

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

GABRIELA ATHAYDE AMIN

**Imunopatologia da doença de Hansen: caracterização do padrão de resposta imune local
através da técnica de sequenciamento de última geração (NGS)**

SÃO PAULO

2023

GABRIELA ATHAYDE AMIN

**Imunopatologia da doença de Hansen: caracterização do padrão de resposta imune local
através da técnica de sequenciamento de última geração (NGS)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob orientação do Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma.

SÃO PAULO

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Amin, Gabriela Athayde
Imunopatologia da doença de Hansen :
caracterização do padrão de resposta imune local
através da técnica de sequenciamento de última
geração (NGS) / Gabriela Athayde Amin. -- São Paulo,
2023.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.
Orientador: Juarez Antônio Simões Quaresma.

Descritores: 1.Sequenciamento de Nova Geração
2.Hanseníase 3.Imunologia 4.Citocinas 5.Receptores
de citocinas

USP/FM/DBD-191/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

GABRIELA ATHAYDE AMIN

**Imunopatologia da doença de Hansen: caracterização do padrão de resposta imune local
através da técnica de sequenciamento de última geração (NGS)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob orientação do Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma.

BANCA AVALIADORA

Avaliador (a) 1

Avaliador (a) 2

Avaliador (a) 3

Avaliador (a) 4

Avaliador (a) 5

SÃO PAULO

2023

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese ao meu eterno professor e amigo, Miguel de Oliveira Saraty (in memoriam), que me ensinou como me reerguer diante das adversidades da vida.

AGRADECIMENTOS

É um enorme desafio escrever uma tese de doutorado, bem como é difícil, também, em duas páginas agradecer a todos que fizeram parte da trajetória que me trouxe até aqui.

O lugar que inicia esse projeto é de um tempo distante; nele rememoro meu avô, Orlando, que todos os dias me pedia para lhe ler o jornal, e me chamava carinhosamente de “professorinha”, o que viria ser uma semente de uma forma de viver o mundo. Dessa forma, acreditei na possibilidade de virar, um dia, uma acadêmica, alguém que pensa na utopia de mudar o mundo através da ciência e da educação.

Agradeço ao meu filho, Gabriel, que me ensinar a ser uma pessoa melhor todos os dias. Sua existência é luz para guiar meus passos, me faz buscar por mais coerência, por valores justos e éticos, por um mundo melhor, nem que seja no nosso microambiente.

Agradeço aos meus pais, que me proporcionaram o acesso a educação, em um país onde ela é um privilégio. Agradeço por sempre terem me incentivado estudar, por terem me ensinado a importância e o prazer do estudo. Eles, que me compravam as enciclopédias, que me fizeram amar livros, que me matriculavam em todos os cursos que eu gostaria de fazer, de quem eu ouvi sempre que, “educação é investimento e que é tudo que deixaremos pra você”, com quem eu aprendi que em um mundo tão desigual, o estudo, por vezes, é a única forma de mobilidade social e de imaginar, dessa forma, um mundo mais justo. Agradeço por fortalecer a importância do que realmente importa, e que a vida só vale ser vivida em sociedade, como diz a filosofia africana, Ubuntu: a concepção de humanidade na qual cada pessoa tenha a consciência de que faz parte de algo maior que seus interesses individuais. Eles me ensinaram isso, talvez não saibam, mas ensinaram com exemplos.

Agradeço a todos os meus familiares que foram minha rede de afetos, minhas tias e tios, primos e primas, em especial Diego, Norberto, Alynne, Darly, Marisa e Kattia, esta última que se tornou a primeira mulher Doutora, na minha família, e que abriu caminho para outras mulheres que viriam, inclusive eu.

Agradeço meu orientador Juarez Quaresma, a oportunidade de tê-lo como orientador. Tenho muito orgulho de citá-lo como um dos responsáveis pela minha formação profissional. Agradeço pela confiança, pela amizade, conselhos e paciência.

Agradeço meu professor e amigo Miguel Saraty (*in memorian*) por sua amizade e amor.

À Hellen Fuzzi, pela ajuda, disponibilidade, generosidade e amizade. Por me conduzir de maneira tão gentil e ser uma inspiração.

Agradeço a todos os meus professores desde o ensino fundamental, passando pelo médio e superior. Meus professores da pós-graduação em Dermatologia em especial, Dra. Maria Amélia, Dra. Alena, Dra Regina e Dr. Miguel (*in memorian*). Dra Amélia com sua doçura, ensinou dermatologia e inspirou. Dra Alena, que com sua maestria trouxe a dermatologia como arte para minha vida e Dra Regina que inspira com tamanho conhecimento e sua generosidade em compartilhá-lo. Elas foram imprescindíveis na minha formação.

À Dra. Carla Pires, por me inspirar, como pessoa e profissional.

Às minhas amigas, que sempre me apoiaram e que com todos os desequilíbrios e distâncias da vida foram capazes de suportar a permanência do sentimento.

Agradeço ao meu companheiro Lauro Sabbá, por toda ajuda, paciência e amor. Por cuidar de mim e do Gabriel quando eu não tinha mais forças. Saber-se amada por quem somos é uma das coisas mais fortalecedoras de uma existência.

Às demais pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho ou participaram da minha vida, e que, porventura, eu não tenha citado, meus mais sinceros agradecimentos.

EPÍGRAFE

*“A mãe reparou que o menino
gostava mais do vazio
do que do cheio.
Falava que os vazios são maiores
e até infinitos.”*

Manoel de Barros

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas e siglas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Hanseníase – Aspectos Gerais	16
1.2 Hanseníase – Epidemiologia	17
1.3 Agente Etiológico e Transmissão.....	20
1.4 Formas Clínicas	23
1.4.1 Hanseníase Indeterminada	23
1.4.2 Hanseníase Tuberculóide	24
1.4.3 Hanseníase Virchowiana	25
1.4.4 Hanseníase Dimorfa	27
1.4.5 Manifestações Neurológicas.....	28
1.4.6 Reações Hansênicas	29
1.5 Tratamento.....	30
1.6 Imunologia.....	32
1.6.1 Resposta Imune Inata.....	32
1.6.2 Resposta Imune Adaptativa.....	40
1.7 Genética.....	49
2 JUSTIFICATIVA	52
3 OBJETIVOS	53
3.1 Objetivo Geral.....	53
3.2 Objetivos Específicos	53
4 METODOLOGIA.....	54
4.1 Desenho do Estudo.....	54
4.2 Casuística e Métodos	54
4.2.1 Procedimentos	55
4.2.2 Purificação de RNA.....	56
4.2.3 Sequenciamento de nova geração (NGS)	56
4.3 Critérios De Inclusão e Exclusão.....	57

4.4 Análise de Dados.....	57
5 RESULTADOS	59
5.1 Características da população do estudo	59
5.2 Parâmetros clínicos.....	61
5.3 Expressão de citocinas e receptores associados por sequenciamento de nova geração (NGS)	62
6 DISCUSSÃO	76
7 CONCLUSÃO.....	88
8 ANEXOS.....	89
9 REFERÊNCIAS.....	90
Apêndices.....	112

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Taxa de detecção geral de casos novos de hanseníase por 100 mil habitantes segundo Unidade da Federação e capital de residência. Brasil, 2021	18
Figura 2 – Estrutura da <i>Micobacteria leprae</i>	22
Figura 3 – Hanseníase indeterminada.....	24
Figura 4 – Hanseníase tuberculóide.....	25
Figura 5 – Hanseníase Virchowiana.....	26
Figura 6 – Hanseníase dimorfa.....	28
Figura 7 – Resposta imune nas formas clínicas polares da hanseníase	36
Figura 8 – Paradigma imunológico da resposta T helper (Th) 1/Th2 nas formas polares da hanseníase.....	41
Figura 9 – Possível integração em rede e novos paradigmas imunológicos na resposta de linfócitos T na hanseníase.....	45
Figura 10 – Citocinas e efeitos dessas citocinas em diferentes células imunes nas respostas imunes da hanseníase.....	48
Figura 11 – Representação esquemática de células T envolvidas no espectro da doença da hanseníase.....	49
Figura 12 – Genes e GWAS loci associados a hanseníase	51
Figura 13 – Fluxograma de coleta dados e material biológico.....	55
Figura 14 – Pacientes das formas tuberculóides apresentando placas eritematoinfiltradas de contornos irregulares e limites pouco nítidos variando de entre 2 cm e 2,5cm nos seus maiores diâmetros	61
Figura 15 – Pacientes das formas Virchowianas apresentando múltiplos nódulos infiltrados e tubérculos distribuídos em tórax, dorso, membros superiores e membros inferiores	62
Figura 16 – Expressão de IL-10 nas formas Virchowianas em relação às formas tuberculóides	665
Figura 17 – Expressão de IL-27 nas formas Virchowianas em relação às formas tuberculóides	66
Figura 18 – Expressão de IL-18 nas formas Virchowianas em relação às formas tuberculóides	66

Figura 19 – Expressão de TGFB1 nas formas Virchowianas em relação às formas tuberculóides	67
Figura 20 – Expressão de IL-16 nas formas Virchowianas em relação às formas tuberculóides	67
Figura 21 – Expressão de IL-13 nas formas Virchowianas em relação às formas tuberculóides	68
Figura 22 – Expressão de IL-36G nas formas Virchowianas em relação às formas tuberculóides	69
Figura 23 – Expressão de IL-21 nas formas Virchowianas em relação às formas tuberculóides	69
Figura 24 – Expressão de IL-17B nas formas Virchowianas em relação às formas tuberculóides	70
Figura 25 – Expressão de IL-17D nas formas Virchowianas em relação às formas tuberculóides	70
Figura 26 – Expressão de IL-15 nas formas Virchowianas em relação às formas tuberculóides	71
Figura 27 – Expressão de TGFB3 nas formas Virchowianas em relação às formas tuberculóides	71
Figura 28 – Expressão de IL-7 nas formas Virchowianas em relação às formas tuberculóides	72
Figura 29 – Expressão de IL-23A nas formas Virchowianas em relação às formas tuberculóides	72
Figura 30 – Expressão de IL-10RA nas formas Virchowianas em relação às formas tuberculóides.....	74
Figura 31 – Expressão de IL-10RB nas formas Virchowianas em relação às formas tuberculóides.....	75
Figura 32 – Diagrama das citocinas mais expressas em cada forma polar da hanseníase	77
Figura 33 – Diagrama dos receptores mais expressos em cada forma polar da hanseníase	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características clínicas e demográficas da população estudada	59
Tabela 2 – Características clínicas e laboratoriais da população estudada.....	60
Tabela 3 – Genes de citocinas estudados, seus valores de logFC e pValue, na população estudada	64
Tabela 4 – Genes de citocinas super-expressos na forma Virchowiana.....	65
Tabela 5 – Genes de citocinas super-expressos na forma tuberculóide	68
Tabela 6 – Genes de receptores de citocinas estudados, seus valores de logFC e pValue, na população estudada.....	73
Tabela 7 – Genes de receptores de citocinas super-expressos na forma Virchowiana.....	74
Tabela 8 – Genes de receptores super-expressos na forma tuberculóide	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BB	Borderline
BCG	Bacilo de Calmette e Guérin
Bregs	Células B reguladoras
BT	Tuberculóide
BV	Borderline Virchowiana
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CCL2	Ligante de quimiocina 2
CONITEC	Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde
CR	Receptores do complemento
DAMPs	Moléculas de padrão associados a danos
DC	Células dendríticas
DD	Dimorfa-dimorfa
DOPA	Dihydroxyphenylalanine
DT	Dimorfa-tuberculóide
DV	Dimorfa-Virchowiana
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ENH	Eritema nodoso hansênico
FDR	False-Discovery rate
FGF	Fator de crescimento básico de fibroblastos
GDEs	Genes diferencialmente expressos
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos
GWAS	Estudo de associação genômica ampla
hBD	Defensina-beta humanas
HE	Hematoxilina-eosina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HT	Hanseníase tuberculóide
HDT	Hanseníase dimorfa tuberculóide
HLA	Sistema de antígenosleucocitários humanos
IFN	Interferon
IL-RA	Antagonista do receptor da interleucina-1

IL	Interleucina
IMC	Imunidade mediada por células
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzida
JAK	Janus quinase
LACC1	<i>Laccase domain containing 1</i>
LAM	Lipoarabinomanana
LPS	Lipopolissacarídeo
LogFC	Logaritmo fold-change
LTA	<i>Lymphotoxin-alpha</i>
ManLAN	Lipoarabinomanana com manose ou arabnose
MB	Multibacilar
MBL	Proteína quimiatrativa de monócitos 1
MCP-1	Concentração sérica de lectina ligante de manose
MDP	Muramil-dipeptídeo
MH	Mal de Hansen
MHB	Grupo de estudo hanseníase borderline ou dimorfa
MHC	Complexo de histocompatibilidade
MHT	Hanseníase tuberculóide
MHV	Hanseníase Virchowiana
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
Mrna	Ácido ribonucleico mensageiro
NFκb	Fator de transcrição nuclear
NGF	Fator de crescimento neural
NGFR	Receptor de fator de crescimento neural
NGS	Sequenciamento de nova geração
NK	Natural killers
NLRs	NLR family pyrin domain
NOD	Nucleotide-binding oligomerization
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PB	Paucibacilar
PCDT	Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Hanseníase
PCR	Proteína C reativa

PG	Peptidoglicano
PGL	Glicolípídeo fenólico
PMN	Leucócitos polimorfonucleares
PQT	Poliquimioterapia
PQT-U	Poliquimioterapia única
PRR	Receptores de reconhecimento de padrões
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RNA	Ácido Ribonucleico
RR/RT1	Reação hansênica tipo 1, ou reação reversa
RT2	Reação hansênica tipo 2
SIRH	Sistema de informação de investigação da resistência antimicrobiana na hanseníase
SOCS1	Supressor da sinalização de citocinas 1
SNP	Polimorfismos de nucleotídeo único
STAT	Ativadores de transcrição de sinal e transdutores de ativação
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th1	Resposta do Tipo 1
Th2	Resposta do Tipo 2
TLR	Toll-like receptors
TNF	Fator de necrose tumoral
Tregs	Células T reguladoras
TYK2	Tirosina-proteína quinase 2
UEPA	Universidade do Estado do Pará
TT	Tuberculóide-tuberculóide
VDR	Receptor de vitamina D
VV	Virchowiana-Virchowiana

RESUMO

Amin GA. Imunopatologia da doença de Hansen: caracterização do padrão de resposta imune local através da técnica de sequenciamento de última geração (NGS) [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

A hanseníase é uma doença infecciosa, granulomatosa causada pelo *Mycobacterium leprae*. Sua imunopatogênese, manifestada no(s) sítio(s) patológico(s) do tecido acometido, é um processo complexo, particularmente à luz da notável heterogeneidade de subconjuntos de células T envolvidas. Este estudo avaliou a resposta imunológica das formas polares, no contexto da hanseníase, utilizando a técnica de Sequenciamento de Nova Geração (NGS). Foram avaliadas as expressões gênicas de citocinas e receptores associados, em amostras de lesões obtidas a partir de sete biópsias de pele (três derivadas de pacientes com a forma tuberculóide e 4 derivadas de pacientes com a forma Virchowiana), com o fim de comparativamente caracterizar o padrão de resposta imune tecidual nas formas clínicas polares da hanseníase. Na forma Virchowiana, observamos expressão diferenciada das seguintes citocinas: IL18BP, IL10, IL-4I1, IL-27, TGF β 1, IL-18 e IL-16. Os genes de receptores mais expressos na forma Virchowiana foram: IL-10RA e IL-10 RB, IL-5RA, IL-12RB1, IL-2RG, IL-2RB, IL17RA e IL-4R. Na forma tuberculóide, foram observadas com maior expressão as citocinas: IL-13, IL-36G, IL11, IL-12B, IL-21, IL-17B, IL-17D, IL15, TGF β 3, IL7 e IL-23A. Os genes de receptores mais expressos na forma tuberculóide foram: IL-17REL, IL-17-RE, IL-23R, IL-1R1, IL-1R2, IL-18R1, IL-7R, IL-13RA2 e IL-2RB, IL-2RG e IL-12RB1. Nossos resultados nos permitiram a construção de um painel contendo as citocinas e seus receptores mais fortemente expressos em cada forma polar. Estes achados, em grande monta, corroboraram com a literatura prévia, além de demonstrarem citocinas ainda não implicadas anteriormente com a hanseníase, tais como a IL-11. Também observamos a expressão diferenciada de citocinas, como a IL-17, que agem como importante mediador inflamatório, o que abre a possibilidade terapêutica envolvendo tratamento de estados de hiper inflamação, como é o caso das reações hansênicas. Desta forma, tomados em conjunto, os resultados deste estudo podem ajudar no entendimento dos mecanismos subjacentes à resposta imune dos pacientes, assim como no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Palavras-chave: Sequenciamento de Nova Geração. Hanseníase. Imunologia. Citocinas. Receptores de citocinas.

ABSTRACT

Amin GA. Immunopathology of leprosy: local immune response patterns deciphered using New Generation Sequencing [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

Leprosy is an infectious, granulomatous disease caused by *Mycobacterium leprae*. Its immunopathogenesis, manifested in the pathological site(s) of the affected tissue, is a complex process, particularly considering the remarkable heterogeneity of subsets of T cells involved. This study evaluated the immune response of the polar forms, in the context of leprosy, using the Next Generation Sequencing (NGS) technique. Gene expressions of cytokines and associated receptors were evaluated in samples of lesions obtained from seven skin biopsies (three from patients with the tuberculoid form and four from patients with the Virchowian form), to comparatively characterize the tissue immune response pattern in polar clinical forms of leprosy. In the Virchowian form, we observed differentiated expression of the following cytokines: IL18BP, IL10, IL-411, IL-27, TGF β 1, IL-18, and IL-16. The most expressed receptor genes in the Virchowian form were IL-10RA and IL-10 RB, IL-5RA, IL-12RB1, IL-2RG, IL-2RB, IL17RA and IL-4R. In the tuberculoid form, the following cytokines were observed with greater expression: IL-13, IL-36G, IL11, IL-12B, IL-21, IL-17B, IL-17D, IL15, TGF β 3, IL7 and IL-23A. The most expressed receptor genes in the tuberculoid form were IL-17REL, IL-17-RE, IL-23R, IL-1R1, IL-1R2, IL-18R1, IL-7R, IL-13RA2 and IL-2RB, IL -2RG and IL-12RB1. Our results allowed us to construct a panel containing the cytokines and their receptors most strongly expressed in each polar form. These findings, to a large extent, corroborate the previous literature, in addition to demonstrating cytokines not previously implicated in leprosy, such as IL-11. We also observed the differentiated expression of cytokines, such as IL-17, which act as an important inflammatory mediator, which opens the therapeutic possibility involving the treatment of hyper-inflammatory states, as is the case of leprosy reactions. Thus, taken together, the results of this study may help in understanding the mechanisms underlying the immune response of patients, as well as in the development of new therapeutic strategies.

Keywords: Next Generation Sequencing. Leprosy. Immunology. Cytokines. Receptors, cytokines.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hanseníase – Aspectos Gerais

A hanseníase é uma doença infecciosa, granulomatosa causada pelo *Mycobacterium leprae*, conhecido também como bacilo de Hansen, que foi descoberto por Armauer Hansen em 1873. A doença afeta principalmente a pele e os nervos periféricos, podendo acometer outros órgãos e sistemas, como mucosas do trato respiratório superior, linfonodos, olhos, testículos, músculos e ossos. A doença possui evolução lenta e progressiva e é passível de causar deformidades e incapacidades físicas (BRASIL, 2017).

A doença, atualmente, é considerada um problema de saúde pública em vários países, principalmente nos bolsões de pobreza, de clima tropical. A hanseníase permanece endêmica nas Américas, África, sudoeste da Ásia, principalmente na Índia e na Indonésia, países localizados na região do Mediterrâneo, e Brasil (NERY *et al.*, 2019).

A hanseníase é considerada uma das antigas doenças epidêmicas humanas, com registros que datam do Século V a.C., da descrição de lesões de pele características, no Egito e na antiga Pérsia (MONOT, 2005).

O *Mycobacterium leprae* é transmitido de uma pessoa para outra, principalmente, através das vias aéreas superiores, por pacientes contaminados, multibacilares, não tratados, sendo esta forma, o meio de manutenção da cadeia de transmissão da doença (QUILTER *et al.*, 2020).

As formas clínicas se relacionam diretamente com a resposta imunológica, apresentando assim, um amplo espectro de manifestações clínicas, onde, quanto melhor for a imunidade Th1 do paciente, mais circunscrita será sua doença, com clínica apresentando menor quantidade de lesões cutâneas e nervos acometidos, por outro lado, com maior predomínio imunológico Th2, a clínica se apresenta mais exuberante, com uma forma multibacilar, o paciente apresenta mais lesões e nervos acometidos. Entretanto, ao longo do tempo, ficou claro que a resposta polarizada Th1/Th2 não é suficiente para explicar a complexidade da resposta imune em hanseníase, e mais recentemente outras células foram identificadas como tendo papel importante na imunopatologia da doença (SOUZA *et al.*, 2017).

Em 2001, o Instituto Pasteur decodificou o genoma do *Mycobacterium leprae*, possibilitando uma nova fase de estudos com sequenciamento genético. Porém, apesar dos esforços para identificar marcadores celulares e mediadores inflamatórios, a imunopatogênese da hanseníase não é totalmente compreendida. A alta heterogeneidade e a existência de

fenótipos celulares mistos em diferentes momentos da infecção que são influenciados pelos mediadores produzidos no microambiente tecidual, juntamente com a inexistência de anticorpos altamente específicos para diferenciar claramente as células humanas, contribuem para a dificuldade de estabelecer um papel preciso de cada célula tipo na imunopatogênese da hanseníase, e para entender melhor essas vias e descobrir novas, são necessárias novas tecnologias, como estudos de sequenciamento de RNA.

Este estudo pretendeu avaliar a resposta imunológica no contexto da hanseníase utilizando a técnica de Sequenciamento de Nova Geração (NGS), que é uma valiosa técnica para os estudos de genômica estrutural e funcional, pois promove o sequenciamento de DNA/RNA em plataformas capazes de gerar dados sobre milhões de pares de bases em uma única execução ao possibilitar economia de tempo e diminuição de custo.

Foram estudadas as expressões de genes de citocinas, além de genes de receptores e outras moléculas associadas, para o estudo, em amostras de lesões obtidas a partir de biopsias de pele, comparando as duas formas polares da doença. Desta forma, pretende-se caracterizar melhor o padrão de resposta imune tecidual na hanseníase, procurando identificar o envolvimento de padrões de resposta imune clássica, bem como novos fatores de resposta do hospedeiro.

1.2 Hanseníase – Epidemiologia

A hanseníase representa um grave problema de saúde pública e muitos esforços vêm sendo feitos, pautados na Estratégia Global de Hanseníase 2021 a 2030, para controlar a doença. As metas da estratégia preveem reduzir em 55% a taxa de casos novos de hanseníase em menores de 15 anos de idade até 2030, reduzir em 30% o número absoluto de casos novos até 2030 e dar providência a 100% das manifestações sobre práticas discriminatórias em hanseníase registradas nas Ouvidorias do Sistema Único de Saúde (SUS). Apesar de os estudos epidemiológicos terem demonstrado certa tendência à queda no número de casos por habitante, continuam sendo observadas altas taxas de prevalência nos continentes africano, asiático e americano (BOLETIM EPIDEM BRASIL, 2023; OMS, 2023).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reportou, em 2021, 140.594 casos novos da doença no mundo, tendo sido observado um aumento na taxa de detecção de 10,2%, quando comparada a 2020, destes casos, 19.826 (15,1%) ocorreram na região das Américas e 18.318 foram notificados, em especial, no Brasil, o que corresponde a 92,4% do número de casos novos das Américas. Os casos novos reportados pelo Brasil, Índia e Indonésia corresponderam a

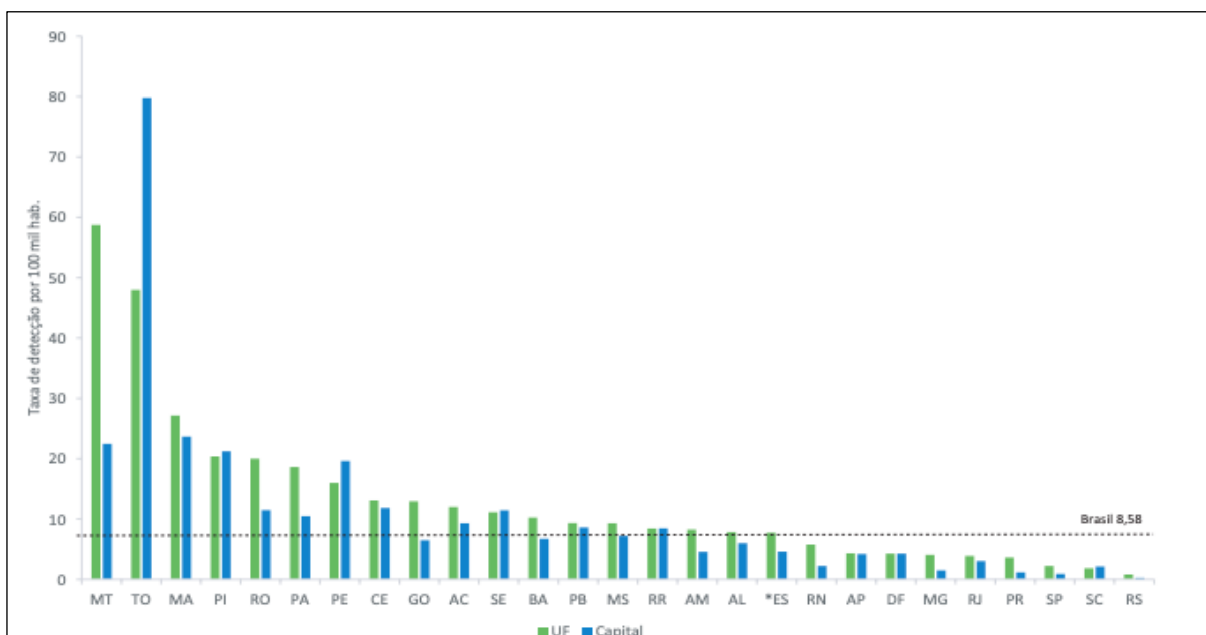
74,5% dos casos novos detectados no ano de 2021 (BOLETIM EPIDEM BRASIL, 2023; OMS, 2023).

Tais dados reportaram casos novos, em menores de 15 anos, em 76 países. No decorrer do ano de 2021, 9.052 novos casos foram diagnosticados nessa população, segundo dados da OMS, correspondendo a 6,4% do total de casos novos diagnosticados. Do total de casos novos diagnosticados no Brasil, 761 (4,1%) ocorreram em menores de 15 anos (BOLETIM EPIDEM BRASIL, 2023; OMS, 2023).

Embora se observe uma redução dos casos de hanseníase ao longo dos anos, essa queda mais acentuada nos últimos anos pode estar relacionada à menor detecção de casos ocasionada pela pandemia de Covid-19, que contribuiu para um subdiagnóstico com subnotificação (BOLETIM EPIDEM BRASIL, 2023; OMS, 2023).

Dados preliminares referentes aos anos de 2012 a 2021 apontam que o Brasil diagnosticou 269.086 casos novos de hanseníase. Do total de casos novos diagnosticados no mesmo período, 17.442 se deram em menores de 15 anos. Todas as regiões do país apresentaram redução nessa taxa ao longo do período, embora com oscilações, principalmente nas regiões Norte e Centro-Oeste. Em 2021, Mato Grosso foi a unidade da Federação (UF) que apresentou a maior taxa de detecção geral, 58,76 casos novos por 100 mil habitantes; sua capital, Cuiabá, registrou a taxa de 22,45 casos por 100 mil habitantes (BOLETIM EPIDEM BRASIL, 2023; OMS, 2023).

Figura 1 – Taxa de detecção geral de casos novos de hanseníase por 100 mil habitantes segundo Unidade da Federação e capital de residência. Brasil, 2021



Fonte: Sinan/SVS/MS

A Estratégia Global de Hanseníase 2021 a 2030 traz mudanças significativas na abordagem ao enfrentamento da hanseníase no mundo. Enquanto as estratégias anteriores estavam direcionadas para a eliminação da doença como problema de saúde pública, tendo obtido avanços significativos na redução de sua carga global nas últimas três décadas, a nova estratégia centraliza esforços para a interrupção da transmissão e a eliminação dos casos autóctones, cujo objetivo em longo prazo é o conceito de zero hanseníase: zero infecção: zero infecção e doença, zero incapacidade, zero estigma e discriminação (OMS, 2021a).

No Brasil, a Estratégia Nacional para o Enfrentamento da Hanseníase 2019-2022 tinha como objetivo geral reduzir a carga da doença no país ao fim de 2022, diminuindo para 30 o número total de crianças com grau 2 de incapacidade física; reduzindo para 8,83/1 milhão de habitantes a taxa de pessoas com grau 2 de incapacidade física; e implantando em todas as Unidades da Federação canais para registro de práticas discriminatórias às pessoas acometidas pela hanseníase e seus familiares (OMS, 2021a).

O Ministério da Saúde antecipou as tratativas junto à OMS, com a retomada das ações regulares de controle da hanseníase e da implantação do esquema único de tratamento (PQT-U), conforme Nota Técnica Conjunta nº 16/2021-CGDE/DCCI/SVS/MS e CGAFME/DAF/SCTIE/MS, e com o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Hanseníase (PCDT) que foi aprovado pela Portaria SCTIE/MS nº 67, de 7 de julho de 2022, garantindo o tratamento oportuno e evitando o desabastecimento da poliquimioterapia (PQT). A vigilância da resistência medicamentosa faz parte das ações estratégicas para a redução da carga da doença no país. No que diz respeito ao monitoramento da resistência antimicrobiana aos fármacos utilizados no tratamento da hanseníase, em 2021, foi desenvolvido e implantado no Sistema Único de Saúde (SUS) o Sistema de Informação de Investigação da Resistência Antimicrobiana na Hanseníase (SIRH) (BRASIL, 2018, 2022).

Após a introdução da poliquimioterapia (PQT), em 1981, as estratégias da OMS se concentraram na redução da prevalência, inicialmente para menos de 1 por 10.000 de população e, depois, na redução da detecção de novos casos, incapacidades físicas, estigma e discriminação. Essas estratégias encorajaram a OMS a redefinir a meta para a hanseníase como eliminação, definida como interrupção da transmissão. Ao incorporar os objetivos de zero incapacidade e zero discriminação, essa estratégia é corajosamente intitulada Rumo à Zero Hanseníase (OMS, 2021a).

1.3 Agente Etiológico e Transmissão

A hanseníase é causada pelo *Mycobacterium leprae*, e foi descoberta em 1874 pelo médico norueguês Armauer Hansen (1841-1912), por esta razão, o é também chamada de Bacilo de Hansen. O *Mycobacterium leprae* é da família *Mycobacteriaceae*, ordem *Actinomycetales*, classe *Schizomycetes*, trata-se de um bacilo gram-positivo, álcool-ácido resistente e com atividade DOPA oxidase. O *Mycobacterium leprae* é um bastonete reto ou ligeiramente encurvado, de 1,5 a 8 micra de comprimento e de difícil cultura laboratorial. Nos esfregaços de pele e cortes histológicos, os bacilos são vistos isolados, em grupamentos variados e em aglomerados chamados globias, imersos em uma substância chamada gleia (REES; YOUNG, 1994; SCOLLARD *et al.*, 2006).

O *Mycobacterium leprae*, no meio ambiente, permanece viável por nove dias, infecta, principalmente, macrófagos e células de Schwann. Não sendo um bacilo cultivado em meios artificiais com lento crescimento (cerca de 12 a 14 dias) e prolifera em temperaturas mais frias, entre 27°C e 30°C, justificando, assim, o maior acometimento de áreas superficiais, tais como a pele, os nervos periféricos, os testículos e as vias respiratórias superiores (LASTÓRIA; ABREU, 2014; REES; YOUNG, 1994). Possui uma parede celular com espessura na ordem de 20nm constituída de peptídeoglicanos, os quais são ligados a cadeias polissacarídeas. Na parede celular da micobactéria encontra-se um importante componente com atividade imunoreguladora, capaz de regular a atividade bactericida dos macrófagos, o lipoarabinomanana (LAM). O núcleo da parede celular contém peptidoglicano, composto por cadeias alternadas de N-acetilglucosamina e N-glicililmuramato, ligadas por pontes cruzadas de peptídeo, que está ligado à camada de galactana por arabinogalactana. Três cadeias ramificadas de arabinano, por sua vez, estão ligadas ao galactano, formando, junto com a camada de peptidoglicano, uma zona densa de elétrons ao redor de *Mycobacterium leprae*. Os ácidos micólicos estão ligados aos terminais das cadeias de arabinano para formar o folheto interno de uma bicamada de pseudolipídeo. O folheto externo é composto por uma rica matriz de ácidos micólicos intercalados de monomicolatos de trealose e ácidos micoseróicos de dimicocerosatos de ftiocerol, bem como glicolipídeos fenólicos (PGLs), formando a zona de elétron-transparente. Foi postulado que muitas dessas mesmas moléculas, juntamente com os manosídeos de fosfatidilinositol e os fosfolipídeos, são liberados da parede celular após a síntese, formando uma região semelhante a uma cápsula. O lipídio dominante na parede celular que confere especificidade imunológica ao *Mycobacterium leprae* é o PGL-1. Estudos recentes sugerem que o PGL-1 está envolvido na interação do *Mycobacterium leprae* com a laminina

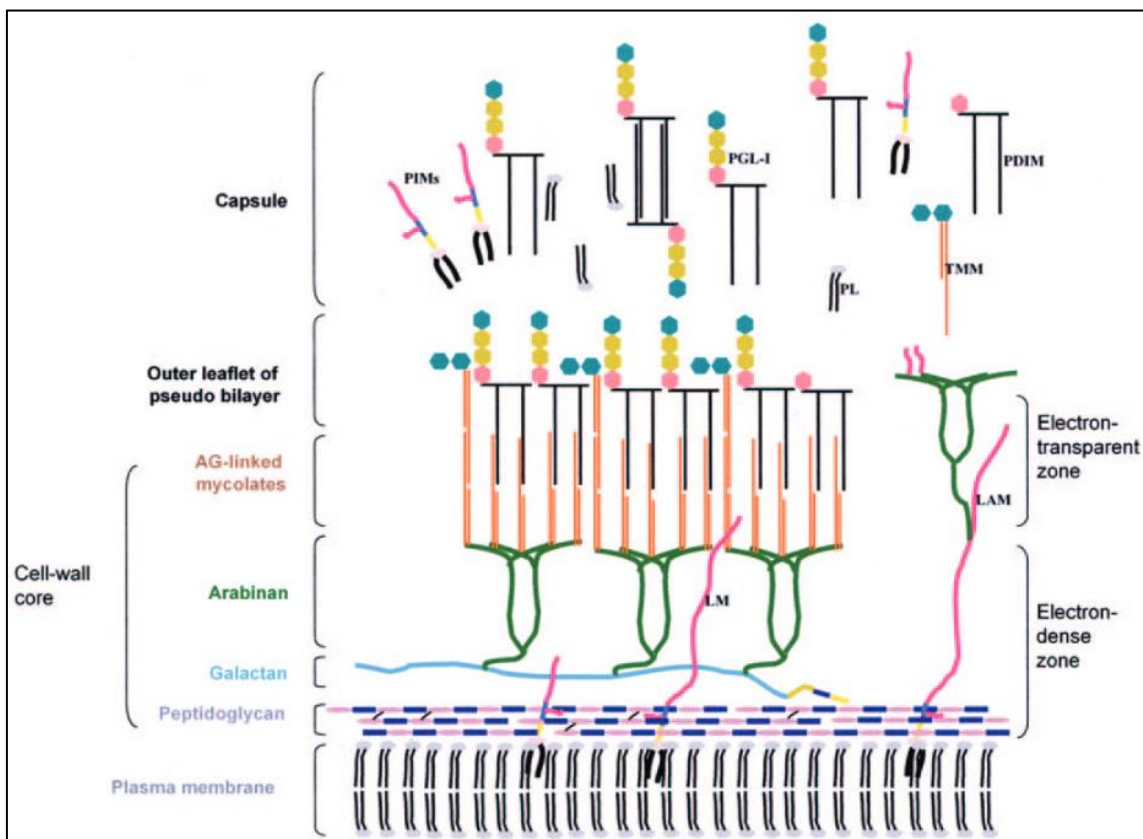
das células de Schwann, sugerindo um papel do PGL-1 nas interações nervo periférico-bacilo (LASTÓRIA; ABREU, 2014; SCOLLARD *et al.*, 2006).

O genoma completo do *Mycobacterium leprae* foi decodificado em 2001, pelo grupo do professor Stewart Cole, a partir de bacilos isolados que foram inoculados em tatus. O genoma possui 3,27 milhões de pares de bases indicando uma significativa redução gênica quando comparada ao *Micobacterium tuberculosis* que tem 4,41 milhões de pares de base. Essa redução no genoma, com delação importante de genes, eliminou vias metabólicas do bacilo, o que poderia explicar a multiplicação lenta e a incapacidade de cultivado *in vitro* (COLE *et al.*, 2001).

