UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DERMATOLOGIA

CAROLINA CARDONA SIQUEIRA LOBO

Análise da função supressora das células T reguladoras em
episódios reacionais hansênicos

São Paulo

2019

CAROLINA CARDONA SIQUEIRA LOBO

Análise da função supressora das células T reguladoras em
episódios reacionais hansênicos

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Programa de Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Gil Benard

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lobo, Carolina Cardona Siqueira
Análise da função supressora das células T
reguladoras em episódios reacionais hansênicos /
Carolina Cardona Siqueira Lobo. -- São Paulo, 2019.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.
Orientador: Gil Benard.

Descritores: 1.Hanseníase 2.Mycobacterium
leprae 3.Linfócitos T reguladores 4.Supressão
5.Patogênese 6.Infecções por Mycobacterium

USP/FM/DBD-134/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu filho, Matheus, e a todos os profissionais de saúde que buscam, todos os dias, um pouco mais de conhecimento sobre a hanseníase, para melhorar a qualidade de vida dos pacientes acometidos.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a todas as forças que me fizeram acreditar que seria possível concluir este projeto, que me fizeram entender que eu era capaz e que chegaria ao fim.

Ao meu filho Matheus, pedacinho de mim, que mesmo pequeno, sem entender muito o que acontecia, me deixava quietinha, por alguns minutos que fosse, para tentar escrever algo e assim finalizar a tão sonhada dissertação.

A minha mãe Dacira, que de longe é a pessoa que mais acredita em mim, no meu potencial, no meu intelecto, e sempre fica ao meu lado, por pior que seja a minha situação.

A minha companheira Andrea, que acompanha minha jornada como pós-graduanda desde o início, e não me deixa desistir, além de estar sempre ao meu lado para discussões sobre imunologia, citometria, e tantos outros assuntos, pois sempre tem algo extremamente interessante a dizer, tamanha inteligência e capacidade que tem.

Ao meu padrasto Flávio, por entrar na família e ser uma pessoa tão incrível com todos nós, me dando sempre apoio, me tratando como sua filha, e dando novo significado a muitos sentimentos que carregou desde pequena.

Ao meu amigo Daniel, companheiro de laboratório, amigo de grandes conversas profundas e cheias de enigmas, sem você a vida no LIM-56 com certeza não teria a mesma graça.

As minhas amigas do grupo, Thalyta e Juliana, que sempre estiveram por perto, me ajudando, correndo atrás de experimentos, ouvindo meu choro, me tirando dúvidas, até o último dia que precisei. Sem elas eu não teria conseguido chegar até o fim.

Aos funcionários e colaboradores do LIM-56, Silvinha, Dri, Lúcio, Evelyn, Edna, Noêmia, Tati, Edu e Maíra, que me acolheram e sempre que precisei me ajudaram, da forma que fosse.

Ao Dr. Alexandre de Almeida, pela leitura atenta e auxílio nos detalhes finais da dissertação, profissional extremamente atencioso.

Ao meu orientador Gil Benard, pessoa excepcional, que nos tira do sério com diversas brincadeiras, mas que sem sombra de dúvidas é um dos grandes profissionais que cruzei em minha carreira, sempre disposto a discutir sobre qualquer assunto, e sempre tentando me mostrar o caminho lindo da imunologia com outros olhos.

A minha co-orientadora Ana Paula, pessoa que me apresentou a hanseníase e me fez ter um amor imenso por cada detalhe do assunto, a qual sou muito grata por me dar a oportunidade de dividir resultados e discussões.

A Dra. Maria Ângela, médica extremamente dedicada e apaixonada pela hanseníase, que nos inspira com sua verdade em trabalhar com cada paciente.

Ao Dr. João Avancini e Rosângela Evangelista do Ambulatório de Hanseníase, que sempre atenderam aos meus pedidos, me auxiliaram com informações de pacientes e sempre estiveram interessados no trabalho executado.

Aos pacientes do Ambulatório de Hanseníase, que aceitaram se voluntariar para fazer parte desse projeto, para que pudéssemos entender melhor a doença e ajudar assim quem tanto precisa.

Aos alunos dos grupos do Dr. Dewton, Dra. Maria, Dr. Jorge e Dr. Telma, assim como aos próprios orientadores, por sempre serem pessoas de bem comigo e deixar o laboratório um lugar muito mais agradável de estar.

Resumo

LOBO CCS. *Análise da função supressora das células T reguladoras em episódios reacionais hansênicos* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

INTRODUÇÃO: A hanseníase é uma doença infectocontagiosa granulomatosa crônica, causada por *Mycobacterium leprae* e representa ainda um problema de saúde pública no Brasil. Em média 30-40% dos doentes tem risco de desenvolver reações hansênicas, que são considerados estados de exacerbação da resposta imunológica do hospedeiro a antígenos *M. leprae*. Está bem descrita a importância de células T reguladoras (Tregs) em infecções bacterianas crônicas. Estudos anteriores do nosso grupo demonstraram aumento da proporção de Tregs *in situ* e em sangue periférico de pacientes multibacilares (mas não em paucibacilares), assim como diminuição da proporção de Tregs na reação tipo 2 (porém não na reação tipo 1), sugerindo a participação deste subtipo celular na imunopatogênese da hanseníase. Entretanto, a baixa frequência de Tregs tem dificultado o estudo da sua capacidade funcional. **OBJETIVO:** Estabelecer protocolo de expansão de Tregs funcionais em pacientes com hanseníase e, posteriormente, avaliar a capacidade funcional das Tregs expandidas. **METODOLOGIA:** Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram separadas e cultivadas, com anti-CD3 e anti-CD28, acrescidos de IL-2 e rapamicina, por 21 dias. Para avaliar a capacidade funcional das Tregs expandidas, realizou-se um ensaio de co-cultivo das Tregs expandidas e PBMCs autólogas (marcadas com CFSE). Utilizou-se diferentes proporções de Tregs:PBMCs (1:1, 1:2 e 1:5). A casuística foi composta por 29 indivíduos diagnosticados com hanseníase, divididos em quatro grupos, de acordo com a classificação de Ridley e Jopling. Além disso, coletou-se material de 6 indivíduos saudáveis, com a finalidade de caracterizar o pool celular do protocolo de expansão. Para isso, culturas de expansão de indivíduos saudáveis foram submetidas a dois protocolos distintos de purificação celular (*beads* magnéticas e *cell sorting*), além de

imunofenotipagem das moléculas CD39, PD-1 e LAG3. RESULTADOS: Tregs dos pacientes multibacilar sem reação, nas proporções 1:2 e 1:5, e no grupo reacional tipo 2, na proporção 1:5, mostraram maior capacidade supressora, quando comparados aos grupos paucibacilar sem reação e reacional tipo 2, respectivamente. No grupo de indivíduos saudáveis não houve diferenças na capacidade supressora das Tregs obtidas por separação por *beads* magnéticas e Tregs obtidas por *cell sorting*, e não houve expressão significativa de células PD-1⁺ e LAG-3⁺ nas culturas de expansão. CONCLUSÃO: Em todos os indivíduos testados, independente da classificação clínica da hanseníase, o protocolo proposto resultou em uma expansão exponencial de uma linhagem de Tregs com atividade supressora, porém com sugestão preliminar de maior eficiência supressora das Tregs na forma MB (com ou sem reação), corroborando a correlação entre atividade supressora de Tregs e maior carga bacilar. Além disso, o protocolo com *beads* magnéticas se mostrou tão eficaz quanto o protocolo de purificação por *cell sorting*. A imunofenotipagem das Tregs expandidas de indivíduos saudáveis indicou que não havia número significativo de células exaustas ao fim de nosso protocolo, assim como não houve crescimento concomitante de células T reguladoras do tipo 1 na cultura de expansão.

Descritores: Hanseníase; *Mycobacterium leprae*; Linfócitos T reguladores; Supressão; Patogênese; Infecções por *Mycobacterium*.

Abstract

LOBO CCS. *Analysis of the suppressive function of regulatory T cells in leprosy reaction episodes* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

INTRODUCTION: Leprosy is a chronic granulomatous infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* and a public health problem in Brazil. On average, 30-40% of patients are at risk of developing leprosy reactions, which are considered as states of exacerbation of the host's immune response to *M. leprae* antigens. The importance of regulatory T cells (Tregs) in chronic bacterial infections has been well described, but their role in leprosy remains unclear. Previous studies from our group have shown increased proportions of Tregs in situ and in peripheral blood of multibacillary patients (but not in paucibacillary patients), and decrease in the proportion of Tregs in type 2 reaction (but not type 1 reaction), reinforcing the role played by these cells in the immunopathogenesis of leprosy. However, the low numbers of Tregs preclude further studies on their functional capabilities. **OBJECTIVE:** To establish a protocol for expansion of functional Tregs in patients with leprosy and evaluate the functional capacity of the expanded Tregs. **METHOD:** Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated and cultured under anti-CD3 and anti-CD28 stimulation, plus IL-2 and rapamycin for 21 days. To evaluate the functional capacity of the expanded Tregs, a co-culture assay of the expanded Tregs and autologous PBMCs (labeled with CFSE) was performed. Different ratios of Tregs: PBMCs (1: 1, 1: 2 and 1: 5) were used. The sample consisted of 29 individuals diagnosed with leprosy, divided into four groups, according to the Ridley and Jopling classification. In addition, samples from 6 healthy individuals were collected to characterize better the cellular characteristics of the expansion protocol. For this, cultures of healthy individuals PBMC were submitted to two distinct cell purification protocols (magnetic beads and cell sorting), as well as immunophenotyping of the molecules CD39, PD-1 and LAG3. **RESULTS:** Expanded Tregs from the multibacillary patients without reaction, at 1:2 and 1:5 ratios, and with

type 2 reaction, at 1: 5 ratio, showed greater suppressive capacity than the respective paucibacillary groups. Tregs from healthy individuals obtained through magnetic beads separation and through cell sorting did not show differences in suppressor capacity, and there was no significant expression of PD-1 + and LAG-3 + on cells of the expansion cultures. CONCLUSION: In all individuals tested, irrespective of the leprosy classification, the proposed protocol resulted in an exponential expansion of Tregs with suppressive capacity; however, preliminary evidence indicated stronger suppressor activity of the Tregs from multibacillary patients (with or without reaction), suggesting a direct correlation between Tregs activity and bacillary load in leprosy. In addition, our protocol with magnetic beads proved to be as effective as the cell sorting protocol. Immunophenotyping of expanded Tregs from healthy subjects revealed that there was no significant number of exhausted cells at the end of our protocol, nor there was the concomitant outgrowth of type 1 regulatory T cells in the expansion protocol.

Descriptors: Leprosy; *Mycobacterium leprae*; Regulatory T lymphocytes; Suppression; Pathogenesis; *Mycobacterium* infections.

Lista de Figuras

Figura 1 Linha do tempo da expansão de células T reguladoras com coquetel de rapamicina, anti-CD3, anti-CD28 e IL-2. Em verde, dias onde houve adição de IL-2 à cultura celular (7,9, 12,14,16,18). Em vermelho, dias onde foi feito estímulo com anti-CD3/anti-CD28 e rapamicina (0,7,14).	37
Figura 2 Estratégia de análise para obtenção da frequência de Treg – amostra pré-expansão (<i>ex vivo</i>).	39
Figura 3 Estratégia de análise para obtenção de frequência de Treg em células pós-expansão.	35
Figura 4 Controle Isotípico (Rat IgG2a, eBioscience) para FoxP3.	40
Figura 5 Indivíduo saudável. FMO para molécula CD25 (FITC). A: PBMC não marcado para CD25 (FITC), estabelecendo local de corte de população. B: PBMC marcado para CD25 (FITC) com o corte a partir do FMO.	41
Figura 6 FMO das fluorescências PercpCy 5.5 – LAG-3 (A), APC - CD39 (B), BV421 PD-1 (C). A1: ausência da fluorescência PercpCy 5.5; A2: análise de células expandidas com marcação para PercpCy 5.5; B1: ausência da fluorescência APC; A2: análise de células expandidas com marcação para APC; C1: ausência da fluorescência BV421; A2: análise de células expandidas com marcação para BV421.	42
Figura 7 Figura representativa da estratégia utilizada para separar as células de interesse, ilustrando a amostra pré-sorting (A), e pós-sorting (B).	44
Figura 8 Estratégia de análise para Ensaio de supressão.	46
Figura 9 Indivíduo saudável. A: Análise de população pré-purificação por <i>beads</i> magnéticas em coluna. B: Análise de população pós-purificação por <i>beads</i> magnéticas em coluna.	50
Figura 10 A: Mediana dos valores iniciais de células TCD4 ⁺ para expansão e valores obtidos pós-expansão – contagem em câmara de Neubauer (n=29). B: Mediana da % de FoxP3 ⁺ em análise de células <i>ex vivo</i> e pós-expansão (n=29). C: Número absoluto de células TCD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low/-} FoxP3 ⁺ pós-expansão, mediana de 2,27x10 ⁶ células (min: 0,6- máx: 5,54x10 ⁶) (n=29). Os valores se referem aos resultados obtidos a partir de amostras de pacientes.	49
Figura 11 Mediana da frequência de células expandidas TCD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low/-} FoxP3 ⁺ por grupo. Grupo PB: 16,87 (min: 8,9 – max: 25,9); grupo MB: 21,55 (15,10 –21,3); grupo R1: 24,13 (9,93 – 44,69); grupo R2: 26,5 (7 –55,9).	55
Figura 12 Número absoluto de células TCD4 ⁺ pré e pós-expansão dos indivíduos saudáveis comparadas pelo teste de Mann Withney (n=6).	56

Figura 13 Dotplot do cruzamento de células CD4 ⁺ (eixo x) e CD25 ⁺ (eixo y), onde observamos um total de 97,6% de células CD4 ⁺ . Análise representativa.....	56
Figura 14 Porcentagem de expressão fenotípica das moléculas PD-1, CD39 e LAG-3 nas células TCD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low/-} FoxP3 ⁺ e TCD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low/-} FoxP3 ⁻ de indivíduos saudáveis (n=6).....	59
Figura 15 A: Análise de PBMCs ex vivo de indivíduos controle – células CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁻ CD39 ⁺ . B: Análise de Tregs expandidas de indivíduos controle – células CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁻ CD39 ⁺	60
Figura 16 Porcentagem da proliferação das PBMCs com e sem interação com as Tregs expandidas quando estimuladas com anti-CD3 e anti-CD28. A: grupo PB (n=7); B: grupo MB (n=5); C: grupo R1 (n=8); D: grupo R2 (n=9).....	62
Figura 17 Análise representativa do ensaio de supressão de paciente do grupo PB. A1: PBMCs na ausência de Tregs estimuladas com anti-CD3/anti-CD28; A2: PBMCs na ausência de Tregs sem estímulo; B1/B2: PBMCs/Treg expandida na proporção 1:1 estimuladas com anti-CD3/anti-CD28; C1/C2: PBMCs/Treg expandida na proporção 1:2 estimuladas com anti-CD3/anti-CD28; D1/D2: PBMCs/Treg expandida na proporção 1:5 estimuladas com anti-CD3/anti-CD28.	63
Figura 18 <i>Dot plot</i> representativo do corte de delimitação da população de Tregs expandidas e a população CFSE ^{low/-} . A: PBMCs na ausência de Tregs expandidas estimuladas com anti-CD3/anti-CD28 com corte de delimitação das duas populações, evitando o <i>overlap</i> ; B: PBMCs na presença de Tregs expandidas na proporção 1:1 estimuladas com anti-CD3/anti-CD28 com o corte de delimitação das populações estipulado a partir da posição das Tregs expandidas.....	64
Figura 19 Porcentagem de supressão dos quatro grupo de pacientes nas proporções Treg:PBMC 1:1, 1:2 e 1:5, estimuladas com anti-CD3/anti-CD28. A equação aplicada para obtenção desse valor foi: 100 - (porcentagem de proliferação de cada proporção Treg:PBMC (1:1, 1:2, 1:5)/ proliferação das PBMCs estimuladas).	65
Figura 20 Gráfico da mediana de intensidade de fluorescência (MFI) da molécula FoxP3 dos quatro grupos de pacientes: PB (n=7), MB (n=5), R1 (n=8) e R2 (n=9).....	67
Figura 21 Correlação entre a porcentagem de células TCD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low/-} FoxP3 ⁺ expandidas e a porcentagem de supressão dos pacientes na proporção Treg:PBMC 1:1.....	68
Figura 22 Porcentagem de supressão do co-cultivo de indivíduos saudáveis em diferentes proporções Treg:PBMC. C: células separadas somente por coluna no início da expansão. S: células submetidas ao processo de purificação por <i>cell sorting</i> no dia 21 da expansão. (n=4).....	69
Figura 23 Secreção de IFN-γ em sobrenadante de co-cultivo de supressão de pacientes (n=9).....	71

Figura 24 Secreção de IFN- γ na terceira semana de expansão de Tregs (dia 21), expressado em picogramas/mL (n=6). 72

Lista de Tabelas

Tabela 1 Características gerais, clínicas e imunológicas das formas clínicas da hanseníase, a partir da classificação de Ridley & Jopling.	20
Tabela 2 Relação dos anticorpos monoclonais utilizados para caracterização das Tregs.	37
Tabela 3 Relação dos anticorpos monoclonais utilizados para caracterização das Tregs dos indivíduos saudáveis.	38
Tabela 4 Relação dos anticorpos monoclonais utilizados para separação das Tregs em <i>cell sorting</i>	43
Tabela 5 Características clínico-demográficas dos pacientes.	48
Tabela 6 Características dos indivíduos saudáveis participantes do estudo.	49
Tabela 7 Número absoluto de células pré e pós o processo de purificação por <i>cell sorting</i> , contadas em câmara de Neubauer e porcentagem de pureza de células CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ pós <i>cell sorting</i> . A porcentagem de pureza pós- <i>sorting</i> foi obtida através da análise dos dados no FlowJo.	51
Tabela 8 Três diferentes purificações realizadas por separação em coluna magnética em um indivíduo saudável. A porcentagem foi obtida através de análise de células previamente marcadas de acordo com o item 4.5. A porcentagem de células FoxP3 ⁺ do dia 0 corresponde a marcação das PBMCs <i>ex vivo</i> , não submetidas a separação por <i>beads</i> magnéticas. As porcentagens de células CD25 ⁺ nos dias 0 e 14 indicam o valor pós-separação por coluna magnética, de acordo com o protocolo proposto.	54
Tabela 9 Porcentagem de supressão nas proporções Treg:PBMC 1:1, 1:2 e 1:5, estimuladas com anti-CD3/anti-CD28. A equação aplicada para obtenção desse valor foi: 100 -(porcentagem de proliferação de cada proporção Treg:PBMC (1:1, 1:2, 1:5)/ proliferação das PBMCs estimuladas). NR = Não realizado.....	66

