Ana Paula Vieira

Atuação de células T reguladoras em episódios reacionais na hanseníase

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Patologia

Orientador: Prof. Dr. Gil Benard

São Paulo

2016

Ana Paula Vieira

Atuação de células T reguladoras em episódios reacionais na hanseníase

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Patologia

Orientador: Prof. Dr. Gil Benard

São Paulo

2016

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

©reprodução autorizada pelo autor

Vieira, Ana Paula

Atuação de células T reguladoras em episódios reacionais na hanseníase / Ana Paula Vieira. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Patologia.

Orientador: Gil Bernard

Descritores: 1.Doenças negligenciadas 2.Hanseníase 3.*Mycobacterium leprae*
4.Eritema nodoso 5.Reação reversa 6.Linfócitos T reguladores

USP/FM/DBD-481/16

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

DEDICATÓRIA

Aos meus pais José e Marlene, com todo meu amor e gratidão, por tudo que fizeram por mim ao longo de minha vida. Pelo incentivo e apoio em todas minhas escolhas e decisões.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado forças e iluminando meu caminho para que pudesse concluir mais uma etapa da minha vida.

Ao meu orientador Dr. Gil Benard que dedicou muito do seu tempo me orientando. Obrigada pelos ensinamentos imunológicos, atenção, paciência e ajuda incondicional ao longo deste período. Obrigada por sempre ter acreditado em mim e no meu potencial.

Aos meus pais José e Marlene, meu infinito agradecimento pelo amor incondicional. Vocês são minha fonte de inspiração.

As minhas irmãs amadas Ro, Fabi, Re, Pati e Vinha, pela parceria, carinho e amor. Vocês me completam.

Aos meus sobrinhos, meus melhores e maiores presentes.

Aos meus avós queridos (*in memoriam*), pelas conversas e ensinamentos. Vocês fazem muita falta.

Ao meu amor Junior, por todo amor. Sempre ao meu lado, me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Muito obrigada por estar ao meu lado nessa fase tão importante em minha vida.

Aos meus companheiros queridos Carol, Ju, Lucas, Andrea e Liã, pelas nossas discussões científicas, pelo auxílio nos experimentos e pela amizade. Vocês são demais!

A Bruna, Laís, Nati, Wan, De, Alanés, Edi, Ma e Mari, família que conquistei ao longo deste período em São Paulo, muitíssimo obrigada pela cumplicidade.

As minhas irmãs de coração Rah, Lu, Amanda, Lê e Jaque, pelas conversas descontraídas e pelas loucuras vividas.

A Dr. Maria Ângela Trindade e ao Dr. João Avancini, pela colaboração e por ter sido fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

A Dra. Carla Pagliari, Lu e Wellington, obrigada pela paciência e pelos ensinamentos de imunohistoquímica. Admiro muito vocês!

Aos funcionários, amigos e companheiros do LIM56, obrigada pela convivência, pela alegria e ensinamentos.

Por fim, agradeço a todos os pacientes que prestaram contribuição fundamental para que este estudo fosse possível e para o avanço da investigação científica na hanseníase.

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado *de International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2012.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo *com List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Siglas e Abreviaturas

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO	16
1.1.	SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA.....	17
1.2.	CLASSIFICAÇÃO	18
1.3.	RESPOSTA IMUNOLÓGICA E FORMAS CLÍNICAS DA HANSENÍASE.....	18
1.4.	EPISÓDIOS REACIONAIS	21
1.4.1.	<i>Reação tipo 1 (R1)</i>	21
1.4.2.	<i>Reação tipo 2 (R2)</i>	23
1.5.	TRATAMENTO	24
1.5.1.	<i>Tratamento das reações</i>	24
1.6.	CÉLULAS T REGULADORAS E HANSENÍASE.....	25
2	OBJETIVOS.....	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1.	CASUÍSTICA	33
3.1.1.	<i>Primeira etapa:</i>	33
3.1.1.1.	Pacientes	33
3.1.1.1.1.	Pacientes com reação tipo 1 (R1)	33
3.1.1.1.2.	Pacientes com reação tipo 2 (R2)	34
3.1.1.2.	Controles	34
3.1.1.2.1.	Contatos	34
3.1.1.2.2.	Pacientes curados de quadros reacionais intensos	35
3.1.1.2.3.	Não contatos	35
3.1.2.	<i>Segunda etapa:</i>	36
3.1.2.1.	Pacientes multibacilares (MB) sem reação	36
3.1.2.2.	Pacientes com reação tipo1(R1).....	36
3.1.2.3.	Pacientes com reação tipo 2 (R2).....	37
3.2.	ANTÍGENO.....	37
3.3.	OBTENÇÃO DE PBMCs	37

3.4.	CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO DE CÉLULAS	38
3.5.	TITULAÇÃO DO ANTÍGENO DE <i>M. LEPRAE</i> (MLCWA).....	38
3.6.	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE CÉLULAS T REGULADORAS (TREG)	39
3.6.1.	<i>Marcação extracelular</i>	39
3.6.2.	<i>Marcação intracelular</i>	40
3.6.3.	<i>Método para caracterização fenotípica das células T reguladoras</i>	40
3.7.	ANÁLISE DE CÉLULAS T REGULADORAS EM PBMCs ESTIMULADAS <i>IN VITRO</i>	43
3.8.	REAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DE FOXP3.....	44
3.9.	SEPARAÇÃO DE CÉLULAS CD4 ⁺ POR BEADS MAGNÉTICAS	45
3.10.	EXPANSÃO <i>IN VITRO</i> DE CÉLULAS T REGULADORAS (TREGS)	46
3.10.1.	<i>Protocolo Rapamicina</i>	46
3.10.2.	<i>Protocolo TGF-</i>	46
3.10.3.	<i>Protocolo Vitamina D₃</i>	47
3.11.	ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SUPRESSORA DE TREGS	48
3.11.1.	<i>Marcação das PBMCs com Carboxifluoresceína Succinimidil Ester</i>	48
3.11.2.	<i>Co-cultivo para avaliação da função supressora de Tregs dependente de contato</i>	48
3.11.3.	<i>Marcação para avaliação da inibição da proliferação de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺</i>	48
3.11.4.	<i>Estratégia de análise para avaliação da capacidade funcional das Tregs expandidas in vitro</i>	49
4	RESULTADOS	51
4.1.	TITULAÇÃO DO ANTÍGENO SOLÚVEL DE <i>M. LEPRAE</i> (MLCWA)	52
4.2.	AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DAS CÉLULAS T REGULADORAS (TREG) E DE SUAS MOLÉCULAS SUPRESSORAS.....	53
4.3.	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO FOXP3 EM BIÓPSIAS DE LESÃO DE PELE.....	59
4.4.	AVALIAÇÃO DE CÉLULAS IL-17+ EM BIÓPSIAS DE LESÕES DE PELE DOS PACIENTES COM HANSENÍASE	60
4.5.	ANÁLISE DE CÉLULAS IL-6+ E TGF ⁺ EM BIÓPSIAS DE LESÕES DE PELE DOS PACIENTES COM HANSENÍASE	62
4.6.	AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO/EXPANSÃO <i>IN VITRO</i> DAS TREGS SOB O EFEITO DE TRÊS PROTOCOLOS DISTINTOS.....	64

4.7.	ANÁLISE DA ATIVIDADE SUPRESSORA DE TREGS EXPANDIDAS <i>IN VITRO</i> COM OS PROTOCOLOS RAPAMICINA, TGF β E VITAMINA D ₃ EM PACIENTES COM HANSENÍASE.....	70
5	DISCUSSÃO.....	75
6	CONCLUSÃO.....	84
7	APÊNDICE	88
	REFERÊNCIAS.....	118

Lista de Siglas e Abreviaturas

ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofostato
APC	Ficocianina-eritrina 7
APCs	Células apresentadoras de antígeno
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina de soro bovina
BV605	<i>Brillant Violet 605</i>
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CCL	<i>Chemokine (C-C motif) ligand</i>
CTLA-4	Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico
CXCL	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DD	Hanseníase dimorfo dimorfo
DT	Hanseníase dimorfo tuberculóide
DV	Hanseníase dimorfo virchowiano
ENH	Eritema nodoso hansênico
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FoxP3	<i>Forkhead transcription factor 3</i>
GITR	Receptor da família TNF induzido por glucocorticóide
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	Antígeno leucocitário humano
IFN	Interferon
IL	Interleucina
LAP	Peptídeo associado à latência (do inglês: <i>Latency-associated peptide</i>)
LAM	Lipoarabinomanana
MB	Hanseníase Multibacilar
MFI	Mediana de intensidade de fluorescência
MLCwA	<i>Mycobacterium leprae cell wall protein</i>
Nrp-1	Neuropilina-1

PB	Hanseníase Paucibacilar
PBMC	Célula mononuclear do sangue periférico
PE	Ficoeritrina
PGL-1	Glicolípídeo fenólico 1
PHA	Fitohemaglutinina
PQT	Poliquimioterapia
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RR	Reação reversa
R1	Reação tipo 1
R2	Reação tipo 2
SFB	Soro fetal bovino
TCD4	Linfócitos T CD4
TCD8	Linfócitos T CD8
TCR	Receptor de linfócitos T
TGF	Fator de transformação do crescimento
Th	Linfócitos T <i>helper</i>
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TSDR	Região demetilada específica de Treg
TT	Hanseníase Tuberculóide
VDR	Receptor de vitamina D
VV	Hanseníase virchowiano

Vieira AP. *Atuação de células T reguladoras em episódios reacionais na hanseníase* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

A hanseníase é geralmente agravada pelo aparecimento de reações, que são quadros inflamatórios de difícil tratamento e a principal causa de seqüelas. Nossa hipótese é de que deficiência e/ou perda da função das células T reguladoras (Tregs) podem estar envolvidas no desenvolvimento das reações. Além da avaliação da frequência das Tregs circulantes em pacientes com reação tipo 1 (R1) e reação tipo 2 (R2), também foi avaliada a frequência *in situ* de FoxP3, IL-17, IL-6 e TGF β . Pacientes com R2 apresentaram expressiva diminuição na frequência das Tregs circulantes e *in situ* em comparação com pacientes com R1 e com os controles. Paralelamente a diminuição das Tregs nas R2 foi observado aumento da expressão de IL-17 *in situ* e diminuição da expressão de TGF β . Biópsias obtidas de pacientes com R1 e R2 antes do episódio reacional mostraram números de células FoxP3+ e IL-17+ similares entre os dois grupos. Entretanto, nas biópsias obtidas durante a reação foi observado diminuição de Tregs e aumento de células IL-17+ em pacientes com R2, enquanto que pacientes com R1 apresentaram o oposto: aumento de Tregs e diminuição de células IL-17+. Além disso, foi observada diminuição da expansão das Tregs frente ao estímulo *in vitro* com *Mycobacterium leprae* e uma tendência a baixa expressão de FoxP3 e da molécula imunossupressora CTLA-4 em Tregs de pacientes com R2. Nossos resultados sugerem que nas R2, a diminuição na frequência de Tregs possa estar favorecendo o desenvolvimento de uma resposta Th17, a qual é característica deste tipo de reação. Adicionalmente, com a finalidade de obter um número suficiente de Tregs para realização de ensaios funcionais com estas células, uma vez que se trata de uma subpopulação com baixa frequência no sangue periférico (<10%), foram estabelecidos e avaliados três protocolos distintos para expansão *in vitro* de Tregs: protocolo Rapamicina, protocolo TGF β e protocolo Vitamina D₃. Todos os protocolos foram capazes de induzir expansão de Tregs viáveis nos grupos estudados (paucibacilares e multibacilares sem reação, R1 e R2). Em todos os grupos estudados as Tregs expandidas apresentaram capacidade de suprimir a proliferação de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺. Apesar dos três protocolos testados apresentarem capacidade de expandir Tregs *in vitro*, selecionamos para ensaios futuros os protocolos Rapamicina e TGF β por apresentarem melhor custo-benefício. A expansão *in vitro* será utilizada para estudos funcionais das Tregs buscando melhor entendimento do envolvimento desta subpopulação na patogenia das reações hansênicas.

Descritores: doenças negligenciadas; hanseníase; *Mycobacterium leprae*; eritema nodoso; reação reversa; linfócitos T reguladores.

Vieira AP. *The role of regulatory-T cells in reaction episodes in leprosy* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

Leprosy is frequently complicated by the appearance of reactions that are difficult to treat and are the main cause of sequelae. We speculated that disturbances in regulatory T-cells (Tregs) could play a role in leprosy reactions. We determined the frequency of circulating Tregs in patients with type 1 reaction (T1R) and type 2 reaction (T2R). The *in situ* frequency of FoxP3 and interleukin (IL)-17, IL-6, and transforming growth factor beta (TGF)- expressing cells was also determined. T2R patients showed markedly lower number of circulating and *in situ* Tregs than T1R patients and controls. This decrease was paralleled by increased *in situ* IL-17 expression but decreased TGF- expression. Biopsies from T1R and T2R patients before the reaction episodes showed similar number of forkhead box protein P3 + (FoxP3+) and IL-17+ cells. However, in biopsies taken during the reaction, T2R patients showed a decrease in Tregs and increase in IL-17+ cells, whereas T1R patients showed the opposite: Tregs increased but IL17+ cells decreased. We also found decreased expansion of Tregs upon *in vitro* stimulation with *Mycobacterium leprae* and a trend for lower expression of FoxP3 and the immunosuppressive molecule CTLA-4 in T2R Tregs. Our results provide some evidence to the hypothesis that, in T2R, downmodulation of Tregs may favor the development of T-helper-17 responses that characterize this reaction. In addition, aiming to provide sufficient number of Tregs to perform functional assays with these cells, as they correspond to a subtle subpopulation among the peripheral blood mononuclear cells (<10%), we established and analyzed three different protocols for *in vitro* Tregs: a Rapamycin protocol, a TGF protocol and a Vitamina D₃ protocol. All three protocols were able to induce the expansion of viable in the four types of patients of the study (paucibacillary and multibacillary patients without reaction, and R1 and R2 patients). In these four groups the tregs were able to suppress the proliferative response of TCD4⁺ e TCD8⁺ lymphocytes. Although the three protocols resulted in expansion of Tregs, we selected two of them, Rapamycin and TGF for further assays since they showed better cost-benefit. The *in vitro* expansion will be used to perform functional assays of the Tregs aiming at a better understanding of the involvement of this subpopulation in the pathogenesis of the leprosy reaction episodes.

Descriptors: neglected disease; leprosy; *Mycobacterium leprae*; erythema nodosum; reversal reaction; T-lymphocytes, regulatory.

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase, causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae* é uma doença infectocontagiosa crônica, cujas manifestações clínicas predominantes são lesões de pele, mucosas e nervos periféricos. Eventualmente pode levar a deformidade, dor e disfunção dos membros. Sua incidência está diretamente relacionada aos problemas socioeconômicos de diversos países em desenvolvimento em que é endêmica.

Mycobacterium leprae é um bacilo em forma de bastonete reto ou ligeiramente encurvado. Devido ao fato de se corar em vermelho pela fucsina e não se decorar pela ação de álcool ou ácido durante o processo de coloração Ziehl-Neelsen, o bacilo é conhecido como álcool-ácido resistente (BAAR), gram-positivo, aeróbico, não cultivável *in vitro*¹. A temperatura ideal para sua sobrevivência e proliferação é entre 27 e 30°C, por essa razão apresenta localização preferencial em áreas superficiais, como pele, nervos periféricos, testículos e vias aéreas superiores^{2,3}. É a bactéria que apresenta o período de crescimento mais longo, entre 12 a 14 dias⁴.

A parede celular da *M. leprae* é composta por peptidoglicanos entrelaçados e ligados a cadeias polissacarídeas e lipoarabinomanana (LAM). A cápsula, estrutura mais interna apresenta componentes lipídicos, como o PGL-1 que contém um grupo fenólico glicosilado com um trissacarídeo característico e aparentemente específico para o *M. leprae*^{5,6,7}.

Trata-se de um microorganismo intracelular obrigatório e a única espécie de micobactéria que infecta nervos periféricos, apresentando também tropismo por APCs (células dendríticas, macrófagos e monócitos), células endoteliais e células de Schwann^{8,9}.

Em 2008 foi descrita outra espécie de micobactéria similar ao *M. leprae* sendo álcool-ácido resistente, não cultivável *in vitro* e que apresenta capacidade de infectar os nervos periféricos, porém geneticamente distinta de *M. leprae*¹⁰. Esta micobactéria, denominada *Mycobacterium lepromatosis*, foi primeiramente descrita no México em dois pacientes com hanseníase virchowiana difusa que desenvolveram fenômeno de Lúcio fatal¹⁰. Recentemente foi descrita em pacientes procedentes de outros países como América do norte¹¹, Ásia¹² e América do Sul (Brasil)^{13,14}. Contudo, pouco se sabe sobre *M. lepromatosis* e o agente causal da hanseníase continua sendo associado ao *M. leprae*¹⁵.

A transmissão é inter-humana, por contato prolongado com indivíduos portadores da forma multibacilar (BV, VV) da doença, ou seja, indivíduos que apresentam elevada carga bacilar¹⁶. A principal fonte de infecção são as vias aéreas superiores por meio da secreção nasal, podendo também se dar, alternativamente, por meio de lesões ulceradas¹⁷. Uma vez estabelecida, a infecção pode apresentar um período de latência de 3 a 10 anos⁹.

1.1. Situação epidemiológica

Apesar do emprego mundial da PQT nos anos 80 (OMS, 1982) ter reduzido drasticamente a prevalência da hanseníase, esta doença continua sendo problema de saúde pública nos países em desenvolvimento tanto pela dificuldade no controle endêmico quanto pelas incapacidades seqüelares.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) publica anualmente um relatório atualizando a incidência mundial de hanseníase, incluindo o número de casos novos e sua prevalência. De acordo com relatórios oficiais recebidos a partir de 138 países e territórios, a prevalência global de hanseníase registrada no fim de 2015 foi de 176.176 casos (0,2 casos/10.000 habitantes). Sendo que, o número de casos novos detectados em 2015 foi de 211.973 (2,9/100.00 habitantes). Em 2014, 213.899 casos novos foram reportados, e em 2013 este número foi de 215.656 casos^{18,19}.

Sendo assim, a hanseníase persiste com alto número de casos novos em algumas regiões da Angola, Brasil, República Africana Central, República Democrática do Congo, Índia, Madagascar, Moçambique, Nepal e República Unida da Tanzânia²⁰.

No Brasil a prevalência de casos novos registrados em 2015 foi de 28.761 casos, apresentando um coeficiente de detecção considerado alto (12,6/100.000 habitantes). Nesse contexto, ainda considerado alto, o coeficiente de prevalência de casos no Brasil em 2015 foi de 1,15/10.000 habitantes. Vale ressaltar também que em 2014 o coeficiente de detecção em indivíduos menores de 15 anos é considerado muito alto (4,6 por 100 mil habitantes). A alta detecção da hanseníase em menores de 15 anos indica endemicidade da doença e revela a persistência na transmissão do bacilo, carência de informações sobre a doença e as dificuldades dos programas de saúde para o controle, evidenciando a necessidade de uma intervenção de vigilância mais efetiva²¹.

A condição de contato intradomiciliar é a situação de risco mais estudada. Vários estudos epidemiológicos apontam para o elevado risco de hanseníase apresentado por contatos intradomiciliares, sendo que as taxas de contágio são mais altas entre aqueles que convivem com pacientes que apresentam altos índices de carga bacilar^{22,23}.

1.2. Classificação

As manifestações clínicas da doença dependem de vários aspectos, entre eles, a resposta imune do hospedeiro contra o bacilo. Devido ao amplo espectro de manifestações clínicas a hanseníase é classificada com base em seus aspectos clínicos, histopatológicos e imunológicos. Nesse contexto, a classificação de Madri (1953) adota critérios de polaridade, considerando-se dois pólos imunologicamente estáveis (T: tuberculóide e V: virchowiano) e duas formas instáveis (I: indeterminado e D: dimorfo). Ridley & Jopling et al.²⁴ adotaram subgrupos dentro do espectro, levando à definição de suas formas polares (TT e VV) e interpolares (BT, BB e BV).

Em 1982, a fim de simplificar a classificação e para padronização terapêutica, a Organização Mundial da Saúde (OMS) adotou uma classificação segundo o número de lesões, sendo considerados paucibacilares (PB) os indivíduos que apresentarem até cinco lesões e multibacilares (MB), aqueles com mais de cinco lesões²⁵.

1.3. Resposta imunológica e formas clínicas da hanseníase

A resposta imune do hospedeiro é, portanto, crucial para o curso e desenvolvimento da hanseníase. Há evidências que sugerem uma influência genética relevante sobre a função de células da imunidade inata e adaptativa, cujo controle altera a resistência e susceptibilidade à infecção por *M. leprae*²⁶⁻²⁹.

Estudos de polimorfismos e de associação genética em populações brasileira, indiana e vietnamita indicam que mutação em genes responsáveis pela expressão de moléculas de receptores de reconhecimento padrão *Toll-like receptor 2* (TLR2), TLR4 e *NOD like-receptor* (NOD2), bem como de proteínas envolvidas na degradação protéica via proteassomo (PARKIN e TAP1), além de mediadores inflamatórios como TNF , iNOS e receptor de vitamina D (VDR) estão associados à maior susceptibilidade à hanseníase^{26, 27, 28, 30}.

O *M. leprae* primordialmente infecta histiócitos presentes na derme e células de Schwann presentes nos nervos periféricos, sendo que esse tropismo por nervos periféricos pode conduzir a deformidades e incapacidades físicas devido à destruição dessas células e intensa inflamação local^{29, 31}. A resposta imune do hospedeiro frente à infecção é que vai determinar os diferentes estágios da doença.

O desenvolvimento da doença pode se manifestar primeiramente como hanseníase indeterminada (HI), que se caracteriza como um estágio inicial e em geral, transitório da doença, que pode evoluir para cura. Esta forma é caracterizada por uma mancha geralmente hipocrômica, sendo que a sensibilidade pode estar preservada ou reduzida^{32,33}.

Histologicamente há um leve infiltrado com linfócitos e histiócitos na região perineural e perianexial³². A forma indeterminada pode evoluir em diferentes formas que variam segundo a resistência imune celular do indivíduo constituindo um modelo de doença espectral horizontal.

No pólo de resistência ao bacilo se encontra a forma tuberculóide (TT), na qual podem ocorrer lesões cutâneas ou neurais únicas ou em pequeno número. As lesões são caracterizadas por placas hipocrômicas ou eritematosas, frequentemente com as bordas elevadas e o centro hipocrômico, apresentando ou não alteração da sensibilidade²⁶. Por se tratar de uma manifestação em que há predomínio de resposta imune celular (ou onde a resposta imune celular é preservada) contra o bacilo, as lesões de pele destes pacientes se caracterizam por infiltrado tuberculóide caracterizado por granulomas bem delimitados com escassez ou ausência de bacilos, presença de células gigantes e epitelióides³⁴.

Na hanseníase tuberculóide é observada uma vigorosa resposta imune celular contra o *M. leprae*, mediada pela subpopulação de linfócitos que expressam o fator de transcrição *t-bet*, denominados Th1^{26, 35}. Nesse tipo de resposta há intensa produção das citocinas IFN γ , que atua na ativação de APCs estimulando sua atividade microbicida e aumento sua expressão de MHC II, favorecendo a apresentação antigênica, IL-2, que estimula a proliferação e sobrevivência dos linfócitos antígeno-específicos e aumenta a produção de IFN γ , linfotóxina (LT), que estimula o desenvolvimento e manutenção do granuloma^{36, 37}, e TNF α , que aumenta o potencial microbicida dos macrófagos e atua na formação do granuloma³⁸.

Além do padrão de citocinas bem definido, pacientes tuberculóides apresentam quantidades significativas tanto de linfócitos TCD4⁺ como de TCD8⁺ nas lesões de pele³⁹.

Esse padrão de resposta está presente tanto nas lesões como na periferia, e em conjunto levam à destruição bacilar e contenção da infecção.

No pólo de alta suscetibilidade, associado à deficiência da imunidade celular e aumento da imunidade humoral específica ao *M. leprae*, encontra-se a forma disseminada da doença, a hanseníase virchowiana (VV).

Essa forma clínica envolve difusamente áreas extensas da pele, múltiplos troncos nervosos, e inclusive órgãos. Inicialmente há aparecimento de máculas mal definidas, hipocrômicas ou eritematosas, ampla ou simetricamente distribuídas pela superfície do corpo. Lesões infiltradas surgem em uma fase tardia originando nódulos (hansenomas) e máculas, que pode comprometer a face (face leonina), lóbulos das orelhas, articulações e extremidades, nariz, testículos e olhos. Outras manifestações da forma virchowiana são perda de anexos e denervação, como rarefação de pelos e anidrose devido ao acometimento das glândulas sudoríparas. Há neuropatia simétrica^{40, 41}.

Histologicamente há presença de epiderme atrófica, infiltrado histiocitário difuso, apresentando faixa de colágeno normal entre a derme e a epiderme (Faixa de Unna). Há predominância de histiócitos em diversos graus de evolução que resultam em células espumosas, multivacuoladas (células de Virchow), com rara presença de linfócitos. Observam-se numerosos bacilos formando agrupamentos denominados globias⁴².

O perfil de resposta imunológica na hanseníase virchowiana é distinto do observada na tuberculóide. No polo VV ocorre predominância da resposta medida pela imunidade humoral, em que os linfócitos expressam o fator de transcrição GATA-3 e são denominados Th2. As principais citocinas produzidas por essa linhagem presentes nas lesões são IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, em conjunto essas citocinas vão estimular a ativação de linfócitos B, inibem a ativação de macrófagos e inibem o desenvolvimento da resposta Th1^{43,44}.

Nesta forma da doença, há escassa presença de linfócitos TCD4⁺, com aumento de linfócitos TCD8⁺, formando granulomas mal organizados³⁹, bem como altos títulos de anticorpos anti-PGL-1 e outras proteínas do bacilo, como lipoarabinomanana (LAM)^{45,46}.

