-75, 2006.
- NEVES, R. G. Hanseníase. In: NETO, C. F.; CUCÉ, L. C.; DOS REIS, V. M. S. **Manual de Dermatologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2001. Cap. 10, p.132-158.
- O'GARRA, A. & VIEIRA, P. Twenty-first century Foxp3. **Nat. Immunol.**, v. 4, p. 304-6, 2003.

OPROMOLLA, D. V. A.; URA, S. **Atlas de hanseníase**. Bauru: Instituto Lauro de Souza Lima, 2002, p. 68 e 70.

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. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 86, n. 5, p. 878-83, 2012.

PARENTE, J. N. T.; TALHARI, C.; SCHETTINI, A. P. M.; MASSONE, C. T regulatory cells (TREG)(TCD4+CD25+FOXP3+) distribution in the different clinical forms of leprosy and reactional states. **An. Bras. Dermatol.**, v. 90, n. 1, p. 41–47, 2015.

RAMBUKKANA, A. Molecular basis for the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 4, p. 21-7, 2001.

RAMBUKKANA, A.; SALZER, J. L.; YURCHENCO, P. D.; TUOMANEN, E. I. Neural targeting of *Mycobacterium leprae* mediated by the G domain of the laminin-alpha2 chain. **Cell**. v. 88, p. 811-21, 1997.

REA, T. H. Suppressor cell activity and phenotypes in the blood or tissues of patients with leprosy. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 54, p. 298, 1983.

REECE, S. T.; IRETON, G.; MOHAMATH, R.; GUDERIAN, J.; GOTO, W.; GELBER, R.; GROATHOUSE, N.; SPENCER, J.; BRENNAN, P.; REED, S. G. ML O4005 and ML 2331 are antigens of *Mycobacterium leprae* with potential for diagnosis of leprosy. **Clin. Vac. Immunol.**, v.13, n. 3, p.333-40, 2006.

REES, R. J. Airborne infection with *Mycobacterium leprae* in mice. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v. 44, p. 99-103, 1976.

RIDLEY, D. S. & JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity: A five-group system. **Int. J. Lep.**, v. 34, n.3, p. 255-273, 1966.

RIDLEY, D.S. Reactions in leprosy. **Lepr. Rev.**, v. 40, n. 2, p. 77-81, 1969.

RIVITTI, E A. **Manual de dermatologia clínica de Sampaio e Rivitti**. São Paulo: Artes médicas Editora, 2014, p. 297-315.

RODRIGUES, L. C.; KERR-PONTES, L. R.; FRIETAS, M.V.; BARRETO, M. L. Long lasting BCG protection against leprosy. **Vaccine**, v. 25, p. 6842-44, 2007.

RONCAROLO, M.; GREGORI, S. The validity of FoxP3 to define human and mouse regulatory T cells: Is FoxP3 a *bona fide* marker for human regulatory T cells? **Eur. J. Immunol.**, v. 38, p. 901-937, 2008.

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 Negl. Trop. Dis.**, v. 10, n. 1, e0004338, 2016.

SAINI, C.; RAMESH, V.; NATH, I. Increase in TGF- β -secreting CD4+CD25+ FOXP3+ T regulatory cells in anergic lepromatous leprosy patients. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8: e2639, 2014.

SAINI, C.; SIDDIQUI, A.; RAMESH, V.; NATH, I. Leprosy Reactions Show Increased Th17 Cell Activity and Reduced FOXP3+ Tregs with Concomitant Decrease in TGF- β and Increase in IL-6. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 10, n. 4, e0004592, 2016.

SAKAGUCHI, S.; MIYARA, M.; COSTANTINO, C. M.; HAFLER, D. A. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 10, p. 490-500, 2010.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; ASANO, M.; ITOH, M.; TODA, M. Immunologic selftolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). **J. Immunol.**, v. 155, p. 1151-64, 1995.

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. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 31, n. 7, p. 1443–51, 2012.

SAMPAIO, L. H.; STEFANI, M. M.; OLIVEIRA, R. M.; SOUSA, A. L.; IRETON, G. C.; REED, S. G.; DUTHIE, M. S. Immunologically reactive *M. leprae* antigens with relevance to diagnosis and vaccine development. **BMC Infect. Dis.**, 11:26, 2011.