Lista de Siglas e Abreviaturas

ANOVA – Análise de variância
AMPc – Adenosina monofosfato cíclico
Breg – Linfócitos B reguladores
BSA – Albumina de soro bovino
CFSE – Carboxifluoresceína diacetato succinimidil Ester
CTLA-4 – *Cytotoxic T lymphocyte antigen-4*
DCs – *Dendritic cells* (células dendríticas)
DD – Hanseníase Dimorfa
DMSO – Dimetilsulfóxido
DT – Dimorfo Tuberculóide
DV – Dimorfo Virchowiano
ENH – Eritema Nodoso Hansênico
ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio de Imunoabsorção enzimática)
EST – Estimulado
FMO – *Fluorescence minus one*
FoxP3 – *Forkhead transcription factor 3*
GITR – *Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor*
HI – Hanseníase Intermediária
IFN- γ – *Interferon-gama*
IL – Interleucina
Lep-LAM – *Leprae lipoarabinomannan*
LIM-56 – Laboratório de Investigação Médica 56
M. leprae – *Mycobacterium leprae*
MB – Hanseníase Multibacilar
MFI – Mediana da intensidade de fluorescência
mTOR – *Mammalian target of rapamycin*
NE – Não estimulado
OMS – Organização Mundial da Saúde
PB – Hanseníase Paucibacilar
PBMC – Células mononucleares do sangue periférico
PBS – Tampão fosfato-salino

PQT – Poliquimioterapia

R1 – Reação tipo 1

R2 – Reação tipo 2

RR – Reação Reversa

SAB – Soro AB

SFB – Soro fetal bovino

SMDM – Susceptibilidade Mendeliana à Doença Micobacteriana

TA – Temperatura ambiente

TB – Tuberculose

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Texp – Célula T reguladora expandida

TGF- β – Fator de transformação do crescimento β

Th – Linfócito *Th*elper

TLR – *Toll like receptor*

TNF- α – *Tumor necrosis factor alpha*

Treg – Linfócito T regulador

TT – Hanseníase Tuberculóide (forma polar)

VV – Hanseníase Virchowiana (forma polar)

Sumário

1. Introdução	18
1.1 Hanseníase	18
1.1.2 Aspectos epidemiológicos	18
1.1.2 <i>Mycobacterium leprae</i>	18
1.1.3 Aspectos clínicos	19
1.1.4 Imunopatogênese da hanseníase.....	22
1.1.5 Fatores genéticos associados à hanseníase	26
1.1.6 Transmissão, tratamento e diagnóstico	27
1.2 Células T reguladoras	28
1.2.1 Características Fenotípicas	28
1.2.2 Capacidade supressora	29
1.2.3 Tregs em infecções.....	29
1.3 Justificativa	30
2. Objetivos	32
2.1 Objetivo Geral	32
2.2 Objetivos específicos	32
3. Casuística.....	33
4. Materiais e Métodos	35
4.1 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).....	35
4.2 Congelamento e descongelamento celular	35
4.3 Separação de células TCD4 ⁺ por beads magnéticas.....	35
4.4 Expansão <i>in vitro</i> de células T reguladoras	36
4.5 Caracterização fenotípica de células T reguladoras (Tregs)	37
4.5.1 Marcação extracelular.....	38
4.5.2 Marcação intracelular.....	38
4.6 Fim da expansão de células Treg	42
4.6.1 Separação de T reguladoras expandidas por <i>cell sorting</i>	43
4.7 Mensuração da proliferação celular com CFSE	44
4.8 Co-cultivo para avaliação de função supressora de Tregs	45
4.9 ELISA IFN- γ /IL-10	46
4.8 Análise estatística	47

5. Resultados e Discussão	48
5.1 Dados Clínicos e Demográficos	48
5.2 Purificação celular	49
5.2.1 Purificação de células TCD4 ⁺ por <i>beads</i> magnéticas	49
5.2.2 Purificação de células expandidas por <i>cell sorting</i>	50
5.3 Expansão de células TCD4 ⁺	51
5.4 Análise de subpopulações de Tregs pós-expansão (indivíduos saudáveis)	57
5.5 Análise da capacidade supressora das células expandidas (ensaio de supressão)	60
5.5.1 Pacientes	61
5.5.2 Indivíduos saudáveis: coluna <i>versus cell sorting</i>	68
5.7 Avaliação da função supressora de Tregs de pacientes pela inibição da secreção de IFN- γ	70
5.8 Avaliação da secreção de IFN- γ e IL-10 na cultura de expansão de Tregs de indivíduos saudáveis	71
6. Comentários finais	73
6.1 Perspectivas	76
7. Referências Bibliográficas	77

1. Introdução

1.1 Hanseníase

1.1.2 Aspectos epidemiológicos

A hanseníase é uma doença infecto-contagiosa granulomatosa crônica, considerada um problema de saúde pública mundial e tem como agente etiológico o bacilo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), que infecta pele, mucosas e nervos periféricos (1,2). De acordo com os relatórios publicados anualmente pela Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre a incidência mundial da hanseníase, em 2016, 143 países reportaram um total de 214.783 casos novos de hanseníase. No Brasil, no mesmo ano, foram reportados 25.218 casos novos, número que classifica o país como de alta incidência para doença, o colocando em segundo lugar com maior número de casos novos registrados no mundo. O primeiro e terceiro lugar dessa lista foi atribuído, respectivamente, à Índia com 135.485 casos novos, e a Indonésia com 15.826 casos novos (3).

No Brasil, entre 2012-2016, foram detectados 151.764 novos casos, com destaque para as regiões Centro-Oeste (37,27/100mil habitantes) e Norte (34,25/100mil habitantes). As regiões com menor incidência registradas foram Sul (3,75/100mil habitantes) e Sudeste (5,31/100mil habitantes) (3).

1.1.2 *Mycobacterium leprae*

O agente *M. leprae* é um bacilo álcool-ácido-resistente e a sua características estão altamente ligadas ao espectro clínico, imunológico e histopatológico da doença (1). É uma micobactéria de crescimento lento *in vivo* (12-14 dias), obrigatoriamente intracelular e que apresenta tropismo por macrófagos, células endoteliais e células de *Schwann* (4,5).

A compreensão sobre a sequência genômica do *M. leprae* foi um avanço, para possibilitar o entendimento da biologia deste organismo (6). Cole e colaboradores (6) verificaram que menos da metade do genoma do *M. leprae* é funcional. Além disso, verificaram a deleção e o decaimento de genes que codificam atividades metabólicas importantes, dados esses relevantes no processo de compreensão do mecanismo de atividade deste agente, auxiliando em novos caminhos de diagnóstico. Diversos estudos foram interrompidos

anteriormente pela dificuldade em cultivar o *M. leprae in vitro*. Atualmente, sabe-se que esse organismo pode se replicar através de um modelo de inoculação da micobactéria em pata de camundongo, e também inoculação em tatus, que são considerados seus hospedeiros definitivos (7, 8).

A membrana celular do *M. leprae* possui importantes antígenos reconhecidos pelo sistema imune do hospedeiro. É possível citar PGL-1 (phenolic glycolipid-1), antígeno bacteriano que estimula uma resposta humoral potente mediada por anticorpos do isotipo IgM (9). Essa resposta é proporcional à carga bacilar dos pacientes e diminui com a introdução da terapia (10, 11). Outro componente importante na membrana celular do *M. leprae* é o Lep-LAM (*leprae lipoarabinomannan*), que possui mecanismos para inibição dos fagolisossomos de macrófagos do organismo do hospedeiro (12). Além disso, proteínas da parede celular do *M. leprae* purificadas são potentes antígenos para células T efectoras (13).

1.1.3 Aspectos clínicos

1.1.3.1 Classificações da hanseníase

Algumas classificações já foram propostas levando em consideração aspectos clínicos, bacteriológicos, imunológicos e histológicos, porém é possível utilizar essas classificações diferentes em conjunto. Dentre elas temos a Classificação de Madri, a de Ridley & Jopling e a classificação mais simplificada e operacional, proposta pela OMS (14, 15).

Na Classificação de Madri levam-se em consideração as características clínicas e o exame baciloscópico, onde os pacientes são divididos em dois grupos imunologicamente instáveis - os indeterminados e dimorfos - e as formas tuberculóide e virchowiana como pólos estáveis da doença (16).

Quando falamos sobre a classificação proposta pela OMS, categorizamos os doentes conforme critérios clínicos, estabelecendo como paucibacilares (PB) pacientes com até cinco lesões cutâneas e/ou apenas um tronco nervoso acometido, e multibacilares (MB) pacientes com mais de cinco lesões cutâneas e/ou mais de um tronco nervoso acometido (17).

A partir da classificação de Ridley & Jopling, analisamos a doença como um espectro e levamos em consideração seus aspectos clínicos e

bacteriológicos, enfatizando os aspectos histológicos e imunológicos, compreendendo assim a definição de suas formas polares e interpolares (tabela 1) (18).

Tabela 1 Características gerais, clínicas e imunológicas das formas clínicas da hanseníase, a partir da classificação de Ridley & Jopling.

Formas Clínicas	Características Clínicas	Características gerais	Características imunológicas
Hanseníase Indeterminada (HI)	Máculas hipopigmentadas/ leve perda de sensibilidade	Estágio inicial e transitório	-
Hanseníase Tuberculóide (TT)	Lesões com bordas bem delimitadas/ perda de sensibilidade	Forma polar - Resistência ao bacilo	Polarização resposta Th1
Hanseníase Virchowiana (VV)	Lesões espalhadas com bordas mal delimitadas	Forma polar – Susceptibilidade ao bacilo	Polarização resposta Th2
Hanseníase Dimorfa (DT/DD/DV)	Manifestações diversas	Podem migrar para qualquer pólo ou permanecer neste	Imunologicamente dinâmico

Segundo essa classificação (tabela 1), o indivíduo infectado pode apresentar hanseníase indeterminada (HI), um estágio inicial e transitório da infecção, e evoluir para cura ou doença, dependendo da resistência imune do hospedeiro (18, 19, 20). Na HI são encontradas máculas hipopigmentadas e em pequena quantidade, e uma leve perda de sensibilidade pode estar presente. Não se encontram nódulos ou placas, a histologia das lesões pode não auxiliar no diagnóstico por ser difícil de distinguir de uma dermatite crônica e os bacilos podem estar ausentes ou em baixo número (18).

Baseado nos quatro critérios propostos por Ridley & Jopling – aspectos clínicos, bacteriológicos, imunológicos e histológicos –, os pacientes são

divididos em cinco grupos, onde o pólo tuberculóide (TT) é o pólo de resistência ao bacilo, seguido dos pólos intermediários – dimorfo tuberculóide (DT), dimorfo dimorfo (DD), dimorfo virchowiano (DV) – e pólo virchowiano (VV), caracterizado como anérgico na doença (5,18).

1.1.3.2 Reações Hansênicas

As reações hansênicas são episódios que resultam de alterações no balanço imunológico entre o hospedeiro e o agente etiológico *M. leprae*. São responsáveis por danos teciduais e neurológicos, sendo a principal causa de incapacidades e morbidade na doença. Elas podem ocorrer antes, durante ou após o tratamento da hanseníase, por exacerbação da resposta imune do hospedeiro frente à bactéria, sendo classificadas em reação tipo 1 e reação tipo 2 (18, 21, 22).

Na reação tipo 1, ou reação reversa (RR), há uma exacerbação da resposta imune contra os antígenos micobacterianos, levando lesões pré-existentes a tornarem eritematosas e edemaciadas, podendo ou não ser acompanhadas do aparecimento de novas lesões. Também pode ocorrer uma inflamação aguda em nervos periféricos que, se não tratada rapidamente, leva a perda de função permanente do nervo acometido. Ela ocorre em pacientes dimorfos (paucibacilares ou multibacilares), principalmente quando estão realizando o tratamento, ou em menor frequência, quando finalizam a poliquimioterapia (PQT) (21, 22, 23, 24, 25, 26). Chaitanya e colaboradores (27) associaram níveis de diversas citocinas pró-inflamatórias aumentados e mRNAs de genes que codificam enzimas transportadoras de cortisol diminuídos ao desenvolvimento da reação tipo 1, características essas que se assemelham às reações de hipersensibilidade tardia.

Na reação tipo 2, a forma de manifestação mais comum é o Eritema Nodoso Hansênico (ENH). Essa reação ocorre em pacientes virchowianos e dimorfos virchowianos (multibacilares) com uma alta carga bacilar nas lesões, se relacionando com a resposta humoral do indivíduo. Como é uma resposta mediada por imunocomplexos, os mesmos podem ser depositados em qualquer órgão ou tecido, trazendo consequências mais graves ao paciente, além da reação do organismo frente a substâncias liberadas dos bacilos

destruídos. Há formação de nódulos dolorosos distribuídos simetricamente, em qualquer região do corpo, acompanhados de manifestações sistêmicas como febre, mal-estar, além de neurites. A reação tipo 2 ocorre geralmente durante o primeiro ou segundo ano de tratamento do paciente (5, 21, 22).

A reação tipo 1 pode perdurar durante 3 a 6 meses, e em alguns casos, até 1 ano. Já a reação tipo 2 pode persistir por anos (26).

1.1.4 Imunopatogênese da hanseníase

A primeira interação entre o agente *M. leprae* e o hospedeiro gera uma resposta imune inata, mais especificamente, os receptores de reconhecimento de padrão, que tem como exemplo os *toll like receptors*. No caso de reconhecimento de micobactérias, os TLR-2 e TLR-4 parecem ser os receptores mais importantes (28). Dentre estes, principalmente o TLR-2 é ativado com as lipoproteínas do *M. leprae*, e a capacidade da indução da resposta imune está diretamente ligada a secreção de IL-12 e IL-23, secretadas por macrófagos e células dendríticas (29, 30). Em sequência a isso, as células dendríticas apresentam os antígenos e causam a ativação de células T *naïves* (31). Após isso, as células podem expandir e se diferenciar em células T *helper* 1 ou T *helper* 2, classicamente. Essa capacidade, celular (*Th1*) ou humoral (*Th2*), está relacionada diretamente com os tipos de citocinas secretadas por essa população celular e, além disso, essa polarização da resposta imune nos encaminha à classificação dos pacientes entre tuberculóides, dimorfos e virchowianos. Porém, é importante citar que o clássico balanço *Th1/Th2* é uma visão simplificada da imunopatogênese dessa doença. Azevedo e colaboradores (32) observaram que a expressão de *mRNA* relacionados aos perfis *Th1*, *Th2*, *Th17* e *Tregs* eram altamente modulados em pacientes com hanseníase, quando comparados a indivíduos saudáveis, mostrando a importância de outros subtipos celulares no espectro.

No polo TT o hospedeiro consegue controlar a multiplicação bacilar, em virtude da sua resposta imune eficaz (18). A diferenciação dos linfócitos se direciona para subpopulação T *helper* 1 (*Th1*), produtores de altos níveis de interferon-gama (IFN- γ), interleucina-2 (IL-2) e *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) (33, 34, 35, 36, 37, 38). IFN- γ é responsável pela indução da

imunidade celular e TNF- α , importante para ativação celular, principalmente das células inatas e formação do granuloma (39).

No polo VV, a resposta imune é mediada por linfócitos do perfil T *helper* 2 (Th2), não eficaz para contenção da multiplicação bacilar. Por se tratar de um perfil de resposta imunológica humoral, há uma grande produção de anticorpos, principalmente contra componentes da parede celular do *M. leprae*. (33, 34, 35). Esse perfil de resposta é acompanhado da produção de altos níveis de citocinas supressoras da atividade dos macrófagos, como IL-4, IL-5 e IL-10, além de baixos níveis de IFN- γ (36). Além disso, sabe-se que a IL-4 diminui expressão dos TLR-2 em monócitos (28) e que a IL-10 suprime a produção de IL-12 (40).

O grupo dimorfo apresenta diversas manifestações clínicas, imunologicamente dinâmicas, devido aos variados graus de resposta ao *M. leprae*. Esse grupo pode progredir para qualquer um dos pólos, ou então, permanecer como DD, relacionando-se diretamente à intensidade de resposta ao bacilo. Quando observamos a evolução da forma DT para DV, nota-se uma tendência progressiva à diminuição da resposta celular, associada a um aumento da carga bacilar (4, 41).

1.1.4.1 Células Th17

Uma terceira subpopulação de células efectoras, que não Th1 ou Th2, vem sendo descritas, as células Th17, produtoras da IL-17 (42, 43). A compreensão deste subtipo celular é um caminho alternativo para esclarecer mecanismos imunes de pacientes com hanseníase, fugindo do clássico espectro proposto. Saini, Ramesh e Nath (2013) (44) encontraram níveis significativamente elevados de IL-17 (diversas isoformas) em sobrenadante de culturas de PBMCs de pacientes tuberculóides estimuladas com fitohemaglutinina, assim como em indivíduos contato saudáveis (indivíduos com contato intra-domiciliar com pacientes, mas que não desenvolveram a doença). Uma hipótese é de que a linhagem Th17 seja uma alternativa para o *clearance* bacteriano, quando o paciente se mostra incapaz de montar uma resposta Th1, ou então quando a polarização da resposta T *helper* ainda não

se direcionou. Curtis e Way (45) já demonstraram o importante papel da IL-17 na defesa contra bactérias, micobactérias e fungos, reforçando tal hipótese.

Saini e colaboradores (46) também demonstraram a importância da resposta *Th17* em pacientes com surtos reacionais, apontando um balanço entre este subtipo citado e células T reguladoras; observaram aumento significativo de RORC (fator de transcrição de células *Th17*) nos grupos reacionais (reação tipo 1 e tipo 2) quando comparados aos grupos não reacionais (tuberculóides e virchowianos).

Outros trabalhos demonstram a importância desse subtipo celular na hanseníase, como Santos e colaboradores (47) que verificaram um aumento de células CD4⁺IL-17A⁺ em biópsias de lesões de indivíduos do pólo tuberculóide, quando comparados a indivíduos do pólo virchowiano, assim como foi observado um aumento na concentração de IL-17A e IL-1 β no soro de indivíduos paucibacilares quando comparados aos multibacilares.