O *Mycobacterium leprae* era o único agente etiológico conhecido da hanseníase até que se descobriu o *Mycobacterium lepromatosis*. Este último foi observado como agente etiológico da hanseníase em áreas endêmicas no México e no Caribe, sobretudo em pacientes com reações graves e que apresentam fenômenos vasculares (HAN *et al.*, 2008). A descoberta dessa nova espécie pode fornecer uma explicação para a variabilidade clínica e geográfica da doença de hansen (HAN *et al.*, 2009; HAN; ZHANG; LI, 2015).

Uma análise com 22.814 nucleotídeos revelou uma diferença de 9,1% entre os dois organismos – *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium lepromatosis* – que substanciou uma divergência em nível de espécie que ocorreu aproximadamente há 10 milhões de anos (HAN *et al.*, 2009).

O conhecimento acerca da biologia e da patogênese da *Mycobacterium lepromatosis* é limitado, pois esta espécie permanece não cultivada (HAN *et al.*, 2008). Uma comparação ampla entre os genomas do *Mycobacterium lepromatosis* e *Mycobacterium leprae* pode fornecer uma visão aprofundada da biologia da *Mycobacterium lepromatosis*, bem como revelar a história evolutiva dessas duas espécies intimamente relacionadas, mas claramente distintas (SINGH *et al.*, 2015).

Figura 2 – Estrutura da *Micobacteria leprae*

Fonte: Scollard *et al.*, 2006.

O homem é o principal hospedeiro e reservatório para o *Mycobacterium leprae*, muito embora tatus possam ser infectados e transmitir para o homem de forma ocasional a doença, e não possuem importância epidemiológica como reservatórios silvestres na cadeia de transmissão do referido bacilo. Estudos recentes mostram que outros animais podem ser reservatórios naturais para o agente etiológico, tal como macacos africanos e esquilos (MEREDITH *et al.*, 2014; STEFANI *et al.*, 2019; TRUMAN *et al.*, 2011).

A transmissão ocorre, principalmente, através do convívio com doentes MB sem tratamento. Os bacilos são eliminados do corpo humano principalmente pelas vias aéreas superiores e pelas secreções oronasais. Existem menções à eliminação através de feridas ulceradas na pele, leite materno, urina e fezes, porém a quantidade de bacilos não seria capaz de provocar infecção (TALHARI; TALHARI; PENNA, 2015). Em revisão epidemiológica recente, concluiu-se que a transmissão bacilar de indivíduos MB não tratados para indivíduos suscetíveis é o único modo de manutenção da cadeia de transmissão da doença (QUILTER *et al.*, 2020).

Em relação à população em geral, o risco de contágio está diretamente relacionado à prevalência de casos bacilíferos. Em apenas 50% dos casos novos conseguem-se descobrir os

elos epidemiológicos que são essenciais ao enfoque profilático do problema, ou seja, o doente contagiante (LASTÓRIA; ABREU, 2014; TALHARI; TALHARI; PENNA, 2015).

1.4 Formas Clínicas

Ao longo do tempo, diversas classificações foram utilizadas para agrupar os pacientes, entre elas as mais importantes são:

Classificação de Madri (1953): estabelecida no Congresso Internacional de Leprologia, que adota critérios de polaridade, baseados nas características clínicas da doença, que foram acrescidos pelos aspectos bacteriológicos, imunológicos e histológicos da hanseníase, dividindo a hanseníase em dois grupos imunologicamente instáveis, o indeterminado e o dimorfo, e dois tipos polares estáveis, o tuberculoide e o virchowiano.

Classificação de Ridley e Jopling (1966): esta é a mais utilizada para as formas clínicas da doença, quer seja para fins clínicos ou para pesquisa, que traz cinco formas de apresentação da hanseníase baseando-se em características clínicas, histológicas e no padrão imunológico. Esta classificação dividiu a doença em formas polares: tuberculóide (TT) e lepromatosa (VV) e em formas intermediárias borderline tuberculoide (BT), borderline (BB) e borderline lepromatosa (BL) (RIDLEY; JOPLING, 1966).

A Organização Mundial de Saúde, em 1989, propôs uma classificação utilizando o número de lesões de pele com o fim de facilitar a operacionalidade do tratamento. Essa classificação define o esquema de poliquimioterapia (PQT) a ser introduzido, em que pacientes com até cinco lesões receberiam o esquema de tratamento para paucibacilares e os que possuíam mais de cinco lesões seriam tratados com o esquema para multibacilares (OMS, 1989).

1.4.1 Hanseníase Indeterminada

A hanseníase indeterminada é considerada como uma forma inicial e transitória da doença, pode ser encontrada em indivíduos com resposta imune não definida diante do bacilo. Apresenta-se principalmente pela presença de manchas hipocrômicas, geralmente assintomáticas, sem limites precisos, medindo em geral poucos centímetros de diâmetro, e em geral apresentam-se com poucas lesões (LASTÓRIA; ABREU, 2014; TALHARI, 2015).

As lesões apresentam áreas com distúrbios de sensibilidade. A sensibilidade térmica é na frequentemente a única a apresentar-se alterada, estando a sensibilidade dolorosa e tátil normais. As manchas podem localizar-se em qualquer região do tegumento. Não ocorrem lesões

neurológicas ou espessamentos nervosos nesta forma (LASTÓRIA; ABREU, 2014). Esta forma apresenta-se com baciloscopia negativa, sendo, portanto, uma forma paucibacilar e a histopatologia se caracteriza por infiltrado com predominância de células linfo-histiocitárias, inespecífico, perineural e perivanexial (SOUZA, 2017).

Figura 3 – Hanseníase indeterminada



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

1.4.2 Hanseníase Tuberculóide

A hanseníase tuberculóide caracteriza a forma clínica de contenção da multiplicação dos bacilos dentro do espectro da doença, costumando acarretar sintomas restritos à pele e aos nervos periféricos (SOUZA 2017).

A lesão caracteriza-se por uma placa eritemato-infiltrada, anular ou circular de centro poupado e hipoestésica. As lesões normalmente são pouco numerosas e restritas a uma área do corpo. Os danos neurais se acentuam rapidamente com espessamento assimétrico dos nervos periféricos, especialmente os nervos próximos às lesões cutâneas, com consequente alteração

tanto sensitiva quanto autonômica dos ramos neurais, que evoluem para hipoestesia e anestesia, além pele xerótica e com alopecia (LASTÓRIA; ABREU, 2014; SOUZA, 1997).

Nesta forma clínica, podemos encontrar somente o comprometimento neural sem lesões cutâneas, denominando-se hanseníase tuberculóide neural pura (SOUZA, 1997). A baciloscopia encontra-se negativa e o exame histopatológico demonstra granulomas do tipo tuberculóide com distribuição perivascular e perineural, e a introdermoreação de Mitsuda é positiva (LASTÓRIA; ABREU, 2014; SOUZA, 2017; TALHARI, 2015).

Figura 4 – Hanseníase tuberculóide



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

1.4.3 Hanseníase Virchowiana

Esta forma é bacilífera e caracteriza-se por um polimorfismo de lesões. As lesões podem ser placas eritemato-infiltradas, nódulos e infiltração dérmica difusa, que quando na face, dão origem à fácies leonina. Essa infiltração dérmica difusa, quando associada a um espessamento comprovado da pele na ausência de lesões cutâneas visíveis, caracteriza a lepromatose difusa (LASTÓRIA; ABREU, 2014; TALHARI, 2015).

As lesões neurais possuem tendência à simetria e resultam de verdadeiras invasões bacilares. As fibras nervosas vão sendo progressivamente comprimidas pelo infiltrado histiocitário com bacilos, sendo por esta razão que as lesões clínicas se manifestam tardiamente.

Essas lesões são mais insidiosas; há neuropatia periférica distal acral simétrica e predisposição para o aumento simétrico dos troncos neurais (TALHARI, 2015).

Entre as manifestações tardias destacam-se a perda de cílios, sobrancelhas, lóbulos auriculares e pele descamativa e xerótica, sobretudo nos pés. Pode-se notar, ainda, sinais e sintomas de acometimento do trato respiratório superior, dos testículos e da câmara anterior do olho. Mucosas podem ser acometidas, especialmente o nariz, com surgimento de rinite, ulceração perfuração e desabamento do septo nasal. Na mucosa oral ocorre infiltração difusa, com ou sem pápulas, em todas as estruturas da cavidade, na laringe há infiltração da epiglote, que pode evoluir com obstrução mecânica da fenda glótica, com conseqüente afonia, dispneia e asfixia. Na área dos olhos, além da madarose, ocorre espessamento córneo, da íris e do corpo ciliar e o lagoftalmo e suas complicações são conseqüentes ao espessamento dos nervos facial e trigêmio (LASTORIA, 2014; SOUZA 2017).

A pesquisa de bacilos no tecido é positiva, observando-se bacilos isolados ou agrupados pela coloração de Ziehl-Neelsen. A histologia mostra macrófagos xantomizados, com aspecto espumoso, chamados células de Virchow. Estes macrófagos encontram-se agrupados na derme poupando pequena faixa de colágeno na interface dermoepidérmica (faixa de Ulna). A reação de Mitsuda é negativa (LASTÓRIA; ABREU, 2014; TALHARI, 2015).

Figura 5 – Hanseníase Virchowiana



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

1.4.4 Hanseníase Dimorfa

A forma dimorfa enquadra-se na maioria dos quadros clínicos dos pacientes. Há três tipos: hanseníase dimorfa tuberculóide, hanseníase dimorfa dimorfa e hanseníase dimorfa Virchowiana. Esta forma é imunologicamente instável, por isso existe uma grande variação em suas manifestações clínicas, seja na pele, nos nervos, ou no comprometimento sistêmico (LASTÓRIA; ABREU, 2014; TALHARI, 2015).

Quanto mais se distanciam do polo tuberculóide, mais numerosas são as lesões cutâneas e a sua morfologia une aspectos das formas Virchowiana e tuberculóide, podendo haver predominância ora de um, ora de outro tipo. São caracterizadas por placas eritematosas infiltradas com periferia ferruginosa, com bordas internas nítidas e limites externos difusos (lesões foveolares). Quando numerosas, são chamadas lesões em renda ou queijo suíço. A infiltração assimétrica da face, dos pavilhões auriculares, e a existência de lesões no pescoço e nuca são elementos que sugerem esta forma clínica (LASTÓRIA; ABREU, 2014; TALAHRI 2015).

Em geral, as lesões neurais ocorrem precocemente e são assimétricas, levando a incapacidades físicas com frequência. A baciloscopia pode ser negativa ou positiva com índice bacilar variável. A histopatologia exhibe granuloma do tipo tuberculóide muito semelhante àquele observado na forma TT, contudo possui um arranjo mais frouxo. A reação de Mitsuda, assim como a baciloscopia, pode ser positiva ou negativa (LASTÓRIA; ABREU, 2014; TALHARI, 2015).

Figura 6 – Hanseníase dimorfa



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

1.4.5 Manifestações Neurológicas

O *Mycobacterium leprae* tem um tropismo pelos nervos periféricos, ocorrendo comprometimento neural em todas as formas de Hanseníase, com variação de gravidade conforme os subtipos da doença. Lesões nervosas de filetes nervosos, de nervos superficiais e de troncos nervosos podem acontecer, as alterações são essencialmente sensitivas, e a primeira sensibilidade alterada é a térmica, em seguida a dolorosa e por último a tátil. A lesão dos troncos neurais, além de alterações sensitivas, também gera alterações motoras, que estão relacionadas

ao surgimento de paresias, paralisias, fraqueza muscular, amiotrofias, retracões tendíneas e garra, e autonômicas, produzindo distúrbios vasculares e da sudorese (LASTORIA, 2014; SOUZA, 2017).

Os nervos mais frequentemente acometidos são o trigêmio e o facial, responsáveis pela mímica da face e pela sensibilidade corneana, respectivamente. Nos membros superiores, os nervos, mediano e ulnar são mais acometidos, e em menor escala o radial. O acometimento do nervo ulnar é responsável pela conhecida mão em garra, enquanto o acometimento do nervo radial é responsável pela mão caída. Além desses achados, podem ocorrer paresias, paralisias, alterações de sudorese, como hipoidrose e anidrose na área acometida (LASTORIA, 2014; SAMPAIO, 2018). Nos membros inferiores, os nervos mais acometidos são o tibial posterior e o fibular comum. A lesão do fibular gera o pé caído, devido ao comprometimento dos músculos responsáveis pela dorsiflexão do pé, além de alterações sensitivas e autonômicas. A lesão do tibial posterior gera os dedos em garra, por paralisia dos músculos intrínsecos do pé e a fisiopatologia das alterações motoras, sensitivas e autonômicas nesse nervo estão envolvidas no desenvolvimento da úlcera plantar e conseqüentemente do mal perfurante plantar (LASTORIA, 2014; SOUZA, 2017; TALHARI, 2015).

De acordo com a forma da Hanseníase, as alterações neurológicas têm características próprias. Nos indivíduos classificados como tuberculoides, as lesões neurológicas são mais precoces, agressivas, assimétricas e geralmente mononeurais. Os granulomas tuberculoides destroem as fibras nervosas e pode ocorrer necrose caseosa no interior dos nervos afetados, formando verdadeiras tumorações, que evoluem para abscessos frios e, posteriormente, podem fistulizar. Já nos indivíduos classificados como virchovianos, as lesões neurais são extensas, simétricas e pouco intensas, sendo lentamente comprimidas pelo infiltrado inflamatório. Nos dimorfos o comprometimento neural é intenso e extensor, havendo destruição dos nervos pelos granulomas de forma generalizada. Essas lesões neurológicas podem preceder as lesões cutâneas e, muitas vezes, a evolução insidiosa, sem dor ou outras manifestações agudas, caracterizada a Neurite Silenciosa (LASTORIA, 2014; TALHARI, 2015).

1.4.6 Reações Hansênicas

São reações caracterizadas pelas manifestações cutâneas e/ou neurológicas, por alterações inflamatórias agudas decorrentes de mecanismos imunológicos. Há duas formas de reações hansênicas, as do tipo 1 ou reação reversa (RR) e a do tipo 2 (RT2), ou Eritema Nodoso.

Elas podem ocorrer em qualquer momento, antes, durante ou após o tratamento (PANDHI, 2013).

As reações do Tipo 1 ocorrem principalmente em pacientes borderlines (HBT, HBB, HBV), enquanto, as do tipo 2, ocorrem em pacientes com níveis baciloscópicos altos e com altos títulos sorológicos de anti-PGL-1, geralmente pacientes virchovianos (PANDHI, 2013).

Fatores genéticos em pacientes portadores do HLA-A11, apresentam mais reações do Tipo 2, ao passo que, o polimorfismo da região promotora do gene do fator de necrose tumoral-alfa apresentam mais reações do tipo 1 e 2. Outros fatores podem contribuir para o surgimento de reações, como por exemplo, a gravidez, parto, infecções, vacinas, estresse, cirurgias (KAHAWITA; WALKER; LOCKWOOD, 2008).

Na RR observamos o surgimento de lesões cutâneas novas e/ou a piora das lesões preexistentes, podem ocorrer manifestações sistêmicas como febre, mal-estar, anorexia, e, as neurites. O quadro tem início súbito e as neurites são comuns, com perda de função sensitiva ou sensitivo-motora e dor à palpação dos nervos acometidos, que se encontram aumentados de volume. Na RT2, ocorre o aparecimento de nódulos eritematosos dolorosos que podem, por vezes, ulcerar. Também há um comprometimento sistêmico com febre, mal-estar, uveíte, iridociclite, artrite, orquiepididimite, edema acrofacial e distúrbios de coagulação (KAHAWITA; WALKER; LOCKWOOD, 2008).

O tratamento das reações se baseia na corticoterapia para reação do tipo 1 e na Talidomida, associada ou não ao corticoide na reação do tipo 2, em caso de neurites, orquiepididimite, e edema de mãos e pés. Na presença de dor neural, medicações como amitriptilina, carbamazepina ou gabapentina, podem ser utilizadas (LASTÓRIA; ABREU, 2014).

1.5 Tratamento

O tratamento específico da pessoa com hanseníase, indicado pelo Ministério da Saúde, é a poliquimioterapia, padronizada pela Organização Mundial de Saúde, que é o esquema de primeira linha para o tratamento, recomendado pela referida Organização desde 1982 e adotado no Brasil como único esquema terapêutico desde o início da década de 1990. A poliquimioterapia é constituída pelo conjunto dos seguintes medicamentos: rifampicina, dapsona e clofazimina, com administração associada. Essa associação evita a resistência medicamentosa do bacilo que ocorre com frequência quando se utiliza apenas um medicamento, impossibilitando a cura da doença (BRASIL, 2018, 2022; OMS, 2019).

A OMS publicou em 2019 as “Diretrizes para o diagnóstico, tratamento e prevenção da hanseníase”, onde recomenda um regime contendo Rifampicina, clofazimina, dapsona para todos os pacientes com hanseníase, com duração de tratamento de seis meses para hanseníase paucibacilar e 12 meses para multibacilar. Em 2018, a Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (Conitec) do Ministério da Saúde avaliou as evidências científicas disponíveis e recomendou na Portaria SCTIE/MS nº 71, de 11/12/2018 14,15 a ampliação do uso da Clofazimina para os pacientes PB.

Após 1º de julho de 2021, todos os PB utilizam o novo esquema terapêutico que passa a ser denominado PQT-U 6 doses (cartela adulto ou infantil); E os pacientes multibacilares mantêm as doze cartelas mensais de PQT-U.

No tratamento das reações do tipo I é recomendado manter a medicação, utilizar 40 a 60 mg/dia de prednisona (1 mg/kg/dia), sobretudo se houver neurite, gradual diminuição de corticóide e empregos eventuais de analgésicos e antiinflamatórios não hormonais.

No tratamento das reações do tipo II é recomendado manter a medicação específica, segundo esquema: Reações leves, analgésicos e antiinflamatórios não hormonais e reações moderadas a intensas: 100 a 400 mg de Talidomida por dia.

O diagnóstico precoce e o tratamento de todos os doentes, principalmente os multibacilares com a MDT-PQT/OMS, consistem nas bases mais importantes da profilaxia da moléstia. O diagnóstico precoce da doença e o reconhecimento imediato dos quadros reacionais possibilitam a interrupção da cadeia de transmissão e a prevenção das incapacidades físicas. A vigilância dos contatos também tem importância fundamental, e nem sempre é realizada.

As ações de controle e vigilância epidemiológica da hanseníase podem ser consideradas essenciais e devem estar centradas nos seguintes aspectos: a) educação em saúde; b) exames periódicos dos contatos de pacientes hanseníacos; c) aplicação da BCG; d) prevenção e tratamento das incapacidades físicas (OMS, 2021a).

A prevenção da hanseníase por quimioprofilaxia é recomendada, pelo Grupo de Desenvolvimento de Diretrizes, como tratamento preventivo para contatos de pacientes com hanseníase (adultos e crianças com idade igual ou superior a 2 anos), após a exclusão de casos de hanseníase e tuberculose, e na ausência de outras contraindicações (OMS, 2019).

A BCG isolada é considerada fator de certo grau de proteção contra a doença, principalmente quando deixa cicatriz. Por este motivo o Ministério da Saúde recomenda a aplicação de uma dose da vacina em contatos intradomiciliares. Contudo só deve receber as duas doses da vacina aqueles que não apresentarem duas cicatrizes vacinais (OMS, 2019).

1.6 Imunologia

1.6.1 Resposta Imune Inata

Os macrófagos são as principais células fagocíticas do sistema imune englobando partículas e microrganismos em estruturas membranosas denominadas fagossomos, os quais sofrem maturação e fusão com lisossomos para lise dos patógenos. Os macrófagos encontrados no tecido representam as principais células hospedeiras do *Mycobacterium leprae*, representando pontos-chaves na imunidade inata relacionada à hanseníase (PINHEIRO *et al.*, 2018).

Sabe-se que os *Receptores do Complemento* (do inglês *Complement Receptors* ou CRs) dos tipos CR1, CR3 e CR4 fazem a mediação da fagocite inicial ao mesmo tempo que a detecção de *Padrões Moleculares Associados a Patógenos* (do inglês *Pathogen-Associated Molecular Pattern* ou PAMPs) por *Receptores de Reconhecimento de Padrões* (do inglês *Pattern Recognition Receptors* ou PRRs) iniciam as interações microrganismo-hospedeiro (*M. leprae*-macrófago). Estudos identificaram dez TLRs, entre eles temos os heterodímeros TLR2/1 e os homodímeros TLR2 e TLR4, todos considerados importantes no processo de reconhecimento de micobactérias (BRIGHTBILL *et al.*, 1999).

O heterodímeros TLR2/1 tem nas lipoproteínas do *Mycobacterium leprae* um fator ligante que, uma vez ativado, produz um aumento na liberação do IL-12 juntamente com *fator de necrose tumoral* (do inglês *tumoral necrosy fator ou TNF*), sendo este último responsável por conduzir as respostas protetoras do tipo TH1. Importante observar que o fenótipo de macrófago M1 é predominantemente observado nesses casos. Outro ponto importante a observar nessa relação é o fato de que já foi demonstrado que a expressão TLR2/1 está presente em biópsias de pele nos pacientes tuberculoides (TT) em comparação com os pacientes virchowianos (VV).

Tendo como base os dados anteriormente relatados, vê-se que a ativação de PRRs é essencial para que as respostas antimicrobianas sejam estimuladas. Embora atuasse de maneira positiva na indução a altos níveis de moléculas reguladoras negativas, como a MCP-1 e o Antagonista do receptor da Interleucina-1(IL-1RA), diminuindo a produção de TNF-alfa, IL-1b e IL6, ficou comprovado através de estudos de citocinas secretadas por monócitos que o PGL-1, isoladamente, não seria capaz de induzir uma resposta inflamatória (LIU *et al.*, 2012; MANCA *et al.*, 2013; MONTROYA, 2010; SAINI *et al.*, 2016).

A produção da citocina pró-inflamatória, a IL-12, é induzida pelo reconhecimento do bacilo feito pelo TLR2/4 e contribui de maneira significativa para a eliminação do bacilo. A presença de polimorfismo nestes receptores, segundo demonstraram estudos genéticos, levaria a uma redução de IL-12 produzidos pelos macrófagos o que impactaria de maneira relevante o desenvolvimento da doença, levando assim a uma presença maior nos pacientes lepromatosos (FROES *et al.*, 2020; KANG; CHAE, 2001).

Os compostos lipoglicana lipomanana/LAM e lipoarabinomanana com manose ou arabnose (ManLAN) são fatores de virulência do *Mycobacterium leprae* que funcionam como agonistas de TLR2/1, atuando na ativação de macrófagos para destruição bacilar, como também na imunomodulação da resposta do hospedeiro, "desativando" os macrófagos. Essas moléculas consomem espécies reativas de oxigênio na explosão oxidativa do fagossomo, o que facilita a sobrevivência do bacilo (TALHARI; TALHARI; PENNA, 2015).

Por sua vez, os tipos CR1, CR3 e CR4, que são essenciais para a fagocitose pelos macrófagos, se ligam a manose como lectina 1, MBL, a superfamília das lectinas tipo C, os quais apresentam importante função na captura do *Mycobacterium leprae* e receptores "Scavenger" de macrófagos (CD36), que removem material extracelular, em especial lipoproteínas oxidadas de baixa densidade, que podem estar relacionados com a formação de células espumosas (ADAMS *et al.*, 1993; GREAVES; GORDON, 2009; MONTOYA, 2010). Os macrófagos, estimulados por determinadas citocinas do sistema imune inato, desenvolvem diferentes caminhos fagocíticos, onde a IL-15, presente nas lesões de pacientes tuberculóides, induz a via antimicrobiana dependente de vitamina D e a IL-10 induz via fagocítica com expressão de receptores scavenger e fagocitose de lipídeos oxidados e micobactérias, o que se constitui uma contradição, entretanto, com a proposta explicação de que a capacidade fagocítica dos macrófagos pode de alguma forma reduzir sua atividade microbicida, limitando subsequentemente sua capacidade de controlar a infecção (FROES *et al.*, 2020; MONTOYA *et al.*, 2022).

A presença de células espumosas (células de Virchow) altamente infectadas é característica nas lesões Virchowianas, mas não nas lesões tuberculóides. O fenótipo espumoso resulta da capacidade do *Mycobacterium leprae* de induzir e recrutar lipídios derivados do hospedeiro para células contendo bactérias, formando gotículas lipídicas (MATTOS *et al.*, 2010). Curiosamente, receptores TLR6 são essenciais para a biogênese de gotículas de lipídios em células de Schwann infectadas com *Mycobacterium leprae*, mas não TLR2 (MATTOS *et al.*, 2011). Esses dados sugerem o envolvimento de TLRs alternativos ou receptores adicionais

associados à resposta imune inata para o reconhecimento do *Mycobacterium leprae* na hanseníase.

Os receptores do tipo NOD ou receptores similares ao domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo (NLRs do inglês *NOD-like receptors*) constituem outro grupo importante de PRRs. Eles que têm sido associados à participação significativa da resposta imune inata durante a infecção por *M. leprae*. Nesse contexto, o NOD2 é um sensor citoplasmático responsável pelo reconhecimento de peptidoglicanos, incluindo derivados micobacterianos, em que o principal ligante é o muramil-dipeptídeo (MDP). Este é reconhecido pelo NOD2 e o fator de transcrição NF- κ B através da molécula adaptadora RIP2 é ativado, dando início à produção de mediadores pró-inflamatórios. Os receptores intracelulares NLRPs reconhecem PAMPs e induzem a secreção de caspase-1 e IL-1 β no contexto do inflamassoma. Nesse processo, a via de autofagia em células dendríticas é aumentada pela ativação de NOD2 e realiza a mediação do processamento e a apresentação de antígenos. (FROES *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2012; SAINI *et al.*, 2016). Em Kang *et al.* (2011), temos que através de experimentos foi demonstrado que o bloqueio da fagocitose inibe a produção de IL-1 β e TNF em resposta ao *Mycobacterium leprae*, sugerindo que a sinalização intracelular também é necessária para a ativação do macrófago após a infecção pelo *Mycobacterium leprae*. Além disso, a ativação de NF- κ B e a expressão de TNF e IL-1 β foram observadas em células transfectadas com NOD1 e NOD2 estimuladas com *M. leprae* (KANG *et al.*, 2011).

Segundo Schenk *et al.* (2012) e Schenk *et al.* (2016), os polimorfismos em NOD2 estão associados à suscetibilidade à hanseníase, pois a ativação de monócitos via NOD2 induz preferencialmente a diferenciação em células dendríticas, mediada por IL-32. Isso pode induzir monócitos de doadores saudáveis ou de pacientes tuberculoides a se diferenciarem rapidamente em DCs. Foi observado que houve uma maior expressão de NOD2 e IL-32, em pacientes tuberculoides, bem como a frequência de DCs CD1b (+) no local da infecção da lepra quando comparados com pacientes lepromatosos (SCHENK *et al.*, 2012; SCHENK *et al.*, 2016).

De acordo com Quaresma (2015) e Talhari *et al.* (2015), uma cascata sinalizadora intracelular é desencadeada pela ligação dos TLRs aos agonistas microbianos, ativando assim os genes regulados pelo fator de transcrição NF- κ B (do inglês *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), além de genes pró-inflamatórios e quimiocinas, bem como genes de moléculas co-estimulatórias necessárias para estimulação de células T. Sabe-se que fator de transcrição NF- κ B, que controla a resposta imunológica e a proliferação celular, tem sua ativação iniciada pela sinalização desencadeada por citocinas, TLR, radicais livres de oxigênio e radiação ultravioleta. Ao olhar para o fator de transcrição NF- κ B, constata-se que ele atua

tanto na imunidade inata como na adquirida e previne a apoptose induzida pelo fator de necrose tumoral (TNF- α), por irradiação e por alguns imunoterápicos. Nos estudos de Wambier (2012), foi observado que a ativação do NF- κ B é exígua em granulomas da forma TT e aumentada em formas clínicas de mais suscetibilidade ao bacilo ou instáveis, indicando que ela pode favorecer a atividade bacilar provavelmente devido a efeitos antiapoptóticos nas células infectadas.

Quando as lipoproteínas triaciladas do *Mycobacterium leprae* ativam o TLR2/1, é desencadeada a produção de citocinas pró-inflamatórias e peptídeos antimicrobianos como as catelicidinas e defensina-beta 2 e 3 humanas (hBDs) nos epitélios e macrófagos. Nesse contexto, os peptídeos hBDs podem destruir patógenos e induzir a produção de IL-6/IL-8 e IL-10 pelos monócitos (TALHARI; TALHARI; PENNA, 2015).

A imunidade inata apresenta outros PRRs, tais como os receptores do complemento 1 e 3 (CR1 E CR3), como já citado, os quais estão presentes na superfície de monócitos e o lipoarabinomanano (LAM) é uma molécula do *Mycobacterium leprae* associada a danos nos nervos. Estudos anteriores, já citados, demonstraram que o LAM ativa o complemento e demonstraram o importante papel do complemento no dano nervoso na hanseníase (BAHIA *et al.*, 2015).

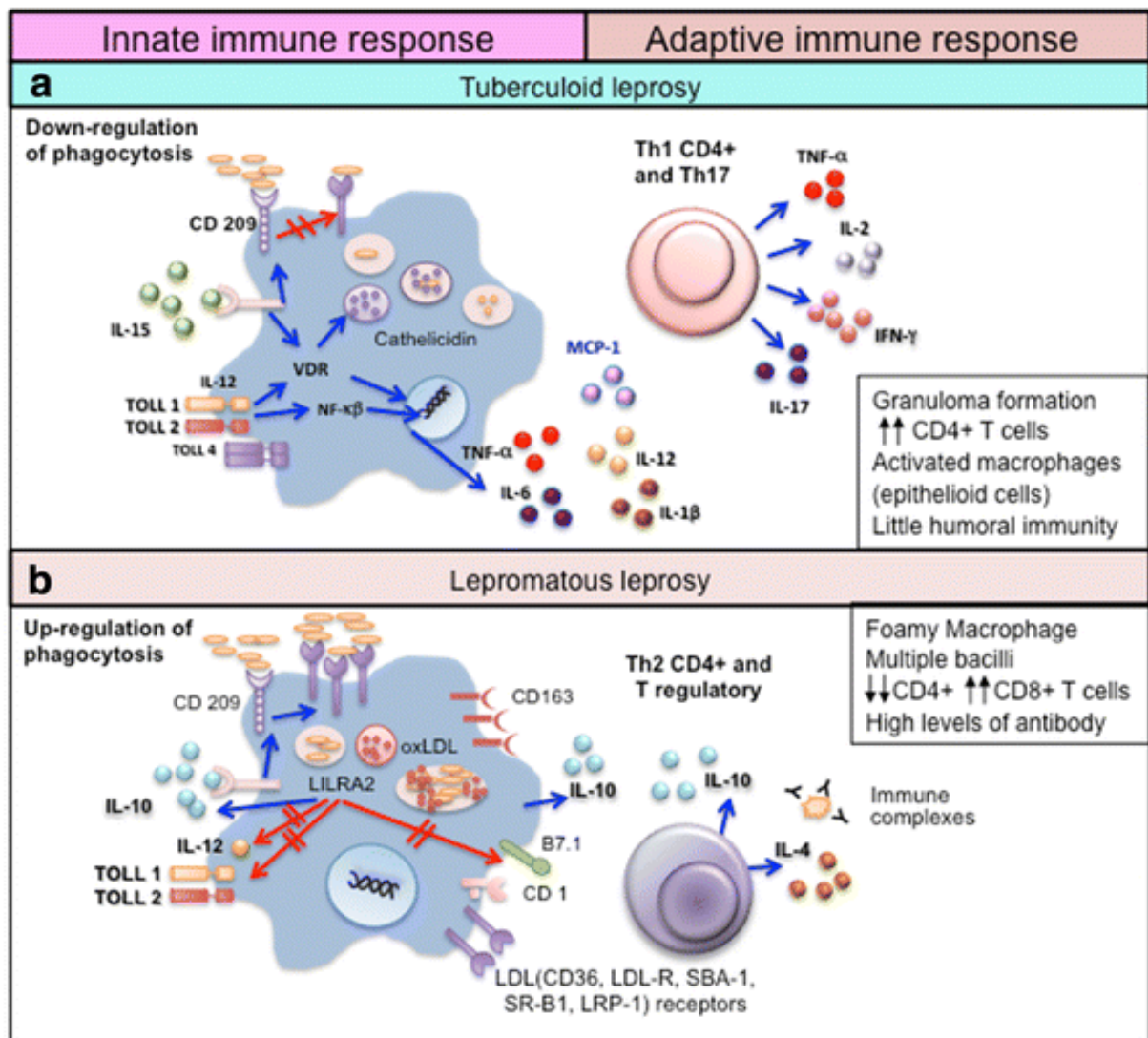
Os estudos de Lahiri *et al.* demonstraram que, quando interrompido, o *Mycobacterium leprae* pode ativar o complemento (LAHIRI *et al.*, 2008) e polimorfismos em genes da cascata do complemento sugerem uma associação de genes do complemento com susceptibilidade à hanseníase (PINHEIRO *et al.*, 2018).

Oliveira *et al.* (2003) observam que uma importante característica clínica da hanseníase é o dano ao nervo periférico, já que é o responsável pela morbidade do paciente. Justamente por esse fato, foram investigadas em células de Schwann humanas a ativação e a expressão TLR2. O lipopeptídeo que mimetiza a lipoproteína de 19 kDa do *Mycobacterium leprae*, e que pode atuar como agonista de TLR2, induz o aumento no número de células apoptóticas durante a ativação das células de Schwann (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Foi possível identificar, de acordo com Oliveira *et al.* (2003), a expressão de TLR2 em células de Schwann presentes em lesões de pacientes tuberculoides, além de células apoptóticas in vivo o que estabelece um elo entre a resposta imune inata e a lesão nervosa na hanseníase. De acordo com Madigan *et al.* (2017), a desmielinização e o dano axonal são iniciados por macrófagos infectados que patrulham os axônios. Evidências recentes sugerem que a desmielinização dos axônios ocorre em função da interação do PGL-1 com a glia mielinizante e sua infecção. O PGL-1 induz a síntese do óxido nítrico em macrófagos infectados que patrulham os axônios. Observações recentes levam a crer que a desmielinização dos axônios ocorre em função da interação do PGL-1 com a glia

mielinizante e sua infecção. O PGL-1 induz a síntese do óxido nítrico em macrófagos infectados, o que resulta em axônios danificados por lesão de suas mitocôndrias e indução de desmielinização (MADIGAN *et al.*, 2017; PINHEIRO *et al.*, 2018).

Polycarpou *et al.* (2016) demonstraram que o *Mycobacterium leprae* ativa o TLR4, apesar de não conter ligantes característicos, uma vez que o agonista clássico do ligante do TLR4 é o LPS. Associado a isso, o tratamento da reação reversa com corticosteróides diminui a expressão gênica e proteica tanto de TLR2 quanto de TLR4 nas células da lesão cutânea (WALKER *et al.*, 2012), indicando o envolvimento de receptores também no desencadeamento do processo inflamatório.

Figura 7 – Resposta imune nas formas clínicas polares da hanseníase



Fonte: Fonseca *et al.* (2017).

Dias *et al.* (2016) afirmam que outro estudo ao correlacionar as vias da imunidade inata com o desenvolvimento do ENH aponta que o reconhecimento do DNA por TLR9 constitui uma das principais vias inflamatórias ativadas ruante o ENH. Em Murphy *et al.* (1986), verifica-se que a liberação maciça de ligantes TLR9 micobacterianos durante a poliquimioterapia parece ter relação com a tempestade de citocinas pró-inflamatórias observada durante o ENH, levando em conta que também ocorre durante esse processo a destruição tecidual expressiva. Ainda nesse sentido, soma-se o fato de que os agonistas de TLR9 foram capazes de induzir a secreção de níveis mais elevados de TNF, IL-6 e IL-1 β no ENH quando comparados com pacientes não reagentes e indivíduos saudáveis (MURPHY *et al.*, 1986).

Como observado nas formas paucibacilares e no início das reações reversas, os macrófagos podem apresentar um fenótipo M1 "pró-inflamatório", no qual a via antimicrobiana que dependente de Vitamina D prevalece. O fenótipo M2 "antiinflamatório", por sua vez, caracteriza-se por uma regulação positiva ("upregulation") de cascatas fagocitárias encontradas nas lesões lepromatosas. As citocinas, arginase-1, e moléculas co-estimulatórias em macrófagos podem contribuir para compreensão do funcionamento do sistema imune inato no estabelecimento das formas polares da doença. Nesse sentido, Teles *et al.* (2002) demonstraram a maior presença de IL-27, uma citocina paradoxal que pode ativar IFN- β e IL-10, que contribuem para o bloqueio de cascatas antimicrobianas, em pacientes lepromatosos (PINHEIRO *et al.*, 2018).