Entre as formas polares da hanseníase também existem as formas instáveis, com amplo espectro de manifestações clínicas, e que são caracterizadas por instabilidade imunológica. A maioria dos pacientes nas casuísticas brasileiras se encontram entre as formas

polares. Pacientes com a forma dimorfa podem adquirir características clínicas tanto tuberculóide (DT), como virchoviana (DV), ou simplesmente permanecer como dimorfa (DD), dependendo da intensidade de resposta imune celular do hospedeiro. No entanto, na evolução da forma DT para DV, observa-se uma progressiva tendência à diminuição da resposta celular associada a um aumento da carga bacilar e da resposta humoral^{4, 24}. As alterações histológicas dependem do quadro clínico e podem ser constituídas de granulomas menos densos e presença de escassas células espumosas⁴².

1.4. Episódios reacionais

Os episódios reacionais são fenômenos inflamatórios agudos sobrepostos à evolução crônica da hanseníase, que podem resultar na perda funcional de nervos periféricos levando a incapacidades físicas causadas pela doença⁴⁸.

Essas reações podem ocorrer antes, durante ou após o tratamento⁴⁷, podendo se manifestar em pacientes que apresentam qualquer uma das formas clínicas da doença, porém sua incidência é maior em pacientes VV, DV, DD e DT⁴⁸.

Existem duas formas de episódios reacionais, reação do tipo 1, também denominada reação reversa, e reação do tipo, tendo o Eritema Nodoso (ENH) como forma de manifestação mais comum.

1.4.1. Reação tipo 1 (R1)

A reação tipo 1 ocorre geralmente nas formas nas formas dimorfas (DT, DD e DV), sendo rara sua manifestação em pacientes com as formas polares da hanseníase⁴⁹. Cerca de 30-50% dos indivíduos com hanseníase dimorfa podem ser acometidos esse tipo de reação. Alguns fatores de risco associados ao desenvolvimento da R1 são carga bacilar positiva, idade maior que 15 anos, soropositividade para o anticorpo anti-PGL-1, DNA do *M. leprae* detectável nas lesões de pele⁵⁰⁻⁵².

Nesta reação observa-se uma reativação das lesões pré-existentes e/ou aparecimento de novas lesões, com sinais de agudização como eritema, infiltração, formando uma placa de superfície lisa, brilhante e com aspecto edemaciado. A duração do surto varia de semanas a meses e, ao regredir, pode apresentar descamação^{48, 53}.

As manifestações são localizadas e não ocorrem manifestações sistêmicas⁵⁴. Nos pacientes paucibacilares (PB), o comprometimento cutâneo pode ou não estar associado a sintomas neurológicos, mas, nos pacientes multibacilares (MB), pode haver associação com envolvimento sistêmico⁵³.

A duração do surto varia de semanas a meses e, ao regredir, pode apresentar descamação. Porém, o agravamento da R1 pode causar ulceração profunda das lesões, necrose acentuada, podendo também levar a formação de abscesso neural resultando em lesões definitivas e perda da função sensitivo-motora⁵⁵.

A imunopatogenia da R1 não é bem definida. Muitos são os trabalhos descritos na literatura realizados com o propósito de melhor compreender os mecanismos imunológicos envolvidos nesses quadros⁵⁶⁻⁵⁹.

O desenvolvimento da R1 envolve principalmente mecanismos da imunidade mediada por células, sendo associado ao aumento da resposta tipo Th1 em resposta ao aumento de *M. leprae* não viável, geralmente decorrente do tratamento antimicobacteriano^{60, 61}.

Nas lesões observam-se granulomas com macrófagos do tipo M1 (CD68+CD163-), macrófagos que apresentam tal fenótipo secretam citocinas próinflamatórias (IL-12, IFN γ , TNF α , IL-6, IL-1 e IL-23) e produzem iNOS, que é um importante antimicrobica, além de estimularem linfócitos Th1^{39, 62}.

No infiltrado inflamatório há predominância de células TCD4⁺ secretoras de IFN γ e TNF α , consistente com o aumento no número de linfócitos T reativos para os antígenos de *M. leprae* nas lesões da pele e nervos^{4, 48}. Andersson et al.⁶³ relataram que indivíduos que desenvolvem R1 apresentam uma maior frequência de células expressando RNAm para TNF α e consequentemente maiores níveis desta citocina na pele e nos nervos, quando comparado com biópsias de pacientes DT e DV sem reação. Além do aumento de TNF α , Teles et al.⁶⁴ analisaram biópsias de lesões de pacientes antes e durante episódios de R1, e observaram aumento de IL-8 e IL-12 na reação. Embora haja relatos de que indivíduos com R1 apresentam baixos níveis de citocinas supressoras, como por exemplo, TGF- β , consistentes com a falta de regulação do processo inflamatório nesse quadro, Lockwood et al.⁶⁵ notaram aumento nos níveis dessa citocina simultaneamente com o aumento nos níveis de TNF α . Em conjunto, esses achados justificam a presença do intenso quadro inflamatório visto nas lesões de pacientes com R1.

Com relação à análise em células circulantes, Santos et al.⁵⁸ observaram que pacientes com R1 apresentam aumento de linfócitos TCD4⁺ efetores e de memória efetora, além de aumento de linfócitos TCD8⁺ efetores; estas células efetoras e de memória-efetora

apresentam potencial de montar mais rapidamente uma resposta antígeno-específica, além de produzirem altos níveis de INF . Nesse contexto, há aumento dos níveis séricos de CXCL10 que é uma quimiocina envolvida no recrutamento de linfócitos Th1 para o sítio inflamatório, bem como o aumento de IL-6, citocina potencialmente inflamatória^{57, 66, 67}. Em contrapartida, Sarno et al.⁶⁸, observaram aumento dos níveis séricos de TNF em tanto em pacientes com R1 como R2.

1.4.2. Reação tipo 2 (R2)

A reação do tipo 2 acomete pacientes multibacilares (BL ou LL) com alta carga bacteriana em suas lesões, sendo mediada por aumento da resposta humoral contra antígenos do *M. Leprae*, resposta do tipo Th2⁶⁹. Frequentemente ocorre durante o tratamento com PQT, porém em alguns casos, se dá como primeira manifestação, antes mesmo do diagnóstico de hanseníase^{70, 71}.

No Brasil, cerca de 37% dos casos de pacientes com DV ou VV desenvolvem R2⁷². Os fatores de risco associados a esse tipo de reação, além da alta carga bacilar, são infecções intercorrentes, estresse, vacinação, gravidez e uso de alguns fármacos⁷³,

Os aspectos clínicos são resultantes de uma resposta inflamatória aguda que envolve qualquer órgão ou tecido em que o bacilo ou seus antígenos estejam presentes. Desse modo, a R2 apresenta um quadro sistêmico em que ocorre queda do estado geral, febre, anorexia, insônia e depressão⁷⁴. Essas manifestações, acompanhadas ou não de neurite, são marcadas pelo aparecimento abrupto de nódulos e/ou placas infiltradas dolorosas, que podem evoluir para pústulas e bolhas que quando hemorrágicas ocorre o risco de ulceração⁷⁵. Em casos mais graves, quando há ulceração e necrose, a R2 é denominada Eritema nodoso necrotizante⁷⁶.

Trata-se de uma reação relacionada à hipersensibilidade do tipo III, ou seja, uma resposta mediada por imunocomplexos. Devido às elevadas concentrações de anticorpos contra frações antigênicas do *M. leprae* (por exemplo, PGL-1) ocorre formação de imunocomplexos circulantes que ao atingir espaços teciduais, vasos sanguíneos e linfáticos resultam na ativação do complemento em alguns órgãos^{69, 77}. Esse processo desencadeia inflamação local com migração de neutrófilos para o sítio de inflamação e liberação de enzimas responsáveis por lesões teciduais.

Nas lesões de pele dos pacientes com R2 são observados poucos macrófagos, tanto com o fenótipo M1 e M2, sugerindo que essa reação não está associada com o recrutamento

de macrófagos, como o visto em R1³⁹. Recentemente foi demonstrado que os mecanismos envolvidos no recrutamento de neutrófilos em R2 são resultantes da secreção de IL-1 por APCs, o que leva à ativação endotelial, com aumento da expressão de E-selectinas que facilitam o recrutamento do neutrófilo para o sítio de infecção⁷⁸. Os altos níveis de IFN presentes no soro de pacientes R2 podem estar relacionados com o aumento da secreção de IL-1⁷⁹.

Entretanto, a R2 provavelmente deve estar relacionada a vários mecanismos, incluindo a presença de resposta imune celular com intensa expressão em PBMCs de mRNA das citocinas pró-inflamatórias de IL-6, GM-CSF, IL-2R e IFN-^{80, 81}. Sousa et al.⁸² observaram aumento dos níveis plasmáticos de IL-6 nestes pacientes em relação aos níveis plasmáticos encontrados em R1 e pacientes sem reação. Também notaram polimorfismos no gene de *IL-6* em pacientes com R2, propondo a IL-6 como um possível biomarcador deste tipo de reação.

Em virtude do que foi mencionado, é difícil estabelecer um padrão de resposta específico tanto para a R1 como para a R2.

1.5. Tratamento

O tratamento é fundamental para cura, bloqueando a fonte de infecção e interrompendo a cadeia de transmissão da doença. Na década de 80, a OMS implantou a poliquioterapia (PQT) para o tratamento da hanseníase (OMS, 1998). A PQT consiste em três medicamentos, rifampicina, dapsona e clofazimina, e é administrada de acordo com a classificação operacional do doente em paucibacilar ou multibacilar.

Sendo assim, pacientes paucibacilares são tratados com um esquema padronizado de 6 doses (6 meses de tratamento) incluindo rifampicina e dapsona. Já pacientes multibacilares são tratados com 12 doses (12 meses), com um esquema que inclui a rifampicina, dapsona e clofazimina⁸³.

Quando o tratamento é realizado adequadamente, as recidivas são raras, porém o acompanhamento continuado dos pacientes é importante na vigilância à resistência medicamentosa.

1.5.1. Tratamento das reações

A detecção precoce e o tratamento das reações hansênicas são essenciais para prevenir incapacidades. Infelizmente, alguns danos neurais permanentes podem ocorrer antes do diagnóstico da hanseníase e, a despeito dos esforços realizados para preveni-los, outros danos neurais podem ocorrer durante e após o tratamento com PQT.

O tratamento com corticosteróides deve ser imediato e em doses adequadas (1-1,5 mg/Kg/dia), pelo tempo que for necessário nos pacientes com surtos reacionais graves, na vigência de neurite e comprometimento de outros órgãos. Apesar de a prednisona ser uma droga eficaz, pode causar graves efeitos adversos, incluindo alguns potencialmente fatais⁵⁵.

Nos casos da R2 subintrante ou crônico, o tratamento de escolha é a talidomida. É usada na dose de 100 a 400 mg/dia, de acordo com a gravidade do quadro. Todos os pacientes respondem ao tratamento, e a maioria tem resolução completa das lesões cutâneas dentro de sete dias. Também nos casos de neurite ou outras inflamações a talidomida é a droga de escolha recomendada para o tratamento, sendo seu uso regulamentado pelo Ministério da Saúde desde a década de 60.

Entretanto, torna-se relevante enfatizar, os principais efeitos colaterais decorrentes do uso dessa droga, entre eles, teratogenicidade, neuropatia periférica, particularmente na R2, e a sonolência, bem como a influência da dose e do tempo de tratamento na ocorrência desses efeitos adversos⁵⁵.

1.6. Células T reguladoras e hanseníase

As células T reguladoras (Tregs) correspondem a até 10% do total de células TCD4⁺ do sangue periférico. Possuem mecanismos imunossupressores essenciais para indução e manutenção da tolerância imunológica, e também para regulação da resposta imune contra bactérias, fungos, parasitas e vírus⁸⁴⁻⁸⁷.

A maioria das células Tregs são CD4⁺ expressam construtivamente a molécula CD25 (cadeia do receptor de IL-2). No entanto a expressão dessa molécula não é considerada um marcador específico para Tregs, uma vez que linfócitos T ativados também expressam transitoriamente CD25 em sua superfície⁸⁸.

Neste contexto, um marcador considerado, até o momento, específico para as Tregs e diretamente envolvido em sua atividade supressiva é o fator de transcrição FoxP3 (forkhead transcription factor 3)^{88, 89}. Estudos demonstraram que a transferência do gene retroviral de Foxp3 para células T CD4⁺CD25⁻ periféricas murinas e humanas resulta no desenvolvimento

de uma função supressora por algumas dessas células, sugerindo a importância da expressão desse fator de transcrição no desenvolvimento da atividade imunorreguladora de células Tregs⁹⁰.

No entanto, outros trabalhos demonstraram que em humanos a expressão de FoxP3 não é restrita a células Tregs, pois pode ser expressa transitoriamente por células T ativadas, e por células tumorais⁹¹.

Outro fator limitante é relacionado ao isolamento dessas células baseadas na expressão de FoxP3, uma vez que se trata de uma molécula intranuclear. Sendo assim, é incontestável a importância de se identificar marcadores específicos presentes em células Tregs que facilitem a identificação e manipulação das mesmas.

A co-expressão de algumas moléculas vem sendo descrita para identificação de Treg, como CD122 (cadeia do receptor de IL-2), CD132 (cadeia do receptor de IL-2)⁹², CD45RO, CD62L, GITR (glucocorticoid-induced TNFR-family). Além da expressão dessas moléculas, a baixa expressão de CD127 (cadeia do receptor de IL-7) também é associada ao fenótipo de células reguladoras, pois estas parecem utilizar mais IL-2 como fator de sobrevivência do que a IL-7. Entretanto, nenhum desses marcadores é específico para esse tipo de células, uma vez que podem ser expressos por células T ativadas⁹³⁻⁹⁵.

Com base em sua origem, geração e mecanismos de ação, as células Tregs têm sido descritas como “naturais” (nTregs) e “induzidas” (iTregs). O processo de geração das nTregs se dá durante os eventos de seleção negativa a partir da diferenciação de alguns clones de linfócitos T CD4⁺ auto-reativos que começam a expressar FoxP3 e não sofrem apoptose⁹⁶. Estas células além de regularem células T auto-reativas na periferia, estão relacionadas com a manutenção da auto-tolerância sendo de grande importância para a manutenção da homeostase do sistema imune, apresentando também capacidade inibitória pela sua atividade de regulação negativa da resposta imune frente a antígenos exógenos^{97, 98}.

Paralelamente, as Tregs induzidas se desenvolvem na periferia a partir de células TCD4⁺ naive convencionais, que após exposição à citocinas reguladoras, como IL-10 e TGF- β , ou após contato com APCs, passam a expressar ou não FoxP3^{99, 100}.

No entanto são descritos na literatura dois tipos de Tregs induzidas: Tregs tipo 1 (Tr1) que dependem exclusivamente de IL-10 para sua diferenciação e função; e as células T auxiliares 3 (Th3), cuja diferenciação e função é mediada pela secreção de TGF- β ⁹⁵. Embora ainda seja controverso, TGF- β poderia atuar como mediador supressor em uma forma ligada a membrana celular, o que pode condicionar outros linfócitos T respondedoras a expressar o FoxP3 e se diferenciar em outra^{88, 101, 102}.

A função supressora das Tregs pode ser desempenhada de forma independente de contato com a célula-alvo, através da secreção de citocinas, como IL-10, TGF β , IL-35 e secreção de granzimas e perforinas, e por interação célula-célula, por meio de moléculas ancoradas em sua superfície que vão interagir com a célula efetora.

Alguns trabalhos vêm demonstrando que é possível determinar a produção de TGF β por citometria de fluxo através da marcação da porção N-terminal da citocina, conhecida também como peptídeo associado à latência (LAP). Esta proteína auxilia e facilita o deslocamento do TGF β para a membrana celular, no momento de sua secreção¹⁰³.

Dentre as moléculas expressas pelas Tregs que auxiliam em sua atividade supressora, a molécula CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4), que é constitutivamente expressa nesse tipo celular, é um potente regulador na resposta imune. Por apresentar uma maior afinidade pelas moléculas B7 do que ao CD28 expressa em células T, CTLA-4 têm a capacidade de se ligar tanto ao CD80 como ao CD86 e diminuir a capacidade coestimuladora de APCs^{104, 105}. Além disso, foi demonstrado que a molécula CTLA-4, expressa pelas Tregs, induz a expressão de indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO), que por sua vez degrada o aminoácido essencial triptofano; a carência deste aminoácido inibe a ativação de células T e promove a apoptose destas¹⁰⁶.

Recentemente, vem sendo mostrado que as ectoenzimas CD39 e CD73 são expressas em células Tregs. Trata-se de moléculas responsáveis por hidrolisar adenosina trifosfato exógenas (ATP) ou adenosina difosfato (ADP) em adenosina monofostato (AMP), que leva a inibição da proliferação de células T e secreção de IL-2^{107, 108}.

Embora muitos trabalhos atribuem a atividade supressora a células TCD4⁺, alguns trabalhos vem enfatizando o papel importante de células TCD8⁺ reguladoras na tolerância e homeostase da resposta imune, embora sua frequência seja menor que a de Treg CD4⁺¹⁰⁹⁻¹¹¹.

A resposta imune para infecção representa um complexo balanço entre uma indução de resposta pró-inflamatória eficaz contra o patógeno, e resposta antiinflamatória para evitar danos ao hospedeiro. Desse modo, células Tregs desempenham um papel fundamental no controle desse balanço durante uma infecção, e os resultados dessa atuação pode variar de uma resposta prejudicial ao patógeno sem levar a imunopatologia no hospedeiro, o que é desejável, a uma resposta que leva à eliminação do parasita, porém à custa de uma inflamação exacerbada e danosa ao hospedeiro⁸⁴.

Nesse contexto, estudos recentes em indivíduos infectados com *Helicobacter pylori* sugerem que células Tregs talvez possam contribuir para a infecção crônica da doença, devido a sua atividade supressora em células T de memória específicas para essa bactéria. Nota-se

também que a exposição crônica a patógenos resulta na indução de uma robusta resposta imunoreguladora mediada pela secreção de IL-10¹¹².

Zhang et al.¹¹³, observaram que indivíduos portadores de hepatite B (HBV) crônica apresentam aumento significativo de Treg ativadas (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) circulantes quando comparados com indivíduos assintomáticos.

Campanelli et al.¹¹⁴ analisou a frequência de Tregs em lesões de pacientes com leishmaniose cutânea, e observou que essas células migraram para lesões causadas na infecção por *L. viannia brasiliensis* devido a alta expressão de quimiocinas CCL17 e CCL22 em lesões de pele.

No contexto da atividade de Tregs em doenças causadas por micobactérias, Silva et al.¹¹⁵ descreveram aumento de Tregs antígeno-específica em pacientes com tuberculose pulmonar ativa quando comparado com pacientes curados e indivíduos saudáveis. Observando Tregs com o fenótipo CD4⁺CD25^{high}CD39⁺, Chiacchio et al.¹⁰⁸ demonstraram que essas células apresentam por alta produção de TGF- β e ausência de expressão de IFN- γ em indivíduos com tuberculose, e que sua depleção a resposta antígeno-específica para *M. tuberculosis*. Além disso, Guyot-Revol et al.¹¹⁶ observaram aumento em mRNA para FoxP3 em PBMCs de pacientes com tuberculose extrapulmonar mas não na tuberculose pulmonar, associando esses achados com uma resposta Th1 suprimida nos pacientes com a forma disseminada.

Na infecção por *Mycobacterium leprae* o papel das células Tregs está sendo objeto de intensos estudos. Neste sentido, nosso grupo¹¹⁷ demonstrou que há um aumento no número de Treg em PBMCs de pacientes multibacilares tanto *in vitro* quanto *in situ* quando comparado com pacientes paucibacilares. Tal aumento pode estar atuando na supressão da resposta proliferativa antígeno-específica e nos níveis reduzidos de IFN- γ observados nos pacientes multibacilares, resultando em uma resposta Th1 deficiente e a perda do controle da carga bacilar. Além disso, neste mesmo estudo demonstrou-se que o aumento na expressão das Tregs nos pacientes MB é acompanhado do aumento da expressão de CTLA-4 e IL-10 nas lesões.

Nossos resultados foram posteriormente confirmados, por outros grupos que também sugeriram aumento de Treg como um mecanismo de imunossupressão nos pacientes com a forma virchowiana¹¹⁸⁻¹²⁰. Entretanto o possível mecanismo de supressão encontrado diferiu dos nossos resultados, em que foi observada alta expressão de TGF- β em pacientes multibacilares¹¹⁸. Mais recentemente, Sadhu et al.¹²⁰ observaram alta expressão de Tregs

secretoras de IL-10 em pacientes BL/LL, reforçando assim que a anergia apresentada por BL/LL esta intimamente relacionada com a supressão da resposta contra o *M. leprae*.

Atualmente propõe-se uma relação entre as Tregs e os linfócitos do subtipo Th17. Isso porque TGF β , como já mencionado, é capaz de induzir diferenciação de Tregs. Entretanto, na presença de IL-6, IL-21 ou de IL-1 β , TGF β leva à diferenciação de Th17. Estes dois subtipos celulares apresentam papéis opostos, enquanto a Tregs é responsável pela regulação da resposta imune, Th17 é responsável por desenvolver uma resposta proinflamatória robusta^{121, 122}.

Poucos trabalhos abordam o papel das Tregs nas reações^{119, 125}. Contudo, ainda não há na literatura estudos que avaliem a função destas células tanto em episódios reacionais quanto nas formas não reacionais.

Uma vez que (a) as reações tipo 1 e tipo 2 são a maior causa de hospitalização e incapacitação de pacientes portadores de hanseníase, (b) que não há, até o momento, relatos de estudos avaliando a capacidade funcional de células Tregs em episódios reacionais, (c) que o tratamento atual destas manifestações consiste no uso, muitas vezes por tempo indeterminado (meses a anos), de corticóides e/ou talidomida, e (d) tendo em vista que a elucidação do papel das Treg nesses quadros poderá eventualmente direcionar para novas intervenções imunoterapêuticas, evitando/diminuindo o uso dessas medicações causadoras de graves efeitos adversos, este trabalho se propõe investigar o envolvimento de células T reguladoras nos episódios reacionais com o propósito de melhor entender seu papel na modulação e supressão da resposta imune desses pacientes. Nossa hipótese foi a de que pacientes que desenvolvem quadros reacionais apresentam diminuição no número/função de células T reguladoras,

2 OBJETIVOS

Estudar células Tregs *in situ* (biópsias de lesões) e *in vivo*, em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com reações hansênicas estimuladas com antígenos específicos de *M. leprae*, com o propósito de melhor compreender a imunopatogenia dessas reações, em especial a atuação das células T reguladoras. Além disso, serão comparados diferentes tipos de estímulos utilizados especificamente para indução e expansão destas células *in vitro*. As subpopulações de Treg assim obtidas serão avaliadas quanto ao seu fenótipo e sua capacidade funcional de suprimir a resposta imune *in vitro*.

Especificamente:

- Quantificar a presença de Treg ($CD4^+CD25^+CD127^{low/-}Foxp3^+$) no sangue periférico e analisar seu perfil supressor através da expressão de moléculas associadas à supressão CD39, LAP, CTLA-4.
- Quantificar em biópsias de lesões de pele a presença de células FoxP3⁺.
- Realizar a quantificação de IL-10 produzidas por Treg presente no sangue periférico e estimulada com o antígeno de *M. leprae*;
- Testar a indução de Treg *in vitro* sob efeito de diferentes coquetéis de expansão.
- Avaliar através da linfoproliferação a atividade supressora de Tregs em co-cultivo com PBMCs autólogas;
- Quantificar a presença de citocinas pro e anti-inflamatórias resultantes da co-cultura das Tregs com PBMCs autólogas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Casuística

O trabalho aqui apresentado foi dividido em duas etapas, sendo que a primeira consistiu da análise da frequência das Tregs *ex vivo* e estimuladas *in vitro* com antígeno de *M. leprae*, e de outros marcadores imunológicos tanto no sangue periférico como nas biópsias das lesões de pele, em pacientes com R1 e R2 e seus respectivos controles.

A segunda etapa consistiu na comparação de três diferentes coquetéis de estímulos utilizados especificamente para indução e expansão de Tregs *in vitro* e em seguida e na avaliação da capacidade funcional dessas células, a partir de pacientes com hanseníase.

Em ambas as etapas foram estudados indivíduos adultos (≥ 18 anos), de ambos os sexos, HIV negativos e sem outras comorbidades, após consentimento esclarecido. Os pacientes incluídos foram agrupados de acordo com a classificação de Ridley & Jopling.

3.1.1. Primeira etapa:

3.1.1.1. Pacientes

3.1.1.1.1. Pacientes com reação tipo 1 (R1)

Foram incluídos 14 pacientes com reação tipo 1 moderada a intensa.

Tabela 1 - Caracterização clínica dos pacientes com reação tipo 1

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Forma clínica	Tipo de Reação
P1-1	65	M	BT/BB	R1 - RR
P2-1	56	M	BL	R1 - RR
P2-1	44	M	BT	R1 - RR
P4-1	42	M	BB	R1 - RR
P5-1	46	F	BB	R1 - RR
P5-1	52	F	BB	R1 - RR
P7-1	38	F	BB	R1 - RR
P8-1	37	F	BT	R1 - RR
P9-1	29	M	BT	R1 - RR
P10-1	73	F	BT	R1 - RR
P11-1	69	M	BT	R1 - RR
P12-1	53	M	BB	R1 - RR
P13-1	37	M	BT	R1 - RR
P14-1	45	M	TT	R1 - RR
Média	49			

3.1.1.1.2. Pacientes com reação tipo 2 (R2)

Foram incluídos 14 pacientes com reação tipo 2 moderada/intensa.