1.1.4.2 Macrófagos e Linfócitos B

Além das subpopulações de linfócitos T, que fazem parte da imunopatogênese da doença, outras células têm mostrado importância na hanseníase. Madigan e colaboradores (48) relataram a atividade dos macrófagos na resposta imune contra antígenos PGL-1 de *M. leprae* como parte essencial na destruição de nervos dos indivíduos infectados. De acordo com o estudo, o PGL-1 induz macrófagos residentes a produzirem altas quantidades de óxido nítrico, e seu excesso causa danos nas mitocôndrias dos axônios, levando a desmielinização dos nervos.

Alguns estudos têm demonstrado que, de acordo com a evolução ou cronicidade dessa enfermidade espectral, certas subpopulações celulares polarizam sua resposta entre pró e antiinflamatória. Os macrófagos fazem parte dessa atividade, caracterizando células inatas que sofrem alterações fenotípicas e desenvolvem determinada resposta imune. No polo tuberculóide, por exemplo, macrófagos M1 produzem TNF- α , IFN- γ e realizam síntese de óxido nítrico (49). Já no polo virchowiano, há uma predominância de macrófagos M2, que produzem IL-10, TGF- β , FGF- β , arginase e IDO (50, 51).

Ainda ressaltando a importância dos macrófagos na hanseníase, Souza e colaboradores (50) descreveram um aumento na expressão de macrófagos M4 (caracterizado pelas moléculas CD68, IL-6, TNF- α , MRP8, MMP7 e MMP12) (52, 53, 54) – em pacientes com a forma virchowiana da doença, o que pode sugerir que essa subpopulação é menos eficaz na destruição dos bacilos, contribuindo para evolução da forma multibacilar da infecção.

Os linfócitos B também têm seu espaço na imunopatogênese da hanseníase (55, 56, 57), apesar de haverem poucos estudos. A literatura nos mostra amplos estudos apontando a importância dessas células em infecções por micobactérias, como por exemplo, *M. tuberculosis*, sugerindo sua atividade na regulação da resposta imune de granulomas, assim como produção de citocinas, resposta de linfócitos T e apresentação de antígenos (58). É importante citar que a literatura cada vez mais aponta para uma resposta celular B e T que caminha lado a lado na hanseníase (58, 59, 60). Os poucos estudos que associam a hanseníase e células B são recentes. Iyer e colaboradores (55) através de imunohistoquímica em biópsias de lesões de diversos casos de hanseníase, encontraram altos índices de marcadores celulares como CD20, CD79a e CD138 em indivíduos com a forma dimorfo virchowiana e virchowiana, enquanto indivíduos dimorfos tuberculóides apresentavam esses marcadores somente de maneira esporádica. Fachin e colaboradores (56) realizaram imunofenotipagem em diversos indivíduos diagnosticados com hanseníase, e observaram que linfócitos CD20⁺ eram mais abundantes em indivíduos tuberculóides, enquanto plasmócitos CD138⁺ não mostraram diferenças no espectro da doença.

Complementando esses achados, Tarique e colaboradores (61) demonstraram a importância da secreção de IL-10 por linfócitos B reguladores (Bregs) nos indivíduos com hanseníase. Esta citocina, em adição ao TGF- β , encaminharia à diferenciação de células T efetoras em Tregs. Além disso, essas Bregs possuem papel importante na função das Tregs; elas são capazes de inibir a proliferação de linfócitos T, potencializando a função dessas células (62).

Com a participação tão ampla de diversas subpopulações celulares na imunopatogênese da hanseníase, começa-se a compreender quão relevante é

continuar a elucidar, da melhor maneira, as possibilidades de resposta imunológica do hospedeiro.

1.1.5 Fatores genéticos associados à hanseníase

Sabe-se que a predisposição genética do hospedeiro tem um papel crítico na patogênese da doença. Estudos sobre a Susceptibilidade Mendeliana à Doença Micobacteriana (SMDM) são as evidências mais diretas sobre a influência da genética humana sobre as infecções. SMDM é uma condição rara, caracterizada pela predisposição seletiva à doença clínica causada por micobactérias fracamente virulentas. Estudos de SMDM resultaram na identificação de diversas mutações raras em genes que codificam proteínas da via IL-12 e IFN- γ como causa de susceptibilidade a doenças micobacterianas (63, 64). Além disso, evidências mostram a existência de susceptibilidade genética em diferentes conjuntos de genes, modificando a predisposição do hospedeiro à hanseníase (65, 66).

Estudos do genoma humano, na população Indiana, detectaram associações na região de ligação do cromossomo 10p13 com pacientes que apresentam a forma paucibacilar da hanseníase (67, 68). Posteriormente, o gene MRC1, localizado em um intervalo da região de ligação do cromossomo 10p13, foi associado com as formas multibacilares da hanseníase, na população Brasileira e Vietnamita (69). Outros estudos foram realizados buscando compreensão da região de ligação do cromossomo 10p13 na população Vietnamita (70, 71), mas não se sabe porque não foi possível associá-la a forma paucibacilar da hanseníase. Além disso, regiões como 6q25-q27 e 6p21 também já foram associadas à susceptibilidade a hanseníase em famílias Vietnamitas (68). Possivelmente não há uma concordância entre os achados dos estudos por se tratar de diferentes populações, o que pode ser uma grande desvantagem na coleta de dados.

Apesar da heterogeneidade, esses achados reforçam a idéia de que a susceptibilidade genética é um fator determinante para o desenvolvimento das formas clínicas da hanseníase em cada indivíduo.

1.1.6 Transmissão, tratamento e diagnóstico

Um fator importante relacionado à transmissão do *M. leprae* é o contato intradomiciliar, caracterizado por contato próximo e prolongado com indivíduos com a forma multibacilar e não tratados (72, 73). Outros estudos mostram que, com menor frequência, erosões na pele também podem ser consideradas via de transmissão, bem como as vias sanguínea, vertical, de leite materno e picadas de inseto também são cogitadas (74, 75, 76, 77, 78). Uma vez estabelecida, a infecção por *M. leprae* pode entrar em um período de latência de 3 até 10 anos (5).

Como diagnóstico, a observação clínica ainda é o passo mais importante, com o auxílio de biópsias de lesão e baciloscopia (79). Infelizmente poucos profissionais têm a experiência clínica necessária para tal diagnóstico, o que dificulta todo processo de detecção de indivíduos infectados, tratamento e, conseqüentemente, controle de transmissão.

O tratamento dos doentes é fundamental para cura, bloqueando a fonte de infecção e interrompendo a cadeia de disseminação da doença. Em 1982, a OMS passou a recomendar a PQT, constituída por rifampicina, dapsona e clofazimina, em decorrência de casos resistentes a dapsona. Somente em 1993 a mesma foi instituída de forma extensa e oficial no Brasil. Uma portaria, de nº 3.125, de 07 de outubro de 2010, do Ministério da Saúde, foi criada e estabeleceu a administração da PQT de acordo com a classificação operacional do doente em PB ou MB (20, 80).

Ao se tratar de doentes com episódio reacional agudo, o diagnóstico precoce e o tratamento com a PQT são a melhor forma de controlar esses quadros que podem apresentar alta morbidade, além de prevenir incapacidades. O uso de corticoesteróides é indicado para pessoas com hanseníase que apresentam episódios reacionais graves, sempre com atenção sobre as doses adequadas (1-1,5mg/Kg/dia). Infelizmente, apesar dos ganhos em relação à melhora dos pacientes quando a prednisona é administrada, fármaco esse que pode causar efeitos adversos severos (26).

A talidomida é indicada para tratamento de ENH, mas tem riscos de efeitos colaterais sérios (teratogenicidade), e por isso é necessária atenção ao prescrevê-la. Os mecanismos de ação dessa droga não são totalmente

esclarecidos, mas as hipóteses incluem uma diminuição dos níveis de TNF- α , inibição de IL-12 e co-estimulação de linfócitos TCD8 (81). É recomendada 100 a 400 mg/dia, em doses fracionadas, sempre levando em consideração a gravidade do quadro reacional (26).

1.2 Células T reguladoras

As células T reguladoras (Tregs) têm um papel importante na tolerância imunológica, assim como no auxílio para preservação da homeostase no organismo. Representam cerca de 5-10% das células TCD4⁺ circulantes em indivíduos saudáveis (82, 83, 84, 85).

1.2.1 Características Fenotípicas

O fator de transcrição FoxP3⁺ confere às Tregs seu desenvolvimento e função, induzindo a alta expressão de moléculas como CD25, CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4) e GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor), componentes de superfície essenciais para a sobrevivência e função dessas células (84, 86).

A molécula de superfície CD25 (cadeia α do receptor de IL-2) é expressa constitutivamente pelas Tregs, e é fundamental para seu funcionamento, uma vez que já se mostrou que a IL-2 é essencial como fator de crescimento e sobrevivência dessas células. Muitos estudos confirmaram que o CD25 não é um marcador extracelular específico para caracterização de Tregs, pois outras subpopulações celulares também possuem esse receptor de alta afinidade para IL-2 (87, 88).

A relação entre as moléculas CD127 (cadeia α do receptor de IL-7) e o fator de transcrição FoxP3 vem sendo investigada. Alguns estudos demonstram que há uma relação inversa, em que células de memória, em sua maioria, apresentam uma alta expressão de CD127 e, em contrapartida, células FoxP3⁺ apresentam baixos níveis dessa molécula em sua superfície. A mesma relação parece também ocorrer com CD25, ou seja, a baixa expressão de CD127 é acompanhada da alta expressão de CD25 (89).

1.2.2 Capacidade supressora

As Tregs são capazes de suprimir uma resposta imunológica através do contato célula-célula, ou por meio de citocinas supressoras. Ao pensar nas citocinas, sabemos que essas agem em diferentes populações celulares. Um por exemplo é seu papel na inibição da proliferação e função de células T efetoras e na ativação de macrófagos, a partir da ação de TGF- β , e na inibição da produção de IL-12 secretada por células dendríticas (DCs) e macrófagos ativados, pela ação da IL-10 (90). Estudos evidenciaram que as Tregs produzem predominantemente a citocina imunossupressora IL-35, e células deficientes na produção dessa citocina mostraram-se com capacidade supressora reduzida (91).

A supressão da resposta imune através do contato célula-célula pode se dar por meio do bloqueio de sinalização entre DCs e linfócitos T (B7-CTLA-4), indução de morte de linfócitos T através do mecanismo de granzimas e perforinas, aumento da regulação de AMPc intracelular de linfócitos T respondedores ou a geração de adenosina pericelular que é catalizada pelas moléculas de superfície CD39 e CD73 expressas nas Tregs (92, 93, 94).

1.2.3 Tregs em infecções

Sabe-se a importância das Tregs em infecções por diversos agentes etiológicos (95, 96, 97, 98, 99). Em infecções bacterianas crônicas, já existem evidências de que Tregs suprimem a resposta de células T efetoras para controlar os danos causados pela resposta inflamatória exacerbada contra o patógeno (100). Além dessas informações, um modelo de comparação muito próximo com a hanseníase é a tuberculose (TB), por se tratar, também, de uma infecção por micobactéria, tendo muitos mecanismos da resposta imune em comum com o *M. leprae*. Dito isso, diversos estudos mostram que pacientes com a TB ativa têm a frequência de Tregs aumentada tanto no sangue periférico, quanto nos sítios da doença (101, 102, 103, 104, 105), ressaltando a importância desta subpopulação de linfócitos em infecções bacterianas.

Outros estudos, em camundongos, apontam que as Tregs têm um papel fundamental no controle do *clearance* bacteriano, evitando que o hospedeiro

elimine o patógeno (106, 107, 108). Em modelos experimentais com *M. tuberculosis*, sabe-se que Tregs específicas expandem nas mesmas proporções que linfócitos *Th1*, também específicos, levando a diminuição de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ e dificultando, conseqüentemente, a resposta efetora contra a micobactéria (109).

O papel das Tregs na infecção por *M. leprae* tem ganhado atenção, e diversos estudos tem sido desenvolvidos. Palermo e colaboradores (110) verificaram em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de pacientes MB um aumento da proporção de Tregs, quando comparada com pacientes PB. Esse aumento pode estar relacionado com a diminuição da resposta antígeno específica, impossibilitando uma resposta eficaz contra o bacilo, e por isso esses pacientes não seriam capazes de conter a disseminação do patógeno.

Saini e colaboradores (111) observaram o aumento de TGF- β em pacientes com a forma virchowiana, indicando que as Tregs podem estar suprimindo a resposta de células T efetoras através da secreção dessa citocina supressora, levando a uma anergia antígeno-específica frente ao *M. leprae*.

Estudos em pacientes reacionais começaram a ganhar espaço, e recentemente Vieira e colaboradores (112) observaram que pacientes com Reação Tipo 2 apresentaram uma frequência de Tregs mais baixa *in situ* e na circulação, quando comparados à pacientes com Reação Tipo 1. Essa diminuição foi paralela ao aumento de IL-17 e a diminuição de TGF- β *in situ*. Saini e colaboradores (46) ainda verificaram diminuição de Tregs em ambos os grupos reacionais quando comparados aos grupos não reacionais.

De fato, poucos trabalhos abordam o papel das Tregs nas reações hansênicas, sendo de fundamental importância a elucidação da função dessas células tanto nas reações, quanto nos estados não reacionais.

1.3 Justificativa

A hanseníase é uma doença milenar, mas que ainda é considerada um problema de saúde pública em alguns países endêmicos como o Brasil. Está incluída entre as doenças negligenciadas, pois persiste endêmica mesmo após mais de três décadas da disponibilização gratuita de tratamento eficaz.

O aparecimento dos episódios reacionais é uma complicação desafiadora, uma vez que ainda não há tratamento específico capaz de impedir o aparecimento desses fenômenos, que são a maior causa de hospitalização pela morbidade aguda e incapacidades que pode desencadear.

As reações são caracterizadas por exacerbação da resposta imune, com quadros de inflamação sistêmica (reação tipo 2) e localizada (reação tipo 1). Embora os dois tipos de reação estejam potencialmente associados à falha na regulação imune, estudos prévios desenvolvidos por nosso grupo (51) demonstraram diminuição na frequência de células T reguladoras circulantes e presentes nas lesões em pacientes com reação tipo 2, mas não em pacientes com reação tipo 1, quando comparados com o grupo controle (indivíduos saudáveis contatos de pacientes MB). Frente a esses achados, torna-se bastante importante um estudo funcional destas células com o propósito de melhor entender seu papel na modulação e supressão da resposta imune de pacientes reacionais.

Desta forma esse trabalho visa avaliar a função imunossupressora das Tregs durante os episódios reacionais (tipo 1 e 2) desenvolvidos por alguns indivíduos portadores de hanseníase. Nesse contexto, baseado na hipótese de que pacientes que desenvolvem quadros reacionais apresentam uma diminuição no número e/ou função de células Treg, será utilizado um estímulo específico para indução e expansão dessas células *in vitro*. As subpopulações de Tregs assim obtidas serão avaliadas quanto ao seu fenótipo e sua capacidade funcional de suprimir a resposta imune inespecífica *in vitro*.

Tendo em vista que o tratamento atual destas manifestações consiste no uso por tempo indeterminado (meses a anos) de corticóides e/ou talidomida, consideramos que a elucidação do papel e possível indução/expansão *in vitro* de Tregs nesses quadros poderão eventualmente direcionar para novas intervenções imunoterapêuticas, evitando/diminuindo o uso dessas medicações causadoras de graves efeitos adversos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a capacidade das células T reguladoras de pacientes diagnosticados com hanseníase (com e sem reação) se expandirem *in vitro* e avaliar a capacidade supressora das mesmas sobre a resposta linfoproliferativa de PBMCs, com estímulo policlonal.

2.2 Objetivos específicos

- Purificação de PBMCs em coluna magnética e expansão das mesmas para uso posterior em ensaio de supressão;
- Avaliação da frequência de Tregs pré e pós-expansão;
- Avaliação do perfil fenotípico das Tregs expandidas dos indivíduos saudáveis com os marcadores CD39, PD-1 e LAG-3;
- Avaliação da capacidade supressora das Tregs expandidas quando estimuladas com anti-CD3/anti-CD28;
- Avaliar se há diferença entre a capacidade supressora das Tregs expandidas separadas em coluna, e Tregs expandidas separadas em coluna e, posteriormente, separadas por *cell sorting*, em indivíduos saudáveis;
- Avaliação do perfil de secreção das citocinas IFN- γ e IL-10 nas culturas expansão dos indivíduos saudáveis e nas culturas de supressão (co-cultivos) dos pacientes.

3. Casuística

Os pacientes foram recrutados da Unidade 3902 (Ambulatório de Hanseníase – sob coordenação da Prof. Dra. Maria Ângela Bianconcini Trindade) da Divisão Clínica Dermatológica, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, e incluídos no estudo após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O presente trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, sob nº 1.922.398.

Critérios de inclusão:

- Indivíduos adultos (> 16 anos).
- Diagnóstico clínico de hanseníase, classificados de acordo com os critérios de Ridley-Jopling (TT, DT, DD, DV, VV).
- Pacientes em vigência de surto reacional moderado à grave tipo 1 ou tipo 2.

Critérios de exclusão:

- Tratamento com poliquimioterapia (PQT) com mais de 2 meses, nos casos de pacientes que não apresentam reação hansênica.
- Gravidez
- Uso de substâncias imunomoduladoras
- Comorbidades que influenciam na resposta imune (HIV, diabetes, doença autoimune, entre outras).

Os pacientes foram alocados em 4 grupos distintos:

- Indivíduos que apresentam reação tipo 1 moderada/intensa.
- Indivíduos que apresentam reação tipo 2 (ENH) moderada/intensa.
- Indivíduos, sem reação, que apresentam as formas TT, DT.
- Indivíduos, sem reação, que apresentam as formas DV, VV.

Para melhor compreensão em relação à divisão dos grupos, nomeamos os pacientes sem reação com as formas clínicas TT/DT como “paucibacilares”, e pacientes sem reação com as formas clínicas DV/VV como “multibacilares”, seguindo a classificação proposta pela OMS.

O grupo de indivíduos saudáveis foi composto por alunos e funcionários do Laboratório de Investigação Médica 56 (LIM-56), apresentando como critérios de inclusão idade a partir de 16 anos (indivíduos adultos) e como critérios de exclusão qualquer doença ou uso de medicamentos que influencie na resposta imune, e gravidez.

