

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE LINFÓCITOS T CD8<sup>BRIGHT/DIM</sup> NA  
HANSENÍASE**

**YURI SCHEIDEGGER DE CASTRO**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
JANEIRO DE 2025

# **AVALIAÇÃO DO PAPEL DE LINFÓCITOS T CD8<sup>BRIGHT/DIM</sup> NA HANSENÍASE**

**YURI SCHEIDEGGER DE CASTRO**

**Tese apresentada ao Centro de  
Biotecnologia e Biociências da  
Universidade Estadual do Norte  
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte  
das exigências para obtenção do título  
de Doutor em Biociências e  
Biotecnologia.**

**Orientadora: Dr<sup>a</sup> Alba Lucínia Peixoto Rangel**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO  
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
JANEIRO DE 2025**

### FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

C355

Castro, Yuri Scheidegger de.

AVALIAÇÃO DO PAPEL DE LINFÓCITOS T CD8<sup>BRIGHT/DIM</sup> NA HANSENÍASE. / Yuri Scheidegger de Castro. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2025.

74 f. : il.

Bibliografia: 65 - 74.

Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2025.

Orientadora: Alba Lucinia Peixoto Rangel.

1. Hanseníase. 2. Resposta imune. 3. Linfócitos T CD8<sup>+</sup>. 4. *Mycobacterium leprae*. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

# AVALIAÇÃO DO PAPEL DE LINFÓCITOS T CD8<sup>BRIGHT/DIM</sup> NA HANSENÍASE

YURI SCHEIDEGGER DE CASTRO

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 29 de janeiro de 2025.

Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente  
 ANDREA CRISTINA VETO ARNHOLDT  
Data: 31/01/2025 14:55:00-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Andrea Cristina Veto Arnholdt (Doutora em Ciências Biológicas (Biofísica) - LBR/UENF.

---

Elena Lassounskaia (Doutora em Ciências Médicas) - LBR/UENF

Documento assinado digitalmente  
 LEA CRISTINA DE CARVALHO CASTELLUCCI  
Data: 29/01/2025 11:29:31-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Léa Cristina de Carvalho Castellucci (Doutora em Imunologia) - HUPES/UFBA

---

Alba Lucínia Peixoto Rangel (Doutora em Biociências e Biotecnologia) - LBR/UENF

**Não existem fatos eternos, como não existem  
verdades absolutas."  
(Friedrich Nietzsche)**

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço a Deus pelo dom da vida, e sustento até aqui, pois não foi fácil e somente Ele para prover toda a calma e força nessa jornada.

Gostaria também de registrar o meu agradecimento a minha mãe Valdirene e avó Maria Celi por tanta força e expectativas em mim, obrigado por nunca desistirem de mim.

A professora Alba, por ter sido minha mãe científica até o doutorado, esse título é mérito também seu, afinal foi você quem moldou o professor e pesquisador que hoje sou. Obrigado por sempre me confiar tamanha responsabilidade e execução desses trabalhos tão especiais com amostras de pacientes humanos; obrigado por todo ensinamento, experiência e dias na universidade.

Aos meus colegas de grupo (Letícia, Rebeka, Luíza, Juliana, Clistiana e Karol) por sempre estarem comigo no laboratório, e me ajudarem em tudo que podiam, compartilhando experiências e vivências, o meu muito obrigado a vocês.

A técnica Juliana Azevedo, obrigado por todo compartilhamento de vida e experiências que você pode me proporcionar, esse trabalho não seria nada sem o seu empenho e expertise no manuseio do equipamento; Nossa Juju foram tantos dias com você, só agradeço a Deus pela sua vida e peço que você continue sendo essa mãe que você foi pra mim. Deixo aqui a minha eterna gratidão em poder ter trilhado minha carreira científica ao seu lado e ter aprendido tanto com você.

Aos meus avós Ariosto e Maria das Graças (*in memorian*), muito obrigado por nunca desistirem de mim e sempre me incentivarem a estudar, esse título é de vocês também, pois sei que onde vocês estiverem, estarão super felizes por mim.

Aos meus tios (Ariosto Jr. e Emília), primos (Yan e Pedro) e irmãos (Bruna e Kauan) que sempre se orgulharam de mim e sempre me dando força para continuar a seguir a jornada acadêmica.

A ASTRAN, LBR e Centro de Referência da Hanseníase (Dr Edilbert e Jocélia), pela disponibilidade de carro, estrutura e amostras para a execução desse trabalho.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1. Gráfico das taxas de detecção de casos novos de hanseníase e em menores de 15 anos por 100 mil habitantes e taxa de prevalência por 10 mil habitantes dos anos de 2009-2023 no Brasil.** A taxa de prevalência é considerada baixa: 0,00-1,00; média: 1,01- 5,00 e alta > 5,01 (Fonte: SINAN/SVS/MS, 2024)

.....17

**Figura 2. Estratégia de gates para células T CD8<sup>+</sup> no sangue periférico de participantes da pesquisa.** **A** - Diagrama de fluxo representativo mostrando a posição dos linfócitos no gráfico de dispersão frontal (FSC) e lateral (SSC); **B** - gate de linfócitos positivos (CD45<sup>+</sup> e SSC); **C** - linfócitos T<sup>+</sup> (CD45<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>); **D** - no quadrante 1 (Q1), representativo dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>.....34

**Figura 3. Percentual da população de células T CD8<sup>+</sup> em diferentes formas clínicas e indivíduos controles.** **A** – Classificação da OMS: MB- Multibacilar, PB- Paucibacilar, HC- Indivíduos controle e teste estatístico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn; **B** – Classificação de Madri: formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IL- Indeterminada, TL- Tuberculóide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn.....37

**Figura 4. Visualização de células T CD8<sup>bright</sup> e CD8<sup>dim</sup> no sangue periférico de indivíduos com hanseníase.** **A** - Diagrama de fluxo representativo mostrando a posição dos linfócitos nos gráficos de dispersão para frente (FSC) e lateral (SSC), **B** - gate positivo para linfócitos (CD45<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>), **C** e **D** - gate positivos para células T CD8<sup>dim</sup> e CD8<sup>bright</sup> (CD3<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>), com uma representação da visualização em pacientes com as formas tuberculóide e virchowiana, respectivamente.....38

**Figura 5. Percentual de células T CD8<sup>bright+</sup> e CD8<sup>dim+</sup> é distinta em diferentes formas clínicas da hanseníase.** **A** e **C** – Classificação da OMS: MB- Multibacilar, PB- Paucibacilar, HC- Controle Saudável e teste estatístico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn; **B** e **D** – Classificação de Madri: formas clínicas LL- Hanseníase lepromatosa, DL- Hanseníase dimorfa, IL- Hanseníase indeterminada, TL- Hanseníase tuberculóide, HC- Controle Saudável e teste estatístico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn.....40

**Figura 6. Porcentagem de células T CD8<sup>bright+/dim+</sup> e carga bacteriana em pacientes com hanseníase.** Os pacientes com hanseníase foram agrupados em negativos (tuberculoides e indeterminados) e positivos (dimorfos e lepromatosos) com índices de + (de 3 a 9 bacilos em todo o esfregaço), ++ (≥10 em todo o esfregaço) e +++ (1 ou mais bacilo por campo) em relação a carga bacilar.....41

**Figura 7. Porcentagem de células T CD8<sup>bright+/dim+</sup> em pacientes com hanseníase, estratificados em três grupos de diferentes idades.** **A** e **C**- Classificação quanto a grupos etários. **B** e **D**- Classificação da OMS correlacionado aos grupos etários. **HC** - Controle saudável e os pacientes foram categorizados em três grupos etários: **Y**, jovens (18-40 anos); **MA**, meia-idade (41-60 anos); e **E**, idosos (acima de 60 anos). Os dados são representados como médias ± erro padrão da média (SEM) e analisados usando o teste estatístico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn.....43

6

**Figura 8. Cinética de produção da citocina TNF- $\alpha$  em cultura celular de PBMC sob estímulo antigênico por *M. leprae*.** **A** - Classificação categórica quanto ao acometimento ou não da doença, **NE**- poço de células não estimuladas, **SEB**- poço com estimulação antigênica por SEB (*Staphylococcus aureus*, Enterotoxin Type B) e **ML**- poço com estimulação por *M. leprae* irradiado. Onde **HC**- controle saudável e **MH**- indivíduos acometidos com os diferentes tipos de formas clínicas da hanseníase. **B** - Classificação segundo a OMS, onde **HC**- controles saudáveis, **PB**- indivíduos paucibacilares e **MB**- indivíduos multibacilares. Os valores de p, foram usados como: \*, onde p<0,05.....45

**Figura 9. Cinética de produção da citocina IFN- $\gamma$  em cultura celular de PBMC sob estímulo antigênico por *M. leprae*.** **A** - Classificação categórica quando ao acometimento ou não da doença, **NE**- poço de células não estimuladas, **SEB**- poço com estimulação antigênica por SEB (*Staphylococcus aureus*, Enterotoxin Type B) e **ML**- poço com estimulação por *M. leprae* irradiado. Onde **HC**- controle saudável e **MH**- indivíduos acometidos com os diferentes tipos de formas clínicas da hanseníase. **B** - Classificação segundo a OMS, **HC**- controles saudáveis, **PB**- indivíduos paucibacilares e **MB**- indivíduos multibacilares. Os valores de p, foram usados como: \*, onde  $p < 0,05$ ; \*\*=  $p \leq 0,001$  e \*\*\*=  $p \leq 0,0001$ . Os dados são representados como médias de intensidades de fluorescências (MIF)  $\pm$  erro padrão da média (SEM) e analisados usando o teste estatístico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn e teste U de Mann Whitney.....47

**Figura 10. Cinética de produção da citocina IL-4 em cultura celular de PBMC sob estímulo antigênico por *M. leprae*.** **A** - Classificação categórica quando ao acometimento ou não da doença, **NE**- poço de células não estimuladas, **SEB**- poço com estimulação antigênica por SEB (*Staphylococcus aureus*, Enterotoxin Type B) e **ML**- poço com estimulação por *M. leprae* irradiado. Onde **HC**- controle saudável e **MH**- indivíduos acometidos com os diferentes tipos de formas clínicas da hanseníase. **B** - Classificação segundo a OMS, **HC**- controles saudáveis, **PB**- indivíduos paucibacilares e **MB**- indivíduos multibacilares. Os valores de p, foram usados como: \*, onde  $p < 0,05$ ; \*\*=  $p \leq 0,001$  e \*\*\*=  $p \leq 0,0001$ . Os dados são representados como médias de intensidades de fluorescências (MIF)  $\pm$  erro padrão da média (SEM) e analisados usando o teste estatístico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn e teste U de Mann Whitney.....48

**Figura 11. Cinética de produção da citocina IL-10 em cultura celular de PBMC sob estímulo antigênico por *M. leprae*.** **A** - Classificação categórica quando ao acometimento ou não da doença, **NE**- poço de células não estimuladas, **SEB**- poço com estimulação antigênica por SEB (*Staphylococcus aureus*, Enterotoxin Type B) e **ML**- poço com estimulação por *M. leprae* irradiado. Onde **HC**- controle saudável e **MH**- indivíduos acometidos com os diferentes tipos de formas clínicas da hanseníase. **B** - Classificação segundo a OMS, **HC**- controles saudáveis, **PB**- indivíduos paucibacilares e **MB**- indivíduos multibacilares. Os valores de p, foram usados como: \*, onde  $p < 0,05$ ; \*\*=  $p \leq 0,001$  e \*\*\*=  $p \leq 0,0001$ . Os dados são representados como médias de intensidades de fluorescências (MIF)  $\pm$  erro padrão da média (SEM) e analisados usando o teste estatístico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn e teste U de Mann Whitney.....50

**Figura 12. Expressão e produção de granzima B nos linfócitos T CD8<sup>dim+/bright+</sup> em cultura celular sob estímulo antigênico por *M. leprae*.** **A** - Porcentagem de linfócitos T CD8<sup>dim+</sup> e T CD8<sup>bright+</sup> que produzem granzima B. **B** - MIF de granzima B sobre os linfócitos T CD8<sup>dim+</sup> e T CD8<sup>bright+</sup>. Classificação categórica quando ao acometimento ou não da doença, **HC**- controle saudável e **MH**- indivíduos acometidos com os diferentes tipos de formas clínicas da hanseníase. **NE**- poço sem estímulo, **SEB**- poço com estímulo por SEB e **ML**- poço com estímulo por *M. leprae* irradiado. Os dados são representados como médias de intensidades de fluorescências  $\pm$  erro padrão da média (SEM) e analisados usando o teste estatístico U de Mann Whitney.....52