Estudos também demonstraram que o microambiente das lesões desempenha um importante papel na diferenciação dos macrófagos, do que resultou a constatação de que os fenótipos M1 são observados predominantemente em granulomas de pacientes TT, enquanto os encontrados nos pacientes LL, exibem o fenótipo M2 (MI; LIU; ZHANG, 2020; SOUZA *et al.*, 2016). Um outro subtipo envolvido na reposta imune inata na hanseníase, os macrófagos M4, que apresentam características que implicam serem provavelmente ineficazes na resposta microbicida ao *Mycobacterium leprae*, contribuindo assim para o desenvolvimento de formas clínicas com maior número de lesões e aumento da proliferação bacilar, como observado na forma LL. Essa característica dos macrófagos M4 pode ser crucial para a sobrevivência do bacilo nos fagócitos devido à evasão imune desencadeada por patógenos. Portanto, a resposta dos macrófagos M4 e dos macrófagos M2 sugere que o ambiente imunossupressor estabelecido na forma LL da hanseníase pode restringir a resposta microbicida para facilitar a proliferação do bacilo, resultando em lesões mais numerosas (FROES *et al.*, 2020; MI; LIU; ZHANG, 2020; PINHEIRO *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2016).

A IL-37 tem a capacidade de induzir mecanismos inibitórios que regulam negativamente a produção de TNF- α , IL-6 e IL-1b em macrófagos e linfócitos T na derme (DING *et al.*, 2017). Nos queratinócitos, células endoteliais e linfócitos, a IL-37 foi ainda mais expressiva na forma lepromatosa do que na hanseníase tuberculóide (SOUZA *et al.*, 2018). Desta forma, o fenótipo dos macrófagos M2 predominantes na forma lepromatosa, pode estar relacionada a IL-37, através da produção de CD206, CD86, TGF-b, IL-10 e Arginase 1 em estudos com *M. tuberculosis* (HUANG *et al.*, 2015).

As células dendríticas (DCs, do inglês *dendritic cells*) também são importantes células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês *antigen-presenting cells*), especializadas em capturar e apresentar antígenos aos linfócitos T imaturos, além de fornecer sinais que estimulam a proliferação e diferenciação desses linfócitos. Análises quantitativas demonstraram uma clara predominância de células dendríticas na hanseníase tuberculóide, enquanto as lesões de pacientes com o polo virchowiano da doença mostram indução fraca de proteínas CD1+ o que pode demonstrar que uma falha na ativação das células dendríticas CD1b pode, também, estar na raiz da disseminação da doença (FACHIN *et al.*, 2017; SIELING *et al.*, 1999).

Além disso, os neutrófilos são igualmente ativados por endotoxina e por *Mycobacterium leprae* in vitro (HUNGER *et al.*, 2004) em todas as formas de hanseníase. Em uma série de experimentos, os autores observaram que neutrófilos isolados de pacientes com hanseníase Virchowiana, com ou sem ENH, liberam TNF e IL-8 após estimulação com *Mycobacterium leprae* (OLIVEIRA *et al.*, 1999). Além disso, a taxa de apoptose de neutrófilos ENH é maior em comparação com pacientes virchowianos e voluntários saudáveis (HUNGER *et al.*, 2004; PINHEIRO *et al.*, 2018).

Em relação à hanseníase, a apoptose é mais frequente nas formas tuberculóides e na reação reversa do que nas células Virchowianas (PATNAIK *et al.*, 2015). As células Virchowianas apresentam expressão aumentada da proteína antiapoptótica Bcl-2, sugerindo que a diminuição da morte celular poderia contribuir para a sustentação da infecção (BRITO *et al.*, 2010). Embora diversos estudos sugiram o papel antibacteriano da apoptose em células infectadas, há evidências de que em pacientes tuberculóides a apoptose é um mecanismo que contribui para a manutenção da infecção, ao invés do infiltrado pró-inflamatório e da presença de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos infectados com *Mycobacterium leprae* aumenta a secreção de mediadores anti-inflamatórios como IL-10, TGF- β e arginase, corroborando a hipótese de que em pacientes paucibacilares. Embora haja uma resposta eficaz do sistema imune celular, a eferocitose contribui para manter

poucos macrófagos suscetíveis nas lesões cutâneas, o que contribui para sustentar a infecção (FULCO *et al.*, 2014; PINHEIRO *et al.*, 2018).

Os macrófagos desenvolveram estratégias de defesa para lidar com bactérias intracelulares, e a compreensão dos mecanismos imunológicos associados à forma paucibacilar (PB) da doença pode revelar novas perspectivas na decifração das vias cruciais relacionadas à proteção na hanseníase. Estudos demonstraram que a fagocitose de células apoptóticas aumenta a sobrevivência do *Mycobacterium leprae* em células M1 diferenciadas (células CD14 + humanas diferenciadas com GM-CSF), acompanhada de redução dos níveis de IL-15 e IL-6 e aumento da secreção de TGF- β e IL-10. Células diferenciadas por GM-CSF com *Mycobacterium leprae* na presença de células apoptóticas induziram a secreção de citocinas Th2 IL-4 e IL-13 em células T autólogas em comparação com culturas estimuladas com *M. leprae* ou células apoptóticas sozinhas. Esses dados sugerem que, em pacientes com hanseníase PB. Assim, a autofagia contribui para a persistência micobacteriana ao induzir uma população de macrófagos mais suscetíveis à infecção (FULCO *et al.*, 2014).

1.6.2 Resposta Imune Adaptativa

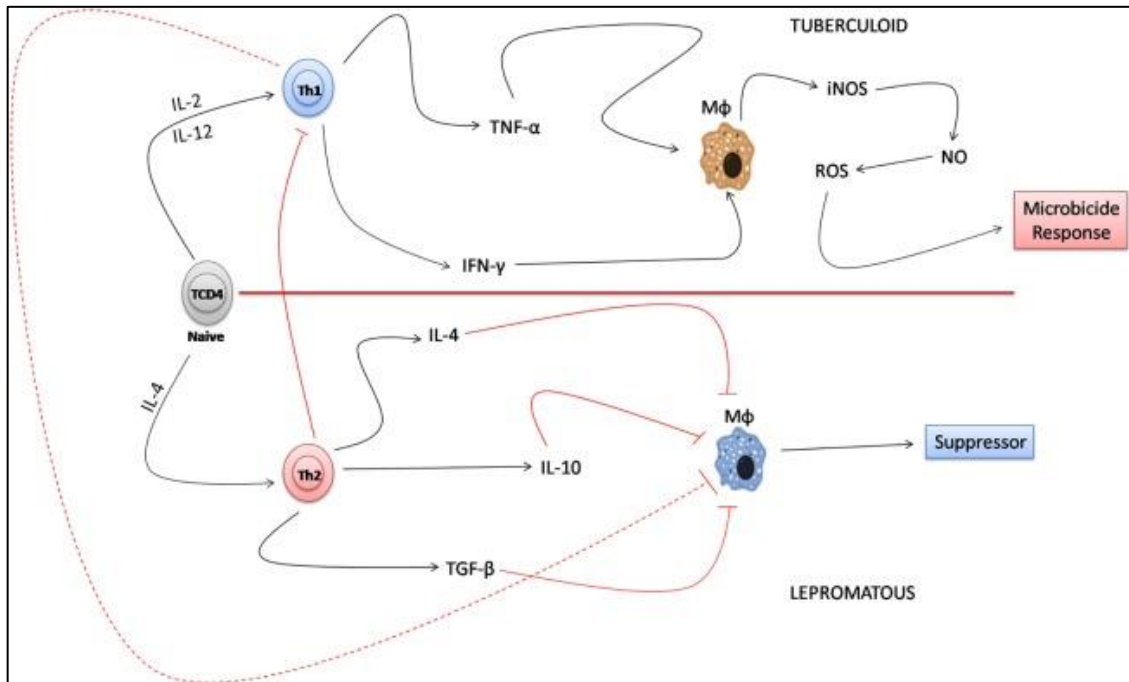
A resposta imune adaptativa inicia seu papel a partir da apresentação e ativação dos linfócitos T naive que são ativados após o processo de apresentação de antígenos (FOSS, 1999). Esta resposta guarda uma relação mais estreita com a evolução da infecção, estando, aparentemente, diretamente relacionada ao padrão da resposta imune. Resumidamente, o polo tuberculóide da doença é caracterizado por uma produção robusta de citocinas inflamatórias Th1 como IL-7 e IL-15, com a formação de processos granulomatosos compostos por macrófagos, células NK e linfócitos T CD4, e o pólo virchowiano está normalmente associado com uma resposta humoral muito mais intensa, com a predominância de citocinas do perfil Th2, como a IL-4, IL-10, IL-5 e o TGF- β (PINHEIRO *et al.*, 2018).

Os macrófagos, bem como suas respostas a diferentes estímulos, apresentam papel fundamental na resposta do hospedeiro à infecção pelo *Mycobacterium leprae*. Ao serem estimulados pelas citocinas TNF- α e IFN- γ , essas células alteram seu fenótipo de M0, para se tornarem macrófagos inflamatórios do tipo M1, os quais produzem a óxido nítrico sintetase induzida (iNOS), e estimulam a síntese de óxido nítrico e radicais livres, os quais serão responsáveis pela degradação do referido bacilo. Em contrapartida, no polo virchowiano, há a ativação de uma via alternativa, com a ativação de macrófagos do tipo M2, os quais secretam interleucinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10 e IL-13), fatores de crescimento (TGF- β e fator de crescimento fibroblástico básico-FGF b-), os quais contribuem para mecanismos imunossupressores e para a reparação tecidual, que seriam responsáveis pelas apresentações clínicas da forma Virchowiana (MIGNANE *et al.*, 2014; SOUSA; SOTTO; QUARESMA, 2017).

Em relação à resposta celular, classicamente, há duas vias principais de resposta dos linfócitos T CD4, a saber, a dos linfócitos Th1, responsável pela indução da formação dos macrófagos M1 e pela forma tuberculoide, e a dos linfócitos Th2, que estimula a formação dos macrófagos M2 e leva à forma Virchowiana da doença. Contudo, com o avanço das técnicas de estudos imunológicos, as vias Th9, Th17 e Th22 ganharam um importante destaque. Os linfócitos Th9 produzem IL-9 a qual possui uma ação antagonista a IL-4 e a IL-10, alterando a resposta imune, mudando o polo de Th2 para Th1, logo, mais frequente nas formas tuberculóides da doença (FROES *et al.*, 2022a). Enquanto, na forma Virchowiana, a IL-9 inibe a produção de IL-4 e IFN- γ , ao mesmo tempo em que a IL-10 inibe a ação microbicida dos macrófagos, por estímulo à produção de TGF- β . Os linfócitos Th17 estão intimamente ligados às reações reversas através da produção de IL-17 e por fim, os linfócitos Th22 têm como

principal função a produção de IL-22, que possui papel fundamental na forma vichowiana, tendo em vista que essa interleucina atua na maturação dos fagolisossomos nos macrófagos, além de auxiliar na produção relacionada ao processo de reparação tecidual, essencial nessa forma clínica, tendo em vista o grande dano tecidual por se constituir numa forma mais difusa da doença (ATTIA, 2014; SILVEIRA, 2015; SOUZA, 2016; SOUZA, 2017).

Figura 8 – Paradigma imunológico da resposta T helper (Th) 1/Th2 nas formas polares da hanseníase



Fonte: Sousa, Sotto e Quaresma (2017).

Na forma tuberculóide, os linfócitos Th1, ao produzirem o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e o interferon-gama (IFN- γ), induzem a ativação de macrófagos que produzem óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e NO que destroem o *Mycobacterium leprae*. Na forma Virchowiana, o predomínio da resposta do linfócito Th2 em detrimento do Th1 resulta na inativação da resposta microbicida dos macrófagos principalmente devido à resposta de citocinas, como IL-4, IL-10 e TGF- β , que favorecem a sobrevivência do *Mycobacterium leprae*.

O paradigma Th1 / Th2 pode explicar as manifestações e histopatologia das duas formas polares da hanseníase. Em forma TT, a resposta imune mediada por células é forte e os bacilos raramente são observados e imunologicamente observamos um perfil de citocinas predominantemente Th1 (IFN- γ , IL-2 e IL-12) e a expressão dos fatores de transcrição envolvidos nas vias de sinalização de citocinas Th1, como STAT1, STAT4, JAK2 e NF κ B, foram encontrados em níveis mais elevados na hanseníase tuberculóide (SILVA *et al.*, 2015), enquanto no LL as manifestações são disseminadas, a resposta humoral domina e a carga de

bacilos é alta, com predominância de citocinas do perfil Th2 (IL-4, IL-5, IL-6) (FROES *et al.*, 2020; MI; LIU; ZHANG, 2020; SADHU; MITRA, 2018).

Acredita-se que esta resposta polarizada de células T (Th1 / Th2) ao *Mycobacterium leprae* seja um elemento crítico na patogênese da hanseníase e de suas diversas manifestações clínicas (MITRA *et al.*, 1999). A geração de células efetoras Th1 que produzem principalmente a citocina interferon-gama (IFN- γ) vs. células efetoras Th2 que produzem interleucina-4 (IL-4) foram consideradas principalmente responsáveis pelo estado polarizado de imunidade. No entanto, a resposta imune manifestada no (s) sítio (s) patológico (s) da hanseníase é um processo extremamente complexo, particularmente à luz da notável heterogeneidade recentemente evidenciada de subconjuntos de células T (BETTELLI *et al.*, 2006). O enriquecimento proporcional de subconjuntos seletivos de células T, particularmente nos locais patológicos, determina a resposta de células T em massa (SHARMA *et al.*, 2009). Numerosos subconjuntos menores de linfócitos foram identificados nas últimas décadas, os quais desempenham papéis críticos na formação da imunidade do hospedeiro por meio de sua resposta de células T, como células T natural killers (NKT), células T reguladoras (Treg), células T $\gamma\delta$ e as células B reguladoras. Demonstrou-se que essas células exercem influências regulatórias na geração de várias células T efetoras, como Th1, Th17 e células semelhantes a Th9 (LITTMAN; RUDENSKY, 2010; NOWAK *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2013).

Os linfócitos Th0 se diferenciam em linfócitos Th9, que produzem preferencialmente IL-9, IL10 e IL-21 (SCHMITT *et al.*, 2014) e a linhagem Th22 é caracterizada pela produção de IL-22, quando na presença de IL-4 e TGF- β , além dessas citocinas produzidas pelas linhagens IL-9/IL-22, vários fatores de crescimento de fibroblastos e receptores de homing da pele (CCR4 e CCR10) são sugestivos dos possíveis papéis de Th22 em doenças de pele (JIA; WU, 2014).

Esses dois subconjuntos de células T auxiliares foram estudados por determinação quantitativa de suas citocinas. A IL-9 foi encontrada para ser mais expressa mais em lesões TT em comparação a lesões LL (SOUZA *et al.*, 2017). Em contraste, a expressão de assinaturas Th22, a IL-22 e o crescimento de fibroblastos fator básico (FGF-b), foi maior nas lesões LL em comparação com TT lesões, embora a IL-22 seja conhecida por atuar em macrófagos estimulando a maturação fagolisossomal e fusão, podendo ser uma alternativa para estimulação da atividade fagocitária dos macrófagos, que é comprometida, assim como, o aumento do FGF-b na hanseníase lepromatosa reforça o papel crucial do fator de crescimento na resposta cicatricial (LIMA *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2017).

A resposta das citocinas produzidas pelo Th25, como IL-4, IL-13, IL-25 e IL-17E, foi recentemente estudada, e sugere-se que essas citocinas estimulem uma resposta Th2, encontradas mais expressas nos pacientes com a forma Virchowiana (SOUSA, 2017).

Muito recentemente, um outro subconjunto de células T auxiliares, células Th17 foi identificado com base em seu perfil de produção de citocinas. Essas células produzem IL-17A (também conhecida como IL-17), IL-17F e IL-22, citocinas envolvidas na neutrofilia, remodelação e reparo de tecidos e produção de proteínas antimicrobianas. As células Th17 diferenciam-se em resposta às citocinas ativadoras de STAT3 IL-6, IL-21 e IL-23 junto com TGF- β e IL-1 β (KORN *et al.*, 2009).

As células Th17 medeiam função pró-inflamatória recrutando neutrófilos, ativando macrófagos e aumentando as células efetoras Th1 (KORN *et al.*, 2009). Muito do dano inflamatório anteriormente atribuído à resposta do tipo 1 é agora pensado para depender de IL-17 e IL-23 (a citocina responsável por apoiar a resposta Th17 *in vivo*). Acredita-se que a resposta Th17 desempenhe um papel crítico na modulação da atividade dos macrófagos já que a IL-17 pode induzir a produção de TNF- α , IL-6 e iNOS, levando à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) que destroem o bacilo e têm sido associadas com o desenvolvimento de reações reversas da hanseníase (AHERN *et al.*, 2008; SADHU, MITRA, 2018).

Células T reguladoras (Tregs) e células Th17 produtoras de IL-17 são funcionalmente interdependentes (EISENSTEIN; WILLIAMS, 2009; SAINI *et al.*, 2016). As células T naive se desenvolvem em Tregs na presença de fator transformador de crescimento TGF- β , enquanto a combinação de TGF- β e IL-6 / IL-21 introduzem células T naive em Th17 (EISENSTEIN; WILLIAMS, 2009; SADHU *et al.*, 2016; SAINI *et al.*, 2016).

Células Th17 produtoras de IL-17 têm uma relação interdependente com Tregs em subconjuntos de programas de desenvolvimento (SADHU *et al.*, 2016). Quando ocorre à estimulação do antígeno, pelo *Mycobacterium leprae*, uma maior frequência de Tregs foi encontrada em pacientes multibacilares com lesões disseminadas, enquanto as células Th17 foi encontradas mais expressas em pacientes tuberculóides (SADHU; MITRA, 2018). Mas a relação recíproca entre Treg e Th17 não é irreversível, um estudo recente mostrou que Tregs de pacientes com hanseníase podem ser convertidos em Th17- produtor de IL-17 como células por rIL-23, sugerindo uma nova maneira de superar a imunossupressão em pacientes com hanseníase, especialmente em multibacilares (SADHU; MITRA, 2018).

No entanto, a relação recíproca entre Treg e Th17 pode não ser aplicável em reações hansênicas, especialmente para T1R, uma vez que T1R e T2R são reações inflamatórias agudas. É razoável pensar uma maior frequência de Th17 em ambos T1R e T2R em comparação com a

hanseníase não reacional, considerando as funções de inflamação das células Th17 (SAINI *et al.*, 2016; SAINI *et al.*, 2020). Comparando a outras formas de hanseníase e controles saudáveis, T2R mostrou frequência Treg circulante mais baixa, que era consistente com a alta frequência Th17 em T2R e, que T1R mostrou uma frequência significativamente maior de Treg em comparação à hanseníase não reativa (PARENTE *et al.*, 2015).

A maior expressão de TGF- β , IFN- γ e IL-17 foi observada em lesões T2R em comparação com T1R e lesões livres de reação. O aumento das células Treg durante o T1R sugere um papel supressor para controlar a resposta imune celular exacerbada durante o T1R que pode causar danos aos tecidos e nervos. Evidências de células Treg reguladas positivamente em TR1, que geralmente ocorrem em pacientes com imunidade Th1-Th17 e as indicações da expressão de Th17 / IL-17 em T2R, que se desenvolve em pacientes com perfil Th2-Treg, sugerem plasticidade de células Treg-Th17 e um papel potencial para essas populações de células na imunopatogênese das reações hanseníicas (COSTA, 2018; MI; LIU; ZHANG, 2020).

Células T reguladoras (Tregs), caracterizadas fenotipicamente pela expressão de CD4, CD25 (interleucina-2 receptor [IL-2R]) e o fator de transcrição FOXP3, têm recebido atenção especial, desempenhando um papel importante na manutenção autotolerância imune e homeostase. De uma perspectiva funcional, as células Treg podem ser agrupadas em quatro "modos de ação" básicos: os vários mecanismos de supressão potenciais usados por estes incluem supressão por citocinas inibitórias, supressão por citólise, supressão por ruptura metabólica e supressão por modulação da maturação das células dendríticas ou função (VIGNALI *et al.*, 2008). Citocinas inibitórias, IL-10 e TGF- β , têm sido o foco de atenção considerável como mediadores da supressão induzida por células Treg (ANNACKER *et al.*, 2003; FAHLÉN *et al.*, 2005).

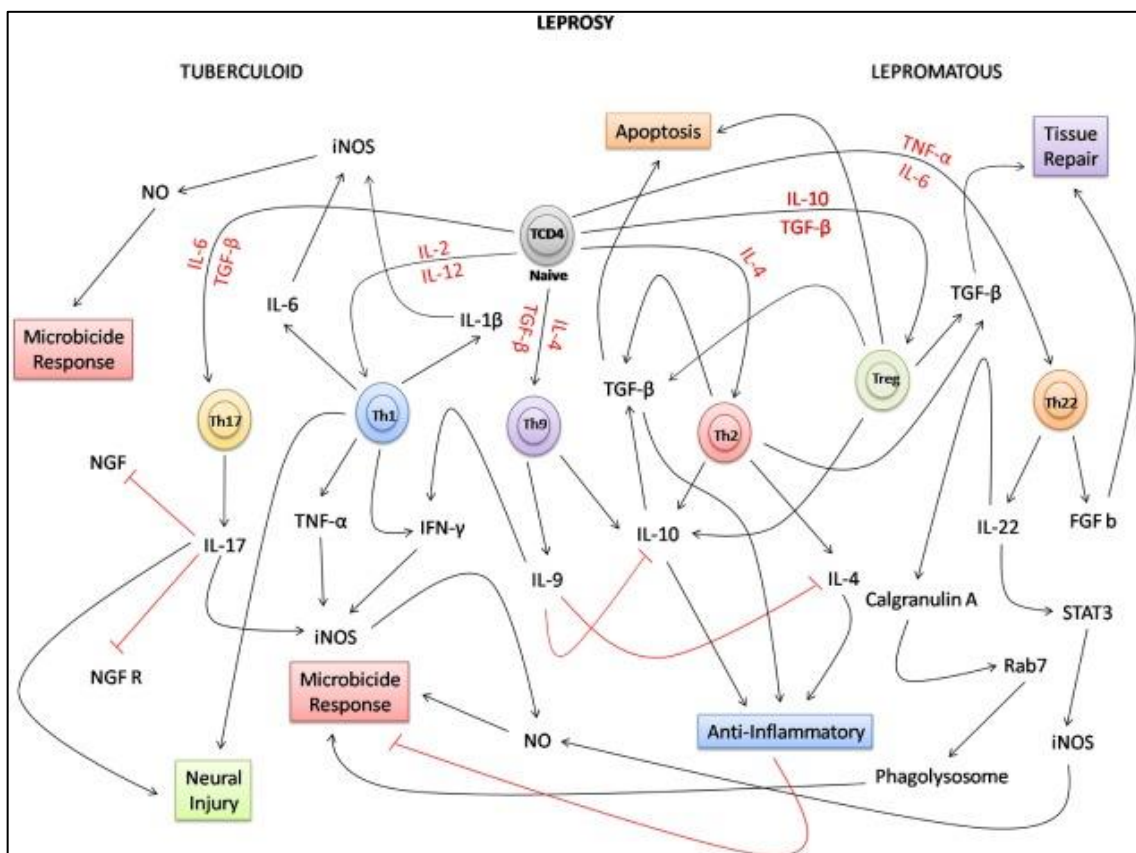
As células T reguladoras, são essenciais para manter a tolerância periférica, prevenir doenças autoimunes e limitar doenças inflamatórias crônicas (SAKAGUCHI *et al.*, 2011). No entanto, no caso de infecções crônicas, elas também limitam esse efeito benéfico, suprimindo a imunidade do hospedeiro. Durante uma infecção, a regulação imunológica é o resultado da resposta do hospedeiro à infecção em uma tentativa de manter ou restaurar um ambiente homeostático e / ou pode ser ativamente induzida pelo patógeno para promover a sobrevivência do patógeno, como no caso do *Mycobacterium leprae* (SHEVACH *et al.*, 2006). A presença de células T com atividade supressora ou anérgica foi descoberta há muito tempo, quando eram conhecidas como células T supressoras (GERSHON *et al.*, 1972; SAKAGUCHI *et al.*, 1995).

A IL35 é uma potente citocina imunossupressora secretada por Tregs, que funciona como um importante fator imunossupressor em doenças imunomediadas, inibindo a

proliferação das células T e a produção de IFN- γ , TNF- α e IL-2. Um dos mecanismos supressores baseia-se na expressão da molécula inibidora Programmed cell Death-1 (PD-1) na superfície das Tregs, que é mais evidente na hanseníase multibacilar (FROES *et al.*, 2020; TARIQUE *et al.*, 2017).

Também foi descrita uma diferença entre os pólos da hanseníase quanto à expressão das moléculas de adesão E-selectina e P-selectina, bem como das integrinas VCAM-1, ICAM-1 e VLA-4. Estudos em imuno-histoquímica têm mostrado uma maior expressão dessas moléculas em células endoteliais e leucócitos em tuberculóide do que na forma lepromatosa. A expressão dessas moléculas é mediada por citocinas Th1 como TNF- α , IFN- γ e IL-1, fazendo com que a maior produção de as citadas citocinas na hanseníase tuberculóide deve ser responsável pela maior expressão de selectinas nestes casos. Como consequência, a deficiência de essas citocinas observadas na hanseníase lepromatosa reduzem a migração de células T para os tecidos (FROES *et al.*, 2020; SOUZA *et al.*, 2015; SOUSA; SOTTO; QUARESMA, 2017).

Figura 9 – Possível integração em rede e novos paradigmas imunológicos na resposta de linfócitos T na hanseníase



Fonte: Sousa, Sotto e Quaresma (2017).

Devido à complexidade da resposta imune, nas formas polares da hanseníase, os linfócitos TCD4 virgens sob a influência de várias citocinas (vermelho) podem se diferenciar em várias subpopulações T [T helper (Th) 1, Th2, Th9, Th17, Th22, e Treg]. Na forma tuberculóide, os linfócitos Th1, Th9 e Th17 participam diretamente da resposta pró-inflamatória, induzindo a produção de citocinas, como IL-1 β , IL-6, IL-9, IL-17, fator de necrose tumoral-alfa (TNF - α) e interferon-gama (IFN- γ) e a atividade microbicida de macrófagos. Devido à intensidade do processo inflamatório, a IL-17 regula negativamente a produção do fator de crescimento nervoso (NGF) e do receptor NGF (NGFR), potencializando o dano neural juntamente com a resposta dos linfócitos Th1. Na forma lepromatosa, os linfócitos Th2 e Treg participam da resposta anti-inflamatória produzindo citocinas IL-4, IL-10 e TGF- β que inibem a ativação de macrófagos, facilitando a sobrevivência do *Mycobacterium leprae*. Nessa forma clínica, a apoptose tem forte relação com a atuação das células Treg e TGF- β . Na resposta Th9, a IL-9 regula negativamente a produção de IL-4 e IL-10. Na forma clínica, onde o número de lesões é muito maior do que na forma tuberculóide, a atuação de fatores de crescimento, como TGF- β e Fator de crescimento básico de fibroblastos (FGF b), é fundamental para induzir a reparação tecidual. Considerando a resposta dos linfócitos Th22, novas abordagens têm mostrado que, nos macrófagos infectados pelo bacilo, a IL-22 regula positivamente a produção de calgranulina A e STAT3. Isso interfere não só no processo de maturação do fagolisossoma devido à expressão de Rab7, mas também na resposta microbicida de macrófagos onde STAT3 induz a produção de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e, conseqüentemente, NO, que destrói o *Mycobacterium leprae*.

Células Gama Delta T

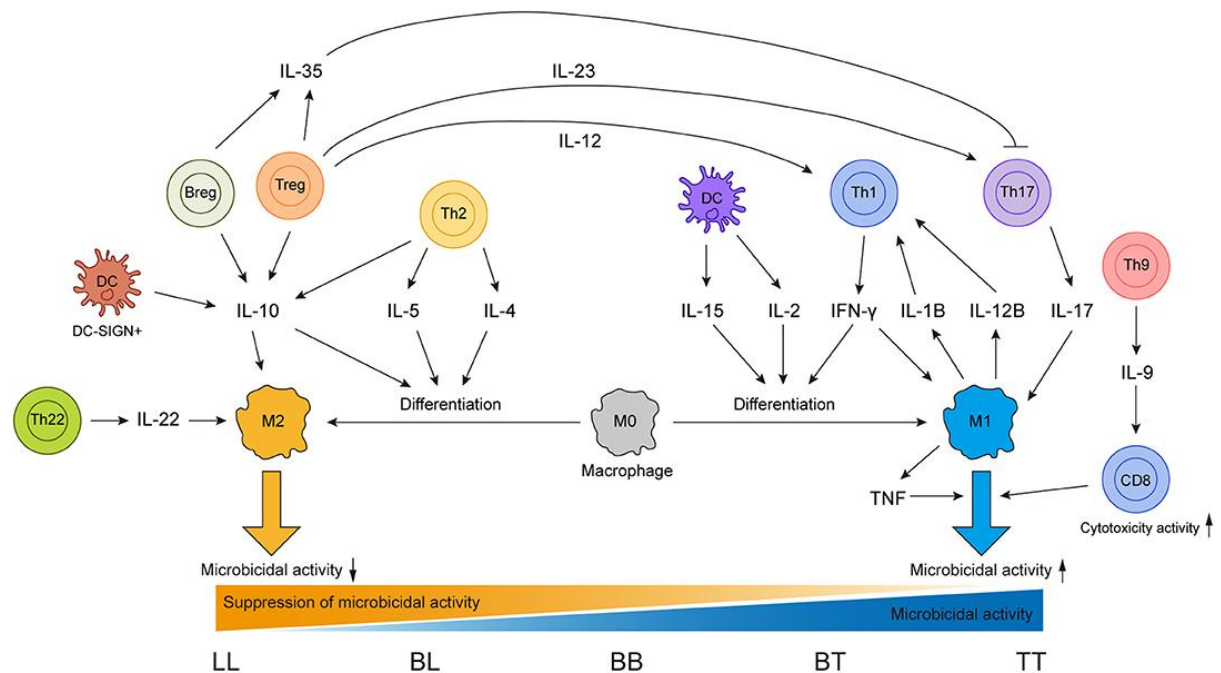
As células T $\gamma\delta$ são uma das três linhagens de linfócitos e constituem apenas uma proporção muito pequena de linfócitos em comparação com as células T $\alpha\beta$ convencionais e células B. No caso da hanseníase, pelo menos dois papéis diferentes das células T $\gamma\delta$ têm sido estudados para as reações hansênicas e imunossupressão. Saini *et al.* (2016) descobriram que as células T $\gamma\delta$ mostraram uma frequência maior em pacientes com reação T1R e T2R em comparação com pacientes estáveis, e mostraram que essas células T $\gamma\delta$ produziram uma quantidade notável de IL-17 e IFN- γ , o que pode explicar o mecanismo pelo qual as células T $\gamma\delta$ contribuem para as reações hansênicas (MI; LIU; ZHANG, 2020; TARIQUE *et al.*, 2017).

Células B Regulatórias

Estudos recentes em células B mostraram que três subconjuntos de B células (Bregs) mostraram funções imunossupressoras que podem desempenham papéis importantes na patogênese da hanseníase (MIZOGUCHI; BHAN, 2006; NEGERA *et al.*, 2017; TARIQUE *et al.*, 2017; TARIQUE *et al.*, 2018). Um estudo comparando o gene perfil de expressão em lesões tuberculóide e lepromatosas mostraram que a doença disseminada estava associada ao aumento da expressão de vias múltiplas e grupos funcionais relacionados a genes de células B, frequência aumentada de células plasmáticas (CD138 β) e aumento da expressão dos níveis de IL-5 e IgM no lesões, consistente com o fato de que a hanseníase lepromatosa está mais próxima do polo Th2.

O segundo subconjunto relatado é o Breg produtor de IL-10, e este subconjunto que também demonstrou uma frequência aumentada em PBMCs de pacientes com hanseníase em comparação com controles saudáveis (TARIQUE *et al.*, 2018). Além disso, os autores mostraram que a produção de IL-10 Breg poderia converter células T efectoras em Tregs e aumentar a função de Treg (TARIQUE *et al.*, 2018). Além de Breg, produtoras de IL-10 e IL-35 também foram relatados como mais abundantes em pacientes multibacilares em comparação com Pacientes T2R (NEGERA *et al.*, 2017). Esses estudos sobre Breg mostraram claramente que funções imunossupressoras de Breg podem ter um importante papel na imunopatogênese da hanseníase (MI; LIU; ZHANG, 2020).

Figura 10 – Citocinas e efeitos dessas citocinas em diferentes células imunes nas respostas imunes da hanseníase



Células Natural Killer (NK)

As células NKT são um subconjunto único de células T maduras que coexpressam uma cadeia α do receptor de antígeno de células T $V\alpha 24J\alpha 18$ semi-invariante (TCR) e marcadores de superfície característicos de células NK. A função mais proeminente e característica das células NKT é a produção rápida e precoce de citocinas imunorreguladoras, como IL-4, IFN- γ e TNF- α após sua ativação (LIU *et al.*, 2012).

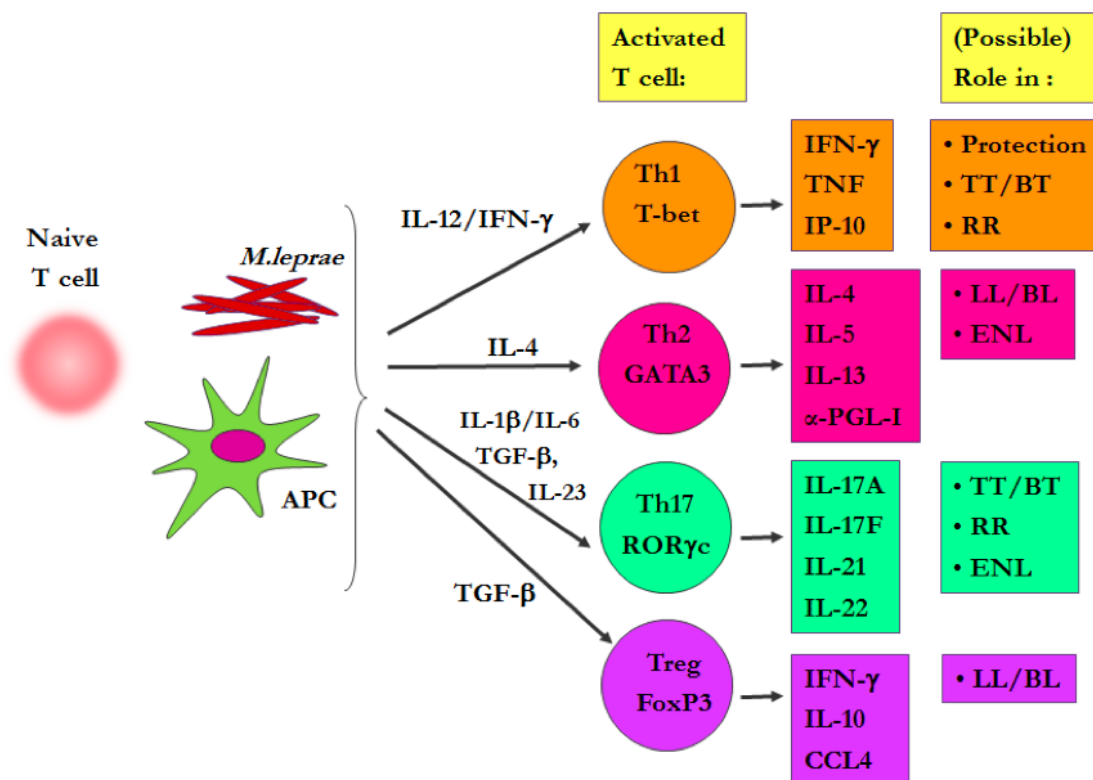
As células T restritas a CD1 parecem desempenhar um papel importante nas respostas imunológicas às micobactérias. As células NKT de camundongos normais respondem à infecção por micobactérias diminuindo IL-4 e aumentando a produção de IFN- γ , mudanças que auxiliam na resposta do hospedeiro às micobactérias, uma vez que IFN- γ desempenha um papel crítico na eliminação do patógeno (ALVARENGA *et al.*, 2015).

Reações Hansênicas

As reações hansênicas são manifestações clínicas que surgem por uma alteração no balanço imunológico entre hospedeiro e agente etiológico. A reação do tipo 1 ou reação reversa, revelou presença das citocinas com perfil Th1, IL-1b, TNF-a, IL-2, IFN-g e proteína quimiotática monócito-1 (MCP-1), que estão aumentadas nas lesões (GOULART; PENNA;

CUNHA, 2002). Enquanto que, a reação do tipo 2 ou Eritema nodoso hansênico, caracteriza-se por um processo inflamatório relacionado à deposição de imunocomplexos e infiltrado neutrofílico, sendo caracterizada pela presença de alta níveis de TNF- α , tanto nas lesões como na periferia sangue, também foram observadas as citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, que possuem um padrão de resposta Th2. Na RR2 sugere-se que a supressão de Tregs dá origem a respostas mediadas por Th17, com alta expressão da citocina pró-inflamatória IL-17 e redução acentuada de Tregs (MARTINIUK *et al.*, 2012).