4. Materiais e Métodos

4.1 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)

Foi coletado, em tubos heparinizados, aproximadamente 50 mL de sangue dos pacientes e indivíduos saudáveis voluntários através de punção venosa. O sangue coletado foi diluído em solução salina na proporção 1:1 e foi recolhida a nuvem de células separadas através do gradiente de densidade em solução FicollPaque™Plus (GE Healthcare, BioSciences AB). As células foram lavadas com solução salina e contadas em câmara de Neubauer – diluídas em corante Trypan Blue Solution (0,4% - Sigma Aldrich, USA), para quantificação de viabilidade celular. Foram utilizadas nos experimentos somente suspensões celulares com viabilidade > 90%.

4.2 Congelamento e descongelamento celular

Aproximadamente 3×10^7 das PBMCs foram congeladas para que fosse possível realização posterior do ensaio de supressão. Para tal, as células foram lavadas e depois ressuspendidas em Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco®) e em solução de congelamento (contendo 20% DMSO + 80% Soro Fetal Bovino), por gotejamento. O material foi transferido para criotubos e armazenado em container contendo álcool isopropílico (Mr. Frost Nalgene® Nunc.) em freezer - 80°C.

Para o descongelamento das PBMCs, o criotubo foi rapidamente imerso em banho-maria à 37°C sob agitação. Em seguida, as PBMCs foram diluídas em meio de cultura com 10% de Soro AB (SAB) (Sigma Aldrich, USA) previamente aquecido à 37°C. Após 2 ciclos de lavagem em meio de cultura, as células foram contadas em câmara de Neubauer, diluídas em Trypan, para obtenção de viabilidade celular. As células foram deixadas em repouso por 24 horas.

4.3 Separação de células TCD4⁺ por beads magnéticas

Após a obtenção de PBMCs, as células foram purificadas através de *beads* magnéticas em coluna, utilizando o protocolo do Kit para separação de

células TCD4⁺ (CD4⁺T Cell Isolation Kit, human – Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Para tal, as células foram submetidas a marcação com um coquetel de anticorpos com *beads* magnéticas contra CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ , e CD235a (Glycophorin A), seguidos por uma incubação com *microbeads* anti-biotina.

Subsequentemente, a suspensão celular foi acondicionada em coluna LD (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) acoplada a um campo magnético VarioMacs (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), sendo possível separar as células de interesse (TCD4⁺) através de seleção negativa, enquanto outros tipos celulares não desejados ficaram retidos na coluna. As células obtidas foram submetidas à lavagem e contadas em câmara de Neubauer, diluídas em azul de Trypan para indicação da viabilidade, sempre > 90%.

4.4 Expansão *in vitro* de células T reguladoras

Após a separação de células TCD4⁺, a suspensão celular foi ajustada para 2,5x10⁶ células/mL em meio de cultura AIM V® suplementado com 10% de SAB, e a mesma foi distribuída em placa de 24 poços (BIOFIL®).

Seguimos protocolo, baseado em Battaglia, Stabilini e Tresoldi (113), onde a placa foi sensibilizada com anti-CD3 por 3 horas em estufa à 37°C (10µg/mL – BD Biosciences), seguido da adição da suspensão celular e estimulação com anti-CD28 (1µg/mL – BD Biosciences) e Rapamicina (100nM – Sigma, USA). A placa permaneceu em estufa de CO₂ a 37°C por 21-28 dias. No 7º e 14º dia houve um reforço no estímulo com 10µg/mL de anti-CD3, 1µg/mL de anti-CD28, rIL-2 (250U/mL - PeproTech®) e Rapamicina (100nM) (figura 1). No 21º dia as células foram coletadas e marcadas para avaliação fenotípica por citometria de fluxo e avaliação funcional, como descrito nos itens 4.6 e 4.7.

Figura 1 Linha do tempo da expansão de células T reguladoras com coquetel de rapamicina, anti-CD3, anti-CD28 e IL-2. Em verde, dias onde houve adição de IL-2 à cultura celular (7,9, 12,14,16,18). Em vermelho, dias onde foi feito estímulo com anti-CD3/anti-CD28 e rapamicina (0,7,14).

4.5 Caracterização fenotípica de células T reguladoras (Tregs)

A frequência de Tregs (pré e pós-expansão) foi obtida através de citometria de fluxo. Para tal, as células adquiridas (após separação de PBMC e após expansão celular) foram caracterizadas pelo fenótipo $CD4^+CD25^+FoxP3^+CD127^{low/-}$ (tabela 2) através da marcação celular de acordo com os itens 4.5.1 e 4.5.2. Em todas as marcações utilizamos marcador de viabilidade celular (APC-H7 – Viability Dye, eBioscience, USA).

Tabela 2 Relação dos anticorpos monoclonais utilizados para caracterização das Tregs.

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Fabricante	Volume de uso
CD3	BV605	SK7	BD Biosciences	3µL
CD4	V500	RPA-T4	BD Biosciences	3µL
CD25	FITC	M-A251	BD Biosciences	4µL
CD127	PE-CY7	HIL-7R-M21	BD Biosciences	2,5µL
FoxP3	PE	PCH101	eBioscience	3µL

A avaliação fenotípica das Tregs dos indivíduos saudáveis pós-expansão seguiu a utilização dos anticorpos citados na tabela 2 e, em adição, a população expandida foi marcada (extracelular) para avaliação das moléculas CD39, PD-1 e LAG-3 (tabela 3).

Tabela 3 Relação dos anticorpos monoclonais utilizados para caracterização das Tregs dos indivíduos saudáveis.

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Fabricante	Volume de uso
CD39	APC	TU66	BD Biosciences	3µL
PD-1	BV421	EH12.1	BD Biosciences	3µL
LAG-3	PercpCy 5.5	C9B7W	BioLegend	4µL

4.5.1 Marcação extracelular

Após lavagem com PBS 1% de BSA a 453g por 10 minutos, as células foram marcadas com os anticorpos CD3, CD4, CD25, CD127 (tabela 2) e marcador de viabilidade e as células expandidas dos indivíduos saudáveis também foram marcadas com CD39, PD-1 e LAG-3 (tabela 3), e incubadas por 30 minutos a 4°C e na ausência de luz. Após esse procedimento, as células foram lavadas e incubadas com tampão de fixação (eBioscience, USA) por 30 minutos a 4°C, na ausência de luz, seguido de um ciclo de lavagem com PBS 1% de BSA.

4.5.2 Marcação intracelular

As células, previamente submetidas a marcação extracelular, foram centrifugadas em 453g por 5 minutos com PBS 1% de BSA e, em seguida, ressuspensas com o tampão de permeabilização (Ebioscience, USA). Foram então incubadas com o tampão de permeabilização juntamente com soro de rato (Ebioscience, USA), e logo após, com o anticorpo monoclonal específico para FoxP3 (Ebioscience, USA) a 4°C e na ausência de luz durante 30 minutos. Posteriormente, as células foram submetidas a nova lavagem com tampão de permeabilização. Por fim, as células foram ressuspensas em solução isotônica BD FACS Flow® (BD Biosciences) e analisadas em citômetro de fluxo em até 24 horas. As aquisições foram realizadas no citômetro de fluxo LSRFortessa (adquiridos 700.000 eventos por tubo) com o *software* FACSDiva (BD Biosciences) e os dados foram analisados no *software* FlowJo® Versão 10, de acordo com a figura 2 e 3. Em todas as análises, foram utilizados

controles isotópicos para determinação do corte da população FoxP3⁺ (figura 4), além do FMO (*Fluorescence minus one*) para corte da população duplo positiva CD4⁺CD25⁺ (figura 5) e FMO para corte das populações positivas para os marcadores CD39, PD-1 e LAG-3 (APC, BV421 e PercpCy 5.5, respectivamente) (figura 6). Para mensuração da porcentagem de células FoxP3⁺ foi aplicada uma fórmula simples, onde: % CD4⁺CD25⁺ x % FoxP3⁺CD127^{low/-}/100.

Figura 2 Estratégia de análise para obtenção da frequência de Treg – amostra pré-expansão (ex vivo).

Figura 3 Estratégia de análise para obtenção de frequência de Treg em células pós-expansão.

Figura 4 Controle Isotípico (Rat IgG2a, eBioscience) para FoxP3.

Figura 5 Indivíduo saudável. FMO para molécula CD25 (FITC). A: PBMC não marcado para CD25 (FITC), estabelecendo local de corte de população. B: PBMC marcado para CD25 (FITC) com o corte a partir do FMO.

Figura 6 FMO das fluorescências PercpCy 5.5 – LAG-3 (A), APC - CD39 (B), BV421 PD-1 (C). A1: ausência da fluorescência PercpCy 5.5; A2: análise de células expandidas com marcação para PercpCy 5.5; B1: ausência da fluorescência APC; A2: análise de células expandidas com marcação para APC; C1: ausência da fluorescência BV421; A2: análise de células expandidas com marcação para BV421.

4.6 Fim da expansão de células Treg

Ao fim das culturas de expansão dos indivíduos saudáveis, foram armazenados 500uL de sobrenadante, para posterior realização de imunoenaios de ELISA.

Subsequentemente, as células expandidas dos pacientes (e parte das células expandidas dos indivíduos saudáveis) foram coletadas da placa de cultura, submetidas a uma centrifugação a 435g por 10 minutos e contadas em câmara de Neubauer. Logo em seguida, ajustamos a concentração para 2×10^5 células/mL – para posterior plaqueamento e realização do ensaio de supressão, conforme item 4.6.3.

A outra parte das células expandidas dos indivíduos saudáveis foi submetida à purificação por *cell sorting*, conforme descrito no item 4.6.1.

4.6.1 Separação de T reguladoras expandidas por *cell sorting*

Após finalizar o protocolo de expansão de células T reguladoras, nos indivíduos saudáveis, realizamos uma purificação da população expandida com os marcadores CD4, CD25 e CD127 por *cell sorting*.

Resumidamente, ao fim da cultura de expansão, as células expandidas foram submetidas a um ciclo de lavagem, marcadas com os anticorpos descritos na tabela 4, incubadas, e então ressuspensas em tampão apropriado para aquisição das mesmas no citômetro de fluxo BD FACS Aria II™ (realizada na UNIFESP, em colaboração com Dra. Daniela Teixeira).

Tabela 4 Relação dos anticorpos monoclonais utilizados para separação das Tregs em *cell sorting*.

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Fabricante	Volume de uso por 10 ⁶ /cél.
CD4	PE	HP2_6	ImmunoStep	2,5µL
CD25	FITC	M-A251	BD Biosciences	4µL
CD127	APC	HIL-7R-M21	BD Biosciences	3µL

Todas as seis purificações por *cell sorting* dos indivíduos saudáveis resultaram em populações com pureza > 90% para os marcadores de interesse (figura 7).

Figura 7 Figura representativa da estratégia utilizada para separar as células de interesse, ilustrando a amostra pré-sorting (A), e pós-sorting (B).

4.7 Mensuração da proliferação celular com CFSE

Para mensuração da proliferação celular, utilizamos a marcação com carboxifluoresceína diacetato succinimidil ester (CFSE – Molecular Probes®, Invitrogen).

Para preparação das PBMCs, descongelamos as células que foram armazenadas em criotubo no início do protocolo, como descrito no item 4.2. Posteriormente, iniciamos a marcação destas células com CFSE. Resumidamente, em torno de 1×10^7 células/mL foram mantidas em 2 mL de RPMI 1640 aquecidas (37°C) com a concentração de $3\mu\text{M}$ de CFSE (concentração já estabelecida no laboratório) sob agitação, por 15 minutos, em banho maria a 37°C . Após isso, o excesso do corante foi retirado, submetendo as células a 3 lavagens com RPMI + 10% de SFB gelado (4°C). A seguir, as PBMCs marcadas foram utilizadas para realização do co-cultivo com as células Tregs, como descrito abaixo, no item 4.8.

4.8 Co-cultivo para avaliação de função supressora de Tregs

Após a expansão, as Tregs (purificadas somente em coluna – pacientes - e purificadas em coluna/*cell sorting* - indivíduos saudáveis) foram avaliadas quanto a sua capacidade de suprimir a resposta imune. Dessa forma, foi realizado co-cultivo de Tregs e PBMCs autólogas marcadas com CFSE (como descrito acima no item 4.7). Foram utilizadas diferentes proporções de Tregs:PBMCs (1:1, 1:2 e 1:5).

As Tregs e PBMCs foram estimuladas, em uma placa de 96 poços de fundo em U (Corning/ Costar), com anti-CD3 (placa sensibilizada) e anti-CD28, na presença ou não de células expandidas (Tregs), e distribuídas em duplicatas. Nos casos de indivíduos saudáveis, foram utilizadas Tregs expandidas não purificadas em *cell sorting* e também Tregs purificadas por essa metodologia. As células foram mantidas cinco dias em estufa CO₂ a 37°C, protegidas da luz.

Foi utilizado, como controle positivo, duplicatas contendo PBMCs na ausência das Tregs expandidas, estimuladas com anti-CD3/anti-CD28. A proliferação celular foi avaliada por CFSE e adquirida em citometria de fluxo LSRFortessa (adquiridos 100.000 eventos por tubo) com o *software* FACSDiva (BD Biosciences) e os dados foram analisados no *software* FlowJo® Versão 10, de acordo com a figura 8.

Ao fim dos co-cultivos de supressão dos pacientes, foram armazenados sobrenadantes das condições propostas para posterior realização de imunoenaios de ELISA.

Figura 8 Estratégia de análise para Ensaio de supressão.

4.9 ELISA IFN- γ /IL-10

Coletamos o sobrenadante das culturas de expansão (dia 21) dos indivíduos saudáveis e sobrenadante dos co-cultivos de supressão dos pacientes e submetemos essas amostras a um ensaio imunoenzimático (ELISA) para detectar a presença das citocinas IFN- γ e IL-10 (esta última somente em sobrenadante de indivíduos saudáveis).

Para tal, sensibilizamos uma placa *half area* de 96 poços (Corning Inc.) com o anticorpo de captura do kit devido para cada citocina (DuoSet® ELISA

human IFN- γ e DuoSet® ELISA human IL-10 - R&D Systems, Inc.) e incubamos a placa *overnight* em temperatura ambiente (TA). Após isso, submetemos a placa a um ciclo de 6 lavagens com PBS 1x e as amostras foram colocadas em placa, seguidas da curva padrão, com 7 pontos (2000pg/mL; 1000pg/mL; 500pg/mL; 250pg/mL; 125pg/mL; 62,5pg/mL; 31,25pg/mL), além do controle negativo (branco). A placa foi submetida a uma incubação de 2 horas em TA, novo ciclo de 6 lavagens e foi adicionado anticorpo de detecção, seguido de nova incubação de 2 horas em TA. A placa foi submetida a um ciclo de 6 lavagens novamente, foi adicionada Streptavidina e, logo após incubação, o substrato da enzima (Tetramethylbenzidine – TMB – Invitrogen®). Ao fim do experimento, foi adicionado H₂SO₄ à placa - solução *stop* - para que fosse possível revelar a placa em leitor adequado (Leitora de Microplacas – BioTek Instruments), a 450 nm, como indica o fabricante dos kits. Os resultados, obtidos em densidade óptica, foram traduzidos em picogramas/mL utilizando o *software GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software, Inc.).

4.8 Análise estatística

Para realização da análise estatística foi utilizado o *software GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software, Inc.). Para comparação de dados entre grupos foi aplicado o teste One-way ANOVA com pós-teste de Dunn, quando as amostras não eram paramétricas. As análises foram consideradas estatisticamente significantes quando apresentaram $p < 0,05$.

5. Resultados e Discussão

5.1 Dados Clínicos e Demográficos

Foi realizada coleta de 29 pacientes para composição dos quatro grupos, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão mencionados anteriormente. Os mesmos encontram-se caracterizados na tabela 5.

Tabela 5 Características clínico-demográficas dos pacientes.

Grupo Sem Reação (Paucibacilar)			
Pacientes	Idade	Gênero	Forma Clínica
P1	58	M	DT
P2	44	F	DT
P3	42	M	DT/DD
P4	35	M	DT/DD
P5	43	M	DT
P6	74	M	TT
P7	55	F	TT
Grupo Sem Reação (Multibacilar)			
P8	58	M	DV
P9	25	M	VV
P10	43	M	DV/VV
P11	36	M	DV/VV
P12	77	F	DD
Grupo Reação Tipo 1 (R1)			
P13	55	M	DT/DD
P14	63	M	DD/DV
P15	58	F	DV
P16	18	M	DT/DD
P17	72	M	DD
P18	27	M	DD
P19	50	M	VV
P20	60	F	DD

Grupo Reação Tipo 2 (R2)			
P21	42	M	DV
P22	35	M	DV
P23	33	M	DV
P24	66	M	DV
P25	33	M	DD/DV
P26	34	M	DV
P27	60	F	DD/DV
P28	35	M	DV
P29	42	M	VV

Para o grupo de indivíduos saudáveis, foi realizada coleta de 6 indivíduos. Os mesmos encontram-se caracterizados na tabela 6.

Tabela 6 Características dos indivíduos saudáveis participantes do estudo.

Indivíduos saudáveis	Idade	Gênero
S1	20	F
S2	22	F
S3	20	F
S4	27	F
S5	30	F
S6	26	F

5.2 Purificação celular

5.2.1 Purificação de células TCD4⁺ por *beads* magnéticas

Foi utilizada a técnica de purificação por seleção celular em coluna magnética, já estabelecida previamente no laboratório por Vieira (114), obtendo-se regularmente pureza >90%. A figura 9 representa a estratégia de análise utilizada para mensuração da porcentagem de pureza obtida através da seleção magnética negativa de células TCD4⁺ de um indivíduo saudável, como exemplo ilustrativo da padronização.

Figura 9 Indivíduo saudável. A: Análise de população pré-purificação por *beads* magnéticas em coluna. B: Análise de população pós-purificação por *beads* magnéticas em coluna.

5.2.2 Purificação de células expandidas por *cell sorting*

As células dos indivíduos saudáveis expandidas *in vitro* foram submetidas à purificação da população $CD4^+CD25^+CD127^-$ por *cell sorting*. Como foram obtidos diferentes números de células $TCD4^+$ pós-expansão por indivíduo, os valores submetidos a essa purificação foram diferentes, conforme descrito na tabela 7.

Tabela 7 Número absoluto de células pré e pós o processo de purificação por *cell sorting*, contadas em câmara de Neubauer e porcentagem de pureza de células CD4⁺CD25⁺CD127⁻ pós *cell sorting*. A porcentagem de pureza pós-*sorting* foi obtida através da análise dos dados no FlowJo.