Tabela 2 - Caracterização clínica dos pacientes com reação tipo 2

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Forma clínica	Tipo de Reação
P1-2	34	M	LL	R2 - ENH
P2-2	33	F	LL	R2 - ENH
P3-2	29	M	BL	R2 - ENH
P4-2	42	M	LL	R2 - ENH
P5-2	59	F	LL	R2 - ENH
P6-2	51	M	BL	R2 - ENH
P7-2	56	F	LL	R2 - ENH
P8-2	39	M	LL	R2 - ENH
P9-2	50	M	BL	R2 - ENH
P10-2	34	F	LL	R2 - ENH
P11-2	18	F	BB	R2 - ENH
P12-2	25	M	LL	R2 - ENH
P13-2	59	M	LL	R2 - ENH
P14-2	35	M	LL	R2 - ENH
Média	40,2			

3.1.1.2. Controles

3.1.1.2.1. Contatos

11 indivíduos saudáveis que convivem frequentemente com pacientes multibacilares (em sua maioria acompanhante de pacientes do ambulatório conforme projetos anteriores).

Tabela 3 - Caracterização dos contatos

Contato	Idade (anos)	Sexo
HC 01	56	F
HC 02	21	F
HC 03	73	F
HC 04	38	M
HC 05	22	F
HC 06	24	F

HC 07	28	M
HC 08	34	F
HC 09	60	F
HC 10	35	F
HC 11	39	M
Média	39	

3.1.1.2.2. Pacientes curados de quadros reacionais intensos

Sete pacientes sem reação e sem tratamento com PQT, porém que no decorrer da doença, em algum momento, já desenvolveram reação tipo 2 grave. Todos eram pacientes multibacilares (MB).

Tabela 4 - Caracterização de pacientes multibacilares sem reação

Paciente	Idade (anos)	Sexo
1	63	F
2	44	F
3	43	F
4	55	F
5	35	F
6	34	F
7	62	F
Média	48	

3.1.1.2.3. Não contatos

Foram selecionados 8 indivíduos saudáveis provenientes do Laboratório de Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiências do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP- LIM 56-HCFMUSP. Esses indivíduos não convivem com portadores de hanseníase.

Tabela 5 - Caracterização de indivíduos não contato

Indivíduo	Idade (anos)	Sexo
1	42	F
2	22	F
3	57	M
4	28	F
5	42	F

6	47	M
7	62	M
Média	42,8	

3.1.2. Segunda etapa:

3.1.2.1. Pacientes paucibacilares (PB) sem reação

Foram selecionados 3 pacientes com as formas TT ou BT sem reação.

Tabela 6 - Caracterização de pacientes paucibacilares sem reação

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Forma Clínica
PB-1	71	M	TT
PB-2	41	M	TT/BT
PB-3	43	F	BT
Média	51,6		

3.1.2.2. Pacientes multibacilares (MB) sem reação

Foram selecionados 3 pacientes com as formas BV ou VV sem reação.

Tabela 7 - Caracterização de pacientes multibacilares sem reação

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Forma Clínica
MB-1	41	M	BV/VV
MB-2	56	M	BV
MB-3	23	M	VV
Média	40		

3.1.2.3. Pacientes com reação tipo1(R1)

Foram incluídos no estudo 2 pacientes com reação tipo um moderada/intensa

Tabela 8 - Caracterização de com reação tipo 1

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Forma Clínica
P1-1	56	M	BT
P2-1	17	M	BB
Média	36,5		

3.1.2.4. Pacientes com reação tipo 2 (R2)

Foram incluídos 3 pacientes com reação tipo 2 moderada/intensa.

Tabela 9 - Caracterização de com reação tipo 1

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Forma Clínica
P1-2	34	M	BV
P2-2	41	M	BV
P3-2	33	M	BV
Média	36		

3.2. Antígeno

Mycobacterium leprae: Será utilizado antígeno solúvel de *M. leprae* cedido pela American Type Culture Collection (ATCC), Virginia, USA (contrato AWB: 1114861).

3.3. Obtenção de PBMCs

Para obtenção de PBMCs foram coletados através de punção venosa cerca de 70 mL de sangue periférico em tubo heparinizado. O material foi diluído na proporção de 1:2 em salina e em seguida transferido cuidadosamente sobre o gradiente de densidade Ficoll-PaqueTMPlus densidade 1076 (GE Healthcare, Bio-Sciences AB) na proporção de 3 partes de sangue diluído:1 parte de Ficoll de modo que ambos não se misturassem. O material foi então centrifugado a 974g por 20 minutos e após a coleta da “nuvem” de células mononucleares, duas lavagens com salina a 453g por 10 minutos cada foram realizadas para retirada do Ficoll

remanescente. Em seguida as células foram quantificadas e a viabilidade celular analisada, por meio do corante azul de Trypan 0,4% (Sigma®), em Câmara de Neubauer (Optik Labor). Serão utilizadas nos experimentos somente suspensões celulares com viabilidade > 90%.

Após a separação celular uma parte das PBMCs foi congelada de acordo com o protocolo a seguir.

3.4. Congelamento e descongelamento de células

PBMCs serão congeladas para uso posterior. Para tanto, as células foram lavadas e ressuspensas por gotejamento em solução contendo 50% de SFB, 40% de RPMI e 10% de DMSO. O material foi transferido para criotubos e acondicionado em container contendo álcool isopropílico (Mr. Frost Nalgene® Nunc.). Tal dispositivo possibilita o congelamento gradual das células uma vez que permite a diminuição controlada da temperatura (redução de 1°C por minuto), resultando na obtenção de maiores índices de viabilidade celular após o descongelamento. Após 1 dia armazenados a -80°C , os criotubos serão transferidos para o nitrogênio.

Para descongelamento, o criotubo contendo as células foi rapidamente imerso em banho-maria a 37°C e em seguida a suspensão foi diluída em meio de cultura com 10% de SFB. Após 2 ciclos de lavagem em meio de cultura, a viabilidade foi determinada por meio de contagem das células coradas pelo Azul de Trypan (0,4%) em Câmara de Neubauer.

3.5. Titulação do antígeno de *M. leprae* (MLCwA)

Com o intuito de obter uma concentração ideal para estimular as PBMCs in vitro, o antígeno do *M. leprae* (MLCwA) foi titulado, como descrito a seguir. Foram coletados cerca de 50 mL de sangue periférico de um doador saudável respondedor ao antígeno (indivíduo que convive frequentemente com pacientes multibacilares). Após separação por Ficoll e duas lavagens com salina a 453g por 10 minutos cada, a concentração de PBMCs foi ajustada para 2×10^6 células/mL e então ressuspensas em RPMI suplementado com 10% de soro AB (Sigma, USA), a suspensão foi distribuída em triplicata em placa de cultura de 96 poços. Desta maneira, foram estimuladas com as seguintes concentrações de antígeno: 30µg/mL, 20µg/mL, 10µg/mL e 5µg/mL. Células estimuladas com mitógeno Pokeweed – PWM

(10µg/mL) foram utilizadas como controle positivo e como controle negativo foi utilizado células em seu estado basal. A placa foi incubada em estufa de CO₂ a 37°C por 96 horas.

O potencial do estímulo em cultura foi avaliado pela mensuração da proliferação celular através da incorporação de timidina triciada (0,5 µCi/poço, Amersham, NEN). Para tanto, no terceiro dia de incubação, as células foram pulsadas com timidina por 18 horas e em seguida a placa foi congelada. Posteriormente, a placa foi descongelada e aspirada com Cell Harvester (Titertek®) em uma membrana de fibra de vidro. A incorporação de timidina foi medida após a adição do líquido de cintilação na membrana e a radiação foi quantificada em equipamento Betaplate™ (EG&G Wallac, Perkin-Elmer)

3.6. Caracterização fenotípica de células T reguladoras (Tregs)

Com a finalidade de caracterizar a população das Treg, PBMCs separadas como descrito anteriormente foram analisadas *ex vivo* e após estímulo com relação expressão de proteínas intra e extracelulares. Para tanto, as células Treg foram caracterizadas pelo fenótipo CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CD127^{low/-}, como também marcação com anticorpos monoclonais específicos para as moléculas CD39, LAP, CTLA-4 (CD152), para ensaio por citometria de fluxo.

Tabela 10 - Relação dos anticorpos monoclonais utilizados para caracterização das células Treg e mensuração das moléculas associadas à supressão.

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Vol. de uso
CD3	BV605	SK7	2µL
CD4	V500	RPA-T4	2µL
CD25	FITC	M-A251	4µL
CD127	PE-CY7	HIL-7R-M21	2,5µL
CD39	APC	TU66	5µL
CD152	BV421	BNI3	2,5µL
LAP	PE-CF594	TW4-2F8	2,5µL
FoxP3	PE	PCH101	3µL

3.6.1. Marcação extracelular

Após lavagem com PBS 1% de BSA a 453g por 10 minutos, as células foram marcadas com anticorpos CD3, CD4, CD25, CD127, CD39, LAP e CTLA-4 (Tabela 1) e

incubadas por 30 minutos a 4°C e na ausência de luz. Após o tempo de incubação foram lavadas e então incubadas com tampão de fixação (ebioscience e/ou BD Bioscience) por 30 minutos a 4°C e na ausência de luz, seguido de um ciclo de lavagem com PBS 1% de BSA.

3.6.2. Marcação intracelular

Os linfócitos previamente submetidos à marcação extracelular foram submetidos a duas lavagens a 453g por 5 minutos cada com o tampão de permeabilização (ebioscience e/ou BD Bioscience) e, em seguida, foram incubadas com o mesmo reagente juntamente com o anticorpo monoclonal específico para Foxp3 (ebioscience, USA) a 4°C e na ausência de luz durante 30 minutos. Posteriormente, os linfócitos foram submetidos a nova lavagem com tampão de permeabilização. Por fim, as células foram ressuspensas em solução isotônica BD FACS Flow® (BD Biosciences) e adquiridas em citômetro de fluxo em até 24 horas. A aquisição foi realizada no citômetro de fluxo LSRFortessa (adquiridos 700.000 eventos por tubo) com o software FACSDiva (BD Biosciences) e os dados foram analisados com a utilização do software FlowJo®7.6.5.

3.6.3. Método para caracterização fenotípica das células T reguladoras

Para análise da frequência de células Treg procedeu-se conforme descrito a seguir. Células sem marcação com anticorpos foram utilizadas para ajustar a voltagem dos lasers no citômetro, em seguida foi realizada a compensação (subtração da interferência de uma cor em outra) utilizando esferas magnéticas marcadas com os anticorpos monoclonais que compõem o painel de marcação (tabela 1). Para tanto, realizou-se a delimitação do gate que inclui as esferas (Figura 1A), e posteriormente, a delimitação dos picos negativo e positivo para cada fluorocromo (Figura 1B).

Figura 1: Métodos de compensação automática no FACSDiva com esferas magnéticas. A: Gráfico em dotplot demonstrando gate para seleção das esferas magnéticas. B: Histograma exemplificando o método para compensação automática para o fluorocromo V500, o gráfico demonstra a delimitação do pico de esferas positivas (pico direito) e negativas (pico esquerdo).

Para o método de análise das amostras, primeiramente foi excluído eventuais oscilações do laser (Time) e possíveis agrupamentos celulares (Singlets) (Figura 2A e 2B, respectivamente). A caracterização das células Treg foi obtida primeiramente através da seleção da população de linfócitos T obtidos pelos parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) (Figura 2C) e pela expressão da proteína de superfície celular CD3 (Figura 2D), seguido da seleção da subpopulação de linfócitos T que expressam simultaneamente as moléculas CD4 e a CD25 (Figura 2E-F). Caracterizamos como Treg as células que dentro da dupla marcação (CD4/CD25) apresentavam baixa ou nenhuma expressão da molécula CD127 e simultaneamente o fator de transcrição Foxp3 (Figura 2G).

Figura 2: Estratégia de análise para caracterização da subpopulação de células T reguladoras. As áreas delimitadas (gates) representam as populações consideradas para análise. Primeiramente foram retiradas as interferências do laser pelo gate Time (FL-2 x Time) (A) e possíveis agrupamentos celulares através do gate singlets (FSC-H x FSC-A) (B). Na sequência foi delimitada a população de linfócitos totais seguindo os parâmetros de granulosidade (SSC) e tamanho (FSC) (C), seguido da seleção da subpopulação de linfócitos T determinada pela expressão da molécula de superfície CD3 (SSC x CD3) (D). Para delimitação de células Treg CD4⁺ foi selecionada a população celular que expressa simultaneamente às moléculas CD4 e CD25 (E-F), seguida da seleção da população Foxp3⁺ e que possui baixos níveis e/ou não expressa a molécula CD127 (G). A leitura foi realizada do LSRFortessa (700.000 eventos por tubo) e os dados analisados pelo software FlowJo®.

Figura 3: Estratégia de análise para mensuração de moléculas supressoras em células T reguladoras. As moléculas supressoras CTLA-4, LAP e CD39 foram analisadas dentro da população de células Treg (CD127^{low/-}Foxp3⁺) (A). A primeira coluna (B) é referente ao controle de marcação – FMO (Fluorescence Minus One), em que foi selecionado o corte da população desejada, a segunda coluna (C) mostra a marcação celular com os anticorpos específicos para molécula. A leitura foi realizada do LSRFortessa e os dados analisados pelo software FlowJo®.

Com a finalidade de analisar a função das células Treg, foram avaliados, por citometria de fluxo, marcadores diretamente relacionados à sua capacidade supressora. Para isto, as mesmas células marcadas para análise da frequência de Treg foram também marcadas com anticorpos específicos para CTLA-4, LAP e CD39 (tabela 4). Dentro da população de células CD127^{low/-}FoxP3⁺ (Figura 3A), foi selecionada a população positiva para cada molécula analisada (Figura 3C) a partir do tubo FMO (Fluorescence Minus One) (Figura 3E).

3.7. Análise de células T reguladoras em PBMCs estimuladas *in vitro*

A frequência de células Treg foi avaliada após estímulo em cultura, como descrito anteriormente¹¹⁷. Para tanto, após separação por Ficoll, a concentração de PBMCs foi ajustada para 2,5x10⁶ células/mL e então ressuspensas em RPMI suplementado com 10% de soro

AB (Sigma, USA), a suspensão foi distribuída em placa de cultura de 24 poços. Desde modo, foram estimuladas, por quatro dias com antígeno *M. leprae* (MLCwA) (5 μ g/mL), células no seu estado basal também foram analisadas. Como controle positivo foi utilizado PHA (10 μ g/mL) por dois dias. A placa foi incubada em estufa de CO₂ a 37°C durante o tempo de cultura. Após o término da cultura, as células foram marcadas para análise por citometria de fluxo da frequência das células Treg, de acordo com o protocolo de marcação extracelular e intracelular descrito acima. E analisadas de acordo com a mesma estratégia de análise já mencionada.

3.8. Reação imunohistoquímica para detecção da expressão de FoxP3

A caracterização imuno-fenotípica do infiltrado inflamatório foi realizada pelo método imuno-histoquímico de estreptavidina-biotina peroxidase (Streptavidin-Biotin Complex – SABC), com metodologia parcialmente modificada e padronizada pelo Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, como descrito previamente¹¹⁷. As biópsias estudadas foram aquelas obtidas durante a rotina diagnóstica (à entrada no ambulatório e durante o tratamento para investigação diagnóstica das reações e controle de tratamento). A análise histológica é feita de rotina no laboratório de Dermatopatologia pela Dra. Neusa Sakai-Valente, da Divisão de Clínica Dermatológica HC-FMUSP.

Cortes histológicos de 4 μ m de espessura foram desparafinados em xilol a temperatura ambiente durante 20 e 10 minutos, sendo posteriormente hidratados em concentrações decrescentes de etanol (100%, 95%, 70%) e lavados em água corrente, destilada e PBS. Para bloqueio de peroxidase endógena foi realizada duas incubações, em câmara escura, com água oxigenada (H₂O₂) 10 volumes a 3% por 15 minutos cada. Em seguida, foi feito a recuperação antigênica realizada através de calor úmido, para isso os cortes foram imersos em tampão ácido acético diaminotetraetileno (Tris/EDTA) pH 9, em banho-maria à 95°C por 25 minutos. Após lavagem com água corrente, destilada e com PBS foi realizado o bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido com incubação em solução de leite desnatado (Molico, Nestlé) a 10 % por 30 minutos à temperatura ambiente.

A etapa seguinte foi incubação das lâminas com o anticorpo primário, este foi diluído em solução de soro-albumina bovina (BSA) a 1% por 12 horas (overnight) a 4°C. Após este período, os cortes foram incubados com anticorpo secundário universal biotinilado (anti-

camudongo, anti-coelho, anti-cabra) do Kit LSAB peroxidase (DakoCytomation, USA) por 30 minutos a 37°C. Em seguida foram incubados com o reagente Estreptavidina peroxidase (DakoCytomation, USA) por 30 minutos a 37°C. Após nova lavagem em água e PBS, a reação imunohistoquímica foi realizada com o emprego do cromógeno 3'3 diamino-benzidina (DAB) (Sigma Chemical CO, USA) acrescido de água oxigenada (H₂O₂) a 3%.

Por fim, os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Mayer's (Dako North America, USA). Após lavagem com água e PBS foram diafinizados em xilol e montados em resina "permount" (Fisher Scientific).

Todas as reações serão acompanhadas de controles positivos. Os controles negativos serão feitos com omissão do anticorpo primário.

A análise morfométrica da população de células Foxp3⁺ foi avaliada de forma quantitativa utilizando o programa Image-Pro Plus. Foram analisados seis campos, excluindo áreas de dobras do corte histológico e artefatos, fotografadas no aumento de 400x e as células imunomarcadas foram quantificadas.

3.9. Separação de células CD4⁺ por beads magnéticas

Após obtenção de PBMCs, as células foram purificadas através do método de separação magnética por beads utilizando o protocolo do Kit de isolamento de células TCD4⁺ (CD4⁺ T Cell Isolation Kit II - Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Para tanto, após lavagem (453g por 10 minutos) as PBMCs ressuspendidas em tampão MACS® Buffer (Miltenyi Biotec) e marcadas com um coquetel de anticorpos monoclonais conjugados com biotina contra CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR / e glicoporina A, e incubadas por 10 minutos a 4°C.

Subsequentemente as células foram marcadas microbeads anti-biotina e novamente incubadas por 15 minutos a 4°C. Após lavagem foi realizada a seleção negativa em que as células marcadas serão acondicionadas em coluna LD (Miltenyi Biotec, Germany) acoplada a campo magnético VarioMacs (Miltenyi Biotec, Germany). Células CD4⁺ que passaram diretamente pela coluna foram utilizadas para a expansão de Tregs descrito a seguir, sendo que os outros tipos celulares retidos na coluna foram desprezados.

3.10. Expansão *in vitro* de células T reguladoras (Tregs)

A partir da obtenção de PBMCs e separação de linfócitos CD4⁺, como descrito anteriormente, a concentração celular foi ajustada para $2,5 \times 10^6$ células/mL e então ressuspendidas em AIM V® suplementado com 10% de soro AB (Sigma, USA), a suspensão será distribuída em placa de cultura de 24 poços. Desta maneira, serão estimuladas de acordo com os protocolos descritos a seguir:

3.10.1. Protocolo Rapamicina

Foi utilizado protocolo baseado em Battaglia et al.¹²⁶. Após purificação, as células CD4⁺ foram distribuídas em placa de 24 poços pré-sensibilizada com anti-CD3 (10µg/mL) e então estimuladas com 1µg/mL de anti-CD28 e 100nM de Rapamicina. A placa foi incubada em estufa de CO₂ a 37°C por 21 ou 28 dias. No 7º e 14º dia as células foram reforçadas com 10µg/mL de anti-CD3, 1µg/mL de anti-CD28, Rapamicina (100nM) e rIL-2 (250U/ml). No 21º ou 28º dia as células foram coletadas e marcadas para avaliação fenotípica de Tregs por citometria de fluxo e avaliação funcional, como descrito nos itens 1.4, exceto os marcadores funcionais e 1.9.

Figura 4: Linha do tempo representando o protocolo Rapamicina.

3.10.2. Protocolo TGF-

Foi utilizado protocolo baseado em Fantini et al.¹²⁷. Resumidamente, após plaqueamento, as células CD4⁺ purificadas foram estimuladas com as seguintes concentrações de citocinas: 1µg/mL de anti-CD3, 5µg/mL de anti-CD28, 250U/mL de rIL-2 e 25µg/mL de rTGF-. A placa foi incubada em estufa de CO₂ a 37°C por 21 ou 28 dias. Nos dias 7 e 14, as células foram reestimuladas com rTGF- (2,5µg/mL), rIL-2 (250U/mL), anti-CD3 (1µg/mL) e anti-CD28 (5µg/mL). No 21º ou 28º dias as células foram coletadas e marcadas para avaliação

fenotípica de Tregs por citometria de fluxo, e avaliação funcional, como descrito nos itens 1.4, exceto os marcadores funcionais e 1.9.

Figura 5: Linha do tempo representando o protocolo TGF .

3.10.3. Protocolo Vitamina D₃

Foi utilizado protocolo baseado em Jeffery et al.¹²⁸. Após plaqueadas as células CD4⁺ purificadas foram estimuladas com as seguintes concentrações de citocinas: 1 μ g/mL de anti-CD3, 5 μ g/mL de anti-CD28 recombinante, 250U/mL de rIL-2 e 100nM de vitamina D₃. A placa foi incubada em estufa de CO₂ a 37°C por 21 ou 28 dias. No 7º e 14º dia a cultura foi novamente reforçada com rIL-2 (250U/mL) e vitamina D₃ (100nM). No dia 21 ou 28 as células foram coletadas e marcadas para avaliação fenotípica de Tregs por citometria de fluxo e avaliação funcional, como descrito nos itens 1.4, exceto os marcadores funcionais e 1.9.

Figura 6: Linha do tempo representando o protocolo Vitamina D₃.

3.11. Ensaio para avaliação da atividade supressora de Tregs

3.11.1. Marcação das PBMCs com Carboxifluoresceína Sucinimidil Ester

A mensuração da proliferação celular (ensaio de supressão) foi realizada por citometria de fluxo pela marcação das células com o corante Carboxifluoresceína Sucinimidil Ester (CFSE – Molecular Probes®).

Para este ensaio, PBMCs foram primeiramente marcados com CFSE seguindo as orientações do fabricante. Resumidamente, $1,5 \times 10^7$ células/mL foram mantidas em 1 mL de RPMI 1640 aquecido (37°C) com a concentração de $3\mu\text{M}$ de CFSE (concentração já estabelecida no laboratório), por 15 minutos a 37° sob agitação. Após este período, o excesso do corante foi retirado por meio de 3 lavagens com RPMI + 10% de soro fetal bovino (SFB - Gibco®). Em seguida as PBMCs marcadas foram utilizadas para realização do co-cultivo de Tregs, como descrito abaixo.

3.11.2. Co-cultivo para avaliação da função supressora de Tregs dependente de contato

Após expansão as Tregs obtidas com diferentes coquetéis de estímulos foram avaliadas funcionalmente, ao qual foi analisada sua capacidade em suprimir uma resposta imune através do contato célula-célula. Sendo assim, foi realizado através do co-cultivo com diferentes proporções de PBMCs autólogas marcadas com CFSE, como descrito no item 1.9.1. Tais células foram estimuladas com anti-CD3 e anti-CD28 na presença ou não das células expandidas por 21 ou 28 dias (potocolo Rapa, TGF e Vit. D₃), e distribuídas em triplicatas em placa de fundo em U de 96 poços (Corning/Costar). Foram utilizadas diferentes proporções Treg/PBMC de: 1:1, 1:2 e 1:5.

3.11.3. Marcação para avaliação da inibição da proliferação de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺

No último dia de co-cultura (21° ou 28°) as células foram coletadas e marcadas para análise da linfoproliferação de TCD4⁺ e TCD8⁺, por citometria de fluxo. Para tanto, pós lavagem com PBS 1% de BSA a 453g por 10 minutos, foram ressuspensas em 1 mL de PBS, marcadas com o marcador de viabilidade celular Fixable Viability Dye eFluor® 780

(eBioscience, USA) e incubadas por 30 minutos a 4°C na ausência de luz. Após esse período, as células foram lavadas novamente e marcadas com os anticorpos CD3, CD4 e CD8 (Tabela 1) e incubadas por 30 minutos a 4°C e na ausência de luz.

Por fim, as células foram lavadas e ressuspensas em solução isotônica BD FACS Flow® (BD Biosciences) e adquiridas em citômetro de fluxo em até 24 horas. A aquisição foi realizada no citômetro de fluxo LSRFortessa (adquiridos 100.000 eventos por tubo) com o software FACSDiva (BD Biosciences) e os dados foram analisados com a utilização do software FlowJo®V10.

Tabela 11- Relação dos anticorpos monoclonais utilizados para avaliação da capacidade das Tregs expandidas em inibir a linfoproliferação.

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Vol. de uso
CD3	BV605	SK7	2µL
CD4	V450	RPA-T4	2,5µL
CD8	AF700	RPA-T8	1,5µL

3.11.4. Estratégia de análise para avaliação da capacidade funcional das Tregs expandidas in vitro

No término do co-cultivo (5º dia), as Tregs expandidas e PBMCs foram coletadas e marcadas com anticorpos específicos (item 1.9.3) para avaliação da linfoproliferação. Após aquisição em citômetro de fluxo (LSRFORTESSA, BD Bioscience, USA), as células foram analisadas pelo software FlowJo®V10. Primeiramente foi excluído eventuais oscilações do laser (Time) (Figura 7A), seguido da seleção da população de interesse (linfócitos) seguindo os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) e seleção da população de células vivas, obtida através do marcador de viabilidade celular Viability Dye 780 (eBioscience, USA) (Figura 7B e C, respectivamente). Dentro da população de células vivas foram selecionados os linfócitos TCD4⁺ (Figura 7D) e TCD8⁺ (Figura 7E). Uma vez selecionados linfócitos CD4 e CD8 verificou-se a porcentagem de proliferação seguindo os parâmetros granulosidade (SSC) e CFSE (FITC) dentro das duas subpopulações de linfócitos T. A mesma análise foi realizada para as proporções 1:1, 1:2 e 1:5 (Figura 7F-U).

Figura 7: Estratégia de análise para avaliação da linfoproliferação de CD4⁺ e CD8⁺ resultantes do co-cultivo de PBMCs autólogas e das Tregs expandidas *in vitro*.