**Figura 13. Expressão e produção de perforina nos linfócitos T CD8<sup>dim+/bright+</sup> em cultura celular sob estímulo antigênico por *M. leprae*.** **A** - Porcentagem de linfócitos T CD8<sup>dim+</sup> e T CD8<sup>bright+</sup> que produzem perforina. **B** - MIF de perforina sobre os linfócitos T CD8<sup>dim+</sup> e T CD8<sup>bright+</sup>. Classificação categórica quando ao acometimento ou não da doença, **HC**- controle saudável e **MH**- indivíduos acometidos com os diferentes tipos de formas clínicas da hanseníase. **NE**- poço sem estímulo, **SEB**- poço com estímulo por SEB e **ML**- poço com estímulo por *M. leprae* irradiado. Os dados são representados como médias de intensidades de fluorescências  $\pm$  erro padrão da média (SEM) e analisados usando o teste estatístico U de Mann Whitney.....54

**Figura 14. Resumo esquemático dos principais achados relacionados aos perfis de células T CD8<sup>bright+/dim+</sup> nos indivíduos acometidos pela hanseníase, destacando as diferenças observadas entre os grupos paucibacilares e multibacilares.....55**

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1:</b> Características da população de estudo.....	32
<b>Tabela 2:</b> Anticorpos monoclonais utilizados para imunofenotipagem por citometria de fluxo.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS

**B:** “Boderline” – Intermediária

**BAAR:** Bacilo álcool ácido resistente

**D:** Dimorfa

**DAMPs:** Padrões moleculares associados a danos

**DD:** Dimorfa- Dimorfa

**DT:** Dimorfa-Tuberculoide

**DV:** Dimorfa - Virchowiana

**FcγR:** Receptor do tipo Fc da superfamília de imunoglobulinas

**HC:** Controle saudável

**HLA:** “Human Leukocyte Antigen” - Antígeno Leucocitário Humano I: Indeterminada

**IFN-γ:** Interferon Gama

**IL-10:** Interleucina 10

**IL-4:** Interleucina 4

**IL-5:** Interleucina 5

**iNOS:** Óxido nítrico sintase indutível

**LL:** Lepromatoso/Virchowiano

**MB:** Multibacilar

**MHC I:** “*Major Histocompatibility Complex I*” - Complexo Principal de Histocompatibilidade I

**MHC II:** “*Major Histocompatibility Complex II*” - Complexo Principal de Histocompatibilidade II

**MIF:** Média de intensidade de fluorescência

**ML:** Pacientes acometidos com as diferentes formas clínicas da hanseníase

**NE:** Poço de cultura não estimulado

**OMS:** Organização Mundial da Saúde

**PAMPs:** Padrões moleculares associados a patógenos

**PB:** Paucibacilar

**PGL-1:** Antígeno Glicolípido Fenólico -1

**PQT-U:** Poliquimioterapia universal.

**ROS:** Espécies reativas de oxigênio

**T:** Tuberculoide

**TCD4<sup>+</sup>:** Linfócito TCD4<sup>+</sup>

**TCD8<sup>+</sup>:** Linfócito TCD8<sup>+</sup>

**Th1:** Células T *Helper* do Tipo 1

**Th2:** Células T *Helper* do Tipo 2

**TNFα:** Fator de necrose tumoral alfa

**TNFβ:** Fator de necrose tumoral beta

**TT:** Tuberculoíde

## RESUMO

A hanseníase, causada por *Mycobacterium leprae*, apresenta um espectro clínico intimamente relacionado ao tipo e intensidade da resposta imune do hospedeiro, que pode variar de um fenótipo de alta resistência à infecção por *M. leprae* (polo tuberculóide), caracterizado por uma resposta imune celular protetora forte, a um fenótipo de baixa resistência (polo lepromatoso), apresentando uma resposta imune celular prejudicada. Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> são responsáveis pela defesa contra patógenos intracelulares, por meio da ação de agentes citotóxicos ou interações moleculares na superfície celular. Neste estudo, avaliamos a porcentagem e intensidade de fluorescência das células T CD3<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> em 91 indivíduos (22 controles saudáveis e 69 pacientes com hanseníase, com diferentes fenótipos clínicos) por meio de citometria de fluxo e produção de citocinas e grânulos citotóxicos intracelulares. Não foi observada significância estatística para a porcentagem de células T CD8<sup>+</sup> entre os indivíduos. No entanto, observamos a existência de duas subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> com intensidades de fluorescência distintas, denominadas células T CD8<sup>bright+</sup> e células T CD8<sup>dim+</sup>. Os pacientes multibacilares apresentaram uma redução acentuada das células T CD8<sup>bright+</sup> quando comparados aos pacientes paucibacilares e aos controles. De acordo com a classificação de Madri, indivíduos com os fenótipos clínicos mais graves (hanseníase borderline e lepromatosa) apresentaram redução das células T CD8<sup>bright+</sup> e um aumento significativo das células T CD8<sup>dim+</sup> em comparação com fenótipos de doença mais leves (hanseníase indeterminada e tuberculóide) e controles saudáveis. Os linfócitos T CD8<sup>dim+</sup> e CD8<sup>bright+</sup> não estão associadas a uma maior carga bacteriana na hanseníase. A idade não afeta significativamente as subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> em pacientes com hanseníase. E as células T CD8<sup>dim+</sup> apresentam menores produções de citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-4, já os CD8<sup>bright+</sup> apresentam um perfil de baixa produção de IL-4 e IL-10. A produção de granzima B e perforina, é estabelecida pelos linfócitos T CD8<sup>dim+</sup> e os linfócitos T CD8<sup>bright+</sup> apresentam baixa capacidade citotóxica nos indivíduos acometidos pelas diferentes formas clínicas da hanseníase. Esses dados indicam, de maneira inédita, um papel potencialmente importante para as células T CD8<sup>bright+</sup> e CD8<sup>dim+</sup> no contexto da resposta imune contra a hanseníase.

**Palavras-chave:** Hanseníase, Resposta imune, Linfócitos T CD8<sup>+</sup>.

## ABSTRACT

Leprosy, caused by *Mycobacterium leprae*, presents a clinical spectrum closely related to the type and intensity of the host immune response, ranging from a phenotype of high resistance to *M. leprae* infection (tuberculoid pole), characterized by a strong protective cellular immune response, to a low-resistance phenotype (lepromatous pole), marked by an impaired cellular immune response. CD8<sup>+</sup> T lymphocytes are responsible for defense against intracellular pathogens through cytotoxic agents or molecular interactions on the cell surface. In this study, we evaluated the percentage of fluorescence intensity of CD3<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in 91 individuals (22 healthy controls and 69 leprosy patients with different clinical phenotypes) using flow cytometry and analysis of cytokine and intracellular cytotoxic granule production. No statistically significant differences were observed in the percentage of CD8<sup>+</sup> T cells among individuals. However, we identified two subpopulations of CD8<sup>+</sup> T cells with distinct percentage fluorescence intensities, termed CD8<sup>bright+</sup> and CD8<sup>dim+</sup> T cells. Multibacillary patients showed a marked reduction in CD8<sup>bright+</sup> T cells compared to paucibacillary patients and healthy controls. According to the Madri classification, individuals with more severe clinical phenotypes (borderline and lepromatous leprosy) exhibited a reduction in CD8<sup>bright+</sup> T cells and a significant increase in CD8<sup>dim+</sup> T cells compared to milder disease phenotypes (indeterminate and tuberculoid leprosy) and healthy controls. CD8<sup>dim+</sup> and CD8<sup>bright+</sup> T lymphocytes were not associated with higher bacterial loads in leprosy. Age did not significantly affect CD8<sup>+</sup> T cell subpopulations in leprosy patients. CD8<sup>dim+</sup> T cells showed lower production of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and IL-4 cytokines, while CD8<sup>bright+</sup> T cells displayed a profile of reduced IL-4 and IL-10 production. Granzyme B and perforin production was primarily established by CD8<sup>dim+</sup> T lymphocytes, whereas CD8<sup>bright+</sup> T lymphocytes exhibited low cytotoxic capacity in individuals with different clinical forms of leprosy. These findings suggest, for the first time, a potentially important role for CD8<sup>bright+</sup> and CD8<sup>dim+</sup> T cells in the immune response against leprosy.

**Keywords:** Leprosy, Immune response, CD8<sup>+</sup> T lymphocytes.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3 JUSTIFICATIVA.....	28
4 OBJETIVOS.....	30
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
6 RESULTADOS.....	37
7 DISCUSSÃO.....	56
8 CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS.....	65

## 1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada por *Mycobacterium leprae* (*M. Leprae*), um bacilo intracelular, e o curso da infecção leva à perda de sensibilidade, inervação, lesão intraepidérmica e lesões associadas à perda de mielina nas células de Schwann (FACER, 2000). A hanseníase permanece como um problema de saúde pública no Brasil, mesmo após a introdução do tratamento poliquimioterápico (PQT) (BRITTON; LOCKWOOD, 2004; SCOLLARD *et al.*, 2006; WHO, 2021).

A doença apresenta baixa letalidade e mortalidade, podendo ocorrer em qualquer idade, raça ou gênero. Nota-se relação entre endemicidade e baixos índices de desenvolvimento humano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Além dos agravantes inerentes a qualquer doença de origem socioeconômica, ressalta-se a repercussão psicológica que pode ser ocasionada pelas sequelas físicas da doença, ajudando para a diminuição da autoestima e para a autossegregação do portador da hanseníase (EIDT, 2000).

No Brasil, os primeiros casos notificados da doença ocorreram na cidade do Rio de Janeiro, no ano de 1600 (YAMANOUCHI *et al.*, 1993), onde após anos mais tarde, seria criado o primeiro lazareto, local destinado a abrigar os doentes de Lázaro, lazarentos ou leprosos (BRASIL, 1989). A taxa de prevalência da doença no Brasil é bastante variável, ou seja, ocorre de forma desigual por todo o território e acompanha a desigualdade socioeconômica regional. Análises dos indicadores por macrorregião mostraram que as regiões Centro-Oeste (37,27/100 mil habitantes) e Norte (34,26/100 mil habitantes) apresentaram as maiores taxas médias de detecção geral no período de 2012 a 2016. Enquanto as menores taxas foram registradas nas regiões Sul (3,75/100 mil habitantes) e Sudeste (5,31/100 mil habitantes) (YAMANOUCHI *et al.*, 1993; Ministério da Saúde, 2018). Os Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul já eliminaram a hanseníase como problema de saúde pública, segundo os critérios da Organização Mundial de Saúde, que preconiza uma taxa menor do que 1:10 mil caso/habitantes (OPS/OMS, 2001). Porém é nítido que há uma redução do número de casos novos no período da pandemia, ou seja, 2020-2022, uma vez que existia toda uma campanha de não sair à rua, para evitar a infecção pelo vírus da COVID-19 no Brasil, o que acabou levando a subnotificações da hanseníase no país.

A cidade de Campos dos Goytacazes em 2024 apresentou uma taxa de detecção de 4,66 casos para cada 100.000 habitantes. No mesmo ano, foram

notificados 24 novos casos da hanseníase (SINAN/SVSA/MS, 2024). O último estudo realizado na cidade foi o de de Batista em 2011, o qual englobou casos de janeiro de 2008 a setembro de 2010, e apontou maior prevalência da hanseníase na região Norte do município, apresentando cerca de 50% dos casos, cujo distrito de Travessão de Campos foi o mais acometido.

De acordo com a classificação de Ridley e Jopling, a doença possui cinco formas clínicas baseadas em critérios clínicos, histopatológicos, imunológicos e baciloscópicos: dimorfa-tuberculoide, dimorfa-virchowiana, dimorfa-dimorfa, tuberculoide e virchowiana (lepromatosa) (RIDLEY; JOPLING, 1966). O estágio inicial de infecção é referido como forma indeterminada. A Organização Mundial de Saúde (OMS) por sua vez classifica pacientes como multibacilar (MB) ou paucibacilar (PB) para fins de tratamento. Essas classificações são feitas com base na identificação dos bacilos e no número de lesões que se apresentam na pele do indivíduo. Como a baciloscopia nem sempre é possível, o número de lesões pode e deverá ser usado para classificar os pacientes em três grupos: hanseníase paucibacilar única (uma lesão cutânea), hanseníase paucibacilar (duas a cinco lesões cutâneas de pele com baciloscopia de raspado intradérmico negativo, quando disponível) e hanseníase multibacilar (presença de seis ou mais lesões de pele ou baciloscopia de raspado intradérmico positiva) (OMS, 2019 e PARDILLO *et al.*, 2007).