SANTOS, A. R.; SUFFYS, P. N.; VANDERBORGHT, P. R.; MORAES, M. O.; VIEIRA, L. M.; CABELLO, P. H.; BAKKER, A. M.; MATOS, H. J.; HUIZINGA, T. W.; OTTENHOFF, T. H.; SAMPAIO, E. P.; SARNO, E. N. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. **J. Infect. Dis.**, v. 186, p. 1687-91, 2002.

SARNO, E. N.; GRAU, G. E.; VIEIRA, L. M.; NERY, J. A. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosy reactional states. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 84, p. 103-08, 1991.

SAUNDERSON, P.; GEBRE, S.; BYASS, P. Reversal reactions in the skin lesions of AMFES patients: incidence and risk factors. **Lepr. Rev.**, v. 71, p. 309-17, 2000.

SCOLLARD, D. M. The biology of nerve injury in leprosy. **Lepr. Rev.**, v. 79, p. 242-53, 2008.

SCOLLARD, D. M.; ADAMS, L. B.; GILLIS, T. P.; KRAHENBUHL, J. L.; TRUMAN, R.W.; WILLIAMS, D. L. The continuing challenges of leprosy. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, p. 338-81, 2006.

SCOLLARD, D. M.; MARTELLI, C. M.; STEFANI, M. M.; MAROJA, M. F.; VILLAHERMOSA, L.; PARDILLO, F.; TAMANG, K. B. Risk factors for leprosy reactions in three endemic countries. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 92, n. 1, p. 108-14, 2015.

SCOLLARD, D. M.; SMITH, T.; BHOOPAT, L.; THEETRANONT, C.; RANGDAENG, S.; MORENS, D. M. Epidemiologic characteristics of leprosy reactions. **Int. J. Lepr.**, v. 62, p. 559-67, 1994.

SERRA, P.; AMRANI, A.; YAMANOUCHI, J.; HAN, B.; THIESSEN, S.; UTSUGI, T.; VERDAGUER, J.; SANTAMARIA, P. CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells. **Immunity**, v. 19, p. 877-89, 2003.

SETIA, M. S.; STEINMAUS, C.; HO, C. S.; RUTHERFORD, G.W. The role of BCG in prevention of leprosy: a meta-analysis. **Lancet Infect. Dis.**, v. 6, n. 3, p. 162-70, 2006.

SHEVACH, E. & DAVIDSON, T. Regulatory T cells. 2010. Disponível em: <http://www.nature.com/nri/posters/tregcells/nri1001_treg_poster.pdf> Acesso em: 05 de novembro de 2016.

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

SIELING, P. A. & MODLIN, R. L. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. **Immunobiology**, v. 191, p. 378-87, 1994.

SIELING, P. A.; ABRAMS, J. S.; YAMAMURA, M.; SALGAME, P.; BLOOM, B. R.; REA, T. H.; MODLIN, R. L. Immunosuppressive roles for interleukin-10 and interleukin-4 in human infection: in vitro modulation of T cell responses in leprosy. **J. Immunol**, v. 150, n. 2, p. 5501-10, 1993.

SPENCER, J. S.; DUTHIE, M. S.; GELUK, A.; BALAGON, M. F.; KIM, H. J.; WHEAT, W. H.; CHATTERJEE, D.; JACKSON, M.; LI, W.; KURIHARA, J. N.; MAGHANOY, A.; MALLARI, I.; SAUNDERSON, P.; BRENNAN, P. J.; DOCKRELL, H. M.. Identification of serological biomarkers of infection, disease progression and treatment efficacy for leprosy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.107, Suppl 1, p. 79-89, 2012.

SREENIVASAN, P.; MISRA, R. S.; WILFRED, D.; NATH, I. Lepromatous leprosy patients show T helper 1-like cytokine profile with differential expression of interleukin-10 during type 1 and 2 reactions. **Immunology**, v. 95, p. 529-36, 1998.

STEFANI, M. M. Challenges in the post genomic era for the development of tests for leprosy diagnosis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41(Suppl 2), p.89-94, 2008.

STEFANI, M. M.; MARTELLI, C. M.; MORAIS-NETO, O. L.; MARTELLI, P.; COSTA, M. B.; DE ANDRADE, A. L. Assessment of anti-PGL-I as a prognostic marker of leprosy reaction. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v. 66, p. 356-64, 1998.

