

Juliana Rodrigues Zampieri

**ATUAÇÃO DAS CÉLULAS *NATURAL KILLER T* E CÉLULAS
LINFOIDES INATAS NA RESPOSTA IMUNE DE PACIENTES
COINFECTADOS POR HIV E *MYCOBACTERIUM LEPRAE***

Tese apresentada à Faculdade Israelita de
Ciências da Saúde Albert Einstein para
obtenção do título de Doutora em Ciências da
Saúde.

São Paulo

2025

Juliana Rodrigues Zampieri

**ATUAÇÃO DAS CÉLULAS *NATURAL KILLER T* E CÉLULAS
LINFOIDES INATAS NA RESPOSTA IMUNE DE PACIENTES
COINFECTADOS POR HIV E *MYCOBACTERIUM LEPRAE***

Tese apresentada à Faculdade Israelita de
Ciências da Saúde Albert Einstein para
obtenção do título de Doutora em Ciências da
Saúde.

Orientadora: Dra. Karina Inacio Ladislau de
Carvalho

São Paulo

2025

Zampieri, Juliana Rodrigues

Atuação das células *natural killer T* e células linfoides inatas na resposta imune de pacientes coinfectados por HIV e *Mycobacterium leprae* / Juliana Rodrigues Zampieri. -- São Paulo, 2025.

xv, 72 f.

Tese (Doutorado) – Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein. Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Título em inglês: *The role of natural killer T cells and innate lymphoid cells in the immune response of patients co-infected with HIV and Mycobacterium leprae.*

1. Hanseníase. 2. Imunidade inata. 3. Células T matadoras naturais.

Elaborada pelo Sistema Einstein Integrado de Bibliotecas

FACULDADE ISRAELITA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE ALBERT EINSTEIN

Coordenador do curso de pós-graduação: Prof. Dr. Luciano Cesar Pontes de Azevedo

Juliana Rodrigues Zampieri

**ATUAÇÃO DAS CÉLULAS *NATURAL KILLER T* E CÉLULAS
LINFOIDES INATAS NA RESPOSTA IMUNE DE PACIENTES
COINFECTADOS POR HIV E *MYCOBACTERIUM LEPRAE***

Presidente da banca: Dra. Karina Inacio Ladislau de Carvalho

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:

Profa. Dra. Luciana Cavalleiro Marti

Prof. Dr. Alessandro de Sá Pinheiro

Profa. Dra. Jane Tomimori

Membros suplentes:

Profa. Dra. Érika Bevilaqua Rangel

Dra. Filipa Blasco Tavares Pereira Lopes

Aprovada em: 29/03/2025.

Dedicatória

Para a minha avó Dona Antônia, sem a sua sabedoria eu não seria quem sou. Para todos os pacientes que enfrentaram ou ainda sofrem com a hanseníase, suas lutas não serão esquecidas.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por todas as oportunidades e as pessoas que apareceram e me ajudaram pelo caminho.

Agradeço a minha família, em especial aos meus pais, Marcia e Ricardo e minhas avós, D. Antônia e D. Vera, que sempre acreditaram que nenhum sonho meu era grande demais.

Agradeço aos meus amigos que me apoiaram durante todo esse processo e nunca duvidaram que eu chegaria até aqui. Obrigada Isabella, Rafa, Bianca, Yolanda, Carol e Gabi e tantos outros. Agradeço ao meu namorado Gustavo, por não ter soltado a minha mão nesses desafios. Agradeço ao meu gatinho, Rony, por ter ficado ao meu lado durante tantos momentos, principalmente durante a escrita desse texto. Agora você é a estrela mais brilhante.

Agradeço a todos os membros do laboratório da Faculdade Israelita de Ciências da Saúde (FICSAE) que sempre estiveram dispostos a me ensinar, em especial ao Thiago, Ana Eduarda, Alexandre e Rafaela. Eu não seria a profissional que eu sou sem a ajuda de vocês.

Agradeço em especial a minha orientadora Dra. Karina por ter me guiado durante todo esse caminho, desde uma aluna de iniciação científica, não tenho palavras para agradecer todos os conselhos e ensinamentos. Obrigada por ser uma inspiração e modelo de cientista.

Agradeço aos meus colegas do Md/Phd e a todos os membros da coordenação da FICSAE que tornaram este projeto possível. Em especial aos Drs. Claudio Lottenberg e Nelson Wolosker pelo apoio financeiro.

Agradeço a todas as mulheres cientistas que vieram antes de mim, sem a luta de cada uma de vocês meu sonho jamais seria possível. Agradeço também a todos os pesquisadores que decidiram olhar para aqueles negligenciados, obrigada por terem me mostrado o caminho.

Agradeço a todos os pacientes que aceitaram colaborar com a pesquisa, obrigada pela confiança.

*me levanto
sobre o sacrifício
de um milhão de mulheres que vieram antes
e penso
o que é que eu faço
para tornar essa montanha mais alta
para que as mulheres que vierem depois de mim
possam ver além*

(Legado de Rupi Kaur)

Sumário

Dedicatória	v
Agradecimentos.....	vi
Lista de figuras	x
Lista de tabelas e quadros	xii
Lista de abreviaturas	xiii
Resumo	xv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Hanseníase	1
1.2 Sistema imune	5
1.2.1 NKT	7
1.2.2 ILC	8
1.2.3 Monócitos	9
1.2.4 Células dendríticas	13
1.3 Objetivos.....	17
2 MÉTODOS	18
2.1 Seleção de pacientes	18
2.2 Processamento das células mononucleares do sangue periférico	18
2.3 Exames laboratoriais	19
2.4 Biópsia de pele e/ou nervo	20
2.5 Imunofluorescência e microscopia confocal	20
2.6 Extração de RNA e PCR quantitativo em tempo real	21
2.7 Imunofenotipagem de superfície celular em células mononucleares do sangue periférico.....	22
2.8 Análise funcional das células ILC2 e NKT	24
2.9 Análise estatística.....	25
3 RESULTADOS	26
3.1 Dados demográficos e laboratoriais	26
3.2 Dados clínicos	27
3.3 Tratamento	29
3.4 Avaliação da expressão gênica das células linfomononucleares do sangue periférico de pacientes com hanseníase multibacilar	30

3.5 Avaliação da frequência de células da imunidade inata no sangue periférico	33
3.5.1 Avaliação da frequência e da funcionalidade das células ILC2 no sangue periférico	33
3.5.2 Avaliação da frequência das células NKT no sangue periférico	36
3.5.3 Avaliação da frequência e fenótipo dos monócitos no sangue periférico	37
3.5.4 Avaliação da frequência e fenótipo das células dendríticas no sangue periférico	44
3.6 Avaliação da presença de células linfoides inatas do tipo 2 no tecido lesionado de pacientes com hanseníase multibacilar	46
3.7 Avaliação da presença de células T matadoras naturais no tecido lesionado de pacientes com hanseníase multibacilar	48
4 DISCUSSÃO	52
5 CONCLUSÕES	58
6 REFERÊNCIAS	59
Abstract	

Lista de figuras

Figura 1. Distribuição geográfica dos novos casos de hanseníase em 2022	1
Figura 2. Mediana dos valores de hemograma dos pacientes e dos controles	27
Figura 3. Expressão gênica nas células PMBC de IL-6 (A) e IL-9 (B) em pacientes com hanseníase multibacilar	30
Figura 4. Expressão gênica nas células PMBC de GATA3, PLZF e Va24 em pacientes com hanseníase multibacilar	32
Figura 5. Frequência (%) das células ILC2 nos pacientes com hanseníase e controles saudáveis, via citometria de fluxo	34
Figura 6. Produção de citocinas pelas células ILC2 estimuladas, comparando pacientes com hanseníase multibacilar e controles saudáveis, via citometria de fluxo	35
Figura 7. Frequência das células NKT nos pacientes com hanseníase e controles saudáveis, analisada via citometria de fluxo.....	36
Figura 8. Correlação entre a frequência de células NKT e ILC2 de pacientes com hanseníase multibacilar	37
Figura 9. Frequência dos subtipos de monócitos no sangue periférico de pacientes com hanseníase multibacilar, comparado com controles, via citometria de fluxo	38
Figura 10. Frequência da expressão de PDL1 nos diferentes subtipos de monócitos em pacientes com hanseníase, comparado com controles, via citometria de fluxo	40
Figura 11. Frequência da expressão de CD163 nos diferentes subtipos de monócitos em pacientes com hanseníase, comparado com controles, via citometria de fluxo	41
Figura 12. Diferenças entre a expressão de CXCR3 e CCR2 em pacientes com hanseníase e controles saudáveis nos monócitos clássicos e não clássicos.....	42
Figura 13. Diferenças entre a expressão de CXCR3 e CCR2 em pacientes com hanseníase e controles saudáveis nos monócitos intermediários	43
Figura 14. Frequência das células dendríticas no sangue periférico de pacientes com hanseníase multibacilar e controles saudáveis	45
Figura 15. Expressão de PDL1 pelos diferentes subtipos de células dendríticas.....	46
Figura 16. Imunomarcagem de células linfoides inatas em tecido de pacientes com hanseníase	47
Figura 17. Imunomarcagem de células T matadoras naturais em áreas de lesão por hanseníase	49

Figura 18. Correlação entre a frequência de células NKT e ILC2 de pacientes com hanseníase multibacilar nas áreas de lesão antes do início do tratamento.....	50
Figura 19. Produção de citocinas pelas células T matadoras naturais em áreas de lesão de pacientes com hanseníase	51

Lista de quadros e tabelas

Quadro 1. Correspondência entre as classificações de hanseníase	3
Quadro 2. Correlação entre o grau de incapacidade e os critérios avaliados.....	4
Quadro 3. Sequência de <i>primers forward</i> e <i>reverse</i> utilizadas para a identificação dos genes de interesse	22
Quadro 4. Diluição dos anticorpos utilizados para imunofenotipagem de monócitos, células dendríticas, ILC2 e NKT	24
Tabela 1. Dados demográficos e laboratoriais dos pacientes	26
Tabela 2. Dados clínicos	28
Tabela 3. Avaliação do grau de incapacidade no início e no final do tratamento	29
Tabela 4. Tipo, tempo e adesão ao tratamento dos pacientes	29

Lista de abreviaturas

APC	Célula apresentadora de antígenos (<i>Antigen-presenting cells</i>)
BB	Hanseníase dimorfo-dimorfo (<i>Borderline-borderline</i>)
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
BL	Hanseníase <i>borderline</i> -virchowiana (<i>Borderline-virchowian</i>)
BT	Hanseníase dimorfo-tuberculoide (<i>Borderline-tuberculoid</i>)
CRTH2	<i>Chemoattractant receptor–homologous molecule expressed on TH2 lymphocytes</i>
DC	Células dendríticas (<i>Dendritic cells</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino
ENH	Eritema nodoso hansênico
FMO	Fluorescência menos um
HBSS	Solução salina balanceada de Hanks (<i>Hank's balanced salt solution</i>)
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (<i>Human immunodeficiency virus</i>)
IFN- γ	Interferon-gama
IFN- λ	Interferon lambda 3
IIEPAE	Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein
IL	Interleucina
ILC1	Células linfoides inatas do tipo 1 (<i>Innate lymphoid cell type 1</i>)
ILC2	Células linfoides inatas do tipo 2 (<i>Innate lymphoid cell type 2</i>)
ILC3	Células linfoides inatas do tipo 3 (<i>Innate lymphoid cell type 3</i>)
LL	Hanseníase virchowiana-virchowiana
LPS	Lipopolissacarídeo
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
mDC	Células dendríticas mieloides (<i>Myeloid dendritic cells</i>)
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (<i>Major histocompatibility complex</i>)
NKT	Células T matadoras naturais (<i>Natural killer T</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde

PBMC	Célula mononuclear do sangue periférico (<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>)
PBS	Tampão fosfato-salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
pDC	Células dendríticas plasmocitoides (<i>Plasmacytoid dendritic cell</i>)
PD-L1	Ligante de morte programada 1 (<i>Programmed death-ligand 1</i>)
PGL-1	Glicolipídio fenólico 1 (<i>Phenolic glycolipid-1</i>)
PLZF	<i>Promyelocytic leukemia zinc finger</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR-T	Receptor de células T (<i>T-cell receptor</i>)
TGF- β	Fator de crescimento transformador-beta (<i>Transforming growth factor</i>)
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa (<i>Tumor necrosis factor-α</i>)
Treg	T regulatória
TRLs	Receptores <i>toll-like</i> (<i>Toll-like receptors</i>)
TT	Hanseníase tuberculoide-tuberculoide

Resumo

Introdução: A hanseníase continua tendo uma grande relevância e prevalência no Brasil e no mundo. A resposta imune ao bacilo se correlaciona diretamente com as diferentes manifestações clínicas, paucibacilar e multibacilar. O estudo de células da imunidade inata em pacientes com hanseníase multibacilar pode trazer respostas com implicações diagnósticas e terapêuticas. **Objetivo:** Descrever o perfil de células da imunidade inata de pacientes com hanseníase multibacilar. **Métodos:** Foram analisadas, via citometria de fluxo, o perfil de células da imunidade inata, como monócitos, células dendríticas, ILC2 e NKT no sangue periférico de pacientes com hanseníase multibacilar, sendo comparado com controles saudáveis. Nas áreas de lesão na pele, via microscopia confocal, foram avaliadas a presença das células ILC2 e NKT. **Resultados:** Foi encontrado que pacientes com hanseníase multibacilar apresentam um aumento de GATA3 e IL-6 no sangue periférico, com diminuição de IL-9. A análise das células da imunidade inata demonstrou uma diminuição de ILC2, mas com aumento de sua produção de IL-4 e TNF. Em relação aos monócitos, foi observada uma diminuição da frequência e expressão de PDL1 nos clássicos, com aumento dos intermediários. Também nos monócitos intermediários, foi observado um aumento significativo na expressão de CD163 e das quimiocinas. Para as células dendríticas, foi demonstrada uma diminuição das mieloides e um aumento das plasmocitoides. A análise do tecido, demonstrou a presença de ILC2 e NKT nas áreas de lesão, porém não demonstrou diferenças estatisticamente significantes ao comparar antes e depois do tratamento. **Conclusão:** Os monócitos intermediários, através da expressão de CD163 e receptores de quimiocinas e as células dendríticas plasmocitoides contribuem para o perfil da resposta imune de pacientes com hanseníase multibacilar.

Descritores: Hanseníase; Imunidade inata; Células T matadoras naturais

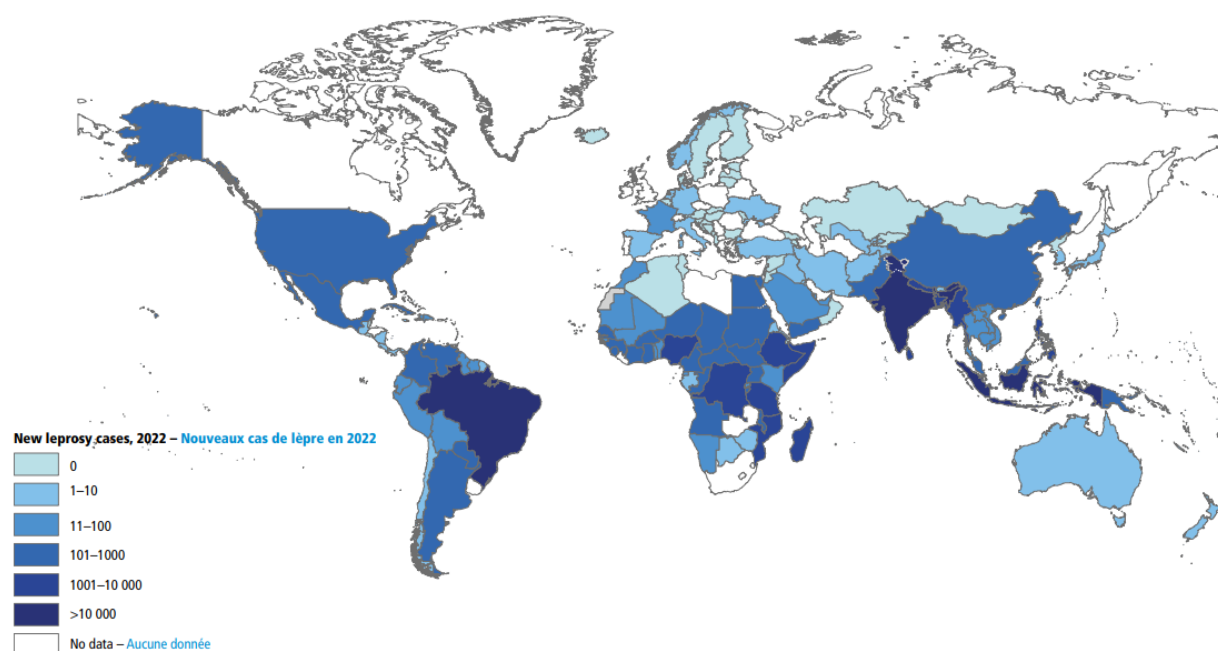
1 INTRODUÇÃO

1.1 Hanseníase

Dentre as doenças tropicais negligenciadas, a hanseníase continua ocupando um lugar de destaque, com um aumento de 23,8% nos casos em 2022 quando comparados a 2021, em nível mundial. O Brasil ocupa uma posição central na epidemiologia da doença, sendo que junto com a Índia e a Indonésia correspondem a 78,1% dos novos casos no mundo⁽¹⁾ (Figura 1).

Map 1 Geographical distribution of new leprosy cases, 2022

Carte 1 Répartition géographique des nouveaux cas de lèpre en 2022



Destaque para Brasil, Índia e Indonésia como países com mais de 10.000 novos casos de hanseníase.

Fonte: World Health Organization (WHO). Global leprosy (Hansen disease) update, 2022: new paradigm – control to elimination. Wkly Epidemiol Rec. 2023;98(37):409-30. Map 1 Geographical distribution of new leprosy cases, 2022.⁽¹⁾

Figura 1. Distribuição geográfica dos novos casos de hanseníase em 2022

No Brasil, segundo dados do último boletim epidemiológico (janeiro 2023), a doença acomete mais indivíduos do sexo masculino (55,7%), tendo maior incidência no Mato Grosso, seguido do Tocantins, com Palmas ocupando o lugar de cidade com maior incidência entre as capitais do país (79,78 casos por 100 mil habitantes).⁽²⁾

Os fatores que levam o indivíduo a desenvolver a doença ainda não são completamente esclarecidos, mas diversos estudos já demonstraram a associação da hanseníase com condições relacionadas a pobreza, como baixa escolaridade, moradias precárias, insegurança alimentar e desnutrição, sendo interessante ressaltar que a vacinação com bacilo de Calmette-Guérin (BCG) foi demonstrada como um fator protetor.⁽³⁻⁵⁾ Contudo existe uma grande parcela de indivíduos assintomáticos que são importantes na cadeia de transmissão da doença⁽⁶⁾ apesar da principal fonte de transmissão ser os pacientes com alta carga bacilar e não tratados, que eliminam o bacilo pelas vias áreas superiores e possivelmente pela pele.^(7,8)

O patógeno causador da hanseníase é o *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*). É identificado como um bacilo álcool-ácido resistente, que invade macrófagos da pele e células nervosas.⁽⁹⁾ Ele possui um tempo de crescimento lento e baixa taxa de proliferação e patogenicidade, com um período de incubação médio de 2 a 5 anos, podendo chegar a 10 anos ou mais.⁽¹⁰⁾

O diagnóstico da hanseníase é clínico, sendo que os principais sinais e sintomas são as lesões dermatológicas e o acometimento dos nervos periféricos, conforme fluxograma do Ministério da Saúde.⁽¹¹⁾ Na pele podem estar presentes manchas hipocrômicas placas, pápulas e nódulos que aparecem mais frequentemente na face, dorso, membros superiores e inferiores e nádegas. Do ponto de vista neurológico, dor e espessamento dos nervos, perda de sensibilidade ou força são os sintomas mais comuns.^(12,13)

A doença possui uma quantidade variável de classificações, entre elas a de Madri (1953), a de Ridley e Jopling (1966) e a mais recente da Organização Mundial da Saúde (OMS) (1982). A primeira, utiliza um conjunto de critérios clínicos e uma avaliação bacteriológica, imunológica e histológica para definir 4 grupos, que depois foram ampliados por Ridley e Jopling.⁽¹⁴⁾ Essa classificação, considera que existem dois polos imunológicos da doença, a hanseníase tuberculoide, que teria uma maior resposta da imunidade celular e a virchowiana que teria uma falta dessa resposta. Entre os dois polos, as formas da doença são instáveis, podendo variar de hanseníase dimorfo-tuberculoide (BT – *borderline-tuberculoid*), dimorfo-dimorfo (BB – *borderline-borderline*) e a dimorfo *borderline-virchowiana* (BL - *borderline-virchowian*).^(15,16)

Porém dada a complexidade dessa classificação e a necessidade de exames subsidiários para sua utilização, a OMS criou uma classificação operacional, focada no tratamento, que divide de forma mais ampla em manifestação paucibacilar e

multibacilar,⁽¹⁷⁾ que diferem nos sintomas e possui correlação com as classificações anteriores⁽¹⁸⁾ (Quadro 1). Nesse estudo, os pacientes foram classificados utilizando os critérios da OMS.

Quadro 1. Correspondência entre as classificações de hanseníase

Classificação				
Madri	Indeterminada	Tuberculoide	<i>Borderline</i>	Virchowiana
Ridley e Jopling	TT	TT	BT, BB, BL	LL
OMS	Paucibacilar	Paucibacilar	Multibacilar	Multibacilar

TT: hanseníase tuberculoide-tuberculoide; BT: hanseníase dimorfo-tuberculoide; BB: hanseníase dimorfo-dimorfo; BL: hanseníase *borderline*-virchowiana; LL: hanseníase virchowiana-virchowiana.

Fonte: Adaptada de Souza CS. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. Medicina, Ribeirão Preto;1997;30:325-34. Tabela II – Correlação entre as classificações de Madri (1953), de Ridley & Jopling (1966) e da OMS (1982) adotadas para a hanseníase; p. 326.⁽¹⁸⁾

Os indivíduos classificados como paucibacilar apresentam de 1 a 5 lesões e baciloscopia obrigatoriamente negativa, caso ela seja realizada, o que não é mais obrigatório.⁽¹⁹⁾ Em relação ao comprometimento de nervos periféricos, no Brasil, segundo a última portaria técnica⁽¹¹⁾ e também de acordo com a classificação desenvolvida pelo governo indiano com parceria com a OMS⁽²⁰⁾ é aceitável classificar e tratar pacientes com acometimento de 1 nervo periférico como paucibacilar. A hanseníase multibacilar apresenta pelo menos 6 lesões de pele e/ou baciloscopia positiva. Existe um consenso na literatura em que casos nos quais haja comprometimento de mais de um nervo periférico ou dúvida diagnóstica, devem ser considerados como multibacilar.⁽¹¹⁾

Essa classificação já foi descrita como tendo 89% de sensibilidade e 88% de especificidade. Como limitação, alguns estudos descreveram a possibilidade de pacientes serem classificados clinicamente como paucibacilar, podem ter a baciloscopia positiva, o que geraria um tratamento por menor tempo do que o necessário e maior risco de recorrência.^(16,21)

Os pacientes ainda podem ser classificados pelo grau de incapacidade causado pela doença, em grau 0, grau 1 ou grau 2 (Quadro 2), utilizando a Avaliação Neurológica Simplificada.⁽²²⁾ Essa classificação além de ser importante na avaliação clínica e seguimentos dos pacientes, tem um impacto epidemiológico, pois novos casos classificados como grau 2 indicam um atraso no diagnóstico.⁽¹⁾

Quadro 2. Correlação entre o grau de incapacidade e os critérios avaliados

Grau	Avaliação (mãos/pés/olhos)
0	Sem alteração funcional
1	Perda da sensibilidade e/ou força
2	Perda da sensibilidade e alterações visíveis

Fonte: Adaptado de Lehman LF, Orsini MB, Fuzikawa PL, Lima RC, Gonçalves SD. Avaliação neurológica simplificada. Belo Horizonte: ALM International; 1997.⁽²²⁾

A evolução crônica e lenta da hanseníase pode ser interrompida por eventos agudos, denominados reações hansênicas ou episódios reacionais, caracterizados por uma resposta inflamatória exacerbada. Constituem em aparecimento de sintomas locais ou sistêmicos, que podem levar ao comprometimento de nervos periféricos, com dor acentuada, em qualquer momento durante o curso da doença, tanto durante quanto depois do início do tratamento.^(23,24)

Os episódios reacionais podem ser classificados em dois tipos, a reação tipo 1 e a reação tipo 2.