Como não existe uma vacina contra a doença, é consenso que a poliquimioterapia constitui-se atualmente como a principal estratégia para interromper a cadeia de transmissão de *M. leprae* e eliminar a hanseníase como problema de saúde pública mundial. A OMS em 1981 introduziu a quimioterapia combinada com três fármacos, conhecida como poliquimioterapia (PQT/OMS), que consiste no uso dos três fármacos: Dapsona (DDS), Clofazimina (CFZ) e Rifampicina (RMP) por seis meses para formas PB e de doze meses para os casos MB (OMS, 2019). A PQT/OMS começou a ser implementada no Brasil em 1986, e em 1991, foi adotada oficialmente pelo Ministério da Saúde (MS), sendo o tratamento poliquimioterápico recomendado para todos os casos de hanseníase diagnosticados (GALL; NERY; GARCIA, 1995 e OPROMOLLA, 1997).

A hanseníase apresenta diversas características clínicas que são determinadas pelo tipo de resposta imune do hospedeiro contra *Mycobacterium leprae*. O espectro clínico é dividido entre os polos, no caso o tuberculoide e o virchowiano (SCOLLARD *et al.*, 2006). Na hanseníase tuberculoide ocorre à polarização para uma resposta do

tipo Th1, caracterizada pela produção de IFN- $\gamma$ , que induz a ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, macrófagos e mecanismos bactericidas que controlam o crescimento de *M. leprae*, a qual é crítica para uma resposta protetora (MODLIN, 1994; FONSECA *et al.*, 2017). Por outro lado, a forma virchowiana apresenta imunidade celular comprometida, com predominância de resposta do tipo Th2, com grande produção de IL-4 e predominantemente ativação de linfócitos B, permitindo assim a evasão do bacilo, levando a uma resposta protetora deficiente, e, conseqüentemente acarretando no quadro de infecção crônica (PARK *et al.*, 2016). Na forma dimorfa, os pacientes exibem características imunológicas e histopatológicas que variam entre as formas tuberculoide e lepromatosa, ou seja, existem os dois tipos de resposta (Th1 e Th2) concomitante (SIMÕES QUARESMA *et al.*, 2012).

Um estudo de Dwyer; Bullock; Filds (1973) demonstrou uma diminuição no número de linfócitos T no sangue periférico de indivíduos acometidos por diferentes formas clínicas da hanseníase, similares resultados foram encontrados por Gajl-Peczalsk *et al* (1973). Entretanto nenhum estudo aborda quantitativamente as subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup> nas diferentes formas clínicas da hanseníase.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi identificar subpopulações de linfócitos T CD8<sup>bright+/dim+</sup> e caracterizá-las quanto a produção de citocinas e marcadores de citotoxicidade em amostras de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de portadores das diferentes formas clínicas da hanseníase.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Histórico

A hanseníase, também conhecida pela designação de lepra, é uma das mais antigas doenças que acomete o Homem, ainda hoje, muitos anos após sua descoberta discute-se se a hanseníase é de origem asiática ou africana. Tendo alguns estudos que mostram que seja originária da Ásia (JOPLING e McDOUGALL, 1991 e BRASIL, 1989). Porém, outros apontam que a África seja o berço desta doença (BRASIL, 1989).

A lepra é conhecida há mais de três ou quatro mil anos na Índia, China e Japão. A doença já existia no Egito quatro mil e trezentos anos antes de Cristo, baseado em um papiro da época de Ramsés II (BRASIL, 1960). Existem evidências objetivas da doença em esqueletos descobertos no Egito, datando do segundo século antes de Cristo (BRASIL, 1989).

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa humana de evolução crônica causada pelo bacilo de Hansen que se manifesta, principalmente, por lesões cutâneas as quais levam a diminuição de sensibilidade térmica, dolorosa e tátil. Essas manifestações são resultantes do tropismo de *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), agente causador da doença, em acometer células cutâneas e nervosas periféricas. O notável pesquisador e médico norueguês Gerhard Armauer Hansen, foi quem identificou, em 1873, este bacilo como o causador da lepra. A doença teve seu nome modificado em virtude da Lei federal de Nº 9.010, Art. 1º onde o nome “Lepra” e seus derivados não deveriam mais ser empregados para designar a doença e o doente (BRASIL, 1995). Então o nome da doença foi alterado para hanseníase em homenagem ao seu descobridor, bem como eliminar o estigma que a outra terminologia trazia (FOSS, 1999).

### 2.2 Epidemiologia da hanseníase

A taxa de prevalência da doença no Brasil é bastante variável, ou seja, ocorre de forma desigual por todo o território (YAMANOUCHI; CARON; SHIWAKU, 1993), encontrando-se entre 0,29 e 3,80 casos por 10 mil habitantes no ano de 2023 (BRASIL, 2001).

Em 2023 a taxa de prevalência da doença no país foi de 1,21 casos para cada 10 mil habitantes, demonstrando que o país está próximo de cumprir a meta de menos de 1 caso para cada 10 mil habitantes estipulada pela OMS (**Figura 1**). O estado do Rio de Janeiro apresentou um coeficiente de prevalência de 0,37 casos

(SINAN/SVSA/MS, 2024); adicionalmente, no mesmo ano a cidade de Campos dos Goytacazes apresentou 0,31 casos (SINAN/SVSA/MS, 2024).



**Figura 1. Gráfico das taxas de detecção de casos novos de hanseníase e em menores de 15 anos por 100 mil habitantes e taxa de prevalência por 10 mil habitantes dos anos de 2009-2023 no Brasil.** A taxa de prevalência é considerada baixa: 0,00-1,00; média: 1,01- 5,00 e alta > 5,01 (Fonte: SINAN/SVS/MS, 2024).

### 2.3 Características clínicas da infecção por *Mycobacterium leprae*

Os fagócitos mononucleares do hospedeiro são as principais células infectadas por *Mycobacterium leprae*, assim como as células de Schwann do sistema nervoso periférico (PREVEDELLO e MIRA, 2007). Esse bacilo possui tropismo por células da pele, anexo cutâneo e principalmente nervos periféricos; ocasionando lesões que podem ser irreversíveis quando o diagnóstico é tardio (TEIXERA *et al.*, 2010).

Se o bacilo acometesse somente a pele, a hanseníase não teria a importância que tem na saúde pública. Uma vez que acomete o sistema nervoso periférico (terminações nervosas livres e troncos nervosos) surgem a perda de sensibilidade, as atrofias, paresias e paralisias musculares que, se não diagnosticadas e tratadas adequadamente, podem evoluir para incapacidades físicas permanentes (BRASIL, 1989).

A infecção ativa por *Mycobacterium leprae* é caracterizada por uma grande diversificação no curso clínico da infecção, variando de uma doença paucibacilar, na qual poucos bacilos estão presentes nas lesões, a uma doença multibacilar, na qual uma grande carga bacilar está presente nas mesmas (HUNTER; GAYLORD; BRENNAN, 1986).

### 2.4 Classificação da doença quanto às formas clínicas

Uma forma de classificar a doença é utilizar o estado funcional do sistema imune, proposta por Ridley e Jopling (1966), a qual foi dividida nas seguintes formas

clínicas: indeterminada (I), virchowiana (V), tuberculoide (T), e as formas intermediárias ou também chamadas de dimorfas como: borderline tuberculoide (BT), borderline borderline (BB), borderline virchowiana (BV).

Adicionalmente a OMS classificou a doença no sentido operacional visando o tratamento com PQT, baseando-se no número de lesões cutâneas que o indivíduo apresenta. Os indivíduos do grupo paucibacilar são categorizados como casos com até cinco lesões de pele e engloba os casos das formas tuberculoide e indeterminada; já os indivíduos do grupo multibacilar são identificados como casos com mais de cinco lesões de pele e agrupam as formas virchowiana e dimorfas (OMS, 2019).

Acrescenta-se a estes, a classificação de Madrid (1953) que adotou critérios de polaridade, baseados nas características clínicas da doença, somados aos aspectos bacteriológicos, imunológicos (Teste de Mitsuda) e histológicos da hanseníase. Definindo por grupo as formas clínicas: grupos polares, tuberculoide (T) e virchowiano (V) ou lepromatoso (L); o grupo inicial ou transitório da doença, a forma indeterminada (I); e o intermediário e instável, a forma borderline (B) ou dimorfa (D) (INTERNATIONAL CONGRESS OF LEPROSY, 1953).

### **2.5 Transmissão da hanseníase**

A principal via de transmissão dos bacilos dos pacientes multibacilares (virchowianos e dimorfos) é a via aérea superior, sendo assim o trato respiratório a mais provável via de entrada de *M. leprae* no corpo (OMS, 2019).

Em média, o período de incubação se dá de 2 a 7 anos. Entretanto, existem descrições de períodos mais curtos, cerca de 7 meses, assim como de períodos mais longos por volta de 10 anos, para manifestação dos sintomas (OMS, 2019).

### **2.6 Diagnóstico da hanseníase**

O diagnóstico da hanseníase é substancialmente clínico e epidemiológico, com associação ao exame dermatoneurológico, utilizado para identificar as lesões ou áreas da pele com alterações de sensibilidade e/ou comprometimento de nervos. A análise das condições e história epidemiológica do paciente também é levada em consideração. A doença pode se manifestar por manchas hipocrômicas ou eritematosas, infiltradas e com perda de sensibilidade ao calor, frio, tato ou dor (ARAÚJO, 2003).

Diversos exames clínicos podem ser realizados para o diagnóstico da hanseníase. Um deles é o teste de sensibilidade térmica, o qual consiste em tocar sob

a pele do paciente tubos, sem que o mesmo possua a visualização da realização do teste, ou seja, o mesmo com os olhos vendados. Após instruções, os tubos contendo água fria (em torno de 25°C) ou quente (37-45°C) devem ser tocados para poder avaliar a sensibilidade da pele do indivíduo; ou, por exemplo, um algodão embebido de éter ou álcool e outro seco, a fim de propiciar o mesmo resultado. Outro método consiste na avaliação da sensibilidade dolorosa do indivíduo através da utilização de uma agulha de seringa, por exemplo, onde o paciente também não possui forma de visualizar a realização do teste e após as orientações deverá identificar se o que está tocando a sua pele é a ponta da agulha (sensação de dor) ou a base da agulha (LYON & GROSSI IN: ALVES et al., 2014). Sabe-se que as lesões provocadas por *M. leprae* podem alterar a sudorese devido ao comprometimento nervoso. Assim pode-se realizar a prova da pilocarpina, que é um teste o qual indica a área não afetada pelo bacilo, através da coloração azulada da região que apresenta a sudorese. O teste compõe-se do pincelamento de tintura de iodo sobre a pele do paciente, com posterior injeção intradérmica de 0,1 a 0,2 mL de pilocarpina (0,5% ou 1%) e consecutivamente polvilhamento de amido sobre a área testada (LYON & GROSSI IN: ALVES et al., 2014).

Um exame laboratorial complementar a avaliação clínica, muito útil para o diagnóstico da hanseníase é a baciloscopia, o qual consiste na realização de um esfregaço proveniente do raspado dérmico de lesões cutâneas, cotovelos ou lóbulos auriculares do paciente. A lâmina produzida é corada pelo método de Ziehl Neelsen. O método tem uma especificidade de 100%, porém, uma baixa sensibilidade que varia entre 10-50%. O índice baciloscópico (IB) é determinado a partir da soma dos índices encontrados em cada local da coleta dividido pelo número de locais da coleta (TALHARI *et al.*, 2015).

Existe também o kit NAT-hans (IBMP), demonstrado no estudo de Barbieri e colaboradores em 2019, o qual indicou que em casos de difícil diagnóstico, o PCR quantitativo (qPCR) apresenta maior sensibilidade (57%) em comparação com a histopatologia (35%), diferindo de outras doenças dermatológicas; a combinação qPCR e da histopatologia pode aumentar a sensibilidade para 65%, representando um avanço significativo no diagnóstico de casos difíceis.

## **2.7 Tratamento da doença**

O tratamento dos pacientes deve ocorrer em regime ambulatorial, nas unidades de serviços básicos de saúde, responsáveis pela administração de uma associação

de fármacos, a poliquimioterapia única (PQTU/OMS), que contém os fármacos Rifampicina, Dapsona e Clofazimina. Desde 2018, a Organização Mundial da Saúde (OMS) passou a recomendar o uso de um esquema terapêutico com os três fármacos para o tratamento de todos os casos de hanseníase, independentemente da classificação operacional do paciente. Nesse contexto, o tratamento mantém a duração de seis doses mensais para os casos paucibacilares (PB) e de 12 doses mensais para os casos multibacilares (MB). No Brasil, esse regime terapêutico foi oficialmente adotado em 2021 e a implementação da PQT-U/OMS elimina o bacilo evitando a evolução da doença, assim como para a transmissão do bacilo prevenindo as incapacidades e deformidades por ela causadas, podendo alcançar a cura, desde que a PQT-U ocorra em conformidade ótima (BRASIL, 2021).