4 RESULTADOS

4.1. Titulação do antígeno solúvel de *M. leprae* (MLCwA)

Previamente aos ensaios para análise da frequência das células Treg estimuladas *in vitro*, foi realizada a titulação do antígeno solúvel de *M. leprae* (MLCwA). Para tanto, PBMCs separadas por Ficoll foram estimuladas por 96 horas com concentrações distintas do antígeno. A proliferação celular foi mensurada pela incorporação de timidina seguido da leitura em contador Betaplate.

A Figura 8 representa a análise da proliferação celular obtida por contagem por minuto (cpm), na qual observa-se que as diferentes concentrações do antígeno MLCwA testadas, 30µg/mL, 20µg/mL, 10µg/mL e 5µg/mL foram capazes de induzir a proliferação celular em proporções similares (médias: 23.741; 28.664; 28.147 e 29.581 com, respectivamente). Deste modo, a concentração utilizada para realização dos ensaios *in vitro* foi de 5µg/mL.

Figura 8: Titulação do antígeno de *M. leprae*. PBMCs foram estimuladas por 96 horas com as seguintes concentrações do antígeno solúvel de *M. leprae* (MLCwA): 30µg/mL, 20µg/mL, 10µg/mL e 5µg/mL (barras em azul). Como controle positivo foi utilizado Pokeweed (PWN; 10 µg/mL), células no seu estado basal também foram analisadas (barra verde). A proliferação celular foi avaliada pela incorporação de timidina triciada (0,5 µCi/poço) e a radioatividade medida em contador beta. Os valores representados são referentes a média das triplicatas de cada variável.

4.2. Avaliação da frequência das células T reguladoras (Tregs) e de suas moléculas supressoras

A primeira etapa do projeto consistiu na análise da frequência das células Tregs no sangue periférico em cinco grupos distintos: pacientes com reação tipo 1 (R1), reação tipo 2 (R2), em pacientes multibacilares (MB) sem reação. Como controles foram analisados dois grupos: contatos de portadores de hanseníase (contatos) e indivíduos saudáveis, porém que não convivem com portadores da doença (controles). Para tanto, após separação por Ficoll, PBMCs foram marcadas com anticorpos específicos para CD3, CD4, CD25, CD127 (Tabela 1) e para o fator de transcrição Foxp3, seguido da aquisição em citômetro de fluxo. Foram consideradas Treg a células que expressam todos os marcadores citados acima, exceto CD127 que no caso desse subtipo celular apresentam baixa ou ausência de expressão.

A Figura 9A representa a análise *ex vivo* da subpopulação de células Tregs, em que podemos observar que pacientes MB sem reação (média $\pm$ SEM: $3,9 \pm 0,5\%$), contatos ($3,4 \pm 0,2\%$), controles ($3,4 \pm 0,4\%$) e pacientes com reação tipo 1 (R1) ($3,4 \pm 0,4\%$), apresentam uma frequência significativamente maior de Tregs quando comparados com pacientes com reação tipo 2 (R2) ($1,7 \pm 0,2\%$). O mesmo não acontece quando comparamos R1 com o grupo controle (MB sem reação, contato e controle), e os grupos controles entre si.

Figura 9: Avaliação da frequência e expressão de moléculas supressoras em células T reguladoras presentes no sangue periférico. A: análise da proporção de células Treg no sangue periférico de pacientes com reação tipo 1 (R1; n=13), com reação tipo 2 (R2; n=14), paciente multibacilar sem reação (MB; n=7), indivíduo saudável que convive frequentemente com pacientes multibacilares (Contato; n=11) e indivíduo saudável sem contato com portadores da doença (Controle; n=8). Resultados apresentados em média±SEM em cada grupo estudado. (**) $p < 0,001$ (***) $p < 0,0001$. B: análise de moléculas supressoras CD39, LAP e CTLA-4 expressas em Treg presentes no sangue periférico de R1 (n=9), R2 (n=7) e em contato (n=9). Resultados apresentados em mediana e percentis 25 e 75%.

As células Tregs exercem seu papel supressor por meio de moléculas ligadas a sua superfície celular e pela secreção de citocinas. Simultaneamente a análise de sua frequência *ex vivo* foi realizada a avaliação da função das Treg, por meio da análise de moléculas associadas à supressão da resposta imune, CD39, LAP e CTLA-4, em pacientes com R1, R2 e contatos (Figura 9B). Os resultados demonstraram que em todos os grupos estudados, R1 (n=9), R2 (n=7) e contato (n=9) houve alta e comparável expressão da molécula CD39 em células Tregs (medianas: R1=49,5%; R2=53,5%; Contato=54,5%). LAP, em contraste, foi relativamente pouco expressa pelas Treg dos três grupos (média < 13%). Em relação à molécula CTLA-4, observamos também níveis baixos de expressão, com exceção do grupo R1 que mostrou média de ~25%, sugerindo portanto uma maior expressão desta molécula neste grupo.

Com a finalidade de avaliar a capacidade do bacilo de estimular células Tregs, PBMCs foram mantidas em cultura por 96 horas com antígeno solúvel de *M. leprae* (MLCwA). Como controle positivo as células foram estimuladas com PHA. As células foram coletadas e marcadas da mesma forma que para a análise *ex vivo*. Os dados apresentados (Figura 11) indicam que apesar da proporção de células Tregs presentes no sangue periférico de pacientes com reação tipo 2 ser menor que nos grupos controles, uma vez estimuladas com MLCwA (estímulo específico) e com PHA, apresentam potencial de indução/expansão *in vitro* comparando com sua proporção sem estímulo. Entretanto, a expansão frente ao estímulo com MLCwA foi menor do que a observada nos contatos ($p < 0.05$). Com PHA, não houve diferença entre os grupos (R1=19%, R2=16,5% e contato=21,1%).

Células T efetoras ativadas (CD25⁺) expressam transitoriamente o fator de transcrição Foxp3, no entanto para desconsiderar tais células da análise consideramos células que apresentam baixa expressão ou não expressam CD127, molécula presente em células em células T efetoras e de memória.

Figura 10: Figura representativa da análise da frequência de células T reguladoras estimuladas *in vitro*. Após estímulo em cultura (96 hrs – MLcWa e 48 hrs – PHA) PBMCs foram marcadas com monoclonais específicos e adquiridas em citômetro de fluxo. A análise foi realizada pelo software FlowJo®. Nos dotplots a esquerda foram selecionadas células CD4⁺CD25⁺, a partir desse *gate* foram quantificadas as células Treg (Foxp3+CD127^{low/-}) apresentado nos dotplots a direita. A: PBMCs sem estímulo (basal); B: PBMCs estimuladas com MLcWa; C: células estimuladas com fitohemaglutinina (PHA).

Figura 11: Análise da frequência de células Tregs após estímulo *in vitro*. Análise da proporção de Treg após estímulo *in vitro* por 96 horas com o antígeno de *M. leprae* (MLCwA) e 48 horas com fitohemaglutinina (PHA) em R1 (n=12), R2 (n=13) e Contato (n=10), os dados obtidos foram comparados com as células sem estímulo. As linhas horizontais representam a média±SEM da frequência de Treg em cada grupo estudado. (*) $p < 0,05$.

A mesma avaliação foi realizada com células estimuladas *in vitro* (Figura 12). Para tanto, PBMCs marcadas com anticorpos para caracterização de células Treg também foram marcadas com anticorpos para análise da expressão das moléculas CD39(A), LAP (B) e CTLA-4 (C).

Apesar da variação individual, os resultados obtidos mostram que, *in vitro*, porcentagem significativas das células Treg dos três grupos estudados (R1, R2 e contato) expressam a molécula CD39, sem estímulo (medianas > 50%) e frente ao estímulo com MLCwA (medianas > 20%). Com PHA houve nítida diminuição da expressão de CD39 em relação às células estimulada com MLCwA nos pacientes com R1 e R2 e controles (Figura 12A).

Quanto à molécula LAP (Figura 12B), observa-se que nos três grupos houve tendência ao aumento da expressão com PHA. Quando não estimuladas e estimuladas com MLCwA, as Treg apresentaram baixos níveis de expressão de LAP em pacientes R1 e em contatos (medianas < 6%). Em pacientes com R2 foi observado níveis discretamente mais elevados em R2 não estimuladas (medianas = 5,5%), porém esses níveis diminuem frente ao estímulo com MLCwA (medianas = 5,5% vs. 3,1%).

O mesmo foi observado para a expressão de CTLA-4, em que os resultados mostraram alta expressão frente ao estímulo com PHA em todos os grupos estudados, o contrário foi

observado nas células sem estímulo, em que houve baixa expressão da molécula (<15%). Apenas nos grupos R1 e contatos houve tendência a aumento da expressão de CTLA-4 com MLCwA (mediana acima de 15%) (Figura 12C).

Figura 12: Avaliação da expressão de moléculas associadas à supressão de T reguladoras. Após 96 horas estimuladas com MLCwA e 48 horas com PHA, PBMCs foram marcadas com anticorpos específicos para análise da expressão de moléculas associadas a supressão presentes em células Treg. A: células Treg que expressam a molécula CD39 em R1 (n=3), R2 (n=6) e contato (n=10); B: células Treg que expressam a molécula LAP (n: R1=4; R2=7; contato=10); C: células Treg que expressam a molécula CTLA-4 (n: R1=5; R2=7; contato=9). Resultados apresentados em mediana e percentis 25 e 75% da frequência de Treg em cada grupo estudado.

4.3. Avaliação da expressão do fator de transcrição FoxP3 em biópsias de lesão de pele

Uma vez avaliada a proporção de células Treg no sangue periférico, realizamos a análise por imunohistoquímica da expressão do fator de transcrição FoxP3 em biópsia de lesões de pele de pacientes com reação tipo 1 (R1), reação tipo 2 (R2) e como controle, biópsias de pacientes multibacilares (MB) sem reação, uma vez que todos os pacientes (R1 e R2) incluídos no estudo foram classificados como multibacilares (Figura 14A). A análise foi realizada através da contagem de células imuno-marcadas (células coradas em marrom) com morfologia de linfócitos presentes nos infiltrados inflamatórios.

Figura 13: Foto representativa da imuno marcação da molécula FoxP3. Biópsias de lesões de pacientes com R1 (A), R2 (B) foram marcadas através da técnica de imunohistoquímica, para análise de células FoxP3⁺ (células coradas em marrom) presentes nos infiltrados inflamatórios. Aumento: 400x.

Os dados obtidos na quantificação de células FoxP3⁺ por imunohistoquímica corroboram os dados da análise da frequência de células Treg presentes no sangue periférico (Figura 14A). Pacientes com R2 apresentam um número significativamente menor de células/linfócitos expressando Foxp3 na lesão (média $\pm$ SEM: $44,5 \pm 9,5$ céls/mm²) que em pacientes com R1 ($170,1 \pm 23,2$ céls/mm², $p < 0,0001$) e pacientes multibacilares (MB) sem reação ($215,6 \pm 25,7$ céls/mm², $p < 0,0001$). Apesar das medianas nos grupos R1 e MB sem reação diferirem, esta diferença não alcançou significância estatística (Figura 14A).

Figura 14: Quantificação de células expressando FoxP3 *in situ*. (A) Expressão de FoxP3 em biópsias de lesões de pacientes com R1 (n=12), R2 (n=14) e em pacientes multibacilares (MB) sem reação (n=12). (B) Análise da expressão de Foxp3 em pacientes com R1 (n=7) e R2 (n=8) antes de entrar em reação e durante o episódio reacional. As linhas horizontais representam a mediana de cada grupo estudado. (**) $p < 0,001$; (***) $p < 0,0001$

Com a finalidade de compreender a relação das células Tregs com os quadros dos episódios reacionais, foi realizada análise imunohistoquímica para expressão de FoxP3 em biópsias de lesões de pacientes antes de desenvolverem a reação e durante a reação (Figura 14B). A análise foi realizada com descrito anteriormente. Os dados obtidos demonstraram um comportamento distinto entre pacientes com R1 e com R2. Enquanto em pacientes com R1 há tendência ao aumento de Treg em comparação a ausência da reação (média: 53,44 vs. 125,3 céls/mm²), no grupo R2 há sugestão de diminuição de Treg em comparação ao mesmo paciente na ausência da reação (média: 57,82 vs. 31,98 céls/mm²). Vale ressaltar que antes de desenvolverem reação, tanto R1 quanto R2, os pacientes possuíam quantidades comparáveis de células FoxP3+ nas lesões (médias: R1: 53,44; R2: 57,82 céls/mm²).

4.4. Avaliação de células IL-17+ em biópsias de lesões de pele dos pacientes com hanseníase

Uma vez realizada a quantificação de células FoxP3+ nas biópsias de lesões de pele dos pacientes com R1, R2 e no grupo controle (MB sem reação), analisamos a expressão de células IL-17+ nas lesões de pele dos mesmos pacientes. A análise foi realizada através da contagem de células imuno-marcadas (células coradas em marrom) com morfologia de linfócitos presentes nos infiltrados inflamatórios.

Figura 15: Foto representativa da imuno marcação da citocina IL-17. Biópsias de lesões de pacientes com R1 (A), R2 (B) foram marcadas através da técnica de imunohistoquímica, para análise de células IL-17+ (células coradas em marrom) presentes nos infiltrados inflamatórios. Aumento: 400x

Os dados obtidos mostram que pacientes com R2 apresentam um número significativamente maior de células IL-17+ nas lesões de pele (média $\pm$ SEM: 295 ± 49 céls/mm²) em relação aos pacientes com R1 (114 ± 27) e ao grupo controle (135 ± 22). Não houve diferença significativa entre o grupo R1 e os controles (Figura 16A).

Com a finalidade de compreender a relação das células Th17 com os quadros dos episódios reacionais, foi realizada análise imunohistoquímica para detecção da citocina IL-17 em biópsias de lesões de pacientes antes de desenvolverem a reação e durante a reação (Figura 16B). Os dados demonstraram que não houve diferença significativa no número de células IL-17+ antes do quadro reacional quando comparados R1 e R2 ($96,5$ vs. $166,3$ céls/mm²). Entretanto, é notável o aumento dessas células quando o paciente desenvolve R2 (média: $341,6$ céls/mm²), sendo que há uma tendência à diminuição em R1 ($67,8$ céls/mm²).

Figura 16: Quantificação de células IL-17+ em biópsias de lesões de pele. (A) Expressão de células IL-17+ em biópsias de lesões de pacientes com R1 (n=10), R2 (n=13) e em pacientes multibacilares (MB) sem reação (n=11). (B) Análise da expressão de IL-17 em pacientes com R1 (n=5) e R2 (n=8) antes de entrar em reação e durante o episódio reacional. As linhas horizontais representam a média±SEM da frequência de Treg em cada grupo estudado. (**) $p < 0,001$

4.5. Análise de células IL-6+ e TGF + em biópsias de lesões de pele dos pacientes com hanseníase

Com a finalidade de compreender o aumento de células IL-17+ nas lesões de pele de pacientes com R2, foram avaliadas nas lesões a presença de IL-6 e TGF , citocinas envolvidas na diferenciação de linfócitos Th17.

Figura 17: Foto representativa da imuno marcação da citocina IL-6. Biópsias de lesões de pacientes com R1 (A), R2 (B) foram marcadas através da técnica de imunohistoquímica, para análise de células IL-6+ (células coradas em marrom) presentes nos infiltrados inflamatórios. Aumento: 400x

Os valores obtidos na quantificação da citocina IL-6 nas biópsias das lesões de pele dos pacientes (R1, R2 e MB) foram muito baixos (< 35 céls/mm²) (Figura 18A). A mesma avaliação foi realizada em biópsias adquiridas antes e durante os pacientes entrarem em R1 ou em R2, porém novamente foram obtidos valores baixos tanto em R1 quanto em R2 antes e durante a reação (Figura 18B).

Com relação à quantificação de TGF β nas lesões, foi observada diminuição das células positivas para essa citocina na R2 em comparação a observada em R1 e no grupo controle (112,2 vs. 249 vs. 269,9 céls/mm²). Com relação a R1 e o controle, os valores obtidos foram comparáveis (Figura 18C).

Figura 18: Quantificação de células IL-6+ e TGF β em biópsias de lesões de pele. (A) Expressão de células IL-6+ em biópsias de lesões de pacientes com R1 (n=8), R2 (n=12) e em pacientes multibacilares (MB) sem reação (n=10). (B) Análise da expressão de IL-6 em pacientes com R1 (n=5) e R2 (n=7) antes de entrar em reação e durante o episódio reacional. (C) Quantificação de células TGF β + em pacientes com R1 (n=12), R2 (n=14) e pacientes multibacilares (MB) sem reação (n=12). As linhas horizontais representam a média±SEM da frequência de Treg em cada grupo estudado. (*) $p<0,01$

4.6. Avaliação da indução/expansão *in vitro* das Tregs sob o efeito de três protocolos distintos

É de fundamental importância o desenvolvimento de metodologias apropriadas para viabilizar a expansão de células T reguladoras *in vitro* para permitir estudos funcionais das mesmas, uma vez que estas células constituem geralmente <5% das PBMCs (em algumas formas clínicas, <2%).

Sendo assim, após análise da frequência das Tregs no sangue periférico, em PBMCs estimuladas com o antígeno de *M. leprae* (MLCwA) e nas biópsias das lesões de pacientes tanto com reação tipo 1 e tipo 2 como também nos grupos controles, foi realizada expansão *in vitro* das Tregs seguindo três diferentes protocolos descritos na literatura: Rapamicida¹²⁶, TGF¹²⁷ e Vitamina D₃¹²⁸.

Para tanto, após separação por beads magnéticas, os linfócitos TCD4⁺ foram estimulados por 21-28 dias, de acordo com os protocolos específicos de expansão (Figuras 4-6). Para expansão *in vitro* de Tregs utilizam-se coquetéis constituídos por potentes ativadores de linfócitos (IL-2 e CD3/CD28) e as células são mantidas por um longo tempo em cultura (até 28 dias). Em virtude disso, primeiramente foi realizada a avaliação da viabilidade celular das Tregs ao final do protocolo d expansão (21º-28º dia) por meio do marcador de viabilidade Live/Dead (BD Bioscience, USA), e análise por citometria de fluxo.

Na figura 19 observa-se que com o protocolo Rapamicina a média de células vivas foi superior a 90% nos quatro grupos estudados (PB: 91,9%; MB: 91,3%; R1: 91,5%; R2: 98,8%). Entretanto, quando foi utilizado o protocolo TGF observou-se também um abo viabilidade celular, porém discretamente menor do que o visto com o protocolo Rapamicina, exceto no grupo R2 (PB: 87,2%; MB: 77,9%; R1: 80,3%; R2: 92,1%). Na expansão com o protocolo Vitamina D₃ também foi observado viabilidade maior que 80% nos três grupos estudados (PB: 88%; R1: 98.1; R2: 89%).

Figura 19: Avaliação da viabilidade das Tregs submetidas à expansão *in vitro*. Análise comparativa da viabilidade celular no 21º-28º dia de cultura em células expandidas pelos protocolos Rapamicina (n: paucibacilar = 3; multibacilar = 3; R1 = 2; R2 = 3), TGF (n: paucibacilar = 3; multibacilar = 3; R1 = 2; R2 = 3) e Vitamina D₃ (n: paucibacilar = 1; R1 = 1; R2 = 1). A leitura foi realizada no LSRFortessa e os dados analisados pelo software FlowJo® V10. Resultados apresentados em média ± SEM.

Uma vez verificada a boa viabilidade celular pós-expansão, foi realizada a análise do potencial de indução/expansão de cada protocolo. Para isto, no 21º-28º dia de cultura as células foram coletadas e marcadas com anticorpos específicos para CD3, CD4, CD25, CD127 e para o fator de transcrição FoxP3, e adquiridas em citômetro de fluxo. Foram consideradas Treg a células que expressam todos os marcadores citados acima, exceto CD127 que no caso desse subtipo celular apresenta baixa ou ausência de expressão. A figura 21 representa a análise da frequência das Tregs expandidas com o protocolo Rapamicina (Figura 21E-G), TGF (Figura 21H-J) e Vitamina D₃ (Figura 21K-M). As células pós-expansão exibem aumento de seu tamanho e complexidade de acordo com os parâmetros FSCxSSC (Figura 20C vs. Figura 21B) e maior frequência de células que expressam as moléculas CD4 e CD25 que as células *ex vivo* (Figura 20E vs. Figura 21E, H e K), sugerindo um maior estado de ativação após a expansão. Esse padrão de aumento de ativação foi visualizado nos quatro grupos estudados.

Figura 20: Análise *ex vivo* da subpopulação de Tregs antes do início da expansão. As áreas delimitadas (gates) representam as populações consideradas para análise. Primeiramente foram retiradas as interferências do laser pelo gate Time (FL2-PE x Time) (A) e possíveis agrupamentos celulares através do gate singlets (FSC-H x FSC-A) (B). Na sequência foi delimitada a população de linfócitos totais conforme os parâmetros de granulosidade (SSC) e tamanho (FSC) (C), seguido da seleção da subpopulação de linfócitos T determinada pela expressão da molécula de superfície CD3 (SSC x CD3) (D). Para delimitação de células Treg CD4⁺ foi selecionada a população celular que expressa simultaneamente às moléculas CD4 e CD25 (E), seguida da seleção da população Foxp3⁺ e que possui baixos níveis e/ou não expressa a molécula CD127 (F). A leitura foi realizada do LSRFortessa (700.000 eventos/ tubo) e os dados foram analisados pelo software FlowJo V10®.

Figura 21: Figura representativa da análise para caracterização da subpopulação de Tregs - linfócitos $CD4^+$ expandidas *in vitro* com três coquetéis distintos. Primeiramente foram retiradas as interferências do laser pelo gate Time (FL2-PE x Time) (A). Na sequência foi delimitada a população de linfócitos totais conforme os parâmetros de granulosidade (SSC) e tamanho (FSC) (B), seguido da seleção de células vivas (SSC x L/D) (C). A subpopulação de linfócitos T foi determinada pela expressão da molécula de superfície CD3 (SSC x CD3) (D). Para delimitação de células Treg $CD4^+$ foi selecionada a população celular que expressa simultaneamente às moléculas CD4 e CD25, seguida da seleção da população Foxp3+ e que possui baixos níveis e/ou não expressa a molécula CD127. E-G, análise das Tregs expandidas com o protocolo Rapamicina; H-J protocolo TGF ; e K-M protocolo Vitamina D_3 . A leitura foi realizada do LSRFortessa (700.000 eventos/ tubo) e os dados foram analisados pelo software FlowJo V10@.

Após 21-28 dias de expansão foi observado expressivo aumento da frequência das Tregs em relação ao início (dia 0) nos três protocolos testados: Rapamicina, TGF e Vitamina D_3 (Figura 22). Os resultados obtidos demonstraram que, nos quatro grupos estudados houve maior frequência de Tregs quando utilizado o protocolo TGF (média $\pm$ SEM: PB = $38,5 \pm 11,1\%$; MB = $29,7 \pm 6,3\%$; R1 = $29,5 \pm 7,5\%$; R2 = $40,5 \pm 4,2\%$) em comparação com o

protocolo Rapamicina (PB = $16,4 \pm 3,6\%$; MB = $19,9 \pm 1,9\%$; R1 = $20,4 \pm 1,4\%$; R2 = $26,4 \pm 7,6\%$) e com o protocolo Vitamina D₃ (PB = $14,1\%$; R1 = $28,1\%$; R2 = $23,8\%$) (Figura 22A, C, E e G).

Paralelamente, também foi verificada a mediana de intensidade de fluorescência (MFI) do fator de transcrição FoxP3 nas Tregs após a expansão (Figura 22B, D, F, H). Os dados obtidos corroboraram os dados descritos acima da análise da frequência das Tregs, havendo aumento da MFI pós-expansão em comparação á MFI obtida no dia 0 (PB = 2279; MB = 4228; R1 = 3138; R2 = 5100). Entretanto, no protocolo TGF o MFI foi maior do que nos outros dois protocolos testados. Além disso, o protocolo Vitamina D₃ (mediana: PB = 4614; R1 = 5628; R2 = 8700) apresentou uma menor MFI com relação protocolo Rapamicina (PB = 4462; MB = 10156; R1 = 6309; R2 = 7834) e TGF (PB = 8411; MB = 13356; R1 = 11442; R2 = 10703) nos grupos estudados.

Figura 22: Avaliação da expansão das Tregs e as respectivas medianas de intensidade de fluorescência (MFI) do fator de transcrição FoxP3, obtidas com o protocolo Rapamicina, TGF e Vitamina D₃. A frequência de Tregs e a MFI foram analisadas após a expansão *in vitro* de 21-28 dias nos grupos: **A-B**, paucibacilar (n: Rapa = 3; TGF = 3; Vit D₃ = 1); **C-D**, multibacilar (Rapa = 3; TGF = 3); **E-F**, R1 (Rapa = 2; TGF = 2; Vit D₃ = 1); **G-H**, R2 (Rapa = 3; TGF = 3; Vit D₃ = 1). Os dados obtidos foram comparados com a frequência de Tregs da análise *ex vivo* (dia 0). Resultados apresentados em média ± SEM.

4.7. Análise da atividade supressora de Tregs expandidas *in vitro* com os protocolos Rapamicina, TGF e Vitamina D₃ em pacientes com hanseníase

Para avaliar se as Tregs expandidas *in vitro* através dos protocolos Rapamicina (Rapa), TGF e Vitamina D₃ (Vit D₃) apresentam atividade supressora, foi realizado ensaio para avaliação da inibição da proliferação de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ autólogas. Para isso, Tregs previamente expandidas com os três protocolos foram co-cultivadas com PBMCs autólogas, previamente marcadas com CFSE. Utilizou-se proporção de Treg:PBMCs de 1:1, 1:2 e 1:5. O controle positivo consistiu em PBMCs estimuladas com CD3/CD28 na ausência das Tregs. O índice de proliferação foi mensurado por citometria de fluxo.

As Figuras 23-26 representam a análise individual da inibição da proliferação pelas Tregs expandidas nos quatro grupos estudados: PB (n=3), MB (n=3), R1 (n=2) e R2 (n=3). Os resultados obtidos demonstraram que, nos três pacientes com a forma PB, houve diminuição da proliferação de linfócitos TCD4⁺ quando utilizado na co-cultura Tregs expandidas com rapamicina, nas três diferentes proporções, 1:1, 1:2 e 1:5. Como esperado, a inibição da proliferação foi maior na medida que aumentava a proporção de Tregs na cocultura (Figura 23A-C).