A reação tipo 1 ou reação reversa, é uma reação inflamatória aguda ou subaguda caracterizada pelo aparecimento de novas lesões dermatológicas ou reativação de lesões antigas e neurites. Ocorre devido a uma hiperativação celular contra o *M. leprae*, com um perfil Th1 e aumento da produção de IFN- γ . O tratamento é realizado preferencialmente com prednisona.^(25,26)

Já a reação tipo 2, conhecida como eritema nodoso hansênico (ENH), ocorre pela formação e depósito de imunocomplexos, gerando um quadro sistêmico, manifestado por nódulos eritematosos dolorosos e manifestações sistêmicas, como neurites, artrites, inflamação ocular e outras.⁽²⁷⁾ Nesses casos o tratamento é realizado preferencialmente com talidomida.⁽²⁸⁾

O Ministério da Saúde Brasileiro, seguindo as recomendações da OMS,⁽²⁹⁾ implantou um programa intenso e coordenado de tratamento poliquimioterápico para hanseníase. O esquema de tratamento no Brasil consiste em doses mensais supervisionadas de rifampicina 600mg, clofazimina 300mg, dapsona 100mg associadas a clofazimina 50mg e dapsona 100mg diariamente e autoadministradas.⁽¹¹⁾ O tempo de tratamento é de 12 meses para os multibacilares⁽³⁰⁾ e de 6 meses para os paucibacilares.⁽³¹⁾ Esse esquema terapêutico possui uma taxa de cura de aproximadamente 98% com baixa taxa de recidiva.^(32,33)

Apesar dos avanços no diagnóstico e tratamento, a hanseníase continua sendo um problema de saúde a nível mundial, levando a OMS a lançar a

Estratégia Global de Hanseníase 2021-2030, que visa a interrupção da transmissão da doença por meio de uma série de metas que envolvem ampliar a prevenção, tratar os casos e suas complicações e combater o estigma da doença. Também são destacadas as lacunas de conhecimento em relação aos fatores ambientais e do hospedeiro que levam ao desenvolvimento da doença, reiterando a importância das pesquisas na área.⁽³⁴⁾

Essa estratégia, reforça a Iniciativa de Pesquisa em Hanseníase (*Leprosy Research Initiative*), documento elaborado pela comunidade científica em 2019, que enumera as prioridades de pesquisa. Dentre elas, está entender como a resposta do sistema imune afeta as manifestações, a progressão e a transmissão da doença, visando novas formas de diagnóstico e tratamento.⁽³⁵⁾

1.2 Sistema imune

Os aspectos imunológicos da hanseníase são de grande importância para o entendimento da doença, já que as diferenças entre as manifestações multibacilar e paucibacilar são principalmente correlacionadas com a resposta imune gerada pelo bacilo e não devido as variações genéticas do *M. leprae*.⁽³⁶⁾

Inicialmente, foi demonstrado que os dois polos clínicos apresentam reações imunológicas consideradas antagônicas, sendo que nas lesões do tipo paucibacilar são mais encontradas citocinas do tipo Th1, como interferon-gama (IFN- γ) e na forma multibacilar, uma resposta do tipo Th2 está presente, com a predominância interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10) e fator de crescimento transformador-beta (TGF- β – *transforming growth factor*).^(37,38) Essa diferença não ocorre apenas em nível local, mas também sistêmico, como foi observado em um estudo que tinha como objetivo verificar a resposta a antígenos de *M. leprae* do sangue periférico de pacientes. Foi descrito que o mesmo antígeno que gerou uma maior produção de IFN- γ em pacientes paucibacilares, levou a uma maior produção de IL-4 nos multibacilares, sendo que essas citocinas são os principais marcadores das diferenças entre os dois polos.⁽³⁹⁾

Em uma ampla avaliação dos parâmetros imunológicos de pacientes mono e coinfectados com hanseníase e vírus da imunodeficiência humana (HIV - *human immunodeficiency virus*), nosso grupo demonstrou que os pacientes monoinfectados pela hanseníase tem aumento na produção de IL-4 por células T CD4⁺. Ainda,

observamos que a hanseníase pode agravar a patogênese do HIV diminuindo a razão CD4:CD8, aumentando níveis de ativação nas células T CD8⁺ e levando a uma perda de células dendríticas (DC – *dendritic cells*) plasmocitoides na periferia.⁽⁴⁰⁾

Com ampliação dos estudos, atualmente vem sendo demonstrado o papel de diversos outros tipos celulares, como T regulatória (Treg), Th17 e Th9 na patogênese da doença. Foi demonstrado que o balanço entre as Treg e as Th17 também contribui para as diferentes manifestações da doença. Pacientes no polo virchowiano (multibacilar), apresentaram um aumento de Treg e da produção de IL-10, enquanto aqueles paucibacilares, demonstraram uma maior quantidade Th17, sugerindo que as Treg, via IL-10, promovem uma inibição do sistema imune nos pacientes multibacilares e que a presença de interleucina-17 (IL-17) contribui para a resposta efetora contra o bacilo.⁽⁴¹⁾

Também foi descrito que em pacientes com hanseníase na forma tuberculoide, nas lesões cutâneas e nas células mononucleares do sangue periférico (PBMC – *peripheral blood mononuclear cell*) ativadas com o antígeno *M. leprae*, foi encontrada maior expressão e liberação de IL-17.⁽⁴²⁾ Outros estudos já haviam descrito que a IL-17 é benéfica nas fases iniciais da doença, através da ativação dos macrófagos e uma maior resposta Th1.^(43,44) Dentre os diversos tipos celulares, um estudo recente mostrou que as células T $\gamma\delta$ não só estão presentes em grande quantidade nas lesões paucibacilares como estão produzindo IL-17.⁽⁴⁵⁾

Demonstrando a complexidade da resposta imune a hanseníase, outro tipo de linfócito que foi descrito como relevante foi o Th9, que forma uma subpopulação de células T auxiliares CD4⁺, caracterizada pela produção das interleucinas-9 (IL-9) em resposta ao conjunto TGF- β e IL-4, sendo inibida pela presença de IFN- γ .⁽⁴⁶⁾ Foi demonstrado que a presença de IL-4, em conjunto com TGF- β inibe a diferenciação das Treg e leva ao desenvolvimento das Th9, que produzem elevadas quantidades de IL-9 e IL-10 e contribuem para a inflamação.⁽⁴⁷⁾ Essas células estão presentes em grande quantidade nos granulomas de lesões em pacientes no polo tuberculoide, mas não no lepromatoide, possivelmente regulando negativamente a produção de IL-10 e IL-4.⁽⁴⁸⁾

Dada a imensa variedade de tipos celulares e citocinas envolvidas na resposta imune da hanseníase, o foco deste estudo foi o papel das células da imunidade inata, as células T matadoras naturais (NKT – *natural killer T*), células linfoides inatas do

tipo 2 (ILC2 – *innate lymphoid cell type 2*), os monócitos e as DC, na hanseníase multibacilar.

1.2.1 NKT

As células NKT são um subtipo de células T que expressam marcadores específicos de células NK e possuem um receptor de células T (TCR-T – *T-cell receptor*) invariante, V α 24J α 18^(49,50) que reconhecem principalmente glicolipídios apresentados pela molécula CD1d, uma molécula não clássica do complexo principal de histocompatibilidade (MHC – *major histocompatibility complex*).^(49,51) O CD1d é expresso em células epiteliais e estromas em diferentes locais, como no sistema gastrointestinal, fígado, pâncreas e pele.⁽⁵²⁾ Uma das principais características das NKT é a capacidade de produzir uma grande gama de citocinas, tanto da resposta Th1 como da Th2.⁽⁵³⁾ O desenvolvimento das células NKT está relacionado a expressão do fator de transcrição *promyelocytic leukemia zinc finger* (PLZF), sendo descrito que a ausência dele impede a expansão, maturação e migração dessas células.⁽⁵⁴⁾

Diversos estudos vêm demonstrando a ligação entre alterações da quantidade e funcionalidade das células NKT para a resposta contra agentes externos, como *Chlamydia trachomatis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*^(55,56) e também em doenças sistêmicas como lúpus eritematoso sistêmico, HIV e colite.⁽⁵⁷⁻⁶¹⁾

Em relação as respostas as micobactérias, primeiro foi descrito o papel das NKT em modelos de tuberculose. Foi demonstrado que glicolipídios provenientes do *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) são capazes de estimular as células NKT e que após o reconhecimento, produzem altos níveis de IFN- γ e diminuem a produção de IL-4, o que contribui para o combate a infecção.⁽⁶²⁾ Além disso, em camundongos, são as células NKT as predominantes nos granulomas.⁽⁶³⁾

Na hanseníase, as células NKT também estão presentes nos granulomas de pacientes com hanseníase tuberculoide. Ainda, na análise do sangue periférico, o repertório de TCR Va era restrito, com uma forte tendência ao uso dos segmentos V α 6 e V α 14.⁽⁶⁴⁾

Outro estudo, analisou o sangue periférico para avaliar o papel das NKT nos diferentes polos da hanseníase. Ele demonstrou uma alta proporção de células

T citotóxicas e NKTs em pacientes no polo multibacilar quando comparados ao paucibacilar, mas que sua presença se correlacionava com a expressão de ligante de morte programada 1 (PD-L1 – *programmed death-ligand 1*), sugerindo um perfil de exaustão dessas células. Destacou-se que tanto as NKT como as TCD8⁺ desempenham um papel crucial no perfil de produção de citocinas, sejam pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias.⁽⁶⁵⁾

Nosso grupo publicou dados que demonstram a diminuição de células NKT em pacientes tanto mono como coinfectados com hanseníase e HIV, contudo essas mesmas células estavam com a produção aumentada de IFN- γ , sugerindo um maior estado de ativação.⁽⁶⁶⁾

1.2.2 ILC

As células linfoides inatas (ILC) são uma ponte importante entre a resposta imune inata e a adquirida. Elas são subdivididas em três grupos principais relacionados à sua função efetora. As células linfoides inatas do tipo 1 (ILC1 – *innate lymphoid cell type 1*) são caracterizadas pela produção de citocinas do tipo Th1, IFN- γ e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), as ILC2 tem perfil Th2, caracterizadas por secreção de interleucinas IL-4, interleucina-5 (IL-5) e interleucina-13 (IL-13) e as células linfoides inatas do tipo 3 (ILC3 – *innate lymphoid cell type 3*) possuem perfil Th17 sendo capazes de produzir IL-17 e interleucina-22 (IL-22).⁽⁶⁷⁾

As ILC2 requerem a presença de interleucina-7 (IL-7) para seu desenvolvimento e expressam os receptores de IL-7 (CD127)⁽⁶⁸⁾ e de *chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on TH2 lymphocytes* (CRTH2) na sua superfície.⁽⁶⁹⁾ Em relação aos fatores de transcrição, essas células dependem da expressão de GATA3 para o seu desenvolvimento e função.⁽⁷⁰⁾

Do ponto de vista funcional, as ILC2 apresentam uma capacidade de promover reparação tecidual após inflamação por parasita intracelular.⁽⁷¹⁾ Contudo, foi demonstrado que essa célula possui um papel importante nas reações alérgicas, via secreção de IL-5 e IL-13 contribuindo para o acúmulo de eosinófilos e macrófagos.⁽⁷²⁾ Outro estudo descreveu a diminuição das ILC no trato gastrointestinal de pacientes com infecção por HIV.⁽⁷³⁾ Além de seu papel na resposta inata, elas promovem o aumento da

taxa de proliferação das células T CD4⁺ e a produção de IL-2 em pacientes asmáticos, sendo um dos responsáveis pela inflamação encontrada nessa doença.⁽⁷⁴⁾

Na pele, as ILC2 vêm ganhando especial atenção, por serem consideradas células residentes, possuindo uma capacidade de migração para os linfonodos. Em camundongos, produzem IL-13, interagem com mastócitos, que após a ativação com IL-2, são capazes de expandir sua população e assumir um fenótipo mais inflamatório, com a produção de IL-5.⁽⁷⁵⁾

Em relação as doenças de pele, as ILC2 foram estudadas na dermatite atópica e na hidradenite supurativa. Os estudos em dermatite atópica, demonstram que as ILC2 estão aumentadas tanto na lesão como na circulação sanguínea, nos modelos animais e em amostras de pacientes, sendo recrutadas após o início do processo alérgico, contribuindo para a inflamação local.^(76,77) Por outro lado, em um estudo sobre hidradenite supurativa, os números absolutos de ILC estavam reduzidos na periferia dos pacientes quando comparados aos controles, mas aumentados nas áreas de lesão.⁽⁷⁸⁾

O papel das ILC2 também foi investigado contra as micobactérias, especificamente as *M. tuberculosis*. Foi descrito que em pacientes com *diabetes mellitus* associado ou não a tuberculose, havia uma menor quantidade de ILC2 e ILC3, com aumento da produção de IFN- γ e diminuição de IL-13.⁽⁷⁹⁾ Já na resposta ao *M. leprae*, um trabalho anterior do nosso grupo, identificou que em pacientes coinfectados com HIV e hanseníase, as ILC2 estavam aumentadas quando comparadas aos controles, sugerindo um perfil mais Th2, apesar de uma diminuição relativa na produção de citocinas.⁽⁸⁰⁾

1.2.3 Monócitos

Os monócitos são células da imunidade inata, originadas de precursoras na medula óssea, que exercem suas funções ao circular na corrente sanguínea,⁽⁸¹⁾ sendo então recrutados para o combate de patógenos nas áreas de inflamação e para a manutenção da homeostasia, originando macrófagos e DC nos tecidos.^(82,83)

Para o estudo das suas funções, eles são divididos em subtipos, identificados de acordo com a expressão de CD14 associada ou não com a de CD16.

Os clássicos apresentam uma alta expressão de CD14 e negativa para CD16 (CD14⁺⁺ e CD16⁻), enquanto os não clássicos expressam CD16 e baixos níveis de CD14 (CD14⁺CD16⁺⁺), sendo que essa divisão já está bem estabelecida.^(84,85) Contudo, mais recentemente, foi descrita a subdivisão dos monócitos CD16⁺, com a identificação de um grupo intermediário (CD14⁺⁺CD16⁺).^(86,87) Esses grupos não diferem apenas na expressão de CD14 e CD16, mas também em diversas outras proteínas de superfície,⁽⁸⁸⁾ expressão gênica e produção de citocinas.⁽⁸⁹⁾

Em indivíduos saudáveis, os clássicos correspondem em torno de 85% dos monócitos circulantes, seguidos dos não clássicos, em torno de 10%, e os intermediários com 5%, sendo que as quantidades se alteraram em condições inflamatórias, com o aumento da proporção daqueles CD16⁺.^(90,91)

É proposto que a cinética da circulação dos monócitos ocorra a partir da medula óssea com o fenótipo clássico, sendo que uma pequena parte, ainda na circulação, se diferencie para o intermediário. Esses então, poderiam ir para os tecidos e ao retornar à circulação, passam a ter características dos não clássicos, sendo esse subtipo o mais maduro.^(89,92,93)

Os monócitos clássicos possuem funções fagocíticas e de produção de citocinas como TNF, IL-6 e IL-1 β em resposta a agonistas receptores *toll-like* (TRLs – *toll-like receptors*), atuando na fase inicial da resposta imune.⁽⁹⁰⁾ São capazes de migrar dos vasos sanguíneos para os tecidos, se diferenciando e repondo a população de macrófagos e de DC.⁽⁹⁴⁾ Em um modelo com camundongos, foi demonstrado que a presença de CCR2 é essencial para a saída dessas células da medula óssea para a circulação.⁽⁹⁵⁾ Ao comparar os monócitos clássicos com aqueles CD16⁺, foi sugerido que eles produzam mais TNF ao serem estimulados via receptores de TLR4 e TLR2.⁽⁹⁶⁾

Em um estado basal, os monócitos não clássicos exercem suas funções nos vasos sanguíneos, sendo referidos como monócitos de patrulhamento.⁽⁹⁷⁾ Eles apresentam um metabolismo mitocondrial acentuado, que pode estar associado com funções de reparação tecidual.⁽⁹⁸⁾ Foi também demonstrado que esses monócitos são essenciais na resposta imune contra os vírus, com a produção principalmente de TNF, IL-1b e CCL3.⁽⁹⁹⁾

Apesar de semelhanças com os outros dois subtipos de monócitos, os intermediários possuem diferenças significativas, que sugerem funções imunológicas únicas, como uma maior propensão para apresentação de antígenos⁽¹⁰⁰⁾ e também com

uma maior produção de IL-10, expressão de CD163 e atividade fagocítica.⁽¹⁰¹⁾ Mais estudos vêm sendo feitos para o entendimento funcional desse tipo celular.

Ao estudar a relação dos monócitos com as micobactérias, inicialmente na tuberculose foi demonstrado o papel central dessas células no combate da infecção. Inicialmente, o aumento na circulação de células CD14⁺ foi descrito e apesar de ser mais significativo nos pacientes com a forma pulmonar, também foi observado em outros tipos de tuberculose, sendo que os valores retornam para normalidade com o tratamento.⁽¹⁰²⁾ Em relação a resposta local, num estudo com camundongos, foram as células CD16 negativas as predominantes nas áreas de lesão.⁽¹⁰³⁾

Ao investigar o papel dos monócitos CD16⁺, eles também tiveram um aumento na frequência em pacientes com tuberculose quando comparados aos controles saudáveis, porém com uma diminuição na expressão de marcadores relacionados a maturação, diferenciação e fagocitose.⁽¹⁰⁴⁾ Estudos iniciais também reforçaram o papel dos monócitos CD16⁺ na resposta ao bacilo, com um aumento da expressão de CCR2 e consequente capacidade de migração, sendo que no líquido pleural, teriam um papel na apresentação de antígenos e combate a infecção. Apesar disso, esse mesmo estudo sugeriu também um papel negativo dos monócitos CD16⁺, já que seu aumento no sangue periférico se associou com a severidade da doença e com a resistência bacteriana.⁽¹⁰⁵⁾

Em relação aos monócitos intermediários, ao diagnóstico, pacientes com tuberculose ativa tinham aumento na frequência dessas células, com maior expressão de MHC-II e capacidade de ativar as células T. Essas alterações nos monócitos foram transitórias, não sendo observadas nos mesmos pacientes durante o tratamento, sugerindo uma resolução da infecção.⁽¹⁰⁶⁾

De forma geral, há uma associação entre o aumento de monócitos circulantes e a infecção ativa por tuberculose, com alteração do fenótipo dessas células, sendo sugerido que os monócitos podem ser usados como um biomarcador para o risco de desenvolver tuberculose.^(107,108)

Desde o início sobre a hanseníase, os monócitos foram sugeridos como células supressoras da resposta imune,⁽¹⁰⁹⁾ sendo descrito que as células mononucleares falhavam em produzir citocinas inflamatórias em pacientes com hanseníase multibacilar quando comparados a paucibacilares.⁽¹¹⁰⁾ Outros estudos, também avaliando monócitos em indivíduos multibacilares, observaram a produção de

fatores solúveis, principalmente IL-10 e prostaglandina E2, que inibiam a proliferação de células T e contribuía para um estado de anergia.^(111,112)

In vitro, os monócitos de doadores saudáveis, quando estimulados com *M. leprae*, produziram menos citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-18, IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- α) e mais moléculas reguladoras negativas (MCP-1 e IL-1Ra) do que quando estimulados com BCG.^(113,114) Outro estudo demonstrou que o glicolípido fenólico 1 (PGL-1 – *phenolic glycolipid-1*), uma proteína específica da membrana do *M. leprae*, também levou a uma fraca produção de TNF- α , IL-1b e IL-10, ao mesmo tempo que aumentou MCP-1, IL-1Ra e VEGF, quando comparado com lipopolissacarídeo (LPS).⁽¹¹⁵⁾

Em relação as diferentes formas clínicas da hanseníase, os monócitos de pacientes multibacilares produziram quantidades significativamente maiores de IL-12 quando estimulados via HLA de classe II do que aqueles do grupo paucibacilar, não sendo observadas diferenças na produção de IL-1b.⁽¹¹⁶⁾ Os monócitos podem reconhecer o *M. leprae* via receptor TLR2, sendo que uma mutação nesse receptor está associada a uma menor produção de IL-12.⁽¹¹⁷⁾

Na avaliação das reações hansênicas, havia um aumento na frequência dos monócitos intermediários e uma diminuição dos não clássicos quando comparados ao grupo com apenas hanseníase, independente da reação ser do tipo 1 ou do tipo 2.⁽¹¹⁸⁾

Além disso, os macrófagos são células essenciais para o entendimento da resposta imune da hanseníase, sendo os responsáveis pelas desmielinização e lesão nervosa⁽¹¹⁹⁾ e contribuindo para os diferentes polos da hanseníase.^(14,37,120)

Os macrófagos derivados de monócitos podem assumir um fenótipo inflamatório⁽¹²¹⁾ na forma paucibacilar ou anti-inflamatório nos multibacilares, o que contribui para a maior gravidade e falta de resposta imune nas áreas de lesão.⁽¹²²⁻¹²⁴⁾

Foi demonstrado que o estímulo IL-10 levou os macrófagos a assumirem um fenótipo mais fagocítico, com aumento da expressão de CD163, o que também era encontrado nos macrófagos das lesões multibacilares. Por outro lado, o estímulo com IL-15, levou a uma expressão gênica relacionada com os programas antimicrobianos. Nos pacientes com reação reversa (tipo 1) havia uma conversão do programa fagocítico para o programa antimicrobiano.⁽¹²⁵⁾ Nas áreas de lesão de pacientes multibacilares, os macrófagos tem uma maior expressão de CD163, o que se

correlaciona com aumento na secreção de IL-10 e da fagocitose, o que favoreceria a sobrevivência do bacilo.⁽¹²⁶⁾

Outro estudo, também com macrófagos derivados de monócitos, encontrou resultados similares, ao utilizar o *M. leprae* como estímulo, os macrófagos tiveram um fenótipo M2, com diminuição de citocinas inflamatórias (IL-1b, IL-6, TNF- α) e da expressão de MHC-II, com aumento de IL-10 e CD163. Além disso, essas células foram mais resistentes a citotoxicidade de T CD8⁺ e favoreceram a diferenciação de linfócitos T para Treg. Nesse estudo, os monócitos de pacientes com hanseníase multibacilar expressaram preferencialmente IL-10 enquanto aqueles de paucibacilares expressaram IL-12 e TNF- α .⁽¹²⁷⁾

Na coinfeção de hanseníase e HIV, os macrófagos também contribuem para a progressão da doença. Em um estudo comparando pacientes com HIV e com reação reversa e HIV, não foram encontradas diferenças nos subtipos de monócitos na periferia, mas a análise nas áreas de lesão mostrou que a coinfeção com HIV manteve um fenótipo mais anti-inflamatório dos macrófagos, mesmo com estado de reação reversa.⁽¹²⁸⁾

Já os monócitos de pacientes com hanseníase paucibacilar são capazes de se transformar tanto em macrófagos quanto em DC quando estimulados via TRLs. Essa capacidade não foi observada nos monócitos de pacientes multibacilares, que se diferenciaram predominantemente em macrófagos. Esses resultados, obtidos em experimentos *in vitro*, foram corroborados por análises de amostras de tecido, onde se observou um aumento de DC nas lesões de pacientes com reação reversa.⁽¹²⁹⁾

1.2.4 Células dendríticas

As DC atuam conectando a imunidade inata e a adquirida, através do reconhecimento de antígenos para a ativação de linfócitos e na indução de tolerância com os antígenos próprios.⁽¹³⁰⁾

São formadas na medula óssea e através da circulação sanguínea, migram para os tecidos (como o fígado, a pele, pulmão e intestino) e para os linfonodos, onde terminam seu processo de maturação e exercem sua função de apresentação de antígenos e ativação das células T.^(131,132) Além disso, também participam da fase inicial da resposta imune, através da produção de citocinas e quimiocinas.⁽¹³³⁾

No sangue, diversas subdivisões foram identificadas, sendo no estado basal, divididas principalmente em células dendríticas plasmocitoides (pDC – *plasmacytoid dendritic cell*) e em mieloides ou convencionais.^(86,134)

As diferenças funcionais entre esses grupos incluem uma com variabilidade de fatores de transcrição, receptores e na ontogenia.^(135,136)

As DC correspondem a uma pequena quantidade na circulação sanguínea, entre 0,1 a 2% em indivíduos saudáveis, sendo em sua maioria as células dendríticas mieloides (mDC – *myeloid dendritic cells*), podendo ser caracterizadas por não expressarem marcadores de linhagem (Lin neg) e pela positividade de HLADR e CD11c.⁽¹³⁷⁾ Elas expressam uma grande gama de receptores TLRs, sendo capazes de responder a sinais que variam de nucleotídeos a polissacáridos.⁽¹³⁸⁾ São mais eficientes para a apresentação cruzada de antígenos e ativação citotóxica, produção de IL-12 e interferon lambda 3 (IFN- λ).⁽¹³⁹⁾ As dendríticas convencionais também são capazes de induzir a resposta Th1 e Th17 nos linfócitos T CD4.⁽¹⁴⁰⁾

Especialmente na pele, existem dois tipos principais de DC residentes, de origem mielóide, sendo que as células de Langerhans estão localizadas na epiderme e possuem uma baixa reatividade a bactérias, enquanto as DC na derme, expressam TLR2, TLR4 e TLR5, sendo importantes no combate aos patógenos.⁽¹⁴¹⁾

As pDC são caracterizadas como HLADR⁺ CD11c⁻CD123⁺ e foram identificados como um subtipo especializado em reconhecer e responder a infecção viral, migrando para os linfonodos e com a produção rápida de interferon tipo I.^(142,143)

Outro subtipo, são as DC inflamatórias, que estão presentes de forma transitória em resposta a estímulos microbianos e inflamatórios, sendo inferido que tanto os monócitos clássicos como os precursores hematopoiéticos podem originar esse tipo celular.⁽¹³⁴⁾ As DC derivadas de monócitos, nos tecidos, possuem diversas funções como controlar a infecção e iniciar a reparação tecidual.⁽⁸¹⁾

Para além do estado basal, as DC também foram estudadas no contexto inflamatório cutâneo, como dermatite atópica, lúpus e a psoríase.⁽¹⁴⁴⁾ A psoríase é uma doença inflamatória crônica, caracterizada por placas escamosas e eritematosas na pele, que pode ser acompanhada por manifestações sistêmicas, sendo proposto um papel central das dendríticas para o início e manutenção da doença.⁽¹⁴⁵⁻¹⁴⁷⁾

É proposto que nas fases iniciais da psoríase, as células pDCs, infiltram a derme e ao reconhecerem os antígenos próprios, produzam IFN- α ⁽¹⁴⁸⁾ que causa a maturação das DC residentes e também a diferenciação dos monócitos em DC,

sendo que essas células têm a capacidade de produzirem uma grande gama de citocinas que ativam e diferenciam os linfócitos T para Th1 e Th17.⁽¹⁴⁹⁾ Um modelo com camundongos demonstrou que as dendríticas derivadas de monócitos (moDC) são recrutadas para as áreas de lesão, produzem TNF e IL-1b e geram a inflamação característica da psoríase.⁽¹⁵⁰⁾

Para além das manifestações cutâneas, existem alterações sistêmicas na psoríase, sendo que foi demonstrada uma correlação positiva entre a quantidade de IFN- γ , IL-12, IL-17 e IL-18 na circulação e a severidade da doença.⁽¹⁵¹⁾ Ao analisar especialmente as DC, no sangue periférico, as células mieloides de pacientes com psoríase, apresentavam um fenótipo mais imaturo e maior produção de IL-12, em comparação com os controles saudáveis.⁽¹⁵²⁾ Em relação as pDC, elas estavam diminuídas tanto em quantidade como na produção de citocinas,^(152,153) o que levou a um aumento na relação mieloide/plasmocitoides.⁽¹⁵³⁾ Essa alteração foi revertida após o tratamento com um anticorpo anti-TNF (infliximab), com um aumento total das dendríticas na circulação.⁽¹⁵⁴⁾

Em relação a hanseníase, o papel central de ativação imune das DC já foi descrito, principalmente como primeira linha de defesa na pele.⁽¹²⁰⁾ Comparando os efeitos de diferentes micobactérias, *M. tuberculosis*, BCG e *M. leprae*, foi descrito que apenas o bacilo causador da hanseníase, não induzia a ativação e maturação das DC, inclusive possuindo um efeito supressor na expressão gênica dessas células, além das células T não terem proliferado em resposta as DC estimuladas com *M. leprae*.⁽¹⁵⁵⁾ Outro estudo demonstrou que para as DC estimuladas com *M. leprae* expressassem de CD83 e promovessem a proliferação dos linfócitos T, era necessário utilizar concentrações muito altas do bacilo, sendo ainda significativamente menor do que a ativação causada por outras micobactérias. O *M. leprae* reduzia a expressão do MHC e não aumentava a expressão de CD86.⁽¹⁵⁶⁾ De forma geral, foi concluído que o *M. leprae* não leva uma ativação das DC, mas sim uma anergia.