A informação sobre a classificação clínica do doente é fundamental para se selecionar o esquema de tratamento adequado ao seu caso. Para crianças acometidas pela hanseníase, a dose dos medicamentos do esquema padrão é ajustada conforme a idade e peso. Já nos pacientes com intolerância a um dos medicamentos do esquema padrão, são indicados esquemas alternativos. A alta por cura é dada após a administração do número de doses preconizadas pelo esquema terapêutico, dentro do prazo recomendado para cada forma clínica (OMS, 2019 e BRASIL, 2021).

## **2.8 Respostas imunológicas do hospedeiro ao patógeno**

O *Mycobacterium leprae* é um bacilo gram-positivo, álcool e ácido-resistente e parasita intracelular obrigatório, com um tropismo acentuado por células fagocíticas, como as células de Schwann nos nervos periféricos e os macrófagos na pele (BRITTON e LOCKWOOD, 2004). Diferencia-se de outras bactérias gram-positivas e gram-negativas pela composição única de sua parede celular, que é rica em lipídios, especialmente ácidos micólicos e glicolípido fenólico-1 (PGL-1). O PGL-1 desempenha um papel crucial na mediação da entrada do bacilo nos macrófagos, interagindo com a fração C3 do complemento por meio dos receptores CR1, CR3 e CR4, o que induz sua fagocitose. Este componente é essencial para a patogênese da hanseníase, estando envolvido no mecanismo de escape lisossomal, além de exercer uma função imunossupressora que facilita a sobrevivência de *M. leprae* no interior das células hospedeiras, como os macrófagos (WYNN; CHAWLA; POLLARD, 2013).

Análises das citocinas secretadas por macrófagos virgens expostos ao glicolípido fenólico-1 (PGL-1) e ao lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa de

bactérias gram-negativas revelaram que o PGL-1, por si só, induz uma produção reduzida de citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina-13 (IL-13) e interleucina-10 (IL-10). Em contrapartida, promove altos níveis de moléculas reguladoras, como a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e o antagonista do receptor de interleucina-1 (IL-1RA). A atividade microbicida dos macrófagos é mediada pela produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, geradas via complexo NADPH-oxidase e síntese de óxido nítrico, respectivamente (GHORPADE, 2002). Um aumento na expressão da sintase de óxido nítrico induzida (iNOS) foi observado em lesões cutâneas de pacientes com a forma tuberculoide da hanseníase, em comparação com lesões lepromatosas, o que pode ser atribuído à resposta imune mais intensa do tipo Th1 presente nos casos paucibacilares (GHORPADE, 2002 e PLOEMACHER *et al.*, 2020).

O papel da inflamação na hanseníase tem sido amplamente estudado. Um componente fundamental da resposta imune inata é o inflamassoma, um complexo de proteínas citosólicas responsável por mediar a inflamação ao processar citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) e a interleucina-18 (IL-18). O inflamassoma é ativado ao reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs), sendo este último crucial para a maturação da caspase-1, a secreção de IL-1 $\beta$  e a indução de um tipo de morte celular inflamatória denominada piroptose. Os níveis de expressão de caspase-1, IL-1 $\beta$  e IL-18 são mais elevados em lesões lepromatosas quando comparados às formas indeterminadas e tuberculoides, sugerindo uma ineficiência da resposta inflamatória em controlar a infecção pelo *Mycobacterium leprae* (AMIN; BOCHE; RAKIC, 2017 e ZAMBONI; LIMA-JUNIOR, 2015).

As respostas inflamatórias aos antígenos do *M. leprae* também desempenham um papel crucial na patogênese, pois são capazes de induzir e amplificar a resposta inflamatória das células de Schwann. Esse processo inflamatório, quando exacerbado, torna-se prejudicial, levando à desmielinização ou à destruição das células nervosas devido à perda neuronal. O *M. leprae* estimula a inflamação aumentando os níveis de TNF-alfa, o que compromete a capacidade de reparo nervoso ao bloquear a indução do fenótipo formador de mielina nas células de Schwann. Esse bloqueio ocorre por meio da sensibilidade induzida pelo TNF-alfa à sinalização de citocinas pró-inflamatórias, dificultando a regeneração e contribuindo

para o dano neural observado nos casos de hanseníase (BROZ; DIXIT, 2016 e ANDRADE *et al.*, 2016).

A polarização da resposta imune (Th1/Th2) ao *Mycobacterium leprae* é reconhecida como o elemento crítico para a patogenicidade da hanseníase, assim como para a manifestação das diversas formas clínicas. Contudo, o desenvolvimento da resposta imune ao *M. leprae* é um processo extremamente complexo (SANDHU *et al.*, 2016).

Uma resposta imune protetora a hanseníase, é considerada dependente de uma resposta celular predominante por parte do sistema imunológico, especificamente na formação de células T-helper 1, as quais podem ativar células da linhagem monocitária (macrófagos, células dendríticas e células de Schwann, entre outras) possibilitando a eliminação de bacilos e células infectadas através da ação de células T efectoras (PALERMO *et al.*, 2012).

Na hanseníase tuberculoide, prevalece a imunidade mediada por células, com ativação de macrófagos, a qual apesar de controlar a infecção não a elimina por completo. São encontrados poucos bacilos viáveis nos tecidos, a patologia, juntamente com a maioria dos sintomas se deve à resposta inflamatória do hospedeiro aos microrganismos resistentes. Na hanseníase virchowiana, a imunidade mediada por células está suprimida e os microrganismos se apresentam em grande número nos macrófagos. Nas formas intermediárias os dois tipos de respostas podem ser concomitantes (ABULAFIA; VIGNALE, 1999).

Existem diferentes espectros clínicos, bacteriológicos e histológicos sendo manifestados em pacientes que desenvolvem a hanseníase, assim como descrito anteriormente em pacientes com a forma clínica tuberculoide, a histologia do indivíduo é caracterizada por grande infiltrado de células T CD4<sup>+</sup>, formando granulomas e pouco ou nenhum bacilo detectado nas lesões. Análises de sangue periférico *in vitro* de pacientes dessa forma, mostraram um padrão de resposta imunológica do tipo Th1, na qual há grande proliferação de linfócitos e citocinas do perfil Th1 (interferon  $\gamma$  – IFN $\gamma$  e interleucina 2 – IL-2). Por outro lado, os indivíduos acometidos pela forma clínica virchowiana apresentam baixa resposta granulomatosa, com pouco infiltrado de células T CD4<sup>+</sup> e macrófagos, o que leva ao aumento do número de bacilos presentes nas lesões, promovendo a supressão da resposta imune do tipo Th1, polarizando para

a resposta imunológica do tipo Th2 com produção de citocinas desse perfil (IL-4 e IL-10) (PALERMO *et al.*, 2012; BRITTON; LOCKWOOD, 2004; SCOLLARD *et al.*, 2006).

Na forma virchowiana, a produção dos antígenos PGL-1 e LAM pelo bacilo, no interior do macrófago, contribuem para o escape do mesmo à oxidação intramacrofágica, uma vez que estes possuem funções supressoras da atividade de macrófago e favorecem a disseminação do mesmo (ARAÚJO, 2003).

Além do clássico paradigma Th1/Th2, variações no espectro imunológico da hanseníase incluem a participação de outras subpopulações de linfócitos, como Th9, Th17, Th25 e Treg (FROES; SOTTO; TRINDADE, 2022). Entre essas, os linfócitos Th9 destacam-se como uma subpopulação de células T CD4<sup>+</sup> auxiliares, caracterizadas pela secreção de interleucinas pró-inflamatórias, como IL-9 e IL-10, que podem desempenhar um papel relevante na amplificação da resposta imune específica contra *Mycobacterium leprae*. O papel desses linfócitos na hanseníase foi avaliado em um estudo que identificou níveis elevados de IL-9 na forma tuberculoide da doença, um efeito relacionado à ação antagônica de IL-9 sobre IL-4 e IL-10, favorecendo uma mudança da resposta Th2 para Th1 (FROES; SOTTO; TRINDADE, 2022 e DE SOUSA *et al.*, 2017).

Os linfócitos Th17, por sua vez, são produtores de citocinas pró-inflamatórias, em especial a IL-17, que têm sido implicadas no desenvolvimento de reações reversas na hanseníase. Níveis elevados de IL-17 também são observados na forma tuberculoide, onde desempenham papel importante no recrutamento de células inflamatórias, ativação endotelial e sustentação da inflamação crônica. Além disso, acredita-se que a resposta Th17 seja fundamental na modulação da função dos macrófagos, uma vez que a IL-17 induz a produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e iNOS, promovendo a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), essenciais para a eliminação do bacilo (SADHU *et al.*, 2016).

As células T reguladoras (Tregs), fenotipicamente caracterizadas pela expressão de CD4, CD25 (receptor de interleucina-2 [IL-2R]) e do fator de transcrição FOXP3, têm recebido destaque em estudos recentes. Elas correspondem a cerca de 10% da população de células T CD4<sup>+</sup> no sangue periférico humano e estão associadas à supressão da resposta celular, mediada pela produção de citocinas reguladoras ou anti-inflamatórias, como o TGF- $\beta$  e a IL-10 (KUMAR *et al.*, 2013). Na hanseníase, as células Treg são encontradas em maior abundância nos pacientes com a forma lepromatosa, sugerindo um possível papel patogênico dessas células nas

apresentações multibacilares (FROES; SOTTO; TRINDADE, 2022). Além disso, foi demonstrado que, nas formas paucibacilares, as células Treg produzem mais IL-17 (citocina pró-inflamatória) e menos IL-10 (citocina reguladora), criando um microambiente que favorece a inflamação e aumenta o dano tecidual. As Tregs também são conhecidas por secretar IL-35, uma citocina imunossupressora que inibe a produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2. O aumento nos níveis de IL-35 em pacientes com hanseníase está diretamente relacionado com o índice baciloscópico, sendo mais elevado nas formas multibacilares da doença (KUMAR *et al.*, 2013).

A resposta imune humoral também é distinta na hanseníase tuberculoide e virchowiana. Na forma tuberculoide ocorrem baixos títulos ou até níveis indetectáveis de anticorpo contra o PGL-1 de *M. leprae*. Na forma virchowiana são observados altos títulos de anticorpos contra PGL-1 podendo ser da classe IgM, IgG e IgE. Porém, a alta concentração desses anticorpos não implica em proteção contra os bacilos e os pacientes infectados apresentam elevada disseminação bacilar (GOULART; PENNA; CUNHA, 2002).

## 2.9 Linfócitos TCD8<sup>+</sup>

As células T CD8<sup>+</sup> são células citotóxicas que apresentam vários mecanismos para o controle e/ou eliminação de células infectadas. Elas podem atuar induzindo estas células à lise ou apoptose, tanto através da liberação de grânulos citotóxicos (contendo perforinas e granzimas) no interior da célula, quanto por interações moleculares na superfície celular. A ação através de perforinas e granzimas se dá com a formação de poros (perforinas) na membrana plasmática de células infectadas, seguida pela ativação de vias dependentes ou independentes de caspase (ativadas por granzimas), que culminam na ativação do apoptose (HAY; SLANSKY, 2022).

Esta ativação quando ocorre por interações moleculares na superfície celular, é resultado da interação de FasL (ligante de Fas), presente na célula T CD8<sup>+</sup>, com a proteína Fas (na superfície da célula alvo), sinalizando para a célula alvo entrar em apoptose (HAY; SLANSKY, 2022). As granzimas constituem uma família de serina proteases localizadas nos grânulos de linfócitos citotóxicos. Em humanos, foram identificados cinco tipos principais de granzimas (A, B, H, K e M), cuja expressão é predominantemente restrita às células da linhagem linfoide (SUSANTO; TRAPANI; BRASACCHIO, 2012). Dentre elas, a granzima A e B destacam-se como as mais abundantes, sendo expressas de maneira constitutiva em diversos tipos celulares,

como linfócitos T citotóxicos (CTL), células natural killer (NK) e células NKT (SUSANTO; TRAPANI; BRASACCHIO, 2012).