O mesmo foi observado quando utilizado o protocolo TGF : houve diminuição da proliferação de linfócitos T CD4⁺ nas diferentes proporções testadas (1:1, 1:2 e 1:5), havendo maior proliferação com o aumento da proporção, exceto no paciente 3 que apresentou percentual de proliferação equivalente nas proporções 1:2 e 1:5. Nos pacientes 2 e 3 nota-se que houve maior proliferação nas coculturas com Tregs do protocolo TGF do que nas Tregs do protocolo Rapa (Figura 23B e C).

Com relação à co-cultura com Tregs do protocolo Vit D₃, testada apenas na proporção 1:1 em um paciente, foi observado diminuição da proliferação, porém a inibição foi menor do que a observada com Tregs dos protocolos Rapa e TGF .

Em seguida, foi avaliada a inibição da proliferação de linfócitos TCD8⁺ e novamente foi observado inibição da proliferação quando utilizado na co-cultura Tregs do protocolo Rapa e TGF nas proporções 1:1, 1:2 e 1:5, sendo que no paciente 3 houve maior proliferação na proporção 1:2 do que na 1:5 com Tregs do protocolo TGF. Da mesma forma que em linfócitos TCD4⁺, novamente foi observado uma menor inibição da proliferação com Tregs do protocolo Vit D₃ (Figura 23D-F).

Figura 23: Avaliação individual da capacidade supressora dependente de contato das Tregs expandidas *in vitro* no grupo paucibacilar (PB). Tregs expandidas com os protocolos Rapa (n=3), TGFβ (n=3) e Vit D₃ (n=1) foram co-cultivadas em diferentes proporções com PBMCs autólogas e com anti-CD3/CD28. Após 5 dias a capacidade funcional foi avaliada pela inibição da linfoproliferação em linfócitos TCD4⁺ (A-C) e em TCD8⁺ (D-F) através da diluição de CFSE. PBMCs estimuladas com anti-CD3/CD28 na ausência das Tregs foram utilizadas como controle.

A avaliação da capacidade supressora das Tregs expandidas também foi realizada em três pacientes com a forma MB (Figura 24). Da mesma forma que o observado na forma PB, houve diminuição da proliferação de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ nas co-cultura de PBMCs com Tregs expandidas com o protocolo Rapa e TGF β , nas proporções de 1:1, 1:2 e 1:5, com exceção do paciente 2 em que a proliferação de CD4⁺ foi semelhante nas três proporções quando foram utilizadas Tregs do protocolo Rapa.

Devido a contaminação no decorrer da cultura para expansão de Tregs, não foi possível a avaliação funcional das Tregs expandidas com VitD₃.

Figura 24: Avaliação individual da capacidade supressora dependente de contato das Tregs expandidas *in vitro* no grupo multibacilar (MB). Tregs expandidas com o protocolo Rapa (n=3) e TGF β (n=3) co-cultivadas em diferentes proporções com PBMCs autólogas e com anti-CD3/CD28. Após 5 dias a capacidade funcional foi avaliada pela inibição da linfoproliferação em linfócitos TCD4⁺ (A-C) e em TCD8⁺ (D-F) através da diluição de CFSE. PBMCs estimuladas com anti-CD3/CD28 na ausência das Tregs foram utilizadas como controle.

A análise da capacidade supressora das Tregs expandidas *in vitro* foi realizada em dois pacientes com R1, sendo que em apenas um foi avaliada a função das Tregs expandidas pelo

protocolo Vit D₃ (Figura 25). Pode-se observar na Figura 21 diminuição da proliferação de linfócitos TCD4⁺ e CD8⁺, quando comparada com a proliferação de PBMCs estimuladas com anti-CD3/CD28 na ausência das Treg, em dois dos protocolos testados: Rapa e TGF β . Em contrapartida, no paciente 1 foi observado que a linfoproliferação de TCD4⁺ e de TCD8⁺ aumentou com relação a PBMCs estimuladas na ausência das Tregs (controle), em co-cultura de PMBCs com Tregs do protocolo Vit D₃. No mesmo paciente notou-se também que na proporção 1:1 a proliferação de CD4⁺ e CD8⁺ foi maior que na proporção 1:2 (Treg:PBMCs), ao contrário do esperado (Figura 25A e C).

Figura 25: Avaliação individual da capacidade supressora dependente de contato das Tregs expandidas *in vitro* no grupo R1. Tregs expandidas com o protocolo Rapa (n=2), TGF β (n=2) foram co-cultivadas em diferentes proporções com PBMCs autólogas e com anti-CD3/CD28. Após 5 dias a capacidade funcional foi avaliada pela inibição da linfoproliferação em linfócitos TCD4⁺ (A e B) e em TCD8⁺ (C e D) através da diluição de CFSE. PBMCs estimuladas com anti-CD3/CD28 na ausência das Tregs foram utilizadas como controle.

Uma vez analisada a capacidade supressora das Tregs expandidas em PB, MB e R1, analisamos também a função destas células em 3 pacientes com R2 (Figura 26). Os resultados obtidos demonstram que novamente as células apresentaram capacidade de inibição da linfoproliferação de CD4⁺ e CD8⁺ quando utilizadas na co-cultura Tregs expandidas pelos três protocolos testados: Rapa, TGF β e Vit D₃. A inibição da linfoproliferação foi diminuindo à medida que a proporção PMBCs:Treg diminui, exceto no paciente 2 onde a proliferação foi

discretamente maior na proporção 1:2 do que a de 1:5 na co-cultura das Tregs expandidas com rapamicina (Figura 26B e D).

Figura 26: Avaliação individual da capacidade supressora dependente de contato das Tregs expandidas *in vitro* no grupo R2. Tregs expandidas com o protocolo Rapa (n=3), TGF (n=3) e Vit D₃ (n=1) foram co-cultivadas em diferentes proporções com PBMCs autólogas e com anti-CD3/CD28. Após 5 dias a capacidade funcional foi avaliada pela inibição da linfoproliferação em linfócitos TCD4⁺ (A-C) e em TCD8⁺ (D-F) através da diluição de CFSE. PBMCs estimuladas com anti-CD3/CD28 na ausência das Tregs foram utilizadas como controle.

5 DISCUSSÃO

Os episódios reacionais desencadeados na hanseníase são quadros agudos caracterizados por de intensa inflamação, podendo ser localizada, no caso da reação tipo 1, ou sistêmica, fenômeno visto na reação tipo 2. Como estes quadros são os maiores causadores de incapacidades em portadores da doença, um melhor esclarecimento da imunopatogenia das reações poderá direcionar a abordagem de novas estratégias terapêuticas, urgentemente necessárias, pois as abordagens atuais prevêm o uso medicações com graves efeitos adversos (corticosteróides e talidomida).

Neste contexto, o presente estudo se propôs caracterizar o papel de células T reguladoras (Tregs) nos quadros de episódios reacionais desencadeados na hanseníase, uma vez que as Tregs são consideradas a principal subpopulação celular responsável pela regulação da resposta imune.

Nossos resultados da análise da frequência das Tregs circulantes no sangue periférico indicam que pacientes com reação tipo 2 apresentam uma expressiva diminuição das Tregs em comparação com pacientes com reação tipo 1 e com grupos controles: pacientes multibacilares sem reação, indivíduos curados da hanseníase e que haviam desenvolvido vários episódios de reação tipo 2 grave; indivíduos saudáveis que mantém contato intradomiciliar com portadores da forma multibacilar (contatos); e por fim, indivíduos saudáveis sem histórico de contato prolongado com portadores da doença (não contato). Em contrapartida, e surpreendentemente, nos pacientes com R1 não houve diminuição desse subtipo celular.

Já está bem estabelecido na literatura que pacientes com a forma virchowiana apresentam um aumento no número de Treg¹¹⁷⁻¹²⁰, porém há poucos estudos relacionando estas células a episódios reacionais. Geluk et. al¹²⁴. associaram o desencadeamento da R1 com a diminuição de Tregs circulantes acompanhada da diminuição da expressão gênica de FoxP3 em um estudo longitudinal de um paciente Além da observação ter sido feita a partir de um único caso, o conjunto de marcadores utilizados para caracterização das Tregs por citometria de fluxo foram distintos dos nossos, por exemplo: não foi realizada marcação intranuclear para FoxP3, e as Tregs foram caracterizadas como células CD4⁺ expressando CD39 e CCL4, ou expressando altos níveis de CD25 apenas.

Outros dois outros estudos de um mesmo grupo avaliaram a frequência de Treg nas diferentes formas clínicas da doença (TT, dimorfos e LL) comparando com pacientes com R2 apenas no primeiro estudo¹²³, e com pacientes com R2 e R1 no estudo subsequente¹²⁵. Em ambos observaram diminuição das Tregs na R2. Porém, quando analisados os pacientes não reacionais observaram o oposto do descrito na literatura: aumento das Tregs no polo

tuberculóide e diminuição no polo virchowiano. A estratégia para caracterização das Tregs nesse trabalho novamente difere da nossa, uma vez que utilizam como marcadores células com altos níveis de CD25 (CD25^{high}), e eventualmente, FoxP3⁺, e não consideraram a ausência de expressão da molécula CD127.

Por fim, Saini et. al.¹²⁹ observaram redução na MFI de FoxP3 tanto na R1 quanto na R2 quanto comparados com os pacientes não reacionais (DT e LL) em PBMCs estimuladas com *M. leprae*. Contudo, esse estudo apresenta algumas limitações, como (a) apenas pelo resultado do MFI o autor infere que a frequência das Tregs nos pacientes reacionais esta diminuída; (b) o estudo também não inclui a molécula CD127 para análise, considerando apenas CD25⁺FoxP3⁺; (c) a estratégia de análise para seleção da população das Tregs não estava correta, aparentemente pela ausência de um controle negativo apropriado (controle isotípico).

De fato na literatura há relatos anteriores de que em casos de R2 haveria diminuição de células com perfil imunossupressor. Entretanto essas células foram associadas a linfócitos antígeno-específicos TCD8⁺ com função supressora e não a Treg CD4⁺ como observamos. Sendo assim, esses achados nos dão indício de que realmente haveria falha e/ou ausência de supressão. Estes estudos datam da década de 1980, e as abordagens metodológicas não contavam com as mesmas ferramentas que utilizamos atualmente^{130, 131}.

Nesse contexto, realizamos algumas análises para determinar a frequência de Tregs CD8⁺, porém verificamos um número muito reduzido de células expressando a molécula CD25⁺ e o fator de transcrição FoxP3 (< 0,5%, dados não mostrados). Portanto não vimos relação dessas células com a imunopatogenia das reações na coorte estudada.

De fato, a participação de células Tregs CD8⁺ é controversa, pois existem poucos trabalhos que avaliam estas células na hanseníase, e não há estudos associando esse subtipo regulador com os episódios reacionais. Bobosha et al. (2014) analisaram a presença de Tregs CD8⁺ em pacientes hansênicos sem reação e, observaram aumento na frequência dessas células em pacientes virchowianos em relação ao grupo controle (contatos) e a pacientes paucibacilares, sugerindo dessa forma que as Tregs CD8⁺ em associação com as Tregs CD4⁺ atuariam para conter o desenvolvimento da resposta imune celular levando ao estado anérgico observado no pólo VV.

Subsequentemente, avaliamos a hipótese de que a diminuição das Tregs no sangue periférico, observada na R2, poderia ser consequência da migração desse subtipo celular para as lesões dos pacientes. Para isso, quantificamos a frequência de células FoxP3⁺ (fator de transcrição expresso por Tregs) em biópsias das lesões de pele dos pacientes (R1 e R2) e

controle (MB sem reação). Observamos novamente uma marcante diminuição de Tregs nas lesões de somente nos pacientes com R2.

Há na literatura alguns trabalhos que analisam a presença de Tregs em biópsias de lesões de pele de pacientes com hanseníase. Enquanto alguns quantificam maior número de células FoxP3⁺ em pacientes com a forma virchowiana (não reacional) em relação a pacientes com a forma tuberculóide^{117, 119}, outros trabalhos não observaram diferença entre as diferentes formas da hanseníase^{132, 133}.

Contudo, Parente et al.¹³² e Massone et al.¹³³ abordaram a relação das Tregs presentes nas lesões com os episódios reacionais, sendo que nestes dois estudos se observou aumento de células FoxP3⁺ em lesões de pele de pacientes com R1 em relação a pacientes com a forma indeterminada, dimorfo tuberculóide, virchowiano e pacientes com R2.

De certa forma nossos dados corroboram estes resultados, pois também verificamos maior número de Tregs em lesões de pacientes com R1 em comparação com R2, mas não em relação ao grupo controle. De fato, na R2 há deficiência no número de Tregs tanto nas lesões quanto no sangue periférico, fenômeno este que pode estar envolvido no desenvolvimento de uma reação inflamatória sistêmica, devido à falta de imunorregulação. A fim de compreender os mecanismos envolvidos na diminuição das Tregs em pacientes com R2, verificamos se as Tregs desses pacientes possuíam alguma disfunção com relação à capacidade de expansão induzida por um antígeno específico e por um estímulo mitogênico. Essa hipótese foi levantada devido a trabalhos que demonstraram acúmulo de Tregs em lesões cutâneas inflamatórias frente à infecção microbiana e viral, e que a expansão das Tregs nesses locais seria responsável pelo controle do processo inflamatório^{132, 135}.

Ao contrário do que observamos *in vivo*, foi possível induzir a expansão de Treg com antígeno de *Mycobacterium leprae* (MLCwA) *in vitro* em pacientes com R2, porém esta expansão resultou em número inferior ao observado com pacientes em R1 e controles. Entretanto, quando estimuladas com o mitógeno (PHA) as Tregs de pacientes com R2 apresentaram potencial de expansão similar ao observado nos outros dois grupos. Nossos resultados sugerem que haveria falha na expansão de Tregs antígeno-específicas na R2, mas não na R1.

Como mencionado anteriormente, a via de desenvolvimento de Th17 e Tregs são mutuamente interligadas, devido ao fato de ambas necessitam da mesma citocina (TGF β) para sua diferenciação¹³⁶. Sendo assim, partindo do pressuposto de que na R2 haveria algum mecanismo *in vivo* bloqueando a expansão das células Treg e que simultaneamente polariza a resposta imune para uma potente resposta pro-inflamatória mediada por linfócitos Th17,

avaliamos a presença de linfócitos Th17 (células IL17⁺) nas lesões de pele desses pacientes. A nossa hipótese foi confirmada, pois houve alta expressão de células IL-17⁺ na R2 e uma frequência expressivamente menor na R1 e em pacientes sem reação.

Uma das principais funções atribuídas aos linfócitos Th17 é a de recrutar neutrófilos para o local de infecção, através da secreção da quimiocina CXCL8, e por ação direta da IL-17 secretada localmente ativar os neutrófilos recrutados¹³⁷. Portanto nossas observações sugerem um provável mecanismo para a presença de infiltrado neutrofílico encontrado em lesões de pacientes com R2, patognomônico desta tipo de reação. Em contrapartida, Attia et al.¹²⁵ não observaram diferença nos níveis sérios de IL-17 entre as diferentes formas clínicas da hanseníase não reacional e pacientes reacionais (ENH e R1).

Em alguns pacientes foi possível obter biópsias das lesões de pele no momento do diagnóstico, ou seja, antes de entrarem em reação, para serem analisadas comparativamente às biópsias obtidas durante o episódio reacional. Antes de entrarem em reação pacientes com R1 e R2 apresentam quantidade similares de células FoxP3⁺, entretanto, durante a R2 houve diminuição no número dessas células, enquanto na R1 houve nítido aumento.

A mesma tendência foi observada com IL-17: encontramos expressão similar em lesões de pele tanto de pacientes com R1 e R2 antes de entrarem em reação, entretanto durante a reação houve aumento da expressão desta citocina nas biópsias de R2 e diminuição nas biópsias de R1. Esse fenômeno mais uma vez reforça a ideia de que a deficiência no número de Tregs associada a aumento da resposta potencialmente inflamatória mediada por Th17 possam estar envolvidos na imunopatogênese da R2. Estes resultados contrastantes entre R1 e R2 reforçam a noção de que reações são fenômenos complexos e que tanto a patogenia como as manifestações clínicas de ambas são distintas.

A fim de compreender os mecanismos envolvidos na polarização da resposta celular para um perfil pró-inflamatório Th17 na R2, quantificamos a presença das citocinas TGF β e IL-6 nas lesões de pele dos pacientes. Enquanto a citocina TGF β pode colaborar pra diferenciação de uma resposta imune tanto reguladora (Tregs) quanto pró-inflamatória (Th17), a atuação de IL-6 associadamente ao TGF β favorece a diferenciação para Th17¹³⁷. Dessa forma observamos uma quantidade inferior de TGF β presentes nas lesões em pacientes com R2 em comparação com pacientes com R1 e pacientes MB sem reação. Alguns estudos relatam que o microambiente constituído com baixos níveis de TGF β favorece a diferenciação de linfócitos TCD4 em células com o perfil Th17. Em contrapartida, sob efeito de altos níveis de TGF β há diferenciação das células para Tregs¹³⁸.

Trabalhos anteriores têm demonstrado que IL-6 pode ser utilizada como um possível biomarcador para R1 e R2^{56, 57}. Entretanto há relatos de que pacientes que desenvolvem R2 apresentam polimorfismos no gene de IL-6. Corroborando esse achado, verificaram também que pacientes com R2 apresentam níveis séricos de IL-6 do que pacientes com R1⁵⁸.

Em contrapartida, a quantificação de células IL-6+ nas lesões de pele foi muito baixa e não houve diferença nos grupos estudados (R1, R2 e MB sem reação). Talvez a dosagem nos níveis séricos, ou até mesmo a avaliação da frequência das células secretoras de IL-6 possa ajudar a explicar seu papel para polarização da resposta imune mediada por Th17 e não por Tregs em pacientes com R2. Outra possibilidade que deve ser considerado é a atuação de outras citocinas na diferenciação para Th17, como IL-1 e/ou IL-21¹³⁶ que não foram avaliados neste estudo.

Além de determinar a frequência das Tregs circulantes e nas lesões de pele, avaliamos indiretamente a capacidade supressora dessas células por meio da análise da expressão de moléculas de superfície celular conhecidas como umas das mediadoras da função das Tregs: CTLA-4, CD39 e LAP. Sendo assim, apenas pacientes em R2 apresentaram tendência à frequência menor de Tregs expressando CTLA-4 *ex vivo* e quando estimuladas com MLCwA. Devido à grande variabilidade nos resultados obtidos não houve diferença significativa na expressão destas moléculas entre os grupos estudados.

Não há na literatura trabalhos investigando a relação das moléculas supressoras expressas por Tregs com os episódios reacionais. Geluk e colaboradores¹²⁴ observaram diminuição de células expressando CD39 durante a R1, porém não foi analisada a expressão dessa molécula especificamente por células Tregs (CD4⁺CD25⁺CD127^{low}/FoxP3⁺) como em nosso estudo. Apesar dos resultados obtidos não permitirem conclusões definitivas, sugerimos que na R2 além da frequência de Tregs estar diminuída, estas possam apresentar algum grau de comprometimento funcional.

A inibição da resposta proliferativa de linfócitos T é um dos mecanismos utilizados pelas Tregs para suprimir uma a resposta imune exacerbada. Dado que verificamos diminuição da frequência das Tregs circulantes após estimulação *in vitro* e nas lesões, nossa próxima etapa foi avaliar a capacidade de Tregs exercerem função supressora sobre a ativação policlonal de linfócitos T autólogos. Devido ao fato de que as Tregs constituem uma pequena proporção das células circulantes (<10% das células) no sangue periférico e pela frequência ainda mais diminuída dessas células em pacientes com R2, fez-se necessário o estabelecimento de um protocolo capaz de expandir Tregs *in vitro*, a fim de aumentar o número de células para realização de ensaios de avaliação de sua capacidade funcional.

Sendo assim, optamos por testar três protocolos de expansão já descritos na literatura: protocolo utilizando Rapamicina, protocolo utilizando TGF e protocolo utilizando Vitamina D₃, com pequenas modificações.

A rapamicina é um fármaco imunossupressor que vem sendo utilizado para indução e/ou expansão de Tregs *in vitro*, de modo a ativação celular na presença de rapamicina os linfócitos T convencionais seriam inibidos, entrando em apoptose, favorecendo a expansão das Tregs presentes no sangue periférico^{126, 139}. Entretanto, até o momento não há estudos que comprovem a tese de que o protocolo com a rapamicina induziria apenas a expansão de Tregs e não de outros subtipos celulares¹²⁶.

Alguns estudos atribuem à rapamicina a capacidade de suprimir a proliferação de linfócitos T efetores (CD4⁺CD25⁻), mas não de Tregs¹⁴⁰. De fato, foi possível induzir a expansão de Tregs viáveis com rapamicina, bem como após expansão as Tregs apresentaram aumento da MFI do fator de transcrição FoxP3.

Nossos achados corroboraram os de Battaglia¹²⁶ et al. que observaram aumento da expressão de CD25 e FoxP3 em linfócitos TCD4⁺ em culturas com rapamicina. Em contrapartida não realizamos análises de marcadores possivelmente associados ao fenótipo de nTregs como Helios^{141, 142} e Nrp-1¹⁴³, nTregs apresentariam alta expressão dessas moléculas, enquanto Tregs induzidas não. Entretanto estudos mais recentes sugerem que mesmo Helios não seria um bom marcador de nTregs, pois também é expresso em iTregs¹⁴⁴ e pode ser expresso durante a ativação e proliferação de linfócitos T convencionais¹⁴⁵. Assim como Helios, a Nrp-1 não é um marcador específico de nTregs, podendo ser expressa em linfócitos T convencionais após ativação¹⁴⁶.

Por esta razão, não pudemos afirmar neste estudo, se o protocolo rapamicina foi capaz de induzir apenas a expansão de nTregs, ou se também foi capaz de induzir a diferenciação de novas Tregs.

De acordo com os dados publicados por Battaglia et al.¹²⁶, observamos que linfócitos TCD4 estimulados via TCR na presença de rapamicina e IL-2 apresentam um grande potencial de suprimir a proliferação de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺. Esses dados foram observados em todos os grupos estudados: pacientes PB e MB sem reação, pacientes em R1 e em R2.

TGF é uma citocina que, entre outras funções, atua na diferenciação de linfócitos T naive em linfócitos T reguladores. Na literatura são observados muitos trabalhos utilizando TGF em conjunto com IL-2 para induzir e expandir Tregs¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Por essa razão, além do protocolo com rapamicina testamos o protocolo utilizando TGF para expandir Tregs *in vitro*.

Da mesma forma que observado por Lu et al.¹⁵⁰, houve alta expressão de CD25 e FoxP3 por linfócitos CD4⁺ quando utilizado o protocolo com TGF β . Houve uma tendência à viabilidade celular ser discretamente menor do que a observada no protocolo com rapamicina, talvez pelo fato da ativação celular ser mais intensa no protocolo TGF β , visto que as células são estimuladas com anti-CD3/CD28 por períodos mais prolongados.

A capacidade funcional de Tregs induzidas por TGF β ainda é sujeita a controvérsias. Enquanto alguns trabalhos relataram que estas células não exercem função supressora^{151, 152}, outros afirmam que a combinação TGF β + IL-2 é capaz de induzir células com potente atividade supressora^{153, 154}. Nesse contexto, quando avaliamos a função das células expandidas com TGF β observamos que as mesmas desempenharam potente atividade imunossupressora. Nos quatro grupos de pacientes estudados estas Tregs foram capazes de suprimir a proliferação tanto de linfócitos TCD4⁺ como de TCD8⁺.

Por fim, o terceiro protocolo testado foi baseado no uso da vitamina D₃ com IL-2. A vitamina D₃ é um fármaco que atua na diferenciação de Tregs e aumenta a frequência dessas células *in vitro*¹⁵⁵. Vale ressaltar que esse protocolo foi testado em apenas um paciente por grupo, exceto no grupo MB sem reação em que problemas de manipulação no decorrer da cultura levaram a seu descarte.

Assim como descrito por Jeffery et al.¹²⁸, houve aumento da expressão de FoxP3 nas Tregs expandidas com vitamina D₃, além de aumento da frequência destas células pós expansão. Contudo, nos três grupos em que esse protocolo foi testado a expansão de Tregs, bem como a MFI, foram menores do que as obtidas com os protocolos rapamicina e TGF β .

Uma das formas pelas quais a vitamina D atua para induzir Tregs é via ligação a seu receptor VDR, presente em APCs, induzindo estas células a apresentarem um perfil tolerogênico (baixos níveis de expressão de CD80, CD86, HLA-DR quanto ativadas), promovendo assim a diferenciação de linfócitos TCD4 naive em células com um perfil regulador (Tregs)^{156, 157}. Nesta circunstância, a frequência menor de Tregs que observamos pode estar relacionada a ausência de APCs como estímulo inicial no processo de expansão de Tregs.

Conforme os dados obtidos por Kang et al.¹⁵⁸, as Tregs expandidas com vitamina D₃ foram capazes de suprimir a resposta linfoproliferativa nos três grupos estudados. Porém o mesmo estudo constatou que o mecanismo pelo qual Tregs expandidas com vitamina D₃ suprimem melhor a proliferação celular é dependente de contato com a célula respondedora e não contato independente (por exemplo. através da secreção de citocinas). Vale ressaltar que

avaliamos apenas a via dependente de contato utilizada pelas Tregs em nossos ensaios de supressão celular.

Os protocolos testados para expansão de Tregs *in vitro* são laboriosos e de alto custo. Por esta razão, selecionamos dois deles, com TGF β e com rapamicina, a fim de avaliar, no futuro, a regulação antígeno específica nos pacientes com hanseníase e em seus episódios reacionais. Enquanto os protocolos com TGF β induzem Tregs com a região TSDR metilada, em que tanto a expressão de FoxP3 e a função supressora se tornam instáveis, as Tregs induzidas no protocolo rapamicina seriam provavelmente, de acordo com a literatura, expandidas de células Treg tímicas ou periféricas, que apresentam a região TSDR demetilada e, conseqüentemente, expressão de FoxP3 e função supressora estáveis¹⁶⁰.