Também já foi demonstrado que o reconhecimento das micobactérias envolve o receptor CD209/DC-SIGN, que está presente nas DC, sendo que mutações alélicas no gene responsável por esse receptor estão associadas ao desenvolvimento da forma paucibacilar da hanseníase.⁽¹⁵⁷⁾

A importância local das DC foi demonstrada, inicialmente através da avaliação da expressão da proteína CD1, que nos granulomas de pacientes com a forma tuberculoide, estava aumentada, sendo majoritariamente expressa por DC maduras.⁽¹⁵⁸⁾

Análises imuno-histoquímicas das áreas de lesão, confirmaram os resultados anteriores, demonstrando uma predominância das DC nas lesões tuberculoides, tanto das células de Langerhans como as DC na derme.⁽¹⁵⁹⁾ Outro estudo que também avaliou as áreas de lesão, encontrou resultados similares, com aumento estatisticamente significativo das células de Langerhans CD1a+ e as DC na derme nos pacientes com lesões paucibacilares quando comparados aos multibacilares.⁽¹⁶⁰⁾ De forma geral, sugere-se que as DC estejam aumentadas nas áreas de lesão da forma paucibacilar, influenciando na ativação da imunidade celular desse subtipo clínico.

Já a análise do sangue periférico de pacientes com eritema nodoso, sugeriu uma ativação da via de sinalização do IFN-I, assim como nas biopsias de pele, sendo que o tratamento com talidomida, levou a uma redução dessa ativação tanto na circulação como nas áreas de lesão. Nesse mesmo estudo, foram estudadas as DC plasmocitoides, que estavam reduzidas no sangue, porém aumentadas nas áreas de lesão, sendo sugerido um papel dessas células nas reações hansênicas.⁽¹⁶¹⁾ As pDC também são importantes nas reações do tipo 1 de pacientes multibacilares, nas quais há elevada expressão de CD123 pelas pDC nos granulomas.⁽¹⁶²⁾

Outros estudos também já demonstraram que as pDC estavam reduzidas na circulação periférica de pacientes com hanseníase e/ou coinfectados com HIV.⁽⁴⁰⁾

A expressão de B7-1/CD80, um marcador de ativação, que está envolvido na resposta das DC ao *M. leprae*,⁽¹⁶³⁾ está aumentada nas DC de pacientes com reação do tipo 1 e do tipo 2, tanto na circulação como nas áreas de lesão, o que poderia estar relacionado a uma ativação imune dessas células, já que em pacientes multibacilares, esse mesmo marcador está diminuído.⁽¹⁶⁴⁾

Em outro estudo, sobre pacientes com hanseníase tanto na primeira infecção como em casos reincidentes, demonstrou uma diminuição da ativação das DC e dos monócitos em ambos os grupos de pacientes quando comparados aos controles saudáveis, sendo ainda menor a expressão de CD86 nos reincidentes, que também eram menos responsivos a antígenos.⁽¹⁶⁵⁾

O estudo da imunidade inata em pacientes com hanseníase multibacilar é importante para que se amplie o entendimento da doença e de suas diversas formas clínicas e assim promover um tratamento mais direcionado, personalizado e efetivo.

1.3 Objetivos

1. Analisar no sangue periférico a frequência das células NKT e ILC2 de pacientes com hanseníase multibacilar, comparando com os controles;
2. Analisar no sangue periférico os monócitos e seus subtipos (clássico, intermediário, não clássico), comparando com os controles;
3. Analisar no sangue periférico as células dendríticas e seus subtipos (mieloide e plasmocitoides);
4. Analisar a presença das células NKT e ILC2 nas áreas de lesão de pacientes com hanseníase multibacilar, antes e após o início do tratamento.

2 MÉTODOS

2.1 Seleção de pacientes

Os pacientes incluídos na pesquisa foram aqueles que atendidos em consulta no ambulatório de dermatologia da Universidade Federal de São Paulo entre 2016 e 2017, com os seguintes critérios de inclusão: pacientes com hanseníase multibacilar, maiores de 18 anos, com sorologia negativa para sífilis, doença de Chagas, hepatite B, hepatite C e o vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV-I/II). Foram obtidas amostras de sangue e tecido de 12 pacientes com diagnóstico de hanseníase multibacilar, no momento do diagnóstico. Para 5 pacientes, foram obtidas amostras de tecido após o término do tratamento. Os pacientes foram avaliados, através da anamnese e do exame físico, para o diagnóstico dos estados reacionais.

Os controles foram obtidos através de amostras de sangue periférico de 10 voluntários saudáveis, que foram coletados nos mesmos locais dos pacientes. Todas as amostras foram processadas e armazenadas no Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein (IIEPAE). Todos os pacientes foram esclarecidos sobre o estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein e da Universidade Federal de São Paulo (CAAE 54494816.3.3002.5505), e SGPP nº. 26341-6.

2.2 Processamento das células mononucleares do sangue periférico

A coleta de 30 mililitros (mL) de sangue periférico foi feita através de punção de veia periférica em membro superior, após assepsia local. O sangue coletado foi encaminhado ao laboratório para processamento, em ambiente estéril. Para isolamento das PBMC, a amostra foi diluída na proporção 1:1 em solução salina balanceada de Hanks (HBSS – *Hank's balanced salt solution*), da GIBCO® - ThermoFisher, e transferidas para tubos com 15mL de solução gradiente de densidade Ficoll (Ficoll® Paque Plus – Sigma-Aldrich). Em seguida, realizou-se a centrifugação a

2300 rotações por minuto (rpm), com temperatura entre 18°C (graus Celsius) e 20°C, durante 40 minutos e com aceleração de 4 e desaceleração 0 para lavagem.

Após a finalização da centrifugação, houve a formação de uma nuvem com as PBMC. Em seguida, cuidadosamente, com uma pipeta Pasteur estéril, foi feita a transferência dessa nuvem para outro tubo cônico, completou-se o volume com HBSS e o tubo foi centrifugado novamente a uma velocidade de 1700rpm, com temperatura entre 18 e 20°C, durante 10 minutos e com aceleração e desaceleração de 9. Esta etapa de lavagem foi realizada duas vezes após o término da segunda centrifugação, as células foram incubadas por dois minutos com 3mL de solução de lise de hemácias (Ammonium-Chloride-Potassium ACK *Lysing Buffer* - GIBCO® - ThermoFisher). Após esse período, foram acrescentados 10mL de meio de cultura R-10, que compreende meio RPMI acrescido de 10% de soro fetal bovino, 1% de tampão HEPES, 1% de piruvato de sódio, 1% de penicilina – estreptomicina e 1% de L-glutamina, para inativação da solução lisante e uma nova centrifugação com os mesmos parâmetros ao passo anterior foi realizada. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em 10mL de meio de cultura R10 para verificação da viabilidade celular e contagem das células.

Para avaliação da viabilidade de células, elas foram coradas em azul de tripan (Trypan Blue) na proporção de 10 microlitros (µL) do corante para 10µL de células e em seguida, o número de células foi avaliado através da contagem celular no aparelho *Countess™ II Automated Cell Counter*. Após a contagem, essas células foram ressuspensas em meio de congelamento 30mL RPMI (Gibico-Thermo Fischer Scientific), 15mL soro fetal bovino e 5mL dimetilsulfóxido (DMSO). Ao final as células foram transferidas para criotubos e permaneceram no *freezer* a -20°C durante 24 horas. Em seguida foram colocadas em nitrogênio líquido, onde permaneceram até o momento de uso.

2.3 Exames laboratoriais

Para a realização do hemograma, foram coletados 2mL de sangue periférico em tubo contendo ácido etilenodiamino (EDTA), tanto dos pacientes quanto dos controles. O hemograma foi feito no equipamento Sysmex XP-300 seguindo as orientações do fabricante. Os valores de referência utilizados foram: hemoglobina (feminino 12 a 16 gramas/decilitros (g/dL) masculino: 13,5 a 18g/dL); hematócritos

(feminino: 35 a 45%, masculino: 40 a 50%); leucócitos totais (feminino: 4100 a 8900 milímetros cúbicos/decilitros ($\text{mm}^3/\mu\text{L}$); masculino: 3600 a 9100 $\text{mm}^3/\mu\text{L}$) e linfócitos (feminino: 1200 a 5200 $\mu\text{L}/\text{mm}^3$; masculino: 1200 a 5200 $\mu\text{L}/\text{mm}^3$).

2.4 Biópsia de pele e/ou nervo

As biópsias de pele foram coletadas por meio do uso do bisturi cônico “*punch*” com 5 milímetros (mm) de diâmetro, após assepsia e anestesia por punção intradérmica com lidocaína a 2%. Fragmentos de 4 micrometros (μm) das lesões foram preparados e fixados em formol e embebidos em parafina. Após análise de diagnóstico do fragmento, o restante da amostra foi destinado à pesquisa das células ILC e NKT. Através do auxílio do patologista, foram feitos cortes, a partir de blocos de parafina, nos locais apontados como lesões de hanseníase.

2.5 Imunofluorescência e microscopia confocal

O uso da microscopia confocal já está consolidado no campo da imunologia, pela possibilidade de utilizar marcadores fluorescentes, que promovem uma imagem tridimensional, com maior resolução e sensibilidade.^(166,167) Para a marcação de imunofluorescência, foram feitos cortes de 5mm, que foram desparafinados em estufa a 60°C por 40min. Em seguida, foram diafanizados em xilol por 10 minutos, a temperatura ambiente, hidratados em uma bateria de álcool etílico (concentrações de 100, 95 e 70%) por 30 segundos em cada concentração e por último permaneceram por 1 minuto em água corrente. Em seguida, as lâminas passaram por um processo de desmascaramento em tampão citrato (pH 6,0) durante 15 minutos no micro-ondas. Em seguida, as lâminas foram lavadas 3 vezes com tampão fosfato-salino (PBS – *phosphate buffered saline*) acrescido de 0,5% de Tween-20, incubadas por 10 minutos com Saponina 0,5% para a permeabilização e, em seguida, com a solução de bloqueio (2% de glicina em PBS + albumina do soro bovino 1%) por 1 hora, à temperatura ambiente.

Para marcação das células NKT, os tecidos foram incubados com os anticorpos primários de camundongo anti-humano CD1d (clone NOR3.2/13.17) da Abcam (Cambridge, UK) e coelho anti-humano CD3 (clone MRQ-39) da Cell Marque™

(Darmstadt, Germany) por 18 horas. As lâminas foram então lavadas com PBS. Os anticorpos secundários utilizados foram alexa 488 anti-camundongo e alexa 568 anti-coelho (Life Technologies Waltham, MA, USA), em incubação por 2 horas e em temperatura ambiente. As lâminas foram novamente lavadas com PBS e incubadas com os anticorpos anti-CD8 PE-CF594 (RPA-T8) e anti-TNF- α PE (MAb11) ambos da BD Biosciences (San Jose, CA, USA) e anti-CD4 BV605 (OKT4), anti-IL-9 Alexa-647 (MH9A3), e anti-IFN- λ PE-Cy7 (B27) da BioLegend (San Diego, CA, USA) por 2 horas, à temperatura ambiente.

Para a marcação das células ILC2 os tecidos foram incubados com anti-CD7 célula apresentadora de antígenos (APC – *antigen-presenting cells*) (8H8.1) da Beckman Coulter (Brea, California, United States), anti-CD117 PE-CY7 (104D2), anti-CD127 BV605 (HIL-7R-M21), anti-CRTH2 PE-CF594 (BM16) e anti-CD45 APC-H7 (2D1) durante 2 horas, à temperatura ambiente.

Após a incubação com os anticorpos, os tecidos foram lavados com PBS e finalmente, foi feita a incubação com DAPI (*4',6-diamidine-2'-phenylindole*) para a marcação do núcleo celular durante 5 minutos. As lâminas foram montadas com o reagente anti-desbotamento (Prolong Golgi, Life Technologies) e lidas em microscópio confocal LSM 710 (Carl Zeiss Jena, Germany). As imagens foram feitas utilizando o *software* ZEN 2012 SP2 (Black, 64 bits) Release Version 11.0 (Carl Zeiss, Jena, Germany). Para cada amostra, foram feitas fotos de 3 a 5 campos ao longo de toda a lâmina.

As fotos foram então analisadas por um especialista em confocal, que avaliou a viabilidade das fotos e realizou a contagem manual da quantidade ILC e NKT por foto, utilizando os mesmos critérios para todos os pacientes e fotos. Para a verificação da produção de citocinas e dos subtipos de NKT, foi realizada nova análise, a partir das células NKT já selecionadas previamente. Foi realizada a verificação da presença ou ausência do marcador, também utilizando os mesmos critérios.

2.6 Extração de RNA e PCR quantitativo em tempo real

As amostras de PBMC foram descongeladas e em seguida o RNA foi extraído usando o *kit Pure Link® RNA Mini* (Thermo Fischer Scientific), seguindo as instruções do fabricante. Com o objetivo de eliminar o DNA residual genômico extraído

junto com o RNA, as células foram lisadas com solução de lise acrescida da enzima RNasefree (DNase I), na proporção 1:100. Para cada orifício da placa foi adicionado 50µL da solução de lise, seguido por incubação por 5 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, foi acrescentado 5µL de solução *Stop* e incubado por 2 minutos. Ao final, o lisado totalizou 55µL contendo RNA total e foi realizada a quantificação em NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

O cDNA foi obtido a partir de 400ng de RNA total usando a Transcriptase Reversa SuperScript™ III (Thermo Fischer Scientific). As reações foram realizadas no sistema QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR (Applied Biosystems) usando o SYBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies). As reações foram incubadas a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. As amostras foram analisadas em triplicata e normalizadas de acordo com os níveis de amplificação do gene constitutivo gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e GATA3, IL-6, Va24, PLZF e IL-9, encomendados da Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). As sequências *primers forward* e *reverse* para os genes de interesse estão descritas a seguir (Quadro 3). Os níveis de expressão gênica foram calculados usando a quantificação relativa do *software* Thermo Fisher Cloud. As expressões relativas de mRNA foram analisadas usando o método $\Delta\Delta CT$ e normalizadas para a expressão do gene de referência GAPDH, sendo que a mediana da expressão dos controles foi definida como 1.

Quadro 3. Sequência de *primers forward* e *reverse* utilizadas para a identificação dos genes de interesse

Gene	Forward	Reverse
PLZF	CATCTGCAGTGAGTGCAACC	TGCCACAGAACTCACACTCG
Va24	TGATCATCCTGGAGGGGAAAG	TGTCAGGGGAAACAGGACCTC
IL-9	TGGACATCAACTTCCTCATCA	TGCCCAAACAGAGACAACTG
GATA3	CGGGCTCTATCACAAAATGAA	GTGTGGTTGTGGTGGTCTGA
GAPDH	ATTGCCCTCAACGACCACTT	TGCTGTAGCCAAATTCGTTGTC
IL-6	AAGCCAGAGCTGTGCAGATG	GTTGGGTCAGGGGTGGTAT

2.7 Imunofenotipagem de superfície celular em células mononucleares do sangue periférico

Após a transferência das células descongeladas para uma placa de 96 poços com fundo em V (NUNC® Brand Products), esta foi centrifugada a 1800rpm por 5 minutos e sobrenadante descartado. Para lavagem celular foi adicionado 170µL do

tampão de citometria (PBS + 10% de soro fetal bovino), feita nova centrifugação de 1800rpm por 5 minutos e em seguida, o sobrenadante foi desprezado. Para iniciar a marcação das proteínas de superfície das células, foram adicionados os anticorpos monoclonais previamente titulados.

Os painéis utilizados foram: CD14 (APC- H7, clone M5E2) e PDL-1 (PeCy7, clone MIH1) ambos da BD Biosciences (San Jose, CA, USA), CD16 (FITC, clone 3G8) da Beckman Coulter (Brea, California, Estados Unidos), CXCR3/CD183 (Brilliant Violet 785, clone G025H7), CCR2 (PE, clone K036C2) e CD163 (PerCP Cy5, clone GHI/61) da BioLegend (San Diego, CA, USA) para monócitos. Já na identificação de DC foram utilizados os anticorpos CD11c (APCCy7, clone HL3), CD123 (PE, clone 9F5), Lin1(CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56, FITC, CAT 340546), PDL1 (PeCy7, clone MIH1) e HLA-DR (Bv711, clone G46-6) todos da BD Biosciences. Também foram analisadas as células NKT e ILC2, pelo seguinte painel Va24 (PeCy7, clone C15) e Vb11 (Fitc, clone C21) ambos da Beckman Coulter, CRTH2 (PeCF594, clone BM16), CD127 (AF 646, clone HIL-7R-M21), CD3 (BV711, clone UCHT1), CD4 (APC-H7, clone RPA-T4) e CD8 (PE, clone HIT8a) todos da BD Biosciences. Para excluir as células mortas foi utilizado o reagente LIVE/DEAD™ “Fixable Red Dead Cell Stain Kit, *for 488nm excitation*” (CAT L23102) da Thermo Fischer Scientific.

As células permaneceram sob incubação por 30min no escuro em temperatura ambiente. Após esse tempo foram centrifugadas e ressuspendidas em 170µL de tampão de citometria para lavagem, sendo então adicionada 200µL de tampão de citometria para subsequente leitura em citômetro de fluxo LSR Fortessa (BD Biosciences). A estratégia de *gate* foi definida através de fluorescência menos um (FMO).⁽¹⁶⁸⁾

Quadro 4. Diluição dos anticorpos utilizados para imunofenotipagem de monócitos, células dendríticas, ILC2 e NKT

Painel	Anticorpo	Concentração (em 10)
Monócitos	CD14	3
	CD16	3
	CXCR3/CD183	1
	CCR2	3
	CD163	2
	PDL1	2
Células dendríticas	CD11c	3
	CD123	3
	Lin1	5
	PDL1	2
	HLADR	1
ILC2	CRTH2	3
	CD127	8
	CD3	1
	TNF	4
	IL4	4
	IFN	3
NKT	Vb11	5
	Va24	4
	CD3	1
	CD4	3
	CD8	5

ILC2: células linfoides inatas do tipo 2; NKT: células T matadoras naturais.

2.8 Análise funcional das células ILC2 e NKT

Para a análise da funcionalidade das células ILC2 e NKT, a produção de citocinas produzidas por estas células foi avaliada. Os PBMC foram incubados com 100ng/mL phorbol 12-myristate 13-Acetato (PMA-Sigma) e 500ng/mL ionomicina (Sigma). Após 1 h a 37°C e 5% CO₂ foram adicionados 5mg/mL de monensina 5mg/mL (Golgi Stop) e 5mg/mL de brefeldina A (Golgi Plug). Após incubação durante 18h, as células foram lavadas com 170µL de tampão de citometria e incubadas com os anticorpos de superfície.⁽¹⁶⁹⁾ Nas células foi adicionado o reagente de fixação/permeabilização da Life Technologies de acordo com instruções do fabricante. As células foram incubadas com TNF (AL700, clone MAb11) da BD Biosciences e IL-4 (BV421, clone MP4-25D2) e IFN (BV785, clone 4S.B3) ambos da BioLegend.

Depois disso, as células foram lavadas com tampão de citometria, ressuspensas e adquiridas em citômetro de fluxo LSR Fortessa™ (BD Biosciences). Para as análises, foram utilizadas células não estimuladas. Todas as amostras foram analisadas com o *software* FlowJo™, versão 9.9 (Tree Star).

2.9 Análise estatística

Foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 6.0, onde atribuímos o teste de Mann-Whitney e correlação de Pearson ou Spearman e atribuímos o valor de significância de 5% ($p \leq 0,05$). Para a representação gráfica das análises, utilizamos mediana (M) e intervalo interquartil (IQR – *interquartile range*).

3 RESULTADOS

3.1 Dados demográficos e laboratoriais

Após a coleta de sangue periférico dos 12 pacientes diagnosticados com hanseníase e dos 10 controles saudáveis, foi feito hemograma sendo comparada os valores de hemoglobina, hematócrito, leucócitos e linfócitos.

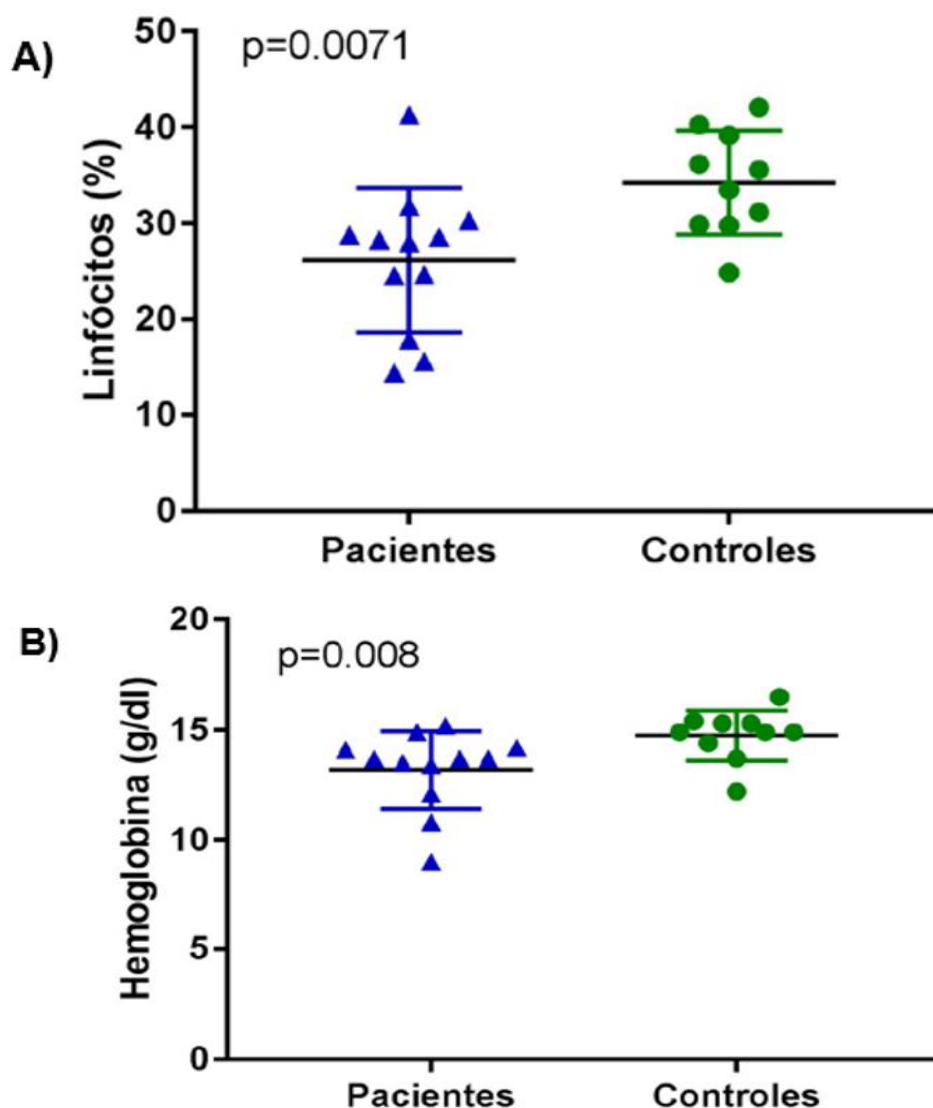
Através da análise desses dados e do prontuário dos pacientes, foi observado que a mediana das idades foi de 47,5 anos e dos controles saudáveis de 50 anos. Em relação à distribuição entre os gêneros, 10 pacientes (83,3%) eram do sexo masculino e 2 pacientes (16,7%) eram do sexo feminino. Entre os do Grupo Controle, 8 (80%) do sexo masculino e 2 (20%) do sexo feminino.

A análise dos dados laboratoriais (Tabela 1) demonstrou que os pacientes apresentaram diminuição do número de linfócitos (Figura 2A) e uma diminuição dos valores de hemoglobina (Figura 2B) quando comparado aos controles saudáveis.

Tabela 1. Dados demográficos e laboratoriais dos pacientes

	Sexo (%)	Idade	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	Leucócito (μL)	Linfócito
Pacientes, n=12						
Masculino	83,3	47 +/- 12,7	13,7 +/- 1,29	39,8 +/- 4,3	6.980 +/- 4,5	1.920 +/- 0,7
Feminino	16,7	46 +/- 15,6	9 +/- 3,3	34,05 +/- 8,7	7.150 +/- 1,8	2.100 +/- 0,6
Controles, n=10						
Masculino	80	50 +/- 12,5	14,9 +/- 0,8	41 +/- 1,8	7.250 +/- 1,3	2450 +/- 0,5
Feminino	20	53 +/- 11,3	13,8 +/- 2,3	40,1 +/- 7,5	7.455 +/- 1,5	2450 +/- 1,2

*Dados expressos em mediana e desvio padrão. Valores de referência: hemoglobina (feminino 12 a 16g/dL; masculino: 13,5 a 18g/dL); hematócritos (feminino: 35 a 45%, masculino: 40 a 50%); leucócitos totais (feminino: 4100 a 8900mm³/μL; masculino: 3600 a 9100mm³/μL) e linfócitos (feminino: 1200 a 5200mm³/μL; masculino: 1200 a 5200mm³/μL).



A) Comparação entre a porcentagem de linfócitos totais. B) Comparação entre os valores de hemoglobina (g/dL). Realizado teste de Mann-Whitney; valor atribuído para $p \leq 0,05$.

Figura 2. Mediana dos valores de hemograma dos pacientes e dos controles

3.2 Dados clínicos

Ao analisar os dados clínicos, todos os pacientes foram classificados com hanseníase multibacilar.

Em relação aos estados reacionais, 33,3% dos pacientes apresentaram reações do tipo 1, 8,3% dos pacientes tiveram reação do tipo 2 e 8,3% dos pacientes tiveram reação mista (tipo 1 e tipo 2) (Tabela 2).

Tabela 2. Dados clínicos

	Multibacilar (%)	Reação tipo 1 (%)	Reação tipo 2 (%)	Reação tipo 1 e tipo 2 (%)
Pacientes, n=12	100	33,3	8,33	8,33

Dados expressos em mediana.

Uma das principais características da hanseníase é o comprometimento nervoso. O nervo ulnar foi o mais acometido, estando comprometido bilateralmente em 83,3% dos pacientes e unilateralmente em 8,3%. Os pacientes também apresentaram acometimento de nervo radial (33,3% bilateral), nervo fibular (50% bilateral e 8,3% unilateral) e nervo tibial posterior (33,3% bilateral).

Cerca de 58,3% dos pacientes não tinham nenhuma comorbidade associada. Dentre aqueles com outros diagnósticos, apenas um paciente tinha etilismo, um paciente com carcinoma basocelular, um com *diabetes mellitus*, hipertensão arterial sistêmica e dislipidemia e um com diagnóstico prévio de sífilis.

A avaliação do grau de incapacidade é uma medida importante na análise do estado clínico⁽¹¹⁾ e foi avaliado no início e no fim do tratamento. Em relação aos escores iniciais, 66,7% dos pacientes tiveram escore total I e 16,7% com escore total II. Ao analisar as regiões específicas, a região mais afetada foram os pés, com 75% dos pacientes com escore I e 8,3% com escore II; seguido pelas mãos com 33,3% com escore I e 16,7% com escore II, sendo os olhos a região menos afetada, com 83,3% com escore 0 (Tabela 3).