Indivíduo saudável	n. células (x10⁶) pré-<i>sorting</i>	n. células (x10⁶) pós-<i>sorting</i>	% pureza pós-<i>sorting</i>
S1	19	3	98,3
S2	19	1,1	97,9
S3	10	4,1	98,3
S4	16	3,5	97,4
S5	5	1,5	99,5
S6	20	1,8	98,8

A concentração de células/mL foi ajustada, para devido plaqueamento das células purificadas e, como citado anteriormente, a porcentagem de pureza das Tregs expandidas pós-*sorting* foi > 90% em todos os indivíduos.

5.3 Expansão de células TCD4⁺

A partir de estudos prévios de Vieira (114), onde foram comparados três protocolos diferentes de expansão de células T reguladoras (rapamicina, TGF- β e VD₃), foi possível estabelecer que o coquetel de rapamicina é o que mais se adequa aos nossos objetivos, pois houve um enriquecimento maior da porcentagem da população de células T reguladoras *in vitro*, além do aumento do número absoluto de células TCD4⁺, permitindo assim a realização da análise funcional destas células expandidas.

Dessa forma, prosseguiu-se com o protocolo de expansão com o coquetel de rapamicina por 21-28 dias, como descrito no item 4.4. Obteve-se a mediana do número absoluto de linfócitos de 13,54x10⁶ (min: 4,7 - máx: 29,2 x10⁶) pós-expansão e uma mediana de frequência de 20,95% (7 - 55,9%) de células TCD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}FoxP3⁺ (figura 10).

Na figura 10A e 10B observa-se, respectivamente, um aumento significativo no número absoluto de células TCD4⁺ e da porcentagem de células TCD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}FoxP3⁺, indicando que os estímulos com anti-CD3, anti-CD28 e IL-2 são eficientes na expansão, porém há somente

enriquecimento da população, possivelmente pela expansão concomitante de células TCD4⁺ não-Tregs (figura 10C). Outros trabalhos observaram médias de 51% (115) e 53% (116) de células FoxP3⁺ ao final da expansão, porém utilizaram diferentes formas de purificação celular, como por exemplo *cell sorting* ou por separação por *beads* magnéticas específicas para separação de outras populações celulares (CD8⁻CD25⁺) (115, 116).

Levando em consideração que, em um total de 35×10^6 de PBMCs, que é a quantidade de células que são aplicadas em coluna para iniciar o processo de separação de linfócitos TCD4⁺, temos uma estimativa da presença de $0,175 \times 10^6$ células TCD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}FoxP3⁺, é possível dizer que atingimos o objetivo de aumentar o número absoluto de células FoxP3⁺ para realização do ensaio de supressão, como proposto inicialmente, uma vez que finalizamos o ensaio com uma mediana de 2×10^6 células TCD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}FoxP3⁺ (figura 10C).

Em alguns casos, foi necessário prolongar o protocolo de expansão para até 28 dias em cultura devido ao crescimento mais lento das células, não atingindo o resultado esperado em relação ao aumento absoluto de células pós-expansão, fato que ocorreu independente da forma clínica apresentada pelos pacientes. Ainda assim, alguns pacientes não atingiram o aumento suficiente no número de células esperado pós-expansão.

Por praticidade, nomearemos a população expandida como “Treg expandida”, apesar de haver somente um enriquecimento com Tregs após a expansão, e não uma purificação.

Figura 10 A: Mediana dos valores iniciais de células TCD4⁺ para expansão e valores obtidos pós-expansão – contagem em câmara de Neubauer (n=29). B: Mediana da % de FoxP3⁺ em análise de células *ex vivo* e pós-expansão (n=29). C: Número absoluto de células TCD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}FoxP3⁺ pós-expansão, mediana de 2,27x10⁶ células (min: 0,6- máx: 5,54x10⁶) (n=29). Os valores se referem aos resultados obtidos a partir de amostras de pacientes.

O uso da rapamicina para favorecer a expansão de células T reguladoras em detrimento das células TCD4⁺ não-Tregs se dá, pois ela age como um bloqueador da atividade da proteína quinase mTOR, impedindo a síntese protéica e, por consequência, a progressão do ciclo celular das células T convencionais e não de Tregs (117, 118). Alguns estudos mostram que células FoxP3⁺ são mais resistentes a ação apoptótica da rapamicina porque expressam constitutivamente a proteína pim 2 – uma proteína serina/treonina quinase (119, 120), enquanto outros sugerem que células FoxP3⁺ apresentam

um nível de fosforilação mais baixo da molécula alvo (mTOR) da rapamicina, o que acaba lhes conferindo resistência a ação do fármaco (121).

Battaglia, Stabilini e Roncarolo (122) observaram que, a adição de rapamicina a culturas de células TCD4⁺, promovia o enriquecimento de células FoxP3⁺, o que não acontecia nas culturas sem rapamicina. Além disso, ao cultivar células CD4⁺CD25⁻ com rapamicina, não havia um aumento na frequência de células FoxP3⁺, o que sugere que a rapamicina não age na geração *de novo* de células CD4⁺CD25⁺.

Com o propósito de diminuir a proporção de contaminantes de células TCD4⁺ não-Tregs, baseado em artigos que utilizam separação de células por *beads* magnéticas em coluna (123, 124, 125, 126), realizamos experimento a partir de material coletado de um indivíduo saudável e iniciamos uma expansão com duração de 21 dias, onde foram feitas três purificações diferentes: i) purificação com *beads* magnéticas por seleção negativa de células CD4⁺ no dia 0; ii) purificação com *beads* magnéticas por seleção negativa de células CD4⁺ + seleção positiva de células CD25⁺ no dia 0; iii) purificação com *beads* magnéticas por seleção negativa de células TCD4⁺ no dia 0 + seleção positiva de células CD25⁺ no dia 14. As purificações i) e ii) não resultaram no maior enriquecimento de células TCD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}FoxP3⁺ ao final dos 21 dias em cultura (tabela 8), por isso mantivemos o protocolo proposto inicialmente para purificação celular.

Tabela 8 Três diferentes purificações realizadas por separação em coluna magnética em um indivíduo saudável. A porcentagem foi obtida através de análise de células previamente marcadas de acordo com o item 4.5. A porcentagem de células FoxP3⁺ do dia 0 corresponde a marcação das PBMCs *ex vivo*, não submetidas a separação por *beads* magnéticas. As porcentagens de células CD25⁺ nos dias 0 e 14 indicam o valor pós-separação por coluna magnética, de acordo com o protocolo proposto.

PURIFICAÇÕES	% CD25 ⁺ Dia 0	% FoxP3 ⁺ Dia 0	% CD25 ⁺ Dia 14	% CD25 ⁺ Dia 21	% FoxP3 ⁺ Dia 21
CD4 ⁺ dia 0	5,88	5,12	95,3	66,5	23,8
CD4 ⁺ CD25 ⁺ dia 0	7,7	5,12	93,1	54,9	20,69
CD4 ⁺ dia 0 + CD25 ⁺ dia 14	5,88	5,12	90,9	69,5	18,69

Diversas outras tentativas de purificação de população $CD4^+CD25^+$ pré-expansão foram realizadas utilizando os mesmo kits de separação ($CD4^+$ T Cell Isolation Kit human e CD25 MicroBeads II human, Miltenyi Biotec), além de tentativas com o kit $CD4^+CD25^+CD127^{dim/-}$ Regulatory T Cell Isolation Kit II human (Miltenyi Biotec), porém os resultados esperados não foram alcançados (dados não mostrados).

Ao analisar separadamente a mediana de frequência de células $TCD4^+CD25^+CD127^{low/-}FoxP3^+$ da população expandida, não há diferença significativa entre os diferentes grupos de pacientes (ANOVA, $p=0,31$) (figura 11). Isso indica que a pequena diferença entre a porcentagem de Tregs expandidas adicionadas aos co-cultivos não deverá ser um fator determinante quando compararmos a capacidade supressora dos diferentes grupos estudados.

Figura 11 Mediana da frequência de células expandidas $TCD4^+CD25^+CD127^{low/-}FoxP3^+$ por grupo. Grupo PB: 16,87 (min: 8,9 – max: 25,9); grupo MB: 21,55 (15,10 – 21,3); grupo R1: 24,13 (9,93 – 44,69); grupo R2: 26,5 (7 – 55,9).

Os indivíduos saudáveis apresentaram uma mediana de frequência de células $TCD4^+CD25^+CD127^{low/-}FoxP3^+$ expandidas de 25,8% (min: 12,8 – max: 33,2) e, assim como a expansão dos pacientes, atingimos o objetivo do aumento da frequência dessas células em cultura. Além disso, houve um aumento significativo no número absoluto de células $TCD4^+$ do início ao fim da expansão, cumprindo mais um dos objetivos do experimento, tornando possível a realização do ensaio de supressão posteriormente (figura 12).

Figura 12 Número absoluto de células TCD4+ pré e pós-expansão dos indivíduos saudáveis comparadas pelo teste de Mann Withney (n=6).

É importante ressaltar que, nas células expandidas, a população CD3⁺ são, predominantemente, células CD4⁺ (pureza >95%), confirmando a eficiência da purificação celular (por *beads* magnéticas) no início do protocolo (figura 13).

Figura 13 Dotplot do cruzamento de células CD4⁺(eixo x) e CD25⁺(eixo y), onde observamos um total de 97,6% de células CD4⁺. Análise representativa.

5.4 Análise de subpopulações de Tregs pós-expansão (indivíduos saudáveis)

Realizamos uma marcação extracelular para citometria de fluxo nas Tregs expandidas dos indivíduos saudáveis para compreender quais populações celulares fazem parte do nosso pool pós-expansão, além da população que sempre é caracterizada. Para isso, adicionamos à nossa marcação convencional (CD3/CD4/CD25/CD127/FoxP3) as moléculas LAG-3, CD39, e PD-1.

Células T reguladoras do tipo 1 (Tr1) tem o fenótipo $CD4^+LAG3^+FoxP3^-$, secretam altos níveis de IL-10 e possuem função supressora (127, 128, 129, 130, 131). Essas células têm um papel importante no controle da inflamação e mostram um grande potencial terapêutico para doenças inflamatórias. LAG-3 é uma molécula estruturalmente homóloga à molécula CD4 e pode se ligar ao MHC de classe II com alta afinidade (132, 133). Apesar de necessitar da presença de IL-27 para crescer *in vitro* (134), essa população deriva de linfócitos $CD4^+$ com ativação via TCR. Mesmo que não haja adição de IL-27 no protocolo de expansão adotado, partimos de linfócitos $CD4^+$ e, com anti-CD3/anti-CD28, induzimos fortemente a ativação dessas células via TCR, nos levando a pensar que há possibilidade de expansão dessa população reguladora do tipo 1 concomitante à população $FoxP3^+$.

PD-1 é um receptor expresso em linfócitos T e B ativados, células NKT e células mielóides (135, 136, 137, 138, 139). Regula negativamente a sinalização do receptor de antígeno, fazendo parte da maquinaria de autoregulação normal das células. Após exposição crônica a um antígeno, a molécula PD-1 fica regulada positivamente de forma persistente nos linfócitos T; desta forma, interações entre receptor/ligante inibem a ativação destes linfócitos, além da inibição de sua proliferação e produção de citocinas, levando a um conseqüente estado de exaustão (140, 141). Visto isso, é possível que, após tantos estímulos vigorosos com anti-CD3/anti-CD28 nas culturas de expansão, as células entrem em um processo de exaustão, e isso prejudique de alguma forma nosso ensaio de supressão, realizado posteriormente.

A molécula CD39 é uma ectonucleotidase, enzima envolvida na produção de adenosina. Estudos mostraram que essa ectonucleotidase,

juntamente à molécula CD73, é expressa na superfície de Tregs de camundongos e humanos (142, 143). Juntas, essas moléculas são responsáveis pela conversão de ATP em AMP e, subsequentemente, em adenosina, que é um fator imunossupressor (144).

Ao analisar a expressão das moléculas de interesse (figura 14), não encontramos resultados que justificassem uma população Tr1, uma vez que não foram encontradas células FoxP3⁻LAG-3⁺ nas culturas de expansão. Também não houve resultado expressivo da molécula PD-1, tanto na população FoxP3⁺ como na FoxP3⁻, descartando a idéia de células exaustas em nossa cultura de expansão que pudessem influenciar de alguma forma o resultado do ensaio de supressão. CD39 foi encontrado em quantidade similar em células FoxP3⁺ e FoxP3⁻.

Dados na literatura demonstram duas populações possíveis de células CD4⁺CD39⁺, as: CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD39⁺ e CD4⁺CD25⁻FoxP3⁻CD39⁺ (145). Essa segunda população não medeia supressão, diferente da primeira, que tem o mesmo fenótipo das Tregs expandidas, analisadas na figura 14.

Figura 14 Porcentagem de expressão fenotípica das moléculas PD-1, CD39 e LAG-3 nas células TCD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}FoxP3⁺ e TCD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}FoxP3⁻ de indivíduos saudáveis (n=6).

Para compreensão da população CD25⁺FoxP3⁻CD39⁺ encontrada nos indivíduos controle (células expandidas), coletamos PBMC de dois indivíduos saudáveis, já inclusos neste trabalho, e realizamos uma marcação para as moléculas CD3/CD4/CD25/CD127/FoxP3/CD39, afim de entender se a população CD39⁺ seria diferente em células não expandidas, sinônimo de uma população altamente estimulada.

A princípio, acreditamos que a expressão de CD39 na população CD25⁺FoxP3⁻ poderia estar relativamente alta pelos estímulos contínuos que proporcionamos na cultura de expansão, o que justifica a expressão dessa molécula na superfície de células não supressoras (146). Porém, ao analisar a população *ex vivo* destes mesmos indivíduos, os valores continuavam muito próximos à porcentagem encontrada em células expandidas (figura 15).

Figura 15 A: Análise de PBMCs ex vivo de indivíduos controle – células $CD4^+CD25^+FoxP3^-CD39^+$. B: Análise de Tregs expandidas de indivíduos controle – células $CD4^+CD25^+FoxP3^-CD39^+$.

5.5 Análise da capacidade supressora das células expandidas (ensaio de supressão)

A partir da expansão das células, o próximo passo foi a realização dos co-cultivos das PBMCs autólogas marcadas com CFSE junto as Tregs expandidas (purificadas por coluna e *cell sorting*, no caso de indivíduos saudáveis). As PBMCs, previamente descongeladas, apresentaram viabilidade > 90% (contagem em câmara de Neubauer).

Foi considerada a porcentagem da proliferação celular das células marcadas (PBMCs), possibilitando o estudo da capacidade supressora das

células (Tregs) expandidas a partir desta interação *in vitro*, frente a estímulos inespecíficos (anti-CD3 e anti-CD28).

5.5.1 Pacientes

A partir dos valores obtidos, é possível observar uma significativa resposta linfoproliferativa frente ao estímulo com anti-CD3/anti-CD28, com uma média dos grupos de 70% (min: 35,4- máx: 94,4%).

De forma geral, observamos (figura 16) que as Tregs expandidas dos pacientes demonstraram uma robusta capacidade de supressão até então, corroborando com experimentos demonstrados por Battaglia *et al* (147), que sugerem que a estimulação via TCR com anti-CD3/anti-CD28, além da adição de rapamicina e IL-2, na expansão celular, gera uma população com grande capacidade supressora.

Essa capacidade supressora é preservada em uma relação de até 1:25 (equivalente à relação Texp:PBMCs 1:5), levando em consideração que apenas uma mediana de 20,95% das células T expandidas são Tregs. Chamamos atenção para a proporção de 1:5 no grupo R1 (figura 16C), onde não houve uma supressão significativa, apresentando uma média de 22,3% de supressão quando comparado com a condição PBMCs estimuladas com anti-CD3/anti-CD28 na ausência de Tregs. Por outro lado, nessa mesma proporção, os grupos PB, MB e R2 (ilustrados nas figuras 16A, 16B e 16D, respectivamente) apresentaram médias de 27,3%, 52,8% e 42,9% de supressão, respectivamente (tabela 9). A análise estatística obtida pelo ANOVA mostrou uma variação significativa entre os grupos, com $p < 0,05$, mas o pós-teste de Dunn comparando grupo a grupo não mostrou significância, fato que pode ser atribuído pelo n baixo.

Figura 16 Porcentagem da proliferação das PBMCs com e sem interação com as Tregs expandidas quando estimuladas com anti-CD3 e anti-CD28. A: grupo PB (n=7); B: grupo MB (n=5); C: grupo R1 (n=8); D: grupo R2 (n=9).

Na figura 17 é possível observar diferença na porcentagem de proliferação entre a população de PBMCs na ausência de Tregs expandidas (figura 17A) e as diferentes proporções de Tregs expandidas adicionadas ao co-cultivo – 1:1, 1:2 e 1:5 (figura 17B/C, 17D/E, 17F/G, respectivamente) – todas estimuladas com anti-CD3/anti-CD28, ilustrando os resultados apresentados na figura 16.

Figura 17 Análise representativa do ensaio de supressão de paciente do grupo PB. A1: PBMCs na ausência de Tregs estimuladas com anti-CD3/anti-CD28; A2: PBMCs na ausência de Tregs sem estímulo; B1/B2: PBMCs/Treg expandida na proporção 1:1 estimuladas com anti-CD3/anti-CD28; C1/C2: PBMCs/Treg expandida na proporção 1:2 estimuladas com anti-CD3/anti-CD28; D1/D2: PBMCs/Treg expandida na proporção 1:5 estimuladas com anti-CD3/anti-CD28.

Apesar de não ser um problema para análise, é importante citar que os últimos ciclos de replicação das células CFSE^{low/-} acabaram apresentando um *overlap* com as Tregs expandidas, quando essas são adicionadas ao co-cultivo. Visto isso, delimitamos um corte da população CFSE^{low/-} antes do início da população de Tregs expandidas no *dot plot* (figura 18B), e aplicamos esse corte à população de PBMCs estimuladas com anti-CD3/anti-CD28 na ausência de Tregs expandidas (nosso controle positivo) (figura 18A), para que o intervalo de proliferação seja fidedigno ao intervalo selecionado para mensurar a capacidade supressora das Tregs nos outros *dot plots*. Esse corte

foi feito por indivíduo, respeitando as diferenças possíveis de compensação do citômetro e das características individuais das células.