Nem todos os objetivos do projeto puderam ser alcançados. O mais importante deles foi não ter sido possível dosar as citocinas presentes no sobrenadante dos co-cultivos realizados para avaliação da função das Tregs (por exemplo, diminuição da produção de IFN γ e de IL-2). Como a dosagem será realizada por CBA que é um kit para uso único, o número amostral deverá ser ampliado antes desta avaliação ser feita.

Além disso, também em razão ao pequeno número de pacientes testados, não foi possível comparar a atividade biológica da Tregs induzida nos diferentes tipos de reação.

6 CONCLUSÃO

Nosso estudo sugere que a R2 seria precedida por alteração da regulação da resposta imunológica, de um micro ambiente anti-inflamatório (Treg) para um microambiente inflamatório (Th17) desencadeado por um mecanismo ainda não esclarecido, mas provavelmente ligado a aumento da exposição a antígenos de *M. leprae*. A elucidação deste mecanismo poderá propiciar um novo alvo terapêutico para intervir precocemente no processo inflamatório.

Contudo, não vimos relação da R1 com a frequência Tregs e nem com os resultados preliminares obtidos da avaliação da capacidade supressora dessas células. Para tanto, pretendemos avaliar a função das Tregs no contexto de regulação antígeno-específica (*M. leprae*), uma vez que pudemos estabelecer um modelo de expansão de Tregs *in vitro* que proporcione um número de células suficiente para realização dos experimentos.

7 APÊNDICE

A – Pacientes incluídos no estudo mostrando aspectos clínicos de reação tipo 1

B – Pacientes incluídos no estudo mostrando aspectos clínicos de reação tipo 2

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: ATUAÇÃO DE CÉLULAS T REGULADORAS EM EPISÓDIOS REACIONAIS NA HANSENIASE.

Área Temática:

Área 9. A critério do CEP.

Pesquisador Responsável: Gil Benard

Versão: 2

Pesquisador Executante: Ana Paula Vieira

CAAE: 05145012.0.0000.0068

Co-autores: Susana Lima Lessa Lobo, Camila Rodrigues Cacere, Maria de Lourdes Palermo Neves, Suzana Lima Lessa Lobo, Maria Ângela Bianconcini Trindade, Carla Pagliari, Alberto José da Silva Duarte.

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Instituição: HCFMUSP

Departamento: PATOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 9550

Número do Parecer: 107.460

Data da Relatoria: 19/09/2012

Apresentação do Projeto: O projeto visa estudar a resposta imunológica em biópsias de lesões cutâneas e avaliação de células mononucleares do sangue periférico em indivíduos hansenianos com reação.

Objetivo da Pesquisa: Avaliar amostras de biópsias cutâneas por imunohistoquímica e células Tregs em hansenianos multibacilares e dimorfos em reação para melhor compreender a imunopatogenia destas reações.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Os benefícios se traduzem em poder avaliar os mecanismos imunológicos envolvidos no desencadeamento das reações hansênicas. Os riscos estão relacionados à coleta de sangue periférico e a realização de biópsia cutânea - risco mínimo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O projeto não apresenta questionamentos de natureza ética.

Rua Dr. Ovidio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar

CEP 05403-010 - São Paulo - SP.

55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

C – Termo de consentimento livre e esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL, 8091 SÃO PAULO - BRASIL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**I- DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATANASCIMEN

TO: .../.../....

ENDEREÇO.....Nº.....APTO.....

BAIRRO.....CIDADE.....CEP:.....

TELEFONE:(.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F

DATANASCIME

NTO:...../...../....

ENDEREÇO.....Nº.....APTO:.....

BAIRRO.....CIDADE:.....CEP:.....

TELEFONE:(.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Atuação das células TCD4 reguladoras em episódios reacionais na hanseníase.

2. PESQUISADOR: Gil Benard

CARGO/FUNÇÃO: Docente –MS3 INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 48049

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de dermatologia – LIM 56

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	x	RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO		RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 3 ANOS

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

- 1. Desenho do estudo e objetivo(s):** Os episódios reacionais ocorrem quando há aumento da vermelhidão, dor, inchaço, ou queimação nas feridas e/ou manchas da pele, ou aparecimento de novas feridas e/ou manchas de, em geral depois que o tratamento da hanseníase começou. Estes episódios são a maior causa de internação em hospital e incapacitação física dos pacientes. Estes episódios podem acontecer por causa de uma diminuição no número de células que regulam o sistema de defesa do organismo, ou a uma falha no funcionamento dessas células. Assim, o Laboratório de Investigação Médica – LIM-56, da Faculdade de Medicina da USP, está desenvolvendo uma pesquisa para melhor compreender a atuação dessas células que regulam o sistema de defesa em pacientes portadores de hanseníase que desenvolvem episódios reacionais. Para realizar esses estudos vamos colher sangue da veia do braço e utilizar o material de biópsia da ferida ou mancha da pele. Os resultados obtidos deste trabalho poderão beneficiar e direcionar a novas formas de tratamento.
- 2. Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros:** Se concordar em participar desta pesquisa será coletado um volume de 40 mL (aproximadamente equivalente a 8 colheres de sopa) de sangue do braço em três momentos diferentes: antes de iniciar o tratamento da hanseníase, quando houver um episódio reacional, e 2-6 meses após este episódio. Este sangue será levado a um laboratório especializado, onde as células serão separadas e realizados ensaios imunológicos, que é exame onde há análise do desempenho do sistema de defesa do nosso organismo.
- 3. Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados:** Serão colhidas amostras de sangue em veia do antebraço. Durante o acompanhamento da doença serão realizadas biópsias da lesão de pele por indicação de seu médico dermatologista, com finalidade de fazer o diagnóstico do episódio reacional. Parte deste material de biópsia poderá ser utilizada na pesquisa também, caso você concorde em participar do estudo.

4. Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2

e 3: Como em qualquer coleta de sangue pode haver desconforto local como dor na hora da coleta e/ou uma mancha roxa. As medidas habituais para com a coleta de sangue serão tomadas para que isto não aconteça. Sempre que possível esta coleta será junto com os exames de rotina evitando assim uma coleta extra.

5. Benefícios para o participante: O voluntário não terá nenhum benefício adicional por participar deste protocolo, mas estará contribuindo enormemente para melhorar o controle do tratamento.**6. Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar:** Não haverá procedimentos alternativos.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

- 1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.** O voluntário poderá obter informações e esclarecer qualquer tipo de dúvida sempre que desejar. Além disso, será avisado sobre qualquer nova informação relacionada a este trabalho.
- 2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência:** Estou ciente de que posso suspender o tratamento ou as coletas de sangue a qualquer momento, sem que este fato implique qualquer forma de constrangimento entre mim e meu médico, que se dispõe a continuar me tratando em quaisquer circunstâncias.
- 3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.** A participação do voluntário é totalmente confidencial e a identidade do paciente é mantida em sigilo, bem como todos os resultados de testes relacionados a este estudo.
- 4. Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores:** Caso alguma informação obtida a partir dessa pesquisa possa ser útil a mim, a equipe fará todo o possível para repassá-la o mais rápido possível.
- 5. Despesas e compensações:** Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação

financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

- 6. Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa:** O pesquisador utilizará os dados e o material coletado somente para esta pesquisa

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Em caso de dúvidas entrar em contato com Dr. Gil Benard – LIM 35 FMUSP – tel: (11) 3061-7499 – Av. Dr. Dr

Enéas de Carvalho Aguiar, 470, 3º andar.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661-6442 ou ramais 16, 17 e 18

FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

VI. CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Atuação das células T reguladoras em episódios reacionais na hanseníase” Eu discuti com o Dr. Gil Benard sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço

Assinatura do paciente/representante legal

_____ Data: ____/____/____

Assinatura da testemunha

Data ____/____/____

(para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual).

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo

Assinatura do responsável pelo estudo

_____ Data: ____/____/____

D – Artigo publicado – Fevereiro/2016

Accepted for Publication, Published online February 22, 2016; doi:10.4269/ajtmh.15-0673.
The latest version is at <http://ajtmh.org/cgi/doi/10.4269/ajtmh.15-0673>

In order to provide our readers with timely access to new content, papers accepted by the American Journal of Tropical Medicine and Hygiene are posted online ahead of print publication. Papers that have been accepted for publication are peer-reviewed and copy edited but do not incorporate all corrections or constitute the final versions that will appear in the Journal. Final, corrected papers will be published online concurrent with the release of the print issue.

VIEIRA AND OTHERS

REGULATORY T-CELLS IN LEPROSY REACTIONS

Development of Type 2, But Not Type 1, Leprosy Reactions is Associated with a Severe Reduction of Circulating and *In situ* Regulatory T-Cells

Ana Paula Vieira, Maria Ângela Bianconcini Trindade, Carla Pagliari, João Avancini, Neusa Yurico Sakai-Valente, Alberto José da Silva Duarte, and Gil Benard*

Laboratory of Medical Investigation Unit 56, Division of Clinical Dermatology, Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; Department of Pathology, Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; São Paulo State Health Department, Health Institute, São Paulo, Brazil; Laboratory of Medical Investigation Unit 53, Tropical Medicine Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

* Address correspondence to Gil Benard, Tropical Medicine Institute, University of São Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 470, São Paulo, SP, 05403, Brazil. E-mail: mahong@usp.br

Abstract. Leprosy is frequently complicated by the appearance of reactions that are difficult to treat and are the main cause of sequels. We speculated that disturbances in regulatory T-cells (Tregs) could play a role in leprosy reactions. We determined the frequency of circulating Tregs in patients with type 1 (T1R) and type 2 (T2R) reactions. The *in situ* frequency of Tregs and IL-17, IL-6 and TGF- β -expressing cells was also determined. T2R patients showed markedly lower number of circulating and *in situ* Tregs than T1R patients and controls. This decrease was paralleled by increased *in situ* IL-17 expression but decreased TGF- β expression. Biopsies from T1R and T2R patients before the reaction episodes showed similar number of Foxp3⁺ and IL-17⁺ cells. However, in biopsies taken during the reaction, T2R patients showed a decrease in Tregs and increase in IL-17⁺ cells, while T1R patients showed the opposite: Tregs increased but IL-17⁺ cells decreased. We also found decreased expansion of Tregs upon *in vitro* stimulation with *M. leprae* and a

trend for lower expression of FoxP3 and the immunosuppressive molecule CTLA-4 in T2R Tregs. Our results provide some evidence to the hypothesis that, in T2R, down modulation of Tregs may favor the development of T-helper-17 responses that characterize this reaction.

Correspondence author: Gil Benard, Instituto de Medicina Tropical, Av Dr. Eneas de Carvalho Aguiar 470, São Paulo, Brazil, Phone: +55-11-30617499; Fax: +55-11-30817190. E-mail: mahong@usp.br

INTRODUCTION

Leprosy is a treatable infectious disease that is frequently complicated by the sudden appearance of reaction episodes. This is a major concern because (a) leprosy sequels such as nerve function impairment and disabilities are in most cases linked to these episodes and (b) treatment of these episodes is based on prolonged use of drugs with potential severe side effects, such corticosteroids and thalidomide.¹ These episodes represent an exacerbation of the inflammatory responses and can appear before, during or after chemotherapy for *M. leprae*. Two types of reactions are recognized, with distinct clinical and histopathological features. T1R or reversal reaction is estimated to result from exacerbation of established or incipient T-helper 1 responses, presumably triggered by increased release of mycobacteria antigens in immunologically instable forms of the disease (borderline tuberculoid [BT], borderline borderline [BB] and borderline lepromatous [BL]).² T2R or erythema nodosum leprosum affects patients with the BB, BL and lepromatous leprosy (LL) forms and has been defined as an immunocomplex mediated disease. More recent evidence suggests that it is a more complex phenomenon with involvement of cell mediated immunity of both the Th-1 and Th-2 phenotypes.³ However, accumulated data show that both pro and anti-inflammatory cytokines participate in both types of reactions, leading to the conclusion that a simple model of Th1 response in T1R and Th2 response in T2R is not sufficient. This may explain why the search for

immunological mediators, especially cytokines that could serve as surrogate markers for T1R and T2R, yielded inconsistent results.⁴

Unfortunately the factors that initiate the development of leprosy are still completely unknown⁵; for this reason the risk factors of T1R and T2R remain an open issue. Hormonal and nutritional factors appear to have an influence.^{6,7} However, a recent study of nearly 2000 patients could not detect the influence of nutritional status and menstrual cycle on the development of reactions.⁵ In addition, this study showed that reactions are not necessarily the result of treatment and they also affect children, although increasing age was a risk factor. Studies on the polymorphisms of immune response genes showed that polymorphisms in Toll-like receptors 1 and 2 genes were associated with, respectively, lower and higher risk of developing T1R, while polymorphisms in tumor necrosis factor, mannose-binding lectin and vitamin D receptor genes failed to show strong associations.⁸⁻¹⁰ These authors also showed that polymorphisms in the nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD-2) gene, which codifies a cytosolic receptor involved in detection of intracellular pathogens, were either associated with protection from T1R or associated with increased susceptibility to T2R.¹¹

We have recently witnessed a remarkable progress in the understanding of the biology of regulatory T-cells (Tregs) and an increasing recognition of their pivotal role in the regulation of immune responses in both pathological and physiological conditions. Tregs are a T-cell subpopulation specialized for immune suppression and engaged in the maintenance of immunological self-tolerance and homeostasis.¹² Although no single marker uniquely identifies this suppressor subpopulation, Tregs are defined as CD25 (interleukin-2 receptor α -chain)-expressing CD4⁺ T cells which express the transcription factor Forkhead box protein P3 (FoxP3), a master regulator for the development and function of Tregs.¹³ We and others have previously shown that Tregs are augmented in the

anergic forms of leprosy (BL/LL) as compared with the TT/BT forms.¹⁴⁻¹⁷ Thus, Tregs seem to play an important role in the regulation of the patients' cellular immune responses to *M. leprae*, particularly in the anergy of lepromatous leprosy.¹⁸

Although T1R and T2R are perceived as being triggered by different, but yet not well-defined, immunopathogenic mechanisms¹, it is clear that they both result from exacerbation of an ongoing immune response and, as such, from lack of immune regulation. However, the participation of Tregs in the development of leprosy reaction episodes remains unclear. We then speculated that disturbances in Tregs could play a role in leprosy reactions, especially T1R, considered to result from exacerbated cell-mediated immunity. Here we show that, unexpectedly, development of T2R, instead of T1R, is associated with a sharp reduction in both *in situ* and circulating Tregs.

Patients and methods

Patients and controls

All patients in this study were recruited from the Leprosy Out-Patient Unit of the Clinics Hospital, São Paulo, Brazil. The study population comprised 28 clinically active, severe reaction (10 lesions and, in the case of T2R, with systemic manifestations and severe pain) leprosy patients who were graded clinically and histologically on the leprosy spectrum according to the Ridley-Jopling classification.¹⁹ Diagnosis of T1R and T2R were made by two expert clinicians (MABT and JA): a total of 14 patients were in T1R and had a diagnosis of BT or BB, while 14 were in T2R (Erythema Nodosum Leprosum) and had a diagnosis of BL or LL. All except three were multibacillary at the moment of diagnosis of leprosy; all received leprosy multidrug chemotherapy (MDT) according to the World Health Organization (WHO) recommendations, and underwent blood collection immediately before (re)initiation of the immunosuppressive treatment (corticosteroids 0.5-1.0mg/kg and/or thalidomide up to 300mg/day). Some patients have been prescribed the

immunosuppressive treatment for the reaction but had stopped it for >15 days and returned because of a new severe episode of reaction, when they were included in the study. For the ex-vivo, circulating Tregs measurements, three distinct groups of healthy donors were recruited: exposed individuals selected among persons living in close contact with multibacillary leprosy patients and with *in vitro* T-cell reactivity to *M. leprae* as previously described¹⁴ (contacts; $n=11$), healthy non-exposed individuals (HNE, $n=8$), and presently healthy individuals who had previously been followed at our unit for BL/LL and recurrent episodes of severe T2R, treated with WHO MDT plus corticosteroids/thalidomide, and were considered clinically cured since at least 5 years (C-T2R, $n=7$). For the *in situ* Tregs measurements the control group consisted of biopsies taken from an active lesion of patients with multibacillary non-reactional leprosy for diagnostic purpose (MB, $n = 12$). We adopted the following exclusion criteria: pregnancy, autoimmune diseases, use of immunosuppressive drugs for other causes than leprosy, infectious comorbidities, and age under 18 years-old. The study was approved by the Ethics Committee of the Clinics Hospital (protocol #107.460). Informed written consent was obtained from all participants. A summary of the clinical and demographic data of all participants are depicted in Supplemental Appendix File 1.

Peripheral blood mononuclear cells isolation and culture

Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cultures were carried out as previously described.¹⁴ PBMCs were isolated from heparinized peripheral blood by density gradient and resuspended in RPMI supplemented with 10% human AB serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). PBMCs (2.5×10^6 /well) were cultivated for 96h in 24-well flat-bottomed plates with medium only, a cell wall preparation of *M. leprae* (MLCwA; 4 μ g/mL), and as positive control, with phytohemagglutinin added for the last 48h (PHA; 5 μ g/mL; Sigma) at 37°C and 5% CO₂. All circulating Tregs measurements were carried out with freshly

isolated cells since preliminary experiments with frozen cells showed a significant reduction in the number of Tregs.

Flow cytometry analysis of Tregs cells

To assess the frequency of circulating Tregs and to analyze the expression of suppressor molecules by these Tregs, ex-vivo PBMCs and cells harvested from the 96h PBMC cultures were incubated at 4°C for 30 min with the following specific antibodies: anti-CD3 BV605 (clone SK7), anti-CD4 V500 (clone RPA-T4), anti-CD25 FITC (clone M-A251), anti-CD127 PE-Cy7 (clone HIL-7R-M21), anti-CD152 (CTLA-4) BV421 (clone BNI3), anti-LAP PE-CF594 (TW4-2F8), anti-CD39 APC (clone TU66) (all from BD Biosciences, San Diego, CA). After incubation, cells were washed with PBS/BSA. For the FoxP3 intracellular staining, cells were resuspended in Fix/Perm buffer (eBioscience, San Diego, CA, USA) and left at 4°C for 30 minutes. Subsequently, these cells were washed with PBS/BSA and a permeabilization buffer (eBioscience), and incubated for 15 min with normal rat serum for preventing non-specific staining. Next, anti-FoxP3 antibody (clone PCH101, eBioscience) was added and the cells were incubated for 30 minutes at 4°C. Cells were then washed and immediately acquired and analyzed using LSRFortessa flow cytometer (BD Bioscience, San Jose, CA, USA). Tregs was characterized as CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}FoxP3⁺ cells according to the Optimized Multicolor Immunofluorescence Panel for in-depth characterization of human T regulatory cells (OMIP-004).²⁰ All analyses were performed in CD4⁺ cells gated within CD3⁺ cells. Illustrative examples of the gating strategy are shown in Fig. 1A. CD8⁺ Tregs were searched in the CD3⁺CD4⁻ lymphocytes gate. Compensation of the subpopulations analyzed was carried out for every experiment using unstained cells and the fluorescence minus one protocol as recommended. At least 700.000 events were acquired for each

analysis. Data were processed using the FlowJo 7.6.5 software (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA).

Immunohistochemistry of lesion biopsies

Biopsies were taken with a standard dermatologic biopsy punch. Biopsies were preferably taken from well-circumscribed plaques in T1R and T2R patients, and in BL/LL patients without reaction from the most infiltrated lesions. For the immunohistochemical (IHC) study of patients' biopsies, a streptavidin-biotin peroxidase method was used as previously described.¹⁴ Briefly, after deparaffinization in xylene and hydration in ethyl alcohol, endogenous peroxidase was blocked by incubating in 3% hydrogen peroxidase solution in dark chamber. Antigen recovery was performed in a retrieval solution at pH 9.0 (S2368; Dako, Carpinteria, CA, USA) for 20 minutes at 95°C. Nonspecific proteins were blocked by incubating sections in skim milk. The primary antibodies anti-TGF- β (Novocastra Leyca Biosystem, New Castle, UK), anti-IL-17 (AF-317-NA R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), anti-IL-6 (NCL-L-IL-6 Novocastra, Buffalo Grove, IL, USA) and anti-Foxp3 (14-4776; eBioscience) as well as a labeled streptavidin-biotin complex (LSAB; Dako) were applied. 3,3-diaminobenzidine tetrahydroxychloride (DAB; Sigma) was used as chromogen, and the slides were counterstained with hematoxylin and hydrated in alcohol. All reactions were performed with positive and negative controls. The latter comprised isotype controls and omission of the primary antibody. The images were captured using AxioVision 4.8.2 software (Zeiss, Oberkochen, Germany). Six images from each specimen were considered. The area of the granulomatous inflammatory infiltrate was measured and the stained cells were counted using Image-Pro Plus, version 6.0 (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA).

Statistical analysis

ANOVA with Newman-Keuls post-test was used for parametric data from the T1R, T2R and control groups while Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test was used to compare the non-parametric data. Significance was set at $p < 0.05$. GraphPad –Prisma 5.0 (Graph-Pad Software Inc. San Diego, CA, USA) was used.

Results and Discussion

We determined the frequency of peripheral blood Tregs during a clinically active severe T1R or T2R episode, immediately before initiation of the immunosuppressive treatment. As shown in Figure 2B, the percentage of Tregs in T2R patients was markedly reduced as compared with healthy controls, exposed or unexposed to *M. leprae* (means $\pm$ SE: T2R, 1.7 ± 0.2 ; contacts, 3.4 ± 0.2 ; HNE, $3.2 \pm 0.4\%$, $P < .001$). This percentage was also much lower than that observed in a previous study with BL/LL patients ($5.5 \pm 0.9\%$).¹⁴ To verify whether this reduction was specifically related to the T2R episode or a constitutive deficiency of these individuals, Tregs frequency was also determined in healthy subjects with a past history of lepromatous leprosy and recurrent episodes of severe T2R (C-T2R). These subjects exhibited high number of circulating Tregs ($3.9 \pm 0.5\%$, $P < 0.001$ vs. T2R) (Figure 1B). On the other hand, the percentage of Tregs in T1R patients ($3.4 \pm 0.4\%$) was similar to that from the control groups and significantly higher than that of T2R patients (Figure 1B). We then examined the possibility that the decrease in CD4⁺Tregs would have been compensated by an increase in CD8⁺Tregs. CD8⁺Tregs have recently been shown to be augmented after *in vitro* stimulation in children with MB leprosy compared with age-matched contacts.²¹ As illustrated in Figure 1A, the presence of CD25⁺ or CD25^{high} cells within the CD8 subset (the TCD3⁺CD4⁻ subpopulation on the left of the histograms displayed on the upper line) was negligible. The same held true for the expression of FoxP3, which was almost exclusively expressed by CD3⁺CD4⁺ cells (not shown). Thus in our leprosy patients CD8⁺Tregs seem not to play a role. Next, we tested the hypothesis that

the reduction in peripheral blood Tregs was due to redistribution to the sites of leprosy reaction lesions, by determining the frequency of Tregs in biopsies taken from these lesions during the same reaction episode. We found a severe reduction in Tregs frequency in T2R lesions ($P<.001$), while in T1R lesions their frequency was comparable to the frequency found in lesions of MB patients without reaction (Figure 2A). Thus, during T2R Tregs are decreased in both peripheral blood and *in situ*.

In order to understand the mechanisms underlying the Tregs decrease of T2R patients, we determined first whether these cells would have a reduced capacity to expand. This rationale was based on observations showing that Tregs accumulate within inflamed cutaneous lesions elicited by microbial challenge (e.g., mycobacteria, varicella zoster virus) and that the Tregs accumulation was associated with control of the inflammatory process.^{22,23} It was also demonstrated that the accumulation was due to local proliferation of Tregs. In fact, Tregs from leprosy reaction patients and controls were able to proliferate *in vitro* (Figure 1C). Interestingly however, it can be seen that although the Tregs pool of T2R patients expanded significantly, the yields induced with MLCwA were significantly lower than those resulting from MLCwA-induced expansion of Tregs from T1R patients and healthy controls; of note, in the latter two groups the yields were comparable. On the other hand, the positive control PHA induced similar vigorous Tregs expansion in the three groups. To exclude the possibility that the reduced antigen-specific induction of Tregs proliferation was due to the lower starting input of Tregs, the percentage of Tregs in presence of medium alone was subtracted from the percentages induced with MLCwA and PHA; this analysis showed that there were still lower Tregs yields with MLCwA stimulation in T2R than in T1R and healthy controls ($P=0.024$, Kruskal-Wallis test), but not with PHA ($P>0.05$). Our results point to a reduction in the *in vitro* *M. leprae*-induced replicative capacity of T2R Tregs but not of T1R Tregs.

Second, we determined the *in situ* expression of IL-6, IL-17 and TGF- β . While TGF- β is a pre-requisite for differentiation of both Th17 and Tregs, IL-6 turns off the pathway to Tregs reprogramming the differentiation towards Th-17 cells.^{24,25} We then expected that the differences in *in situ* Tregs numbers would reflect the balance between these cytokines in the inflammatory microenvironment of T1R and T2R. Surprisingly, we found that T2R lesions exhibited a marked reduction in TGF- β + cells frequency as compared with T1R and MB lesions, which in turn expressed similar high levels (Figure 2B). On the other hand, while the number of IL-6 expressing cells was low in T2R, T1R and MB lesions (all means 32 cells/mm^2 , Figure 2C), IL17+ cell results mirrored those of Foxp3 and TGF- β : there was a high expression in T2R (mean $295 \pm 49 \text{ cells/mm}^2$), and a significantly lower expression in T1R ($114 \pm 27 \text{ cells/mm}^2$) and MB lesions ($136 \pm 22 \text{ cells/mm}^2$) (Figure 2D). The low IL-6 expression was somewhat disappointing because there is evidence for (a) elevated IL-6 levels in the serum of T2R patients, and (b) an association between some *IL-6* gene single-nucleotide polymorphisms and T2R.^{26,27} However, elevated IL-6 serum levels have also been described in BL/LL patients without reaction as well as in T1R patients.^{28,30} In addition, IL-6 mRNA and protein have been detected in T1R lesions.^{30,33} Thus, the lack of unequivocal correlations between specific cytokines and distinct phenotypes or outcomes highlights the complexity of the immune response in leprosy. An exception to this could be the high expression of IL-17, which is in agreement with the neutrophil infiltration and Th-17 pattern of immune response that characterize the histological picture of T2R.³⁴ Although the underlying mechanisms remain unclear, our data may suggest that in T2R skin lesions Tregs development is turned off to make room for the pro-inflammatory Th-17-mediated responses.