Em relação aos escores finais, poucas alterações foram observadas, sendo que 1 paciente teve regressão do seu escore de I para 0, reflexo de uma melhora clínica. O restante dos pacientes manteve seus escores ou não terminaram os seus tratamentos.

Tabela 3. Avaliação do grau de incapacidade no início e no final do tratamento

Paciente	Grau de incapacidade início				Grau de incapacidade final			
	Olho	Mão	Pé	Total	Olho	Mão	Pé	Total
1	S	I	I	I	S	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	I	I	0	0	I	I
4	0	I	I	I	0	I	I	I
5	0	0	I	I	0	0	I	I
6	0	II	II	II	0	II	II	II
7	0	II	I	II	S	S	S	S
8	I	I	I	I	I	I	I	I
9	0	0	0	0	0	S	S	S
10	0	0	I	I	0	0	I	I
11	0	0	I	I	S	S	S	S
12	0	I	I	I	S	S	S	S

S indica dados não disponíveis.

3.3 Tratamento

A poliquimioterapia escolhida foi o esquema para o tipo multibacilar. Na maioria dos pacientes que apresentaram reações do tipo 1 e/ou 2 foram associadas prednisona e/ou talidomida (33,3%). O tempo médio de tratamento foi de 12,9 meses e a mediana foi de 10,5 meses, sendo que o tempo máximo de tratamento foi de 25 meses. O tempo de tratamento 0 se refere a aqueles pacientes que não concluíram o tratamento. (Tabela 4).

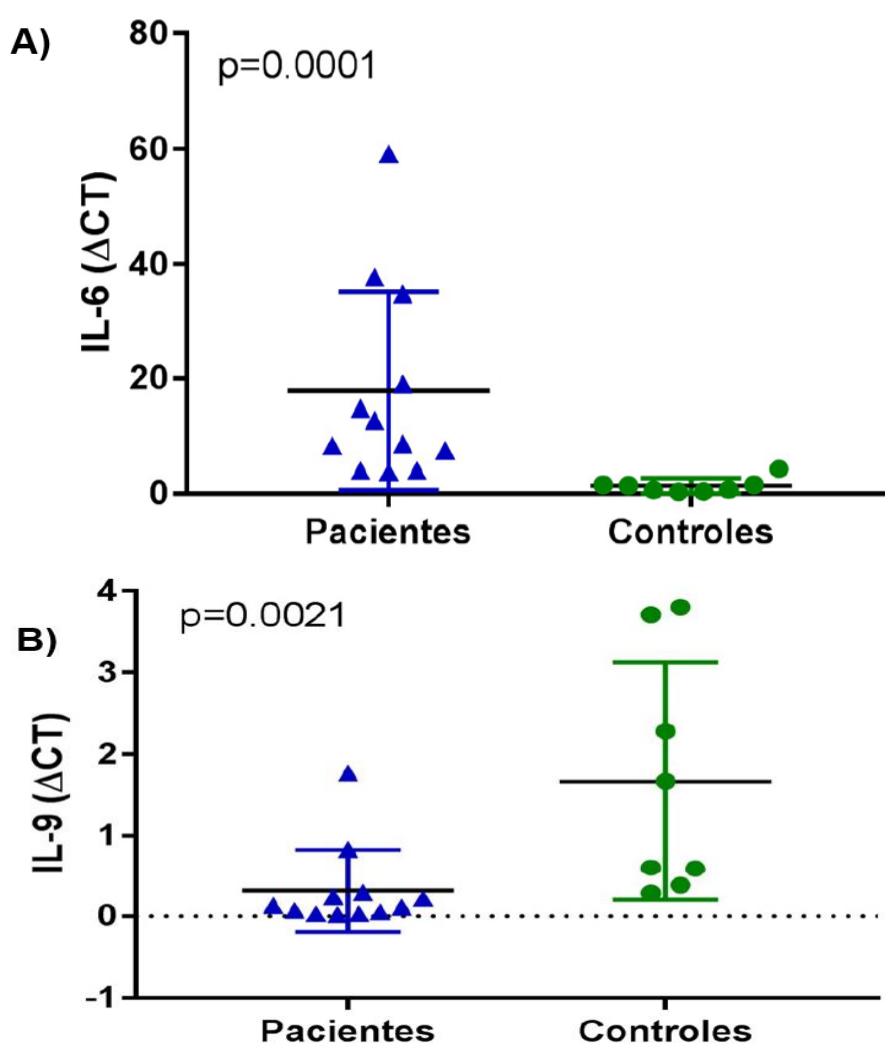
Tabela 4. Tipo, tempo e adesão ao tratamento dos pacientes

Nº paciente	Medicamentos	Tempo de tratamento (meses)	Adesão
1	MB MDT	10	Alta
2	MB MDT	13	Alta
3	MB MDT/Talidomida/Prednisona	13	Alta
4	MB MDT/Talidomida/Prednisona	11	Alta
5	MB MDT	25	Alta
6	MB MDT	5	Abandono
7	MB MDT/Prednisona	0	Em tratamento
8	MB MDT	12	Alta
9	MB MDT	0	Em tratamento
10	MB MDT/Prednisona	14	Alta
11	MB MDT	0	Abandono
12	MB MDT	0	Encaminhado

MB MDT: *multibacillary-multidrug therapy*.

3.4 Avaliação da expressão gênica das células linfomononucleares do sangue periférico de pacientes com hanseníase multibacilar

Foi avaliada a expressão gênica, via PCR em tempo real, das citocinas IL-6 e IL-9. Foi encontrado que IL-6 estava aumentada nos pacientes (Figura 3A) mas que IL-9 estava diminuída (Figura 3B), quando comparada aos controles, o que pode se relacionar com o perfil mais anti-inflamatório dos pacientes com hanseníase multibacilar.

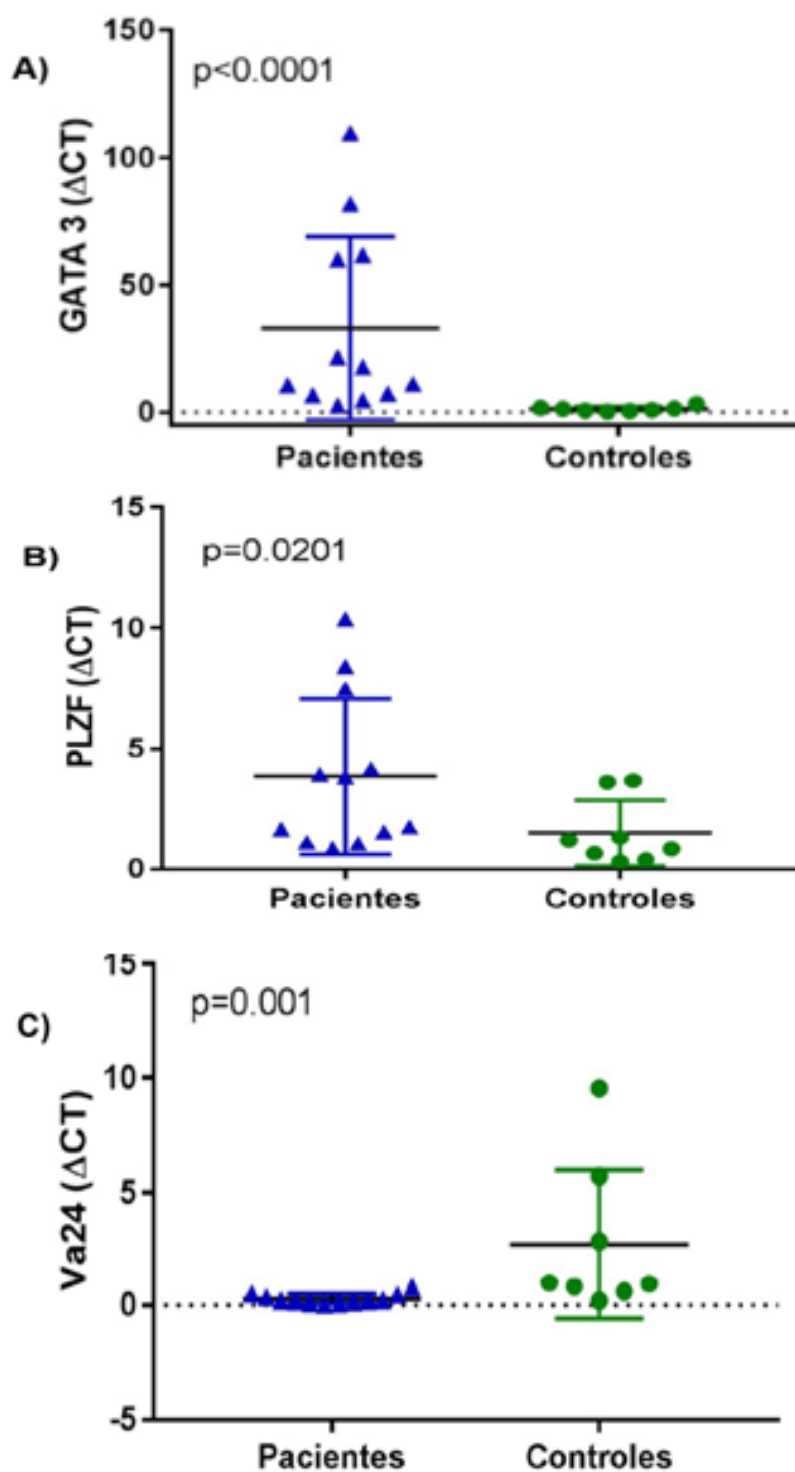


A) A expressão de IL-6 estava aumentada nos pacientes quando comparado aos controles saudáveis. B) A expressão de IL-9 estava diminuída nos pacientes quando comparado aos controles saudáveis. Realizado teste de Mann-Whitney; valor atribuído para $p \leq 0,05$. ILC6: células linfoides inatas do tipo 6.

Figura 3. Expressão gênica nas células PMBC de IL-6 (A) e IL-9 (B) em pacientes com hanseníase multibacilar

O GATA3⁽⁷⁰⁾ é um fator de transcrição característico e essencial para as ILC2 e relacionado a resposta Th2, que está aumentado nos pacientes (Figura 4A), assim como o fator PLZF (Figura 4B). Apesar de não ser exclusivo, o fator de transcrição PLZF é importante para as funções efectoras das células NKT,⁽¹⁷⁰⁾ sendo que o *outlier* foi um paciente que apresentou reação tipo 1.

Contudo, a expressão de Va24 está diminuída (Figura 4C), o que sugere uma menor circulação das células NKT na periferia de pacientes com hanseníase multibacilar.



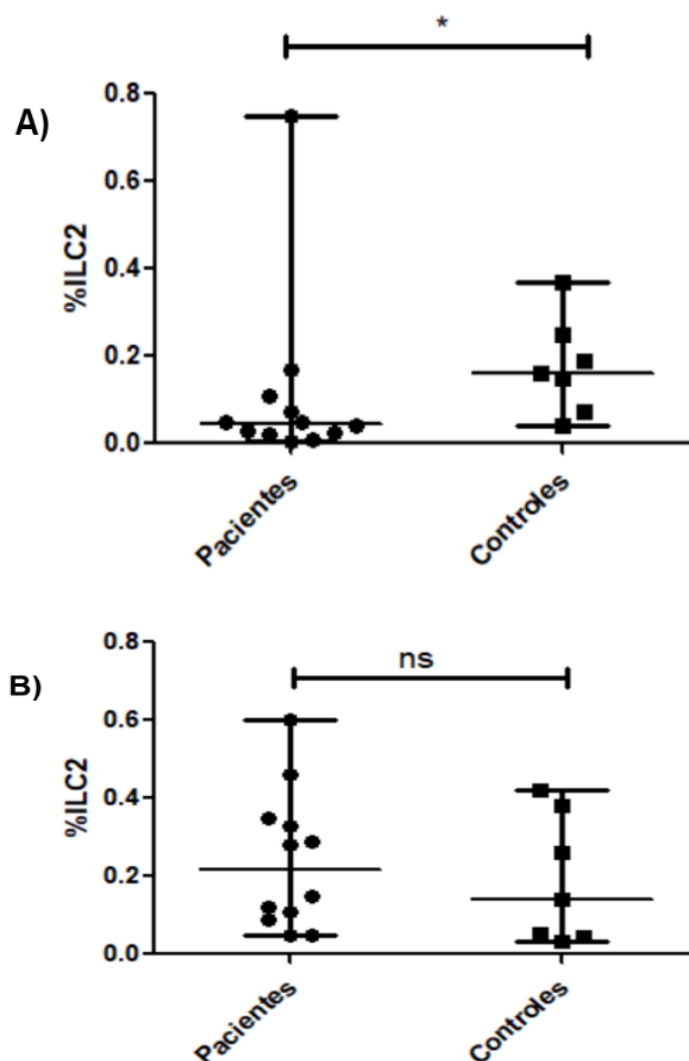
A) A expressão de GATA3 estava aumentada nos pacientes quando comparado aos controles. B) A expressão de PLZF estava aumentada nos pacientes quando comparado aos controles. C) A expressão de Va24 estava diminuída nos pacientes quando comparado aos controles. Realizado teste de Mann-Whitney; valor atribuído para $p \leq 0,05$.

Figura 4. Expressão gênica nas células PMBC de GATA3, PLZF e Va24 em pacientes com hanseníase multibacilar

3.5 Avaliação da frequência de células da imunidade inata no sangue periférico

3.5.1 Avaliação da frequência e da funcionalidade das células ILC2 no sangue periférico

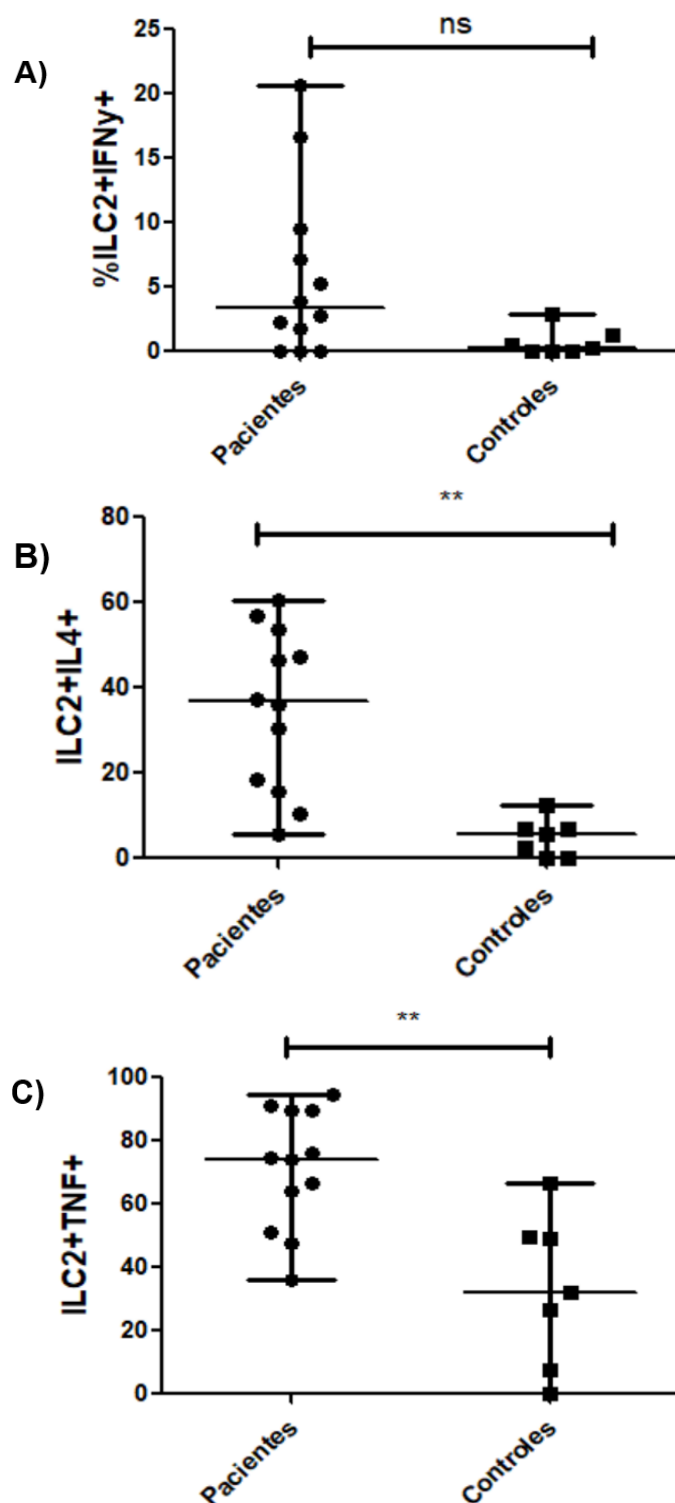
As células ILC2 foram caracterizadas através da expressão de CD294 (CARTH2) e CD127 e negativas para marcadores de linhagem (Lin negativo). Apesar de uma certa heterogeneidade, foi encontrada uma redução estatisticamente significativa nos pacientes com hanseníase multibacilar quando comparado aos controles (Figura 5A). Ao estimular as células com PMA+ionomicina, não se teve diferença estatística entre os grupos (Figura 5B). Em ambos os casos, os outliers, foram pacientes diferentes que apresentavam reação do tipo 1, em tratamento com prednisona.



A) %ILC2 não estimuladas. Houve uma redução da frequência das células ILC2 no sangue periférico de pacientes com hanseníase multibacilar quando comparada aos controles saudáveis. B) %ILC2 estimuladas. Não houve diferença estatística na frequência das ILC2 ao serem estimuladas. Realizado teste de Mann-Whitney ; valor atribuído para $p \leq 0,05$. ILC2: células linfoides inatas do tipo 2.

Figura 5. Frequência (%) das células ILC2 nos pacientes com hanseníase e controles saudáveis, via citometria de fluxo

Em relação a produção de citocinas, nas células estimuladas, não foi observada diferença estatística em relação ao IFN- γ entre os grupos (Figura 6A), porém os pacientes apresentam um aumento na expressão de IL-4 (Figura 6B) e TNF (Figura 6C). Em relação ao TNF, dentre os pacientes que apresentaram a maior produção, estavam aqueles que tiveram reação do tipo 2 ou mista.

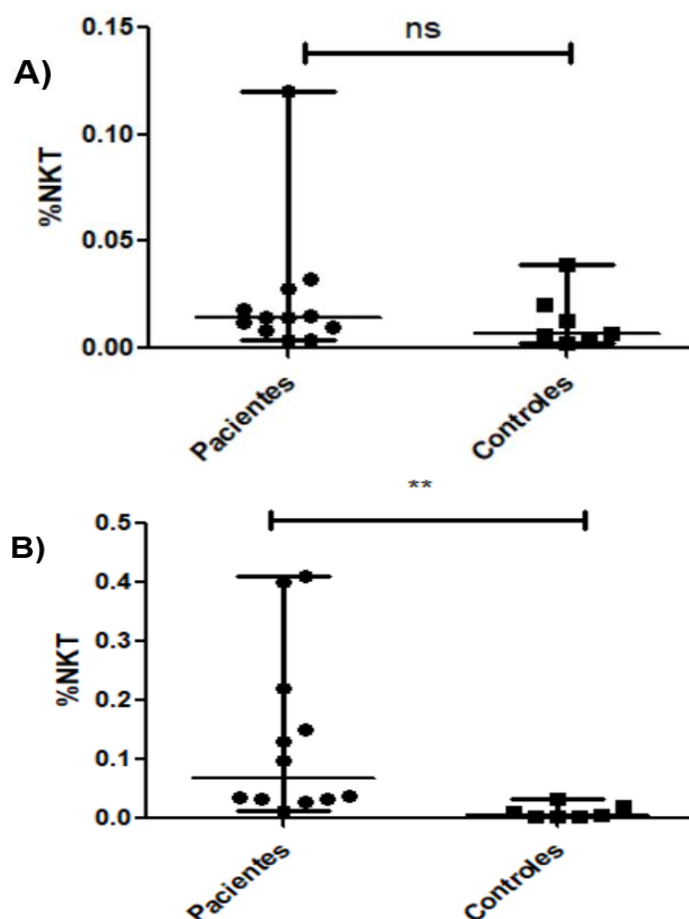


A) Não foram encontradas diferenças estatísticas na produção de IFN- γ . B) Os pacientes apresentaram maior expressão de IL-4. C) Os pacientes apresentaram maior expressão de TNF. Realizado teste de Mann-Whitney ; valor atribuído para $p \leq 0,05$. ILC2: células linfóides inatas do tipo 2; TNF: fator de necrose tumoral.

Figura 6. Produção de citocinas pelas células ILC2 estimuladas, comparando pacientes com hanseníase multibacilar e controles saudáveis, via citometria de fluxo

3.5.2 Avaliação da frequência das células NKT no sangue periférico

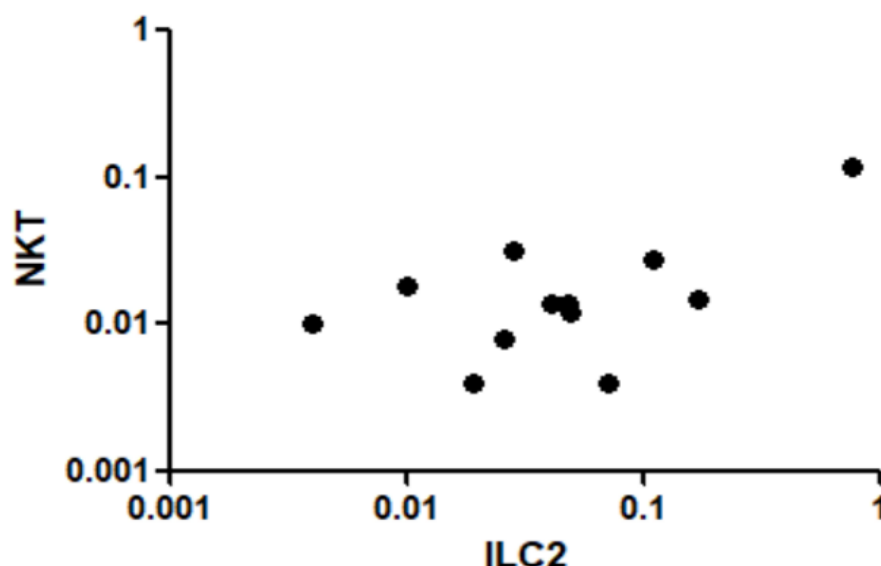
As células NKT foram caracterizadas, via citometria de fluxo, pela expressão de CD3, Vb11 e Va24. Nas células não estimuladas, não foi observada diferença estatística entre os pacientes e os controles (Figura 7A), sendo que um paciente com reação do tipo 1 se apresentou como um *outlier*. Ao estimular as células com PMA+ionomicina, o aumento das células NKT em relação aos controles foi estatisticamente significativo (Figura 7B). Pela baixa frequência dessas células na circulação sanguínea, não foi possível realizar a análise da produção de citocinas.



A) %NKT não estimuladas. Não foram observadas diferenças estatísticas. B) %NKT estimuladas. Foram observadas um aumento das células NKT nos pacientes. Realizado teste de Mann-Whitney; valor atribuído para $p \leq 0,05$. NKT: células T matadoras naturais.

Figura 7. Frequência das células NKT nos pacientes com hanseníase e controles saudáveis, analisada via citometria de fluxo

Foi observada uma correlação positiva e estaticamente significativa entre as células NKT e ILC2 (R quadrado 0,9019, IC 95% 0,8260 0,9861, valor-p<0,0001) (Figura 8), dos pacientes com hanseníase, o que não foi encontrado nos controles saudáveis.

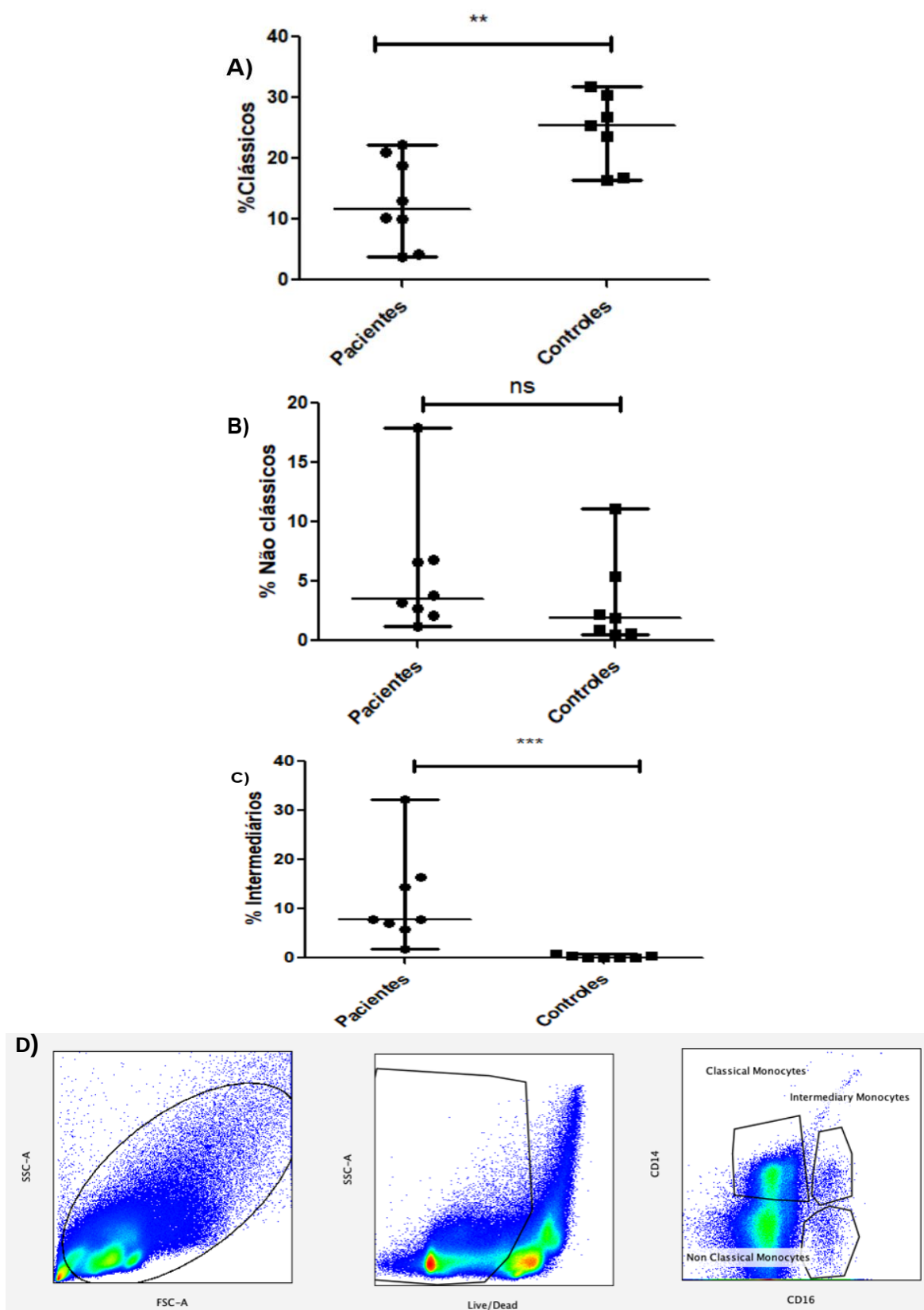


Realizada a correlação de Pearson R quadrado 0,9019, IC 95% 0,8260 – 0,9861, valor-p<0,0001. NKT: células T matadoras naturais; ILC2: células linfoides inatas do tipo 2.