O co-receptor CD8 desempenha um papel fundamental na ativação das células T CD8<sup>+</sup> por meio de interações com o TCR (receptor de células T) e os complexos peptídeo/MHC de classe I (GAO; JAKOBSEN, 2000; HOLLER; KRANZ, 2003; COUEDEL *et al.*, 1999 e ALEXANDER *et al.*, 1991). A ligação do CD8 pode aumentar a sensibilidade ao peptídeo em até um milhão de vezes ou mais (HOLLER; KRANZ, 2003), sendo essencial para a formação de um complexo estável entre o MHC de classe I e o TCR (SCHOTT; PLOEGH, 2002; NAEHER; LUESCHER; PALMER, 2002). Tradicionalmente, acreditava-se que a expressão do CD8 fosse estável durante a resposta imune mediada por células T CD8<sup>+</sup>, sendo amplamente utilizado como um marcador para definir células T citotóxicas. No entanto, foi demonstrado que a expressão de CD8 pode ser inibida por certas citocinas, incluindo IL-2, IL-4 e IL-15, em células T ativadas (KIENZLE *et al.*, 2005). Além disso, a regulação negativa do CD8 tem sido sugerida como um dos mecanismos de tolerância periférica (MAILE *et al.*, 2001). Subpopulações com baixa expressão de CD8 têm sido observadas em doenças crônicas (SCHMITZ *et al.*, 1998; GRISOTTO *et al.*, 2001 e KIZAKI *et al.*, 1991), porém, essa regulação negativa do CD8 também ocorre durante respostas imunes agudas a patógenos (BUSH *et al.*, 1998; HARRINGTON *et al.*, 2002; SLIFKA; WHITTON, 2001) e em linhas celulares (WALKER *et al.*, 1995).

Os subconjuntos de células TCD8<sup>bright+</sup> e TCD8<sup>dim+</sup> representam duas subpopulações de linfócitos TCD8<sup>+</sup> que apresentam atividades funcionais distintas e são diferenciadas pela intensidade da coloração com anticorpos monoclonais anti-CD8 que reconhecem especificamente a cadeia CD8 $\alpha$  (BAUME *et al.*, 1990). As células TCD8<sup>bright+</sup> representam em grande parte um subconjunto CD3<sup>+</sup> com atividade citolítica restrita ao MHC e atividade supressora para produção de anticorpos; já as células TCD8<sup>dim+</sup> que são também CD3<sup>+</sup> apresentam a atividade citolítica de células T não restrita ao MHC, assim como as células Natural killer (NK) que são um subconjunto de CD3<sup>-</sup> (LANIER *et al.*, 1983; LANIER *et al.*, 1986; RICHARDS *et al.*, 1990; BAUME *et al.*, 1990; MOEBIUS *et al.*, 1991). No estudo de Simpson e colaboradores em 2007, onde foram avaliados os linfócitos T CD8<sup>+</sup> em indivíduos que realizavam exercícios de alta intensidade, demonstrou que quando o indivíduo saudável estava em repouso aproximadamente dois terços de todas as células CD8<sup>+</sup>

expressam CD8<sup>bright+</sup> e o outro restante, de um terço expressando CD8<sup>dim+</sup>. As subpopulações de células T CD8<sup>bright+</sup> na infecção por HIV são significativamente mais efetivas na inibição da replicação do vírus. Além disso, a frequência das células T CD8<sup>dim+</sup> estão correlacionadas diretamente com a carga viral e preditores clínicos de progressão mais rápida da doença (ELLER *et al.*, 2016). A subpopulação de TCD8<sup>dim+</sup> está presente em porcentagens relativamente baixas  $\pm$  de 10% dos linfócitos, majoritariamente em indivíduos saudáveis (PRINCE; BERMUDEZ; PLAEGER-MARSHALL, 1993). Essas células são consideradas funcionalmente prejudicadas e exercem efeitos supressores por meio de diferentes mecanismos, tanto em humanos quanto em modelos murinos. O comprometimento funcional dessas células é evidente pela sua capacidade reduzida de proliferação e produção de citocinas. Em pacientes com HIV, as células T CD8<sup>dim</sup> naïve apresentam defeitos na proliferação e sinalização do receptor de células T (TCR), comprometendo a secreção de IL-2; um aumento dessas células é observado em condições de exposição crônica e persistente a antígenos, como em pacientes infectados por HIV, receptores de transplantes e em camundongos cronicamente infectados com *Trypanosoma cruzi* (FAVRE *et al.*, 2011; GRISOTTO *et al.*, 2001 e NAJI *et al.*, 2007).

## 2.15 Resposta imune e citocinas

Na caracterização da resposta imune, a doença se apresenta classicamente em duas formas clínicas antagonistas, o que orienta a compreensão do padrão de resposta dual observado entre os linfócitos Th1 e Th2 (MODLIN, 1994; ZHOU; ZHANG; AUNE, 2003; WALKER; LOCKWOOD, 2006; YAMAMURA *et al.*, 1991). Na hanseníase, os linfócitos Th1 e Th2 derivam da diferenciação de linfócitos Th0, onde as principais citocinas envolvidas nesse processo são a IL-2 e a IL-12 (Th1), e a IL-4 (Th2). Os linfócitos Th1, geralmente, expressam os receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR3, enquanto os linfócitos Th2 expressam predominantemente os receptores CCR4, CCR8 e, em menor grau, CCR3 (ZHOU; ZHANG; AUNE, 2003; SIMOES QUARESMA *et al.*, 2012).

Na forma resistente da hanseníase, a tuberculoide, a redução da carga bacilar está associada a um padrão de resposta imune do tipo Th1, no qual a produção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  ativa os macrófagos, induzindo a produção de iNOS, que destrói o bacilo através da liberação de radicais livres. No outro polo, o lepromatoso, considerado o suscetível da doença, está associado a um maior número de lesões, com a presença de macrófagos espumosos e globias. Segundo a literatura, há uma

predominância da resposta mediada por linfócitos Th2 na forma lepromatosa, a qual induz a produção de citocinas como IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ , que inativam a resposta microbicida dos macrófagos, facilitando, assim, a sobrevivência do bacilo (SINSIMER *et al.*, 2010; HALL, 2011; NATH *et al.*, 2000). Nesse contexto, a resposta mediada por linfócitos Th2, através da liberação de IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ , regula negativamente a resposta Th1, inibindo a ação microbicida dos macrófagos no polo suscetível da doença (SIMOES QUARESMA *et al.*, 2012 e AARÃO *et al.*, 2014).

Considerando o paradigma Th1/Th2 da hanseníase, o perfil de citocinas encontrado na pele difere em cada polo, com uma expressão mais elevada de citocinas Th1 (como IL-7 e IL-15) em pessoas com hanseníase tuberculóide e uma expressão mais alta de citocinas Th2 (como IL-4, IL-5, IL-10 e fator de crescimento transformador-beta [TGF- $\beta$ ]) em pacientes com hanseníase lepromatosa. A análise de sangue periférico de pacientes com hanseníase também mostrou que, após a estimulação com antígenos recombinantes de *M. leprae*, há uma indução predominante da secreção de citocinas Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-12) em apresentações paucibacilares e citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-6) em formas multibacilares (DUPNIK *et al.*, 2015 e SAMPAIO *et al.*, 2012).

### 3. JUSTIFICATIVA

A expressão clínica da hanseníase é orientada pelas interações bactéria e sistema imune do hospedeiro (SANSONETTI et al., 1981). Na maioria das pessoas o contato com *M. leprae* induz imunidade efetiva resultando na ausência de desenvolvimento da doença ou mesmo eliminação do patógeno sem manifestações clínicas (JACOBSON; KRAHENBUHL, 1999). Em uma minoria de pessoas, cerca de 5%, o contato com *M. leprae* resulta em doença ativa cujo espectro imunopatológico é amplamente considerado devido à variação nas respostas imunes acompanhada de reações granulomatosas variáveis por parte de cada hospedeiro à antígenos específicos de *M. leprae*.

Os linfócitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> (CTLs) são conhecidos por contribuir para a defesa do hospedeiro contra patógenos intracelulares por meio da produção de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e da morte de células-alvo infectadas através de sua ação citotóxica. O papel das células T CD8<sup>+</sup> humanas têm sido mostrado pela lise de macrófagos infectados com micobactérias, mas também por terem a capacidade de exercer atividade antimicrobiana independente de sua capacidade de secretar IFN- $\gamma$ , mediado por um mecanismo de secreção dependente de grânulos que é por meio da ligação com MHC I e através da ligação de FasL das CTLs com Fas da célula alvo (STENGER et al., 1997; BALIN et al., 2018).

Alguns mediadores potenciais da atividade antimicrobiana exercida por essas células foram descritos ao longo dos anos, incluindo granzima B, perforina e granulicina (STENGER et al., 1997; OCHOA et al., 2001). A perforina é a grande responsável pela lise de células infectadas reconhecidas pelas células T CD8<sup>+</sup>, já a granzima B possui o potencial de eliminar parasitas intracelulares degradando suas defesas contra radicais de oxigênio, e a granulicina é importante para a morte intracelular de bactérias e patógenos (WALCH et al., 2014 e DOTIWALA et al., 2016).

Os CTLs são heterogêneos em sua expressão de proteínas de grânulo citotóxico, onde algumas células expressam apenas uma proteína citotóxica e outras expressam múltiplas proteínas citotóxicas (BUSCH et al., 1998). Deste modo, os componentes específicos do grânulo CTL que são necessários e suficientes para promover as mortes intracelulares permanecem incertos.

As células T CD8<sup>dim+</sup> têm sido observadas em infecções virais persistentes e descritas por terem atividade citotóxica ineficiente (TRAUTMANN et al., 2003; XU et al., 2013 e OUYANG et al., 2013). O papel fisiológico das células T CD8<sup>dim+</sup> atualmente

não é conhecido. Pressupõe-se que a persistência do antígeno afete o desenvolvimento de uma população celular ineficiente de células T ou que essas células surjam como uma população reguladora que controla a intensidade da atividade citolítica e de dano ao tecido (MAGGI *et al.*, 1994).

Portanto, reconhecer e caracterizar as subpopulações de linfócitos T CD8<sup>bright+/dim+</sup> em associação com as formas clínicas da hanseníase, será de grande importância na complementação dos nossos estudos e ajudará a desvendar o papel dessas subpopulações de células no contexto da infecção por *M. leprae*.

#### 4. OBJETIVO GERAL

Identificar e caracterizar as subpopulações de linfócitos T CD8<sup>bright+</sup> e TCD8<sup>dim+</sup> correlacionando com as diferentes formas clínicas da hanseníase antes da intervenção poliquimioterápica.

##### 4.1 Objetivos específicos

- a. Recrutar pacientes portadores de diferentes formas clínicas da hanseníase, por amostragem por conveniência, antes da intervenção terapêutica, bem como indivíduos controles saudáveis;
- b. Analisar as subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes portadores de diferentes formas clínicas da hanseníase e indivíduos saudáveis a partir das PBMC;
- c. Estabelecer a cinética de produção de citocinas intracelulares e avaliar o perfil de produção dessas citocinas sob estímulos antigênicos específicos em células TCD8<sup>+</sup> de indivíduos com hanseníase e controles saudáveis;
- d. Avaliar a produção de granzima B e perforinas no interior das células T CD8<sup>+</sup> de indivíduos com hanseníase e controles saudáveis.
- e. Correlacionar os dados de fenotipagem celular, produção de citocinas intracelulares e secreção de grânulos com fenótipos clínicos da hanseníase.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Sujeitos da pesquisa

Foi implementado um estudo observacional, analítico do tipo caso-controle. Neste estudo utilizamos um total de amostras de 91 indivíduos, sendo 69 de sangue periférico de portadores da hanseníase e 22 indivíduos saudáveis (não portadores), todos eles residentes no município de Campos dos Goytacazes. Os indivíduos foram avaliados quanto a parâmetros imunológicos e, portanto, as amostras foram coletadas antes de iniciar o tratamento com a medicação PQT-U, sendo o período de 2020 à 2024 da coleta do sangue periférico.

Grupo caso: pacientes portadores de diferentes formas clínicas da hanseníase (tuberculoide, virchowiana, dimorfa e indeterminada), oriundos do Programa Municipal de Controle da Hanseníase, pertencente à Secretaria Municipal de Saúde do município de Campos dos Goytacazes, o qual funciona como Centro de Referência Regional para diagnóstico e tratamento da doença. Este ambulatório recebe pacientes encaminhados de instituições de saúde públicas e privadas. Os indivíduos portadores da hanseníase selecionados para o estudo foram diagnosticados clinicamente como portadores da hanseníase, pelo médico dermatologista Dr. Edilbert Pellegrini Nahn Jr., colaborador neste projeto; e classificados segundo a classificação de Madrid, além de terem sido avaliados para baciloscopia através da Coloração de Ziehl Neelsen, onde se observa a quantidade de bacilos corados na lâmina das lesões, lóbulos auriculares e cotovelos, sendo classificados quanto a esse número em diferentes cruzes: + (3 a 9 bacilos em todo o esfregaço), ++ ( $\geq 10$  em todo o esfregaço) e +++ (1 ou mais bacilo por campo), no Laboratório Regional de Campos dos Goytacazes-Fundação Municipal de Saúde de Campos dos Goytacazes.

Grupo Controle: 22 indivíduos provenientes do hemocentro do Hospital Ferreira Machado, o qual pertence a rede pública de saúde do município de Campos dos Goytacazes sem história pregressa e atual de hanseníase.