Figura 11 – Representação esquemática de células T envolvidas no espectro da doença da hanseníase



Fonte: International Textbook of Leprosy cap Immunodiagnosics for Leprosy.

1.7 Genética

A base genética do hospedeiro é de relevante importância de patogênese da hanseníase variando de resistência inata a *Mycobacterium leprae* para controle do tipo e extensão do hospedeiro respostas imunes, à infecção. Alguns estudos vêm relacionando a infecção e o desenvolvimento da doença à variantes genômicas na região promotora do *PRKN* (anteriormente *PARK2*) e *PACRG*, bem como variantes de codificação nos genes *TLR1*, *SLC11A1* (anteriormente *NRAMP1*) e *VDR* são exemplos de genes validados em associação

com a hanseníase. (ALCAIS *et al.*, 2007; ALTER *et al.*, 2013; ALVARADO-ARNEZ *et al.*, 2015; FAVA; DALLMANN-SAUER; SCHURR, 2020; WONG *et al.*, 2010a).

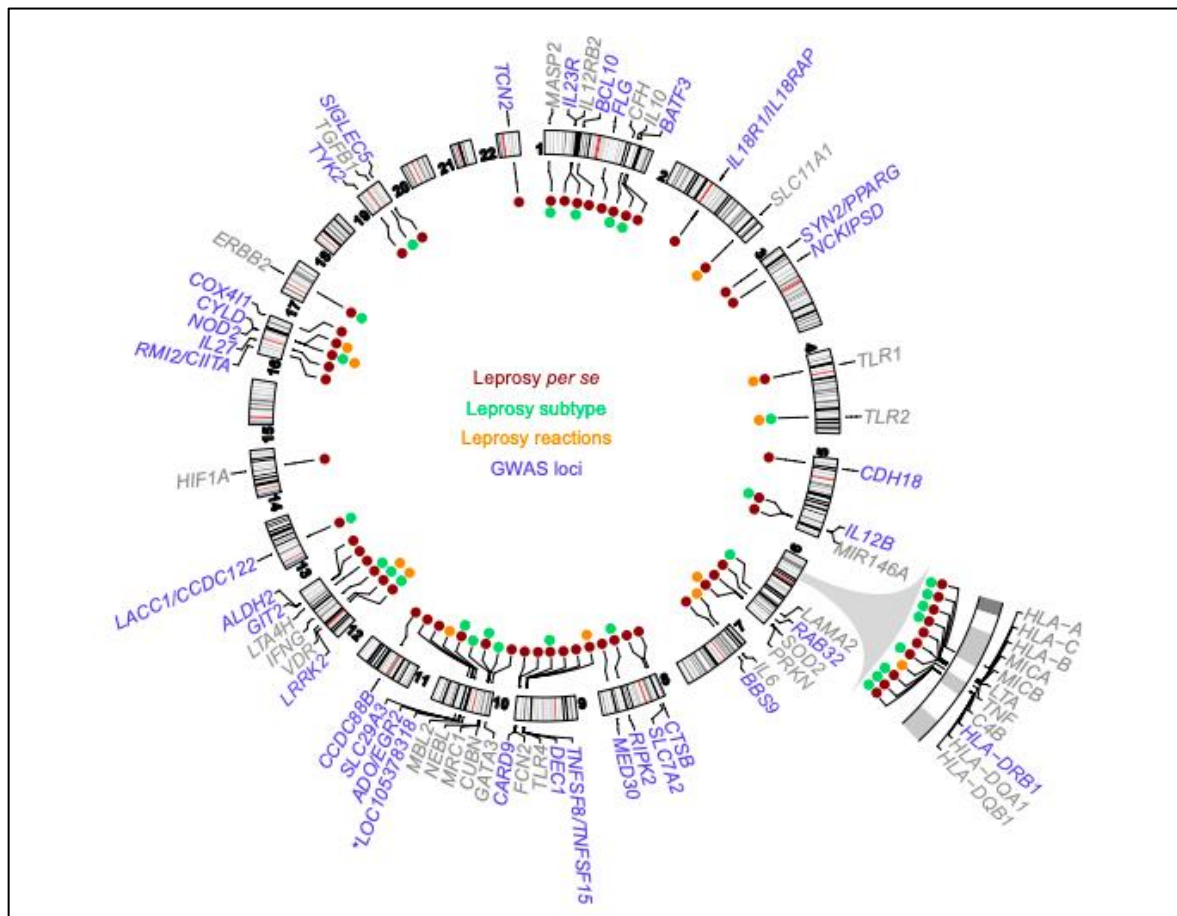
Alguns estudos mais recentes voltados à descoberta de fatores de suscetibilidade à hanseníase possibilitaram a descoberta de outros genes associados à doença, variantes genéticas no complexo de histocompatibilidade principal (MHC/HLA), devido ao papel dos genes HLA nas respostas das células T e imunidade adaptativa, estudos de associação de alelos HLA com hanseníase vêm sendo realizados desde a década de 70, principalmente focado na polarização imune da hanseníase (JARDULI *et al.*, 2013).

A publicação do primeiro estudo de associação genômica ampla (GWAS – Genome Wide Association Studies) deu-se há cerca de dez anos (ZHANG *et al.*, 2009). A arquitetura genética da fisiopatologia da hanseníase foi caracterizada com a ajuda de estudos de replicação através dos quais identificaram-se as variantes no NOD2 e nos genes LACC1 como os marcadores de risco mais relevantes no desenvolvimento da hanseníase, (WONG *et al.*, 2010b; WANG *et al.*, 2018b). Dessa forma, a alteração de aminoácidos é fator de risco para a hanseníase e a redução da sinalização LACC1-NOD2 fornece uma ligação direta entre GWAS SNP de risco e a resposta à infecção (LAHIRI *et al.*, 2017). Outra variante comum, próxima ao gene IL23R, e uma variante p.G149R de IL23R, foram fatores de risco para hanseníase (LIU *et al.*, 2017) e a via de sinalização Janus quinase (JAK) e do ativador da transcrição (STAT) é a via de sinalização de IL-23, e mais dois genes chave dessa via também foram associados à hanseníase – TYK2 e SOCS1 (LIU *et al.*, 2012; SHIMODA *et al.*, 2002).

Em um estudo de associação de loci de suscetibilidade, o polimorfismo de IL4 também foi associado à hanseníase junto com variantes próximas aos genes dos receptores do heterodímero IL18, IL18R1 e IL18RAP, e o IL12B e os genes IL12RB2 (LIU *et al.*, 2017).

Até, então, apenas um estudo usou triagem de exoma inteiro com sequenciamento de próxima geração (NGS) em um pequeno subconjunto das amostras foi usada em apenas um estudo e identificou-se a variante p.D349N rara no HIF1A como fator de risco da hanseníase independente (WANG *et al.*, 2018b). Levando em conta a redução de custos das tecnologias NGS, parece razoável prever que estamos chegando a um ponto onde todo o genoma pode ser rastreado de forma econômica para codificação rara e variantes estruturais em centenas de amostras.

Figura 12 – Genes e GWAS loci associados a hanseníase



Fonte: Fava, Dallmann-Sauer, Schurr (2019).

2 JUSTIFICATIVA

A hanseníase é uma doença infecciosa transmissível e de caráter crônico, que ainda persiste como problema de saúde pública no Brasil. Apesar do declínio substancial, existe uma detecção constante de novos casos, indicando a transmissão ativa da doença. Além disso, vêm surgindo relatos de casos de hanseníase resistentes à poliquimioterapia. Diante desse quadro, estudos que visem a elucidar mecanismos da etiopatogênese da doença são fundamentais para medidas de prevenção mais efetivas, e para a proposição de novas drogas que possam ser utilizadas em conjunto com a poliquimioterapia. A resposta imunológica ao *Mycobacterium leprae* é um elemento crítico na patogênese da hanseníase e de suas diversas manifestações clínicas. No entanto, a resposta imune manifestada no (s) sítio (s) patológico (s) da hanseníase é um processo extremamente complexo, particularmente à luz da notável heterogeneidade recentemente evidenciada de subconjuntos de células T; Entre eles, o meio local de citocinas; a presença de hormônios imunologicamente ativos; a dose e a via de administração do antígeno; o tipo de células T estimuladoras de células apresentadoras de antígeno; e a "intensidade do sinal" do receptor de células T para o complexo MHC-antígeno. No contexto da hanseníase, alterações recíprocas na expressão de citocinas em tuberculóides e Virchowianos, juntamente com redes regulatórias de citocinas complexas, foram evidenciadas no local da infecção (MITRA *et al.*, 1999). Subconjuntos de linfócitos foram identificados nas últimas décadas, os quais desempenham papéis críticos na formação da imunidade do hospedeiro por meio de sua resposta de células T. Neste estudo justifica-se a identificação de novos perfis imunológicos e modos de ação de citocinas para ajudar a caracterizar melhor o padrão de resposta imune tecidual e seus possíveis pontos-chave, tendo como um diferencial deste estudo a técnica executada, o Sequenciamento de Nova Geração (NGS), que é uma técnica para os estudos de genômica estrutural e funcional que permite o sequenciamento de DNA/RNA em plataformas capazes de gerar dados sobre milhões de pares de bases em uma única execução, possibilitando economia de tempo e diminuição de custo, possibilitando estudos de amplos genomas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Identificar a expressão de marcadores imunológicos para as respostas inflamatórias em amostras de lesões nas formas clínicas polares da hanseníase comparando-as entre si utilizando a técnica de Sequenciamento de Última Geração (NGS).

3.2 Objetivos Específicos

- a) Quantificar a expressão tecidual de genes relacionados a resposta de hospedeiros manifestando as formas clínicas polares da doença, com utilização da técnica de NGS.
- b) Comparar o padrão de expressão gênica tecidual de citocinas e receptores relacionados a resposta do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae* a fim de caracterizar as possíveis diferenças e semelhanças entre as formas clínicas polares da doença.

4 METODOLOGIA

Todos os pacientes da presente pesquisa são estudados segundo os preceitos da Declaração de Helsinque e do Código de Nuremberg, respeitadas as Normas de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Res. CNS 466/2012) do Conselho Nacional de Saúde.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa ocorreu em maio de 2017, sob o número 2.075.607, e o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) recebeu o número 67565617.5.0000.5174 (ANEXO A) e pela Universidade do Estado do Pará, onde os pacientes são captados e entrevistados, bem como coletadas as amostras, conforme Carta de Aceite da Instituição (ANEXO B). Todos os participantes da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO C).

4.1 Desenho do Estudo

Estudo predominantemente observacional, transversal e descritivo.

4.2 Casuística e Métodos

Os pacientes com hanseníase foram oriundos de Unidades Básicas de Saúde de Belém do Pará e de municípios próximos, bem como do ambulatório médico de dermatologia da Universidade do Estado do Pará (UEPA).

São utilizados grupos de pacientes com hanseníase dividido pelas formas clínicas, tuberculóide e Virchowiana.

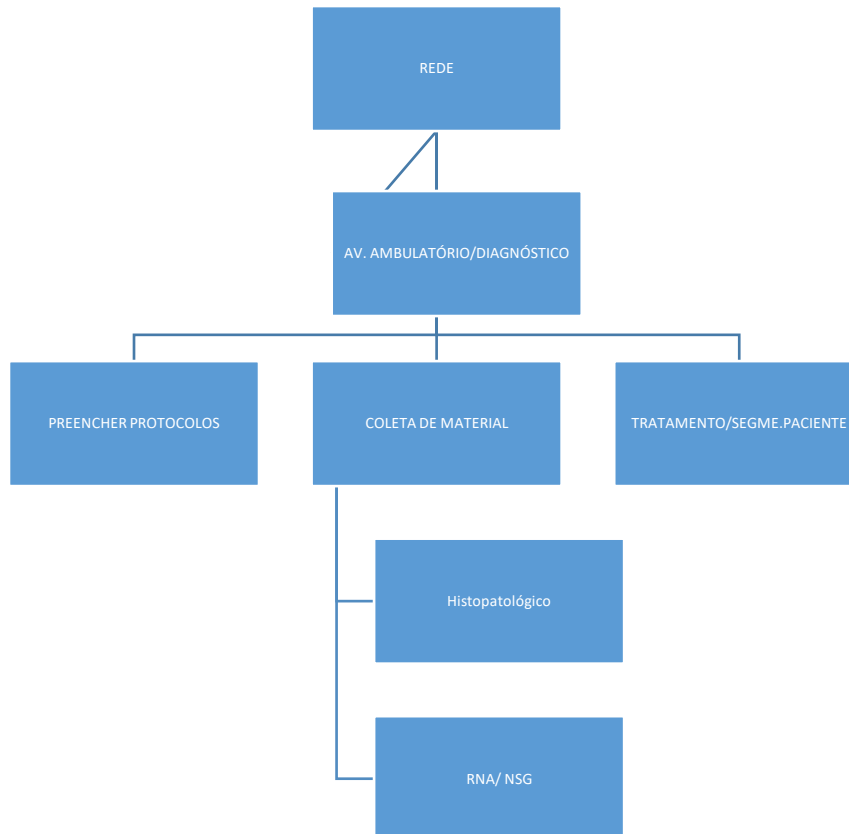
O diagnóstico de hanseníase foi feito de acordo com as normas recomendadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) caracterizadas por lesão na pele com alteração de sensibilidade (após submetê-lo ao teste de sensibilidade convencional), envolvimento de nervos periféricos (observado pelo seu espessamento), presença na linfa de bacilos álcool-ácidos-resistentes (BRASIL, 2017) e exame histopatológico conclusivo.

Foram triados 20 pacientes, sendo 10 tuberculóide e 10 virchowianos, destas, 13 amostras foram tecnicamente impossibilitadas, desta forma, a casuística deste estudo é de 7 pacientes, sendo 3 da forma tuberculóide e 4 da forma Virchowiana.

4.2.1 Procedimentos

Os pacientes foram submetidos à coleta de dados, explicações e orientações acerca do trabalho, bem como a solicitação de autorização para inclusão neste estudo, conforme Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO C).

Figura 13 – Fluxograma de coleta dados e material biológico



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Após a seleção, os pacientes passaram por uma anamnese e exame físico para coleta de dados de protocolo pré-definido (APÊNDICE A). Desta forma, o foi realizado o atendimento inicial de coleta de dados e da coletada de material biológico (FIGURA 13) que consistiu em uma amostra de biópsia de pele para cada paciente após anestesia local das lesões pré-selecionadas, utilizando *punch* número 5 que foram armazenadas em nitrogênio líquido.

4.2.2 Purificação de RNA

Para a extração de RNA das amostras foi utilizado o kit ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System® de acordo com o protocolo do fabricante. Brevemente, as amostras foram maceradas com 1-Tioglicerol em Tampão LBA. Em seguida, foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e centrifugadas por 3 minutos a $14.000 \times g$. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL. Adicionou-se isopropanol conforme recomendação e as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 5 segundos e transferidas para a minicoluna, que estava acoplada a um tubo de coleta de eluição. Em seguida, as minicolunas foram centrifugadas a $12.000\text{--}14.000 \times g$ por 1 minuto a $20\text{--}25^\circ\text{C}$. O líquido eluído foi descartado e cada minicoluna foi lavada com 500µl de solução de lavagem de RNA, centrifugada a $12.000\text{--}14.000 \times g$ por 30 segundos. Após a lavagem, o DNA foi digerido utilizando DNase I em Yellow Core Buffer por 15 minutos. Depois, as microcolunas foram lavadas com 200µl de Column Wash Solution e centrifugado a $12.000\text{--}14.000 \times g$ por 15 segundos. Novamente, as colunas foram lavadas com 500µl de solução de lavagem de RNA e centrifugado a $12.000\text{--}14.000 \times g$ por 30 segundos, repetindo-se esta operação por mais uma vez, porém a centrifugando-se por 2 minutos. As colunas foram, então, transferidas para o microtubo de eluição e o RNA foi eluído com 30 µL de água ultrapura, incubando por 1 minuto e centrifugando a $12.000\text{--}14.000 \times g$ por 1 minuto. O RNA purificado foi quantificado utilizando o equipamento Invitrogen Qubit® Fluorometer e o Q32852 Quant-iT RNA Assay Kit, 100 assays *5-100ng* (250pg/uL-100ng/uL) para a leitura das amostras, seguindo as instruções do fabricante. Sua integridade foi avaliada no gel de agarose a 1% com formaldeído e armazenado a -70°C .

4.2.3 Sequenciamento de nova geração (NGS)

Antes de iniciar a técnica de NGS, o mRNA deve ser purificado do RNA total. Esta purificação foi realizada utilizando o kit Dynabeads™ mRNA DIRECT™ Purification Kit (Invitrogen), de acordo com o fabricante. Em seguida, o mRNA foi quantificado com o equipamento Invitrogen Qubit® Fluorometer e o Q32852 Quant-iT RNA Assay Kit, 100 assays *5-100ng* (250pg/uL-100ng/uL) para a leitura das amostras, seguindo as instruções do fabricante.

As bibliotecas de cada amostra foram realizadas utilizando o Ion Total RNA-Seq Kit v2 e Ion Xpress™ Barcode Adapters 1-16 Kit (ThermoFisher Scientific), de acordo com o fabricante. Brevemente, o mRNA de cada amostra foi fragmentado com RNase III por 3 minutos, e depois purificado. Em seguida, os adaptadores foram ligados e foi realizada a transcrição reversa para obtenção do cDNA. Após a purificação do cDNA, este foi amplificado utilizando Platinum™ PCR SuperMix High Fidelity. O cDNA foi purificado e analisado no Bioanalyzer™, utilizando o High Sensitivity DNA Kit para avaliar sua qualidade.

Cada amostra foi quantificada com o Ion Library TaqMan™ Quantitation Kit no StepOnePlus (Applied Biosystems).

As amostras foram adicionadas em partes iguais e sequenciadas no Ion GeneStudio S5 Plus System.

4.3 Critérios De Inclusão e Exclusão

Os critérios de inclusão foram pacientes recém diagnosticados com hanseníase formas tuberculóide e Virchowiana, não tratados, de ambos os gêneros, maiores de 18 anos. Foram excluídos deste estudo indivíduos gestantes e aqueles que estivessem em reação hansênica tipo 1 ou 2, ou, possuíam sorologia positiva para HIV, e outras comorbidades como diabetes, tuberculose e doenças auto-imunes.

4.4 Análise de Dados

Para a análise dos dados do sequenciamento foi utilizada a ferramenta miARma-Seq. Os arquivos Fastq que são gerados pelo sequenciador são inicialmente primados, analisando a qualidade, e filtrado pelo Cutadapt. Depois, os dados foram alinhados ao genoma humano pelo software Bowtie-2, para identificação dos genes que foram sequenciados. Após a identificação, as leituras foram contadas pelo featureCounts, gerando um arquivo txt com a contagem bruta dos dados. Esse arquivo txt foi carregado na plataforma R com o pacote edgeR. Inicialmente o edgeR realizou a normalização por TMM (Trimmed mean of M-values) dos dados e em seguida realizou a análise de expressão diferencial de genes, dando o resultado em logaritmo de fold-change (logFC).

Neste estudo, foram utilizadas triplicatas técnicas para cada amostra, e a comparação foi realizada com amostras Virchowianas em relação às amostras tuberculóides para o cálculo de logFC.

Comparando-se estes grupos amostrais entre si – Virchowiana contra tuberculóide – um valor de expressão diferencial foi obtido para cada gene, o qual é numericamente representado por logaritmo de fold-change (logFC) sendo, fold-change uma medida de razão.

O valor logaritmo de fold-change é obtido a partir da razão entre os valores de detecção sumarizados do grupo Virchowiano (S_{exp}) e do grupo tuberculóide (S_{ctrl}), aplicando-se um logaritmo na base 2 para normalização de sua escala, como indicado na equação abaixo:

$$\log FC = \log_2 \left(\frac{S_{exp}}{S_{ctrl}} \right)$$

Fonte: NUNES, 2013

Para cada gene, o valor de logFC determinou o quanto que sua expressão gênica foi alterada durante a condição experimental: um valor positivo indicou super-expressão, um valor negativo indicou sub-expressão, e um valor próximo de zero indicou que não houve diferença significativa. Com a inclusão de replicatas amostrais, cada logFC é acompanhado de um valor-p indicando sua significância estatística, o qual é calculado a partir dos desvios entre os valores de detecção e representa a probabilidade de o logFC ser considerado incoerente à comparação.

Um ajuste deste valor-p foi aplicado na finalidade de diminuir a taxa de erros tipo I (“falso-positivos”), utilizando-se métodos como o false-discovery rate (FDR). Sendo assim, genes que apresentam um logFC positivo ou negativo, bem como significância estatística (valor-p ajustado próximo de zero), foram atribuídos como genes diferencialmente expressos (GDEs) para a condição observada.

A escala log favoreceu a separação entre genes super- e sub-expressos e diminuiu discrepâncias, por esta razão, tornou-se mais viável assumir alterações biológicas usando os próprios GDEs e adotando o logFC como medida comparativa.

Por fim, para a análise estatística dos dados foi estabelecido um nível de significância em 95% ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Características da população do estudo

Foram triados 20 pacientes com hanseníase nas formas polares, sendo 10 da forma tuberculóide e 10 da forma Virchowiana, que preenchem os critérios de inclusão neste estudo, estes foram atendidos, diagnosticados e após os esclarecimentos de dúvidas e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) na Universidade do Estado do Pará (UEPA), foram coletadas amostras de biópsia de pele em punch nº 5. Treze pacientes foram excluídos do estudo, dada a impossibilidade técnica de algumas dessas amostras, devida dificuldade de coleta técnica para fins de dosagem de RNA, o que afetou o número da casuística.

Dos demais pacientes, foram analisadas as amostras de fragmentos de pele, de 7 pacientes, sendo 3 (três) tuberculóides e 4 (quatro) Virchowianos, sete pacientes do gênero masculino, com idades que variaram de 21 a 77 anos, sendo uma média de idade de 53,42, com predominância de procedência urbana, com número de lesões que variaram de 1 a mais de 10 lesões, sendo disseminadas nos pacientes Virchowianos e localizadas no tronco e membros superiores nos pacientes tuberculóides. As lesões elementares eram placas eritematoinfiltradas nos pacientes tuberculóides e tubérculos nos pacientes Virchowianos, e a baciloscopia foi negativa nos pacientes tuberculóides e positiva nos pacientes Virchowianos, sendo que todos os pacientes não se encontravam em estado reacional.

Tabela 1 – Características clínicas e demográficas da população estudada

Paciente	Gênero	Idade	Procedência	Forma clínica	Número de lesões
1	masculino	60	Urbana	Tuberculóide	1
2	masculino	66	Urbana	Virchowiano	>10
3	masculino	77	Urbana	Tuberculóide	1
4	masculino	21	Rural	Tuberculóide	1
5	masculino	45	Urbana	Virchowiano	>10
6	masculino	50	Rural	Virchowiano	>10
7	masculino	55	Urbana	Virchowiano	>10

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Tabela 2 – Características clínicas e laboratoriais da população estudada

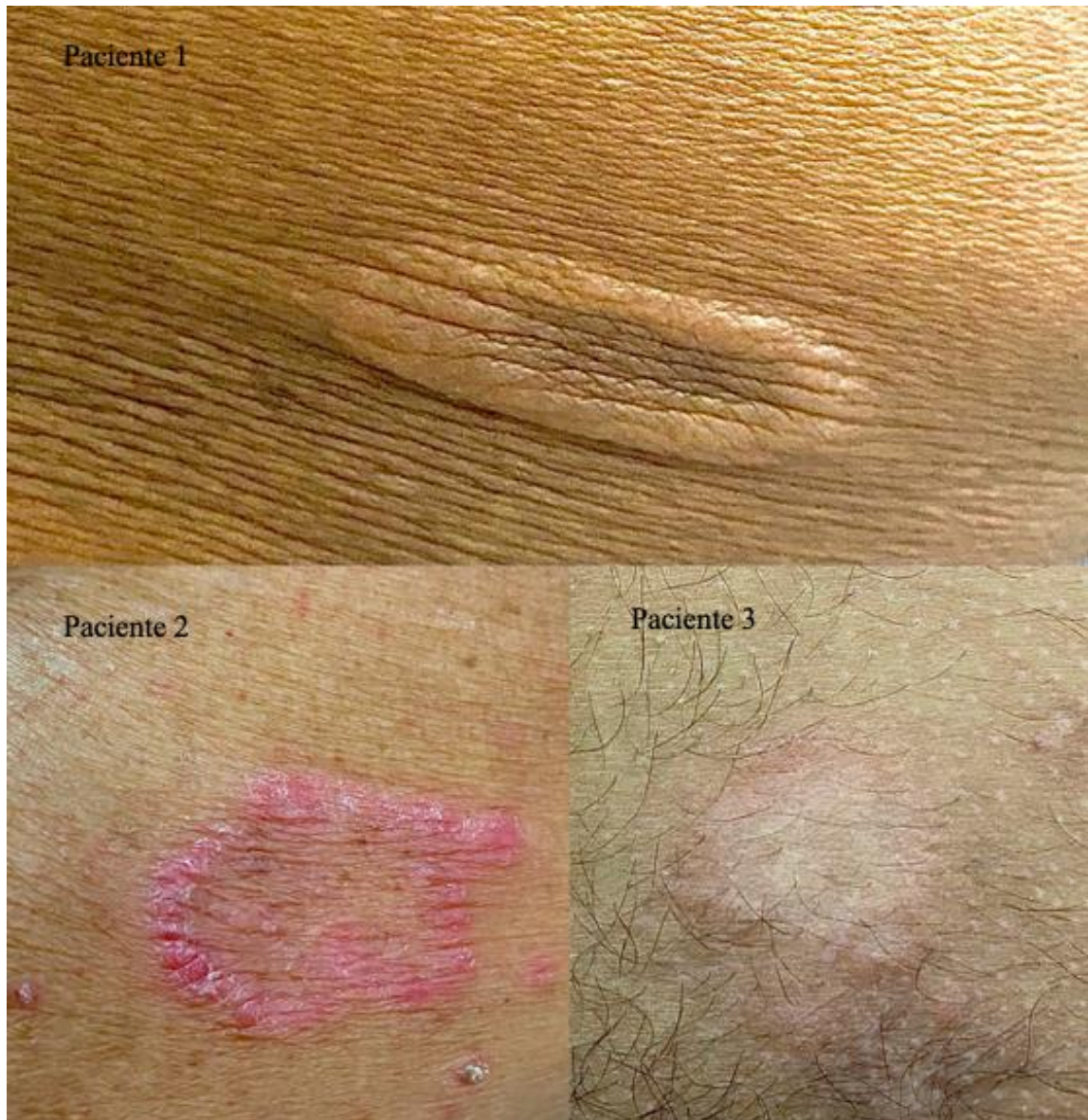
Paciente	Número de lesões	Localização	Lesão Elementar	Baciloscopia	Reação hansênica
1	1	Tronco	Placa eritemato-infiltrada	Negativa	Não
2	>10	Disseminado	Tubérculos	Positiva	Não
3	1	MMSS	Placa eritemato-infiltrada	Negativa	Não
4	1	Tronco	Placa eritemato-infiltrada	Negativa	Não
5	>10	Disseminado	Tubérculos	Positiva	Não
6	>10	Disseminado	Tubérculos	Positiva	Não
7	>10	Disseminado	Tubérculos	Positiva	Não

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

5.2 Parâmetros clínicos

As lesões clínicas variaram de acordo com cada forma clínica.

Figura 14 – Pacientes das formas tuberculóides apresentando placas eritematoinfiltradas de contornos irregulares e limites pouco nítidos variando de entre 2 cm e 2,5cm nos seus maiores diâmetros



Fonte: Arquivo fotográfico da autora.

Figura 15 – Pacientes das formas Virchowianas apresentando múltiplos nódulos infiltrados e tubérculos distribuídos em tórax, dorso, membros superiores e membros inferiores



Fonte: Arquivo fotográfico da autora.

5.3 Expressão de citocinas e receptores associados por sequenciamento de nova geração (NGS)

A expressão diferencial de genes por NGS foi realizada com 3 pacientes da forma tuberculóide e 4 pacientes com a forma Virchowiana. Como resultado, obteve-se 18.716 genes diferentemente expressos entre as duas formas de hanseníase. Com isso, foram selecionados 35 genes de citocinas e associados às citocinas para o estudo.

A análise realizada para a diferenciação de expressão gênica foi baseada em um valor de expressão diferencial que é obtido para cada gene, o qual é numericamente representado por logaritmo de fold-change (logFC).

Para cada gene, o valor de logFC determinará o quanto que sua expressão gênica foi alterada durante a condição experimental: um valor positivo indicará super-expressão, um valor negativo indicará sub-expressão, e um valor próximo de zero indicará que não houve diferença significativa. Além disso, com a inclusão de replicatas amostrais, cada logFC é acompanhado de um valor-p indicando sua significância estatística. Sendo assim, genes que apresentam um logFC positivo ou negativo, bem como significância estatística (valor-p ajustado próximo de zero), serão atribuídos como genes diferencialmente expressos (GDEs) para a condição observada. O propósito das análises de expressão diferencial por transcriptomas consiste, portanto, em identificar os GDEs que respondem ao conjunto de experimentos sendo estudados (NUNES, 2020).

Os genes de citocinas selecionados foram: IL-18BP (proteína de ligação à interleucina-18), IL-10 (interleucina 10), IL-4I1 (enzima imunossupressora do gene 1 (IL4I1) induzida pela Interleucina 4), IL-27 (interleucina 27), TGF β 1 (ou TGF- β 1 ou fator de crescimento transformador beta 1), IL-18 (interleucina 18), IL-16 (interleucina 16), IL-23A (subunidade alfa da interleucina 23), IL-7 (interleucina 7), TGF β 3 (ou TGF- β 3 ou fator de crescimento transformador beta 3), IL-15 (interleucina 15), IL-17D (interleucina 17D), IL-17B (interleucina 17B), IL-21 (interleucina 21), IL-12B (subunidade beta da interleucina 12), IL-11 (interleucina 11), IL-36G (interleucina 36 gama) e IL-13 (interleucina 13).

Tabela 3 – Genes de citocinas estudados, seus valores de logFC e pValue, na população estudada

CITOCINAS	LOGFC	PVALUE
IL18BP	2,9763346	5,43E-15
IL10	2,6887774	1,27E-08
IL4I1	2,41995652	7,13E-11
IL27	1,86607053	0,00071411
TGFB1	1,5464646	2,85E-06
IL18	0,83218973	0,00055939
IL16	0,60713754	0,02735398
IL23A	-0,7801175	0,02240802
IL7	-0,7979278	0,00265323
TGFB3	-0,823222	0,00183083
IL15	-1,0912553	1,96E-07
IL17D	-1,1833468	4,02E-05
IL17B	-1,4441608	0,00758969
IL21	-1,462613	0,02036248
IL12B	-1,9385644	0,00915689
IL11	-2,3625907	0,00719783
IL36G	-2,6439764	0,01225658
IL13	-5,386741	3,29E-07

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os genes de citocinas mais expressos na forma Virchowiana foram os genes logFC com numeração positiva, significando que estão super-expressos em relação a forma tuberculóide.

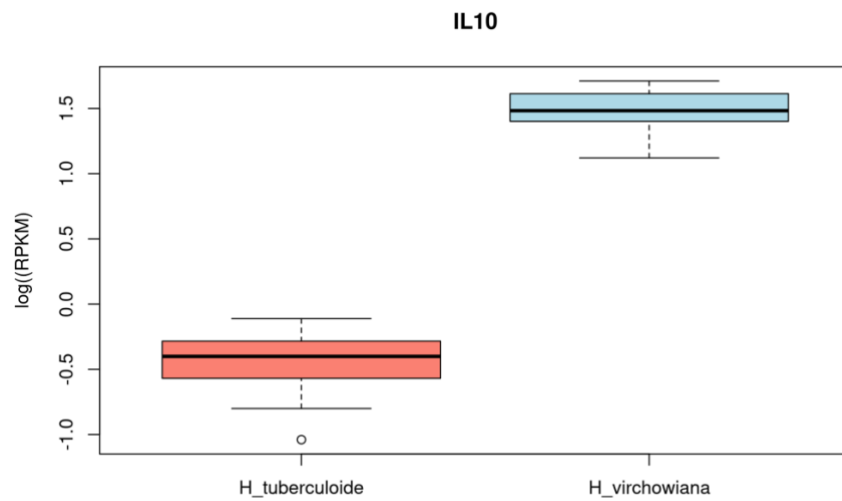
Na forma Virchowiana, portanto, foi evidenciada expressão diferencial dos seguintes marcadores: IL18BP (proteína de ligação à interleucina-18 - logFC 2,9763346 e $P \leq 0,05$), de IL-10, quase cinco vezes mais expressa na forma Virchowiana (logFC 2,6887774, $p \leq 0,05$), IL-4I1 (logFC 2,41995652 e $P \leq 0,05$) e IL27 (logFC 1,86607053 e $P \leq 0,05$), com expressão quase quatro vezes maior. O TGFB1 (logFC 1,5464646 e $P \leq 0,05$) e as citocinas IL-18 (logFC 0,832189 e $P \leq 0,05$) e IL-16 (logFC 0,60713 e $P \leq 0,05$) também foram marcadamente mais expressas na forma Virchowiana.

Tabela 4 – Genes de citocinas super-expressos na forma Virchowiana

CITOCINA VV	LOGFC	PVALUE
IL18BP	2,9763346	5,43E-15
IL10	2,6887774	1,27E-08
IL4I1	2,41995652	7,13E-11
IL27	1,86607053	0,00071411
TGFB1	1,5464646	2,85E-06
IL18	0,83218973	0,00055939
IL16	0,60713754	0,02735398

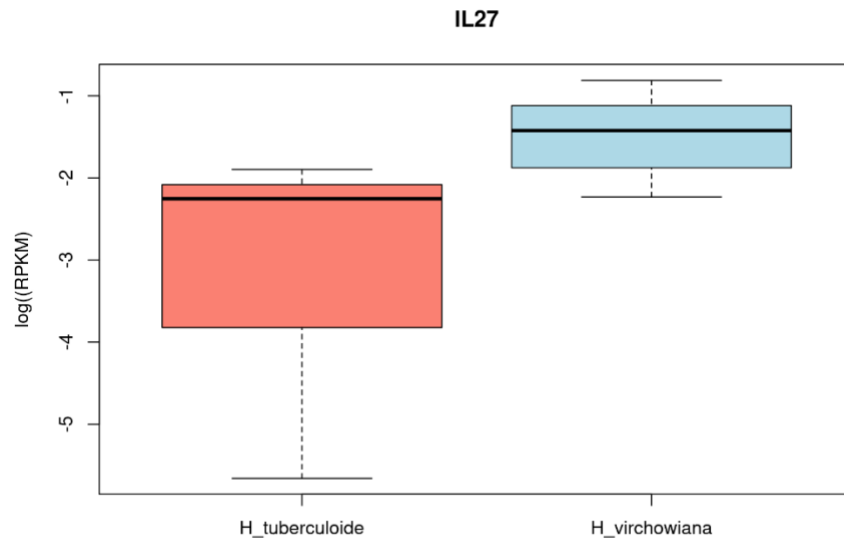
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 16 – Expressão de IL-10 nas formas Virchowianas em relação às formas tuberculóides



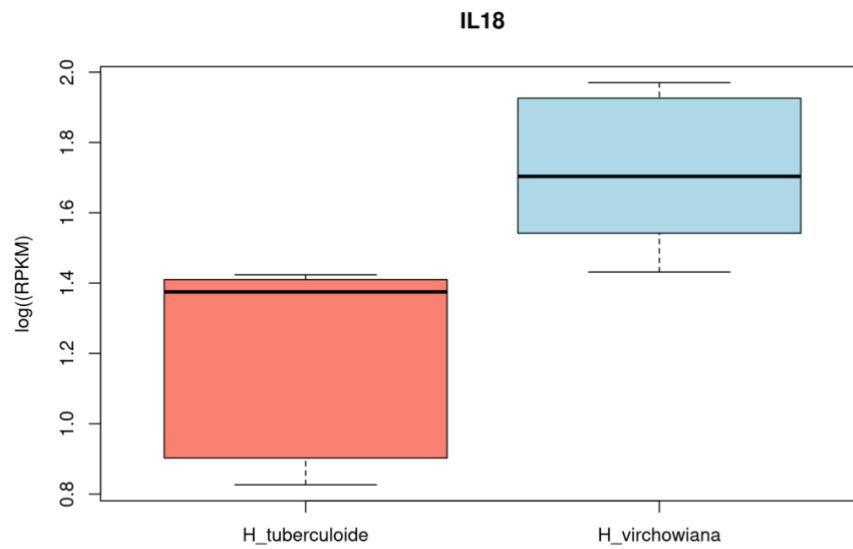
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 17 – Expressão de IL-27 nas formas Virchowianas em relação às formas tuberculóides



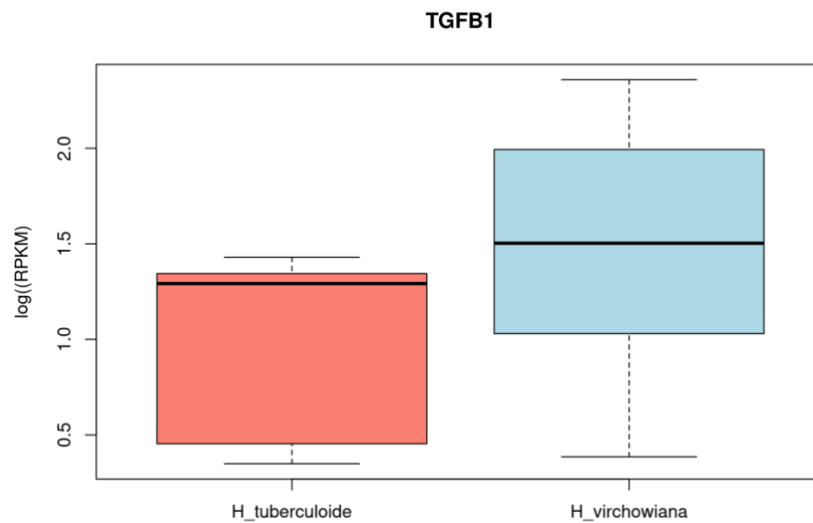
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 18 – Expressão de IL-18 nas formas Virchowianas em relação às formas tuberculóides



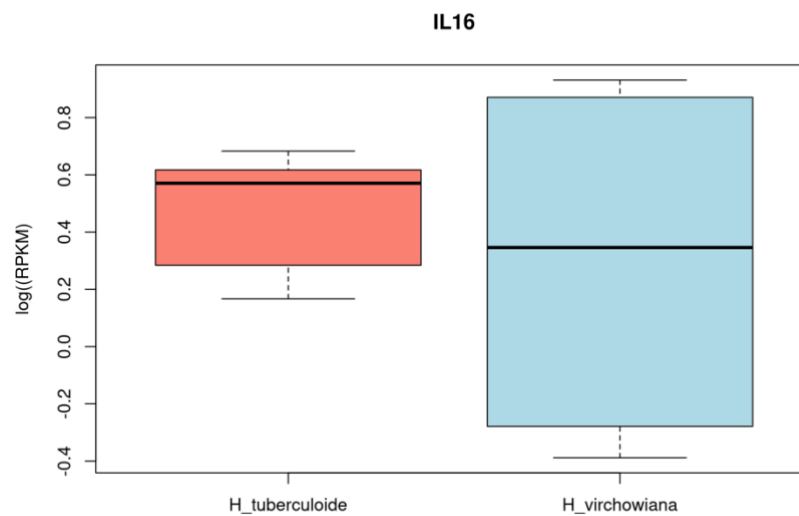
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 19 – Expressão de TGFB1 nas formas Virchowianas em relação às formas tuberculóides



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Figura 20 – Expressão de IL-16 nas formas Virchowianas em relação às formas tuberculóides



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os genes de citocinas mais expressos na forma tuberculóide foram os genes logFC com numeração negativa, significando que estão sub-expressos em relação à forma Virchowiana.