Figura 8. Correlação entre a frequência de células NKT e ILC2 de pacientes com hanseníase multibacilar

3.5.3 Avaliação da frequência e fenótipo dos monócitos no sangue periférico

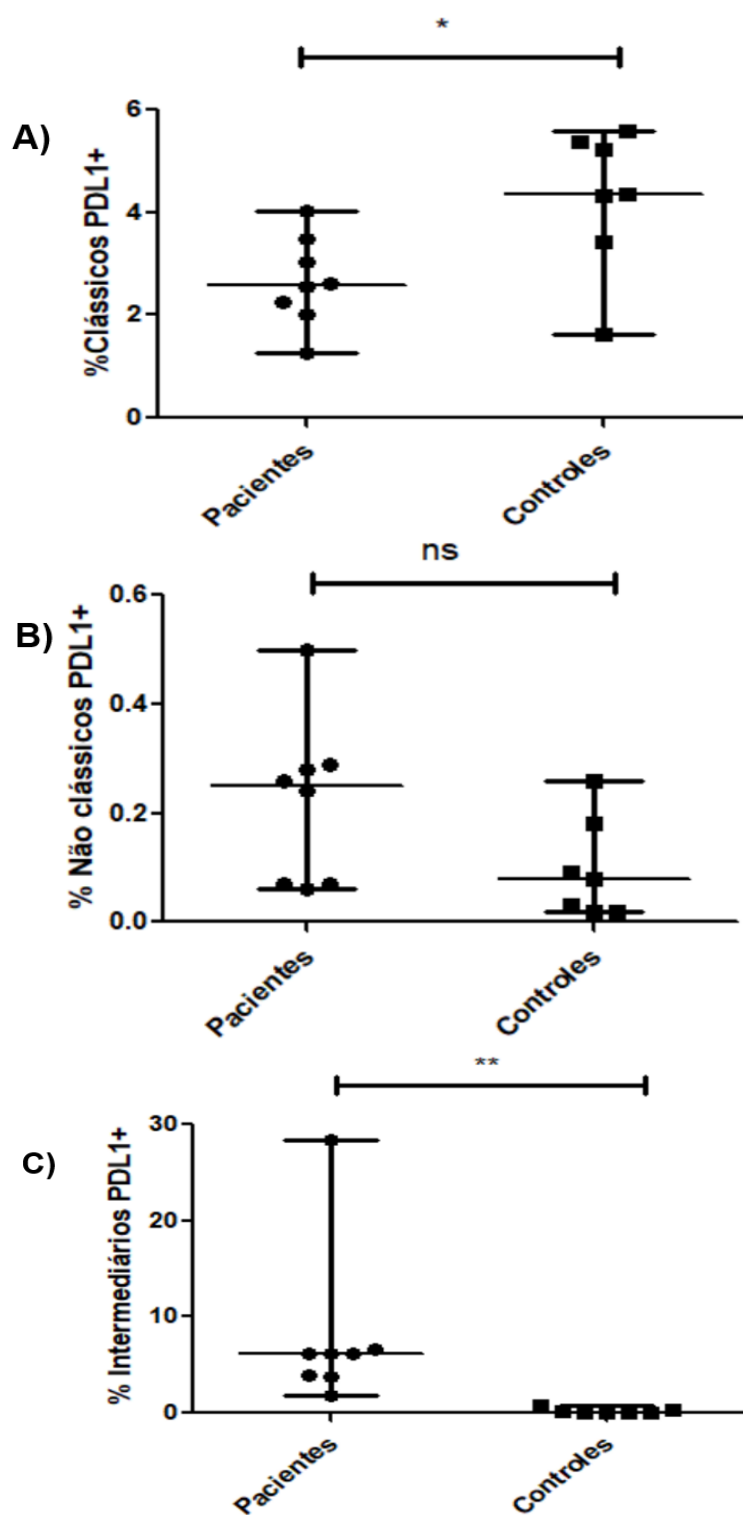
Os monócitos foram observados através da expressão de CD14 e CD16, via citometria de fluxo. Os clássicos foram CD14⁺⁺ e CD16⁻, os não clássicos CD14⁺CD16⁺⁺ e o grupo intermediário CD14⁺⁺CD16⁺ (Figura 9D). Os monócitos clássicos estavam diminuídos (Figura 9A) e os intermediários (Figura 9C) estavam aumentados nos pacientes quando comparados aos controles. Já os monócitos não clássicos não apresentaram diferença estatística (Figura 9B).



A) Havia uma diminuição dos monócitos clássicos nos pacientes. B) Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos monócitos não clássicos. C) Foram observadas um aumento dos intermediários nos pacientes. D) Gráficos representam a estratégia de *gate* utilizada. Realizado teste de Mann-Whitney; valor atribuído para $p \leq 0,05$.

Figura 9. Frequência dos subtipos de monócitos no sangue periférico de pacientes com hanseníase multibacilar, comparado com controles, via citometria de fluxo

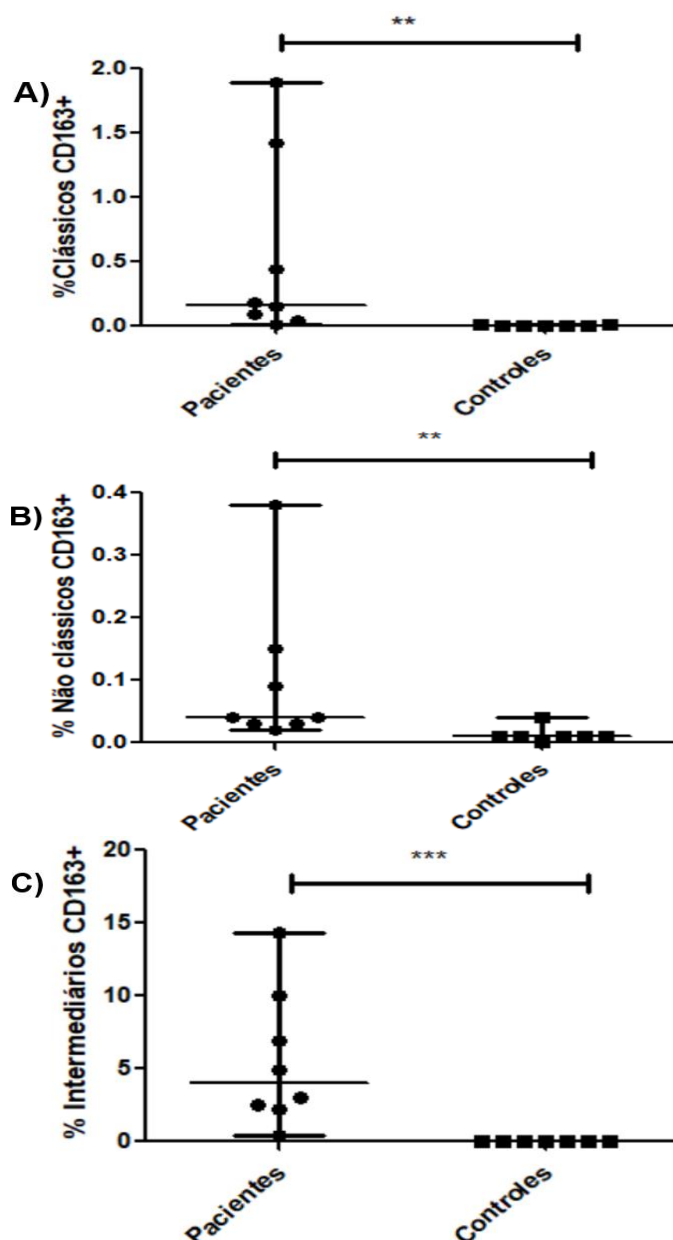
Foi avaliada a expressão de PDL1 e de CD163 nos diferentes subtipos de monócitos, nos pacientes e controles. Em relação ao PDL1, os clássicos apresentavam uma diminuição da expressão (Figura 10A), enquanto os intermediários apresentaram um aumento nos pacientes quando comparado aos controles (Figura 10C). Assim como a frequência absoluta, não houve diferença estatística para a expressão de PDL1 nos não clássicos (Figura 10B).



A) Havia uma diminuição da expressão de PDL1 dos monócitos clássicos. B) Havia um aumento da expressão de PDL1 dos monócitos intermediários. C) Não foram observadas diferença estatística em relação aos não clássicos. Realizado teste de Mann-Whitney; valor atribuído para $p \leq 0,05$. PDL1+: ligante de morte programada 1+.

Figura 10. Frequência da expressão de PDL1 nos diferentes subtipos de monócitos em pacientes com hanseníase, comparado com controles, via citometria de fluxo

O CD163 é um marcador característico dos monócitos intermediários, que apresenta relação com atividade fagocítica e anti-inflamatória. Conforme esperado, os monócitos intermediários tiveram a maior expressão de CD163 (Figura 11C) e em todos os subtipos, a expressão de CD163 foi maior nos pacientes quando comparado aos controles.

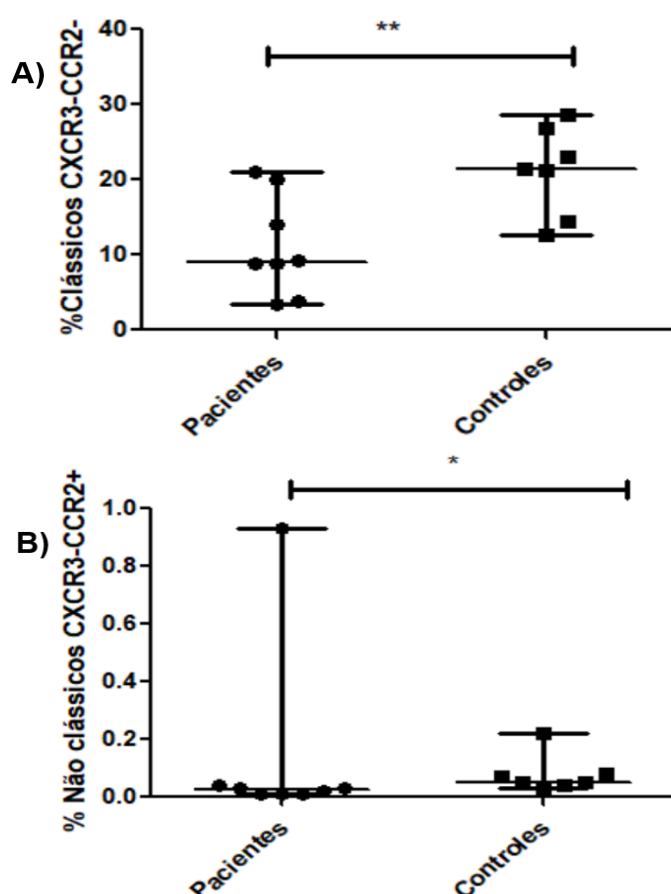


A expressão de CD163 foi maior nos pacientes quando comparado: A) Aos controles nos monócitos clássicos. B) Aos controles nos monócitos não clássicos. C) Aos controles nos monócitos intermediários. Realizado teste de Mann-Whitney; valor atribuído para $p \leq 0,05$.

Figura 11. Frequência da expressão de CD163 nos diferentes subtipos de monócitos em pacientes com hanseníase, comparado com controles, via citometria de fluxo

A expressão de quimiocinas é essencial para o tráfego dos monócitos. Foi avaliada a expressão dos receptores CXCR2 e CXCR3 nos diferentes subtipos. Em relação aos monócitos clássicos, o duplo negativo (CXCR3⁻CCR2⁻) estava diminuído, de forma estatisticamente significativa, nos pacientes quando comparado aos controles (Figura 12A). Nas demais análises, duplo positivo ou apenas CXCR2⁺ ou CXCR3⁺, não foram encontradas diferenças estatísticas (dados não mostrados).

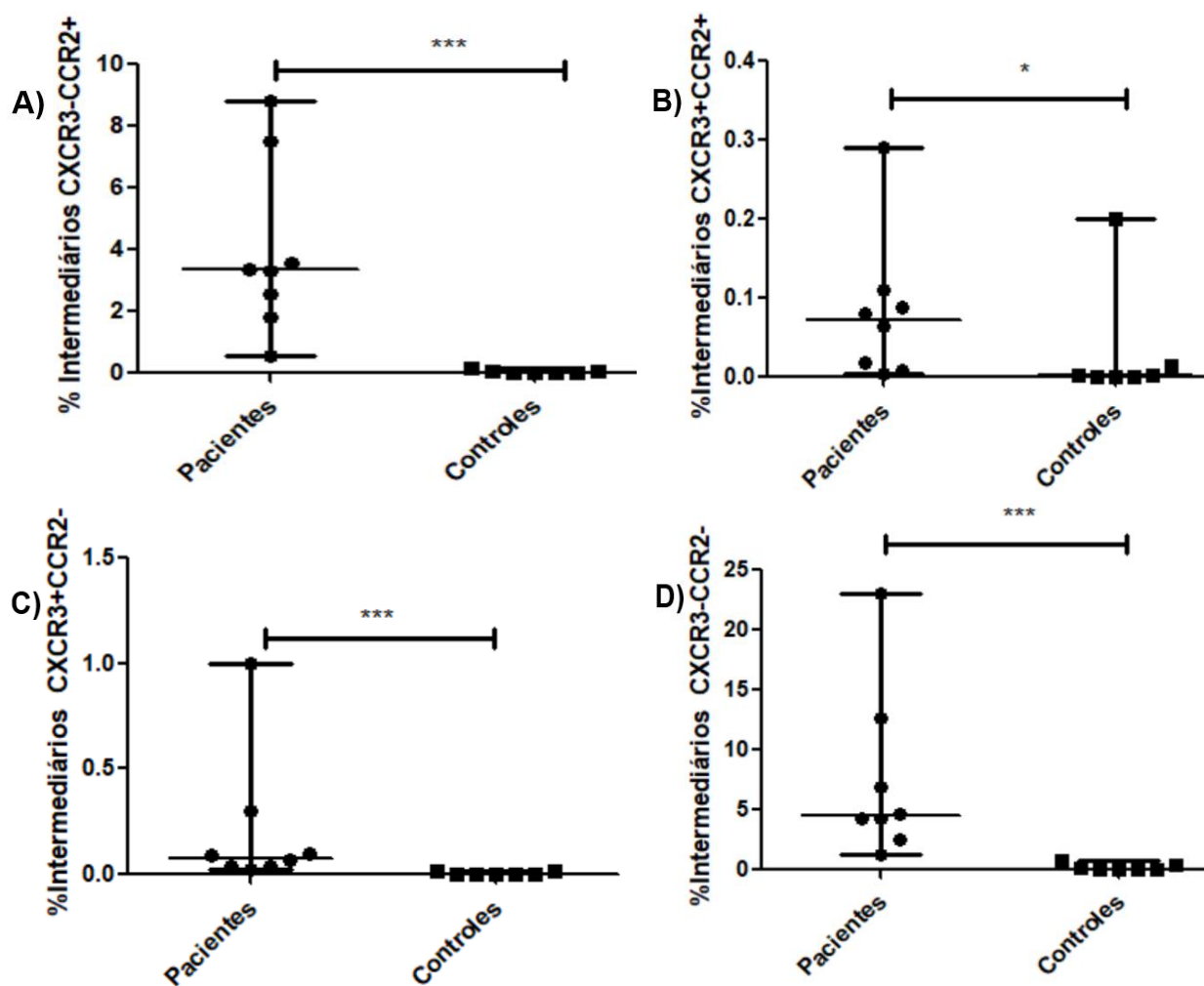
Já para os não clássicos, apesar da pequena porcentagem, a expressão somente de CCR2 (CXCR3⁻CCR2⁺), foi estatisticamente maior nos pacientes quando comparado aos controles saudáveis, sendo que um paciente que apresentava reação do tipo 1, correspondeu ao maior valor (Figura 12B).



A) Frequência (%) de monócitos clássicos CXCR3 negativos e CCR2 negativos. Havia uma diminuição da população dupla negativa nos pacientes. B) Frequência (%) de monócitos não clássicos CXCR3 negativos e CCR2 positivos. Havia um aumento nos pacientes quando comparado aos controles. Realizado teste de Mann-Whitney; valor atribuído para $p \leq 0,05$.

Figura 12. Diferenças entre a expressão de CXCR3 e CCR2 em pacientes com hanseníase e controles saudáveis nos monócitos clássicos e não clássicos

No caso dos monócitos intermediários, foi observado um aumento nos pacientes da expressão de ambos os receptores de quimiocinas, principalmente de CCR2 (Figura 13A e B), mas também do grupo duplo positivo (Figura 13C), o que poderia indicar um recrutamento dessa população para as áreas de lesão, apesar da população duplo negativa também estar aumentada (Figura 13D).



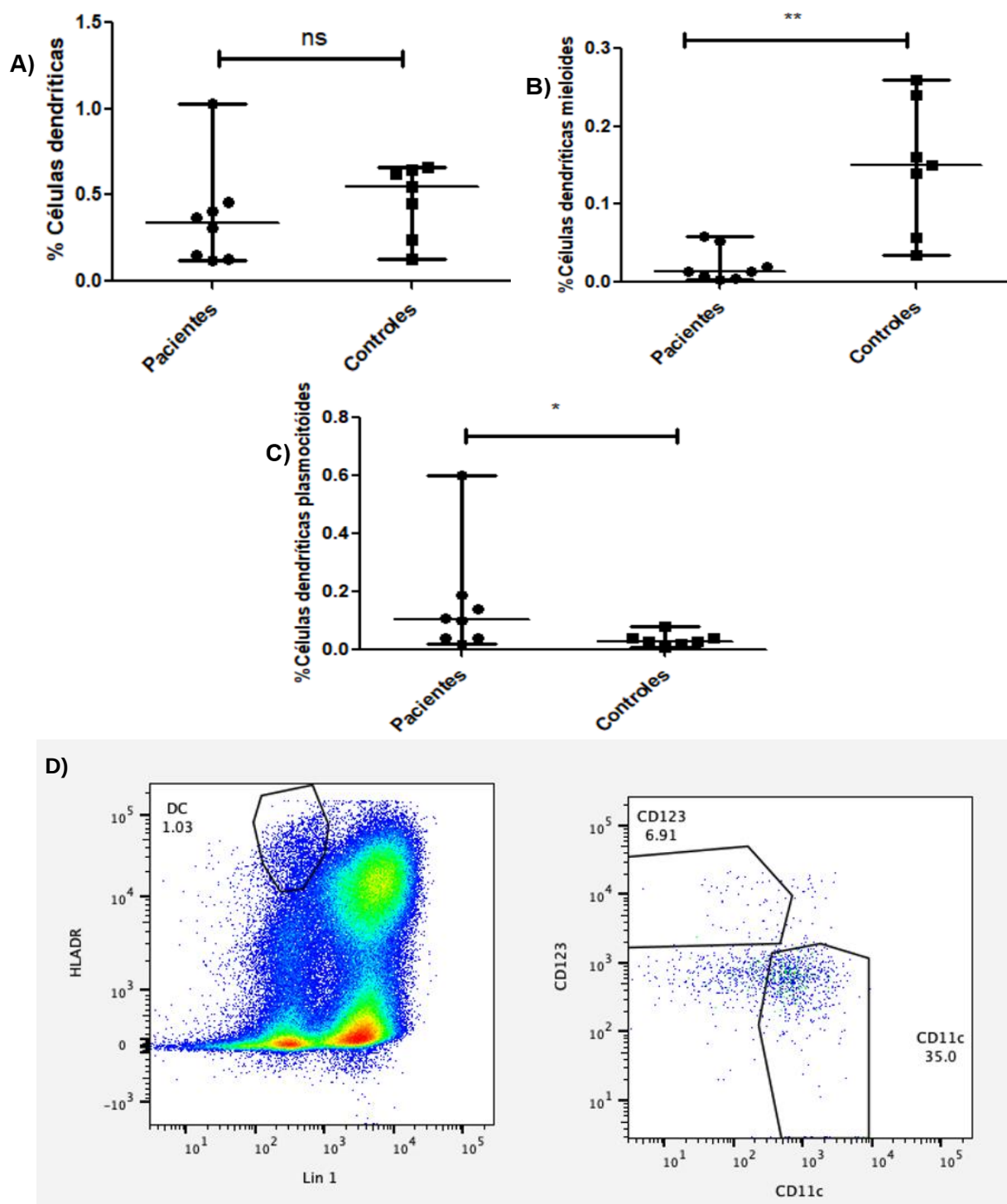
A) CXCR3-CCR2+. B) CXCR3+CCR2+. C) CXCR3+CCR2-. D) CXCR3-CCR2-. Todas as populações estavam estatisticamente aumentadas nos pacientes com hanseníase multibacilar quando comparadas aos controles. Realizado teste de Mann-Whitney; valor atribuído para $p \leq 0,05$.

Figura 13. Diferenças entre a expressão de CXCR3 e CCR2 em pacientes com hanseníase e controles saudáveis nos monócitos intermediários

3.5.4 Avaliação da frequência e fenótipo das células dendríticas no sangue periférico

Fenotipicamente, via citometria de fluxo, as DC não expressam certos marcadores de linhagem (Lin negativas) e expressam altos níveis de MHCII, sendo que os subtipos podem ser diferenciados pela expressão de CD11c e CD123, as mieloides sendo CD11c⁺⁺ CD123⁺ e as plasmocitoides, CD11c⁻ CD123⁺⁺ (Figura 14D).

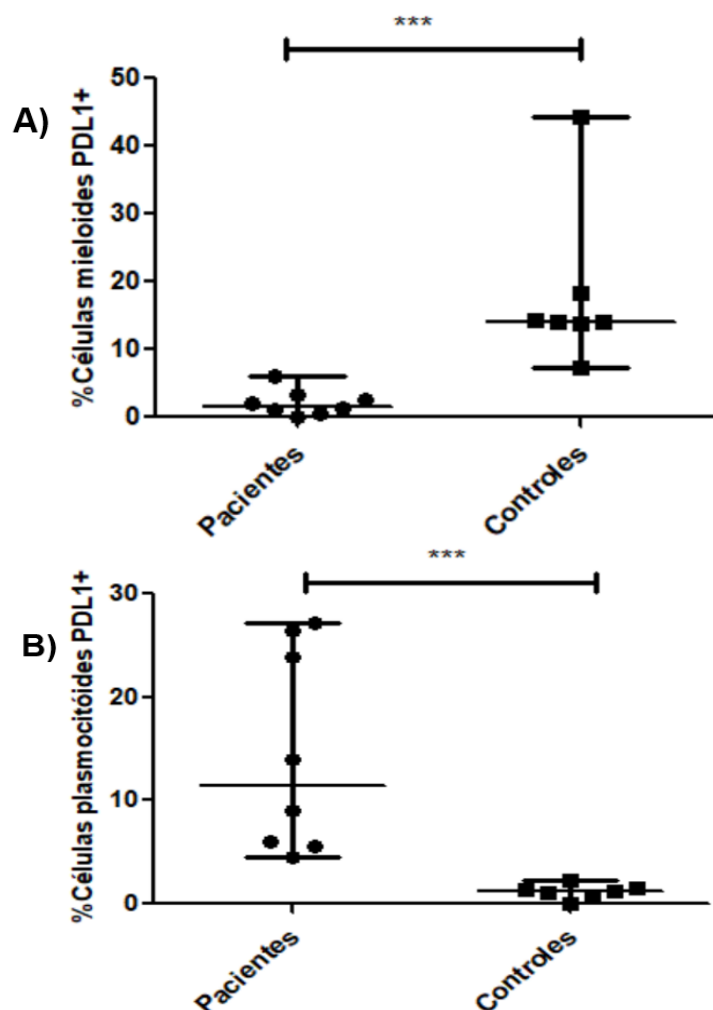
Não se teve diferença estatisticamente significativa entre as porcentagens totais de DC nos pacientes com hanseníase quando comparados aos controles (Figura 14A). Ao analisar os diferentes subtipos, as mDC estavam diminuídas e as plasmocitoides aumentadas nos pacientes (Figura 14B e C).



A) Frequência (%) de células dendríticas totais. Não houve diferença estatística. B) Ao analisar os subgrupos, as dendríticas mieloides estavam diminuídas nos pacientes. C) As plasmocitoides estavam aumentadas nos pacientes. D) Gráficos representam a estratégia de *gate* utilizada para identificação das células dendríticas. Realizado teste de Mann-Whitney; valor atribuído para $p \leq 0,05$.

Figura 14. Frequência das células dendríticas no sangue periférico de pacientes com hanseníase multibacilar e controles saudáveis

A expressão de PDL1 foi também analisada nas DC. As mDC apresentavam uma redução na expressão (Figura 15A) mas as plasmocitoides (Figura 15B) apresentavam um aumento, ambas diferenças estatisticamente significantes.