We additionally tested the possibility that IL-6 played an inhibitory role on the *in vitro* Tregs expansion induced with MLCwA and PHA. Concentrations ranging from 10 pg/mL

to up to 200 pg/mL of IL-6 were unable to block the expansion of Tregs induced with MLCwA and PHA in PBMC of reaction patients and contacts (data not shown). In fact the role played by IL-6 in the inhibition of Tregs has been debated and it has been suggested that this cytokine preferentially drives the differentiation of Th0 cells towards Th-17 cells through the blockade of the pathway to Tregs, but does not directly inhibit the proliferation of already differentiated Tregs.^{35,36}

We were able to retrieve the biopsy taken at the moment of diagnosis of leprosy in five T1R and eight T2R patients, before they developed the reaction episodes. We then compared these biopsies with those taken during the reactions. As shown in Figure 3, before reaction the frequency of Tregs from the patients who subsequently developed T1R and T2R were similar ($P=0.7$). However, during the reaction episodes the frequency increased 2.5 times in T1R lesions and decreased by 60% in T2R lesions, resulting in a frequency of Tregs in T2R lesions that was four-fold lower than in T1R lesions ($P<0.01$). Thus, development of T2R, but not T1R, was associated with a sharp decrease of *in situ* Tregs. We also compared these biopsies with regard to IL-17 and IL-6 expression. Interestingly, IL-17 expression was also comparable before reaction, but during T2R the frequency of IL-17+ cells increased while in T1R it decreased, resulting in a frequency in T2R lesions five-fold higher than in T1R lesions ($P<0.01$). IL-6 expression was low before and remained unchanged during both T1R and T2R. These data corroborate the notion that development of T2R is accompanied by a sharp decrease in Tregs and an increase in IL-17 expression.

Finally, although this study was not designed to examine the functional properties of Tregs, we determined the levels of expression of some molecules known to mediate the immunosuppressive activity of Tregs, and thus tried to infer indirectly the immunosuppressive potential of these cells. We measured the surface expression of (a)

CTLA-4, a molecule that competes with CD28 for binding to CD80/CD86 co-stimulatory molecules, down modulating T-cell receptor signaling and IL-2 secretion ³⁷; (b) CD39, a molecule that hydrolyses the extracellular ATP or ADP released by T cells during antigen presentation to AMP, displaying inhibitory and antiproliferative effects,³⁸ and (c) latency-associated peptide (LAP), which is a TGF- β associated molecule that acts as a transporter of latent TGF- to the cell membrane and then releases the cytokine to the extracellular milieu.³⁹ We additionally assessed the median fluorescence intensity of FoxP3, whose intracellular accumulation correlates with the immunosuppressive capacity of the Tregs.⁴⁰ The ex-vivo expression levels of these molecules by Tregs are shown in Figure 4. As in previous studies,⁴¹ there was individual variability in the expression of these molecules in the three groups and no significant differences among them were found, although T2R patients showed a trend for lower expression of CTLA-4 and FoxP3. We also assessed the *in vitro* expression of these molecules in unstimulated and MLCwA and PHA-stimulated Tregs (Table 1). Similarly, while no significant differences could be detected among the groups, a trend for lower expression of CTLA-4 in the three *in vitro* conditions and for lower FoxP3 MFI in MLCwA cultures were noted in Tregs from T2R patients. Thus, although this limited set of experiments did not allow for definite conclusions, our data suggest that, in addition to their reduced frequency, T2R Tregs may present some functional impairment.

Conclusion

We show that T2R develops in leprosy patients concomitantly with a reduction in the Tregs frequency in peripheral blood and *in situ*, while such association is not seen in T1R. Although the two types of reaction are clinically and histologically distinct, the attempts to define a distinct pattern of immunological markers which would underlie each type of reaction were hindered because these markers frequently overlap. Recently, a large IHC

study of leprosy biopsies reported that *in situ* TGF- β expression was associated with T1R, although this association showed low specificity as high TGF- β expression was also found in 50% of the LL biopsies and 54% of the T2R biopsies.⁴² We verified high and comparable expression of TGF- β in MB and T1R biopsies, while its expression was at least 50% lower in T2R. We also assessed the *in situ* expression of IL-17 and IL-6, and noted high IL-17 expression in T2R but low expression in T1R and MB lesions while IL-6 expression was uniformly low in the three groups. Thus, our expectation that high TGF- β and IL-6 expression would explain the down modulation of Tregs by one side, and the up regulation of Th-17 type response by the other side, was not confirmed. Other regulatory cytokines should be investigated such as IL-1, IL-21, -22 and -23, among others, that could explain the immune regulation that takes place in T2R. In T1R, the mechanisms leading to lack of control of the exacerbated responses remain to be determined.

In addition, our assays on Tregs capacity to expand and on the expression of molecules associated with immunosuppressive activity suggest that T2R Tregs may also present some dysfunction. Overall, our results provide some evidence to the hypothesis that, in T2R, down modulation of Tregs would favor the development of Th17 responses that characterize this type of reaction. We thus believe that understanding better the role played by Tregs in reaction episodes can possibly provide a new target for the treatment of this still challenging complication of leprosy.

Financial support: Fapesp #2014/15286-0, Capes and Fundação Paulista contra a Hanseníase. GB and AJSD are senior researchers of CNPq.

Acknowledgments: We would like to thank the Mycobacteria Research Laboratories, Colorado State University, for kind donation of the *M. Leprae* antigen, Naiura Vieira Pereira and Luciane

Kanashiro Gallo for the assistance with the IHC and Luiz Augusto M. Fonseca for careful English editing.

Authors' addresses: Ana Paula Vieira, Laboratory of Medical Investigation Unit 56, Division of Clinical Dermatology, Medical School, University of Sao Paulo, Brazil E-mail: anavieira@usp.br. Maria Angela B. Trindade, São Paulo State Health Department, and Division of Clinical Dermatology, Medical School, University of Sao Paulo, Brazil, E-mail: angelatrindade@uol.com.br. João Avancini, Division of Clinical Dermatology, Medical School, University of Sao Paulo, Brazil E-mail: avancini.joao@gmail.com. Carla Pagliari, Department of Pathology, Medical School, University of Sao Paulo, Brazil, E-mail: cpagliari@usp.br. Neusa Y. Sakai-Valente, of Clinical Dermatology, Medical School, University of Sao Paulo, Brazil, E-mail: neusavalente@gmail.com. Alberto J S Duarte, Laboratory of Medical Investigation Unit 56, Division of Clinical Dermatology, Medical School, University of Sao Paulo, Brazil, and Department of Pathology, Medical School, University of Sao Paulo, Brazil, E-mail: adjsduar@usp.br. Gil Benard, Laboratory of Medical Investigation Unit 56, Division of Clinical Dermatology, Medical School, University of Sao Paulo, Brazil and Laboratory of Medical Investigation Unit 53, Tropical Medicine Institute, University of São Paulo, Brazil, E-mail: mahong@usp.br.

Figure Legends

FIGURE 1. Flow cytometry analysis of Tregs (CD4+CD25+CD127^{low/-}Foxp3+ cells) in PBMCs of leprosy patients and controls. **A**, the gate strategy showing in the upper row the percentage of CD25+ cells within CD4+ cells and in the bottom row the expression of Foxp3+ and CD127^{low/-} cells among the CD25+ cells. **B**, peripheral blood Treg frequency in T1R (*N* = 14), T2R (*N* = 14) patients; C-T2R (*N* = 7), contacts (*N* = 10) and HNE controls (*N* = 8). **C**, Tregs frequency in PBMCs stimulated *in vitro* with MLCwA or PHA,

or not stimulated (medium), from TR1 ($N = 13$) and TR2 ($N = 14$) patients and contacts ($N = 10$). Results are presented as mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

FIGURE 2. Representative sections of immunofluorescence staining (upper row, original magnification 400X) and respective frequencies (bottom row) of (A) Foxp3+, (B) TGF- β +, (C) IL-6+ and (D) IL-17+ cells in biopsies of lesions from T1R ($N = 8-12$), T2R ($N = 12-14$) and MB patients ($N = 10-12$). Results are represented as mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. Insets show the intracellular staining in more detail.

FIGURE 3. Frequency of (A) Foxp3+, (B) IL-17+ and (C) IL-6+ cells in biopsies of lesions from five T1R and eight T2R patients before (BR) and during reaction episodes. Results are presented as mean $\pm$ SEM. ** $P < 0.01$.

FIGURE 4. Percentage of Tregs expressing surface molecules (CTLA-4, LAP and CD39) and FoxP3 median fluorescence intensity (MFI) by Tregs from T1R ($N = 8-10$) and T2R ($N = 11-13$) patients and contacts ($N = 7-10$). Box plots show the median and interquartiles (percentile 25 to percentile 75).

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4

TABLE 1

Percentage of Tregs expressing surface molecules and Foxp3 median fluorescence intensity (MFI) in PBMCs stimulated culture from T1R and T2R and contacts controls.

	T1R	T2R	Contacts
CTLA-4	(N = 10)	(N = 8)	(N = 8)
Medium	9.17%	5.21%	12.9%
	(5.46-21.55)	(5.10-11.7)	(5.84-19.05)
MLCwA	16.50%	7.82%	18.8%
	(5.91-26.50)	(5.57-16.90)	(7.29-27.78)
PHA	78.85%	59.05%	80.35%
	(49.78-88.43)	(53.20-69.15)	(62.08-87.78)
LAP	(N = 9)	(N = 7)	(N = 8)
Medium	3.60%	5.56%	3.19%
	(2.21-11.73)	(4.22-13.7)	(1.61-4.72)
MLCwA	5.50%	3.14	3.64%
	(3.18-9.29)	(1.42-10.28)	(2.14-6.73)
PHA	12.10%	14.80%	13.35%
	(7.28-19.30)	(11.80-20.05)	(9.84-19.50)
CD39	(N = 9)	(N = 7)	(N = 10)
Medium	52.70%	50.75%	70.70%
	(22.20-78.60)	(15.83-73.95)	(58.18-76.20)
MLCwA	25.10%	39.35%	42.75%
	(13.25-61.30)	(12.07-55.68)	(38.75-59.50)
PHA	18.25%	18.40%	16.50%
	(12.7-40.85)	(13.10-26.50)	(13.28-17.40)
FoxP3			
(MFI)	(N = 13)	(N = 12)	(N = 10)
Medium	1440	1576	1032
	(773,2-2802)	(926,8-3979)	(709,5-2274)
MLCwA	2818	1846	2567
	(1435-3520)	(1002-2374)	(1572-3707)
PHA	2749	4972	3691
	(1788-4592)	(2330-14915)	(2774-11562)

Median and interquartile interval (percentile 25 to percentile 75)

References

1. Kahawita IP, Walker SL, Lockwood DL, 2008. Leprosy type 1 and Erythema Nodosum Leprosum. *An Bras Dermatol* 83: 75-82.
2. Walker SL, Lockwood DN, 2008. Leprosy type 1 (reversal) reactions and their management. *Lepr Rev* 79: 372-86.
3. Kahawita IP, Lockwood DNJ, 2008. Towards understanding the pathology of erythema nodosum leprosum. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102: 329–37
4. Pandhi D, Chhabra N, 2013. New insights in the pathogenesis of type 1 and type 2 lepra reaction. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 6: 739-49.
5. Scollard DM, Martelli CMT, Stefani MMA, Maroja MF, Villahermosa L, Pardillo F, Tamang KB, 2015. Risk Factors for Leprosy Reactions in Three Endemic Countries. *Am J Trop Med Hyg* 92(1): 108–114.
6. Saunderson P, Gebre S, Byass P, 2000. Reversal reactions in the skin lesions of AMFES patients: incidence and risk factors. *Lepr Rev* 71(3): 309–317.
7. Saporta L, Yuksel A, 1994. Androgenic status in patients with lepromatous leprosy. *Br J Urol* 74: 221-224.
8. Misch EA, Macdonald M, Ranjit C, Sapkota BR, Wells RD, Siddiqui MR, Kaplan G, Hawn TR, 2008. [Human TLR1 Deficiency Is Associated with Impaired Mycobacterial Signaling and Protection from Leprosy Reversal Reaction](#). *PLoS Negl Trop Dis* 2: e231.
9. Bochud PY, Hawn TR, Siddiqui MR, Saunderson P, Britton S, Abraham I, Argaw AT, Janer M, Zhao LP, Kaplan G, Aderem A, 2008. [Toll-Like Receptor 2 \(TLR2\) Polymorphisms Are Associated with Reversal Reaction in Leprosy](#). *J Infect Dis* 197(2): 253–261.
10. Sapkota BR, Macdonald M, Berrington WR, Misch EA, Ranjit C, Siddiqui MR, Kaplan G, Hawn TR, 2011. Association of TNF, MBL, and VDR Polymorphisms with Leprosy Phenotypes. *Hum Immunol* 10: 992–998
11. Berrington WR, Macdonald M, Khadge S, Sapkota BR, Janer M, Hagge DA, Kaplan G, Hawn TR, 2010. [Common polymorphisms in the NOD2 gene region are associated with leprosy and its reactive states](#). *J Infect Dis*. 201(9): 1422–1435.
12. Sakaguchi S, Nomura T, Ono M, 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133: 775-87.

13. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S, 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299: 1057-61.
14. Palermo ML, Pagliari C, Trindade MA, Yamashitafuji TM, Duarte AJ, Cacere CR, Benard G, 2012. Increased expression of regulatory T cells and down-regulatory molecules in lepromatous leprosy. *Am J Trop Med Hyg.* 86: 878-83.
15. Saini C, Ramesh V, Nath I, 2014. Increase in TGF- β Secreting CD4⁺CD25⁺ FOXP3⁺ T Regulatory Cells in Anergic Lepromatous Leprosy Patients. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e2639.
16. Kumar S, Naqvi RA, Ali R, Rani R, Khanna N, Rao DN, 2013. CD4⁺CD25⁺ T regs with acetylated FoxP3 are associated with immune suppression in human leprosy. *Mol Immunol* 56: 513–20.
17. Apoptotic activity and Treg cells in tissue lesions of patients with leprosy 2014. Quaresma JA, Esteves PC, de Sousa Aarão TL, de Sousa JR, da Silva Pinto D, Fuzii HT. *Microb Pathog* 76:84-8.
18. Bobosha K, Wilson L, van Meijgaarden KE, Bekele Y, Zewdie M, Schip JJ, Abebe M, Hussein J, Khadge S, Neupane KD, Hagge DA, Jordanova ES, Aseffa A, Ottenhoff TH, Geluk A, 2014. T-cell regulation in lepromatous leprosy. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e2773.
19. Ridley DS, Jopling WH, 1966. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 34: 255–27.
20. Biancotto A, Dagur PK, Fuchs JC, Langweiler M, McCoy JP Jr, 2012. OMIP-004: in-depth characterization of human T regulatory cells. *Cytometry A* 81:15-6.
21. Fernandes C, Gonçalves HS, Cabral PB, Pinto HC, Pinto MIM, Câmara LMC, 2013. Increased Frequency of CD4 and CD8 Regulatory T Cells in Individuals under 15 Years with Multibacillary Leprosy. *PLoS One* 8: e79072.
22. Vukmanovic-Stejic M, Agius E, Booth N, Dunne PJ, Lacy KE, Reed JR, Sobande TO, Kissane S, Salmon M, Rustin MH, Akbar AN, 2008. The kinetics of CD4⁺Foxp3⁺ T cell accumulation during a human cutaneous antigen-specific memory response in vivo. *J Clin Invest.* 118: 3639-50.
23. Vukmanovic-Stejic M, Sandhu D, Sobande TO, Agius E, Lacy KE, Riddell N, Montez S, Dintwe OB, Scriba TJ, Breuer J, Nikolich-Zugich J, Ogg G, Rustin MHA, Akbar NA, 2013. Varicella Zoster specific CD4⁺Foxp3⁺ T cells accumulate after cutaneous antigen challenge in humans. *J Immunol* 190: 977–86.
24. Noack M, Miossec P, 2014. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev* 13: 668–67.
25. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y, 2008. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 28: 454–67.

-
26. Stefani MM, Guerra JG, Sousa AL, Costa MB, Oliveira ML, Martelli CT, Scollard DM, 2009. Potential plasma markers of Type 1 and Type 2 leprosy reactions: a preliminary report. *BMC Infect Dis* 27: 9-75.
 27. Sousa AL, Fava VM, Sampaio LH, Martelli CM, Costa MB, Mira MT, Stefani MM, 2012. Genetic and immunological evidence implicates interleukin 6 as a susceptibility gene for leprosy type 2 reaction. *J Infect Dis.* 205:1417-24.
 28. Chaitanya VS, Lavania M, Nigam A, Turankar RP, Singh I, Horo I, Sengupta U, Jadhav RS, 2013. Cortisol and proinflammatory cytokine profiles in type 1 (reversal) reactions of leprosy. *Immunol Lett* 156: 159-67.
 29. Belgaumkar VA, Gokhale NR, Mahajan PM, Bharadwaj R, Pandit DP, Deshpande S, 2007. Circulating cytokine profiles in leprosy patients. *Lepr Rev* 78: 223-30.
 30. Iyer A, Hatta M, Usman R, Luiten S, Oskam L, Faber W, Geluk A, Das P, 2007. Serum levels of interferon- γ , tumour necrosis factor- α , soluble interleukin-6R and soluble cell activation markers for monitoring response to treatment of leprosy reactions. *Clin Exp Immunol* 150: 210–16.
 31. Moraes MO, Sarno EN, Teles RMB, Almeida AS, Saraiva BC, Nery JAC, Sampaio EP, 2000. Anti-inflammatory drugs block cytokine mRNA accumulation in the skin and improve the clinical condition of reactional leprosy patients. *J Invest Dermatol.* 115: 935-41.
 32. Atkinson SE, Khanolkar-Young S, Marlowe S, Jain S, Reddy RG, Suneetha S, Lockwood DN, 2004. Detection of IL-13, IL-10, and IL-6 in the leprosy skin lesions of patients during prednisolone treatment for type 1 (T1R) reactions. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 72: 27-34.
 33. Teles RM, Moraes MO, Geraldo NT, Salles AM, Sarno EN, Sampaio EP, 2002. Differential TNF- α mRNA regulation detected in the epidermis of leprosy patients. *Arch Dermatol Res* 294: 355-62.
 34. Martiniuk F, Giovinazzo J, Tan AU, Shahidullah R, Haslett P, Kaplan G, Levis WR. 2012. Lessons of leprosy: the emergence of TH17 cytokines during type II reactions (ENL) is teaching us about T-cell plasticity. *J Drugs Dermatol* 11: 626-30.
 35. Goodman WA, Levine AD, Massari JV, Sugiyama H, McCormick TS, Cooper KD, 2009. IL-6 signaling in psoriasis prevents immune suppression by regulatory T cells. *J Immunol.* 183: 3170-6.
 36. Fujimoto M, Nakano M, Terabe F, Kawahata H, Ohkawara T, Han Y, Ripley B, Serada S, Nishikawa T, Kimura A, Nomura S, Kishimoto T, Naka T, 2011. The influence of excessive IL-6 production in vivo on the development and function of Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 186: 32–40

37. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley OS, Freeman GJ, Green JM, Thompson CB, 1994. CTLA-4 can function as a negative regulator of T-cell activation. *Immunity* 1: 405-13.
38. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, Höpner S, Centonze D, Bernardi G, Dell'Acqua ML, Rossini PM, Battistini L, Rötzschke O, Falk K, 2007. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 110: 1225–32.
39. Lawrence DA, 2001. Latent-TGF-beta: an overview. *Mol Cell Biochem* 219: 163–70.
40. Chauhan SK, Saban DR, Lee HK, Dana R, 2009. Levels of Foxp3 in regulatory T cells reflect their functional status in transplantation. *J Immunol* 182: 148–53.
41. Pulte ED, Broekman MJ, Olson KE, Drosopoulos JHF, Kizer JR, Islam N, Marcus AJ, 2007. CD39/NTPDase-1 Activity and Expression in Normal Leukocytes. *Thrombosis Research* 121: 309–17.
42. Lockwood DN, Suneetha L, Sagili KD, Chaduvula MV, Mohammed I, van Brakel W, Smith WC, Nicholls P, Suneetha S. 2011. Cytokine and protein markers of leprosy reactions in skin and nerves: baseline results for the North Indian INFIR cohort. *PLoS Negl Trop*. 5: e1327.

E – Artigo submetido para publicação

Severe type 1 upgrading leprosy reaction in a renal transplant recipient: an immune reconstitution syndrome due to deficiency of antigen-specific regulatory T-cells?

American Journal of Transplantation.

Submetido em 27 de outubro de 2016.

REFERÊNCIAS

1. Rees RFW. The microbiology of leprosy. *In*: Hastings RC (ed) *Leprosy*, 1st edition, Churchill Livingstone Inc, New York, p. 31-52, 1985.
2. P. W. Brand, R. E. Mansfield, J. D. Ebner . Bacterial density in the skin in lepromatous leprosy as related to temperature. R. C. Hastings,. *Lepr Rev.* 1968 Apr; 39(2): 71–74.
3. Desikan KV. Viability of *Mycobacterium leprae* outside the human body. *Lepr Rev.* 1977;48:231-5
4. Suzuki K, Akama T, Kawashima A, Yoshihara A, Yotsu RR, Ishii N. Current status of leprosy: Epidemiology, basic science and clinical perspectives. *Journal of Dermatology*, v. 39, p. 121–129, 2012.
5. Hirata T. Electron microscopic observations of cell wall and cytoplasmic membrane in murine and human leprosy bacilli. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1985;53:433-40
6. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:338–81.
7. Jadhav R, Suneetha L, Kamble R *et al.* Analysis of antibody and cytokine markers for leprosy nerve damage and reactions in the INFIR cohort in India. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5:e977
8. Briton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. *The Lancet*, v. 363, p. 1209-1219, 2004.
9. Pinheiro RO, Salles JS, Sarno EN, Sampaio EP. *Mycobacterium leprae*– host-cell interactions and genetic determinants in leprosy: an overview. *Future Microbiol*, v. 6, p. 217–230, 2011.
10. Xiang Y. Han, Yiel-Hea Seo, Kurt C. Sizer, Taylor Schoberle, Gregory S. May, John S. Spencer, Wei Li, R. Geetha Nair. A New *Mycobacterium* species causing diffuse lepromatous leprosy. *Am J Clin Pathol.* 2008 Dec; 130(6): 856–864.
11. Peter GJ, Marc D, Tom G, David S, Frances J, George B, Pam C, Anne M. Leprosy-like illness in a patient with *Mycobacterium lepromatosis* from Ontario, Canada. *J Drugs Dermatol.* 2012 Feb; 11(2): 229–233.