SUZUKI, K.; UDONO, T.; FUJISAWA, M.; TANIGAWA, K.; IDANI, G.; ISHII, N. Infection during infancy and long incubation period of leprosy suggested in a case of a chimpanzee used for medical research Koichi. **J. Clin. Microbiol**, v. 48, n. 09, p. 3432-34, 2010.

THORNTON, A. M. & SHEVACH, E. M. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. **J. Exp. Med.**, v. 188, p. 287–96, 1998.

TOMIMORI-YAMASHITA, J. & FLORIANO, M. C. Hanseníase. In: LOPES, A. C. **Diagnóstico e Tratamento Vol. 2**. São Paulo: Editora Manole, 2006, p. 493-98.

TRUMAN, R. Leprosy in wild armadillos. **Lepr. Rev.**, v. 76, p.198–208, 2005.

VAN BRAKEL, W. H.; KHAWAS, I. B.; LUCAS, S. B. Reactions in leprosy: an epidemiological study of 386 patients in west Nepal. **Lepr. Rev.**, v. 65, p. 190-203, 1994.

VAN VEEN, N. H.; MCNAMEE, P.; RICHARDUS, J. H.; SMITH, W. C. Cost-effectiveness of interventions to prevent disability in leprosy: a systematic review. **PLoS One**, v. 4, n. 2, e4548, 2009.

VIEIRA, A. P.; TRINDADE, M. A.; PAGLIARI, C.; AVANCINI, J.; SAKAI-VALENTE, N. Y.; DUARTE, A. J.; BENARD, G. Development of Type 2, But Not Type 1, Leprosy Reactions is Associated with a Severe Reduction of Circulating and In situ Regulatory T-Cells. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 94, n.4, p. 721-7, 2016.

WALKER, S. L. & LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy. **Clin. Dermatol.**, v. 25, p. 165-172, 2007.

WALKER, S. L.; WITHINGTON, S. G.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy. In: FARRAR, J. *et al.* **Manson's Tropical Diseases**. London: Elsevier Health Sciences, 23rd ed., 2013, p. 506-18.

WHO, World Health Organization. Chemotherapy of Leprosy for Control Programmes. Geneva: WHO, Study Group. **Tech. Rep. Ser.**, v.847, 1994.

WHO, World Health Organization. Global leprosy situation, 2005. **Week. Epidemiol. Rec.**, v. 80, n. 34, p.289-296, 2005.

WHO, World Health Organization. Global leprosy update, 2014: need for early case detection. **Week. Epidemiol. Rec.**, v. 90, n. 36, p. 461–76, 2015.

WHO, World Health Organization. **Guide to Eliminate Leprosy as a Public Health Problem**, Geneva, 2000.

WHO, World Health Organization. Leprosy. **Resolution of Forty-fourth World Health Assembly**, Geneva, 1991.

WHO, World Health Organization. Progress towards the elimination of leprosy as a public health problem. **Week. Epidemiol. Rec.**, v. 71, n. 20, p. 149-56, 1996.

WHO. World Health Organization. Expert Committee on Leprosy. **Tech. Rep. Ser.**, v. 768, p. 1-51, 1988.

WILDIN, R. S.; SMYK-PEARSON, S.; FILIPOVICH, A. H. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. **J. Med. Genet.**, v.39, p. 537-45, 2002.

YAGI, H.; NOMURA, T.; NAKAMURA, K.; YAMAZAKI, S.; KITAWAKI, T.; HORI, S.; MAEDA, M.; ONODERA, M.; UCHIYAMA, T.; FUJII, S.; SAKAGUCHI, S. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. **Int. Immunol.**, v. 16, n. 1, p. 1643-56, 2004.

YAWALKAR, S. J. **Leprosy for medical practioners and paramedical workers.** Switzerland: Novartis Foundation for Sustainable Development , 8^a Ed, 2009.

ZEWDIE, M.; HOWE, R.; HOFF, S. T.; DOHERTY, T. M.; GETACHEW, N.; TAREKEGNE, A.; TESSEMA, B.; YAMUAH, L.; ASEFFA, A.; ABEBE, M. Ex-vivo characterization of regulatory T cells in pulmonary tuberculosis patients, latently infected persons, and healthy endemic controls. **Tuberculosis**, v. 100, p. 61-8, 2016.

ZODPEY, S.P. Protective effect of bacillus Calmette Guerin (BCG) vaccine in the prevention of leprosy: a meta-analysis. **Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.**, v.73, n. 2, p.86–93, 2007.