Todos os indivíduos voluntários no estudo foram informados sobre os objetivos do projeto e sobre sua forma de participação, mediante leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. O termo foi redigido segundo as regras da resolução 466/2012, exigida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), para coleta de amostras de sangue periférico. Esse projeto foi submetido à avaliação

do Comitê de Ética em Pesquisa pela plataforma Brasil e aprovado sobre o CAAE: 19679119.8.0000.5244.

**Tabela 1:** Características da população de estudo.

	Grupos clínicos (OMS)/ N	Grupos clínicos (Madri)	N	Média de idade ± Desvio padrão (PT)	Gênero Feminino/Masculino (%)
Hanseníase (MH)	Multibacilar (MB) 53	Lepromatoso (LL)	23	50.45 ± 15.44 (18-76)	8.69/ 91.31
		Dimorfo (DL)	30	55.30 ± 18.45 (18-79)	20.00/ 80.00
	Paucibacilar (PB) 16	Indeterminado (IL)	4	37.75 ± 14.24 (18-50)	25.00/ 75.00
		Tuberculoide (TL)	12	39.91 ± 15.47 (19-65)	75.00/ 25.00
Total MH			69	50.32 ± 17.74 (18-79)	26.08/73.92
Controles saudáveis (HC)			22	36.00 ± 10.78 (20-54)	34.79/65.21

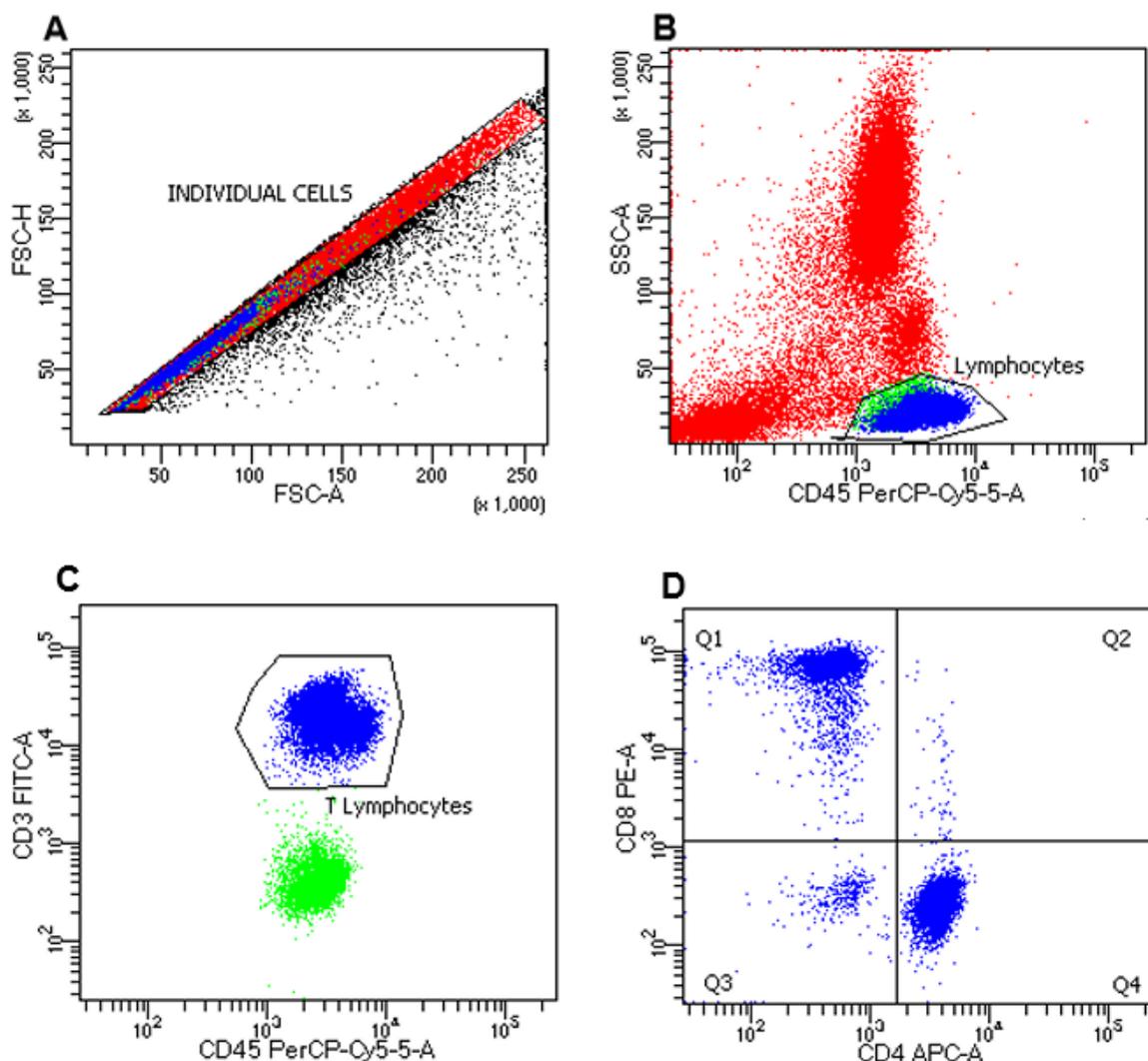
## 5.2 Obtenção das PBMCs a partir do sangue periférico

As amostras de sangue dos indivíduos participantes do estudo foram coletadas por venopunção para obtenção de 10 mL de sangue periférico, em tubos a vácuo contendo heparina sódica. O fracionamento celular foi feito por gradiente de Ficoll (LSM®, ORGANON TEKNIKA – 1,08g/mL) para separação das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) por diferença de densidade, adicionando-se lentamente o sangue sobre o Ficoll, na proporção de 2:1 em tubos

cônicos de 50 mL, e submetido à centrifugação à 1000 x g, por 20 minutos, numa temperatura de 22°C. O plasma foi retirado e armazenado em tubos de 15 mL a 20°C. As PBMCs coletadas foram lavadas com meio RPMI-1640 (Meio HEPES modificado – GIBCO-BRL) através de duas centrifugações de 1000 x g 4°C durante 10 minutos. Após o processo de lavagem, as células foram ressuspensas em 1mL de meio RPMI-1640, e uma alíquota de 10 µL dessa suspensão foi retirada e diluída em 90µL de Azul de Tripán (0,2%) para a realização da contagem em Câmara de Neubauer do número de células e avaliação da viabilidade celular.

### **5.3 Fenotipagem celular, marcação extracelular de células TCD8<sup>bright+/dim+</sup> e análise por citometria de fluxo.**

Para fenotipagem celular das células de todos os pacientes e controles participantes do estudo, foram adicionados 25 µL de anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos BD Multitest anti-CD3 [fluoresceína isotiocianato (FITC)], anti-CD8 [ficoeritrina (PE)], anti-CD45 [complexo de proteína peridinina-clorofila (PerCP)] e anti-CD4 [aloficocianina (APC)] a 50 µL de sangue total em um tubo de 1 mL. O tubo foi vortexado suavemente e incubado por 15 minutos no escuro à temperatura ambiente (20° a 25°C). Em seguida, adicionamos 450 µL de Solução de Lise FACS 1X (BD Biosciences), vortexamos suavemente e incubamos por 15 a 30 minutos no escuro à temperatura ambiente. Após isso, adicionamos 500 µL de Solução de Lise FACS 1X aos tubos e os submetemos à centrifugação a 500x g por 10 minutos a 4°C. As amostras foram então adquiridas em um BD FACSymphony A1 com configuração de 4 lasers (BD Biosciences) e analisadas usando BD FACSDiva, versão 9.0.2 (BD Bioscience, NJ, EUA). A fenotipagem das células é apresentada na **Figura 2**, exibindo a estratégia de *gates*.



**Figura 2.** Estratégia de *gates* para células T CD8<sup>+</sup> no sangue periférico de participantes da pesquisa. **A** - Diagrama de fluxo representativo mostrando a posição dos linfócitos no gráfico de dispersão frontal (FSC) e lateral (SSC); **B** - *gate* de linfócitos positivos (CD45<sup>+</sup> e SSC); **C** - linfócitos T<sup>+</sup> (CD45<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>); **D** - no quadrante 1 (Q1), representativo dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>.

#### 5.4 Cultura de Células Mononucleares do Sangue Periférico

PBMC de 19 participantes da pesquisa, sendo 11 pacientes portadores de diferentes formas clínicas da hanseníase e 8 indivíduos controles foram separadas, como descrito no item 5.2, e cultivadas em placas de cultura de 24 (1,0 × 10<sup>6</sup> células/poço) para avaliação da produção de citocinas, grânulos de citotoxicidade e marcação por imunofenotipagem celular por citometria de fluxo. Utilizamos para cultura o meio “Culture Medium for Blastogenesis (CMBlast)” [RPMI-1640 (GIBCO BRL); L-Glutamina 2mM (MERK); Antibiótico Gentamicina 20µg/ml (GIBCO BRL) e soro humano AB normal (SIGMA) inativado.

As culturas de PBMC foram estimuladas antígenoicamente por antígenos específicos através da adição de *M. leprae* irradiado - BEI RESOURCES (2,5µg/ml) e

não específico por enterotoxina B estafilocócica (SEB- 0,25 µg/ml) e culturas de PBMC não estimuladas antígenicamente foram mantidas como controles experimentais. As culturas celulares foram mantidas em estufas úmidas de CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C durante cinco dias, e foram processadas em diferentes marcos de tempo conforme descrito no parágrafo subsequente.

As culturas de PBMC após 24, 72 e 120h foram processadas para a fenotipagem e marcação intracelular de citocinas e grânulos citotóxicos sobre células CD8<sup>+</sup>. Em cada marco, 4h antes de completar o tempo, foram adicionados 25µL da solução diluída de monoensina (99,2µL de RPMI + 0,8µL de monoensina) numa placa de 96 poços, na estufa e incubamos o regente por 4h. Após esse período de incubação, cada poço foi retirado e alocado em um tubo de 1,5µL, e acrescentado 1mL de solução *staining buffer* (PBS sem Mg<sup>2+</sup> e Ca<sup>2+</sup>, 1% SFB, 0,09% de azida sódica, pH 7,4 e filtrado) e submetido a 2x centrifugações à 500g, 4°C por 10 minutos. O pellet foi ressuspendido em 50µL de *staining buffer*, e a marcação externa foi feita seguindo: 1 tubo de controle branco (contendo somente as células), 1 tubo com controle isotípico externo [5µL de: anti- Mouse IgG1 (APC), κ; anti- Mouse BALB/c IgG2b, κ (FITC) e anti-Rat IgG2a, κ (PE)]; 1 tubo com 25µL de multitest (CD3, CD8 e CD45); 1 tubo do controle da placa com 25µL multitest; 1 tubo do poço de estímulo com SEB com 25µL de multitest e 1 tubo do poço de estímulo com *M. leprae* irradiado com 25µL de multitest. As amostras foram incubadas por 30 minutos, à 4°C ao abrigo da luz, após esse período as células foram lavadas 2x com 1mL de *staining buffer* à 500g, 4°C por 10 minutos. Após a lavagem, as células foram ressuspendidas em 300µL da solução de fixação e permeabilização (Kit BD Cytotfix/Cytoperm™) e incubado por 20 minutos, à 4°C ao abrigo da luz. Após os 20 minutos, as células foram lavadas 2x com 1mL de solução BD Perm/Wash™ (Kit BD Cytotfix/Cytoperm™) à 500g, 4°C por 10 minutos. Ressuspendeu-se o pellet com 50µL da solução BD Perm/Wash para a marcação interna sendo feita seguindo: 1 tubo com controle isotípico interno [5µL de: anti- Mouse IgG1 (APC), κ; anti- Mouse BALB/c IgG2b, κ (FITC) e anti-Rat IgG2a, κ (PE)]; 1 tubo do controle da placa contendo 12,5µL do mix de anticorpos [15mL de tampão *Brilliant Blue* (BD) + 3,75µL de cada anticorpo: anti-IFN-γ; anti-TNF-α; Anti-IL4; anti-IL10; anti- perforina e anti- granzima B] as células foram incubadas por 30 minutos, à 4°C ao abrigo da luz. Após esse tempo as células foram lavadas 2x com 1mL de solução BD Perm/Wash à 500g, 4°C por 10 minutos e na última lavagem as células foram ressuspendidas em 150µL de *staining buffer* e

armazenadas à 4°C até a leitura no citometro de fluxo. Todo esse processamento foi realizado em cada um dos 3 marcos de tempo (24, 72 e 120h) e a **Tabela 2** demonstra todos os anticorpos e fluorocromos que foram utilizados no painel de fenotipagem celular.