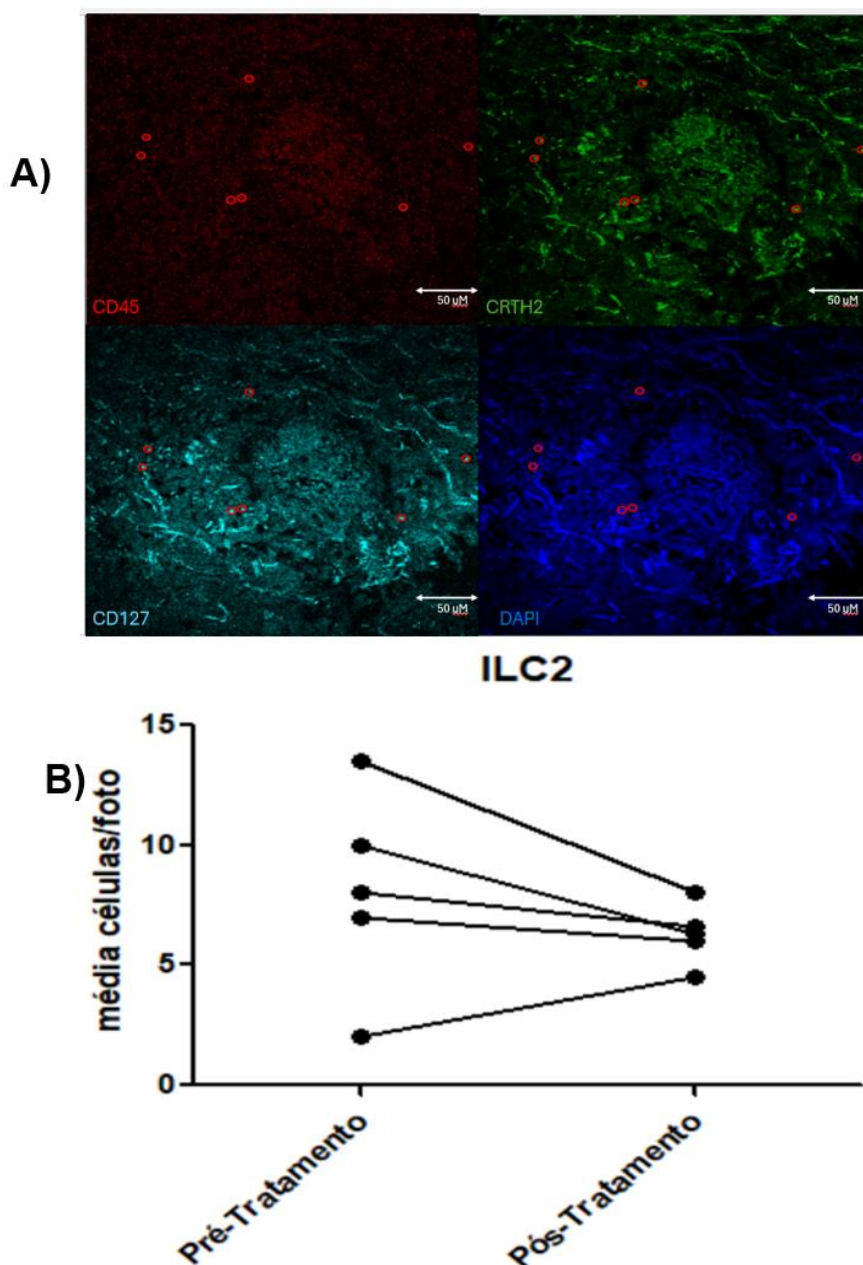
A) Havia uma diminuição da expressão de PDL1 nas dendríticas mieloides quando comparadas aos controles. B) Havia um aumento da expressão de PDL1 nas dendríticas plasmocitoides quando comparadas aos controles. Realizado teste de Mann-Whitney; valor atribuído para $p \leq 0,05$. PDL1+: ligante de morte programada 1+.

Figura 15. Expressão de PDL1 pelos diferentes subtipos de células dendríticas

3.6 Avaliação da presença de células linfoides inatas do tipo 2 no tecido lesionado de pacientes com hanseníase multibacilar

A partir das amostras de biopsias de pele de pacientes com hanseníase multibacilar, foi avaliada a presença de ILC2 nas áreas de lesão previamente identificadas, antes e após o início do tratamento. As células ILC2 foram aquelas que expressavam simultaneamente CD45, CCR2 e CD127 (Figura 16A). Com exceção de um paciente, que apresentava reação tipo 1, foi identificada uma tendência a diminuição

de células ILC2 (Figura 16B), após o tratamento, contudo não foi encontrada diferença estatística quando comparados os grupos.

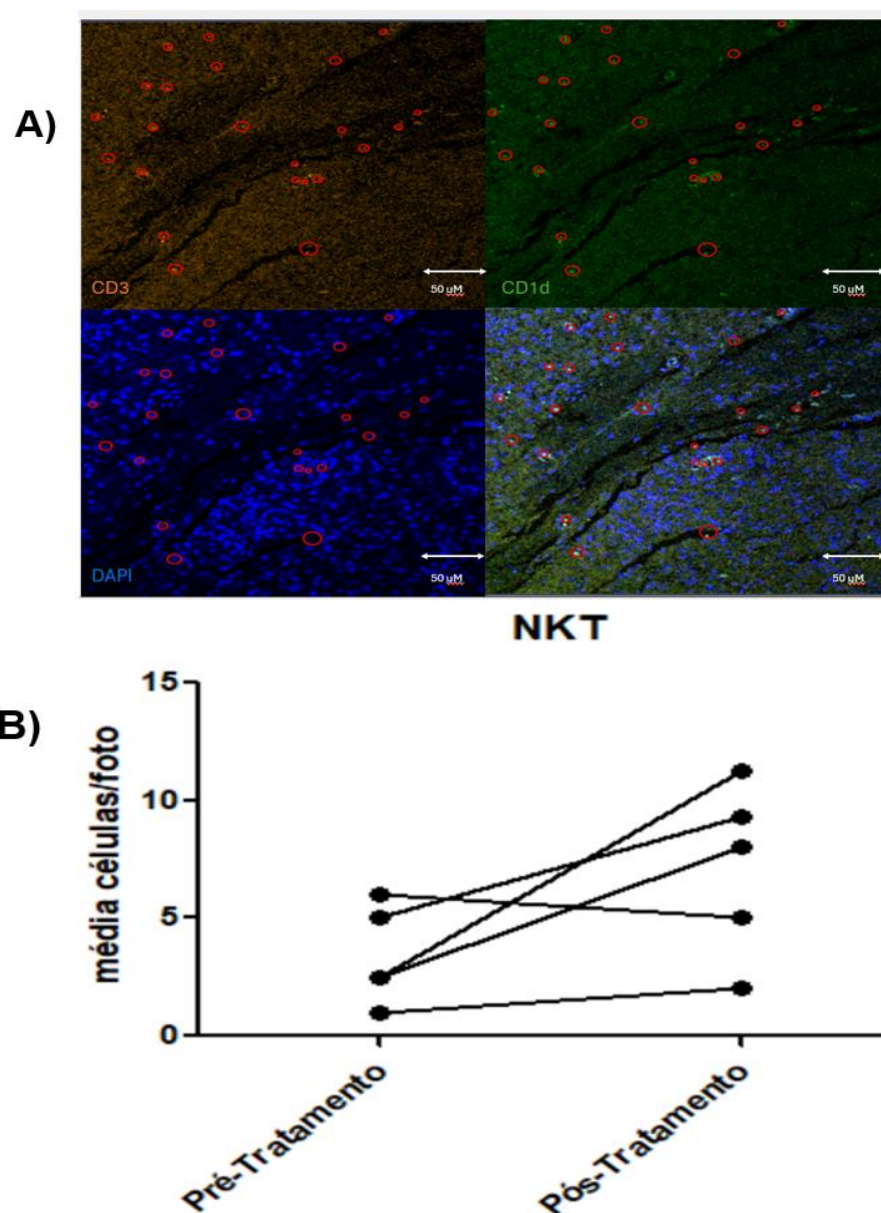


A) Foram consideradas células ILC2 aquelas que expressam CD45 (vermelho), CRTH2 (verde) e CD127 (azul) e DAPI (marcador nuclear). B) Para cada paciente, foram feitas de 3-5 fotos do campo da lesão. Assim, foi realizada a contagem do número de ILC2 por foto, com o cálculo da média de células/foto. ILC2: células linfoides inatas do tipo 2.

Figura 16. Imunomarcção de células linfoides inatas em tecido de pacientes com hanseníase

3.7 Avaliação da presença de células T matadoras naturais no tecido lesionado de pacientes com hanseníase multibacilar

Foi avaliada a presença dessas células nas lesões provenientes dos pacientes com hanseníase, sendo identificadas como células NKT aquelas que expressavam CD1d e CD3 (Figura 17A). Observou-se um aumento geral no número de células NKT após o início do tratamento, exceto em um paciente que apresentou uma diminuição. É interessante notar que o paciente que não seguiu a tendência de aumento das células NKT também apresentou diferença para as células ILC2 e foi diagnosticado com reação do tipo 1 (Figura 17B). Porém, também não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre a quantidade de NKT antes e após o início do tratamento.

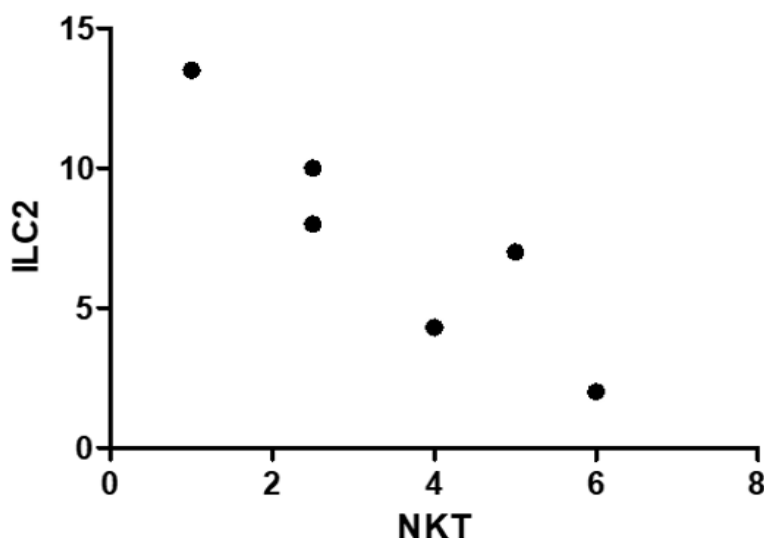


A) Representação da sobreposição das marcações, CD3 (laranja) CD1d (verde), DAPI (azul) e a sobreposição dos marcadores. B) Para cada paciente, foram feitas de 3-5 fotos do campo da lesão. Assim, foi realizada a contagem do número de NKT por foto, com o cálculo da média de células/foto. NKT: células T matadoras naturais.

Figura 17. Imunomarcção de células T matadoras naturais em áreas de lesão por hanseníase

Houve uma correlação negativa estatisticamente significativa (Pearson R quadrado 0,8218 IC 95% -0,9899 a -0,359, valor-p=0,0127) entre a quantidade de ILC2 e de NKT nas áreas de lesão antes do tratamento (Figura 18). Essa correlação não foi estatisticamente significativa após o tratamento (dados não mostrados).

ILC2 e NKT nas áreas de lesão pré-tratamento



Realizada a correlação de Pearson R quadrado 0,8218 IC 95% (-0,9899 a -0,359), valor-p: 0,0127. ILC2: células linfoides inatas do tipo 2; NKT: células T matadoras naturais.

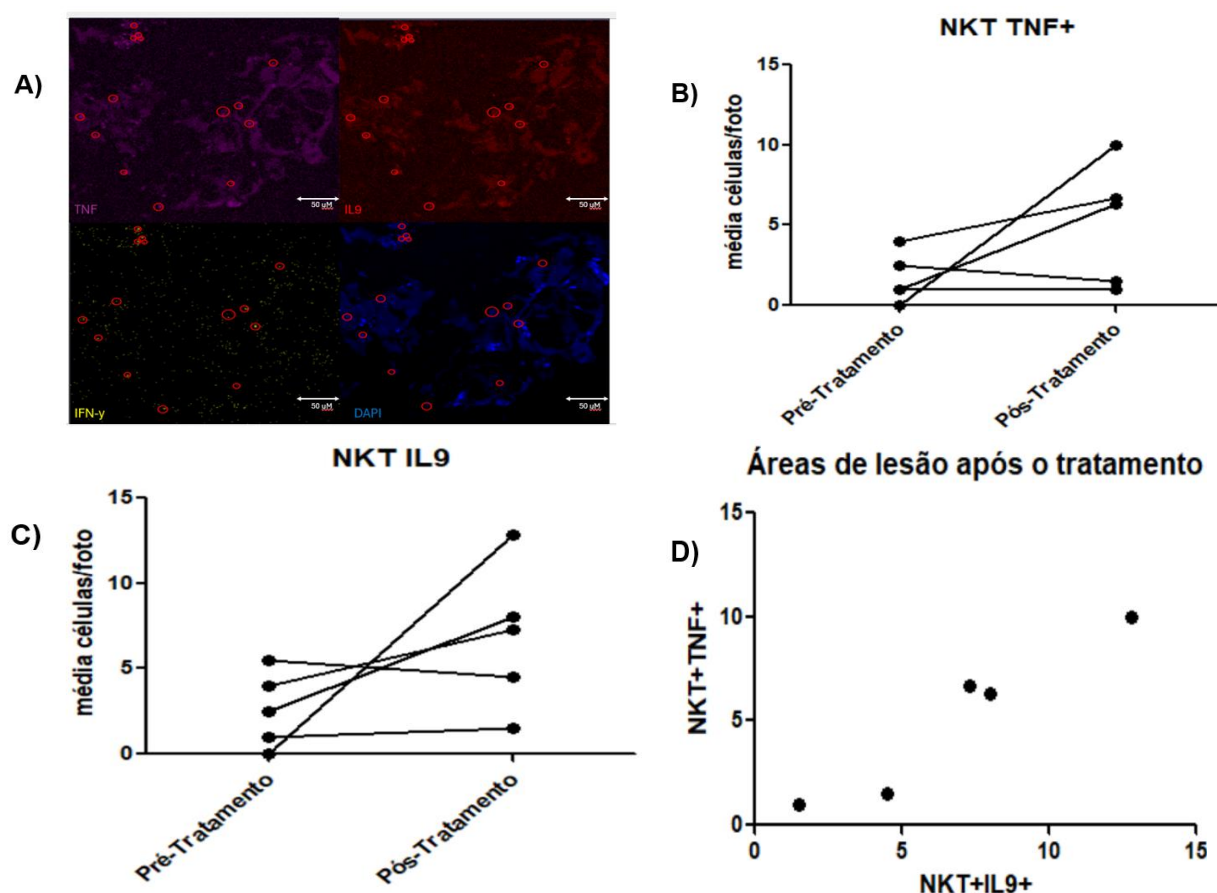
Figura 18. Correlação entre a frequência de células NKT e ILC2 de pacientes com hanseníase multibacilar nas áreas de lesão antes do início do tratamento

Foi avaliada a secreção de citocinas pelas células NKT nas áreas de lesão antes e depois do tratamento. Foi encontrada a presença de TNF e IL-9 na pele (Figura 19A). Em relação ao TNF, foi observada uma tendência ao aumento da quantidade após o tratamento (Figura 19B), mas sem diferença estatística entre os grupos. Analisando de forma individual, o paciente que apresentou reação do tipo 2, antes do tratamento foi o único a não apresentar nenhuma NKT com TNF⁺, porém após o tratamento, foi esse o indivíduo que apresentou os maiores valores absolutos de NKT⁺TNF⁺. O paciente com reação do tipo 1, foi o único a apresentar uma redução da quantidade de células positivas após o início do tratamento.

A análise das células NKT⁺IL-9⁺ (Figura 19C), se mostrou similar aquelas TNF⁺, também foi observada uma tendência ao aumento após o tratamento, sem diferença estatística. Além disso, de forma individual, os pacientes com reação tipo 2 e reação tipo 1, também tiveram a análise similar.

Ao realizar a correlação entre TNF e IL-9 produzidas pelas NKT nas áreas de lesão após o tratamento, observou-se uma correlação estatisticamente significativa (R quadrado 0,9256 IC 95% [0,5276 a 0,9976], valor-p 0,0088) (Figura 19D). A correlação realizada com os valores pré-tratamento não foi estatisticamente

significante (dados não mostrados). A expressão de IFN- γ estava muito diminuída em todos os pacientes analisados, tanto antes como após o tratamento.



A) Imunomarcacão na área de lesão das células NKT e expressão de TNF (roxo), interleucina-9 (vermelho) e Interferon- γ (amarelo). DAPI representa o marcador nuclear. B) Para cada paciente, foram feitas de 3-5 fotos do campo da lesão. Assim, foi realizada a contagem do número de NKT+TNF+ por foto, realizando a média de células/foto. C) Realizada mesma análise, para as células NKT+IL-9+. D) Correlação entre a média de células NKT TNF+ e IL-9+ após o tratamento, nas áreas de lesão. Realizada a correlação de Pearson R quadrado 0,9256 IC 95% (0,5276 a 0,9976), valor-p 0,0088. NKT: células T matadoras naturais; IL9: interleucina 9; TNF+: fator de necrose tumoral +.

Figura 19. Produção de citocinas pelas células T matadoras naturais em áreas de lesão de pacientes com hanseníase

4 DISCUSSÃO

Em relação a epidemiologia, apesar de uma amostra relativamente pequena (12 pacientes), nosso estudo teve proporções similares com o perfil da hanseníase no Brasil, com maior acometimento de homens adultos: 55,7% sendo a faixa de 50-59 anos a mais acometida no boletim epidemiológico⁽²⁾ e nesse estudo 83,3% dos pacientes eram do sexo masculino, com a mediana de idade de 47,5 anos. Todos os pacientes foram diagnosticados como multibacilares, que continua sendo a forma mais comum da doença, com aumento da proporção em relação a paucibacilares.⁽¹⁷¹⁾

A análise dos parâmetros hematológicos, demonstrou que quando comparado aos controles, os valores de hemoglobina e linfócitos estavam diminuídos. Já foi descrito que a diminuição dos valores de hemoglobina pode estar presente em até 65% dos pacientes com hanseníase e que isso pode ser explicado pelo fato da dapsona levar a hemólise. Contudo, nesse mesmo estudo foi detectada uma linfocitose ao invés da linfopenia encontrada em nos nossos pacientes.⁽¹⁷²⁾ Essa discordância pode ser explicada pela alta prevalência de reações hanseníase no primeiro estudo, algo que não se repete com o grupo avaliado, apesar de não existir consenso na literatura em relação as alterações na série branca.⁽¹⁷³⁾

Na nossa análise sobre a expressão gênica no sangue periférico de pacientes com hanseníase, encontramos um aumento de IL-6 e uma redução de IL-9. Já foi descrita a importância da produção de IL-6 pelas ILC2 principalmente em infecções por *S. aureus*⁽¹⁷⁴⁾ como da asma⁽¹⁷⁵⁾ e na resposta contra patógenos de pele, como *Staphylococcus aureus*.⁽¹⁷⁴⁾

O papel da IL-9 em infecções bacterianas foi sugerido como protetor em modelo de sepse induzida por *Pseudomonas aeruginosa*, no qual a sua atividade foi acompanhada por redução de TNF- α , IL-12 e IFN- γ .⁽¹⁷⁶⁾ Em resposta ao *M. leprae*, demonstrou-se que IL-9 apresenta um comportamento Th2 atípico por induzir a uma modulação da resposta imune e participar da interação com citocinas que controlam a citotoxicidade em resposta à micobactéria.⁽¹⁷⁷⁾ Em modelos murinos, foi demonstrado que a IL-9 presente nos pulmões de camundongos induz a produção de IL-13 e que a IL-9 pode ser produzida tanto por células ILC2 quanto por células NKT.⁽¹⁷⁸⁾ Essas citocinas isoladamente ou em combinação, reduzem o número de células ciliadas e a

resistência transepitelial durante a diferenciação do epitélio normal, induzindo assim um mecanismo de reparo em modelos de asma.⁽¹⁷⁹⁾

O GATA3 além de ser importante para a caracterização das células ILC2⁽¹⁷⁹⁾ está associado a diferenciação Th2 e a produção de IL-5 e IL-13,⁽¹⁸⁰⁾ sendo que mutações de GATA3 já foram relacionados com resistência e suscetibilidade para a hanseníase.⁽¹⁸¹⁾ O GATA3 está aumentado nos nossos pacientes, o que corrobora o perfil mais Th2 da hanseníase multibacilar. Além disso, o fator PLZF também está aumentando nos nossos pacientes, apesar de uma redução de Va24, característico das NKT.

Apesar de não ser exclusivo, o fator de transcrição PLZF é importante para as funções efectoras das células NKT⁽¹⁸¹⁾ para a regulação da transcrição de fator de transcrição Maf (c-Maf), inibidor da proteína de ligação ao DNA ID-2 (Id2) e coestimulador indutivo de células T (ICOS), bem como os receptores pró-inflamatórios de citocinas IL12Rb1 e IL18R1,⁽¹⁷⁰⁾ sendo descrito também nas células T IL-17⁺ $\gamma\delta$,⁽¹⁸²⁾ seu aumento na hanseníase pode estar relacionado com a ativação do sistema imune.

Nós avaliamos o papel das células da imunidade inata no sangue periférico de pacientes com hanseníase multibacilar. Considerando os diferentes subtipos de monócitos, observamos uma diminuição da frequência nos clássicos e aumento nos intermediários. Além disso, todos os subtipos apresentaram um aumento da expressão de CD163 nos pacientes com hanseníase, sendo esse aumento ainda mais expressivo no grupo dos monócitos intermediários.

Esses achados se correlacionam com alguns dados da literatura, que demonstram a expansão e o papel dos monócitos intermediários em situações inflamatórias. Como na asma, na qual foram os monócitos intermediários que estavam aumentados nos casos graves, também tendo um aumento na expressão de CD163.⁽¹⁸³⁾ Outro estudo demonstrou um aumento dos monócitos intermediários na artrite reumatoide, sendo que eles foram potentes indutores da resposta Th17.⁽¹⁸⁴⁾

Em relação a expressão de CD163, ela foi positivamente regulada pelas citocinas anti-inflamatórias (IL-6 e IL-10) e negativamente por LPS, IFN e TNF⁽¹⁸⁵⁾ em monócitos e macrófagos. Na hanseníase, já foi demonstrado que tanto os valores de CD163 expressos na superfície dos monócitos⁽¹⁸⁶⁾ como a concentração sérica do CD163 solúvel (sCD163) apresentam uma correlação com a hanseníase multibacilar.^(186,187) Além disso, na leishmaniose, o sCD163 se correlacionou com a gravidade da doença e o *Leishmania* induziu a expressão de CD163 nos monócitos e

neutrófilos.⁽¹⁸⁷⁾ Com isso, nossos resultados sugerem que o aumento dos monócitos intermediários e da expressão de CD163 está relacionado com o perfil de resposta da hanseníase multibacilar.

Ampliando a nossa análise, verificamos a expressão de receptores de quimiocinas que se correlacionam com a capacidade de migração dos monócitos. Os monócitos intermediários, nos pacientes com hanseníase multibacilar, apresentavam um aumento na expressão de CXCR3 e de CCR2. Os não clássicos apresentaram um aumento na expressão de CCR2 e os clássicos apresentaram uma redução da população de duplo negativo (CXCR3⁻CCR2⁻) nos pacientes. Com isso, sugerimos um possível recrutamento dos monócitos, inclusive dos intermediários na hanseníase.

Resultados similares, foram encontrados em um estudo de leishmaniose cutânea, que também descreveu um aumento na frequência dos monócitos intermediários e na expressão de CCR2 destes, sugerindo que eles migram para as áreas de lesão na pele e assim contribuem para reação inflamatória.⁽¹⁸⁸⁾

O CCR2 foi descrito como essencial para o recrutamento de monócitos e DC para os pulmões em modelos de tuberculose, sendo que sua deleção levou a uma maior mortalidade e carga do bacilo nos pulmões.^(189,190) Também foi proposto, que os monócitos inflamatórios CCR2⁺ são importantes para o transporte do *M. tuberculosis* para os linfonodos.⁽¹⁹¹⁾ Na hanseníase, o CCR2 estava aumentado nos linfócitos na circulação sanguínea,⁽¹⁹²⁾ mas não foram encontradas diferenças nas áreas de lesão entre as diferentes formas clínicas ou controles saudáveis.⁽¹⁹³⁾

Já o CXCR3 é um receptor reconhecido por uma variedade de quimiocinas, como CXCL4 e CXCL10, estando relacionado com a migração de leucócitos e com a angiogênese.⁽¹⁹⁴⁾ Em monócitos, a ausência de CXCR3 levou a uma diminuição da migração e metástase pulmonar em um modelo de melanoma.⁽¹⁹⁵⁾ A expressão de CXCR3 por monócitos também foi demonstrada secundária ao vírus HIV, levando ao recrutamento dessas células através da barreira hematocefálica e contribuindo para o desenvolvimento de manifestações neurológicas associadas ao HIV.⁽¹⁹⁶⁾ Na resposta as micobactérias, em um modelo animal, a deficiência de CXCR3, diminuiu a migração dos monócitos infectados, o que limitou a disseminação do bacilo e a formação de granulomas.⁽¹⁹⁷⁾

Além dos monócitos, também avaliamos o perfil das DC na hanseníase multibacilar. Nós encontramos diferenças entre os subtipos, com uma diminuição das mDCs e um aumento das plasmocitoides (pDcs) nos pacientes.

As alterações nas frequências das DC, com aumento das plasmocitoides também foram demonstradas em outras doenças. Em pacientes com tuberculose pulmonar, houve uma diminuição dos valores de dendríticas totais e⁽¹⁹⁸⁾ e aumento das pDCs em relação as mDCs, o que não foi encontrado após o tratamento.⁽¹⁹⁹⁾ Um aumento das pDC também foi encontrado como fator protetor na dengue grave,⁽²⁰⁰⁾ enquanto uma diminuição das DC foi descrita na malária.⁽²⁰¹⁾ Em doenças autoimunes, como o vitiligo, as DC estavam aumentadas, o que se correlacionava positivamente com a concentração de IL-17 e negativamente com a de IL-10.⁽²⁰²⁾

Tanto as células dendríticas como os monócitos expressam PDL-1, que atua inibindo as células T, através da ligação com PD1, sendo relacionado com anergia e diminuição da resposta imune.⁽²⁰³⁾ Na tuberculose, foi encontrado um aumento da expressão de PDL-1 e PD-1 nos monócitos e linfócitos T de pacientes com a doença ativa, sendo que o bloqueio dessa ligação levou a uma proliferação dos linfócitos T CD4.⁽²⁰⁴⁾ O bloqueio da ligação de PD-1/PDL-1 também levou a uma maior ativação imune e controle do patógeno, em estudos de malária,⁽²⁰⁵⁾ leishmaniose⁽²⁰⁶⁾ e cardiomiopatia induzida pelo *Trypanosoma cruzi*.⁽²⁰⁷⁾

Na hanseníase, a expressão do PD1 estava aumentada nas células T.^(203,208) O aumento da expressão de PDL-1 na hanseníase foi descrito nos linfócitos B, monócitos e DC, especialmente em pacientes com hanseníase multibacilar. A expressão de PDL-1 nas células APC levou a uma diminuição da ativação e das ações efetoras das células T, o que contribui para a persistência da infecção pelo *M. leprae*.^(65,209) Na hanseníase multibacilar, foi encontrado um aumento das células B reguladoras, com aumento de IL-10, FoxP3 e PDL-1, o que levou ao aumento da expressão de PD1 nas Tregs.⁽²¹⁰⁾

Em nosso estudo, os monócitos clássicos e as mDC apresentavam uma redução na expressão de PDL-1 enquanto nos monócitos intermediários e as pDC, houve um aumento da sua expressão, sendo que esses subtipos também estavam aumentados em frequência. Portanto, o nosso estudo acrescenta informações aos dados da literatura, destacando o papel dos monócitos intermediários e pDC, possivelmente também através da expressão de PDL-1, levando a uma resposta imune menos efetiva.