Figura 18 Dot plot representativo do corte de delimitação da população de Tregs expandidas e a população CFSE^{low/-}. A: PBMCs na ausência de Tregs expandidas estimuladas com anti-CD3/anti-CD28 com corte de delimitação das duas populações, evitando o *overlap*; B: PBMCs na presença de Tregs expandidas na proporção 1:1 estimuladas com anti-CD3/anti-CD28 com o corte de delimitação das populações estipulado a partir da posição das Tregs expandidas.

Ao analisar os resultados de porcentagem de supressão dos grupos de pacientes, observamos uma diferença significativa entre os grupos PB e MB nas proporções 1:2 e 1:5, e nos grupos R1 e R2 na proporção 1:5 (figura 19). Essa diferença pode ser atribuída às diferentes formas clínicas apresentadas pelos pacientes, pois, se lembrarmos das características imunológicas clássicas de indivíduos com as formas virchowianas da doença (com ou sem reação), sabe-se que estes possuem uma resposta imune principalmente reguladora, o que corrobora a maior capacidade de supressão destes grupos encontrada nos ensaios; a caracterização clássica desses pacientes para o polo *Th2* e a secreção de citocinas supressoras como IL-4, IL-5 e IL-10 reforçam esse raciocínio (148, 149). Estudos também mostraram que existe uma mutação no gene que codifica o TLR2 (*Toll like receptor 2*) nas células de pacientes virchowianos, fato que interfere diretamente na ativação do fator de transcrição NF- κ B, fator determinante para produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-2, IL-12, IFN- γ e TNF- α , favorecendo o aumento da

produção de IL-10, quando comparadas com células que não possuem a mutação (150, 151).

Além disso, já foi descrito pelo nosso grupo (110) que pacientes multibacilares, quando comparados aos paucibacilares, possuem maior número de Tregs *in situ*, além de estudos (111) que demonstraram aumento de citocinas regulatórias nestes pacientes, correlacionando esses achados à população T reguladora dos pacientes estudados.

Figura 19 Porcentagem de supressão dos quatro grupo de pacientes nas proporções Treg:PBMC 1:1, 1:2 e 1:5, estimuladas com anti-CD3/anti-CD28. A equação aplicada para obtenção desse valor foi: $100 - (\text{porcentagem de proliferação de cada proporção Treg:PBMC} (1:1, 1:2, 1:5) / \text{proliferação das PBMCs estimuladas})$.

Tabela 9 Porcentagem de supressão nas proporções Treg:PBMC 1:1, 1:2 e 1:5, estimuladas com anti-CD3/anti-CD28. A equação aplicada para obtenção desse valor foi: $100 - (\text{porcentagem de proliferação de cada proporção Treg:PBMC (1:1, 1:2, 1:5)} / \text{proliferação das PBMCs estimuladas})$. NR = Não realizado.

Paciente	1:1	1:2	1:5	Grupo
P1	56,6	50,5	23,6	PB
P2	63	41,4	25,2	PB
P3	78,1	57,9	48,1	PB
P4	28,2	33,5	13,2	PB
P5	68,3	48,3	26,8	PB
P6	68	53,8	NR	PB
P7	35,8	34,5	NR	PB
P8	77,6	74,7	72,4	MB
P9	78,4	69,9	42,5	MB
P10	78,3	64,5	38,3	MB
P11	65,3	67,4	67,4	MB
P12	60,2	57,2	43,8	MB
P13	82,7	91,6	NR	R1
P14	61,6	54,6	33,1	R1
P15	65,2	70,9	NR	R1
P16	36,3	8,2	1,7	R1
P17	66,1	51,8	30,2	R1
P18	75,9	52,8	30,1	R1
P19	50,6	36,2	27,9	R1
P20	66,7	35,4	11,2	R1
P21	71,2	64,8	65,4	R2
P22	81,2	85,1	NR	R2
P23	93,6	86	66,6	R2
P24	66	55	25,6	R2
P25	41	33,9	28,1	R2
P26	83,8	74	NR	R2
P27	72,9	73,2	69,7	R2
P28	43	26,1	10	R2
P29	56	46,8	34,9	R2

Ao analisar o MFI (mediana de intensidade de fluorescência) de FoxP3 das Tregs expandidas, apesar de não haver diferença significativa entre os grupos, há um aumento nos valores desta mediana que sugere relação com a capacidade supressora aumentada nos grupos MB (proporções 1:2 e 1:5) e R2 (proporção 1:5) (figura 18) e a mediana de intensidade de fluorescência da molécula FoxP3 encontrada nessas populações (figura 20).

Figura 20 Gráfico da mediana de intensidade de fluorescência (MFI) da molécula FoxP3 dos quatro grupos de pacientes: PB (n=7), MB (n=5), R1 (n=8) e R2 (n=9).

O resultado expressado na figura 19, com as porcentagens de supressão dos grupos estudados, nos remete à menção de que as diferenças individuais nas porcentagens de Treg expandida dos pacientes nos co-cultivos de supressão não seriam determinantes em relação à capacidade de supressão e suas possíveis diferenças entre os grupos (figura 11). Ao analisar a possibilidade de correlação entre a porcentagem de células $\text{TCD4}^+\text{CD25}^+\text{CD127}^{\text{low}}/\text{FoxP3}^+$ expandidas e a porcentagem de supressão dos quatro grupos de pacientes, encontramos uma correlação positiva na proporção de Treg:PBMC 1:1, com $p=0,009$ e $r=0,5$ (figura 21). Nas proporções de 1:2 e 1:5 não foi encontrada correlação, com $p=0,08/r=0,3$ e $p=0,22/r=0,2$, respectivamente.

Figura 21 Correlação entre a porcentagem de células $\text{TCD4}^+\text{CD25}^+\text{CD127}^{\text{low/-}}\text{FoxP3}^+$ expandidas e a porcentagem de supressão dos pacientes na proporção Treg:PBMC 1:1.

Neste caso, é possível que a alta quantidade de Tregs adicionadas ao co-cultivo de fato influencie a supressão, principalmente quando lembramos que essa não é uma condição próxima do estado fisiológico dos pacientes, afinal, é uma subpopulação menor no sangue periférico ($<10\%$ linfócitos TCD4^+) (82).

Ao diluir a população de Tregs expandidas no mesmo co-cultivo, não encontramos mais correlação entre os valores, reforçando a ideia de que a grande quantidade de Tregs em uma condição “não-fisiológica” pode influenciar a porcentagem de supressão encontrada. Como não há correlação entre as porcentagens nas proporções 1:2 e 1:5, é possível dizer que as diferenças encontradas nas porcentagens de supressão entre os grupos podem ser atribuídas por uma diferença na imunopatogênese das formas clínicas da hanseníase.

5.5.2 Indivíduos saudáveis: coluna *versus* cell sorting

Realizamos o ensaio de supressão dos indivíduos saudáveis com duas populações distintas de Treg: a população que foi purificada somente em coluna (CD4) no dia 0 da expansão, e a população que foi purificada em coluna (CD4) no dia 0 e purificada novamente no dia 21 da expansão por *cell sorting*.

Ao comparar a capacidade de supressão das Tregs expandidas purificadas por *cell sorting* e as Tregs do mesmo indivíduo não purificadas por *cell sorting*, não encontramos diferença significativa na porcentagem de supressão nas diferentes proporções Treg:PBMC (figura 22). Sendo assim, não é possível apontar que a purificação por *cell sorting* no dia 21 da expansão seja um fator indispensável, pois nossas células não-purificadas se mostraram tão eficazes em sua atividade quanto as purificadas.

Figura 22 Porcentagem de supressão do co-cultivo de indivíduos saudáveis em diferentes proporções Treg:PBMC. C: células separadas somente por coluna no início da expansão. S: células submetidas ao processo de purificação por *cell sorting* no dia 21 da expansão. (n=4).

Ao comparar as técnicas de separação celular (separação por *beads* magnéticas e por *cell sorting*), compreendemos suas vantagens e desvantagens. A separação em coluna é geralmente mais barata e mais rápida, mas, em contrapartida, a separação por *cell sorting* é ideal para separação de populações raras e resulta em uma pureza muito maior (152). Portanto, entendemos que há um problema quando purificamos as células somente em coluna e as colocamos em cultura de expansão, assim como já discutido anteriormente, no item 5.3. Sabe-se que a separação por *cell sorting* pode mostrar desvantagens quanto à viabilidade celular, que seria afetada pela

pressão hidrodinâmica aplicada no FACS (153) e tais consequências dependem das condições celulares, como fragilidade da membrana e o status de ativação das células (células pré-ativadas são mais propensas aos impactos nocivos desta técnica). Todas essas questões devem ser levadas em consideração, mas, de toda forma, esses danos são mínimos na maioria dos casos (154).

Ainda nos referindo à figura acima, apesar de não haver diferença significativa ao comparar as colunas da figura 22 entre si (em suas diferentes proporções), é visível a diminuição da capacidade de supressão dessas células expandidas - separadas ou não - quando diluímos, cada vez mais, nossas Tregs no co-cultivo; resultado esperado, pois, quanto menos Tregs na cultura, menor a capacidade supressora, assim como demonstrado em nossos pacientes, na figura 19.

5.7 Avaliação da função supressora de Tregs de pacientes pela inibição da secreção de IFN- γ

Ao realizar o imunoensaio enzimático (ELISA) para IFN- γ , observamos uma diferença significativa entre as condições estimulada (PBMCs na ausência de Tregs estimuladas com anti-CD3/anti-CD28) e as proporções Treg:PBMC 1:1 e 1:2 (figura 23). Realizamos o ensaio com nove pacientes (PB e MB), número de indivíduos suficiente para avaliação da citocina em comparação com a proliferação dos ensaios de supressão.

Figura 23 Secreção de IFN- γ em sobrenadante de co-cultivo de supressão de pacientes (n=9).

O resultado complementa os achados de porcentagens de proliferação dos pacientes, expressadas na figura 14, onde nossas condições estimuladas tiveram altos índices de proliferação e, ao adicionar as Tregs (proporções 1:1, 1:2 e 1:5), a proliferação dos grupos PB, MB, R1 (excessão da proporção 1:5) e R2 diminuem de forma significativa. Sabe-se que culturas com altos níveis de IFN- γ tem sua produção da citocina inibida após adição de Tregs ($CD4^+CD25^{high}$) de um modo dose-dependente. (155) Alguns estudos sugerem que a oferta da molécula de co-estimulação (CD28) em cultura permite que as células efectoras escapem do bloqueio dessa via (CD80/86-CTLA-4) pelas Tregs, porém estas células continuam susceptíveis a supressão da produção de IFN- γ (156).

5.8 Avaliação da secreção de IFN- γ e IL-10 na cultura de expansão de Tregs de indivíduos saudáveis

Realizamos ELISA no sobrenadante das culturas de expansão dos indivíduos saudáveis, a fim de complementar os achados da caracterização fenotípica das células com a secreção de citocinas da população celular expandida. O sobrenadante coletado na terceira semana de expansão (dia 21) foi submetido então ao protocolo de dosagem de citocinas para compreensão do padrão de secreção de IFN- γ (figura 24) e IL-10 (dados não mostrados).

Figura 24 Secreção de IFN- γ na terceira semana de expansão de Tregs (dia 21), expressado em picogramas/mL (n=6).

Não encontramos uma alta expressão de IFN- γ por essas células expandidas no sobrenadante coletado. Células T *naive* começam a secretar IFN- γ 6-12 horas após a estimulação, com pico após 36 horas (156). O sobrenadante dessas culturas foi coletado após 168 horas (sete dias) do estímulo com anti-CD3/anti-CD28, portanto é possível que os níveis da citocina já não estivessem em produção ótima.

Ao analisar IL-10 no sobrenadante das culturas de expansão, não encontramos, em nenhum indivíduo saudável, valores acima da faixa mínima de detecção do nosso kit (dados não mostrados). A ausência de IL-10 nessas culturas reforça a hipótese de que não há células Tr1 em nossa cultura de expansão, uma vez que, como citado anteriormente, uma das características dessa população celular é a alta secreção de IL-10 (127, 128, 129).

6. Comentários finais

Ao separar PBMCs com *beads* magnéticas em uma população de células TCD4⁺ e cultivá-las por 21 dias com anti-CD3/anti-CD28, IL-2 e rapamicina, obtivemos uma população com intensa atividade supressora, assim como já descrito em literatura (113), além do aumento significativo no número absoluto de células ao fim da cultura de expansão. Apesar de não purificarmos essa cultura de expansão em uma população de células TCD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}FoxP3⁺, e sim a enriquecermos somente, ao realizar ensaios de *cell sorting* com as Tregs expandidas de indivíduos saudáveis, não verificamos diferenças entre a capacidade funcional de células separadas em coluna somente e expandidas, e as que haviam sido submetidas inicialmente a separação por coluna, expandidas e, posteriormente, separadas por *cell sorting*.

Estes resultados, onde conseguimos apenas um enriquecimento de células TCD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}FoxP3⁺ em nossas culturas de expansão, nos encaminham a discussões sobre as limitações em nosso protocolo, pois outros trabalhos já demonstraram enriquecimento maior após realizar o protocolo de expansão (115, 116). É possível que essas limitações se dêem por aspectos específicos do protocolo, como a adição de rapamicina, por exemplo. Apesar das Tregs apresentarem níveis menores de mTor em comparação com as T convencionais, estes podem ser suficientes, ao serem inibidos pela rapamicina, retardando a expansão das células (121). Porém, apesar das diversas controvérsias sobre a utilização deste fármaco para expansão de Tregs, muitos estudos vêm estabelecendo que a rapamicina permita a expansão de Tregs funcionais, com alta frequência de células FoxP3⁺ (119, 120, 122, 160, 161, 162). Nestes trabalhos foi utilizada uma concentração de rapamicina diferente da utilizada em nosso protocolo (50 nM), e isso pode ser um detalhe a ser investigado em futuros experimentos. Outro ponto importante, que deve ser levado em consideração, é a quantidade de IL-2 adicionada às culturas de expansão. Earle, Tang e Zhou (157) e Singh e colaboradores (158) mostraram que a expansão de Tregs requer altas doses de IL-2 (2000U/mL). Além disso, Tang e colaboradores (159) não observaram expansão de Tregs em concentrações de IL-2 abaixo de 200U/mL. Alguns

trabalhos utilizam entre 300 e 500u/mL. Utilizamos nas expansões 250U/mL de IL-2, quantidade previamente titulada e, apesar de ter promovido a expansão dessas células, é possível que esta concentração não tenha sido ótima. Isso nos encaminha, também, a futuros experimentos para pesquisa destas concentrações, para otimização do protocolo.

Ao analisar o co-cultivo de supressão dos pacientes, verificamos diferenças entre as porcentagens de supressão dos grupos estudados. Pacientes MB apresentaram uma capacidade supressora aumentada, quando comparados com pacientes PB nas proporções 1:2 e 1:5 (1:10 e 1:25, quando consideramos a média de aproximadamente 20% de Tregs em nosso *pool* de células expandidas), e pacientes do grupo R2 também apresentaram maior capacidade supressora, quando comparados com pacientes R1, na proporção 1:5. Em ambos os casos, os resultados corroboram a imunopatogênese das diferentes formas clínicas, onde pacientes do polo virchowiano, com ou sem reação, tem um perfil predominantemente regulador, quando comparados com pacientes do polo tuberculóide (148, 149). É possível, então, dizer que essas diferenças estejam ligadas diretamente à forma clínica desses pacientes, uma vez que não houve correlação entre a quantidade de Tregs expandidas por grupo e sua capacidade supressora nas proporções Treg:PBMC 1:2 e 1:5. Já na proporção 1:1, é provável que haja correlação entre estes dados, pois é uma condição artificial, distante do que veríamos em condição fisiológica, *in vivo*, visto que as Tregs correspondem a 5-10% das TCD4 totais (1:10 a 1:20).

Como ao expandir nossas culturas de células TCD4⁺, obtivemos somente um enriquecimento de células TCD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}FoxP3⁺, e até 80% da população não estava caracterizada (“não-Tregs”), tornou-se importante realizar a fenotipagem dessas células, para compreensão do *pool* obtido ao final da expansão. Além disso, surgiu a necessidade de saber se essas não-Tregs estariam de alguma forma, interferindo em nossos resultados, como por exemplo, se houvesse expansão paralela de células Tr1, dentre outras populações. Ao caracterizar fenotipicamente o *pool* de células expandidas de indivíduos saudáveis, não encontramos quantidades significativas de células exaustas (ausência de expressão de PD-1), assim como não houve expansão de células Tr1 (FoxP3⁻LAG3⁺) junto às células TCD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}FoxP3⁺. Em contra partida, encontramos uma

população não esperada, de células $CD4^+CD25^+FoxP3^-CD39^+$. Nos estudos encontrados na literatura, é clara a diferença entre as populações $CD39^+$ e $CD39^-$. Em suma, células $CD4^+CD25^+FoxP3^+CD39^+$ correspondem a uma subpopulação supressora, sendo caracterizadas como Tregs, enquanto células $CD4^+CD25^-FoxP3^-CD39^+$ correspondem a uma subpopulação de células T efetoras, não supressoras (145, 163, 164). Não encontramos na literatura nenhum dado que mostre a expressão da molécula CD39 em uma população $CD4^+CD25^+FoxP3^-$, a não ser quando colocadas em situação de vigorosos estímulos (146), como acontece em nosso protocolo. Muitos estudos descrevem a heterogeneidade nas subpopulações celulares que expressam o marcador CD39. Um exemplo são as células senescentes que possuem maior porcentagem de CD39 em sua superfície, que está diretamente ligado a susceptibilidade das células a apoptose (165), além das citadas anteriormente, com função supressora ($CD4^+CD25^+FoxP3^+CD39^+$) ou efetora ($CD4^+CD25^-FoxP3^-CD39^+$).

Como complemento à fenotipagem das Tregs expandidas de indivíduos saudáveis, não detectamos níveis significativos de IL-10 no sobrenadante da cultura de expansão dessas células, o que reforça a hipótese de não haver expansão concomitante de células Tr1 em nossas culturas. Também não encontramos altos níveis de IFN- γ nos sobrenadantes, fato que pode ser atribuído às células não estarem em seu pico ótimo de produção de citocina (~36h), uma vez que haviam sido estimuladas há 168 horas.

Apesar de diversos trabalhos utilizarem somente a análise da proliferação para apontar resultados relacionados à atividade de Tregs, sabe-se que um dos mecanismos de supressão desta população é a diminuição da secreção de citocinas pró-inflamatórias no microambiente, como TNF- α e IFN- γ (166). Portanto, avaliamos a dosagem de IFN- γ no sobrenadante de co-cultivo de supressão de um subgrupo de pacientes, e encontramos resultados concordantes com a proliferação destes indivíduos. Ao adicionar as Tregs expandidas ao co-cultivo, há uma diminuição significativa da quantidade de IFN- γ , quando comparada com a situação estimulada, onde temos PBMCs na ausência de Tregs expandidas. Além disso, houve também uma curva dose-resposta da inibição.