**Tabela 2:** Anticorpos monoclonais que foram usados para imunofenotipagem por citometria de fluxo.

Anticorpo anti- “cluster of differentiation”	Fluorocromo	Clone	Isotipo	Fabricante
Anti-CD3	FITC	SK7	IgG1, κ	BD Horizon™
Anti-CD8	PE	SK1	IgG1, κ	BD Horizon™
Anti-CD45	PerCP	2D1	IgG1, κ	BD Horizon™
Anti-IFN-γ	BV605	B27	Mouse IgG1, κ	BD Horizon™
Anti-TNF	BV650	MAb11	Mouse IgG1, κ	BD Horizon™
Anti-IL4	BV786	MP4-25D2	Rat IgG1	BD Horizon™
Anti-IL10	PeCy7	JES3-19F1	Rat IgG2a, κ	BD Pharmingen™
Anti- perforina	BV421	δG9	Mouse gG2b, κ	BALB/c BD Horizon™
Anti- granzima B	PE-CF594	GB11	Mouse gG1, κ	BALB/c BD Horizon™

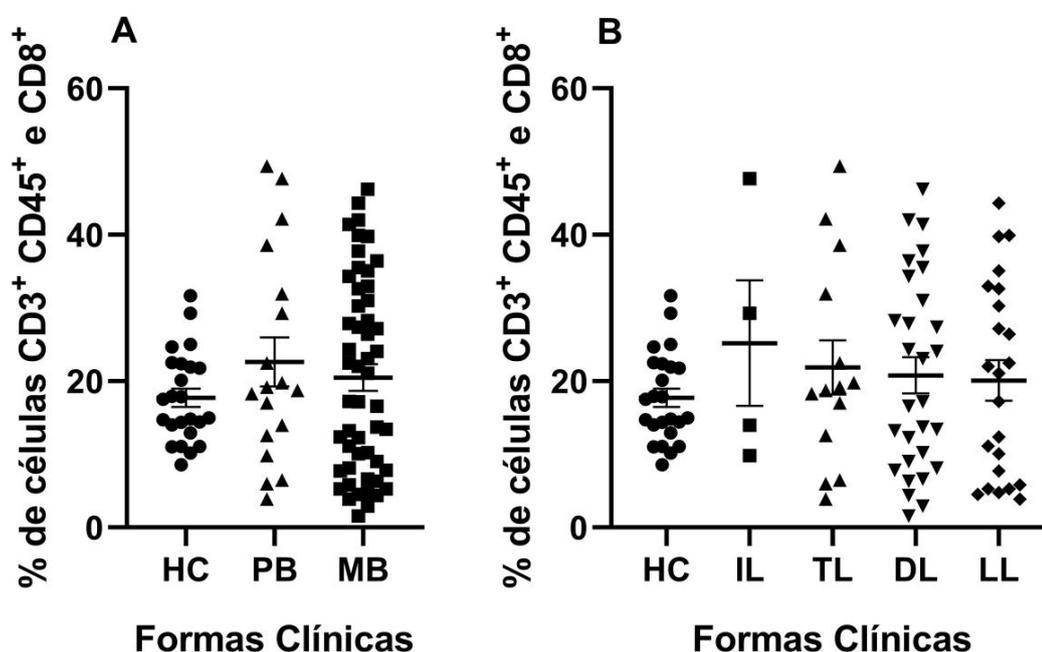
### 5.5 Análises estatísticas

As análises estatísticas intergrupos, para comparar o número de células e expressão de CD8, e níveis de produção de citocinas e grânulos citotóxicos, foram realizadas utilizando-se o programa estatístico Prisma (GraphPad Prism 6.0), onde utilizamos as classificações de Madri (1953), OMS (1982) e classificação categórica em relação ao desenvolvimento ou não da hanseníase, para comparação de pacientes e controles saudáveis. Os dados foram verificados inicialmente quanto à natureza paramétrica ou não paramétrica, considerando-se o seu grau de independência, normalidade e variância. Como os dados não apresentaram distribuição normal, foram analisados pelo teste estatístico Kruskal-Wallis, que é o teste usado para comparação entre três ou mais grupos, seguido pelo teste de Dunn's (pós teste). O teste Mann-Whitney foi usado para comparação entre dois grupos. Em todas as análises, as diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

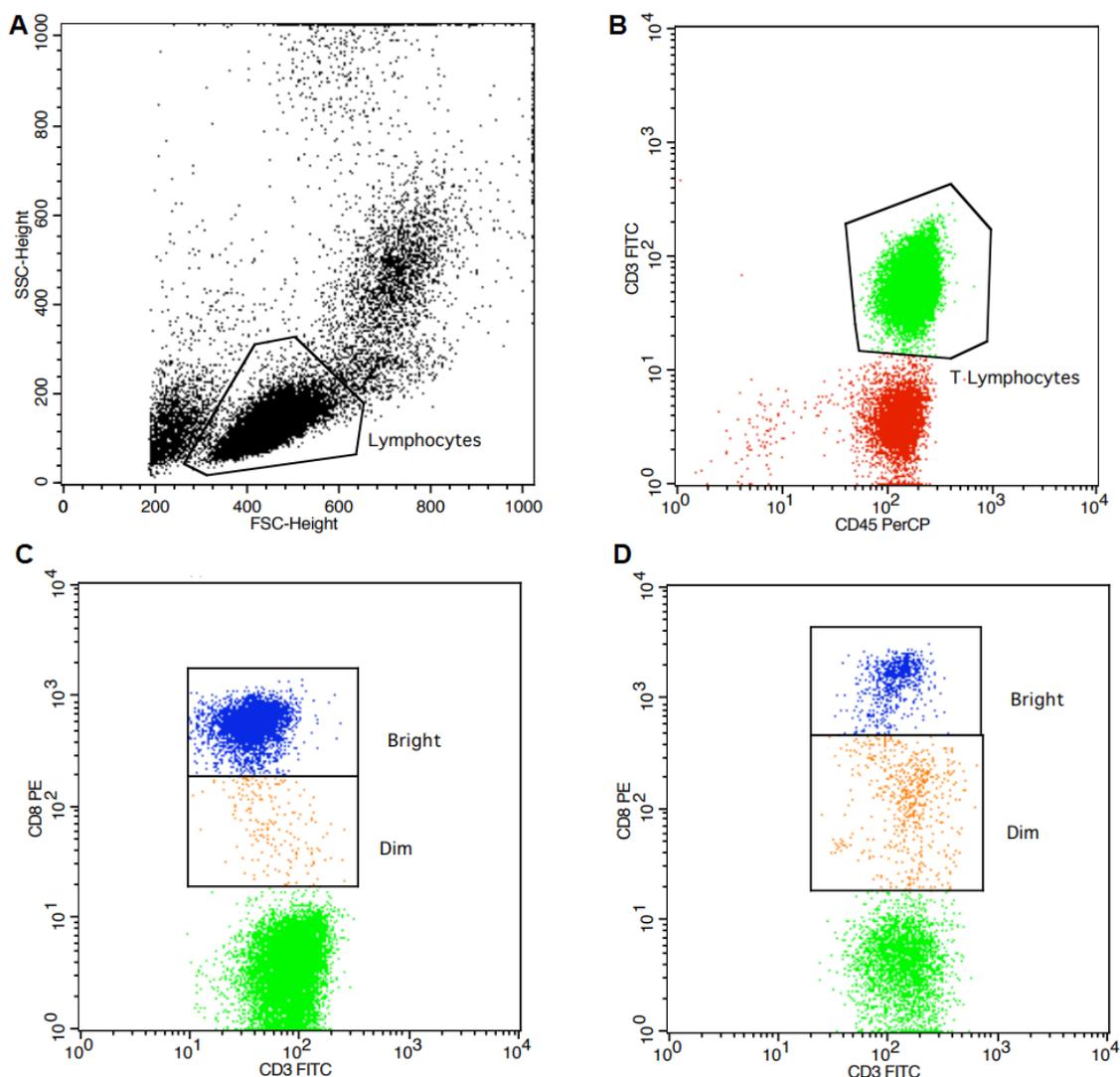
### 6.1 Análise *ex vivo* da quantidade de células T CD8<sup>+</sup> em PBMCs de pacientes com hanseníase

Para avaliar a porcentagem de células T CD8<sup>+</sup> no sangue periférico de pacientes com hanseníase e indivíduos controles (HC), agrupamos os pacientes de acordo com a classificação da OMS (**Figura 3A**) e de Madri (**Figura 3B**). A frequência de células T CD8<sup>+</sup> foi semelhante entre as formas clínicas da hanseníase e HC, mesmo considerando as classificações da OMS ou Madri (**Figura 3A e 3B, respectivamente**).



**Figura 3. Percentual da população de células T CD8<sup>+</sup> em diferentes formas clínicas e indivíduos controles.** **A** – Classificação da OMS: MB- Multibacilar, PB- Paucibacilar, HC- Indivíduos controle e teste estatístico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn; **B** – Classificação de Madri: formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IL- Indeterminada, TL- Tuberculóide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn.

No entanto, ao analisar os dados, observamos duas subpopulações com intensidade de fluorescência distintas do receptor CD8 na superfície dessas células T, denominadas CD8<sup>bright+</sup> e CD8<sup>dim+</sup> (**Figura 4**).



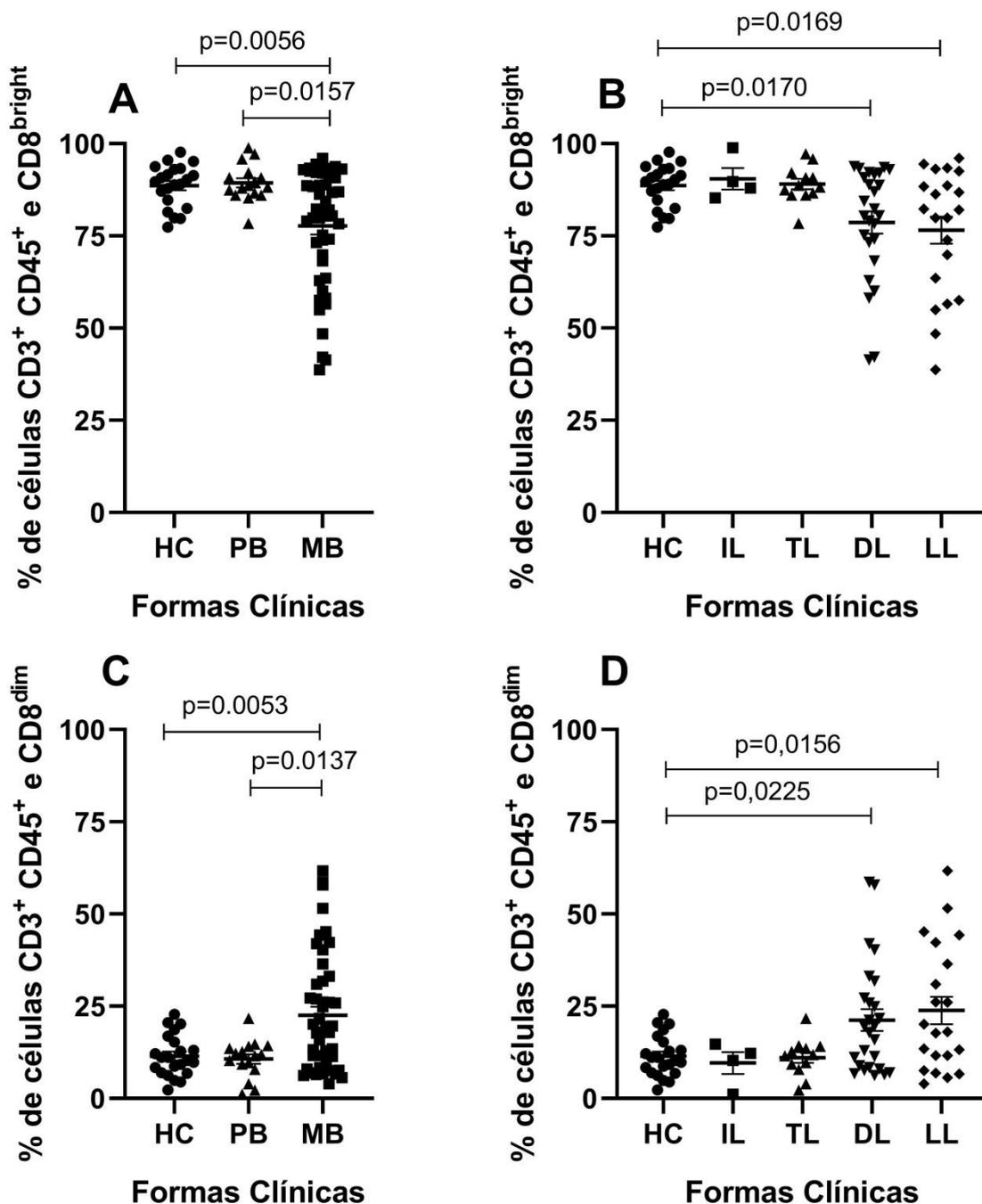
**Figura 4. Visualização de células T CD8<sup>bright</sup> e CD8<sup>dim</sup> no sangue periférico de indivíduos com hanseníase.** A - Diagrama de fluxo representativo mostrando a posição dos linfócitos nos gráficos de dispersão para frente (FSC) e lateral (SSC), B - *gate* positivo para linfócitos (CD45<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>), C e D - *gate* positivos para células T CD8<sup>dim</sup> e CD8<sup>bright</sup> (CD3<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>), com uma representação da visualização em pacientes com as formas tuberculóide e virchowiana, respectivamente.