Dada a complexidade da resposta imune a hanseníase, também avaliamos as células ILC2 e NKT. Nós encontramos uma diminuição da circulação de ILC2, mas com um aumento da produção de IL-4 e TNF nos pacientes com hanseníase. Em um modelo de infecção por *Schistosoma haematobium*, essa célula também foi

descrita em número diminuído na periferia de crianças infectadas, voltando ao valor basal após a cura da infecção.⁽²¹¹⁾

Para as células NKT, encontramos diferença estatística ao estimular as células, com um aumento das NKT nos pacientes. Variações na frequência de NKT, já foram descritas em inúmeras condições. Uma diminuição das NKTs circulantes foi encontrada em estudos lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide,^(212,213) porém seu aumento foi observado em pacientes com psoríase, no qual havia uma superexpressão de CD1d na pele e aumento na produção de IFN- γ .⁽²¹⁴⁾ Ainda, as NKT podem ter uma função protetora, através da produção IL-19, como foi descrito em um modelo de colite.⁽²¹⁵⁾

Ainda em relação a essas células na circulação sanguínea, nós encontramos uma correlação positiva entre os valores de NKT e ILC2 nos pacientes, o que pode indicar um papel dessas células principalmente na fase inicial da infecção. Para aprofundar o estudo em relação a esses tipos celulares, nós também avaliamos o seu comportamento nas áreas de lesão, antes e depois do início do tratamento, através da microscopia confocal.

Com isso, identificamos uma tendência a diminuição de células ILC2 e um aumento das NKT após o tratamento, mas sem diferença estatística. A correlação entre as células ILC2 e NKT antes do tratamento foi negativa e estatisticamente significativa, o que não foi encontrado após o tratamento.

A microscopia confocal foi descrita anteriormente como uma forma de avaliação de danos nas pequenas fibras sensoriais da córnea de pacientes com diagnóstico de hanseníase.⁽²¹⁶⁾ Ademais, as células ILC2 foram caracterizadas utilizando a microscopia confocal, em modelos de asma com camundongos.⁽²¹⁷⁾ No tecido, as células NKT já foram descritas em linfonodos, pele de camundongos e em granulomas após inoculação de *M. tuberculosis*.⁽²¹⁸⁾ Contudo, em nossos conhecimentos, essa foi a primeira vez que essa metodologia foi utilizada para avaliar essas células em tecidos de pacientes com hanseníase.

O recrutamento desses tipos celulares, já foi avaliado em um modelo de sepse com foco abdominal em camundongos. Nele, as ILC2 já estavam aumentadas nas áreas infectadas nas primeiras 24 horas e com aumento da produção de IL-33 no plasma. Foi demonstrado um recrutamento inicial de ILC2 e NKT do fígado para as áreas de lesão e uma possível interação entre as NKT e ILC2, pois os camundongos deficientes de iNKT tinham um menor recrutamento de ILC2.⁽²¹⁹⁾

Em relação a funcionalidade, investigamos a produção de TNF, IL-9 e IFN- γ pelas células NKT no tecido.^(220,221) Em relação ao TNF e a IL-9, foi observada uma tendência ao aumento da quantidade após o tratamento, mas sem diferença estatística entre os grupos. Após o início do tratamento, nós observamos uma correlação positiva entre a produção de TNF e IL-9. A expressão de IFN- γ estava muito diminuída em todos os pacientes analisados, tanto antes como após o tratamento, não sendo possível realizar a análise.

Apesar do pequeno número de pacientes avaliados, notamos algumas particularidades em relação aos pacientes que apresentam reação tipo 1, tipo 2 ou mista. Na análise da circulação periférica, eles estavam entre os que apresentaram a maior produção de TNF pelas ILC2 e expressão de CCR2 pelos monócitos. Nas lesões de pele, o paciente com reação tipo 1 apresentou uma tendência contrária aos demais pacientes, com um aumento das células ILC2 e redução das NKT após o tratamento. O paciente com reação do tipo 2 foi o único a não apresentar nenhuma NKT com TNF⁺, porém após o tratamento, foi esse o indivíduo que apresentou os maiores valores absolutos de NKT⁺TNF⁺. Apesar de serem resultados individuais, eles estão de acordo com a literatura, que demonstra uma diferença na resposta imune dos pacientes com reações hansênicas.⁽²²²⁾

Existem algumas limitações na interpretação dos nossos resultados. Tivemos um número limitado de pacientes (n=12) e que apresentavam o mesmo perfil de hanseníase (multibacilar). Outro ponto foi que as análises pós-tratamento foram feitas em diferentes pontos, sendo que o tempo de tratamento não foi homogêneo para todos os pacientes. Mais estudos devem ser feitos, com maior número de pacientes, comparando os pacientes multibacilares e paucibacilares e possivelmente correlacionado com a baciloscopia nas áreas de lesão e comparando com áreas de pacientes saudáveis. Também seria interessante avaliar outros aspectos funcionais e de interação, principalmente dos monócitos intermediários e pDC. Em relação a metodologia utilizada, não existem muitos protocolos e estudos disponíveis com o uso de confocal para NKT e ILC2. Mais estudos na área, que possam fornecer reprodutibilidade, podem ajudar a esclarecer a atuação dessas células em um tecido tão complexo como a pele.

5 CONCLUSÕES

1. Os monócitos intermediários apresentaram um aumento na expressão do marcador CD163 e dos receptores de quimiocinas (CXCR3 e CCR2) nos pacientes com hanseníase multibacilar;
2. As células dendríticas plasmocitoides, em conjunto com os monócitos intermediários, também apresentaram um aumento de PDL1, refletindo um perfil específico de resposta na hanseníase multibacilar;
3. Em uma avaliação piloto das células ILC2 e NKT, observamos uma diminuição da circulação de ILC2, mas com um aumento da produção de IL-4 e TNF nos pacientes com hanseníase;
4. Para as células NKT, encontramos um aumento na circulação sanguínea dos pacientes;
5. Nos tecidos, apesar das células ILC2 e NKT estarem presentes, não encontramos diferenças estatisticamente significantes antes e após o início do tratamento.

6 REFERÊNCIAS

1. World Health Organization (WHO). Global leprosy (Hansen disease) update, 2022: new paradigm – control to elimination. *Wkly Epidemiol Rec.* 2023;98(37):409-30.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico: hanseníase. 2023;N. Esp.
3. Anantharam P, Emerson LE, Bilcha KD, Fairley JK, Tesfaye AB. Undernutrition, food insecurity, and leprosy in North Gondar Zone, Ethiopia: a case-control study to identify infection risk factors associated with poverty. *PLoS Negl Trop Dis.* 2021;15(6):e0009456.
4. Kerr-Pontes LR, Barreto ML, Evangelista CM, Rodrigues LC, Heukelbach J, Feldmeier H. Socioeconomic, environmental, and behavioural risk factors for leprosy in North-east Brazil: results of a case-control study. *Int J Epidemiol.* 2006;35(4):994–1000.
5. Cabral-Miranda W, Chiaravalloti Neto F, Barrozo LV. Socio-economic and environmental effects influencing the development of leprosy in Bahia, north-eastern Brazil. *Trop Med Int Health.* 2014;19(12):1504–14.
6. Goulart IM, Araujo S, Filho AB, de Paiva PH, Goulart LR. Asymptomatic leprosy infection among blood donors may predict disease development and suggests a potential mode of transmission. *J Clin Microbiol.* 2015;53(10):3345–8.
7. Reibel F, Cambau E, Aubry A. Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy. *Med Mal Infect.* 2015;45(9):383–93.
8. Job CK, Jayakumar J, Kearney M, Gillis TP. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;78(3):518–21.
9. Sugawara-Mikami M, Tanigawa K, Kawashima A, Kiriya M, Nakamura Y, Fujiwara Y, et al. Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium leprae*. *Virulence.* 2022;13(1):1985-2011.
10. Richardus JH, Ignotti E, Smith WC. Epidemiology of leprosy. In: Scollard DM, Gillis TP, editors. *International textbook of leprosy*. Greenville: American Leprosy Missions; 2016 [cited 2024 Dec 12]. Available from: <https://doi.org/10.1489/itl>.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Hanseníase. Brasília: Ministério da Saúde; 2022. 152 p.
12. Araújo MG. [Leprosy in Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;36(3):373–82. Portuguese.
13. World Health Organization (WHO). Expert Committee on Leprosy. Geneva: World Health Organization; 2012.
14. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1966;34(3):255–73.
15. Kumar DP, Uprety S, Dogra S. Clinical diagnosis of leprosy. In: Scollard DM, Gillis TP, editors. *International textbook of leprosy*. Greenville: American Leprosy Missions; 2017 [citado 2024 Fev 19]. Available from: <https://doi.org/10.1489/itl.2.1>.
16. Pardillo FE, Fajardo TT, Abalos RM, Scollard D, Gelber RH. Methods for the classification of leprosy for treatment purposes. *Clin Infect Dis.* 2007;44(8):1096–9.
17. World Health Organization (WHO). Prevention of coronary heart disease. Geneva: World Health Organization; 1982.
18. Souza CS. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. *Medicina, Ribeirão Preto.* 1997;30:325-34.

19. World Health Organization (WHO). Guidelines for the diagnosis, treatment and prevention of leprosy. New Delhi: World Health Organization, Regional Office for South-East Asia; 2018.
20. World Health Organization (WHO). Guide to eliminate leprosy as a public health problem. Geneva: World Health Organization; 2000.
21. Croft RP, Smith WC, Nicholls P, Richardus JH. Sensitivity and specificity of methods of classification of leprosy without use of skin-smear examination. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1998;66(4):445–50.
22. Lehman LF, Orsini MB, Fuzikawa PL, Lima RC, Gonçalves SD. Avaliação neurológica simplificada. Belo Horizonte: ALM International; 1997.
23. Foss NT. [Reactional episodes in leprosy]. *Medicina, Ribeirão Preto.* 2003;36(2/4): 453-9. Portuguese.
24. Nery JA, Sales AM, Illarramendi X, Duppre NC, Jardim MR, Machado AM. Contribution to diagnosis and management of reactional states: a practical approach. *An Bras Dermatol.* 2006; 81(4):367-75.
25. Verhagen CE, Wierenga EA, Buffing AA, Chand MA, Faber WR, Das PK. Reversal reaction in borderline leprosy is associated with a polarized shift to type 1-like *Mycobacterium leprae* T cell reactivity in lesional skin: a follow-up study. *J Immunol.* 1997;159(9):4474-83.
26. Rêgo JL, de Lima Santana N, Machado PR, Ribeiro-Alves M, de Toledo-Pinto TG, Castellucci LC, et al. Whole blood profiling of leprosy type 1(reversal) reactions highlights prominence of innate immune response genes. *BMC Infect Dis.* 2018;18(1):422.
27. Walker SL, Balagon M, Darlong J, Doni SN, Hagge DA, Halwai V, et al.; Erythema Nodosum Leprosum International Study Group. ENLIST 1: an international multi-centre cross-sectional study of the clinical features of erythema nodosum leprosum. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(9):e0004065.
28. Maymone MB, Venkatesh S, Laughter M, Abdat R, Hugh J, Dacso MM, et al. Leprosy: treatment and management of complications. *J Am Acad Dermatol.* 2020;83(1):17–30.
29. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota técnica n. 16/2021-CGDE/DCCI/SVS/MS de 19 de julho de 2021. Orientações a Estados e Municípios para a implementação da “ampliação de uso da clofazimina para o tratamento da hanseníase paucibacilar, no âmbito do Sistema Único de Saúde”, conforme o determinado na Portaria SCTIE/MS N. 71, de 11 de dezembro de 2018.
30. Dogra S, Kumaran MS, Narang T, Radotra BD, Kumar B. Clinical characteristics and outcome in multibacillary (MB) leprosy patients treated with 12 months WHO MDT-MBR: a retrospective analysis of 730 patients from a leprosy clinic at a tertiary care hospital of Northern India. *Lepr Rev.* 2013;84(1):65–75.
31. Podder I, Saha A, Bandyopadhyay D. Clinical and histopathological response to multidrug therapy in paucibacillary leprosy at the end of 6 months: a prospective observational study from Eastern India. *Indian J Dermatol.* 2018;63(1):47–52.
32. Li HY, Hu LF, Huang WB, Liu GC, Yuan LC, Jin Z, et al. Risk of relapse in leprosy after fixed-duration multidrug therapy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1997;65(2):238–45.
33. Dasananjali K, Schreuder PA, Pirayavaraporn C. A study on the effectiveness and safety of the WHO/MDT regimen in the northeast of Thailand; a prospective study, 1984-1996. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1997;65(1):28–36.
34. World Health Organization (WHO). Rumor à zero hanseníase: estratégia global de hanseníase 2021–2030. Nova Delhi: Organização Mundial da Saúde, Escritório Regional para o Sudeste Asiático; 2021.

35. Blok D; Global Partnership for Zero Leprosy (GPLZ). GPZL reports on research priorities. *Lepr Rev.* 2019;90(3):237–89.
36. Froes LA, Sotto MN, Trindade MA. Leprosy: clinical and immunopathological characteristics. *An Bras Dermatol.* 2022;97(3):338–47.
37. de Sousa JR, Sotto MN, Simões Quaresma JA. Leprosy as a complex infection: breakdown of the Th1 and Th2 immune paradigm in the immunopathogenesis of the disease. *Front Immunol.* 2017;8:1635.
38. Modlin RL. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. *J Invest Dermatol.* 1994;102(6):828–32.
39. Sampaio LH, Sousa AL, Barcelos MC, Reed SG, Stefani MM, Duthie MS. Evaluation of various cytokines elicited during antigen-specific recall as potential risk indicators for the differential development of leprosy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31(7):1443–51.
40. Carvalho KI, Maeda S, Marti L, Yamashita J, Haslett PA, Kallas EG. Immune cellular parameters of leprosy and human immunodeficiency virus-1 co-infected subjects. *Immunology.* 2008;124(2):206–14.
41. Sadhu S, Khaitan BK, Joshi B, Sengupta U, Nautiyal AK, Mitra DK. Reciprocity between regulatory T cells and Th17 cells: relevance to polarized immunity in leprosy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(1):e0004338.
42. Saini C, Ramesh V, Nath I. CD4+ Th17 cells discriminate clinical types and constitute a third subset of non Th1, Non Th2 T cells in human leprosy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(7):e2338.
43. de Almeida-Neto FB, Assis Costa VM, Oliveira-Filho AF, de Souza Franco E, Tavares Julião de Lima EV, Barros de Lorena VM, et al. TH17 cells, interleukin-17 and interferon- γ in patients and households contacts of leprosy with multibacillary and paucibacillary forms before and after the start of chemotherapy treatment. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2015;29(7):1354–61.
44. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature.* 2008;453(7198):1051–7.
45. Liu Y, Shi C, Ma S, Ma Y, Lu X, Zhu J, et al. The protective role of tissue-resident interleukin 17A-producing gamma delta T cells in *Mycobacterium leprae* infection. *Front Immunol.* 2022;13:961405.
46. Schmitt E, Germann T, Goedert S, Hoehn P, Huels C, Koelsch S, et al. IL-9 production of naive CD4+ T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF-beta and IL-4, and is inhibited by IFN-gamma. *J Immunol.* 1994;153(9):3989–96.
47. Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, et al. IL-4 inhibits TGF beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol.* 2008;9(12):1347–55.
48. de Sousa JR, Pagliari C, de Almeida DS, Barros LF, Carneiro FR, Dias LB Jr, et al. Th9 cytokines response and its possible implications in the immunopathogenesis of leprosy. *J Clin Pathol.* 2017;70(6):521–7.
49. Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today.* 2000;21(11):573–83.
50. Gapin L. The making of NKT cells. *Nat Immunol.* 2008;9(9):1009–11.
47. Kronenberg M, Gapin L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(8):557–68.
51. Kronenberg M, Gapin L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(8):557–68.
52. Balato A, Unutmaz D, Gaspari AA. Natural killer T cells: an unconventional T-cell subset with diverse effector and regulatory functions. *J Invest Dermatol.* 2009;129(7):1628–42.

53. Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, et al. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest*. 2004;113(10):1490–7.
54. Constantinides MG, Bendelac A. Transcriptional regulation of the NKT cell lineage. *Curr Opin Immunol*. 2013;25(2):161–7.
55. Bharhani MS, Chiu B, Na KS, Inman RD. Activation of invariant NKT cells confers protection against *Chlamydia trachomatis*-induced arthritis. *Int Immunol*. 2009;21(7):859–70.
56. Nieuwenhuis EE, Matsumoto T, Exley M, Schleipman RA, Glickman J, Bailey DT, et al. CD1d-dependent macrophage-mediated clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from lung. *Nat Med*. 2002;8(6):588–93.
57. Oishi Y, Sumida T, Sakamoto A, Kita Y, Kurasawa K, Nawata Y, et al. Selective reduction and recovery of invariant Valpha24JalphaQ T cell receptor T cells in correlation with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2001;28(2):275–83.
58. van der Vliet HJ, von Blomberg BM, Hazenberg MD, Nishi N, Otto SA, van Benthem BH, et al. Selective decrease in circulating V alpha 24+V beta 11+ NKT cells during HIV type 1 infection. *J Immunol*. 2002;168(3):1490–5.
59. Chan WL, Pejnovic N, Liew TV, Lee CA, Groves R, Hamilton H. NKT cell subsets in infection and inflammation. *Immunol Lett*. 2003;85(2):159–63.
60. Lin Y, Roberts TJ, Wang CR, Cho S, Brutkiewicz RR. Long-term loss of canonical NKT cells following an acute virus infection. *Eur J Immunol*. 2005;35(3):879–89.
61. Snyder-Cappione JE, Nixon DF, Loo CP, Chapman JM, Meiklejohn DA, Melo FF, et al. Individuals with pulmonary tuberculosis have lower levels of circulating CD1d-restricted NKT cells. *J Infect Dis*. 2007;195(9):1361–4.
62. Tatituri RV, Watts GF, Bhowruth V, Barton N, Rothchild A, Hsu FF, et al. Recognition of microbial and mammalian phospholipid antigens by NKT cells with diverse TCRs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(5):1827–32.
63. Apostolou I, Takahama Y, Belmant C, Kawano T, Huerre M, Marchal G, et al. Murine natural killer T(NKT) cells [correction of natural killer cells] contribute to the granulomatous reaction caused by mycobacterial cell walls. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Apr 27;96(9):5141–6. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Jun 22;96(13):7610.
64. Mempel M, Flageul B, Suarez F, Ronet C, Dubertret L, Kourilsky P, et al. Comparison of the T cell patterns in leprosy and cutaneous sarcoid granulomas. Presence of Valpha24-invariant natural killer T cells in T-cell-reactive leprosy together with a highly biased T cell receptor Valpha repertoire. *Am J Pathol*. 2000;157(2):509–23.
65. Sadhu S, Kumar S, Mitra DK, Joshi B. Activated TLR2/4-positive T cells boost cell exhaustion during lepromatous leprosy infection via PD-1 upregulation. *Heliyon*. 2022;8(11):e11633.
66. Carvalho KI, Bruno FR, Snyder-Cappione JE, Maeda SM, Tomimori J, Xavier MB, et al. Lower numbers of natural killer T cells in HIV-1 and *Mycobacterium leprae* co-infected patients. *Immunology*. 2012;136(1):96–102.
67. Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. Innate lymphoid cells—a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(2):145–9.
68. Moro K, Yamada T, Tanabe M, Takeuchi T, Ikawa T, Kawamoto H, et al. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature*. 2010;463(7280):540–4.

69. Mjösberg JM, Trifari S, Crellin NK, Peters CP, van Drunen CM, Piet B, et al. Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CCR4 and CD161. *Nat Immunol.* 2011;12(11):1055–62.
70. Hoyler T, Klose CS, Souabni A, Turqueti-Neves A, Pfeifer D, Rawlins EL, et al. The transcription factor GATA-3 controls cell fate and maintenance of type 2 innate lymphoid cells. *Immunity.* 2012;37(4):634–48.
71. Turner JE, Morrison PJ, Wilhelm C, Wilson M, Ahlfors H, Renauld JC, et al. IL-9-mediated survival of type 2 innate lymphoid cells promotes damage control in helminth-induced lung inflammation. *J Exp Med.* 2013;210(13):2951–65.
72. Mohapatra A, Van Dyken SJ, Schneider C, Nussbaum JC, Liang HE, Locksley RM. Group 2 innate lymphoid cells utilize the IL-4-IL-13 module to coordinate epithelial cell maintenance of lung homeostasis. *Mucosal Immunol.* 2016;9(1):275–86.
73. Krämer B, Goeser F, Lutz P, Glässner A, Boesecke C, Schwarze-Zander C, et al. Compartment-specific distribution of human intestinal innate lymphoid cells is altered in HIV patients under effective therapy. *PLoS Pathog.* 2017;13(5):e1006373.
74. Drake LY, Iijima K, Kita H. Group 2 innate lymphoid cells and CD4+ T cells cooperate to mediate type 2 immune response in mice. *Allergy.* 2014;69(10):1300–7.
75. Roediger B, Kyle R, Yip KH, Sumaria N, Guy TV, Kim BS, et al. Cutaneous immunosurveillance and regulation of inflammation by group 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol.* 2013;14(6):564–73.
76. Kim BS, Siracusa MC, Saenz SA, Noti M, Monticelli LA, Sonnenberg GF, et al. TSLP elicits IL-33-independent innate lymphoid cell responses to promote skin inflammation. *Sci Transl Med.* 2013;5(170):170ra16.
77. Salimi M, Barlow JL, Saunders SP, Xue L, Gutowska-Owsiaik D, Wang X, et al. A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. *J Exp Med.* 2013;210(13):2939–50.
78. Petrasca A, Hambly R, Molloy O, Kearns S, Moran B, Smith CM, et al. Innate lymphoid cell (ILC) subsets are enriched in the skin of patients with hidradenitis suppurativa. *PLoS One.* 2023;18(2):e0281688.
79. Ssekamatte P, Nakibuule M, Nabatanzi R, Egesa M, Musubika C, Bbuye M, et al. Type 2 diabetes mellitus and latent tuberculosis infection moderately influence innate lymphoid cell immune responses in Uganda. *Front Immunol.* 2021;12:716819.
80. Papotto PH, Maeda S, Tomimori J, Xavier MB, Rizzo LV, Kallas EG, et al. New players in the same old game: disturbance of group 2 innate lymphoid cells in HIV-1 and *Mycobacterium leprae* co-infected patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(9):e0004030.
81. Wolf AA, Yáñez A, Barman PK, Goodridge HS. The ontogeny of monocyte subsets. *Front Immunol.* 2019;10:1642.
82. Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol.* 2008;26(1):421–52.
83. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(11):762–74.
84. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood.* 1989;74(7):2527–34.
85. Ziegler-Heitbrock HW. Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14+ CD16+ subpopulation. *Immunol Today.* 1996;17(9):424–8.
86. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood.* 2010;116(16):e74–80.

87. Ancuta P, Rao R, Moses A, Mehle A, Shaw SK, Luscinskas FW, et al. Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16⁺ monocytes. *J Exp Med*. 2003;197(12):1701–7.
88. Ravenhill BJ, Soday L, Houghton J, Antrobus R, Weekes MP. Comprehensive cell surface proteomics defines markers of classical, intermediate and non-classical monocytes. *Sci Rep*. 2020;10(1):4560.
89. Wong KL, Tai JJ, Wong WC, Han H, Sem X, Yeap WH, et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood*. 2011;118(5):e16–31.
90. Boyette LB, Macedo C, Hadi K, Elinoff BD, Walters JT, Ramaswami B, et al. Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. *PLoS One*. 2017;12(4):e0176460.
91. Ziegler-Heitbrock L. The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2007;81(3):584–92.
92. Tak T, Drylewicz J, Conemans L, de Boer RJ, Koenderman L, Borghans JA, et al. Circulatory and maturation kinetics of human monocyte subsets in vivo. *Blood*. 2017;130(12):1474–7.
93. Sugimoto C, Hasegawa A, Saito Y, Fukuyo Y, Chiu KB, Cai Y, et al. Differentiation kinetics of blood monocytes and dendritic cells in macaques: insights to understanding human Myeloid cell development. *J Immunol*. 2015;195(4):1774–81.
94. Robinson A, Han CZ, Glass CK, Pollard JW. Monocyte regulation in homeostasis and malignancy. *Trends Immunol*. 2021;42(2):104–19.
95. Serbina NV, Pamer EG. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol*. 2006;7(3):311–7.
96. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, et al. The proinflammatory CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol*. 2002;168(7):3536–42.
97. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*. 2007;317(5838):666–70.
98. Schmidl C, Renner K, Peter K, Eder R, Lassmann T, Balwierz PJ, et al.; FANTOM consortium. Transcription and enhancer profiling in human monocyte subsets. *Blood*. 2014;123(17):e90–9.
99. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, et al. Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity*. 2010;33(3):375–86.
100. Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, Winter P, Marell RR, Fliser D, et al. SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset. *Blood*. 2011;118(12):e50–61.
101. Skrzeczyńska-Moncznik J, Bzowska M, Loseke S, Grage-Griebenow E, Zembala M, Pryjma J. Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol*. 2008;67(2):152–9.
102. Sánchez MD, García Y, Montes C, París SC, Rojas M, Barrera LF, et al. Functional and phenotypic changes in monocytes from patients with tuberculosis are reversed with treatment. *Microbes Infect*. 2006;8(9-10):2492–500.