6.1 Perspectivas

Como o propósito da utilização destas células expandidas seria a supressão da resposta específica de PBMCs, iniciamos, em paralelo, experimentos utilizando como estímulo antígenos provindos de lisado de citomegalovírus (CMV) e de frações de parede celular de *M. leprae* (MLCwA). Utilizamos o antígeno de CMV como controle da resposta antígeno específica, uma vez que este é um antígeno ubiquitário, e padronizado em nosso laboratório na rotina para acessar a competência imunológica dos indivíduos que, em geral, respondem fortemente a esse estímulo. Porém, ao analisar os resultados dos co-cultivos estimulados com ambos os antígenos, verificamos uma ausência de supressão inesperada nos ensaios. Na presença de Tregs expandidas, ao invés de observarmos a supressão da proliferação das PBMCs, encontramos aumento da resposta proliferativa destas células, em alguns casos.

Podemos sugerir que as Tregs expandidas não suprimiram a resposta linfoproliferativa nos ensaios estimulados com CMV e MLCwA, possivelmente porque não foram suficientemente ativadas nesses co-cultivos, como aconteceu nos co-cultivos com anti-CD3/anti-CD28. Apesar de acreditarmos que o desenvolvimento de um protocolo específico aumente a eficácia da resposta, assim como Tang e colaboradores apresentam em seus resultados em modelos *in vivo* (159), é preciso apontar que muitos modelos *in vitro* mostram que Tregs policlonais são eficientes no bloqueio da autoimunidade (167, 168, 169, 170, 171), o que indica que a habilidade de supressão gerada *in vitro* tem sido altamente preditiva sobre sua eficácia *in vivo*, e presume-se que seja uma resposta não-específica. Porém, são necessários alguns ajustes no protocolo dos ensaios com antígeno-específico para melhor compreensão dos resultados.

7. Referências Bibliográficas

1. Bullock WE. *Micobacterium leprae* (leprosy). 3th ed. New York: Churchill Livingstone Inc.; 1990. In: Mandell GL., Douglas RG. Jr, Bennett JE., eds. Principles and practice of infectious disease; 1906-1914.
2. Paho WHO. Washington DC: Pan American Health Organization. Leprosy; Disponível em: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=30&Itemid=40755&lang=en. Acesso em 6 de abril de 2018.
3. Secretaria de Vigilância em Saúde (Ministério da Saúde). Boletim Epidemiológico - Brasil. [Acesso em 8 de abril de 2018]. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/31/2018-004-Hanseniose-publicacao.pdf>.
4. Suzuki K., Akama T., Kawashima A., Yoshihara A., Yotsu R., Ishii N. Current status of leprosy: Epidemiology, basic science and clinical perspectives. *Journal of Dermatology* 2012; **39**:121–129.
5. Briton W.J., Lockwood D.N.J. Leprosy. *The Lancet* 2004, **363**, 1209-1219.
6. Cole S.T., Eiglemer K., Parkhill J., James K.D., Thomson N.R., Wheeler P.R., Honoré N., et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*, 2001; **409 (6823)**:1007-11.
7. Sheppard C.C. The experimental disease that follows the injection of the human leprosy bacilli into the footpads of mice. *J. Exp. Med.*, 1960; **112**: 445-51.
8. Kirchheimer W.F., Storrs E.E. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus*) as a model for the study of leprosy: I, report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. *Int. J. Lepr.*, 1971; **39**: 693-701.
9. Cho S-N., Yanagihara D.L., Hunter S.W., Gelber P.H., Brennan P.J. Serological specificity of phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. *Infect Immun.*, 1983; **41**: 1077-83.
10. Roche PW., Britton WJ., Neupane KD., Failbus SS., Cho S-N., Theuvenet WJ. The response to chemotherapy of serum *Mycobacterium leprae*-specific antigen in multibacillary leprosy patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1991; **44**: 702-08.

11. Cho SN., Cellona RV., Villahermosa LG., et al. Detection of phenolic glycolipid I of *Mycobacterium leprae* in sera from leprosy patients before and after start of multidrug therapy. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2001; **8**: 138-42.
12. Torreles JB., Khoo KH., Sieling PA. et al. Truncated structural variants of lipoarabinomannan in *Mycobacterium leprae* and an ethambutol-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.*, 2004; **279**: 41227-39.
13. Ngamyang M., Sawanpanyalert P., Butraporn R. et al. Effect of vaccination with refined components of the organism on infection of mice with *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun.*, 2003; **71**:1596-98.
14. Souza C.S. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. Medicina, Ribeirão Preto, Simpósio: HANSENÍASE. **30(3)**: 325-334, Capítulo I; 1997.
15. Parkash O. Classification of leprosy into multibacillary and paucibacillary groups: an analysis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2009;**55**:1-5.
16. Basombrio B., Cochrane R.G., Prieto J.G., Khanolkar V.R., Kitamura K., Latapi F., Rabello F.E.A., Vegas M., Wade H.W., Arnold H. Comision of classification – Draft Report of Classification Committee. *Memoria de VI Congreso Internacional de Leprologia. Madrid : Gobierno de España y Asociacion Internacional de la Lepra* 1953; 75-86.
17. WHO Expert Committee on Leprosy. [Não há autores listados]. *World Health Organ Tech Rep Ser.*, 1988; **768**:1-51.
18. Ridley D.S., Jopling W.H. Classification of leprosy according to immunity: a five group system. *Int. J. Lepr.*, 1996; **34**:255-73.
19. Jopling W.H. Leprosy stigma. *Lepr Rev.* 1991; **62**:1-12.
20. Opromolla D.V.A. Noções de hansenologia. *Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato*, Bauru, 2000.
21. Nery J.A.C., Sales A.M., Illarramendi X., Duppre N.C., Jardim M.R., Machado A.M. Contribuição ao diagnóstico e manejo dos estados reacionais: Uma abordagem prática. *An. Bras. Dermatol.* 2006; **81(4)**: 367-375.
22. Kawahita I.P. Leprosy type 1 reactions and erythema nodosum leprosum. *An. Bras. Dermatol.* 2008; **83(1)**:75-82

23. Britton W.J. *The management of leprosy reversal reactions. Lepr Rev.* 1998; **69(3)**:225-34.
24. Croft R.P., Nicholls P.G., Richardus J.H., Smith W.C. Incidence rates of acute nerve function impairment in leprosy: a prospective cohort analysis after 24 months (The Bangladesh Acute Nerve Damage Study). *Lepr Rev.* 2000; **71(1)**:18-33.
25. Walker S.L., Lockwood D.N. Leprosy type 1 (reversal) reactions and their management. *Leprosy review.* 2008; **79(4)**:372-86.
26. Andrade A. R. G., Lehman L. F., Schreuder P. A. M., Fuzikawa P. L. Como Reconhecer e tratar reações hansênicas. Belo Horizonte: Secretaria do Estado de Minas Gerais; 2005. Disponível em: http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/hanseniose/public/Reacoes_hansenicas.pdf.
27. Chaitanya VS., Lavania M., Nigam A., Turankar RP., Singh I., Horo I., Sengupta U., Jadhav RS. Cortisol and proinflammatory cytokine profiles in type 1 (reversal) reactions of leprosy. *Immuno Lett.*, 2013; **156(1-2)**: 159-67.
28. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science.* 1999; **285**:732-6.
29. Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE, et al. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat Med.* 2005; **11**:653-60.
30. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, et al. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10 producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; **101**:4560-5.
31. Demangel C, Britton WJ. Interaction of dendritic cells with mycobacteria: where the action starts. *Immunol Cell Biol.* 2000; **78**:318-24.
32. Azevedo M.C.S., Marques H., Binelli L.S., Malange M.S.V., Devides A.C., Silva E.A., Fachin L.R.V. et al. Simultaneous analysis of multiple T helper subsets in leprosy reveals distinct patterns of Th1, Th2, Th17 and Tregs markers expression in clinical forms and reactional events. *Med Microbiol Immunol.*, 2017; **206(6)**: 429-39.

33. Modlin R.L., Bloom B.R. Immune regulation: learning from leprosy. *Journal Hospital Practice*, 1993; **(28)**:71-84.
34. Mendonça V.A., Costa R.D., Brito-Melo G.E., Antunes C.M., Teixeira A.L. Immunology of leprosy. *An Bras Dermatol*. 2008; **83**:343-50
35. Ottenhoff T.H. Immunology of Leprosy: lessons from and for leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1994; **62(1)**:108-21.
36. Scollard D.M. Inside the skin: the local immune and inflammatory milieu in leprosy. *Am J Trop Med Hyg*. 1991; **44(4 Pt 2)**:17-23.
37. Yamamura M., Uyemura K., Deans R.J., Weinberg K., Rea T.H., Bloom B.R., Modlin R.L. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science*, 1991; **254**:277-279.
38. Sieling P.A., Modlin R.L. T cell and cytokine patterns in leprosy skin lesions. *Springer Semin Immunopathol*, 1992; **13(3-4)**:413-26.
39. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*. 1999; **285**:732-6.
40. Libraty DH, Airan LE, Uyemura K, Jullien D, Spellberg B, Rea TH, et al. Interferon-gamma differentially regulates interleukin-12 and interleukin-10 production in leprosy. *J Clin Invest*. 1997; **99**:336-41.
41. Foss N.T., Souza C.S., Goulart I.M.B., Gonçalves H.S., Virmond M. Hanseníase: Episódios reacionais. *Projeto Diretrizes*, Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, 2003.
42. Bettelli E., Oukka M., Kuchroo V.K. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol*, 2007; **8**: 345–350.
43. Bettelli E., Carrier Y., Gao W., Korn T., Strom T.B., et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 2006; **441**: 235–238.
44. Saini C. , Ramesh V. , Nath I. CD4+ Th17 cells discriminate clinical types and constitute a third subset of non Th1, non Th2 T cells in human leprosy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; **7(7)**: e2338.
45. Curtis M.M., Way S.S. Interleukin-17 in host defense against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology*, 2009; **126**: 177–185.

46. 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*. 2016; **10**(4): 4592.
47. Santos M.B., Oliveira D.T., Cazzaniga R.A., Varjão C.S., et al. Distinct Roles of Th17 and Th1 cells in inflammatory responses associated with presentation of paucibacillary leprosy and leprosy reactions. *Scand J Immunol*, 2017; **86**(1): 40-49.
48. Madigan C.A., Cambier C.J., Scumpia K.M.K., Sagasti A., Modlin R. L., Ramakrishnan L. A macrophage response to *Mycobacterium leprae* phenol glycolipid initiates nerve damage in leprosy. *Cell*, 2017; **170**: 973-85.
49. Quaresma J.A.S., Almeida F.A., Aarao T.L.S., Soares L.P.M.A., Magno I.M.N., Fuzii H.T., Libonati R.M.F., Xavier M.B., Pagliari C., Duarte M.I.S. Transforming growth factor β and apoptosis in leprosy skin lesions: possible relationship with the control of the tissue immune response in the *Mycobacterium leprae* infection. *Microbes Infect*. 2012; **14**:696–701.
50. Sousa J.R., Sousa R.P., Aarão T.L., Dias L.B.Jr., Carneiro F.R., Fuzii H.T., Quaresma J.A. In situ expression of M2 macrophage subpopulation in leprosy skin lesions. *Acta Trop*. 2016; **157**:108-14.
51. Moura D.F., Mattos K.A., Amadeu T.P., Andrade P.R., Sales J.S., Schmitz V., Nery J.A., Pinheiro R.O., Sarno E.N. CD163 favors *Mycobacterium leprae* survival and persistence by promoting anti-inflammatory pathways in lepromatous macrophages. *Eur J Immunol*. 2012; **42**:2925–36.
52. Chistiakov D.A., Bobryshev Y.V., Orekhov A.N. Changes in transcriptome of macrophages in atherosclerosis. *J Cell Mol Med*. 2015; **19**:1163–73.
53. Butcher M.J., Galkina E.V. Phenotypic and functional heterogeneity of macrophages and dendritic cell subsets in the healthy and atherosclerosis-prone aorta. *Front Physiol*. 2012; **3**:44.
54. Paoli F., Staels B., Chinetti-Gbaguidi G. Macrophage phenotypes and their modulation in atherosclerosis. *Circ J*. 2014; **78**:1775–81.
55. Iyer A.M., Mohanty K.K., Van Egmond D., et al. Leprosy-specific B-cells within cellular infiltrates in active leprosy lesions. *Hum Pathol*. 2007; **38**: 1065–1073.

56. Fachin L.R., Soares C.T., Belone A.F., et al. Immunohistochemical assessment of cell populations in leprosy-spectrum lesions and reactional forms. *Histol Histopathol.* 2016; **32**:385–396.
57. Negera E., Walker S.L., Bekele Y., et al. Increased activated memory B-cells in the peripheral blood of patients with erythema nodosum leprosum reactions. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017; **11**: 6121.
58. Kozakiewicz L., Phuah J., Flynn J., et al. The role of B cells and humoral immunity in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Adv Exp Med Biol.* 2013; **783**:225–250.
59. Maglione P.J., Chan J. How B cells shape the immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol.* 2009; **39**:676–686.
60. Chaurasiya S.K. Tuberculosis: smart manipulation of a lethal host. *Microbiol Immunol.* 2018; **62**:361–379.
61. Tarique M., Naz H., Kurra S.V., Saini C., Naqvi R.A., Rai R., Suhail M., Khanna N., Rao D.N., Sharma A. Interleukin-10 producing regulatory B cells transformed CD4+CD25- into Tregs and enhanced regulatory T cells function in human leprosy. *Frontiers in Immunology* 2018; **9**:1636.
62. Lu Y., Liu F., Li C., Chen Y., Weng D., Chen J. IL-10-producing B cells suppress effector T cells activation and promote regulatory T cells in crystalline silica-induced inflammatory response in vitro. *Mediators Inflamm*, 2017:8415094.
63. Boisson-Dupuis S., Bustamante J., El-Baghdadi J. et al. Inherited and acquired immunodeficiencies underlying tuberculosis in childhood. *Immunol Rev*, 2015; **264**:103–120.
64. Casanova J-L. Severe infectious diseases of childhood as monogenic inborn errors of immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015; **112**:E7128–E7137.
65. Sauer M.E.D., Salomão H., Ramos G.B. et al. Genetics of leprosy: expected and unexpected developments and perspectives. *Clin Dermatol*, 2015; **33**:99–107.
66. Fava V.M., Schurr E. The Complexity of the Host Genetic Contribution to the Human Response to *Mycobacterium leprae*. In: Scollard D., Gillis T. (ed.) *International Textbook of Leprosy*, 2016. Disponível em: <http://www.internationaltextbookofleprosy.org>. pp 1–33.

67. Siddiqui M.R., Meisner S., Tosh K. et al. A major susceptibility locus for leprosy in India maps to chromosome 10p13. *Nat Genet*, 2001; **27**:439–441.
68. Mira M.T., Alcaïs A., Van Thuc N. et al. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. *Nat Genet*, 2003; **33**:412–415.
69. Alter A., De Léséleuc L., Van Thuc N. et al. Genetic and functional analysis of common MRC1 exon 7 polymorphisms in leprosy susceptibility. *Hum Genet*, 2010; **127**:337–348.
70. Grant A.V., Cobat A., Van Thuc N. et al. CUBN and NEBL common variants in the chromosome 10p13 linkage region are associated with multibacillary leprosy in Vietnam. *Hum Genet*, 2014; **133**:883–893.
71. Medeiros P., Silva W.L., Oliveira Gimenez B.B. et al. The GATA3 gene is involved in leprosy susceptibility in Brazilian patients. *Infect Genet Evol*, 2016; **39**:194–200.
72. Domingues E.M. Epidemiological information on leprosy in the Singu area of upper Burma. *Bull World Health Organ* 1980; **58**:51-90.
73. Noordeen S.K. The Epidemiology of Leprosy in: Hastings SRC (ed). *Leprosy*. 1^a ed. New York: Churchill Livingstone 1985; 15-30.
74. Job C.K. Nasal mucosa and abraded skin are the two routes of entry of *Mycobacterium leprae*. *Star*. 1990; **49**:1.
75. Bona S.H., Fonseca A.P.M., Silva A.C.L., Costa R.J. Bacilos álcool-ácido resistentes no *Culex fatigans*. *An Bras Dermatol*. 1985; **60**:163-70.
76. Santos A.R., Balassiano V., Oliveira M.L.W., Pereira M.A.S., Santos P.B., Degraive W.M., Suffys P.N. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase chain reaction in the blood of individuals, eight years after completion of anti-leprosy therapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001; **96**(8):1129-33.
77. Pedley J.C. The presence of *M. leprae* in human milk. *Lepr Rev*. 1967; **38**(4):239-42.
78. Pinheiro R.O., Salles J.S., Sarno E.N., Sampaio E.P. *Mycobacterium leprae* – host-cell interactions and genetic determinants in leprosy: an overview. *Future Microbiol* 2011; **6**:217–230.

79. World Health Organisation. WHO Expert Committee on Leprosy, 8th Report. World Health Organisation 2012, Geneva.
80. Ministério da Saúde. Portaria nº 3.125, de 7 de outubro de 2010. [Acesso em 11 fevereiro de 2019]. Disponível em: http://www.morhan.org.br/views/upload/portaria_n_3125_hanseniose_2010.pdf.
81. Toraño J.S., Verbon A., Guchelar H.J. Quantitative determination of thalidomide in human serum with high-performance liquid chromatography using protein precipitation with trichloroacetic acid ultraviolet detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999; **734**:203-10.
82. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995; **155**(3):1151-64.
83. Vahlenkamp T.W., Tompkins M.B., Tompkins W.A. The role of CD4+CD25+ regulatory T cells in viral infections. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005; **108**(1-2):219-25.
84. Hori S., Nomura T., Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003; **299**(5609):1057-61.
85. Seddiki N., Santner-Nanan B., Martinson J., Zaunders J., Sasson S., Landay A., Solomon M., Selby W., Alexander S.I., Nanan R., Kelleher A., Fazekas de St Groth B. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med.* 2006; **203**(7):1693-700.
86. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Pillars Article: Foxp3 Programs the Development and Function of CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *Nat. Immunol.* 2003; **4**: 330-336. *J Immunol.* 2017; **198**(3):986-992.
87. Almeida A.R., Legrand N., Papiernik M., Freitas A.A. Homeostasis of peripheral CD4+ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4⁺ T cell numbers. *J Immunol.* 2002; **169**(9):4850-60.
88. Suzuki H., Zhou Y.W., Kato M., Mak T.W., Nakashima I. Normal regulatory alpha/beta T cells effectively eliminate abnormally activated T cells lacking the interleukin 2 receptor beta in vivo. *J Exp Med.* 1999; **190**(11):1561-72.