Na forma tuberculóide, observamos a expressão diferenciada das seguintes citocinas: IL-13 (logFC -5,386741 e $P \leq 0,05$), IL-36G (logFC -2,6439764 e $P \leq 0,05$), IL11 (logFC -2,3625907 e $P \leq 0,05$), IL-12B (logFC -1,9385644 e $P \leq 0,05$), IL-21 (logFC -1,462613 e $P \leq 0,05$), IL-17B (logFC -1,4441608 e $P \leq 0,05$), IL-17D (logFC -1,1833468 e $P \leq 0,05$), IL15 (logFC -1,0912553 e $P \leq 0,05$), TGFB3 (logFC -0,823222 e $P \leq 0,05$), IL7 (logFC -0,7979278 e $P \leq 0,05$)

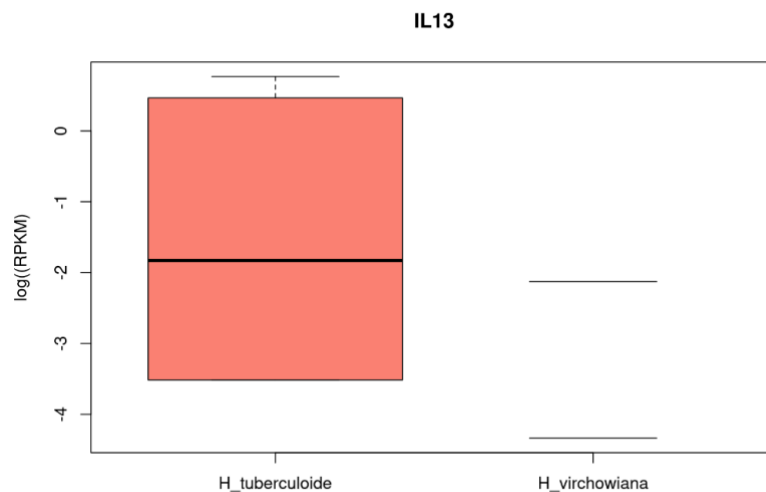
e IL-23A (logFC -0,7801175 e $P \leq 0,05$). A citocina IL-13 mostrou-se 10 vezes mais expressa na forma tuberculóide, enquanto a IL-11 foi expressa quatro vezes mais. Da mesma forma observou-se que as citocinas IL-21 e IL-15 estavam expressas duas vezes mais na forma tuberculóide.

Tabela 5 – Genes de citocinas super-expressos na forma tuberculóide

CITOCINA TT	LOGFC	PVALUE
IL23A	-0,7801175	0,02240802
IL7	-0,7979278	0,00265323
TGFB3	-0,823222	0,00183083
IL15	-1,0912553	1,96E-07
IL17D	-1,1833468	4,02E-05
IL17B	-1,4441608	0,00758969
IL21	-1,462613	0,02036248
IL12B	-1,9385644	0,00915689
IL11	-2,3625907	0,00719783
IL36G	-2,6439764	0,01225658
IL13	-5,386741	3,29E-07

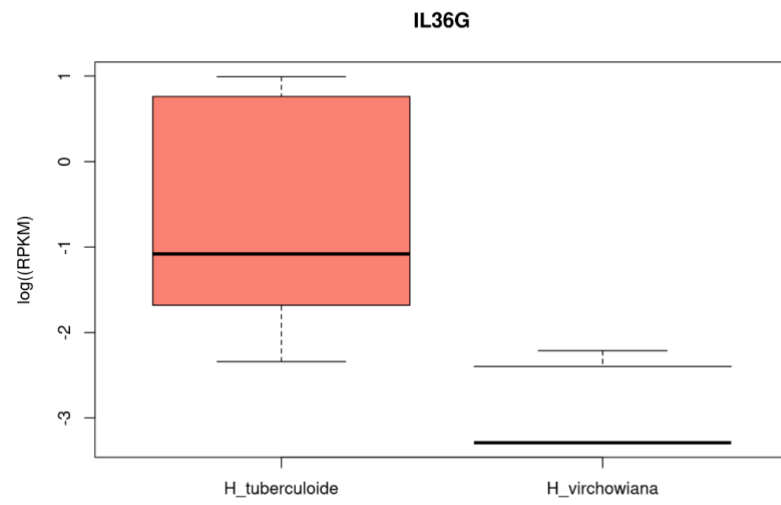
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 21 – Expressão de IL-13 nas formas Virchowianas em relação às formas tuberculóides



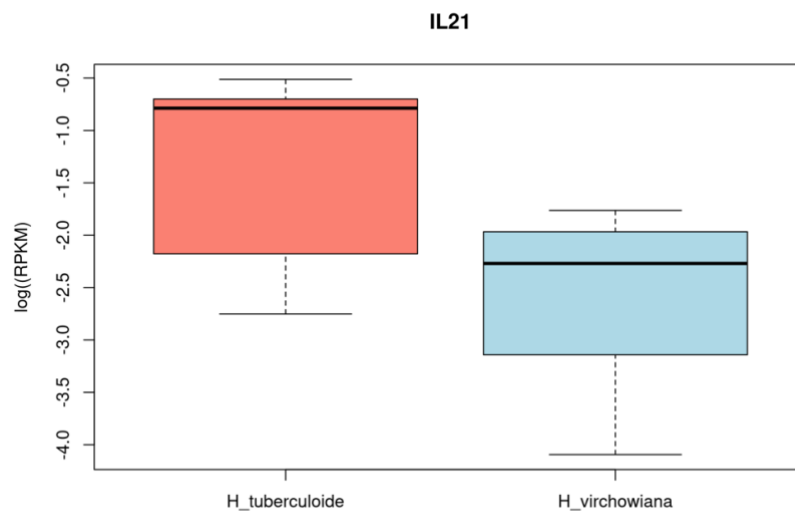
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 22 – Expressão de IL-36G nas formas Virchowianas em relação às formas tuberculóides



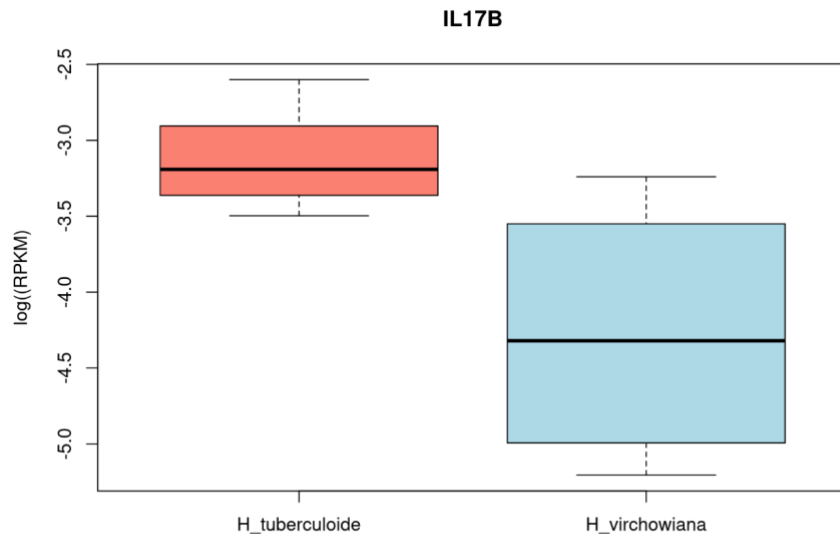
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 23 – Expressão de IL-21 nas formas Virchowianas em relação às formas tuberculóides



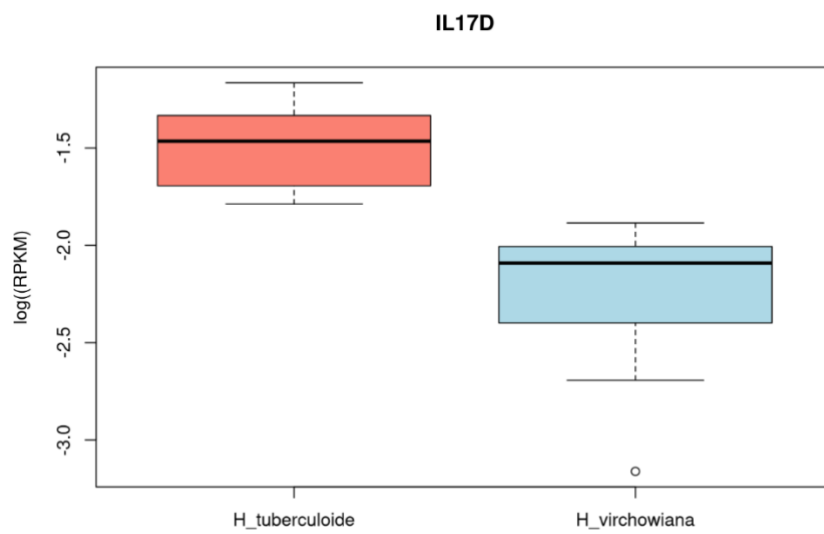
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 24 – Expressão de IL-17B nas formas Virchowianas em relação às formas tuberculóides



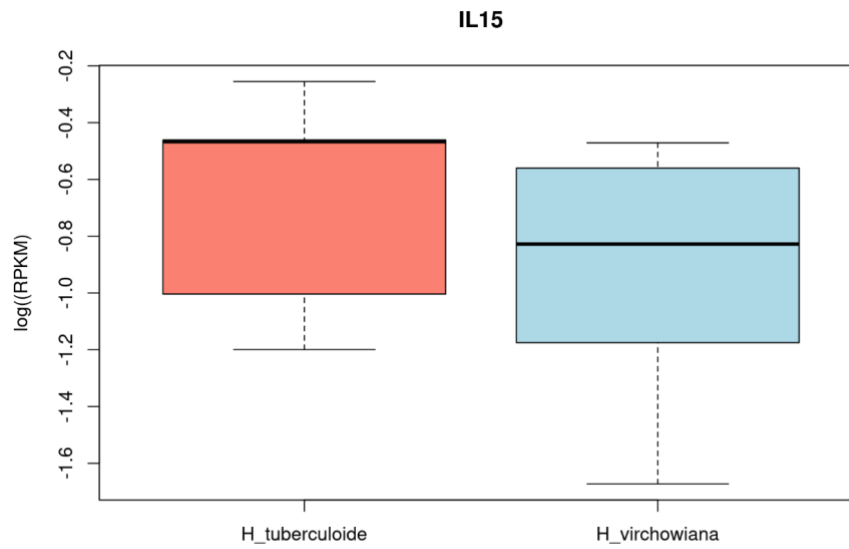
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 25 – Expressão de IL-17D nas formas Virchowianas em relação às formas tuberculóides



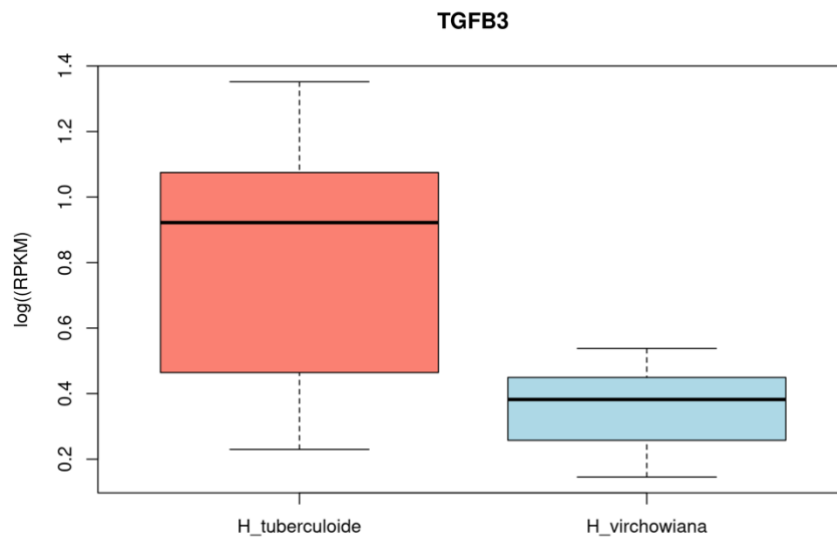
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 26 – Expressão de IL-15 nas formas Virchowianas em relação às formas tuberculóides



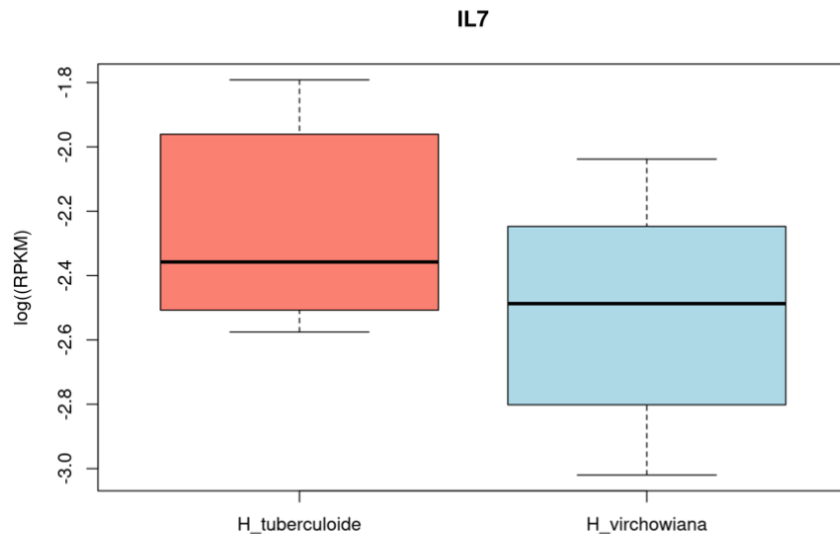
Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Figura 27 – Expressão de TGFB3 nas formas Virchowianas em relação às formas tuberculóides



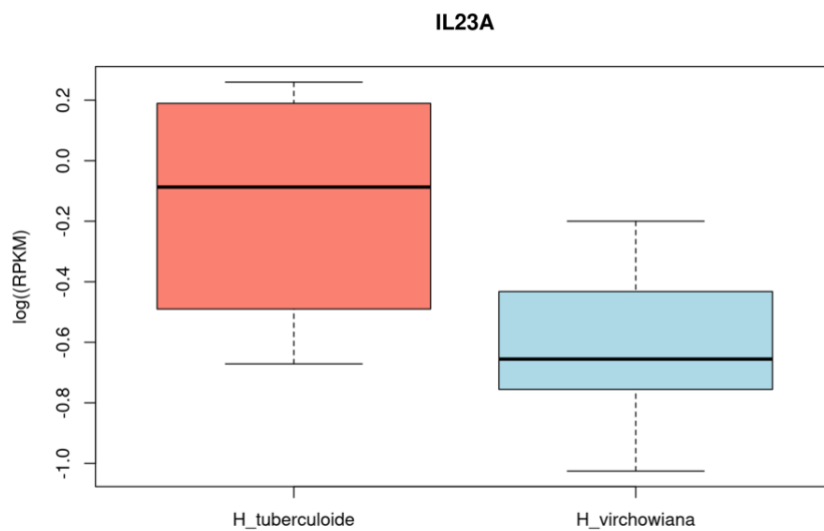
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 28 – Expressão de IL-7 nas formas Virchowianas em relação às formas tuberculóides



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 29 – Expressão de IL-23A nas formas Virchowianas em relação às formas tuberculóides



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os genes associados a citocinas e seus receptores selecionados foram: IL-10RA (subunidade alfa do receptor de interleucina 10), IL-10 RB (subunidade beta do receptor de interleucina 10), IL-5RA (subunidade alfa do receptor de interleucina 5), IL-12RB1 (subunidade beta 1 do receptor de interleucina 12), IL-2RG (subunidade gamma do receptor de interleucina 2), IL-2RB (subunidade beta do receptor de interleucina 2), IL17RA (receptor de

interleucina 17A), IL-4R (receptor de interleucina 4), IL-17REL (receptor E like da interleucina 17), IL-17-RE (receptor de interleucina 17E), IL-23R (receptor de interleucina 23), IL-1R1 (receptor tipo 1 de interleucina 1), IL-1R2 (receptor tipo 1 de interleucina 1), IL-18R1 (receptor 1 de interleucina 18), IL-7R (receptor de interleucina 18), IL-13RA2 (subunidade alfa 2 do receptor de interleucina 13) , IL-2RB (subunidade beta do receptor de interleucina 2), IL-2RG (subunidade gama do receptor de interleucina 2) e IL-12RB1(subunidade beta 1 do receptor de interleucina 12) .

Tabela 6 – Genes de receptores de citocinas estudados, seus valores de logFC e pValue, na população estudada

RECEPTORES	LOGFC	PVALUE
IL10RA	2,37445641	6,45E-13
IL10RB	0,94725694	0,00688085
IL5RA	3,32913812	2,89E-09
IL12RB1	1,01529328	0,00026639
IL17RA	0,84889023	0,0043498
IL2RG	0,95890744	2,28E-05
IL2RB	0,88431504	5,51E-06
IL4R	0,67017524	0,01428978
IL18R1	-1,4241246	4,39E-07
IL7R	-2,4289976	7,21E-07
IL13RA2	-7,4373844	3,04E-07
IL12RB2	-0,8991077	0,00212648
IL17REL	-1,3349576	0,00414076
IL17RE	-1,9335137	6,24E-08
IL23R	-2,7229067	7,94E-05
IL1R1	-0,4599947	0,01613153
IL1R2	-0,6087723	0,00174252

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

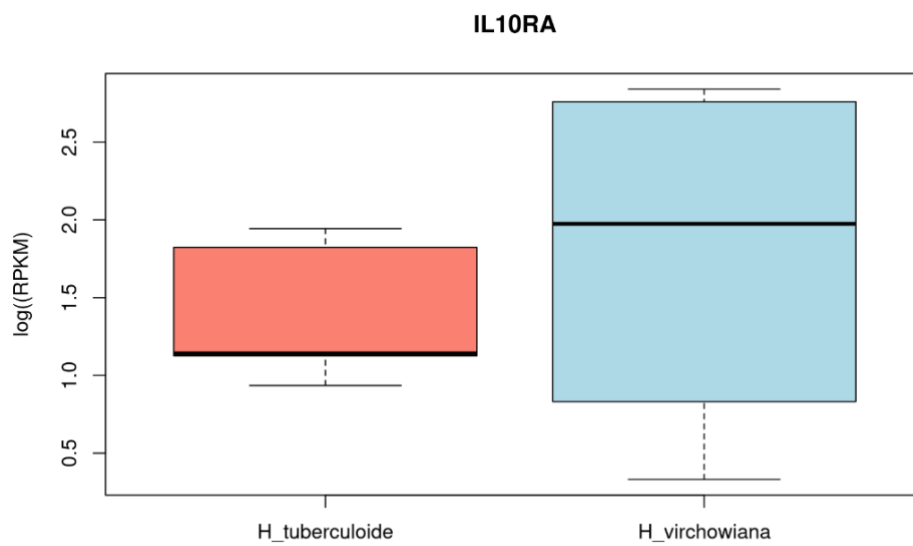
Os genes de receptores mais expressos na forma Virchowiana foram IL-10RA (logFC 2,37445641 e $P \leq 0,05$) e IL-10RB (logFC 0,94725694 e $P \leq 0,05$), IL-5RA (logFC 3,32913812 e $P \leq 0,05$), IL-12RB1 (logFC 1,01529328 e $P \leq 0,05$), IL-2RG (logFC 0,95890744 e $P \leq 0,05$), IL-2RB (logFC 0,88431504 e $P \leq 0,05$), IL17RA (logFC 0,84889023 e $P \leq 0,05$) e IL-4R (logFC 0,67017524 e $P \leq 0,05$).

Tabela 7 – Genes de receptores de citocinas super-expressos na forma Virchowiana

RECEPTOR	LOGFC	PVALUE
IL10RA	2,37445641	6,45E-13
IL10RB	0,94725694	0,00688085
IL5RA	3,32913812	2,89E-09
IL12RB1	1,01529328	0,00026639
IL17RA	0,84889023	0,0043498
IL2RG	0,95890744	2,28E-05
IL2RB	0,88431504	5,51E-06
IL4R	0,67017524	0,01428978

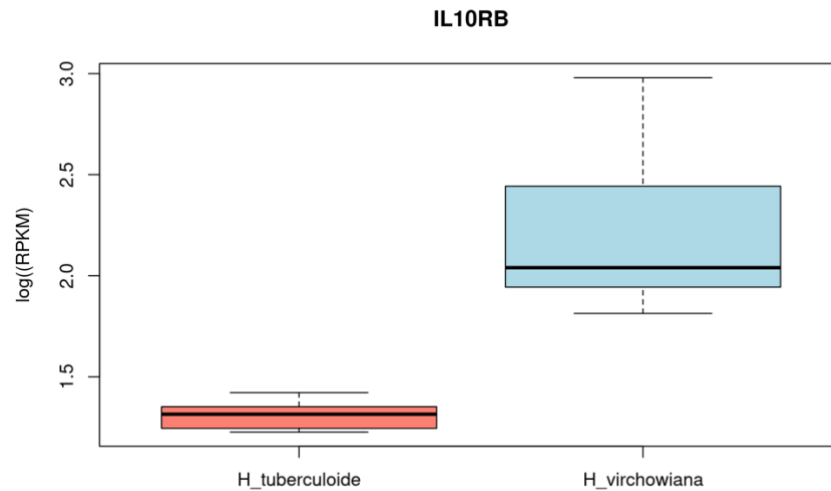
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 30 – Expressão de IL-10RA nas formas Virchowianas em relação às formas tuberculóides



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Figura 31 – Expressão de IL-10RB nas formas Virchowianas em relação às formas tuberculóides



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os genes de receptores mais expressos na forma tuberculóide foram: IL-17REL (logFC -1,3349576 e $P \leq 0,05$), IL-17-RE (logFC -1,9335137 e $P \leq 0,05$), IL-23R (logFC -2,7229067 e $P \leq 0,05$), IL-1R1 (logFC -0,4599947 e $P \leq 0,05$), IL-1R2 (logFC -0,6087723 e $P \leq 0,05$), IL-18R1 (logFC -1,4241246 e $P \leq 0,05$), IL-7R (logFC -2,4289976 e $P \leq 0,05$), IL-13RA2 (logFC -7,4373844 e $P \leq 0,05$) e IL-12RB2 (logFC -0,8991077 e $P \leq 0,05$).

Tabela 8 – Genes de receptores super-expressos na forma tuberculóide

RECEPTOR	LOGFC	PVALUE
IL18R1	-1,4241246	4,39E-07
IL7R	-2,4289976	7,21E-07
IL13RA2	-7,4373844	3,04E-07
IL12RB2	-0,8991077	0,00212648
IL17REL	-1,3349576	0,00414076
IL17RE	-1,9335137	6,24E-08
IL23R	-2,7229067	7,94E-05
IL1R1	-0,4599947	0,01613153
IL1R2	-0,6087723	0,0017425

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

6 DISCUSSÃO

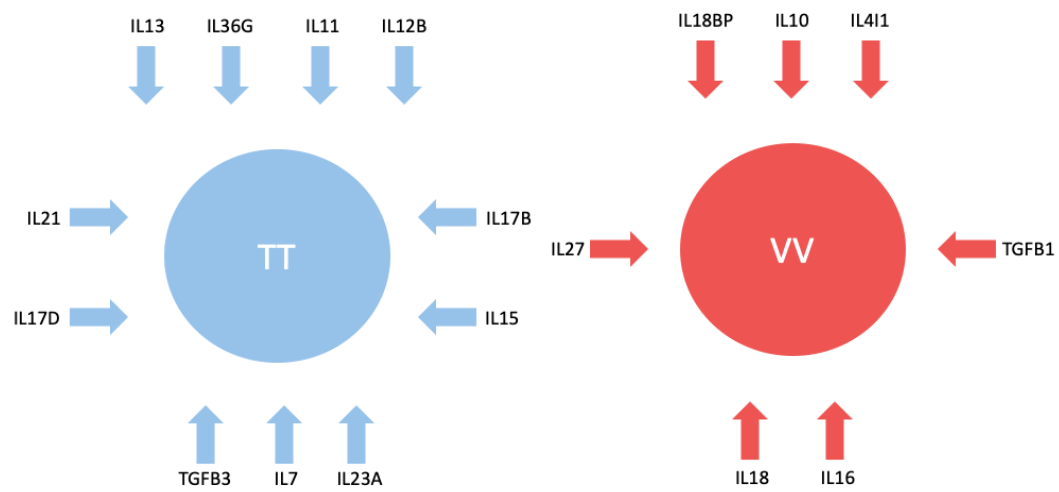
A hanseníase é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium leprae* em que as manifestações clínicas se correlacionam com a imunidade mediada por células (IMC). Em um dos polos de manifestação clínica, a hanseníase tuberculóide (TT) é caracterizada por forte IMC e um padrão de citocinas Th1 bem documentado nas lesões. No outro polo, os pacientes com hanseníase Virchowiana (VV) respondem fracamente aos antígenos do *M. leprae* e suas lesões são caracterizadas por um padrão de citocinas Th2 (SOUSA *et al.*, 2017; YAMAMURA *et al.*, 1991; YAMAMURA *et al.*, 1992).

Nos anos recentes, a utilização de técnicas de varredura genômica tem nos permitido ampliar e melhor entender a lista de genes envolvidos nas vias imunológicas mais importantes associadas à suscetibilidade ou resistência à hanseníase (CARDOSO *et al.*, 2011). Os mecanismos pelos quais patógenos intracelulares ativam vias imunossupressoras são críticos para a compreensão da patogênese da infecção, o que parece depender de quando e como uma determinada citocina se encontrará no sítio da doença (GOULART; PENNA; CUNHA, 2002).

A capacidade dos patógenos microbianos de desencadear respostas imunes que neutralizam a defesa do hospedeiro é crítica para a patogênese da doença infecciosa, e nesse sentido, é importante identificar possíveis genes que possam “desligar” a resposta imunológica protetiva, assim como o mecanismo que regula esse “desligamento” nas formas polares da hanseníase (TELES *et al.*, 2015).

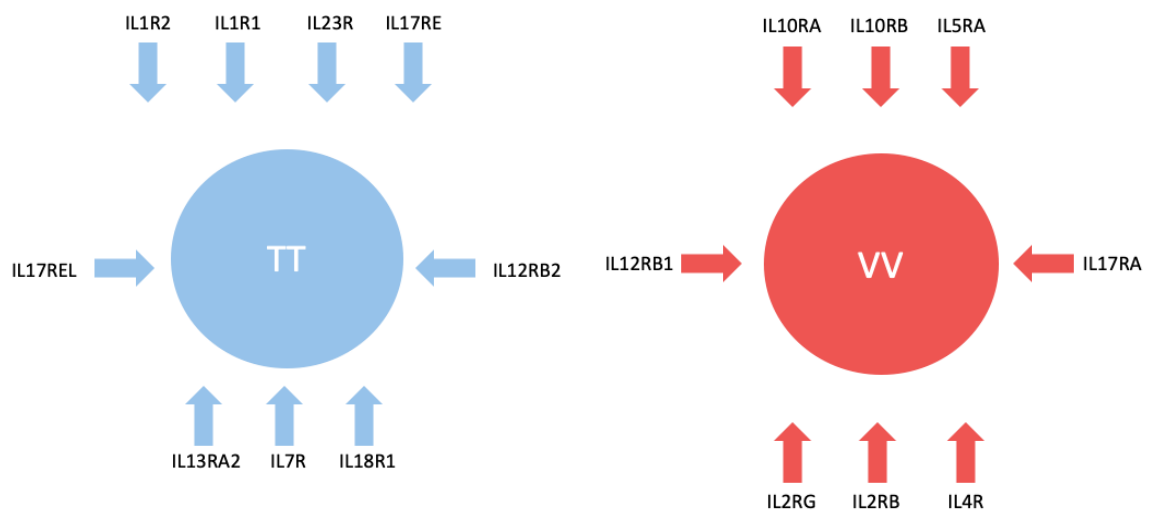
Nesse painel, exploramos a expressão dos seguintes genes de citocinas expressadas e parte de seus receptores: IL-1, IL-4, IL-7, IL-10, IL-11, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, IL-27 e TGF- β em pacientes que manifestavam as formas clínicas polares da hanseníase. Os resultados obtidos nos desafiaram a traçar um perfil de genes potencialmente envolvidos nas respostas imunes e suas interrelações, tendo como resultado o desfecho clínico nas formas polares. Esses resultados trouxeram a luz a participação de citocinas pouco estudadas na hanseníase, como também, as citocinas já relacionadas sua patogenia. O interessante é avaliar como estas citocinas e seus receptores se interconectam para explicar a clínica do paciente eliciadas nestas formas clínicas, especialmente quando comparados com a literatura especializada. Um painel com esta diversidade de citocinas e seus receptores, com implicações que podem resultar tanto em melhor entendimento dos mecanismos subjacentes à resposta imune dos pacientes quanto no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Figura 32 – Diagrama das citocinas mais expressas em cada forma polar da hanseníase



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 33 – Diagrama dos receptores mais expressos em cada forma polar da hanseníase



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A IL-10 é uma importante citocina, atuando como principal inibidor das respostas inflamatórias, e no estabelecimento da anergia das células T periféricas (AKDIS; BLASER, 2001), conseqüentemente assumindo função primordial no desligamento da resposta imunológica, sendo importante para sua regulação. A função anti-inflamatória da IL-10 pode acontecer por mecanismos variados, que incluem: 1) inibe diversas citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6, IL-12, TNF, que levam à diminuição na atividade fagocítica e antimicrobiana de macrófagos; 2) Inibe a expressão de diversas quimiocinas, que por sua vez

inibem o recrutamento de monócitos, células dendríticas, neutrófilos e células T; 3) inibe a apresentação de antígenos, regulando negativamente o complexo de histocompatibilidade (MHC) classe II e moléculas coestimuladoras de macrófagos (MEGE *et al.*, 2006).

A produção de IL-10 é regulada pelo gene que codifica essa citocina, localizado no cromossomo 1 em 1q31-32, vários estudos mostraram que fatores genéticos podem explicar 50% a 70% das variabilidades na secreção de IL-10 e que polimorfismos no promotor do gene IL-10 estariam associados com a suscetibilidade, resistência, resposta imune e manifestações clínicas da hanseníase. Com efeito, é bastante expressa em pacientes com a forma clínica VV (CARDONA-CASTRO *et al.*, 2012; MI. ZHANG, 2020).

Neste estudo, foi identificada a expressão gênica de IL-10 quase cinco vezes maior na forma clínica Virchowiana, do que na forma tuberculóide. Diversos estudos já haviam demonstrado a importância da IL-10 como citocina primordial para determinar o desfecho da doença (CARDONA-CASTRO *et al.*, 2012; ALVARADO-ARNEZ *et al.*, 2015; FRANCESCHI *et al.*, 2009). Um estudo de perfis de expressão gênica derivados de lesões cutâneas de hanseníase sugere a existência de uma via que inibe as respostas de defesa do hospedeiro, envolvendo a indução de interferons tipo I e subsequentemente IL-10, uma ligação entre IL-27 e a via de IL-10 induzida por IFN- β . Há também evidências de que a indução da IL-10 por IFN- β é parcialmente dependente de IL-27, uma citocina paradoxal que suprime a atividade antimicrobiana induzida por IFN- γ contra *Mycobacterium leprae*. O bacilo induziria o IFN- β , o qual induz IL-27 que leva a secreção de IL-10 diretamente. Isso sugere que a indução de IL-27 fornece um mecanismo de supressão das respostas de defesa do hospedeiro na patogênese da hanseníase. Desta forma, a expressão conjunta de IL-10 e IL-27 nos pacientes VV, estaria relacionada a um mecanismo de desligamento imunológico via IFN- β , IL-27 e IL-10 intimamente relacionado, que poderia representar um eixo primordial no desfecho da doença. Ratificando esse possível mecanismo, nossos achados mostram maior expressão de IL-27 três vezes maior na forma clínica Virchowiana.

Aliado ao resultado de maior expressão de IL-10, este estudo evidenciou maior expressão dos genes para de receptores de IL-10, denominados de IL-10RA e IL-10RB (a co-expressão destes dois genes é necessária para a transdução do sinal induzido por IL-10), na forma lepromatosa da doença, o que confirma a importância da IL-10 no contexto da hanseníase Virchowiana.

Os receptores da IL-10 (IL-10R) são heterodímeros compostos por um domínio intracelular, um espaço de ligação extracelular e uma hélice transmembrana, expressos predominantemente em células imunes. O IL-10R é composto por duas subunidades, IL-10R1

(também denominada IL10R α – subunidade alfa do receptor de interleucina 10), uma subunidade de ligação ao ligante, e IL-10R2 (também denominada IL10R β - subunidade beta do receptor de interleucina 10), uma subunidade acessória necessária para a transdução do sinal (PESTKA *et al.*, 2004). Da mesma forma que outros membros desta família de receptores de citocinas, o complexo receptor interage com membros da família JAK, especificamente JAK1 e tirosina cinase2. A ligação de IL-10 desencadeia a fosforilação da tirosina e a ativação dos fatores de transcrição STAT3, STAT1 e STAT5. Relevante para suas potentes propriedades anti-inflamatórias, a IL-10 inibe a translocação nuclear do fator de transcrição NF κ B e a subsequente síntese de citocinas pró-inflamatórias, além de promover a degradação do mRNA de citocinas pró-inflamatórias. A ativação de STAT3 pela IL-10 também desencadeia a síntese de citocinas supressoras e proteínas efetoras que podem interferir diretamente na sinalização pró-inflamatória (MINSHAWI *et al.*, 2020; RILEY *et al.*, 1999).

Em nosso estudo, a expressão de IL-4R (Receptores de IL-4) apresentou maior expressão na forma VV. Apesar de não ter sido visto IL-4 propriamente dita, a presença de um gene indutor de IL-4 e seu receptor mostra a importância desta citocina no desfecho clínico da hanseníase. Em estudos prévios da literatura específica, foi visto a maior expressão de IL-4 nestes pacientes (SADHU *et al.* 2016; SOUSA *et al.*, 2018).