12. Xiang Yang Han, Kurt Clement Sizer, Hiok-Hee Tan . Identification of the leprosy agent *Mycobacterium lepromatosis* in Singapore. *J Drugs Dermatol*. 2012 Feb; 11(2): 168–172
13. Costa IM, Kawano LB, Pereira CP, *et al*. Lucio's phenomenon: a case report and review of the literature. *Int J Dermatol*. 2005;44:566-571 – BRASIL
14. Xiang YH, Fleur MA, Siew EC, Betina WA. Analysis of the leprosy agents *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium lepromatosis* in four countries. *J Clin Pathol*. 2014 Oct; 142(4): 524–532.
15. Scollard DM. Infection with *Mycobacterium lepromatosis*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2016;95(3):500-501.
16. Lombardi C. História natural da hanseníase. São Paulo: *IMESP-SASEP*, 1990;13-20.
17. Girdhar BK.. Skin to skin transmission of leprosy. *Indian Joournal of Dermatology, Venereology and Leprology*. 2005;71(4):223-225
18. Global leprosy update, 2015: time for action, accountability and inclusion. Weekly Epidemiological Record, 91, 35 (pp. 405–420)
19. Global leprosy update, 2014: time for action, accountability and inclusion. Weekly Epidemiological Record.
20. Weekly epidemiological Record. No. 35, 2016, 91, 405–42.
21. SINAN-NET, Rede da SVS-MS, 2014.
22. Domingues EM. Epidemiological information on leprosy in the Singu area of upper Burma. *Bull World Health Organ*. 1980;58:51-90.
23. Noordeen SK. The Epidemiology of Leprosy in: Hastings SRC (ed). *Leprosy*. New York: Churchill.
24. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity: a five group system. *Int J Lepr*. 1996;34:255-73.
25. Organização Mundial da Saúde (OMS). Manual para o controle da lepra. 2nd ed. Washington: DC; 1989

26. Scollard, DM *et al.* The continuing challenges of leprosy. *Clinical microbiology reviews*. 2006;19(2):338–81.
27. Andrea A, Alexandre A, Laurent A, Erwin S. Leprosy as a genetic model for susceptibility to common infectious diseases. *Hum Genet*. 2008;123(3): 227–235.
28. Sapkota BR, Macdonald M, Berrington WR, *et al.* Association of *TNF*, *MBL*, and *VDR* Polymorphisms with Leprosy Phenotypes. *Human immunology*. 2010;71(10):992-998. doi:10.1016/j.humimm.2010.07.001.
29. Pinheiro RO, de Souza Salles J, Sarno EN, & Sampaio EP. *Mycobacterium leprae*–host-cell interactions and genetic determinants in leprosy: an overview. *Future Microbiology*. 2011;6(2): 217–230.
30. Fitness J, Tosh K, Hill AV. Genetics of susceptibility to leprosy. *Genes Immun*. 2002;3(8):441-53.
31. Briton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. *The Lancet*. 2004;363:1209-1219.
32. Pandya AN, Tailor HJ. Clinocohistopathological correlation of leprosy. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2008;74:174-6.
33. Opromolla DVA. Noções de hansenologia. Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, Bauru, p. 129, 2000.
34. Talhari S, Neves RG, Penna GO, Oliveira ML VDR. Diagnóstico. *Hanseníase*. 2006;4 cap 10:128-32.
35. Nath I CM. Immunological Aspects, First Ed. IAL Textbook of LEPROSY. *New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd.* 2010;60–73
36. Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL 1991. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 254: 277-279
37. Deanna A. Hagge, Bernadette M. Saunders, Gigi J. Ebenezer, Nashone A. Ray, Vilma T. Marks, Warwick J. Britton, James L. Krahenbuhl, Linda B. Adams. Lymphotoxin- and TNF Have Essential but Independent Roles in the Evolution of the Granulomatous Response in Experimental Leprosy. *Am J Pathol*. 2009;174(4):1379–1389

38. Kindler V, Sappino AP, Grau GE, Piguet PF, Vassalli P. Inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell*. 1989;56(5):731-40.
39. Histol Histopathol. 2016 Jul 22;11804. Immunohistochemical assessment of cell populations in leprosy-spectrum lesions and reactional forms. Fachin LR¹, Soares CT², Belone AF¹, Trombone AP³, Rosa PS⁴, Guidella CC⁵, Franco MF⁶.
40. Foss NT. Immunological aspects of leprosy. Simpósio: Hanseníase, v. 30, p. 335-339, 1997
41. Goulart IMB, Penna GO, Cunha G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2002;35:363-375.
42. Souza, CS. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. *Medicina*, Ribeirão Preto. 1997;30: 325-334.
43. Modlin RL. 1- 2 paradigm: insights from leprosy. *J Invest Dermatol*. 1994;102(6):828-32.
44. De Sousa JR, Pagliari C, de Almeida DS, *et al* . Th9 cytokines response and its possible implications in the immunopathogenesis of leprosy. *J Clin Pathol*. 2016.
45. Cho SN, Cellona RV, Villahermosa LG, Fajardo TT jr, *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.
46. Pradeep K D, Bhawna S, Rajni U, *et al*. Phenolic-glycolipid-1 and lipoarabinomannan preferentially modulate TCR- and CD28-triggered proximal biochemical events, leading to T-cell unresponsiveness in mycobacterial diseases. *Lipids Health Dis*. 2012; 11: 119.
47. Naafs, B. Current views on reactions in leprosy. *Indian journal of leprosy*. 2000; 72 (1): 97–122.
48. Foss NT, souza CS, Goulart IMB, Gonçalves HS, Virmond M. Hanseníase: Episódios reacionais. Projeto Diretrizes, 2003.
49. Walker SL, Dina NJ. Leprosy. *Clin Dermatol*. 2007; 25(2): 165–172.

50. Roche PW, Theuvenet WJ, Britton WJ . Risk factors for type-1 reactions in borderline leprosy patients. *Lancet*. 1991; 338: 654–657.
51. Ranque B, Nguyen VT, Vu HT, Nguyen TH, Nguyen NB, Pham XK, Schurr E, Abel L, Alcais A. Age is an important risk factor for onset and sequelae of reversal reactions in Vietnamese patients with leprosy. *Clin Infect Dis*. 2007; 44: 33–40.
52. Sousa ALOM, Stefani MMA, Pereira GAS, *et al*. Mycobacterium leprae DNA associated with type 1 reactions in single lesion paucibacillary leprosy treated with single dose rifampin, ofloxacin, and minocycline. *Am J Trop Med Hyg*. 2007; 77(5): 829–833.
53. Nery, JAC, Andrade, ARC. Hanseníase: Avanços e Desafios. Capítulo: Episódios reacionais da hanseníase. Universidade de Brasília, 2014; 189-213.
54. Beck-bleumink M, Berhe D. Occurrence of reactions, their diagnosis and management in leprosy patients treated with multidrug therapy. Experience in the leprosy control programme of the All Africa Leprosy and Rehabilitation Training Center (ALERT) in Ethiopia. *Int J Lepr*. 1992; 60:173-184.
55. Andrade ARC, Lehman LF, Schreuder PAM. Como reconhecer e tratar reações hansênicas. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2005.
56. Belgaumkar VA, Gokhale NR, Mahajan PM, Bharadwaj R, Pandit DP, Deshpande S. Circulating cytokine profiles in leprosy patients. *Lepr Ver*. 2007; 78: 223-230.
57. Stefani, MM, Guerra, JG, Sousa, ALM, *et al*. Potential plasma markers of type 1 and type 2 leprosy reactions: a preliminary report. *BMC Infectious Diseases*. 2009; 9: 75. <http://doi.org/10.1186/1471-2334-9-75>
58. Dos Santos LN, da Silva PHL, Alvim IMP, *et al*. Role of T_{EFFECTOR/MEMORY} Cells, *TBX21* Gene Expression and T-Cell Homing Receptor on Type 1 Reaction in Borderline Lepromatous Leprosy Patients. *PLoS ONE*. 2016; 11(10):e0164543. doi:10.1371/journal.pone.0164543.
59. Silva CA, Webb K, Andre BG, *et al*. Type 1 reaction in leprosy patients corresponds with a decrease in pro-resolving and an increase in pro-inflammatory lipid mediators. *Infect Dis. PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(8):e0004955. doi: 10.1371/journal.pntd.0004955.
60. Yamamura M, Wang XH, Ohmen JD, *et al*. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. *J Immunol*. 1992; 149:1470–5.

61. Scollard DM. Epidemiologic characteristics of leprosy reactions. *Int J Lepr Other Mycobact* 1994; 62: 559-569.
62. Sica A, Larghi P, Mancino A, *et al.* Macrophage polarization in tumor progression. *Semin. Cancer Biol.* 2008; 5:349-355.
63. Andersson AK, Chaduvula MV, Atkinson SE, *et al.* Effects of Prednisolone Treatment on Cytokine Expression in Patients with Leprosy Type 1 Reactions. *Infection and Immunity.* 2005; 73: 3725–3733.
64. Teles RMB, Moraes MO, Geraldo NTR, Salles AM, Sarno EN, Sampaio EP. Differential TNFalpha mRNA regulation detected in the epidermis of leprosy patients. *Arch Dermatol Res.* 2002, 294(8): 355–362.
65. Lockwood DNJ, Suneetha L, Sagili KD, *et al.* Cytokine and Protein Markers of Leprosy Reactions in Skin and Nerves:Baseline Results for the North Indian INFIR Cohort. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5.
66. Scollard DM, Chaduvula MV, Martinez A, *et al.* Increased CXC Ligand 10 Levels and Gene Expression in Type 1 Leprosy Reactions. *Clin Vaccine Immunol.* 2011; 18(6): 947–953.
67. Sharma I, Singh A, Mishra AK, Singh LC, Ramesh V, Saxena S. Is CXCL10/CXCR3 axis overexpression a better indicator of leprosy type 1 reaction than inducible nitric oxide synthase? *Indian J Med Res.* 2015; 142(6): 681–68.
68. Sarno EN, Graut GE, Vieira LMM, Nery JA. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-11 during leprosy reactional states. *Clin. exp. Immunol.* 1991; 84:103-108.
69. Ridley MJ, Ridley DS. The immunopathology of erythema nodosum leprosum: the role of extravascular complexes. *Lepr Rev.* 1983;54:95-107.
70. Kumar B, Dogra S, Kaur I. Epidemiological characteristics of leprosy reactions: 15 years experience from north India. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2004;72:125-33.
71. Pocaterra L, Jain S, Reddy R, Muzaffarullah S, Torres O, Suneetha S, *et al.* Clinical course of erythema nodosum leprosum: an 11-year cohort study in Hyderabad, India. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;74:868-79.
72. Nery JA, Vieira LM, de Matos HJ, Gallo ME, Sarno EN. Reactional states in multibacillary hansen disease patients during multidrug therapy. *Rev Inst Med Trop.* 1998;40:363-70.

73. Jopling WH, Mc dougall AC. A doença. In: Manual de hanseníase, 4º ed, *Atheneu Editora*, São Paulo.1991; 11-59.
74. Souza, CS. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. *Medicina*, Ribeirão Preto, 30: 325-334, jul./set. 1997.
75. Pfaltzgraff RE, Ramu G. Clinical leprosy. *Leprosy. 2nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone*. 1994; 237-90.
76. Yawalkar SJ. Reactions in Leprosy. In: YAWALKAR SJ. Leprosy for medical practioners and paramedical workers. World Health Organization - Novartis Foundation for Sustainable Development, Basle, Switzerland. 2002. Chapter 12: 72-79.
77. Murphy GF, Sanchez NP, Flynn TC, Sanchez JL, Mihm MC. Erythema nodosum leprosum: nature and extent of the cutaneous microvascular alterations. *Am Acad Dermatol*. 1986; 14(1): 59–69.
78. Lee DJ, Li H, Ochoa MT, *et al*. Integrated pathways for neutrophil recruitment and inflammation in leprosy. *J Infect Dis*. 2010; 201:558–569.
79. Masters SL, Mielke LA, Cornish AL, *et al*. Regulation of interleukin-1 by interferon- is species specific, limited by suppressor of cytokine signalling 1 and influences interleukin-17 production. *EMBO Rep*. 2010; 11(8): 640–646.
80. Moraes MO, Sarno EN, Almeida AS, Saraiva BC, Nery JA, Martins RC, Sampaio EP. Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon-gamma and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). *Scand J Immunol*. 1999; 50(5): 541–549.
81. Madan NK, Agarwal K, Chander R. Serum cytokine profile in leprosy and its correlation with clinico-histopathological profile. *Lepr Rev*. 2011; 82(4): 371–382.
82. Sousa ALM, Fava VM, Sampaio LH, Martinelli CMT, Costa MB, Mira MT, Stefanil MMA. Genetic and Immunological Evidence Implicates Interleukin 6 as a Susceptibility Gene for Leprosy Type 2 Reaction. *J Infect Disease*, 2012; 205 (9): 1417-1424.
83. Brasil. Portaria 3.125, de 7 de outubro de 2010: aprova as diretrizes para vigilância, atenção e controle da hanseníase. Brasília: Ministério da Saúde; 2010. Avaiaible from: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portaria_n_3125_hanseníase_2010.pdf

84. Taams LS, Palmer DB, Akbar AN, Robinson DS, Brown Z, Hawrylowicz CM. Regulatory T cells in human disease and their potential for therapeutic manipulation. *Immunology*. 2006; 118: 1-9.
85. Hori S, Carvalho TL, Demengeot J. CD25+CD4+ regulatory T cells suppress CD4+ T cell-mediated pulmonary hyperinflammation driven by *Pneumocystis carinii* in immunodeficient mice. *Eur. J. Immunol.* 2002; 32: 1282-1291.
86. Montagnoli C, Bacci A, Bozza S, Gaziano R, Mosci P, Sharpe AH. B7/CD28-dependent CD4+CD25+ regulatory T cells are essential components of the memory-protective immunity to *Candida albicans*. *J. Immunol.* 2002; 169: 6298-6308.
87. Seddiki N, Santner-Nanan B, Tangye SG, *et al*: Persistence of naive CD45RA+ regulatory T-cells in adult life. *Blood*. 2006; 107: 2830-2838.
88. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses?. *International Immunology*. 2009; 21: 1105–1111.
89. Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*. 2009; 30: 636-45.
90. Kronenberg M, Rudensky A. Regulation of immunity by self-reactive T cells. *Nature*. 2005; 435: 598-604.
91. Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, *et al*. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci*. 2006; 16: 665-670.
92. Yu A, Zhu L, Altman NH, Malek TR. A low interleukin-2 receptor signaling threshold supports the development and homeostasis of T regulatory cells. *Immunity*. 2009; 30: 204-17.
93. Dieckmann D, Plotter H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4+CD25+ T cells with regulatory properties from human blood. *J. Exp. Med.* 2001; 193:1303-1310.
94. Kuniyasu Y, Takahashi T, Itoh M, Shimizu J, Toda G, Sakaguchi S. Naturally anergic and suppressive CD25+CD4+ T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell population. *Int Immunol.* 2000; 12:1145.
95. Mills KHG. Regulatory t cells: friend or foe in immunity to infection?. *Nature*. 2004; 4: 841-855.

96. Von Boehmer H, Melchers F. Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease. *Nat Immunol.* 2010;11(1):14-20.
97. 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; 155:1151-1164.
98. Belkaid Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7:875-888.
99. Sakaguchi, S. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic selftolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22: 531-562.
100. Rudensky A. Foxp3 and dominant tolerance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2005; 360:1645-6.
101. Ohkura N, Sakaguchi S. Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function. *Semin Immunopathol.* 2010; 32: 95-106.
102. Piccirillo CA. Regulatory T cells in health and disease. *Cytokine.* 2008; 43: 395-401.
103. Schmidt A., Oberle N., Krammer P. H. Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Frontiers in Immunology.* 2012;3, article 51 doi: 10.3389/fimmu.2012.00051
104. Oderup C, Cederbom L, Makowska A, Cilio CM, Oderup FI. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology.* 2006; 118: 240-249.
105. Wing K, Nishi Y, Prieto-martin P, *et al.* CTLA-4 Control over Foxp3⁺ Regulatory T Cell Function. *Science.* 2008; 322: 271-274.
106. Fallarino F, Grohmann U, Hwang, KW, *et al.* Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003; 1206-1212.
107. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, Hopner S. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood.* 2007; 110:1225–1232.
108. Chiacchio T, Casetti R, Butera O, *et a.* Characterization of regulatory T cells identified as CD4⁺CD25^{high}CD39⁺ in patients with active tuberculosis. *Clinical & Experimental Immunology.* 2009;156: 463–470.

- 109.Pomié C, Ménager-Marcq I, van Meerwijk JPM.. Murine CD8⁺ regulatory T lymphocytes: the new era. *Hum Immunol*. 2008; 69:708–14.
- 110.Dinesh RK, Skaggs BJ, La Cava A, Hahn BH, Singh RP.. CD8⁺ Tregs in lupus, autoimmunity, and beyond. *Autoimmun Ver*. 2010; 9:560–8.
- 111.Churlaud G, Pitoiset F, Jebbawi F, *et al*. Human and Mouse CD8⁺CD25⁺FOXP3⁺ Regulatory T Cells at Steady State and during Interleukin-2 Therapy. *Frontiers in Immunology*. 2015; 6:171. doi:10.3389/fimmu.2015.00171.
- 112.Lundgren A, Suri-Payer E, Enarsson K, Svennerholm AM, & Lundin BS.. *Helicobacter pylori*-Specific CD4⁺ CD25^{high} Regulatory T Cells Suppress Memory T-Cell Responses to *H. pylori* in Infected Individuals .*Infection and Immunity*. 2003; 71(4): 1755–1762. <http://doi.org/10.1128/IAI.71.4.1755-1762.2003>.
- 113.Zhang M, Zhou J, Zhao T, *et al*. Dissection of a circulating and intrahepatic CD4(+)Foxp3(+) T-cell subpopulation in chronic hepatitis B virus (HBV) infection: a highly informative strategy for distinguishing chronic HBV infection states. *J Infect Dis*. 2012; 205:1111-20.
- 114.Campanelli AP, Roselino AM, Cavassani KA. CD4+CD25+ T Cells in Skin Lesions of Patients with Cutaneous Leishmaniasis Exhibit Phenotypic and Functional Characteristics of Natural Regulatory T Cells. *J Inf Dis*. 2006; 193:1313–22.
- 115.Silva MV, Massaro Junior JL, Machado JR. Expression Pattern of Transcription Factors and Intracellular Cytokines Reveals That Clinically Cured Tuberculosis Is Accompanied by an Increase in Mycobacterium-Specific Th1, Th2, and Th17 Cells. *BioMed Research International*. 2015.
- 116.Guyot-Revol V, Innes JA, 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: 803-810.
- 117.Palermo ML, Pagliari C, Trindade MAB, Yamashita TM, Duarte AJS, Cacere CR, BernarD G. Increased Expression of Regulatory T Cells and Down-Regulatory Molecules in Lepromatous Leprosy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2012.
- 118.Kumar S, Naqvi RA, Ali R, Rani R, Khanna N, Rao DN. CD4+CD25+ T regs with acetylated FoxP3 are associated with immune suppression in human leprosy. *Mol Immunol*. 2013; 4: 512-20.
- 119.Saini C, Ramesh V, Nath I. Increase in TGF- secreting CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ T regulatory cells in anergic lepromatous leprosy patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 1.

- 120.Sadhu S, Khaitan BK, Joshi B, Sengupta U, Nautiyal AK, Mitra DK. Reciprocity between Regulatory T Cells and Th17 Cells: Relevance to Polarized Immunity in Leprosy. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2016; 10(1).
- 121.Bedoya, S. K., Lam, B., Lau, K., & Larkin, J. (2013). Th17 Cells in Immunity and Autoimmunity. *Clinical and Developmental Immunology*. 2013; 9:86789. <http://doi.org/10.1155/2013/986789>.
- 122.Tabarkiewicz J, Pogoda K, Karczmarczyk A, Pozarowski P, Giannopoulos K.. The Role of IL-17 and Th17 Lymphocytes in Autoimmune Diseases. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2013, 435–449. <http://doi.org/10.1007/s00005-015-0344->
- 123.Attia EAS., Abdallah M, Saad AA, Afifi A, EL Tabbakh A, El-Shennawy D, Ali HB. Circulating CD4+ CD25highFoxP3+ T cells vary in different clinical forms of leprosy. *International Journal of Dermatology*. 2010; 49:1152–1158,
124. Geluk A., Van Meijgaarden KE, Wilson L, *et al.*. Longitudinal immune responses and gene expression profiles in type 1 leprosy reactions. *J Clin Immunol*. 2014; 34 (2):245-55.
125. Attia EA, Abdallah M, El-Khateeb E, Saad AA, Lotfi RA, Abdallah M, El-Shennawy D. Serum Th17 cytokines in leprosy: correlation with circulating CD4(+) CD25 (high)FoxP3 (+) T-regs cells, as well as down regulatory cytokines. *Arch Dermatol Res*. 2014; 306(9):793-801. doi: 10.1007/s00403-014-1486-2.
- 126.Battaglia M, Stabilini A, Migliavacca B, Horejs-hoeck J, Kaupper T, Roncarolo MG. Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J Immunol*. 2006; 5:1121-22.
- 127.Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Gallep R, Neurath, MF. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J.Immunol*. 2004; 172:5149–5153.
- 128.Jeffery LE., Burke F, MURA M. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit Tcell produciton of inflammatory cytokines and promote development of regulatory Tcells expressing CTLA-4 and FOXP3. *J Immunol*. 2009; 183: 5458-5467.
- 129.Saini C, Siddiqui A, Ramesh V, Nath I. Leprosy Reactions Show Increased Th17 Cell Activity and Reduced FOXP3+ Tregs with Concomitant Decrease in TGF- and Increase in IL-6. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(4): e0004592.

130. Modlin RL, Mehra V, Jordan R, Bloom BR, Rea TH. In situ and in vitro characterization of the cellular immune response in erythema nodosum leprosum. *J Immunology*. 1986; 136: 3883-886.
131. Cooper CL, Mueller C, Sinchaisri TA, *et al.* Analysis of naturally occurring delayed-type hypersensitivity reactions in leprosy by in situ hybridization. *J Exp Med*. 1998; 169: 1565-81.
132. Parente JNT, Talhari C, Schettini APM, Massone C. T regulatory cells (TREG)(TCD4+CD25+FOXP3+) distribution in the different clinical forms of leprosy and reactional states. *An. Bras. Dermatol*. 2015; 90(1): 41-47.
133. Massone C, Nunzi E, Ribeiro-Rodrigues R, *et al.* T regulatory cells and plasmacytoid dendritic cells in hansen disease: a new insight into pathogenesis? *Am J Dermatopathol*. 2010; 32(3): 251–256.
134. Vukmanovic-Stejic M, Agius E, Booth N, Dunne PJ, Lacy KE, Reed JR, Sobande TO, Kissane S, Salmon M, Rustin MH, Akbar AN, 2008. The kinetics of CD4+Foxp3+ T cell accumulation during a human cutaneous antigen-specific memory response in vivo. *J Clin Invest*; 118: 3639–3650.
135. Vukmanovic-Stejic M, Sandhu D, Sobande TO, Agius E, Lacy KE, Riddell N, Montez S, Dintwe OB, Scriba TJ, Breuer J, Nikolich-Zugich J, Ogg G, Rustin MH, Akbar AN, 2013. Varicella zoster-specific CD4+Foxp3+ T cells accumulate after cutaneous antigen challenge in humans. *J Immunol* 190: 977–986
136. Noack M, Miossec P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev*. 2014; 13(6): 668–677.
137. Pelletier E, Maggi M, Micheletti A, *et al.* Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood*. 2010; 115:335-343.
138. Ivanov II., Zhou L, Littman DR. Transcriptional Regulation of Th17 Cell Differentiation. *Seminars in Immunology*. 2007; 19(6), 409–417. <http://doi.org/10.1016/j.smim.2007.10.011>
139. Long, SA., Buckner JH. Combination of Rapamycin and IL-2 Increases De Novo Induction of Human CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T Cells. *Journal of Autoimmunity*. 2008; 30(4), 293–302. <http://doi.org/10.1016/j.jaut.2007.12.012>
140. Sehgal SN. Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clin Biochem*. 1998; 31(5): 335–340.

141. Sugimoto N, Oida T, Hirota K, Nakamura K, Nomura T, Uchiyama T, Sakaguchi S. Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25⁺CD4⁺ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. *Int Immunol*. 2006; 18(8): 1197–1209.
142. Getnet D, Grosso JF, Goldberg MV, Harris TJ, Yen HR, Bruno TC, Drake CG. A role for the transcription factor Helios in human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Molecular Immunology*. 2010; 47(7-8), 1595–1600. <http://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.02.001>.
143. Yadav M, Louvet C, Davini D, Gardner JM, Martinez-Llordella M, Bailey-Bucktrout S, Bluestone JA. Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*. 2012; 209(10): 1713–1722. <http://doi.org/10.1084/jem.20120822>.
144. Rachel A, Gottschalk CE, James PA. Expression of Helios in peripherally induced Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Immunol*. 2012; 188(3): 976–980.
145. Akimova T, Beier UH, Wang L, Levine MH, Hancock WW. Helios Expression Is a Marker of T Cell Activation and Proliferation. *PLoS ONE*. 2011; 6(8): e24226. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0024226>.
146. Szurek E, Lukasz AC, Maciej W, *et al*. Differences in Expression Level of Helios and Neuropilin-1 Do Not Distinguish Thymus-Derived from Extrathymically-Induced CD4⁺Foxp3⁺ Regulatory T Cells, 2015.
147. Fu S, Zhang N, Yopp AC, *et al*. TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. *Am J Transplant*. 2004; 4(10): 1614–1627.
148. Gunnlaugsdottir B, Maggadottir SM, Skaftadottir I, Ludviksson B. The ex vivo induction of human CD103⁺ CD25^{hi} Foxp3⁺ CD4⁺ and CD8⁺ Tregs is IL-2 and TGF- 1 dependent. *J Immunol*. 2013; 77(2): 125–134. doi: 10.1111/sji.12009.
149. Shevach EM, Tran DQ, Davidson TS, Andersson J. The Critical Contribution of TGF- to the Induction of Foxp3 Expression and Treg Function. *European Journal of Immunology*. 2008; 38(4): 915–917. <http://doi.org/10.1002/eji.200738111>.
150. Lu L, Zhou X, Wang J, Zheng SG, Horwitz DA. Characterization of Protective Human CD4⁺CD25⁺ FOXP3⁺ Regulatory T Cells Generated with IL-2, TGF- and Retinoic Acid. *PLoS ONE*, 2010; 5(12): e15150. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0015150>.
151. Selvaraj RK, Geiger TL. A kinetic and dynamic analysis of Foxp3 induced in T cells by TGF-beta. *J Immunol*. 2007; 179:11.

152. Tran DQ, Ramsey H, Shevach EM. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood*. 2007;110:2983–2990.
153. Zheng SG, Wang JH, Gray JD, Soucier H, Horwitz DA. Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. *J Immunol*. 2004;172:5213–5221.
154. Rao PE, Petrone AL, Ponath PD. Differentiation and expansion of T cells with regulatory function from human peripheral lymphocytes by stimulation in the presence of TGF- β . *J Immunol*. 2005;174:1446–1455.
155. Urry Z, Chambers ES, Xystrakis E, Dimeloe S, Richards DF, Gabrysova L, *et al.* The role of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and cytokines in the promotion of distinct Foxp3+ and IL-10+ CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol*. 2012; 4: 2697–2708.
156. Griffin MD, *et al.* Dendritic cell modulation by 1 α ,25 dihydroxyvitamin D₃ and its analogs: a vitamin D receptor-dependent pathway that promotes a persistent state of immaturity in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci*. 2001; 98(12):6800–5.
157. Szeles L, *et al.* 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is an autonomous regulator of the transcriptional changes leading to a tolerogenic dendritic cell phenotype. *J Immunol*. 2009; 182(4):2074–83.
158. Kang SW, Kim SH, Lee N, *et al.* 1,25(OH)₂ vitamin D₃ promotes *FOXP3* expression via binding to vitamin D response elements in its conserved non-coding sequence region. *Journal of Immunology*. 2012;188(11): 5276–5282. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1101211>
159. Akimova T, Kamath BM, Goebel JW, *et al.* Differing Effects of Rapamycin or Calcineurin Inhibitor on T-Regulatory Cells in Pediatric Liver and Kidney Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation : Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2012; 12(12): 3449–3461. <http://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2012.04269.x>
160. Rossetti M, Spreafico R, Saidin S, *et al.* Ex Vivo–Expanded but Not In Vitro–Induced Human Regulatory T Cells Are Candidates for Cell Therapy in Autoimmune Diseases Thanks to Stable Demethylation of the FOXP3 Regulatory T Cell–Specific Demethylated Region. *The Journal of Immunology*. 2015; 194:113–124.