103. Balboa L, Barrios-Payan J, González-Domínguez E, Lastrucci C, Lugo-Villarino G, Mata-Espinoza D, et al. Diverging biological roles among human monocyte subsets in the context of tuberculosis infection. *Clin Sci (Lond)*. 2015;129(4):319–30.
104. Castaño D, García LF, Rojas M. Increased frequency and cell death of CD16+ monocytes with *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis (Edinb)*. 2011;91(5):348–60.
105. Balboa L, Romero MM, Basile JI, Sabio y García CA, Schierloh P, Yokobori N, et al. Paradoxical role of CD16+CCR2+CCR5+ monocytes in tuberculosis: efficient APC in pleural effusion but also mark disease severity in blood. *J Leukoc Biol*. 2011;90(1):69–75.
106. Hillman H, Khan N, Singhanian A, Dubelko P, Soldevila F, Tippalagama R, et al. Single-cell profiling reveals distinct subsets of CD14+ monocytes drive blood immune signatures of active tuberculosis. *Front Immunol*. 2023;13:1087010.
107. La Manna MP, Orlando V, Dieli F, Di Carlo P, Cascio A, Cuzzi G, et al. Quantitative and qualitative profiles of circulating monocytes may help identifying tuberculosis infection and disease stages. *PLoS One*. 2017;12(2):e0171358.
108. Rakotosamimanana N, Richard V, Raharimanga V, Gicquel B, Doherty TM, Zumla A, et al. Biomarkers for risk of developing active tuberculosis in contacts of TB patients: a prospective cohort study. *Eur Respir J*. 2015;46(4):1095–103.
109. Bloom BR, Mehra V. Immunological unresponsiveness in leprosy. *Immunol Rev*. 1984;80(1):5–28.
110. Horwitz MA, Levis WR, Cohn ZA. Defective production of monocyte-activating cytokines in lepromatous leprosy. *J Exp Med*. 1984;159(3):666–78.
111. Misra N, Selvakumar M, Singh S, Bharadwaj M, Ramesh V, Misra RS, et al. Monocyte derived IL 10 and PGE2 are associated with the absence of Th 1 cells and in vitro T cell suppression in lepromatous leprosy. *Immunol Lett*. 1995;48(2):123–8.
112. Sathish M, Bhutani LK, Sharma AK, Nath I. Monocyte-derived soluble suppressor factor(s) in patients with lepromatous leprosy. *Infect Immun*. 1983;42(3):890–9.
113. Sinsimer D, Fallows D, Peixoto B, Krahenbuhl J, Kaplan G, Manca C. *Mycobacterium leprae* actively modulates the cytokine response in naive human monocytes. *Infect Immun*. 2010;78(1):293-300.
114. Suzuki K, Fukutomi Y, Matsuoka M, Torii K, Hayashi H, Takii T, et al. Differential production of interleukin 1 (IL-1), IL-6, tumor necrosis factor, and IL-1 receptor antagonist by human monocytes stimulated with *Mycobacterium leprae* and *M. bovis* BCG. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1993;61(4):609-18.
115. Manca C, Peixoto B, Malaga W, Guilhot C, Kaplan G. Modulation of the cytokine response in human monocytes by *mycobacterium leprae* phenolic glycolipid-1. *J Interferon Cytokine Res*. 2012;32(1):27-33.
116. Ohyama H, Kato N, Takeuchi K, Soga Y, Uemura Y, Nishimura F, et al. Monocytes of distinct clinical types of leprosy are differentially activated by cross-linking class II HLA molecules to secrete IL-12. *APMIS*. 2004;112(4-5):271-4.
117. Kang TJ, Lee SB, Chae GT. A polymorphism in the toll-like receptor 2 is associated with IL-12 production from monocyte in lepromatous leprosy. *Cytokine*. 2002;20(2):56-62.
118. Shibuya M, Bergheme G, Passos S, Queiroz I, Rêgo J, Carvalho LP, et al. Evaluation of monocyte subsets and markers of activation in leprosy reactions. *Microbes Infect*. 2019;21(2):94-8.
119. Madigan CA, Cambier CJ, Kelly-Scumpia KM, Scumpia PO, Cheng TY, Zailaa J, et al. A macrophage response to *mycobacterium leprae* phenolic glycolipid initiates nerve damage in leprosy. *Cell*. 2017;170(5):973-85.e10.

120. Li X, Ma Y, Li G, Jin G, Xu L, Li Y, et al. Leprosy: treatment, prevention, immune response and gene function. *Front Immunol.* 2024;15:1298749.
121. Leal-Calvo T, Martins BL, Bertoluci DF, Rosa PS, de Camargo RM, Germano GV, et al. Large-Scale Gene Expression Signatures Reveal a Microbicidal Pattern of Activation in *Mycobacterium leprae*-Infected Monocyte-Derived Macrophages With Low Multiplicity of Infection. *Front Immunol.* 2021;12:647832. Erratum in: *Front Immunol.* 2022 Feb 03;13:852579.
122. Inkeles MS, Teles RM, Pouldar D, Andrade PR, Madigan CA, Lopez D, et al. Cell-type deconvolution with immune pathways identifies gene networks of host defense and immunopathology in leprosy. *JCI Insight.* 2016;1(15):e88843.
123. de Sousa JR, Lucena Neto FD, Sotto MN, Quaresma JA. Immunohistochemical characterization of the M4 macrophage population in leprosy skin lesions. *BMC Infect Dis.* 2018;18(1):576.
124. de Sousa JR, de Sousa RP, Aarão TL, Dias LB, Jr., Carneiro FR, Fuzii HT, et al. In situ expression of M2 macrophage subpopulation in leprosy skin lesions. *Acta Trop.* 2016;157:108-14.
125. Montoya D, Cruz D, Teles RM, Lee DJ, Ochoa MT, Krutzik SR, et al. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. *Cell Host Microbe.* 2009;6(4):343-53.
126. Moura DF, de Mattos KA, Amadeu TP, Andrade PR, Sales JS, Schmitz V, et al. CD163 favors *Mycobacterium leprae* survival and persistence by promoting anti-inflammatory pathways in lepromatous macrophages. *Eur J Immunol.* 2012;42(11):2925-36.
127. Yang D, Shui T, Miranda JW, Gilson DJ, Song Z, Chen J, et al. *Mycobacterium leprae*-Infected Macrophages Preferentially Primed Regulatory T Cell Responses and Was Associated with Lepromatous Leprosy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(1):e0004335.
128. da Silva TP, Bittencourt TL, de Oliveira AL, Prata RB, Menezes V, Ferreira H, et al. Macrophage polarization in Leprosy-HIV co-infected patients. *Front Immunol.* 2020;11:1493.
129. Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE, et al. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat Med.* 2005;11(6):653-60.
130. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998;392(6673):245-52.
131. Balan S, Saxena M, Bhardwaj N. Dendritic cell subsets and locations. In: Lhuillier C, Galluzzi L, editors. *International review of cell and molecular biology.* Vol. 348. Cambridge (MA): Academic Press; 2019. p. 1-68.
132. Granot T, Senda T, Carpenter DJ, Matsuoka N, Weiner J, Gordon CL, et al. Dendritic Cells Display Subset and Tissue-Specific Maturation Dynamics over Human Life. *Immunity.* 2017;46(3):504-15.
133. Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology.* 2018;154(1):3-20.
134. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol.* 2013;31(1):563-604.
135. Worah K, Mathan TS, Vu Manh TP, Keerthikumar S, Schreibelt G, Tel J, et al. Proteomics of Human Dendritic Cell Subsets Reveals Subset-Specific Surface Markers and Differential Inflammasome Function. *Cell Rep.* 2016;16(11):2953-66.

136. Williams M, Ginhoux F, Jakubzick C, Naik SH, Onai N, Schraml BU, et al. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(8):571-8.
137. Rovati B, Mariucci S, Manzoni M, Bencardino K, Danova M. Flow cytometric detection of circulating dendritic cells in healthy subjects. *Eur J Histochem*. 2008;52(1):45-52.
138. Jarrossay D, Napolitani G, Colonna M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2001;31(11):3388-93.
139. Nizzoli G, Krietsch J, Weick A, Steinfelder S, Facciotti F, Gruarin P, et al. Human CD1c⁺ dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T-cell responses. *Blood*. 2013;122(6):932-42.
140. Leal Rojas IM, Mok WH, Pearson FE, Minoda Y, Kenna TJ, Barnard RT, et al. Human blood CD1c⁺ dendritic cells promote Th1 and Th17 effector function in memory CD4⁺ T cells. *Front Immunol*. 2017;8:971.
141. van der Aar AM, Sylva-Steenland RM, Bos JD, Kapsenberg ML, de Jong EC, Teunissen MB. Loss of TLR2, TLR4, and TLR5 on Langerhans cells abolishes bacterial recognition. *J Immunol*. 2007;178(4):1986-90.
142. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*. 1999;284(5421):1835-7.
143. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, et al. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med*. 1999;5(8):919-23.
144. Johnson-Huang LM, McNutt NS, Krueger JG, Lowes MA. Cytokine-producing dendritic cells in the pathogenesis of inflammatory skin diseases. *J Clin Immunol*. 2009;29(3):247-56.
145. Kim TG, Kim DS, Kim HP, Lee MG. The pathophysiological role of dendritic cell subsets in psoriasis. *BMB Rep*. 2014;47(2):60-8.
146. Zaba LC, Fuentes-Duculan J, Eungdamrong NJ, Abello MV, Novitskaya I, Pierson KC, et al. Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells. *J Invest Dermatol*. 2009;129(1):79-88.
147. Wang A, Bai Y. Dendritic cells: The driver of psoriasis. *J Dermatol*. 2020;47(2):104-113.
148. Nestle FO, Conrad C, Tun-Kyi A, Homey B, Gombert M, Boyman O, et al. Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J Exp Med*. 2005;202(1):135-43.
149. Kamata M, Tada Y. Dendritic Cells and Macrophages in the Pathogenesis of Psoriasis. *Front Immunol*. 2022;13:941071.
150. Singh TP, Zhang HH, Borek I, Wolf P, Hedrick MN, Singh SP, et al. Monocyte-derived inflammatory Langerhans cells and dermal dendritic cells mediate psoriasis-like inflammation. *Nat Commun*. 2016;7(1):13581.
151. Arican O, Aral M, Sasmaz S, Ciragil P. Serum levels of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in patients with active psoriasis and correlation with disease severity. *Mediators Inflamm*. 2005;2005(5):273-9.
152. Khasawneh A, Baráth S, Medgyesi B, Béke G, Dajnoki Z, Gáspár K, et al. Myeloid but not plasmacytoid blood DCs possess Th1 polarizing and Th1/Th17 recruiting capacity in psoriasis. *Immunol Lett*. 2017;189:109-13.
153. Plasma interleukin-18 and dendritic cells in males with psoriasis vulgaris. *Mediators Inflamm*. 2007;2007:61254.

154. Prignano F, Ricceri F, Beccatti M, Di Gennaro P, Fiorillo C, Lotti T, et al. Circulating dendritic cell subsets in psoriatic patients before and after biologic therapy. *J Dermatol*. 2012;39(3):274-5.
155. Murray RA, Siddiqui MR, Mendillo M, Krahenbuhl J, Kaplan G. *Mycobacterium leprae* inhibits dendritic cell activation and maturation. *J Immunol*. 2007;178(1):338-44.
156. Hashimoto K, Maeda Y, Kimura H, Suzuki K, Masuda A, Matsuoka M, et al. *Mycobacterium leprae* infection in monocyte-derived dendritic cells and its influence on antigen-presenting function. *Infect Immun*. 2002;70(9):5167-76.
157. Germano GV, Braga AF, Camargo RM, Ballalai PB, Bezerra OC, Manta FS, et al. Association of CD209 (DC-SIGN) rs735240 SNV with paucibacillary leprosy in the Brazilian population and its functional effects. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2022;117:e220014.
158. Sieling PA, Jullien D, Dahlem M, Tedder TF, Rea TH, Modlin RL, et al. CD1 expression by dendritic cells in human leprosy lesions: correlation with effective host immunity. *J Immunol*. 1999;162(3):1851-8.
159. Simões Quaresma JA, de Oliveira MF, Ribeiro Guimarães AC, de Brito EB, de Brito RB, Pagliari C, et al. CD1a and factor XIIIa immunohistochemistry in leprosy: a possible role of dendritic cells in the pathogenesis of *Mycobacterium leprae* infection. *Am J Dermatopathol*. 2009;31(6):527-31.
160. Kulhria A, Punia RP, Basia D, Chhikara D. Differential expression of CD1a and s-100 by dendritic cells in different forms of leprosy—possible role of dendritic cells in pathogenesis. *Int J Clin Diagn Pathol*. 2019;2(1):380-3.
161. Rosa TL, Mendes MA, Linhares NR, Rodrigues TF, Dias AA, Leal-Calvo T, et al. The type I interferon pathway is upregulated in the cutaneous lesions and blood of multibacillary leprosy patients with erythema nodosum leprosum. *Front Med (Lausanne)*. 2022;9:899998.
162. Andrade PR, Amadeu TP, Nery JA, Pinheiro RO, Sarno EN. CD123, the plasmacytoid dendritic cell phenotypic marker, is abundant in leprosy type 1 reaction. *Br J Dermatol*. 2015;172(1):268-71.
163. Santos DO, Santos SL, Esquenazi D, Nery JA, Defruyt M, Lorré K, et al. Evaluation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) costimulatory molecules and dendritic cells on the immune response in leprosy. *Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi*. 2001;70(1):15-24.
164. Santos DO, Castro HC, Bourguignon SC, Bastos OM, Rodrigues CR, Van Heuverswyn H, et al. Expression of B7-1 costimulatory molecules in patients with multibacillary leprosy and reactional states. *Clin Exp Dermatol*. 2007;32(1):75-80.
165. Esquenazi D, Alvim IM, Pinheiro RO, Oliveira EB, Moreira LO, Sarno EN, et al. Correlation between central memory T cell expression and proinflammatory cytokine production with clinical presentation of multibacillary leprosy relapse. *PloS One*. 2015;10(5):e0127416. Erratum in: *PLoS One*. 2015 Aug 31;10(8):e0137445.
166. Elliott AD. Confocal microscopy: principles and modern practices. *Curr Protoc Cytom*. 2020;92(1):e68.
167. Paddock SW, Eliceiri KW. Laser scanning confocal microscopy: history, applications, and related optical sectioning techniques. *Methods Mol Biol*. 2014;1075:9-47.
168. Roederer M. Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats. *Cytometry*. 2001;45(3):194-205.
169. Lovelace P, Maecker HT. Multiparameter Intracellular Cytokine Staining. *Methods Mol Biol*. 2018;1678:151-66.
170. Gleimer M, von Boehmer H, Kreslavsky T. PLZF Controls the expression of a limited number of genes essential for NKT cell function. *Front Immunol*. 2012;3:374.

171. Barros ID, Sousa CD, Silva NR, Mascarenhas MD. Characterization of cases and epidemiological and operational indicators of leprosy: analysis of time series and spatial distribution, Piauí state, Brazil, 2007-2021. *Epidemiol Serv Saude*. 2024;33:e2023090.
172. Inyang IE, Bassey IE, Okoroiwu HU. Evaluation of hematological parameters in patients with leprosy in Southern Nigeria. *Germes*. 2022;12(4):478-87.
173. Gupta B, Gupta S, Chaudhary M, Raj AT, Awan KH, Patil S. Hematological alterations in lepromatous leprosy: A cross-sectional observational study. *Dis Mon*. 2020;66(7):100919.
174. Hardman CS, Chen YL, Salimi M, Nahler J, Corridoni D, Jagielowicz M, et al. IL-6 effector function of group 2 innate lymphoid cells (ILC2) is NOD2 dependent. *Sci Immunol*. 2021;6(59):eabe5084.
175. Malik B, Bartlett NW, Upham JW, Nichol KS, Harrington J, Wark PA. Severe asthma ILC2s demonstrate enhanced proliferation that is modified by biologics. *Respirology*. 2023;28(8):758-66.
176. Grohmann U, Van Snick J, Campanile F, Silla S, Giampietri A, Vacca C, et al. IL-9 protects mice from Gram-negative bacterial shock: suppression of TNF-alpha, IL-12, and IFN-gamma, and induction of IL-10. *J Immunol*. 2000;164(8):4197-203.
177. Finiasz MR, Franco MC, de la Barrera S, Rutitzky L, Pizzariello G, del Carmen Sasiain M, et al. IL-9 promotes anti-Mycobacterium leprae cytotoxicity: involvement of IFNgamma. *Clin Exp Immunol*. 2007;147(1):139-47.
178. Temann UA, Laouar Y, Eynon EE, Homer R, Flavell RA. IL9 leads to airway inflammation by inducing IL13 expression in airway epithelial cells. *Int Immunol*. 2007;19(1):1-10.
179. Parker JC, Thavagnanam S, Skibinski G, Lyons J, Bell J, Heaney LG, et al. Chronic IL9 and IL-13 exposure leads to an altered differentiation of ciliated cells in a well-differentiated paediatric bronchial epithelial cell model. *PLoS One*. 2013;8(5):e61023.
180. Zhu J, Min B, Hu-Li J, Watson CJ, Grinberg A, Wang Q, et al. Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses. *Nat Immunol*. 2004;5(11):1157-65.
181. Medeiros P, da Silva WL, de Oliveira Gimenez BB, Vallezi KB, Moraes MO, de Souza VN, et al. The GATA3 gene is involved in leprosy susceptibility in Brazilian patients. *Infect Genet Evol*. 2016;39:194-200.
182. Lu Y, Cao X, Zhang X, Kovalovsky D. PLZF Controls the development of fetal-derived IL-17+Vγ6+ γδ T Cells. *J Immunol*. 2015;195(9):4273-81.
183. Moniuszko M, Bodzenta-Lukaszyk A, Kowal K, Lenczewska D, Dabrowska M. Enhanced frequencies of CD14++CD16+, but not CD14+CD16+, peripheral blood monocytes in severe asthmatic patients. *Clin Immunol*. 2009;130(3):338-46.
184. Rossol M, Kraus S, Pierer M, Baerwald C, Wagner U. The CD14(bright) CD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis Rheum*. 2012;64(3):671-7.
185. Buechler C, Ritter M, Orsó E, Langmann T, Klucken J, Schmitz G. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol*. 2000;67(1):97-103.
186. Farag AG, El Askary SA, Fathy WM, Elbassal F, Azzam AA, Tayel NR, et al. Relationship between sCD163 and mCD163 and their implication in the detection and typing of leprosy. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2020;13:379-89.
187. Silva RL, Santos MB, Almeida PL, Barros TS, Magalhães LS, Cazzaniga RA, et al. sCD163 levels as a biomarker of disease severity in leprosy and visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(3):e0005486.

188. Passos S, Carvalho LP, Costa RS, Campos TM, Novais FO, Magalhães A, et al. Intermediate Monocytes Contribute to Pathologic immune response in *Leishmania braziliensis* infections. *J Infect Dis.* 2014;211(2):274-82.
189. Peters W, Cyster JG, Mack M, Schlöndorff D, Wolf AJ, Ernst JD, et al. -dependent trafficking of F4/80dim macrophages and CD11cdim/intermediate dendritic cells is crucial for T cell recruitment to lungs infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 2004;172(12):7647-53.
190. Peters W, Scott HM, Chambers HF, Flynn JL, Charo IF, Ernst JD. Chemokine receptor 2 serves an early and essential role in resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(14):7958-63.
191. Samstein M, Schreiber HA, Leiner IM, Sušac B, Glickman MS, Pamer EG. Essential yet limited role for CCR2+ inflammatory monocytes during *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cell priming. *eLife.* 2013;2:e01086.
192. Mendonça VA, Melo GE, Teixeira MM, Martins-Filho OA, Antunes CM, Teixeira AL. Analysis of chemokine receptors on the surface of circulating leukocytes of individuals infected with *Mycobacterium leprae*: preliminary results. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008;41(Suppl 2):95-8.
193. Kirkaldy AA, Musonda AC, Khanolkhar-Young S, Suneetha S, Lockwood DN. Expression of CC and CXC chemokines and chemokine receptors in human leprosy skin lesions. *Clin Exp Immunol.* 2003;134(3):447-53.
194. Van Raemdonck K, Van den Steen PE, Liekens S, Van Damme J, Struyf S. CXCR3 ligands in disease and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015;26(3):311-27.
195. Butler KL, Clancy-Thompson E, Mullins DW. CXCR3+ monocytes/macrophages are required for establishment of pulmonary metastases. *Sci Rep.* 2017;7(1):45593.
196. Niu F, Liao K, Hu G, Moidunny S, Roy S, Buch S. HIV tat-mediated induction of monocyte transmigration across the blood–brain barrier: role of chemokine receptor CXCR3. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:724970.
197. Torraca V, Cui C, Boland R, Bebelman JP, van der Sar AM, Smit MJ, et al. The CXCR3-CXCL11 signaling axis mediates macrophage recruitment and dissemination of mycobacterial infection. *Dis Model Mech.* 2015;8(3):253-69.
198. Lu YB, Xiao DQ, Liang KD, Zhang JA, Wang WD, Yu SY, et al. Profiling dendritic cell subsets in the patients with active pulmonary tuberculosis. *Mol Immunol.* 2017;91:86-96.
199. Gupta V, Jaiswal A, Behera D, Prasad HK. Disparity in circulating peripheral blood dendritic cell subsets and cytokine profile of pulmonary tuberculosis patients compared with healthy family contacts. *Hum Immunol.* 2010;71(7):682-91.
200. Pichyangkul S, Endy TP, Kalayanaroj S, Nisalak A, Yongvanitchit K, Green S, et al. A blunted blood plasmacytoid dendritic cell response to an acute systemic viral infection is associated with increased disease severity. *J Immunol.* 2003;171(10):5571-8.
201. Jangpatarapongsa K, Chootong P, Sattabongkot J, Chotivanich K, Sirichaisinthop J, Tungpradabkul S, et al. *Plasmodium vivax* parasites alter the balance of myeloid and plasmacytoid dendritic cells and the induction of regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 2008;38(10):2697-705.
202. Srivastava N, Bishnoi A, Parsad D, Kumaran MS, Vinay K, Gupta S. Dendritic cells subsets are associated with inflammatory cytokine production in progressive vitiligo disease. *Arch Dermatol Res.* 2021;313(9):759-67.
203. Lima HR, Gasparoto TH, de Souza Malaspina TS, Marques VR, Vicente MJ, Marcos EC, et al. Immune checkpoints in leprosy: immunotherapy as a feasible approach to control disease progression. *Front Immunol.* 2017;8:1724.

204. Shen L, Gao Y, Liu Y, Zhang B, Liu Q, Wu J, et al. PD-1/PD-L pathway inhibits M.tb-specific CD4+ T-cell functions and phagocytosis of macrophages in active tuberculosis. *Sci Rep.* 2016;6(1):38362.
205. Butler NS, Moebius J, Pewe LL, Traore B, Doumbo OK, Tygrett LT, et al. Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage Plasmodium infection. *Nat Immunol.* 2011;13(2):188-95.
206. Esch KJ, Juelsgaard R, Martinez PA, Jones DE, Petersen CA. Programmed death 1-mediated T cell exhaustion during visceral leishmaniasis impairs phagocyte function. *J Immunol.* 2013;191(11):5542-50.
207. Gutierrez FR, Mariano FS, Oliveira CJ, Pavanelli WR, Guedes PM, Silva GK, et al. Regulation of Trypanosoma cruzi-induced myocarditis by programmed death cell receptor 1. *Infect Immun.* 2011;79(5):1873-81.
208. Palermo ML, Trindade MÃ, Duarte AJ, Cacere CR, Benard G. Differential expression of the costimulatory molecules CD86, CD28, CD152 and PD-1 correlates with the host-parasite outcome in leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107 (Suppl 1):167-73.
209. Tarique M, Naz H, Suhail M, Turan A, Saini C, Muhammad N, et al. Differential expression of programmed death 1 (PD-1) on various immune cells and its role in human leprosy. *Front Immunol.* 2023;14:1138145.
210. Tarique M, Naz H, Kurra SV, Saini C, Naqvi RA, Rai R, et al. Interleukin-10 Producing Regulatory B Cells Transformed CD4⁺CD25⁻ Into Tregs and Enhanced Regulatory T Cells Function in Human Leprosy. *Front Immunol.* 2018;9:1636.
211. Nausch N, Appleby LJ, Sparks AM, Midzi N, Mduluza T, Mutapi F. Group 2 innate lymphoid cell proportions are diminished in young helminth infected children and restored by curative anti-helminthic treatment. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(3):e0003627.
212. Yang JQ, Singh AK, Wilson MT, Satoh M, Stanic AK, Park JJ, et al. Immunoregulatory role of CD1d in the hydrocarbon oil-induced model of lupus nephritis. *J Immunol.* 2003;171(4):2142-53.
213. Yanagihara Y, Shiozawa K, Takai M, Kyogoku M, Shiozawa S. Natural killer (NK) T cells are significantly decreased in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol.* 1999;118(1):131-6.
214. Bonish B, Jullien D, Dutronc Y, Huang BB, Modlin R, Spada FM, et al. Overexpression of CD1d by keratinocytes in psoriasis and CD1d-dependent IFN-gamma production by NK-T cells. *J Immunol.* 2000;165(7):4076-85.
215. Kim HS, Chung DH. IL-9-producing invariant NKT cells protect against DSS-induced colitis in an IL-4-dependent manner. *Mucosal Immunol.* 2013;6(2):347-57.
216. Cajueiro MA, Cavalcanti BM, Cavalcanti CM, Brito MF, Bonfim CV, Correia CD. Small-fibre neuropathy in leprosy the role of in vivo confocal microscopy: a cross-sectional study. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2023;89(4):524-9.
217. Sun F, Zou W, Shi H, Chen Z, Ma D, Lin M, et al. Interleukin-33 increases type 2 innate lymphoid cell count and their activation in eosinophilic asthma. *Clin Transl Allergy.* 2023;13(6):e12265.
218. Doisne JM, Becourt C, Amniai L, Duarte N, Le Luduec JB, Eberl G, et al. Skin and peripheral lymph node invariant NKT cells are mainly retinoic acid receptor-related orphan receptor (gamma)t⁺ and respond preferentially under inflammatory conditions. *J Immunol.* 2009;183(3):2142-9.
219. Chun TT, Chung CS, Fallon EA, Hutchins NA, Clarke E, Rossi AL, et al. Group 2 innate lymphoid cells (ILC2s) are key mediators of the inflammatory response in polymicrobial sepsis. *Am J Pathol.* 2018;188(9):2097-108.

220. Monteiro M, Agua-Doce A, Almeida CF, Fonseca-Pereira D, Veiga-Fernandes H, Graca L. IL-9 Expression by invariant NKT cells is not imprinted during thymic development. *J Immunol.* 2015;195(7):3463-71.
221. Coquet JM, Chakravarti S, Kyparissoudis K, McNab FW, Pitt LA, McKenzie BS, et al. Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(32):11287-92.
222. Leyla B, Betul D, Demet C. Leprosy reactions. In: Wellman R, editor. *Hansen's disease: The forgotten and neglected disease*. Rijeka: IntechOpen; 2017.

Abstract

Introduction: Leprosy remains highly relevant and prevalent in Brazil and worldwide. The immune response to the bacillus directly correlates with the different clinical manifestations, paucibacillary and multibacillary. Studying innate immune cells in patients with multibacillary leprosy may provide insights with diagnostic and therapeutic implications. **Purpose:** To describe the profile of innate immune cells in patients with multibacillary leprosy. **Methods:** Using flow cytometry, we analyzed the profile of innate immune cells, such as monocytes, dendritic cells, ILC2, and NKT cells in the peripheral blood of patients with multibacillary leprosy and compared it to healthy controls. In skin lesion areas, the presence of ILC2 and NKT cells was assessed via confocal microscopy. **Results:** We found that patients with multibacillary leprosy had increased levels of GATA3 and IL-6 in peripheral blood, with decreased IL-9. Analysis of innate immune cells showed a decrease in ILC2, but with increased IL-4 and TNF production. Regarding monocytes, a decrease in the frequency and expression of PDL1 was observed in classical monocytes, with an increase in intermediate monocytes. In these intermediate monocytes, there was a significant increase in CD163 expression and chemokine levels. For dendritic cells, a decrease in myeloid cells and an increase in plasmacytoid cells were observed. A tissue analysis showed the presence of ILC2 and NKT cells in lesion areas; however, no statistically significant differences were found when comparing samples before and after treatment. **Conclusion:** Intermediate monocytes, through CD163 expression and chemokine receptors, along with plasmacytoid dendritic cells, contribute to the immune response profile in patients with multibacillary leprosy.

Keywords: Leprosy; Immunity, innate; Natural killer T-cells