A IL-4 é uma citocina multifuncional produzida principalmente por células T ativadas, mas também por mastócitos, basófilos e eosinófilos. A IL-4 compartilha homologia de sequência, receptores de superfície celular, sinalização intracelular e efeitos funcionais parciais em células que expressam a IL-13 (LAPORTE *et al.*, 2008). É uma citocina com perfil Th2 que regula a proliferação celular, a apoptose e a expressão de numerosos genes em vários tipos de células, incluindo linfócitos, macrófagos e fibroblastos, células epiteliais e endoteliais. Neste estudo, observamos em nossas amostras a expressão aumentada de IL-4R (Receptores de IL-4) nos pacientes com a forma VV, corroborado com os dados de literatura expostos.

Seguindo o contexto de citocinas que, no polo lepromatoso, a resposta imunológica mediada por linfócitos, pode envolver a participação de citocinas imunossupressoras, e que isso poderia facilitar a esta forma de hanseníase, temos o fator de crescimento transformador beta (TGF- β), que tem ação no controle, diferenciação, proliferação celular, desenvolvimento e reparo tecidual. Estudos demonstram que a sua atuação favoreceria o desenvolvimento da infecção (KINGSLEY, 1994; LETTERIO; ROBERTS, 1998; MENDONCA *et al.*, 2008). O TGF- β 1 se apresentou, neste estudo, mais expresso na forma clínica VV, sendo três vezes mais expresso do que na forma TT. Este gene regulatório atua estimulando o aumento da produção de RNA mensageiro das metaloproteinases, e na produção do NGF (fator de crescimento

neural) nas células de Schwann, bem como promove cicatrização no tecido inflamado com regulação de matriz extracelular pelos fibroblastos, indução e proliferação de células endoteliais para o processo de angiogênese (SOUSA *et al.*, 2013).

Entre os efeitos inibitórios do TGF- β no sistema imunológico estão a diminuição da proliferação e função dos linfócitos, supressão da produção de IL-2 e inibição do receptor de IFN- γ e da expressão do complexo de histocompatibilidade principal II. O TGF- β também bloqueia a ativação de macrófagos induzida por IFN- γ , evocando a inibição de IL-1, fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e síntese de iNOS (forma induzível da sintase do óxido nítrico), bem como, tem alguns efeitos estimuladores no sistema imunológico, promovendo a produção de IL-10 (KISZEWSKI *et al.*, 2003) e dessa forma, promovendo um desligamento da imunidade protetora microbiana. Os estudos desenvolvidos por Goulart, Penna e Cunha (2002), demonstram que o TGF- β impediria a expressão do óxido nítrico e sua ação antimicrobiana ao contrapor-se a citocinas mediadoras da resposta Th1. Os resultados alcançados com o presente estudo encontraram concordância com trabalhos da literatura como o de Souza *et al.* (2013). Neste estudo os autores procuraram entender a diferença existente entre as formas tuberculoide e lepromatosa, no que se refere a presença do TGF- β , sendo demonstrado que na forma lepromatosa da doença, a concentração de células por campo foi maior do que na tuberculoide, tal qual no presente estudo onde, o TGF- β 1 foi mais expresso na forma lepromatosa.

Nos estudos de Kiszewski *et al.* (2003), foi demonstrado que as três isoformas de TGF- β e seus receptores são expressos em ambas as formas polares da hanseníase, sendo a expressão maior nas lesões cutâneas de VV e que a expressão de TGF- β poderia estar relacionada às características clínicas e imunológicas significativas da hanseníase; especificamente, a alta expressão de TGF- β em VV poderia participar da supressão da imunidade celular, enquanto a leve expressão de TGF- β em TT poderia participar do controle do crescimento bacteriano pela indução da expressão de TNF- α e fibrose (KISZEWSKI *et al.*, 2003). O TGF- β também pode ser um importante indutor de apoptose na forma Virchowiana aumentando a ativação de quinases e o clivamento da caspase 3 e a ativação dos domínios de morte nos processos crônicos e infecciosos da doença. Outros estudos retratam que esta citocina pode interferir na expansão de células de tecido conjuntivo, na fibrogênese, nas lesões dos nervos e na morte celular programada. (BROWN *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2005; QUARESMA *et al.*, 2012).

Entretanto, um ponto interessante em nosso estudo, ainda referente ao TGF- β , é que, assim como o TGF- β 1 se apresentou mais expresso na forma lepromatosa, o TGF- β 3 se expressou de forma mais significativa na forma TT, porém sua maior expressão não foi tão

exuberante. Unindo-se a menor expressão de TGF- β 1 e uma não tão maior expressão de TGF- β 3 na forma tuberculóide, isso poderia estar relacionado a baixas concentrações locais dessa citocina, logo, menor efeito inibitório, permitindo maior eliminação do bacilo característica da forma tuberculóide. E corrobora com a fibrose, que também é uma característica histopatológica que pode ser parcialmente produzida pelo TGF- β em pacientes com TT, já que essa citocina é um fator fibrogênico muito eficiente (KISZEWSKI *et al.*, 2003).

A interleucina (IL)-18, que compõe a família da IL-1, foi originalmente descrita como um fator que aumentava a produção de IFN- γ (IGIF - IFN- γ inducing factor) a partir de células Th1 estimuladas por anti-CD3, especialmente na presença de IL-12. Embora tanto a IL-12 como a IL-18 sejam fatores importantes para a produção de IFN- γ por células Th1, a IL-12 é basicamente um fator de diferenciação que induz o desenvolvimento de células Th1. Em contraste, a IL-18 se apresenta como uma citocina pró-inflamatória, que facilita a produção de IFN- γ por células Th1, particularmente em presença de IL-12. Além disso, a IL-18 sem IL-12, mas em presença de IL-2, estimula células NK, células NKT CD4+ e células Th1 estabelecidas a produzir IL-3, IL-9 e IL-13. Além disso, junto com a IL-3, a IL-18 estimula mastócitos e basófilos a produzir IL-4, IL-13 e mediadores químicos como a histamina. Portanto, a IL-18 representa uma citocina que estimula vários tipos celulares e tem funções pleiotrópicas (NAKANISHI *et al.*, 2001).

A presença gênica mais expressiva da IL-18, que tem essa função importante na resposta Th1, com produção de IFN- γ a partir de células T e células natural killer, em pacientes com a forma clínica VV, nos traz um dado interessante acerca da presença de outro gene, o gene de proteína de ligação à IL-18 (IL18BP), que teve uma expressão quase seis vezes maior nesta mesma forma clínica. A IL-18 possui atividade equilibrada pela presença de IL-18BP, que em humanos é codificada pelo gene IL18BP, que age como inibidora da citocina pró-inflamatória IL18, impedindo a ligação de IL18 ao seu receptor e, assim, inibindo a produção de IFN- γ induzida por IL-18 (DINARELLO *et al.*, 2013). Essa interação justificaria a incompetência pró-inflamatória na forma VV, uma vez que encontramos uma alta expressão de IL-18BP em nossas amostras. Sendo também necessário pontuar o papel dos inflamossomos na hanseníase Virchowiana, este é um é um complexo multiproteico intracelular que atua na ativação de enzimas da família cisteína-aspartato proteases (CASPASES), secreção de IL-1 β e IL-18 mediando a inflamação através dos PAMPs e DAMPs. A expressão dos inflamossomos aumentada no polo VV (SILVA *et al.*, 2018), justifica o aumento da IL-18 no mesmo polo e a presença da IL-18BP justifica a ineficácia da IL-18 nesse contexto e até estudos que não conseguiam identificar a IL-18 de forma expressiva na forma lepromatosa, talvez por uma

questão de método utilizado para identificação da mesma, haja vista que o NGS é muito mais fidedigno para identificação de genes e logo, de possíveis proteínas expressas.

Outro achado interessante em nosso estudo foi a expressão do gene do IL-18RA, que estava mais expresso na forma TT. Dessa forma, na presença da IL-18 e seu respectivo receptor teríamos uma resposta inflamatória compatível com a hanseníase tuberculóides (forma clínica TT). Até onde alcançam nossos conhecimentos, não há referências na literatura relacionando a expressão do IL-18RA associado a hanseníase (AREND *et al.*, 2008).

A expressão da interleucina 16 (IL-16) se mostrou aumentada nos pacientes multibacilares. Esta citocina é imunomoduladora e é produzida por células T CD4+, monócitos, macrófagos e células dendríticas. Sua expressão em células relacionadas ao sistema imunológico potencializa o efeito antimicrobiano. Não há na literatura, até o presente momento, estudos que relacionem a IL-16 e a doença de Hansen. Entretanto, o estudo de Huang *et al.* (2019) investigou a expressão da IL-16 e a polarização dos macrófagos, concluindo que a IL-16 modula a polarização dessas células pela regulação da expressão de IL-10, IL-1a e IL-6. O Mir-145, uma molécula curta de RNA que em humanos é codificada pelo gene MIR145, age para regular os níveis de expressão de outros genes por vários mecanismos e está envolvido na polarização de macrófagos M2, visando IL-16 e aumentando a expressão de IL-10. Os macrófagos M1 expressam níveis mais elevados de IL-16 do que os macrófagos M2, mas expressam níveis mais baixos de IL-10 e mir-145 do que as células M2. Nesse contexto, a presença do Mir-145 diminui a expressão de IL-16 e aumenta a expressão de IL-10, promovendo assim a polarização do macrófago M2.

Outro achado de interesse nesse estudo foi a maior expressão do gene da interleucina 7 (IL-7) e de seu receptor na forma TT. A regulação do gene IL-7 é complexa e pode variar entre os tipos de células. A avaliação da regulação da expressão do gene IL7 mostrou que o interferon γ (IFN γ) induz a regulação positiva da expressão do mRNA de IL-7, enquanto IL-1, TNF- α e TGF- β não tiveram influência nos níveis de produção de IL-7, em estudos com queratinócitos murinos. A via da IL-7 fornece sinais essenciais de sobrevivência e crescimento para vários tipos de células no sistema imunológico. Deficiências na via da IL-7 causam deficiências imunológicas, e o excesso de funções da via promove autoimunidade e leucemia (WINER *et al.*, 2022).

Um estudo investigou o papel da IL-7 na regulação das respostas imunes à infecção e hanseníase, fornecendo um modelo para compreender estas respostas imunológicas em humanos. Foi utilizada a qPCR para avaliar se a IL-7 era produzida no local da infecção na hanseníase. O mRNA da IL-7 foi mais fortemente expresso na forma tuberculóide da doença,

em comparação com a forma Virchowiana progressiva. A fonte celular de IL-7 incluiu monócitos estimulados por Ag e queratinócitos induzidos por IFN- γ . Esses dados sugeriram que a IL-7, produzida no local da doença, contribui para a resposta imune mediada por células a patógenos humanos, o que justifica, também, o achado de expressão gênica, neste estudo, do receptor da IL-7 aumentado nos pacientes tuberculóides em relação aos virchowianos (SIELING *et al.*, 1995).

Aqui, investigamos o papel da IL-15 na resposta imune e o gene foi mais expresso em pacientes tuberculóides imunologicamente resistentes, quando comparado com pacientes lepromatosos não-responsivos e suscetíveis. A interleucina 15 (IL-15) é uma citocina com potente atividade para estimular o crescimento de células T, no sistema imune inato induz uma via fagocítica antimicrobiana dependente de vitamina D (MONTROYA *et al.*, 2009). Como já demonstrado em outro estudo (JULLIEN, 1997), sua expressão é acentuada em pacientes paucibacilares. Ela possui semelhança estrutural com a IL-2. Tal como a IL-2, a IL-15 se liga através de um complexo composto por IL-2/IL-15 da cadeia beta do receptor (CD122) e a cadeia gama comum (gama-C, CD132), sendo secretada por fagócitos mononucleares (NISHIMURA *et al.*, 2000; STEEL *et al.*, 2011).

A IL-15 aumenta a resposta local das células T ao patógeno intracelular humano. Nos estudos de Silva (2021), foi observado maior expressão gênica de IL-15 diferencialmente em pacientes multibacilares (MB) que posteriormente desenvolveram T1R durante o acompanhamento clínico. Observou-se também nesse estudo, que o IFN- γ pode induzir um programa transcricional de autofagia mediada por TPR em células estimuladas por M. leprae semelhante ao observado em células da pele durante T1R, através de uma via que envolve a produção de IL-15, sugerindo o envolvimento dessa citocina na patogênese do T1R.

No presente estudo, observamos expressão dos receptores de IL-2 e os receptores IL-2RG (subunidade gama do receptor de interleucina 2) e IL-2RB (subunidade beta do receptor de interleucina 2) foram mais expressos na forma Virchowiana em relação à forma tuberculóide, e o IL-2RB2 (Receptor de interleucina 2 subunidades beta 2) foi encontrado com expressão aumentada nos pacientes com hanseníase tuberculóide. Logo, a IL-15, mais expressa em TT, pode se utilizar dos receptores IL-2RB encontrados mais expressos nos tuberculóides, e a IL-2, sabidamente mais expressa em VV, se beneficiariam da maior expressão de IL-2RG e IL-2RB.

Na hanseníase tuberculóides, a expressão do gene da interleucina 11 (IL-11) está aumentada em aproximadamente quatro vezes quando se compara com a hanseníase VV, o que suscitou a necessidade de mais estudos desta citocina e seu papel na hanseníase. Nenhum artigo na literatura parece associar a citocina e a doença. A IL-11 aparenta apresentar ação sinérgica

com a IL-6, G-CSF, IL-3 em relação às colônias de megacariócitos, sendo um importante regulador da megacariopoese (KOBAYASHI *et al.*, 1993).

Leng (1997) discorre sobre a IL-11, descrevendo-a como uma citocina do tipo IL-6, produzida por uma variedade de células estromais, incluindo fibroblastos, células epiteliais e osteoblastos. A IL-11 estimula múltiplos aspectos da hematopoiese e a produção, em hepatócitos, de proteínas de resposta de fase aguda. Também inibe a gênese de adipócitos, ativa osteoclastos, altera o fenótipo neural, estimula a fibrose tecidual e regula a função de condrócitos, sinoviócitos e células B. Em outras configurações, a IL-11 minimiza a lesão tecidual. Isso pode ser resultado de sua capacidade de proteger células-tronco clonogênicas, regular a proliferação de células epiteliais, inibir a apoptose e inibir a produção de citocinas de macrófagos. Na hanseníase, em especial no polo TT da doença, seu papel permanece incerto sendo necessário aprofundar-se nas investigações sobre a função desta citocina.

Os linfócitos Th17 produzem citocinas pró-inflamatórias, mais proeminentemente, a IL-17, que estão mais presentes na hanseníase tuberculóide, onde assumem a função de recrutamento de células inflamatórias, ativação de células endoteliais e a manutenção do processo inflamatório crônico e já foi associado ao desenvolvimento de reações reversas de hanseníase (AARÃO *et al.*, 2016).

O presente estudo evidenciou uma maior expressão de IL-17D e IL-17B e os receptores IL17REL (Interleucina 17 receptor E like), IL17RE (receptor de interleucina 17E), nos pacientes tuberculóides, quando comparada com amostras de pacientes virchowianos. As células Th17 medeiam sua função pró-inflamatória, recrutando neutrófilos, ativando macrófagos e aumentando as células efetoras Th1. Um aumento na expressão de IL-17 na forma tuberculóide, e essa elevação de citocinas contribui para o recrutamento de células inflamatórias, ativação de células endoteliais e manutenção do processo inflamatório crônico. Como já descrito em outros estudos, as citocinas relacionadas a Th17, quimiocinas, fatores de transcrição e células Th17 mostraram maior expressão em pacientes tuberculóides em comparação com pacientes da forma lepromatosa (AARÃO *et al.*, 2016; SAINI *et al.*, 2013). A secreção defeituosa de IL-17 parece ter influência na progressão da hanseníase e sua cronicidade, segmentar Th17 ou IL-17, pode representar uma futura abordagem útil para limitar esta doença incapacitante endêmica. Acredita-se que a resposta Th17 possa desempenhar papel crítico na modulação da atividade do macrófago, uma vez que o IL-17 pode induzir a produção de TNF-, IL-6 e iNOS, levando à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) que destroem o bacilo, motivo pelo qual esta citocina é mais encontrada no polo tuberculóides, que é

imunologicamente mais competente que o pólo virchowiano (AARÃO *et al.*, 2016; FROES *et al.*, 2022; SOUSA *et al.*, 2018)

A associação do Th17 com as reações hansênicas, trazem boas perspectivas para o controle da doença, uma vez que alguns relatos mostraram que os níveis de IL-17 se mostravam elevados no sangue de pacientes afetados por eritema nodoso. Além disso, os níveis do isômero IL-17F estariam também elevados no sangue de pacientes com reações tipo 1. Um estudo de caso, realizado na Universidade de Brasília, demonstrou que o Secuquinumabe, um anticorpo monoclonal totalmente humano que pertence ao grupo de medicamentos denominados inibidores da interleucina (IL), trouxe boa melhora clínica, neutralizando a atividade da IL-17A, que está presente em níveis elevados em doenças como a psoríase, artrite psoriásica e espondilite anquilosante. Este estudo sugere a redução na IL-17 concomitante com melhorias clínicas bastante evidentes na função neural dos pacientes e, conseqüentemente, na melhora das reações hansênicas, no que representa uma nova possibilidade terapêutica no controle dessas reações (ABDALLAH *et al.*, 2013; KURIZKY *et al.*, 2021; SAINI *et al.*, 2018), um outro estudo, este, controlado e randomizado, foi realizado em 2018, avaliando o uso de prednisona vs. um inibidor de interleucina 17, no manejo de reações hansênicas tipo 1, demonstrou melhora na função neural, motora e sensitiva, no grupo do Secukinumabe, porém não foram significativas, em relação ao grupo que utilizou a prednisona, tendo ambos os grupos, uma melhora significativa em sua qualidade de vida, sendo desta forma considerado uma segunda opção a pacientes sem resposta ou com contra-indicação a prednisona (MITRA, 2018).

Apesar dos IL-17REL e IL-17RE estarem significativamente aumentadas na forma TT, o IL-17-RA estavam mais expressos nos pacientes VV. Este resultado é intrigante, mas factível, já que as respostas estão presentes em ambas as formas. Porém, podem ser desencadeadas por receptores diferentes e assim, sua intensidade, possa ser diferente. Entretanto, mais estudos são necessários para compreender melhor as diferenças entre esses receptores.

Corroborando com os resultados relacionados à resposta Th17, a IL-21 foi marcadamente mais expressa nos pacientes paucibacilares em relação aos pacientes do polo mais suscetível. Esta citocina é uma promotora para células Th17, pertence à família de citocinas IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15, e aumenta a função das células Th17, além de inibir a geração de células Treg. A IL-21 já foi amplamente estudada em doenças infecciosas, doenças autoimunes e outras, porém, sua função ainda carece de maior investigação na patogênese da hanseníase. Um estudo recente avaliou a IL-21 na hanseníase, revelando que pode desempenhar função significativa na modulação do equilíbrio das células Th17-Treg, fornecendo assim uma

possível estratégia de tratamento mais focada para o manejo do *M. leprae* e sua reação (SAINI *et al.*, 2022).

Ainda relacionado a Th17, neste estudo a IL-23A (subunidade alfa da IL-23), que codifica uma subunidade da citocina heterodimérica interleucina 23 (IL23) e o IL-23R se apresentaram mais expressos em pacientes com a forma tuberculóide. A IL-23 é composta por essa proteína e pela subunidade p40 da interleucina 12 (IL12B), encontrada com expressão quase quatro vezes maior nos pacientes da forma tuberculóide, do que na forma Virchowiana. O receptor da IL23 é formado pela subunidade beta 1 da IL12 (IL12RB1) e uma subunidade específica da IL23, IL23R, que também foram expressos neste estudo, sendo o IL12RB1 duas vezes mais expresso nos pacientes virchowianos e o IL-23R cinco vezes mais expresso na forma tuberculóide (OPPMANN *et al.*, 2000).

A interleucina 23 (IL-23) pode estimular predominantemente as células T dérmicas $\gamma\delta$ a produzir interleucina 17 (IL-17), uma citocina que pode levar à proteção contra doenças. Estudos de Liu *et al.* (2022) demonstraram que as células T dérmicas $\gamma\delta$ responsivas à IL-23 eram o principal recurso de produção de IL-17A na pele, o que as tornaria um alvo potencial no tratamento da hanseníase. Nesse mesmo estudo, demonstraram que um subtipo adicional de células T, as células T TCR $\gamma\delta$, podem liberar IL-17 em resposta à citocina IL-23 na lesão cutânea de pacientes com hanseníase ((OPPMANN *et al.*, 2000; SHI *et al.*, 2022).

Considerando-se a identificação de IL23R como um novo gene de suscetibilidade, estabeleceu-se firmemente o envolvimento da imunidade inata na patogênese da hanseníase. O IL23R é parte das cascatas IL-12, IL-23 e IFN- γ , e tem papéis essenciais na imunidade a micobactérias (ZHANG *et al.*, 2011).

A interleucina-1 (IL-1) é uma citocina envolvida em uma ampla gama de processos fisiológicos, incluindo um papel central na regulação da inflamação aguda e crônica (GABAY; LAMACCHIA; PALMER, 2010). Os efeitos biológicos da IL-1 (IL-1 α e IL-1 β) são alcançados pela ligação da citocina ao receptor IL-1 tipo 1 ligado à membrana (IL1R1). Entre os resultados encontrados, a presença dos receptores de IL-1 (IL-1R1 e IL-1R2) foram mais expressos na forma tuberculóide (COLOTTA *et al.*, 1993; SIMS *et al.*, 1993; VASILYEV; VASILYEV; SILKOV; SENNIKOV, 2015).

A IL1R1 é uma glicoproteína com uma massa molecular de 80 kDa que é predominantemente expressa em células endoteliais, músculo liso células epiteliais, hepatócitos, fibroblastos, queratinócitos, células dendríticas epidérmicas e linfócitos T (DINARELLO *et al.*, 2001). A ligação de IL-1 ao domínio extracelular de IL1R1 promove o recrutamento da proteína acessória do receptor de IL-1, que leva à transdução de sinal mediada

pelo citoplasma domínios dos receptores IL1R1 e IL1R2 e é possível que a resposta funcional de uma população celular à IL-1 dependa do equilíbrio entre os níveis de IL1R1 e IL1R2 nas células (VASILYEV; SILKOV; SENNIKOV, 2015).

Os linfócitos Th25 são caracterizados pela expressão de IL-4, IL-13 e IL-25, sendo responsáveis por amplificar a resposta de células Th2 e de macrófagos M2. A IL-4 e a IL-13 inibem respostas antimicrobianas e ativam linfócitos B, enquanto a IL-25 inibe a produção de citocinas das respostas Th1 e Th17 (SOUSA *et al.*, 2018.)

A expressão de interleucina 13 (IL-13), assim como de seu receptor IL-13RA2, mostrou-se significativamente aumentada em pacientes tuberculóides, sendo a citocina IL-13 expressa quase dez vezes mais nesses pacientes, quando comparados ao polo VV. A IL-13 também é produzida por células Th0, Th1, Th2 e CD8+, e inibe a atividade quimiotática e fagocitária de monócitos/macrófagos, reduz a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12) e quimiocinas (MIP-1 e MCP) bem como, aumenta a produção de IL-1g. Desta forma, a IL-13 atua diminuindo a resposta inflamatória e por outro lado, induz a diferenciação de monócitos e de células B (MONTANER *et al.*, 1993). No estudo de de la Barrera (2004), foi observado que a IL-13 regula negativamente a geração de linfócitos T citotóxicos, efeito observado nos estágios iniciais da resposta, sugerindo que essa citocina afeta a produção de IFN γ pelas células NK. A neutralização de IL-13 em PBMC de pacientes com hanseníase multibacilar (MB) induz a produção da proteína IFN γ pelos linfócitos. Desta forma, um papel modulador na geração de CTL induzidos por hsp65 é demonstrado e esse efeito ocorre através da produção de IFN γ .

Células diferenciadas por GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos) iniciadas com *M. leprae* na presença de células apoptóticas induziram a secreção de citocinas Th2, IL-4 e IL-13 em células autólogas em comparação com culturas com *M. leprae* ou células apoptóticas apenas. Os dados obtidos sugeriram que em pacientes paucibacilares, a autofagia contribui para persistência micobacteriana pois induz uma população de macrófagos suscetíveis à infecção (FULCO *et al.*, 2014).

No contexto de que diversos genes podem desligar a resposta imunológica, poderíamos questionar o papel do gene IL-13 no desligamento da resposta imunológica em pacientes paucibacilares, que de alguma forma, contribuiria para a suscetibilidade à doença em relação a população sadia.

7 CONCLUSÃO

Os mecanismos imunes locais são cruciais para determinar o desfecho das diferentes formas clínicas em pacientes com hanseníase. Neste estudo foi utilizada a avaliação da expressão gênica usando sequenciamento de RNA que surge como uma poderosa ferramenta em genômica no campo da hanseníase, se constituindo em uma estratégia valiosa a fim de lançar luz sobre a funcionalidade e a interação das populações celulares, bem como, podem contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de controle da doença.

Neste estudo observamos como estas citocinas e seus receptores se interconectam, nas formas clínicas polares, resultando em um painel diverso de genes associados, com resultados que, em grande monta, corroboraram com a literatura prévia, além de demonstrarem citocinas ainda não implicadas anteriormente com a hanseníase, tais como a IL-11. Também observamos a expressão de citocina, como a IL-17, um importante mediador inflamatório, o que abre a possibilidade de terapêutica envolvendo tratamento de estados de hiper inflamação, como é o caso das reações hansênicas. Desta forma, tomados em conjunto, os resultados deste estudo podem ajudar no entendimento dos mecanismos subjacentes à resposta imune dos pacientes, assim como no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

ANEXOS**ANEXO A – PROTOCOLO DE PESQUISA**

Número de identificação: _____

1. Sexo: Masculino Feminino

2. Idade: _____

3. Residência: Rural Urbana

4. Ingresso ao serviço de dermatologia:

Espontaneamente Encaminhamento Médico Campanha Transferência

Não registrado

5. Tipo de Lesão apresentada na primeira consulta:

Hipocrômia Infiltração Nódulos Eritema Tubérculos

Dano neural

Outros: _____

6. Número de Lesões :

_____ Não foi registrado

7. Forma Clínica:

Indeterminada Tuberculóide Dimorfa Virchowiana DT DD DV

8. Locais do corpo acometido pelas lesões:

Cabeça Tronco Membros Especificamente _____

9. Baciloscopia: Positiva Negativa Não registrada Não realizada

10. Classificação Operacional: Paucibacilar Multibacilar

11. Histopatologia: _____

12. Desenvolveu reações: Sim Não

REFERÊNCIAS

- AARÃO, T. L. de S. *et al.* Nerve growth factor and pathogenesis of leprosy: review and update. **Frontiers in Immunology**, v. 9, article 939, maio 2018. DOI 10.3389/fimmu.2018.00939. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00939/full>. Acesso em: 16 abr. 2023.
- AARÃO, T. L. *et al.* Correlation between nerve growth factor and tissue expression of IL-17 in leprosy. **Microb Pathog.**, v. 90, p. 64-8, jan. 2016. DOI 10.1016/j.micpath.2015.11.019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0882401015301376>. Acesso em: 15 fev. 2022.
- ABDALLAH, M. *et al.* Estimation of serum level of interleukin-17 and interleukin-4 in leprosy, towards more understanding of leprosy immunopathogenesis. **Indian J Dermatol Venereol Leprol.**, v. 79, n. 6, p. 772-6, nov./dez. 2013. DOI 10.4103/0378-6323.120723. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24177608/>. Acesso em: 20 jan. 2022.
- ADAMS, L. B.; FUKUTOMI, Y.; KRAHENBUHL, J. L. Regulation of murine macrophage effector functions by lipoarabinomannan from mycobacterial strains with different degrees of virulence. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 4173-4181, 1993.
- AHERN, P. P. *et al.* The interleukin-23 axis in intestinal inflammation. **Immunol Rev**, v. 226, p. 147-159, 2008. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00705.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-065X.2008.00705.x>. Acesso em: 20 abr. 2023.
- AKDIS, C. A.; BLASER, K. Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression. **Immunology**, v. 103, n. 2, p. 131-6, jun. 2001. DOI 10.1046/j.1365-2567.2001.01235.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11412299/>. Acesso em: 20 jan. 2022.
- ALCAIS, A. *et al.* Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin-alpha allele as a major risk factor for early-onset leprosy. **Nat Genet**, v. 39, n. 4, p. 517-522, 2007. DOI 10.1038/ng2000. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ng2000>. Acesso em: 20 jan. 2022.
- ALTER, A. *et al.* Linkage disequilibrium pattern and age-at-diagnosis are critical for replicating genetic associations across ethnic groups in leprosy. **Hum Genet**, v. 132, n. 1, p. 107-116, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00439-012-1227-6>. Acesso em: 20 jan. 2022.
- ALVARADO-ARNEZ, L. E. *et al.* Association of IL10 polymorphisms and leprosy: a meta-analysis. **PLoS One**, v. 10, 9, 2015. DOI 10.1371/journal.pone.0136282. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0136282>. Acesso em: 20 jan. 2022.
- ANG, C. W.; JACOBS, B. C.; LAMAN, J. D. The Guillian-Barre syndrome: a true case of molecular mimicry. **Trends Immunol**, v. 25, n. 2, p. 61-66, fev. 2004. DOI 10.1016/j.it.2003.12.004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15102364/>. Acesso em: 30 jan. 2022.

ANNACKER, O. *et al.* Interleukin-10 in the regulation of T cell-induced colitis. **J. Autoimmun**, v. 20, p. 277-279, 2003. DOI 10.1016/s0896-8411(03)00045-3. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12791312/>. 10 nov. 2022.

ATTIA, E. A. *et al.* Serum Th17 cytokines in leprosy: correlation with circulating CD4(+) CD25 (high)FoxP3 (+) T-regs cells, as well as down regulatory cytokines. **Arch Dermatol Res.**, v. 306, n. 9, p. 793-801, nov. 2014. DOI: 10.1007/s00403-014-1486-2. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00403-014-1486-2>. Acesso em: 14 fev. 2023.

AREND, W. P.; PALMER, G.; GABAY, C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. **Immunol Rev.**, n. 223, p. 20-38, 2008. DOI 10.1111/j.1600-065x.2008.00624.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18613828/>. Acesso em: 3 maio 2022.

BETTELLI, E. *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, n. 441, p. 235–8, 2006. DOI 10.1038/nature04753. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature04753>. Acesso em: 17 mar. 2023.

BHAT, R. M.; PRAKASH, C. Leprosy: an overview of Pathophysiology of leprosy. **Interdiscip Perspect Infect Dis**, v. 2012, 2012. DOI 10.1155%2F2012%2F181089. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3440852/>. Acesso em: 17 mar. 2022.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico de Hanseníase**, https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2023/boletim_hanseniaese-2023_internet_completo.pdf. Acesso em: 1 abr. 2023.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico de Hanseníase**, n. especial, jan. 2022. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2022/boletim-epidemiologico-de-hanseniaese-_25-01-2022.pdf/view. Acesso em: 14 abr. 2023.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim epidemiológico hanseníase 2023. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2023/boletim_hanseniaese-2023_internet_completo.pdf. Acesso em: 4 abr. 2023.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia Prático Sobre Hanseníase**. Brasília, 2017. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/novembro/22/Guia-Pratico-deHanseniaese-WEB.pdf>. Acesso em: 13 maio 2021.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria SCTIE/MS nº 71, de 11/12/2018**. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sctie/2018/prt0071_12_12_2018.html. Acesso em: 18 abr. 2023.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis.

Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Hanseníase. Brasília: Ministério da Saúde, 2022. Disponível em: https://www.gov.br/aids/pt-br/centrais-de-conteudo/pcdts/2022/hansenia/pcdt-hans-2022_eletronica_isbn.pdf/view Acesso em: 10 mar. 2022.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim epidemiológico de hanseníase**, n. especial, jan. 2021. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2021/boletim_hansenia_internet_-2.pdf. Acesso em: 20 jan. 2022.

BRIGHTBILL, H. D. *et al.* Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. **Science**, v. 285, p. 732-736, 1999. DOI: 10.1126/science.285.5428.732. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10426995/>. Acesso em: 17 mar. 2022.

BROWN, T. L. *et al.* Transforming growth factor β induces caspase 3-independent cleavage of α -fodrin coincident with apoptosis. **J Biol Chem.**, v. 274, n. 33, p. 23256-62, ago. 1999. DOI 10.1074/jbc.274.33.23256 . Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10438500/>. Acesso em: 30 maio 2022.

CARDONA-CASTRO, N. *et al.* IL-10 gene promoter polymorphisms and leprosy in a Colombian population sample. **Biomed.**, v. 32, n. 1, p. 71-76, 2012. DOI 10.1590/s0120-41572012000100009 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23235789/>. Acesso em: 15 maio 2022.

CARDOSO, C. C. *et al.* Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. **Future Microbiol.**, v. 6, n. 5, p. 533-49, maio 2011. DOI 10.2217/fmb.11.39. Disponível em: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb.11.39>. Acesso em: 20 fev. 2022.

COLE, S. T. *et al.* Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, p. 1007-1011, 2001. DOI 10.1038/35059006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11234002/>. Acesso em: 17 mar. 2022.

COLLINS, M. P. The vasculitic neuropathies: an update. **Curr Opin Neurol**, v. 25, n. 5, p. 573-585, 2012. DOI 10.1097/wco.0b013e3283580432. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22918487/>. Acesso em: 20 fev. 2022.

COLOTTA, F. *et al.* Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that regulated by IL-4. **Science**, n. 261, p. 472-475, 1993. DOI 10.1126/science.8332913 Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.8332913>. Acesso em: 30 mar. 2022.

COSTA, M. B. In situ T regulatory cells and Th17 cytokines in paired samples of leprosy type 1 and type 2 reactions. **Plos One**, jun. 2018. DOI 10.1371/journal.pone.0196853. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0196853>. Acesso em: 20 fev. 2022.

DAVIES, L. C.; TAYLOR, P. R. Tissue-resident macrophages: then and now. **Immunology**, v. 144, p. 541-548, 2015. DOI 10.1111/imm.12451. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25684236/>. Acesso em: 20 jun. 2022.

DE LESELEUC, L. *et al.* PARK2 mediates interleukin 6 and monocyte chemoattractant protein 1 production by human macrophages. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 1, 2013. DOI 10.1371/journal.pntd.0002015. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002015>. Acesso em: 20 fev. 2022.

DE LA BARRERA, S. *et al.* NK cells modulate the cytotoxic activity generated by Mycobacterium leprae-hsp65 in leprosy patients: role of IL-18 and IL-13. **Clin Exp Immunol.**, v. 135, n. 1, p. 105-13, jan. 2004. DOI 10.1111/j.1365-2249.2004.02334.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2249.2004.02334.x>. acesso em: 3 abr. 2022.

DIAS, A. A. *et al.* DNA sensing via TLR-9 constitutes a major innate immunity pathway activated during erythema nodosum leprosum. **J Immunol.**, v. 197, p. 1905–13, 2016. DOI 10.4049/jimmunol.1600042. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27474073/>. Acesso em: 16 abr. 2023.

DINARELLO, C. A. *et al.* IL-1 receptor type I. *In: OPPENHEIM, J. J. et al. (ed.). Cytokine Reference: A Compendium of Cytokines and Other Mediators of Host Defense.* London: Academic Press, 2001, p. 1587-1600.

DINARELLO, C. A. *et al.* Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Front Immunol.* 2013 Oct 8;4:289. DOI 10.3389/fimmu.2013.00289. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24115947/>. Acesso em: 17 mar. 2022.

DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Annu Rev Immunol.**, v. 27, p. 519-550, 2009. DOI 10.1146/annurev.immunol.021908.132612. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19302047/>. Acesso em: 20 ago. 2022.

DING, V. A. *et al.* The role of IL-37 in non-cancerous diseases. **Pathol Oncol Res.**, v. 23, n. 3, p. 463-470, 2017. DOI 10.1007/s12253-016-0137-7. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12253-016-0137-7>. Acesso em: 30 mar. 2023.

EISENSTEIN, E. M.; WILLIAMS, C. B. The Treg/Th17 cell balance: a new paradigm for autoimmunity. **Pediatr Res**, n. 65(5 Pt 2), 26R–31R, 2009. DOI 10.1203/PDR.0b013e31819e76c7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19218879/>. Acesso em: 15 mar. 2023.

EL-IDRISSI, N. *et al.* M. leprae components induce nerve damage by complement activation: identification of lipoarabinomannan as the dominant complement activator. **Acta Neuropathol**, v. 129, 653-667, 2015. DOI 10.1007/s00401-015-1404-5. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00401-015-1404-5>. Acesso em: 17 mar. 2023.

FAHLÉN, L. *et al.* T cells that cannot respond to TGF- β escape control by CD4+CD25+ regulatory T cells. **J Exp Med.**, v. 201, p. 737-746, 2005. DOI 10.1084/jem.20040685. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15753207/>. Acesso em: 14 mar. 2023.

FAVA, V. M.; DALLMANN-SAUER, M.; SCHURR, E. Genética da hanseníase: hoje e além. **Hum Genet.**, v. 139, p. 835-846, 2020. DOI 10.1007/s00439-019-02087-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00439-019-02087-5>. Acesso em: 17 jan. 2023.