89. Liu W., Putnam A.L., Xu-Yu Z., Szot G.L., Lee M.R., Zhu S., Gottlieb P.A., Kapranov P., Gingeras T.R., Fazekas de St Groth B., Clayberger C., Soper D.M., Ziegler S.F., Bluestone J.A. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med.* 2006; **203(7)**:1701-11.
90. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 7th Ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011.
91. Collison L.W., Workman C.J., Kuo T.T., Boyd K., Wang Y., Vignali K.M., Cross R., Sehy D., Blumberg R.S., Vignali D.A. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature.* 2007; **450(7169)**:566-9.
92. Bopp T., Becker C., Klein M., Klein-Hessling S., Palmetshofer A., Serfling E., Heib V., Becker M., Kubach J., Schmitt S., Stoll S., Schild H., Staeger M.S., Stassen M., Jonuleit H., Schmitt E. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med.* 2007; **204(6)**:1303-10.
93. Deaglio S., Dwyer K.M., Gao W., Friedman D., Usheva A., Erat A., Chen J.F., Enjyoji K., Linden J., Oukka M., Kuchroo V.K., Strom T.B., Robson S.C. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med.* 2007; **204(6)**:1257-65.
94. Paust S., Lu L., McCarty N., Cantor H. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; **101(28)**:10398-403.
95. Kessler P.A.. Potential role of regulatory T cells in mother-to-child transmission of HIV. *Curr HIV Res.* 2019; **16**: 396-403.
96. Bunn P.T., Montes de Oca M., de Labastida Rivera F., Kumar R. et al. Distinct roles for CD4⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells and IL-10-mediated immunoregulatory mechanisms during experimental visceral leishmaniasis caused by *Leishmania donovani*. *J Immunol.*, 2018; **201(11)**: 3362-72.
97. Franzese O., Kennedy P.T., Gehring A.J. Modulation of the CD8⁺ T cell response by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with hepatitis B virus infection. *J Virol.*, 2005; **79(6)**: 3322-8.

98. Stoop J.N., Molen R.G., Baan C.C. Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*, 2005; **41(4)**: 771-8.
99. Giadans C.G., Rios D.A., Ameigeiras B., Pietrantonio M. et al. Chronic hepatitis B: The interplay between intrahepatic lymphocyte population and viral antigens in relation to liver damage. *J Viral Hepat.*, 2019; 1-11.
100. Cools N., Ponsaerts P., Van Tendeloo V.F., Berneman Z.N. Regulatory T cells and human disease. *Clin Dev Immunol.* 2007; **2007**:89195.
101. Marin N.D., Paris S.C., Velez V.M., Rojas C.A., Rojas M., Garcia L.F. Regulatory T cell frequency and modulation of IFN-gama and IL-17 in active and latent tuberculosis. *Tuberculosis*, 2010; **90(4)**: 252-61.
102. Pang H. Frequency of regulatory T-cells in the peripheral blood of patients with pulmonary tuberculosis from Shanxi Province, China. *PLoS One*, 2013; **8(6)**: 65496.
103. Guyot-Revol V., Innes J.A., Hackforth S., Hinks T., Lalvani A. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.*, 2006; **173(7)**: 803-10.
104. Chen X. CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells suppress *Mycobacterium tuberculosis* immunity in patients with active disease. *Clin Immunol*, 2007; **123(1)**: 50-9.
105. He X.Y. T regulatory cells and Th1/Th2 cytokines in peripheral blood from tuberculosis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2010; **29(6)**: 643-50.
106. Kusar M. Cutting edge: regulatory T cells prevent efficient clearance of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*, 2007; **178(5)**: 2661-5.
107. Mason C.M., Porretta E., Zhang P., Nelson S. Cd4+CD25+ transforming growth factor-beta-producing T cells are present in the lung in murine tuberculosis and may regulate the host inflammatory response. *Clin Exp Immunol*, 2007; **148(3)**: 537-45.
108. Scott-Browne J.P. Expansion and function of FoxP3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. *J Exp Med*, 2007; **204(9)**: 2159-69.
109. Shafiani S., Tucker-Heard G., Kariyone A., Takatsu K., Urdahl K.B. Pathogen-specific regulatory T cells delay the arrival of effector T cells in the lung during early tuberculosis. *J Exp Med*, 2010; **207(7)**: 1409-20.

110. 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.* 2012; **86(5)**:878-83.
111. 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.* 2014; **8(1)**:e2639.
112. 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.* 2016; **94(4)**: 721-7.
113. Battaglia M., Stabilini A., Tresoldi E. Expanding human T regulatory cells with the mTOR-inhibitor rapamycin. *Methods Mol Biol.* 2012; **821**:279-93.
114. Vieira A.P. Atuação de células T reguladoras em episódios reacionais na hanseníase [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.
115. Tresoldi E., Dell'Albani I., Stabilini A., Jofra T., Valle A., Gagliani N., Bondanza A., Roncarolo M.G., Battaglia M. Stability of human rapamycin-expanded CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Haematologica.* 2011; **96(9)**:1357-65.
116. Tran D.Q., Andersson J., Hardwick D., Bebris L., Illei G.G., Shevach E.M. Selective expression of latency-associated peptide (LAP) and IL-1 receptor type I/II (CD121a/CD121b) on activated human FOXP3⁺ regulatory T cells allows for their purification from expansion cultures. *Blood.* 2009; **113(21)**:5125-33.
117. Blaha P., Bigenzahn S., Koporc Z., Schmid M., Langer F., Selzer E., Bergmeister H., Wrba F., Kurtz J., Kiss C., Roth E., Muehlbacher F., Sykes M., Wekerle T. The influence of immunosuppressive drugs on tolerance induction through bone marrow transplantation with costimulatory blockade. *Blood.* 2003; **101(7)**:2886-93.
118. Wiederrecht G.J., Sabers C.J., Brunn G.J., Martin M.M., Dumont F.J., Abraham R.T. Mechanism of action of rapamycin: new insights into the regulation of G1-phase progression in eukaryotic cells. *Prog Cell Cycle Res.* 1995; **1**:53-71.

119. Strauss L., Whiteside T.L., Knights A., Bergmann C., Knuth A., Zippelius A. Selective survival of naturally occurring human CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells cultured with rapamycin. *J Immunol.* 2007; **178**(1):320-9.
120. Basu S., Golovina T., Mikheeva T., June C.H., Riley J.L. Cutting edge: Foxp3-mediated induction of pim 2 allows human T regulatory cells to preferentially expand in rapamycin. *J Immunol.* 2008; **180**(9):5794-8.
121. Crellin N.K., Garcia R.V., Levings M.K. Altered activation of AKT is required for the suppressive function of human CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Blood.* 2007; **109**(5):2014-22.
122. Battaglia M., Stabilini A., Roncarolo M.G. Rapamycin selectively expands CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells. *Blood.* 2005; **105**(12):4743-8.
123. Mayer E., Bannert C., Gruber S., Klunker S., Spittler A., Akdis C.A., Szépfalusi Z., Eiwegger T. Cord blood derived CD4⁺CD25^(high) T cells become functional regulatory T cells upon antigen encounter. *PLoS One.* 2012; **7**(1):e29355.
124. Lawson J.M., Tremble J., Dayan C., Beyan H., Leslie R.D., Peakman M., Tree T.I. Increased resistance to CD4⁺CD25^{hi} regulatory T cell-mediated suppression in patients with type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol.* 2008; **154**(3):353-9.
125. Cavassani K.A., Campanelli A.P., Moreira A.P., Vancim J.O., Vitali L.H., Mamede R.C., Martinez R., Silva J.S. Systemic and local characterization of regulatory T cells in a chronic fungal infection in humans. *J Immunol.* 2006; **177**(9):5811-8.
126. Lindley S., Dayan C.M., Bishop A., Roep B.O., Peakman M., Tree T.I. Defective suppressor function in CD4⁺CD25⁺ T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2005; **54**(1):92-9.
127. Gagliani N., Magnani C.F., Huber S., Gianolini M.E., Pala M., Licona-Limon P., et al. Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat Med.*, 2013; **19**:739–46.
128. Okamura T, Fujio K, Sumitomo S, Yamamoto K. Roles of LAG3 and EGR2 in regulatory T cells. *Ann Rheum Dis.*, 2012; **2**:96–100.

129. Huber S., Gagliani N., Esplugues E., O'Connor W. Jr., Huber F.J., Chaudhry A., et al. Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3(-) and Foxp3+ regulatory CD4+ T cells in an interleukin-10-dependent manner. *Immunity*, 2011; **34**:554–65.
130. Roncarolo, M.G., Yssel, H., Touraine, J.L., Betuel, H., De Vries, J.E., and Spits, H. Autoreactive T cell clones specific for class I and class II HLA antigens isolated from a human chimera. *J. Exp. Med.*, 1988; **167**: 1523–1534.
131. Groux H., O'Garra A., Bigler M., Rouleau M., Antonenko S., de Vries J.E., Roncarolo, M.G. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, 1997; **389**: 737–742.
132. Huard B., Prigent P., Tournier M., Bruniquel D., Triebel F. CD4/major histocompatibility complex class II interaction analyzed with CD4- and lymphocyte activation gene-3 (LAG-3)-Ig fusion proteins. *Eur J Immunol.*, 1995; **25**:2718–21.
133. Huard B., Mastrangeli R., Prigent P., Bruniquel D., Donini S., El-Tayar N., et al. Characterization of the major histocompatibility complex class II binding site on LAG-3 protein. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1997; **94**:5744–9.
134. Fitzgerald D.C., Zhang G.X., El-Behi M., Fonseca-Kelly Z., Li H., Yu S., et al. Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells. *Nat Immunol.*, 2007; **8**:1372–9.
135. Keir M.E., Butte M.J., Freeman G.J., Sharpe A.H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.*, 2008; **26**:677–704.
136. Chang W.S., Kim J.Y., Kim Y.J., Kim Y.S., Lee J.M., Azuma M., Yagita H., Kang C.Y. Cutting edge: Programmed death-1/ programmed death ligand 1 interaction regulates the induction and maintenance of invariant NKT cell anergy. *J Immunol.*, 2008; **181**:6707–6710.
137. Agata Y., Kawasaki A., Nishimura H., Ishida Y., Tsubata T., Yagita H., Honjo T. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol.*, 1996; **8**:765–772.

138. Bennett F., Luxenberg D., Ling V., Wang I.M., Marquette K., Lowe D., Khan N., Veldman G., Jacobs K.A., Valge- Archer V.E., Collins M., Carreno B.M. Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses. *J Immunol.* 2003; **170**:711–718.
139. Thibult M.L., Mamessier E., Gertner-Dardenne J., Pastor S., Just-Landi S., Xerri L., Chetaille B., Olive D. PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation. *Int Immunol.* 2013; **25**:129–137.
140. Latchman Y., Wood C.R., Chernova T., Chaudhary D., Borde M., Chernova I., Iwai Y., Long A.J., Brown J.A., Nunes R., Greenfield E.A., Bourque K., Boussiotis V.A., et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol.* 2001; **2**:261–268.
141. Parry R.V., Chemnitz J.M., Frauwirth K.A., Lanfranco A.R., Braunstein I., Kobayashi S.V., Linsley P.S., Thompson C.B., Riley J.L. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol.* 2005; **25**:9543–9553.
142. Dwyer K.M., Deaglio S., Gao W., Friedman D., Strom T.B, Robson S.C. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*, 2007; **204**: 1257.
143. Mandapathil M., Lang S., Gorelik E., Witheside T.L. Isolation of functional human regulatory T cells (Treg) from the peripheral blood based on the CD39 expression. *J Immunol*, 2009; 346-55.
144. Sitkovsky M.V., Kjaergaard J., Lukashev D., Ohta A. Hypoxia-adenosinergic immunosuppression: tumor protection by T regulatory cells and cancerous tissue hypoxia. *Clin Cancer Res*, 2008; **14**: 5947.
145. Schuler P.J., Schilling B., Harasymczuk M., Hoffmann T.K., Johnson J., Lang S., Whiteside T.L. Phenotypic and functional characteristics of CD4+CD39+FoxP3+ and CD4+CD39+FoxP3neg T-cell subsets in cancer patients. *Eur J Immunol*, 2012; **42**: 1876-85.
146. Pulte, E. D., M. J. Broekman, K. E. Olson, J. H. Drosopoulos, J. R. Kizer, N. Islam, and A. J. Marcus. 2007. CD39/NTPDase-1 activity and expression in normal leukocytes. *Thromb. Res.* 121: 309–317.

147. Battaglia M., Stabilini A., Migliavacca B., Horejs-Hoeck J., Kaupper T., Roncarolo M.G. Rapamycin promotes expansion of functional CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J Immunol.* 2006; **177**(12):8338-47.
148. Beiguelman B., Quagliato R. Nature and familial character of the lepromin reactions. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1965; **33**:800-7.
149. Sieling P.A., Wang X.H., Gately M.K., Oliveros J.L., McHugh T., Barnes P.F., et al. IL-12 regulates T helper type 1 cytokine responses in human infectious disease. *J. Immunol.* 1994; **153**:3639-47.
150. Scollard D.M., Williams D.L. Nerve injury in leprosy [Base de dados da Internet]. *UpToDate*. [Acesso em 10 março 2019]. Disponível em: <http://www.uptodate.com>
151. Kang T.J., Chae G.T. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2001; **31**:53-8.
152. Rahmanian N., Bozorgmehr M., Torabi M., Akbari A., Zarnani A-H. Cell separation: potentials and pitfalls. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2016.
153. Elliott, S. Cell Damage due to Hydrodynamic Stress in Fluorescence Activated Cell Sorters. The Ohio State University, 2009.
154. Lugli E., Gattinoni L., Roberto A., Mavilio D., Price D.A., Restifo N.P., Roederer M. Identification, Isolation and in vitro Expansion of Human and Nonhuman Primate T Stem Cell Memory Cells. *Nat. Protoc.* 2013; **8**(1): 33–42.
155. Baecher-Allan C., Brown J.A., Freeman G.J., Hafler D.A. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *The Journal of Immunology*, 2001; **167**: 1245-1253.
156. Sokja D.K., Fowell D.J. Regulatory T cells inhibit acute IFN- γ synthesis without blocking T-helper cell type 1 (Th1) differentiation via a compartmentalized requirement for IL-10. *PNAS*, 2011; **108**(45):18336-18341.
157. Earle K.E., Tang Q., Zhou X. In vitro expanded human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress effector T cell proliferation. *Clinical Immunol*, 2005; **115**(1): 3-9.

158. Singh K., Kozyr N., Stempora L., Kirk A.D., Larsen C.P., Blazar B.R., Kean L.S. Regulatory T cells exhibit decreased proliferation but enhanced suppression after pulsing with sirolimus. *Am. J. Transplant.* 2012; **12(6)**: 1441-1457.
159. Tang Q., Henriksen K.J., Bi M., Finger E.B., Szot G., Ye J., Masteller E.L., McDevitt H., Bonyhadi M., Bluestone J.A. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J. Exp. Med.* 2004; **199(11)**: 1455-65.
160. Golovina T.N., Mikheeva T., Suhoski M.M., Aqui N.A., Tai V.C., Shan X., Liu R., Balcarcel R.R., Fisher N., Levine B.L., Carroll R.G., Warner N., Blazar B.R., June C.H., Riley J.L. CD28 co stimulation is essential for human T regulatory expansion and function. *J Immunol.* 2008; **181(4)**: 2855-68.
161. Keever-Taylor C.A., Browning M.B., Johnson B.D., Truitt R.L., Bredeson C.N., Behn B., Tsao A. Rapamycin enriches for CD4⁺CD25⁺CD27⁺FoxP3⁺ regulatory T cells in ex vivo-expanded CD-25-enriched products from healthy donors and patients with multiple sclerosis. *Cytotherapy.* 2007; **9(2)**: 144-57.
162. Strauss L., Czystowska M., Szajnik M., Mandapathil M., Whiteside T.L. Differential responses of human regulatory T cells (Treg) and effector T cells to rapamycin. *PLoS One.* 2009; **4(6)**: e5994.
163. Dwyer K.M., Hanidziar D., Putheti P, Hill P.A., Pommey S., McRae J,L., Winterhalter A. et al. Expression of CD39 by human peripheral blood CD4⁺CD25⁺ T cells denotes a regulatory memory phenotype. *Am J Transplant*, 2010; **204**: 1257-1265.
164. Moncrieffe H., Nistala K., Kamhieh Y., Evans J., Eddaoudi A., Eaton S., Wedderburn L.R. High expression of the ectonucleotidase CD39 on T cells from the inflamed site identifies two distinct populations, one regulatory and one memory T-cell population. *J Immunol*, 2010; **185**: 134-143.
165. Fang F., Yu M., Cavanagh M.M., Tian L., Weyand C., Goronzy J.J. et al. Expression of CD39 on activated T cells impairs their survival in older individuals. *Cell Reports*, 2016; **14**:1218-31.

166. Allan S.E., Alstad A.N., Merindol N., Crellin N.K., Amendola M., Bacchetta R., Naldini L. et al. Generation of potent and stable human CD4⁺ T regulatory cells by activation-independent expression of FoxP3. *Mol. Ther.* 2008; **16**: 194-202.
167. Salomon B., Lenschow D.J., Rhee L., Ashourian N., Singh B., Sharpe A., Bluestone J.A. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*. 2000; **12**: 431-440.
168. Read S., Malmstrom V., Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25⁺CD4⁺ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 2000; **192(2)**: 295-302.
169. Taylor P.A., Lees C.J., Blazar B.R. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4⁺CD25⁺ immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood*. 2002; **99**: 3493-3499.
170. Hoffmann P., Ermann J., Edinger M., Fathman C.G., Strober S. Donor-type CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J. Exp. Med.* 2002; **196**: 389-399.
171. Edinger M., Hoffmann P., Ermann J., Drago K., Fathman C.G., Strober S., Negrin R.S. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat. Med.* 2003; **9**: 1144-1150.