FONSECA, A. B. *et al.* The influence of innate and adaptative immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy. **Infect Dis Poverty**, v. 6, n. 5, 2017. DOI 10.1186/s40249-016-0229-3. Disponível em: <https://idpjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40249-016-0229-3>. Acesso em: 4 jan. 2023.

FOSS, N. T. Hanseníase: aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos. **Anais brasileiros de imunologia**, v. 74, n. 2, 1999.

FRANCESCHI, D. S. *et al.* Influence of TNF and IL10 gene polymorphisms in the immunopathogenesis of leprosy in the south of Brazil. **Int J Infect Dis.**, v. 13, n. 4, p. 493-8, jul. 2009. DOI 10.1016/j.ijid.2008.08.019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19058987/>. Acesso em: 23 fev. 2022.

FREITAS, A. A. *et al.* Alterations to antigen-specific immune responses before and after multidrug therapy of leprosy. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 83, n. 2, p. 154-61, out. 2015. DOI 10.1016/j.diagmicrobio.2015.06.021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26233487/>. Acesso em: 3 jan. 2023.

FROES JR, L. A. R.; TRINDADE, M. A. B.; SOTTO, M. N. Immunology of leprosy. **Int Rev Immunol.**, v. 41, n. 2, p. 72-83, 2022. DOI 10.1080/08830185.2020.1851370. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33241709/>. Acesso em: 17 mar. 2022.

FULCO, T. de O. *et al.* Effect of apoptotic cell recognition on macrophage polarization and mycobacterial persistence. **Infect Immun.**, v. 82, n. 9, p. 3968-78, set. 2014. DOI 10.1128/IAI.02194-14. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/IAI.02194-14>. Acesso em: 20 ago. 2022.

GABAY, C.; LAMACCHIA, C.; PALMER, G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. **Nat Rev Rheumatol.**, v. 6, n. 4, p. 232-241, abr. 2010. DOI 10.1038/nrrheum.2010.4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20177398/>. Acesso em: 17 mar. 2022.

GERSHON, R. K. *et al.* Suppressor T cells. **J Immunol.**, n. 108, p. 586-90, 1972. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4401006/>. Acesso em: 17 ago. 2022.

GLENN, T. D.; TALBOT, W. S. Signals regulating myelination in peripheral nerve and the Schwann cell response to injury. **Curr Opin Neurobiol**, v. 2, n. 6, 2013.

GOETHAS, S. *et al.* Toll-like receptor expression in the peripheral nerve. **Glia**, v. 58, n. 14, p. 1701-1709, 2010. DOI 10.1002/glia.21041. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20578041/>. Acesso em: 20 jun. 2022.

GOULART, I. M. B.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, 2002. DOI 10.1590/S0037-86822002000400014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/YpsJ3XmYgL7K5vjRhDw35bq/?lang=pt>. Acesso em: 20 jan. 2022.

GOULART, I. M.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 35, n. 4, p. 365–375, 2002. DOI 10.1590/ s0037-86822002000400014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/YpsJ3XmYgL7K5vjRhDw35bq/?lang=pt>. Acesso em: 15 jan. 2023.

GOULART, I. M.; MINEO, J. R.; FOSS, N. T. Production of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) by blood monocytes from patients with different clinical forms of leprosy. **Clin Exp Immunol.**, v. 122, n. 3, p. 330-334, dez. 2000. DOI 10.1046/j.1365-2249.2000.01376.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11122237/>. Acesso em: 10 maio 2022.

GREAVES, D. R.; GORDON, S. The macrophage scavenger receptor at 30 years of age - current knowledge and future challenges. **J Lipid Res.**, 2008. DOI 10.1194/jlr.r800066-jlr200. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19074372/>. Acesso em: 17 fev. 2022.

GURDON, J. B.; MELTON, D. A. Nuclear reprogramming in cells. **Science**, v. 322, p. 1811-1815, 2008. DOI 10.1126/science.1160810. Disponível em: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1160810>. Acesso em: 20 maio 2022.

HAN, X. Y. *et al.* A New *Mycobacterium* Species Causing Diffuse Lepromatous Leprosy. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 130, n. 6, p. 856-864, 2008. DOI 10.1309/ajcpp72fjzrrvmm. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19019760/>. Acesso em: 17 jun. 2022.

HAN, X. Y. *et al.* Comparative sequence analysis of *Mycobacterium leprae* and a new leprosy-causing *Mycobacterium lepromatosis*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 19, p. 6067-6074, 2009. DOI 10.1128%2FJJB.00762-09. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2747882/>. Acesso em: 20 fev. 2022.

HAN, Y. X.; ZHANG, J.; LI, L. Leprosy agents *Mycobacterium lepromatosis* and *Mycobacterium leprae* in Mexico: a clarification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 10, p. 3387-3388, 2015. DOI 10.1128%2FJCM.01588-15. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4572544/>. Acesso em: 20 jan. 2022.

HARBOE, M.; ASEFFA, A.; LEEKSSA, R. Challenges presented by nerve damage in leprosy. **Lepr Rev**, v. 76, p. 5-13, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15881032/>. Acesso em: 17 abr. 2022.

HUANG, Y. *et al.* IL-16 regulates macrophage polarization as a target gene of mir-145-3p. **Mol Immunol.**, v. 107, p. 1-9, mar. 2019. DOI 10.1016/j.molimm.2018.12.027.

HUANG, Z. *et al.* IL-37 expression is upregulated in patients with tuberculosis and induces macrophages towards an M2-like phenotype. **Scand J Immunol.**, v. 82, n. 4, p. 370-379, 2015. DOI 10.1111/sji.12326. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26073153/>. Acesso em: 18 dez. 2022.

HUNGER, R. E. *et al.* Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells. **J Clin Invest.**, n. 113, p. 701-8, 2004. DOI 10.1172/JCI200419655. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/19655>. Acesso em: 17 dez. 2022.

INTERNATIONAL LEPROSY ASSOCIATION. Report of the committee on classification. International Congress of leprosy, Madrid; 1953. **Int J Lepr.**, v. 21, p. 504-16, 1953. Disponível em: <http://ila.ilsl.br/pdfs/v22n4a08.pdf>. Acesso em: 17 mar. 2022.

JARDULI, L. R. *et al.* Role of HLA, KIR, MICA, and cytokines genes in leprosy. **Biomed Res Int.**, 98983, 2013. DOI 10.1155/2013/989837. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/989837/>. Acesso em: 24 nov. 2022.

JIA, L.; WU. C. The biology and functions of Th22 cells. **Adv Exp Med Biol.**, v. 841, p. 209–30, 2014. DOI 10.1007/978-94-017-9487-9_8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25261209/>. Acesso em: 30 nov. 2022.

JR. FROES, L. A. R.; SOTTO, M. N.; TRINDADE, M. A. B. Leprosy: clinical and immunopathological characteristics. **An Bras Dermatol.**, v. 97, n. 3, p. 338-347, mar./jun. 2022. DOI 10.1016/j.abd.2021.08.006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35379512/>. Acesso em: 3 dez. 2022.

JR. FROES, L. A. R.; TRINDADE, M. A. B.; SOTTO, M. N. Immunology of leprosy. **Int Rev Immunol.**, v. 41, n. 2, p. 72-83, 2022. DOI 10.1080/08830185.2020.1851370. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33241709/>. Acesso em: 17 mar. 2023.

JULLIEN, D. *et al.* IL-15, an immunomodulator of T cell responses in intracellular infection. **J Immunol.**, v. 158, n. 2, p. 800-6, 15 jan. 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8992997/>. Acesso em: 17 mar. 2022.

KA, M. B. *et al.* Phenotypic diversity and emerging new tools to study macrophage activation in bacterial infectious diseases. **Front Immunol.**, n. 5, p. 500, 10 out. 2014. DOI 10.3389/fimmu.2014.00500. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2014.00500/full>. Acesso em: 17 dez. 2022.

KAHAWITA, I. P.; WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy type 1 reactions and erythema nodosum leprosum. **An Bras Dermatol.**, v. 83, p. 75-82, 2008. DOI 10.1590/S0365-05962008000100010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abd/a/tJSX8sqzrpKz9WDdXXHphr/?lang=en>. Acesso em: 17 mar. 2022.

KANG, T. J.; CHAE, G. T. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, v. 31, n. 1, p. 53-58, 2001.

DOI 10.1111/j.1574-695X.2001.tb01586.x. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11476982/>. Acesso em: 16 dez. 2022.

KANG, T. J.; CHAE, G. T. The role of intracellular receptor NODs for cytokine production by macrophages infected with *Mycobacterium leprae*. **Immune Netw**, v. 11, p. 424-7, 2011. DOI 10.4110/in.2011.11.6.424. Disponível em:
<https://immunenetw.org/DOIx.php?id=10.4110/in.2011.11.6.424>. Acesso em: 20 dez. 2022.

KERR, L. *et al.* Human-armadillo interaction in Ceará, Brazil: potential for transmission of *Mycobacterium leprae*. **Act Trop.**, v. 152, p. 74-79, dec 2015. DOI 10.1016/j.actatropica.2015.07.023. Disponível em:
<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/20495>. Acesso em: 17 abr. 2022.

KIBBIE, J. *et al.* Jagged1 instructs macrophage differentiation in leprosy. **PLoS Pathog**, aug. 2016. DOI 10.1371/journal.ppat.1005808. Disponível em:
<https://journals.plos.org/plospathogens/article/file?id=10.1371/journal.ppat.1005808&type=printable>. Acesso em: 10 jun. 2022.

KIM, E. W. *et al.* Vitamin D status contributes to the antimicrobial activity of macrophages against *Mycobacterium leprae*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12, n. 7, 2018. DOI 10.1371/journal.pntd.0006608. Disponível em:
<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0006608>. Acesso em: 20 jun. 2022.

KINGSLEY, D. M. The TGF- β superfamily: new members, new receptors and new genetic tests of function in different organisms. **Genes Dev.**, v. 8, n. 2, p. 133-46, jan. 1994. DOI 10.1101/gad.8.2.133 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8299934/>. Acesso em: 30 jan. 2022.

KISZEWSKI, C. A. *et al.* Expression of Transforming Growth Factor- β Isoforms and Their Receptors in Lepromatous and Tuberculoid Leprosy. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 57, p. 279-285, 2003. DOI 10.1046/j.1365-3083.2003.01210.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-3083.2003.01210.x>. acesso em: 17 mar. 2022.

KOBAYASHI, S. *et al.* Interleukin-11 acts as an auto-crine growth factor for human megakaryoblastic cell lines. **Blood.**, v. 81, p. 889-893, 1993. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8427997/>. Acesso em: 18 abr. 2022.

KOSKI, C. L. Characterization of complement fixing antibodies to peripheral nerve myelin in Guillian Barre syndrome. **Ann Neurol**, v. 27 (Suppl), p. 544-547, 1990. DOI 10.1002/ana.410270712. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2194426/>. Acesso em: 16 jan. 2022.

KOSKI, C. L. Mechanism of Schwann cell damage in inflammatory neuropathy. **J Infect Dis**, v. 176 (Suppl), p. S169-S172, 1997. DOI 10.1086/513795. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9396705/>. Acesso em: 18 jan. 2022.

KURIZKY, P. S. *et al.* Dramatic secukinumab-mediated improvements in refractory leprosy-related neuritis via the modulation of T helper 1 (Th1) and T helper 17 (Th17) immune pathways. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n. 54, 2021. DOI 10.1590/0037-8682-0336-2021. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/PwmPvgV7YY6m7FBrpmBrrZj/?lang=en>. Acesso em: 20 jan. 2022.

LAHIRI, A. *et al.* Human LACC1 increases innate receptor-induced responses and a LACC1 disease-risk variant modulates these outcomes. **Nature Commun**, v. 8, p. 15614, 2017. DOI 10.1038/ncomms15614. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ncomms15614>.

Acesso em: 2 maio 2022.

LAHIRI, R. *et al.* Activation of complement by Mycobacterium leprae requires disruption of the bacilli. **Lepr Rev.**, v. 79, p. 311-4, 2008.

LASTÓRIA, J. C.; ABREU, M. A. M. M. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects-part 1. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 89, n. 2, p. 205-218, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20142450>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abd/a/QW7n3sM8js6p4pVR7Dssfdh/>. Acesso em: 17 abr. 2022.

LAPORTE, S. L. *et al.* Molecular and structural basis of cytokine receptor pleiotropy in the interleukin-4/13 system. **Cell**, v. 132, p. 259-272, 2008. DOI 10.1016/j.cell.2007.12.030. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18243101/>. Acesso em: 20 ago. 2022.

LETTERIO, J. J.; ROBERTS, A. B. Regulation of immune responses by TGF-beta. **Annu Rev Immunol.**, v. 16, p. 137-61, 1998. DOI 10.1146/annurev.immunol.16.1.137. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9597127/>. Acesso em: 12 jan. 2023.

LENG, S. X.; ELIAS, J. A. Interleukin-11. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997 Aug-Sep;29(8-9):1059-62. DOI 10.1016/s1357-2725(97)00017-4. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272597000174>. Acesso em: 17 mar. 2022.

LIRA, M. L. *et al.* Dermal dendrocytes FXIIIa+ are essential antigen-presenting cells in indeterminate leprosy. **Am J Dermatopathol.**, v. 37, p. 269-273, 2015. DOI 10.1097/DAD.0000000000000238. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25365500/>. Acesso em: 10 jan. 2023.

LITTMAN, D. R.; RUDENSKY, A. Y. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. **Cell**, v. 140, p. 845-58, 2010. DOI 10.1016/j.cell.2010.02.021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20303875/>. Acesso em: 20 nov. 2022.

LIU, H. *et al.* Discovery of six new susceptibility loci and analysis of pleiotropic effects in leprosy. **Nat Genet.**, v. 47, p. 267-71, 2015. DOI 10.1038/ng.3212. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ng.3212>. Acesso em: 20 dez. 2022.

LIU, H. *et al.* Genome-wide analysis of protein-coding variants in leprosy. **J Invest Dermatol**, 2017. DOI 10.1016/j.jid.2017.08.004. Disponível em: [https://www.jidonline.org/article/S0022-202X\(17\)32793-8/fulltext](https://www.jidonline.org/article/S0022-202X(17)32793-8/fulltext). Acesso em: 10 maio 2022.

LIU, Y. *et al.* The protective role of tissue-resident interleukin 17A-producing gamma delta T cells in *Mycobacterium leprae* infection. **Front Immunol.**, v. 13, 961405, 26 out. 2022. DOI 10.3389/fimmu.2022.961405. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36389696/>. Acesso em: 10 jan. 2023.

LIU, H. *et al.* MicroRNA-21 targets the vitamin D-dependent antimicrobial pathway in leprosy. **Nat Med.**, v. 18, p. 267-73, 2012. DOI 10.1038/nm.2584. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nm.2584>. Acesso em: 3 jan. 2023.

MADIGAN, C. A. *et al.* A macrophage response to *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid initiates nerve damage in leprosy. **Cell**, n. 170, p. 973-85, 2017. DOI 10.1016/j.cell.2017.07.030. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28841420/>. Acesso em: 17 dez. 2022.

MANCA, C. *et al.* Modulation of the cytokine response in human monocytes by mycobacterium leprae phenolic glycolipid-1. **J Interferon Cytokine Res.**, v. 32, n. 1, p. 27-33, jan. 2012. DOI 10.1089/jir.2011.0044. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/jir.2011.0044>. Acesso em: 17 jan. 2023.

MARQUES, C. S. *et al.* Toll-like Receptor 1 N248S Single-Nucleotide Polymorphism Is Associated With Leprosy Risk and Regulates Immune Activation During Mycobacterial Infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 208, n. 1, p. 120-129, 2013. DOI 10.1093/infdis/jit133. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23547143/>. Acesso em: 20 maio 2022.

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

MASAKI, T. *et al.* Reprogramming adult Schwann cell to stem-like cells by Leprosy Bacilli promotes dissemination of infection. **Cell**, v. 152, n.1-2, p. 51-67, jan. 2013. DOI 10.1016/j.cell.2012.12.014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4314110/>. Acesso em: 13 jan. 2022.

MATTOS, K. A. *et al.* Lipid droplet formation in leprosy: toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. **J Leukoc Biol.**, n. 87, p. 371-84, 2010. DOI 10.1189/jlb.0609433. Disponível em: <https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1189/jlb.0609433>. Acesso em: 17 mar. 2023.

MATTOS, K. A. *et al.* TLR6-driven lipid droplets in *Mycobacterium leprae*-infected Schwann cells: immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence. **J Immunol.**, n. 187, p. 2548-58, 2011. DOI 10.4049/jimmunol.1101344. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21813774/>. Acesso em: 18 jan. 2023.

MEGE, J. L. *et al.* The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. **Lancet Infect Dis.**, v. 6, n. 9, p. 557-569, 2006. DOI 10.1016/s1473-3099(06)70577-1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16931407/>. Acesso em: 17 maio 2022.

- MENDONÇA, V. A. *et al.* Imunologia da Hanseníase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, n. 4, p. 343-350, 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abd/a/tLJZgCGdYrsP5kwZQqKVP9s/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 14 fev. 2022.
- MEREDITH, A. *et al.* Leprosy in red squirrels in Scotland. **Veterinary Record**, v. 175, n. 11, p. 285-286, sep. 2014. DOI: 10.1136/vr.g5680. Disponível em: <https://bvajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1136/vr.g5680>. Acesso em: 14 fev. 2022.
- MI, M.; LIU, H.; ZHANG, F. Advances in the Immunology and Genetics of Leprosy. **Front. Immunol.**, v. 11, p. 567, 2020. DOI 10.3389/fimmu.2020.00567. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00567/full>. Acesso em: 17 jul. 2022.
- MINSHAWI, F. *et al.* The Generation of an Engineered Interleukin-10 Protein with Improved Stability and Biological Function. **Front Immunol.**, n. 11, p. 1-18, 2020. DOI 10.3389/fimmu.2020.01794. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32849644/>. Acesso em: 16 maio 2022.
- MIRANDA, A. *et al.* Increased langerhans cell accumulation after mycobacterial stimuli. **Histopathology**, v. 51, p. 649-656, 2007. DOI 10.1111%2Fj.1365-2559.2007.02848.x. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2121149/>. Acesso em: 17 abr. 2022.
- MISCH, E. A. *et al.* Leprosy and the human genome. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v. 74, n. 4, p. 589-620, 2010. DOI 10.1128/MMBR.00025-10. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/MMBR.00025-10>. Acesso em: 17 mar. 2023.
- MITRA, D. K. *et al.* Induction of lepromin reactivity in cured lepromatous leprosy patients: impaired chemokine response dissociates protective immunity from delayed type hypersensitivity. **Microbes Infect.**, v. 11, n. 14-15, p. 1122-30, 2009. DOI 10.1016/j.micinf.2009.08.006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1286457909001841>. Acesso em: 19 dez. 2022.
- MITRA D. A Randomized Controlled Trial of Prednisolone vs. Interleukin 17 A Inhibitor Secukinumab in the Management of Type 1 Lepra Reaction in Leprosy Patients. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 5, n. 1, S290, nov. 2018. DOI 10.1093%2Fofid%2Fofy210.818. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6254982/>. Acesso em: 20 ago. 2022.
- MIZOGUCHI, A.; BHAN, A. K. A case for regulatory B cells. **J Immunol.**, v. 176, p. 705-10, 2006. DOI 10.4049/jimmunol.176.2.705. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16393950/>. Acesso em: 15 dez. 2022.
- MODLIN, R. L. The innate immune response in leprosy. **Curr Opin Immunol.** , v. 22, n. 1, p. 48-54, 2010. DOI 10.1016/j.coi.2009.12.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20060279/>. Acesso em: 17 mar. 2023.

MONOT, M. *et al.* On the origin of leprosy. **Science**, v. 308, n. 5724, p.1040-1042, mai. 2005. DOI 10.1126/science/1109759. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15894530/>. Acesso em: 18 maio 2022.

MONTOYA, D.; MODLIN, R. L. Learning from leprosy: insight into the human innate immune response. **Adv Immunol**, v. 105, p.1–24, 2010. DOI 10.1016/s0065-2776(10)05001-7. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0065277610050017?via%3Dihub>. Acesso em: 16 jun. 2022.

MONTOYA, D. *et al.* Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. **Cell Host Microbe.**, v. 6, n. 4, p. 343-53, 22 out. 2009. DOI 10.1016/j.chom.2009.09.002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19837374/>. Acesso em: 17 abr. 2022.

MONTANER, L. J. Interleukin 13 inhibits human immunodeficiency virus type 1 production in primary blood-derived human macrophages in vitro. **J Exp Med.**, n. 178, p. 743-747, 1993. DOI 10.1084/jem.178.2.743. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8101865/>. Acesso em: 17 mar. 2022.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol.**, v. 8, n. 12, p. 958-69, dez. 2008. DOI 10.1038/nri2448. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri2448>. Acesso em: 17 mar. 2023.

MOSSER, D. M.; ZHANG, X. I. Interleukin-10: New perspectives of an old cytokine. **Immunol Rev.**, v. 19, n. 3, p. 205-18, 2013. DOI 10.1111/j.1600-065x.2008.00706.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19161426/>. Acesso em: 17 fev. 2022.

MURPHY, G. F. *et al.* Erythema nodosum leprosum: nature and extent of the cutaneous microvascular alterations. **J Am Acad Dermatol.**, n. 14, p. 59-69, 1986. DOI 10.1016/S0190-9622(86)70008-X. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S019096228670008X>. Acesso em: 18 mar. 2023.

NAKANISHI, K. *et al.* Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 19, p. 423-474, 2001. DOI 10.1146/annurev.immunol.19.1.423 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11244043/>. Acesso em: 2 mar. 2022.

NARANBHAI, V. *et al.* Genomic modulators of gene expression in human neutrophils. **Nat Commun.**, n. 6, p. 7545, 7 jul. 2015. DOI 10.1038/ncomms8545. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26151758/>. Acesso em: 17 mar. 2023.

NEGERA, E. *et al.* Clinico-pathological features of erythema nodosum leprosum: a case-control study at ALERT Hospital, Ethiopia. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 10, 2017. DOI 10.1371/journal.pntd.0006011. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0006011>. Acesso em: 20 jan. 2022.

NERY, J. S. *et al.* Socioeconomic determinants of leprosy new case detection in the 100 million Brazilian cohort: a population-based linkage study. **Lancet Glob Health**, v. 7, n. 9,

2019. DOI 10.1016/S2214-109X(19)30260-8. Disponível em:
[https://www.thelancet.com/journals/langlo/article/PIIS2214-109X\(19\)30260-8/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/langlo/article/PIIS2214-109X(19)30260-8/fulltext).
Acesso em: 20 jan. 2022.

NISHIMURA, H. *et al.* Differential roles of interleukin 15 mRNA isoforms generated by alternative splicing in immune responses in vivo. **J Exp Med.**, v. 191, n. 1, p. 157-70, 3 jan. 2000. DOI 10.1084/jem.191.1.157. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10620614/>. Acesso em: 20 set. 2022.

NOWAK, E. C. *et al.* IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. **J Exp Med.**, n. 206, p. 1653-60, 2009. DOI 10.1084/jem.20090246. Disponível em:
<https://rupress.org/jem/article/206/8/1653/40368/IL-9-as-a-mediator-of-Th17-driven-inflammatory>. Acesso em: 20 dez. 2022.

NUNES, I. J. G. **Gene Expression Variation Analysis (GEVA): um novo pacote do R para avaliar variações de expressão diferencial em múltiplas comparações.** 2020. 130 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2020.

OLIVEIRA, R. B. *et al.* Cytokines and *Mycobacterium leprae* induce apoptosis in human Schwann. **J Neuropathol Exp Neurol.**, v. 64, n. 10, p. 882-90, out. 2005. DOI 10.1097/01.jnen.0000182982.09978.66. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16215460/>. Acesso em: 4 abr. 2022.

OLIVEIRA, R. B. *et al.* Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy. **Infect Immun.**, n. 71, p. 1427-33, 2003. DOI: 10.1128/IAI.71.3.1427-1433.2003. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12595460/>. Acesso em: 16 fev. 2023.

OLIVEIRA, R. B. *et al.* Neutrophils isolated from leprosy patients release TNF-alpha and exhibit accelerated apoptosis in vitro. **J Leukoc Biol.**, n. 65, p. 364-71, 1999. DOI: 10.1002/jlb.65.3.364. Disponível em: <https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jlb.65.3.364>. Acesso em: 17 nov. 2022.

OMS (Organização Mundial da Saúde). **Rumo à zero hanseníase – Estratégia Global de Hanseníase 2021-2030.** Publicado em 2021. Disponível em:
<http://telessaude.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2022/04/1.-Hanseníase-2021-2030.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2022.

OMS (Organização Mundial de Saúde). **Diretrizes para o diagnóstico, tratamento e prevenção da hanseníase.** 2019. Disponível em:
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274127/9789290227076-por.pdf?sequence=47&isAllowed=y>. Acesso em: 2 fev. 2022.

OMS (Organização Mundial de Saúde); OPAS (Organização Pan-Americana de Saúde). **Manual para o controle da lepra.** Washington, 1989.

OPPAMAN, B. *et al.* Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. **Immunity.**; v.13, n. 5, p. 715-725, 2000. DOI:10.1016/s1074-7613(00)00070-4. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11114383/>. Acesso em: 20 jan. 2023.

ORGANIZAÇÃO MUNICIPAL DA SAÚDE. **Diretrizes para o diagnóstico, tratamento e prevenção da hanseníase**. 2019. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274127/9789290227076-por.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2022.

PANDHI, D.; CHHABRA, N. New insights in the pathogenesis of type 1 and type 2 lepra reaction. **Indian J Dermatol Venereol Leprol.**, v. 79, n. 6, p. 739-49, nov./dez. 2013. DOI 10.4103/0378-6323.120719. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24177605/>. Acesso em: 18 mar. 2023.

PARENTE, J. N. *et al.* T regulatory cells. (TREG)(TCD4+CD25+FOXP3+) distribution in the different clinical forms of leprosy and reactional states. **An Bras Dermatol.**, n. 90, p. 41-7, 2015. DOI 10.1590/abd1806-4841.20153311. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abd/a/G5Sf4pRN6fQsnC7D5FwxDBd/?lang=en>. Acesso em: 20 jan. 2023.

PATNAIK, N. *et al.* Evaluation of apoptosis in skin biopsies of patients of borderline leprosy and lepra reversal reaction. **Indian J Dermatol.**, n. 60, p. 60-5, 2015. DOI 10.4103%2F0019-5154.147795. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4318065/>. Acesso em: 20 nov. 2022.

PELTONEN, S.; ALANNE, M.; PELTONEN, T. Barriers of the peripheral nerve. **Tissue Barriers**, v. 1, n. 3, p. e24956, 2013. DOI: 10.4161%2Ftisb.24956. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3867511/>. Acesso em: 10 mar. 2022.

PESTKA, S. *et al.* Interleukin-10 and related cytokines and receptors. **Annual Rev Immunol.**, v. 22, p. 929-979, 2004. DOI 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104622. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15032600/>. Acesso em: 15 ago. 2022.

PINHEIRO, R. O. *et al.* Innate immune responses in leprosy. **Front Immunol**, v. 9, n. 518, mar. 2018. DOI 10.3389/fimmu.2018.00518. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5882777/pdf/fimmu-09-00518.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2022.

POLYCARPOU, A. *et al.* Mycobacterium leprae activates toll-like receptor-4 signaling and expression on macrophages depending on previous bacillus calmetteguerin vaccination. **Front Cell Infect Microbiol.**, n. 6, p. 72, 2016. DOI 10.3389/ fcimb.2016.00072. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2016.00072/full>. Acesso em: 17 dez. 2022.

PONTILLO, A. *et al.* NLRP1 haplotypes associated with leprosy in Brazilian patients. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 19, p. 274-279, 2013. DOI 10.1016/j.meegid.2013.06.006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1567134813002311>. Acesso em: 10 jun. 2022.

QUARESMA, J. A. S. *et al.* Transforming growth factor β and apoptosis in leprosy skin lesions: possible relationship with the control of the tissue immune response in the *Mycobacterium leprae* infection. **Microbes Infect.**, v. 14, n. 9, p. 696-701, ago. 2012.

DOI 10.1016/j.micinf.2012.02.010. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22429842/>. Acesso em: 17 mar. 2022.

QUARESMA, J. A. *et al.* Immunohistochemical evaluation of macrophage activity and its relationship with apoptotic cell death in the polar forms of leprosy. **Microb Pathog.**, v. 49, n. 4, p. 135-40, out. 2010. DOI 10.1016/j.micpath.2010.05.003. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20510345/>. Acesso em: 17 mar. 2022.

QUARESMA, J. A. *et al.* T-helper 17 cytokines expression in leprosy skin lesions. **Br J Dermatol.**, v. 173, n. 2, p. 565-567, 2015. DOI 10.1111/bjd.13608. Disponível em:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/bjd.13608>. Acesso em: 10 jan. 2023.

QUILTER, E. E. V. *et al.* Patients with skin smear positive leprosy in Bangladesh are the main risk factor for leprosy development: 21-year follow-up in the household contact study (COCOA). **PLOS Negl Trop Dis**, v. 14, n. 10, out. 2020. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7598483/pdf/pntd.0008687.pdf>. Acesso em: 16 fev. 2022.

RABELLO JÚNIOR, F. E. Uma classificação clínico-epidemiológica das formas de lepra. **Rev Bras Leprol**, p. 375-410, 1936. Disponível em:
<http://hansen.bvs.ilsl.br/textoc/revistas/Edicao%20Especial/1936/PDF/Ed.esp.a35.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2022.

REES, R. J. W.; YOUNG, D. B. The microbiology of leprosy. *In*: HASTINGS, R. C. (ed.). **Leprosy**. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone, 1994, p. 49-83.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A fivegroup system. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 34, p. 255-273, 1966. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5950347/>. Acesso em: 4 abr. 2022.

RILEY, J. K. *et al.* Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. **J Biologi Chemist.**, v. 274, n. 23, p. 16513-16521, 1999. DOI 10.1074/jbc.274.23.16513. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10347215/>. Acesso em: 17 maio 2022.

SADHU, S. *et al.* Reciprocity between regulatory T cells and Th17 cells: relevance to polarized immunity in leprosy. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 10, n. 1, e0004338, 2016. DOI 10.1371/journal.pntd.0004338. Disponível em:
<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004338>. Acesso em: 17 mar. 2023.

SADHU, S.; MITRA, D. K. Emerging concepts of adaptive immunity in leprosy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 604, abr. 2018. DOI 10.3389/fimmu.2018.00604. Disponível em:
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00604/full>. Acesso em: 21 jan. 2022.

SAINI, C. *et al.* A distinct double positive IL-17A(+)/IFN- γ (+) T helper 17 cells induced inflammation leads to IL17 producing neutrophils in type 1 reaction of leprosy patients. **Cytokine**, n. 126, p. 154873, 2020. DOI 10.1016/j.cyto.2019.154873. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31629113/>. Acesso em: 16 jan. 2023.

SAINI, C. *et al.* $\gamma\delta$ T cells are associated with inflammation and immunopathogenesis of leprosy reactions. **Immunol Lett.**, n. 200, p. 55-65, ago. 2018. DOI 10.1016/j.imlet.2018.07.005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30006101/>. Acesso em: 6 abr. 2022.

SAINI, C.; RAMESH, V.; NATH, I. CD4+ Th17 cells discriminate clinical types and constitute a third subset of non Th1, Non Th2 T cells in human leprosy. **PLoS Negl Trop Dis.**, n. 7, n. 7, e2338, 25 jul. 2013. DOI 10.1371/journal.pntd.0002338. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23936569/>. Acesso em: 17 mar. 2022.

SAINI, C. *et al.* Leprosy reactions show increased Th17 cell activity and reduced FOXP3+ tregs with concomitant decrease in TGF-beta and increase in IL-6. **PLoS Negl Trop Dis.**, n. 10, e0004592, 2016. DOI 10.1371/journal.pntd.0004592. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004592>. Acesso em: 30 dez. 2022.

SAINI, C. *et al.* IL-21 plays an important role in modulating "Th17-Treg" cell axis in leprosy Type 1 reactions. **Cytokine.**, n. 152, 155821, abr. 2021. DOI 10.1016/j.cyto.2022.155821. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1043466622000308>. Acesso em: 17 fev. 2022.

SAKAGUCHI S. Regulatory T cells: history and perspective. **Methods Mol Biol.**, n. 707, p. 3-17, 2011. DOI 10.1007/978-1-61737-979-6_1. Disponível em: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-61737-979-6_1. Acesso em: 4 jan. 2023.

SAKAGUCHI, S. *et al.* Immunologic selftolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **J Immunol.**, v. 155, p. 1151-64, 1995.

SAMPAIO, E. P. *et al.* Pentoxifylline decreases in vivo and in vitro tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production in lepromatous leprosy patients with erythema nodosum leprosum (ENL). **Clin Exp Immunol.**, n. 111, p. 300-8, 1998. DOI 10.1046/j.1365-2249.1998.00510.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9486396/>. Acesso em: 18 jan. 2023.

SARITA, S. *et al.* A Study on Histological Features of Lepra Reactions in Patients Attending the Dermatology Department of the Government Medical College, Calicut, Kerala, India. **Lepr Rev.**, v. 84, p. 51-64, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23741882/>. Acesso em: 6 maio 2022.

SCHENK M. *et al.* Human NOD2 recognizes structurally unique muramyl dipeptides from Mycobacterium leprae. **Infect Immun.**, v. 84, n. 9, p. 2429-38, 2016. DOI 10.1128/IAI.00334-16. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/IAI.00334-16>. Acesso em: 17 mar. 2023.

SCHENK M. *et al.* NOD2 triggers an interleukin-32-dependent human dendritic cell program in leprosy. **Nat Med.**, v. 18, p. 555-63, 2012. DOI 10.1038/nm.2650. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nm.2650>. Acesso em: 17 mar. 2023.

SCHLESINGER, L. S.; HORWITZ, M. A. Phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* binds complement component C3 in serum and mediates phagocytosis by human monocytes. **J Exp Med.**, v. 174, n. 5, p. 1031-8, 1 nov. 2019. DOI 10.1084/jem.174.5.1031. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1940785/>. Acesso em: 17 jan. 2023.

SCHMITT, E.; KLEIN, M.; BOPP, T. Th9 cells, new players in adaptive immunity. **Trends Immunol.**, n. 35, p. 61-68, 2014. DOI 10.1016/j.it.2013.10.004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24215739/>. Acesso em: 17 jan. 2023.

SCHMITZ, V. *et al.* Neutrophils in Leprosy. **Front Immunol**, v. 10, n. 495, mar. 2019. DOI 10.3389/fimmu.2019.00495. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00495/full>. Acesso em: 3 mar. 2022.

SCOLLARD, D. M. *et al.* The continuing challenges of leprosy. **Clin Microbiol Rev.**, v. 19, p. 338-381, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1128/cmr.19.2.338-381.2006>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16614253/>. Acesso em: 17 mar. 2022.

SHARMA, P. K. *et al.* FoxP3+ regulatory T cells suppress effector T-cell function at pathologic site in miliary tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 179, n. 11, p. 1061-1070, 2009. DOI: 10.1164/ rccm.200804-529OC. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19246720/>. Acesso em: 20 fev. 2023.

SHI, C. *et al.* Elevated IL-23 in skin promotes IL-23 derived Th17 responses in leprosy patients. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v. 49, n. 9, p. 1002-1009, set. 2022. DOI 10.1111/1440-1681.13689. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1440-1681.13689>. Acesso em: 30 jan. 2022.

SIELING, P. A. *et al.* IL-7 in the cell-mediated immune response to a human pathogen. **J Immunol.**, v. 154, n. 6, p. 2775-83, 15 mar. 1995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7876548/>. Acesso em: 17 mar. 2022.

SHEVACH, E. M. *et al.* The lifestyle of naturally occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. **Immunol Rev.**, v. 212, p. 60-73, ago. 2006. DOI 10.1111/j.0105-2896.2006.00415.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.0105-2896.2006.00415.x>. Acesso em: 15 jan. 2023.

SHIMODA, K. *et al.* Partial impairment of interleukin-12 (IL-12) and IL-18 signaling in Tyk2-deficient mice. **Blood**, v. 99, n. 6, p. 2094-2099, 2002. DOI 10.1182/blood.v99.6.2094. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/99/6/2094/53545/Partial-impairment-of-interleukin-12-IL-12-and-IL>. Acesso em: 20 jan. 2022.

SILVA, L. M. *et al.* Immunohistochemical analysis of the expression of cellular transcription NFjB (p65), AP-1 (c-Fos and cJun), and JAK/STAT in leprosy. **Hum Pathol.**, v. 46, n. 5, p. 746-752, 2015. DOI 10.1016/j.humpath.2015.01.015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25771902/>. Acesso em: 13 jan. 2023.

SILVA, B. J. A. *et al.* Autophagy-Associated IL-15 Production Is Involved in the Pathogenesis of Leprosy Type 1 Reaction. **Cells.**, v. 10, n. 9, p. 2215, 27 ago. 2021. DOI 10.3390/cells10092215. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34571865/>. Acesso em: 17 maio 2022.

SILVA, L. M. *et al.* The inflammasome in leprosy skin lesions: an immunohistochemical evaluation. **Infect Drug Resist.**, v. 11, p. 2231-2240, 12 nov. 2018. DOI 10.2147/IDR.S172806. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30519061/>. Acesso em: 10 jan. 2022.

SILVEIRA, E. de L. *et al.* New immunologic pathways in the pathogenesis of leprosy: role for Th22 cytokines in the polar forms of the disease. **J Am Acad Dermatol.**, v. 72, n. 4, p. 729-30, abr. 2015. DOI 10.1016/j.jaad.2014.11.023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25773413/>. Acesso em: 17 jan. 2022.

SILVEIRA, E. de L. *et al.* New immunologic pathways in the pathogenesis of leprosy: role for Th22 cytokines in the polar forms of the disease. **J Am Acad Dermatol.**, v. 72, n. 4, p. 729-730, 2015. DOI 10.1016/j.jaad.2014.11.023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25773413/>. Acesso em: 28 nov. 2022.

SIMS, J. E. *et al.* Interleukin 1 signaling occurs exclusively *via* the type I receptor. **Proc Natl Acad Sci USA**, n. 90, p. 6155-6159, 1993. DOI 10.1073/pnas.90.13.6155. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8327496/>. Acesso em: 17 maio 2022.

SINGH, P. *et al.* Insight into the evolution and origin of leprosy bacilli from the genome sequence of *Mycobacterium lepromatosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 14, p. 4459-4464, 2015. DOI 10.1073/pnas.1421504112. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25831531/>. Acesso em: 15 maio 2022.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA. Comunicado SBD Hanseníase: mudança de esquema de tratamento da hanseníase em pacientes paucibacilares (PB) em acordo as recomendações do Ministério da Saúde: Nota Técnica nº 16/2021...2021. Disponível em: <https://www.sbd.org.br/mm/cms/2021/06/30/nota-tecnica-hans.pdf>. Acesso em: 10 maio 2022.

SOUSA, J. *et al.* Endothelium adhesion molecules ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 and VLA-4 expression in leprosy. **Microb Pathog.**, n. 104, p. 116–124, 2017. DOI 10.1016/j.micpath.2017.01.021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0882401016305319>. Acesso em: 17 jan. 2023.

SOUSA, J. R. de *et al.* In situ expression of M2 macrophage subpopulation in leprosy skin lesions. **Acta Trop.**, v. 157, p. 108-114, 2016. DOI 10.1016/j.actatropica.2016.01.008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26827741/>. Acesso em: 18 jun. 2022.

SOUSA, J. R. de; SOTTO, M. N.; QUARESMA, J. A. S. Leprosy As a Complex Infection: Breakdown of the Th1 and Th2 Immune Paradigm in the Immunopathogenesis of the Disease. **Fronteiras da Imunologia**, v. 8, 28 nov. 2017. DOI 10.3389/fimmu.2017.01635. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.01635/full>. Acesso em: 18 abr. 2023.

SOUSA, J. R. *et al.* In situ expression of M2 macrophage subpopulation in leprosy skin lesions. **Acta Trop.**, n. 157, p. 108-114, 2016. DOI 10.1016/j.actatropica.2016.01.008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26827741/>. Acesso em: 10 dez. 2022.

- SOUSA, J. R. *et al.* Th9 cytokines response and its possible implications in the immunopathogenesis of leprosy. **J Clin Pathol.**, n. 70, p. 521-7, 2017. DOI 10.1136/jclinpath-2016-204110. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27927694/>. Acesso em: 16 fev. 2023.
- SOUSA, J. R.; QUARESMA, J. A. S. The role of T helper 25 cells in the immune response to *Mycobacterium leprae*. **J Am Acad Dermatol.**, n. 78, p. 1009-11, 2018. DOI 10.1016/j.jaad.2017.11.025. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29146126/>. Acesso em: 12 maio 2022.
- SOUZA V. N. B. de *et al.* Analysis of apoptosis and Bcl-2 expression in polar forms of leprosy. **FEMS Immunol Med Microbiol**, n. 60, p. 270-4, 2010. DOI 10.1111/j.1574-695X.2010.00746.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20964723/>. Acesso em: 2 abr. 2023.
- SOUZA, C. S. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 30, p. 325-334, jul./set. 1997. DOI <https://doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v30i3p325-334>. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/1185>. Acesso em: 18 maio 2022.
- SOUZA, J. *et al.* E-selectin and Pselectin expression in endothelium of leprosy skin lesions. **Acta Trop.**, n. 149, p. 227-231, 2015. DOI 10.1016/j.actatropica.2015.06.002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26051909/>. Acesso em: 10 dez. 2022.
- SOUZA, J. R de *et al.* Immunohistochemical characterization of the M4 macrophage population in leprosy skin lesions. **BMC Infect Dis.**, v. 18, 576, 2018. DOI 10.1186/s12879-018-3478-x. Disponível em: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-018-3478-x#citeas>. Acesso em: 10 fev. 2022.
- SOUSA, J. R. de *et al.* Imunoexpressão de TNF- α e TGF- β em lesões de pacientes nas diversas formas clínicas da hanseníase por meio da técnica de imunoistoquímica. **Rev Pan-Amaz Saude**, Ananindeua, v. 4, n. 2, p. 45-53, jun. 2013. DOI 10.5123/S2176-62232013000200006. Disponível em: http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232013000200006&lng=pt&nrm=iso. Acesso em: 12 mar. 2023. .
- STEEL, J. C.; WALDMANN, T. A.; MORRIS, J. C. Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer. **Trends Pharmacol Sci.**, v. 33, n. 1, p. 35-41 jan. 2012. DOI 10.1016/j.tips.2011.09.004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22032984/>. Acesso em: 17 mar. 2022.
- STEFANI, M. M. A. *et al.* Leprosy survey among rural communities and wild armadillos from Amazonas state, Northern Brazil. **PLoS One**, v. 14, n. 1, e0209491, 10 jan. 2019. DOI 10.1371/journal.pone.0209491. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0209491>. Acesso em: 10 fev. 2023.
- TALHARI, C.; TALHARI, S.; PENNA, G. O. Clinical aspects of leprosy. **Clinics in Dermatology**, v. 33, n. 1, p. 26-37, 2015. DOI 10.1016/j.clindermatol.2014.07.002.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0738081X14001448?via%3Dihub>.
Acesso em: 10 fev. 2022.

TALHARI, S. *et al.* **Hanseníase**. 5. ed. Manaus: Dilivros, 2015.

TARIQUE M. *et al.* Interleukin10 producing regulatory B cells transformed CD4(+)CD25(-) into tregs and enhanced regulatory T cells function in human leprosy. **Front Immunol.**, n. 9, p. 1636, 2018. DOI 10.3389/fimmu.2018.01636. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.01636/full>. Acesso em: 16 jan. 2023.

TARIQUE, M. *et al.* CD4+TCR $\gamma\delta$ +FoxP3+ cells: An unidentified population of immunosuppressive cells towards disease progression leprosy patients. **Experimental Dermatology**, v. 26, n. 10, p. 946-948, jan. 2017. DOI 10.1111/exd.13302. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/exd.13302>. Acesso em: 6 mar. 2022.

TELES, R. M. B. *et al.* IL-27 Suppresses Antimicrobial Activity in Human Leprosy. **J Invest Dermatol.**, v. 135, n. 10, p. 2410-2417, out. 2015. DOI 10.1038/jid.2015.195. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26030183/>. Acesso em: 20 maio 2022.

TELES, R. M. *et al.* Differential TNF α mRNA regulation detected in the epidermis of leprosy patients. **Arch Dermatol Res**, v. 294, p. 355-362, 2002. DOI 10.1007/s00403-002-0340-0. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s00403-002-0340-0.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2022.

TRUMAN, R. W. *et al.* Probable zoonotic leprosy in the southern United States. **N Engl J Med**, v. 364, n. 17. p. 1626-1633, abr. 2011. DOI 10.1056/NEJMoa1010536. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa1010536>. Acesso em: 7 fev. 2022.

UBOGO, E. E. Inflammatory neuropathies: pathology, molecular markers and targets for specific intervention. **Acta Neuropath**, v. 4, p. 445-468, 2015. DOI 10.1007/s00401-015-1466-4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26264608/>. Acesso em: 17 fev. 2022.

VASILYEV, F. F.; SILKOV, A. N.; SENNIKOV, S. V. Relationship between interleukin-1 type 1 and 2 receptor gene polymorphisms and the expression level of membrane-bound receptors. **Cell Mol Immunol.**v. 12, n. 2, p. 222-30, mar. 2015. DOI 10.1038/cmi.2014.43. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/cmi201443>. Acesso em: 17 jul. 2022.

VIGNALI, D. A.; COLLISON, L. W.; WORKMAN, C. J. How regulatory T cells work. **Nat Rev Immunol.**, v. 8, n. 7, p. 523-532, 2008. DOI 10.1038/nri2343. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri2343>. Acesso em: 10 jan. 2023.

WALKER, S. L. *et al.* The effect of systemic corticosteroid therapy on the expression of tolllike receptor 2 and toll-like receptor 4 in the cutaneous lesions of leprosy reversal reactions. **Br J Dermatol.**, n. 167, p. 29-35, 2012. DOI 10.1111/j.1365-2133.2012.10891.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2133.2012.10891.x>. Acesso em: 10 abr. 2023.

WAMBIER, Carlos Gustavo. **Papel da ativação do fator nuclear kappa B (NF-kappa B) na expressão cutânea da hanseníase**. 2012. Tese (Doutorado em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

WANG, D. *et al.* Common variants in the PARL and PINK1 genes increase the risk to leprosy in Han Chinese from South China. **Sci Rep.**, n. 6, 37086, 2016. DOI 10.1038/srep37086. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep37086>. Acesso em: 16 dez. 2022.

WANG, D *et al.* Missense variants in HIF1A and LACC1 contribute to leprosy risk in Han Chinese. **Am J Hum Genet**, v. 102, n. 5, p. 794–805, 2018b. DOI 10.1016/j.ajhg.2018.03.006. Disponível em: [https://www.cell.com/ajhg/fulltext/S0002-9297\(18\)30095-8](https://www.cell.com/ajhg/fulltext/S0002-9297(18)30095-8). Acesso em: 11 out. 2022.

WANG, Z. *et al.* Discovery of 4 exonic and 1 intergenic novel susceptibility loci for leprosy. **Clin Genet.**, v. 94, n. 2, p. 259–263, 2018a. DOI 10.1111/cge.13376. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cge.13376>. Acesso em: 10 maio 2022.

WINER, H. *et al.* IL-7: Comprehensive review. **Cytokine.**, n. 160, 156049, dez. 2022. DOI 10.1016/j.cyto.2022.156049. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36201890/>. Acesso em: 10 fev. 2023.

WONG, S. H. *et al.* Leprosy and the adaptation of human toll-like receptor 1. **PLoS Pathog.**, v. 6, 2010b. DOI 10.1371/journal.ppat.1000979. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1000979>. Acesso em: 20 jan. 2022.

WONG, S. H.; HILL, A. V.; VANNBERG, F. O. Genomewide association study of leprosy. **N Engl J Med**, v. 362, n. 15, p. 1446–1447, 2010b. DOI 10.1056/NEJMc1001451. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMc1001451>. Acesso em: 17 fev. 2022.

YAMAMURA, M. *et al.* Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. **Science**, n. 254, p. 277-9, 1991. DOI 10.1126/science.254.5029.277. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1925582/>. Acesso em: 16 jan. 2022.

YAMAMURA, M. *et al.* Cytokines patterns of immunological mediated tissue damage. **J Immunol.**, n. 149, p. 1470-5, 1992. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1500726/>. Acesso em: 17 jan. 2022.

YANG, M. *et al.* Regulatory B cells in autoimmune diseases. **Cell Mol Immunol.**, v. 10, n. 2, p. 122-132, 2013. DOI 10.1038/cmi.2012.60. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/cmi201260>. Acesso em: 15 mar. 2023.

ZHANG, F. *et al.* Identification of two new loci at IL23R and RAB32 that influence susceptibility to leprosy. **Nat Genet**, v. 43, n. 12, p. 1247-1251, 2011. DOI 10.1038/ng.973. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ng.973>. Acesso em: 16 mar. 2022.

ZHANG, F. *et al.* Identification of two new loci at IL23R and RAB32 that influence susceptibility to leprosy. **Nat Genet.**, v. 43, n. 12, p. 1247-1251, 2011. DOI 10.1038/ng.973. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ng.973>. Acesso em 9 jun. 2022.

ZHANG, F. R. *et al.* Genomewide association study of leprosy. **N Engl J Med**, v. 361, n. 27, p. 2609–2618, 2009a. DOI 10.1056/NEJMoa0903753. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa0903753>. Acesso em: 16 mar. 2022.

Apêndice A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com os de outros pacientes, não sendo divulgada qualquer informação que possa levar a sua identificação.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título: Imunopatologia da doença de Hansen: caracterização do padrão de resposta do hospedeiro e a resposta imune compartimentalizada da pele através da técnica de sequenciamento de última geração (NGS).

Os dados obtidos dos prontuários, dos questionários e os resultados dos exames biomoleculares serão preenchidos em protocolos que serão avaliados pela autora e submetidos a uma análise estatística.

Em qualquer momento do estudo o (a) paciente, seus responsáveis e familiares terão acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa, para esclarecimento de dúvidas.

A principal investigadora é a médica dermatologista, Gabriela Athayde Amin, que pode ser encontrada pelo telefone 984206575, e domiciliada na Av. Magalhães Barata 110, Belém-PA. Este trabalho será apreciado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) indicado pela Plataforma Brasil.

GARANTIAS

O (a) paciente tem a garantia de que seu nome não será divulgado no trabalho.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo.

Este trabalho será realizado com recursos próprios da autora.

Também não haverá nenhum pagamento por sua participação.

O pesquisador utilizará os dados somente para esta pesquisa.

RISCOS

Os danos que podem ser causados aos pacientes são que as informações colhidas em protocolos e a identidade dos pacientes podem ser extraviadas, bem como danos físicos referente a coleta de material para análise, através da biópsia de pele.

O problema que pode ocorrer no decorrer da realização deste trabalho é: alguns pacientes se recusarem a assinar o termo de consentimento.

Esses problemas podem ser solucionados sendo garantido ao paciente que não constará qualquer forma de identificação do mesmo no protocolo de pesquisa (número de prontuário, iniciais e etc.), sendo ainda a entrevista realizada em um local que garanta privacidade do entrevistado. Os protocolos obtidos serão armazenados durante 5 anos e estarão sob a responsabilidade do pesquisador, que não permitirão que ninguém (além dos pesquisadores) tenha acesso a quaisquer dados. Depois desse período os protocolos serão incinerados. Será feito ainda o atendimento de um maior número de pacientes a fim de se alcançar à amostra desejada com os questionários devidamente preenchidos, atendendo o paciente da melhor forma possível como este desejar e os termos de consentimento assinados, e orientar o paciente no sentido de que os resultados desta pesquisa podem retornar em forma de benefícios acerca da doença. Em relação à danos físicos decorrente das biópsias de pele, é bom lembrar, que o procedimento é de baixa complexidade com baixa possibilidade de intercorrências e/ou de sequelas ou complicações. A intercorrência que pode ocorrer são reações adversas ao uso do anestésico utilizado e sangramentos; e as sequelas podem ser cicatrizes atróficas, hipertróficas ou queloidianas, no que diz respeito a complicações a mais comum é a infecção do sítio da biópsia. Estes riscos para serem minimizados contarão com um profissional experiente na coleta deste tipo de material, realizando todo cuidado como questionamento sobre reações prévias a anestésicos, o profissional será capacitado caso haja alguma reação adversa, para seu diagnóstico e resolução/tratamento, devendo o procedimento ser realizado em ambiente apropriado que garantam a possibilidade de tratamento caso haja necessidade; assepsia e antiseptia adequados, hemostasia adequada e tratamento antibiótico nos casos em que houver necessidade. É importante frisar que o paciente terá assegurado acompanhamento e retornos caso haja necessidade, em caso de quaisquer uma das situações supracitadas.

BENEFÍCIOS

A hanseníase se desenvolve em indivíduos que sejam susceptíveis a essa infecção. Esta susceptibilidade ocorre principalmente pela falha do sistema imunológico na resposta contra o bacilo da Hansen. Essa susceptibilidade imunológica, dentre os indivíduos susceptíveis, pode ainda variar. A resposta imunológica pode ser mais eficiente, levando ao desenvolvimento de um quadro menos severo, com menor número de lesões e presença de poucos bacilos (paucibacilar), o polo tuberculóide. Ou uma resposta pouco eficiente, que leva a um quadro mais grave, com maior número de lesões e presença de muitos bacilos (multibacilar). Além disso, há o desenvolvimento de quadros intermediários, que oscilam entre estes polos. Muitos trabalhos foram desenvolvidos para compreender melhor as implicações da resposta

imunológica na hanseníase, trabalhos que incluem vários estudos realizados por este grupo. A resposta imunológica contra o bacilo é complexa e apresenta mecanismos efetores contra o antígeno, mas também elementos reguladores para que a resposta elimine apenas o invasor. O conhecimento em imunologia tem avançado muito nos últimos anos, e com isso, há a possibilidade de maior entendimento nos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da hanseníase. Principalmente, com relação aos elementos reguladores que podem causar desregulação na resposta imunológica contra o micro-organismo, permitindo que a infecção persista e se tome crônica. Com isso este projeto se destina a ampliar o conhecimento de vários fatores envolvidos na resposta imunológica nos dois polos extremos da hanseníase. Utilizando a tecnologia de sequenciamento de última geração (NGS), serão analisados genes, em relação a expressão gênica, de citocinas, mais quimiocinas, fatores de crescimento e fatores de transcrição. Com isso, pretende-se conhecer de forma mais profunda os perfis imunológicos da doença e suas interações que resultam nas formas espectrais da hanseníase.

DECLARAÇÃO

Declaro que compreendi as informações do que li ou que me foram explicadas sobre o trabalho em questão.

Ficaram claros para mim, quais são os propósitos da pesquisa, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos.

Ficou claro também que minha participação não tem despesas.

Concordo voluntariamente em participar desse estudo podendo retirar meu consentimento a qualquer momento sem necessidade de justificar o motivo da desistência, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Belém, _____, de _____ de 2020.

Assinatura do paciente

Assinatura de testemunha

Declaro que assisti a explicação da médica dermatologista, a paciente, que compreendeu e retirou suas dúvidas, assim como eu, sobre tudo o que será realizado na pesquisa.

Gabriela Athayde Amin

Declaramos que obtivemos de forma apropriada e voluntária o consentimento livre e esclarecido deste (a) paciente ou representante legal para participação no presente estudo.

Apêndice B – Aceite da Instituição

DECLARAÇÃO

Declaro em nome do Ambulatório de Dermatologia da Universidade do Estado do Pará ter conhecimento da pesquisa intitulada “Imunopatologia da doença de Hansen: caracterização do padrão de resposta do hospedeiro e a resposta imune compartimentalizada da pele através da técnica de sequenciamento de última geração (NGS)”, de autoria da médica dermatologista, Gabriela Athayde Amin, dando-lhe consentimento para realizar o trabalho nesta Instituição, e coletar dados em nosso serviço durante o período preestabelecido pelo cronograma.

Estamos também cientes e concordamos com a publicação dos resultados encontrados, sendo obrigatoriamente citada na publicação a UEPA como local de realização do trabalho.

Belém - Pará, 03 de janeiro de 2017

Prof.ª Dr.ª Francisca Regina Oliveira Carneiro



Dra. Regina Carneiro
Dermatologista
CRM-PA 3599
RQE 4305

Apêndice C – Aceite do Orientador

GOVERNO DO ESTADO DO PARÁ
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
NÚCLEO DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E EXTENSÃO EM MEDICINA

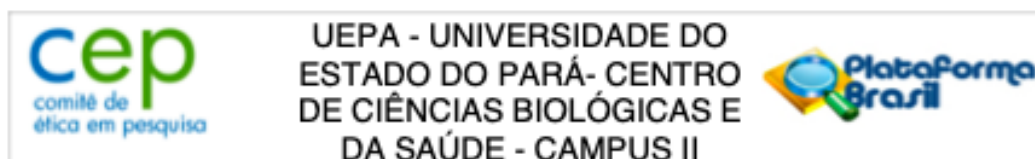
DECLARAÇÃO

Eu, Juarez Antônio Simões Quaresma, aceito orientar o trabalho intitulado “Imunopatologia da doença de Hansen: caracterização do padrão de resposta hospedeiro e a resposta imune compartimentalizada da pele através da técnica de sequenciamento de última geração (NGS)”, de autoria de Gabriela Athayde Arcoverde declarando ter total conhecimento das normas de realização de Trabalhos Científicos vigentes, estando inclusive ciente da necessidade de minha participação na banca examinadora por ocasião da defesa do trabalho. Declaro ainda ter conhecimento do conteúdo desta, ora entregue para o qual dou meu aceite pela rubrica das páginas.

Belém - Pará, 02 de junho de 2017

Documento assinado digitalmente
 JUAREZ ANTONIO SIMOES QUARESMA
Data: 08/05/2023 08:01:42-0300
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Apêndice - D



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Análise da resposta imunológica local em pacientes acometidos pelas formas polares da hanseníase utilizando Sequenciamento de Última Geração (NGS)

Pesquisador: GABRIELA ATHAYDE AMIN

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 67565617.5.1001.5174

Instituição Proponente: Universidade do Estado do Pará - UEPA / Centro de Ciências Biológicas e da

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.548.488

Apresentação do Projeto:

O Presente estudo é predominantemente observacional, transversal e descritivo. Os locais do estudo vão variar com as atividades realizadas. A seleção, anamnese, exame físico, explicações acerca do trabalho com TCLE, e coleta de material para biópsia serão realizados no Ambulatório de Dermatologia da Universidade do Estado do Pará (UEPA). As técnicas em biologia molecular e montagem do banco de dados do sequenciamento serão realizadas utilizando a infraestrutura e apoio técnico do Laboratório de Imunopatologia do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará que encontra-se apto para estas realizações. A análise de dados será realizada no Laboratório de Dermatoinmunologia da Universidade do Estado do Pará. Os pacientes com hanseníase serão oriundos de Unidades Básicas de Saúde de Belém e de municípios próximos bem como do ambulatório médico de Dermatologia e do Laboratório de Dermatoinmunologia, da Universidade do Estado do Para (UEPA). Todos os pacientes serão diagnosticados e classificados de acordo com as normas recomendadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS): lesão na pele com alteração de sensibilidade tátil e dolorosa (após submete-lo ao teste de sensibilidade convencional); envolvimento de nervos periféricos (observado pelo seu espessamento); presença na linfa de bacilos álcool - ácidos - resistentes (Levis e cols., 2002). Os pacientes com hanseníase serão divididos segundo suas formas clínicas. Procedimentos Os pacientes selecionados serão submetidos a entrevista, explicações e orientações acerca do trabalho, bem como solicitação de

Endereço: Trav. Perebeui, 2623 (1º andar da biblioteca do Campus II da UEPA, Sala 01)

Bairro: Marco

CEP: 66.087-670

UF: PA

Município: BELEM

Telefone: (91)3131-1781

E-mail: cepocbs@uepa.br



UEPA - UNIVERSIDADE DO
ESTADO DO PARÁ- CENTRO
DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E
DA SAÚDE - CAMPUS II



Continuação do Parecer: 4.548.488

autorização para inclusão neste estudo, conforme Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), será realizada anamnese e exame físico, coleta de dados em protocolos pré-definido para padronização dos dados. Serão coletadas biópsias de pele após anestesia local das lesões pré-selecionadas, utilizando punch número 4 e armazenadas em RNAlater para posterior extração de RNA. O mesmo procedimento de anamnese, coleta de amostras de sangue e biópsia de pele em pacientes que pertencerão ao grupo controle.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Quantificar diferentes marcadores imunológicos para as respostas inflamatórias em lesões nas formas clínicas da hanseníase, utilizando Sequenciamento de Última geração (NGS).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Presentes e adequados nesta versão.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante para o estudo da Hanseníase. Esta versão 4 trata-se de uma Emenda para a inclusão do grupo controle.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Presente.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme as Resoluções 466/12 e 510/2016, é atribuição do CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente a pesquisa. Ressaltamos as seguintes atribuições do pesquisador: Desenvolver o projeto conforme delineado; Elaborar e apresentar os relatórios parcial (is) e final até 60 dias após o seu término (como notificação); Apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento; Manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda responsabilidade, por um período de 5 (cinco) anos após o término da pesquisa; Encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto. Justificar fundamentadamente, perante o CEP, qualquer modificação (emenda) ou interrupção do projeto e

Endereço: Trav. Perebeui, 2623 (1º andar da biblioteca do Campus II da UEPA, Sala 01)

Bairro: Marco

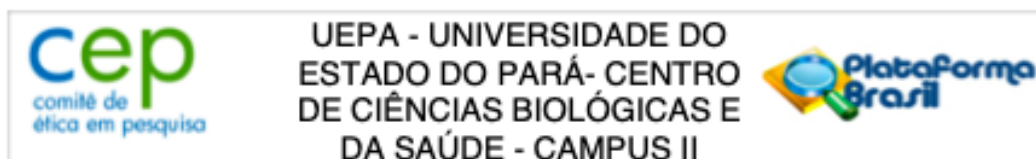
CEP: 66.087-670

UF: PA

Município: BELEM

Telefone: (81)3131-1781

E-mail: cepccbs@uepa.br

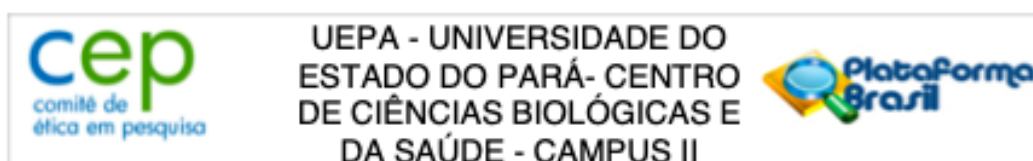


Continuação do Parecer: 4.548.488

BELEM, 19 de Fevereiro de 2021

Assinado por:
REGINA GABRIELA CALDAS DE MORAES
(Coordenador(a))

Endereço: Trav. Perebeui, 2623 (1º andar da biblioteca do Campus II da UEPA, Sala 01)
Bairro: Marco **CEP:** 66.087-670
UF: PA **Município:** BELEM
Telefone: (91)3131-1781 **E-mail:** cepocbs@uepa.br



Continuação do Parecer: 4.548.488

identificar nas Informações Básicas tais mudanças.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1657027_E2.pdf	08/01/2021 09:58:04		Aceito
Outros	METODOLOGIAINCLUINDOCONTROL ES.docx	08/01/2021 09:56:45	GABRIELA ATHAYDE AMIN	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	QUALIFICAnormalizandotestealteraa.o.docx	08/01/2021 09:55:45	GABRIELA ATHAYDE AMIN	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	HELLENMT.pdf	08/01/2021 09:52:05	GABRIELA ATHAYDE AMIN	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	gabriela.pdf	08/01/2021 09:47:30	GABRIELA ATHAYDE AMIN	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	SOLICITACOESDOPARECERCONSUB STANCIADODOCEP.pdf	08/01/2021 09:44:45	GABRIELA ATHAYDE AMIN	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	08/01/2021 09:38:04	GABRIELA ATHAYDE AMIN	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	ericaaceite.pdf	24/02/2020 09:56:41	GABRIELA ATHAYDE AMIN	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	29/03/2017 19:46:59	GABRIELA ATHAYDE AMIN	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.docx	26/03/2017 16:35:56	GABRIELA ATHAYDE AMIN	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Trav. Perebeui, 2623 (1º andar da biblioteca do Campus II da UEPa, Sala 01)
Bairro: Marco **CEP:** 66.087-670
UF: PA **Município:** BELEM
Telefone: (91)3131-1781 **E-mail:** cepocbs@uepa.br

Apêndice E

ARTIGO

----- Forwarded message -----

De: PLOS ONE <em@editorialmanager.com>

Date: seg., 8 de mai. de 2023 às 07:49

Subject: Submission Confirmation for PONE-D-23-13997 - [EMID:dd3490ad0ebcf8c8]

To: Juarez Antônio Simões Quaresma <juarez.quaresma@gmail.com>

PONE-D-23-13997

Immunopathology of Leprosy: local immune response patterns deciphered using New Generation Sequencing

Immunopathology of Leprosy using New Generation Sequencing

PLOS ONE

Dear Dr. Quaresma,

Thank you for submitting your manuscript entitled 'Immunopathology of Leprosy: local immune response patterns deciphered using New Generation Sequencing Immunopathology of Leprosy using New Generation Sequencing' to PLOS ONE. Your assigned manuscript number is PONE-D-23-13997.

We will now begin processing your manuscript and may contact you if we require any further information. You will receive an update once your manuscript passes our in-house technical check; you can also check the status of your manuscript by logging into your account at <https://www.editorialmanager.com/pone/>.

If during submission you selected the option for your manuscript to be posted on the bioRxiv preprint server (<http://biorxiv.org>), we will be assessing the manuscript for suitability shortly. If suitable, your preprint will be made publicly available on bioRxiv and you will receive an email confirmation from them when it has posted. Please check your response to this question and email us as soon as possible at plosone@plos.org if it has been answered incorrectly. Further information about our partnership with bioRxiv to facilitate the rapid availability of life sciences research is available at <http://journals.plos.org/plosone/s/preprints>.

If you have any inquiries or other comments regarding this manuscript please contact plosone@plos.org.

Thank you for your support of PLOS ONE.

Kind regards,

PLOS ONE

PLOS ONE

Immunopathology of Leprosy: local immune response patterns deciphered using New Generation Sequencing

Immunopathology of Leprosy using New Generation Sequencing

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Article
Full Title:	Immunopathology of Leprosy: local immune response patterns deciphered using New Generation Sequencing Immunopathology of Leprosy using New Generation Sequencing
Short Title:	Immunopathology of Leprosy using New Generation Sequencing
Corresponding Author:	Juarez Antônio Simões Quaresma, Ph.D UFPA: Universidade Federal do Para Belem, --- Select One --- BRAZIL
Keywords:	Keywords: Next Generation Sequencing; Leprosy; Immunology.
Abstract:	<p>Leprosy is an infectious, granulomatous disease caused by <i>Mycobacterium leprae</i>. Its immunopathogenesis, manifested in the pathological site(s) of the affected tissue, is a complex process, particularly considering the remarkable heterogeneity of subsets of T cells involved.</p> <p>This study evaluated the immune response of the polar forms, in the context of leprosy, using the Next Generation Sequencing (NGS) technique. Gene expressions of cytokines and associated receptors were evaluated in samples of lesions obtained from seven skin biopsies (three from patients with the tuberculoid form and four from patients with the Virchowian form), to comparatively characterize the tissue immune response pattern in polar clinical forms.</p> <p>In the Virchowian form, we observed differentiated expression of the following cytokines: IL18BP, IL10, IL-411, IL-27, TGFb1, IL-18, and IL-16. The most expressed receptor genes in the Virchowian form were IL-10RA and IL-10 RB, IL-5RA, IL-12RB1, IL-2RG, IL-2RB, IL17RA and IL-4R. In the tuberculoid form, the following cytokines were observed: IL-13, IL-36G, IL11, IL-12B, IL-21, IL-17B, IL-17D, IL15, TGFb3, IL7 and IL-23A. The most expressed receptor genes in the tuberculoid form were IL-17REL, IL-17-RE, IL-23R, IL-1R1, IL-1R2, IL-18R1, IL-7R, IL-13RA2 and IL-2RB, IL - 2RG and IL-12RB1.</p> <p>Our results allowed us to construct a panel containing the cytokines and their receptors most strongly expressed in each polar form. These findings, to a large extent, corroborate the previous literature, in addition to demonstrating cytokines not previously implicated in leprosy, such as IL-11. We also observed the differentiated expression of cytokines, such as IL-17, which act as an important inflammatory mediator, which opens the therapeutic possibility involving the treatment of hyper-inflammatory states, as is the case of leprosy reactions. Thus, taken together, the results of this study may help in understanding the mechanisms underlying the immune response of patients, as well as in the development of new therapeutic strategies.</p>
Order of Authors:	<p>Gabriela Amin, M.D.</p> <p>Francisca Regina Oliveira Carneiro, PhD</p> <p>Rommel Thiago Jucá Ramos</p> <p>Carlos Willian Dias Dantas</p> <p>Valquíria Kulig Vieira</p> <p>Iago Fernando de Sousa Brasil</p> <p>Mayara Silva Nascimento</p> <p>Edmar Tavares da Costa</p> <p>Artur Luiz da Costa Silva</p>

	Hellen Thais Fuzii Juarez Antônio Simões Quaresma
Opposed Reviewers:	
Additional information:	
Question	Response
<p>Financial Disclosure</p> <p>Enter a financial disclosure statement that describes the sources of funding for the work included in this submission. Review the submission guidelines for detailed requirements. View published research articles from PLOS ONE for specific examples.</p> <p>This statement is required for submission and will appear in the published article if the submission is accepted. Please make sure it is accurate.</p> <p>Unfunded studies Enter: <i>The author(s) received no specific funding for this work.</i></p> <p>Funded studies Enter a statement with the following details:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Initials of the authors who received each award • Grant numbers awarded to each author • The full name of each funder • URL of each funder website • Did the sponsors or funders play any role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript? • NO - Include this sentence at the end of your statement: <i>The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.</i> • YES - Specify the role(s) played. <p>* typeset</p>	<p>Postgraduate Support Program (PAPQ-UFPA). Amazon Foundation for the Studies and Research in Pará (FAPESPA/Brazil) – 020/2019.</p> <p>The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.</p>
<p>Competing Interests</p> <p>Use the instructions below to enter a competing interest statement for this submission. On behalf of all authors, disclose any competing interests that could be perceived to bias this</p>	<p>The authors have declared that no competing interests exist.</p>

1 **Immunopathology of Leprosy: local immune response patterns deciphered using New**
2 **Generation Sequencing**

3 Immunopathology of Leprosy using New Generation Sequencing
4

5 Gabriela Athayde Amin^{1,2*}, Francisca Regina Oliveira Carneiro¹, Rommel Thiago Jucá
6 Ramos², Carlos Willian Dias Dantas², Valquíria Kulig Vieira², Iago Fernando de Sousa
7 Brasil², Mayara Silva Nascimento¹, Edmar Tavares da Costa², Artur Luiz da Costa Silva²,
8 Hellen Thais Fuzii², Juarez Antônio Simões Quaresma^{1,2,3*}

9 ¹ State University of Pará, UEPA, Belém, Pará, Brazil (Dermatology Department)

10 ² Federal University of Pará, Belém, Pará, Brazil

11 ³ University of São Paulo, USP, São Paulo, SP, Brazil

12 * Corresponding author

13 E-mail: gabrielaamin@ufpa.br

14 juarez@ufpa.br

15 **Abstract**

16 Leprosy is an infectious, granulomatous disease caused by *Mycobacterium leprae*. Its
17 immunopathogenesis, manifested in the affected tissue pathological site(s), is a complex
18 process, particularly considering the remarkable subsets heterogeneity of involved T cells. This
19 study evaluated the polar forms immune response, in the context of leprosy, using the Next
20 Generation Sequencing (NGS) technique. Gene expressions of cytokines and associated
21 receptors were evaluated in samples of lesions obtained from seven skin biopsies (three from
22 patients with the tuberculoid form and four from patients with the Virchowian form), to
23 comparatively characterize the tissue immune response pattern in polar clinical forms of
24 leprosy. In the Virchowian form, we observed differentiated expression of the following
25 cytokines: IL18BP, IL10, IL-4I1, IL-27, TGF β 1, IL-18, and IL-16. The most expressed
26 receptor genes in the Virchowian form were IL-10RA and IL-10 RB, IL-5RA, IL-12RB1, IL-
27 2RG, IL-2RB, IL17RA and IL-4R. In the tuberculoid form, the following cytokines were
28 observed with greater expression: IL-13, IL-36G, IL11, IL-12B, IL-21, IL-17B, IL-17D, IL15,
29 TGF β 3, IL7 and IL-23A. The most expressed receptor genes in the tuberculoid form were IL-
30 17REL, IL-17-RE, IL-23R, IL-1R1, IL-1R2, IL-18R1, IL-7R, IL-13RA2 and IL-2RB, IL -2RG
31 and IL-12RB1. Our results allowed us to construct a panel containing the cytokines and their
32 receptors most strongly expressed in each polar form. These findings, to a large extent,
33 corroborate the previous literature, in addition to demonstrating cytokines not previously
34 implicated in leprosy, such as IL-11. We also observed the differentiated expression of
35 cytokines, such as IL-17, which act as an important inflammatory mediator, which opens the
36 therapeutic possibility involving the treatment of hyper-inflammatory states, as is the case of
37 leprosy reactions. Thus, taken together, the results of this study may help in understanding the
38 mechanisms underlying the immune response of patients, as well as in the development of new
39 therapeutic strategies.