## 6.2 Diminuição de células T CD8<sup>bright+</sup> e aumento de células T CD8<sup>dim+</sup> em pacientes multibacilares

Para investigar se subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> com intensidade de fluorescência distintas estavam associadas a fenótipos clínicos na hanseníase, agrupamos os pacientes considerando as classificações da OMS e de Madri (**Figura 5**). Observamos que a porcentagem de células T CD8<sup>bright+</sup> teve uma redução acentuada em formas multibacilares em comparação com formas paucibacilares e HC ( $p=0,0157$  e  $p=0,0056$ , respectivamente) (**Figura 5A**), assim como na hanseníase

lepromatosa (LL) e hanseníase dimorfa (DL) em comparação com HC ( $p=0,0169$  e  $p=0,0170$ , respectivamente), na classificação de Madri (**Figura 5B**).

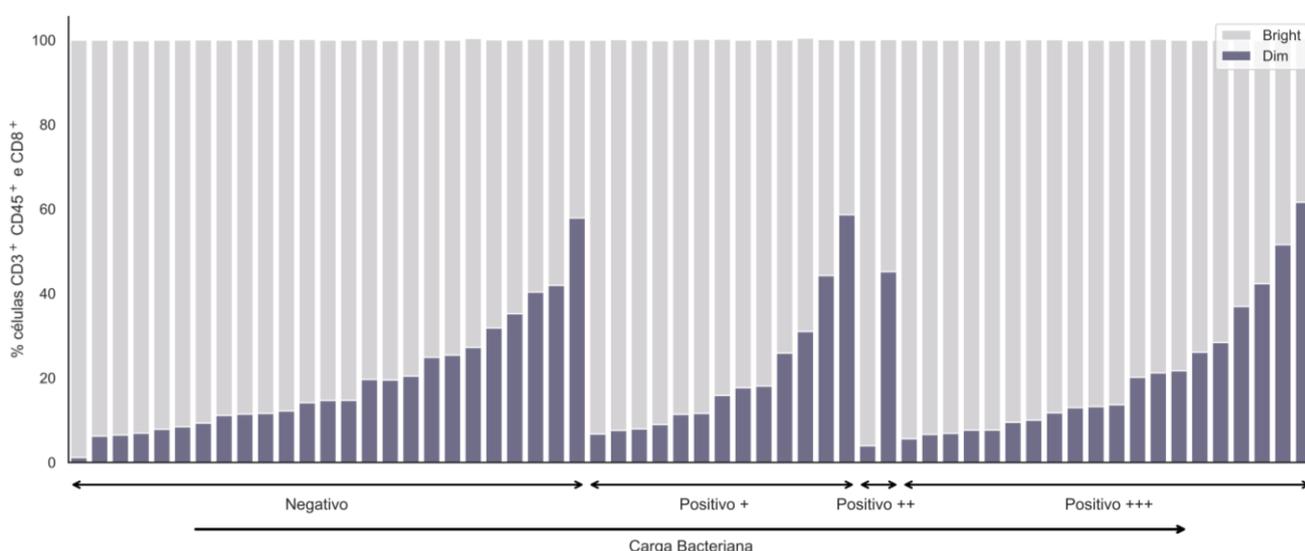
Por outro lado, observamos um aumento na porcentagem de células T CD8<sup>dim+</sup> em formas multibacilares em comparação com formas paucibacilares e HC ( $p=0,0137$  e  $p=0,0053$ ) na classificação da OMS (**Figura 5C**). Considerando a classificação de Madri, a porcentagem de células T CD8<sup>dim+</sup> também foi significativamente maior em pacientes com as formas mais graves da hanseníase (DL e LL) em comparação com HC ( $p=0,0225$  e  $p=0,0156$ ) (**Figura 5D**).



**Figura 5.** Percentual de células T CD8<sup>bright+</sup> e CD8<sup>dim+</sup> é distinta em diferentes formas clínicas da hanseníase. **A e C** – Classificação da OMS: MB- Multibacilar, PB- Paucibacilar, HC- Controle Saudável e teste estatístico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn; **B e D** – Classificação de Madri: formas clínicas LL- Hanseníase lepromatosa, DL- Hanseníase dimorfa, IL- Hanseníase indeterminada, TL- Hanseníase tuberculóide, HC- Controle Saudável e teste estatístico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn.

### 6.3 Percentual de células TCD8<sup>bright+/dim+</sup> não está associado a carga bacilar

Como a porcentagem de células T CD8<sup>bright+</sup> e CD8<sup>dim+</sup> apresentava um perfil distinto entre as formas mais graves da hanseníase e as formas mais leves, investigamos se essa variação estava correlacionada com a carga bacilar, e descobrimos que não estava. Pacientes paucibacilares, que possuem baciloscopia negativa, com nenhum ou poucos bacilos, apresentaram uma porcentagem maior de células CD8<sup>bright+</sup>, e alguns pacientes apresentaram aumento das células T CD8<sup>dim+</sup>. De forma semelhante, pacientes multibacilares, caracterizados por uma alta carga bacilar, exibiram um aumento nas células T CD8<sup>bright</sup> e CD8<sup>dim</sup> (**Figura 6**). Assim, nossos dados indicam que a diferenciação de linfócitos TCD8<sup>+</sup> nessas subpopulações de células T CD8<sup>bright+</sup> e TCD8<sup>dim+</sup> não está associado à carga bacilar.

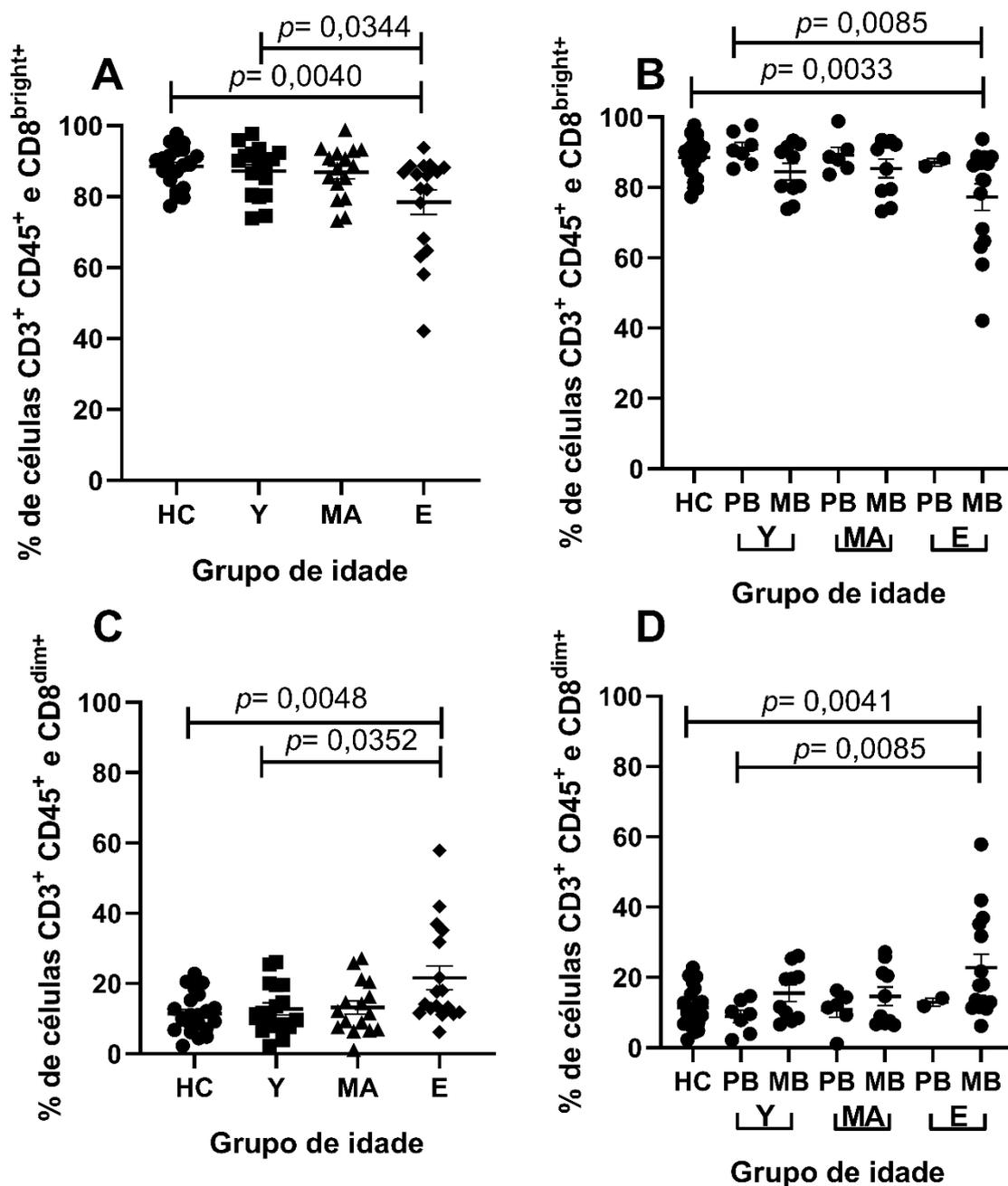


**Figura 6. Percentagem de células T CD8<sup>bright+/dim+</sup> e carga bacteriana em pacientes com hanseníase.** Os pacientes com hanseníase foram agrupados em negativos (tuberculoides e indeterminados) e positivos (dimorfos e lepromatosos) com índices de + (de 3 a 9 bacilos em todo o esfregaço), ++ (≥10 em todo o esfregaço) e +++ (1 ou mais bacilo por campo) em relação a carga bacilar.

### 6.4 Diminuição de células T CD8<sup>bright+</sup> e aumento de células T CD8<sup>dim+</sup> em pacientes idosos com hanseníase

Como não houve correlação entre a carga bacilar entre as diferentes formas clínicas da hanseníase em relação a diferenciação das células T CD8<sup>+</sup> para os perfis *bright+* e *dim+*, avaliamos se a idade poderia estar influenciando nessa diferenciação para subpopulações de células TCD8<sup>+</sup> em resposta à infecção por *M. leprae*. Os dados mostram que uma diminuição significativa na população de células T CD8<sup>bright+</sup> foi observada em indivíduos idosos com hanseníase (E) em comparação com o grupo

( $p= 0,0040$ ) controle saudável (HC) e o grupo ( $p= 0,0344$ ) jovem (Y) (**Figura 7A**). Por outro lado, as células  $CD8^{dim+}$  aumentaram em indivíduos idosos (E) em comparação com ( $p= 0,0048$ ) controles saudáveis HC e ( $p= 0,0352$ ) indivíduos jovens (Y) (**Figura 7C**), indicando que indivíduos saudáveis (HC) e pacientes jovens (Y) possuem um perfil semelhante de percentual das subpopulações de células T  $CD8^{bright+}$  e  $CD8^{dim+}$  e oposto ao perfil apresentado por pacientes idosos (E). Então a fim de descobrir se essa expansão do perfil *dim+* e detrimento do perfil *bright+* nos indivíduos idosos estaria relacionado à doença *per si* ou a idade, avaliamos e analisamos conforme a classificação da OMS e agrupados quanto as faixas etárias; sendo assim podemos perceber que os indivíduos idosos (E) das formas multibacilares apresentam a diminuição de células T  $CD8^{bright+}$  em comparação aos pacientes ( $p=0,0085$ ) paucibacilares jovens (Y) e aos ( $p=0,0033$ ) controles saudáveis (**Figura 7B**). E que o aumento do perfil de linfócitos T  $CD8^{dim+}$  acontece nos pacientes multibacilares idosos (E) comparados aos ( $0,0085$ ) pacientes paucibacilares jovens (Y) e aos ( $0,0041$ ) controles saudáveis (**Figura 7D**). Isso mostra que a idade não está influenciando na diferença de linfócitos T  $CD8^{dim+}$  e  $CD8^{bright+}$  e que isso é atrelado a doença, já que idosos das formas paucibacilares apresentam níveis de linfócitos T  $CD8^{dim+/bright+}$  parecidos com pacientes paucibacilares jovens e controles.



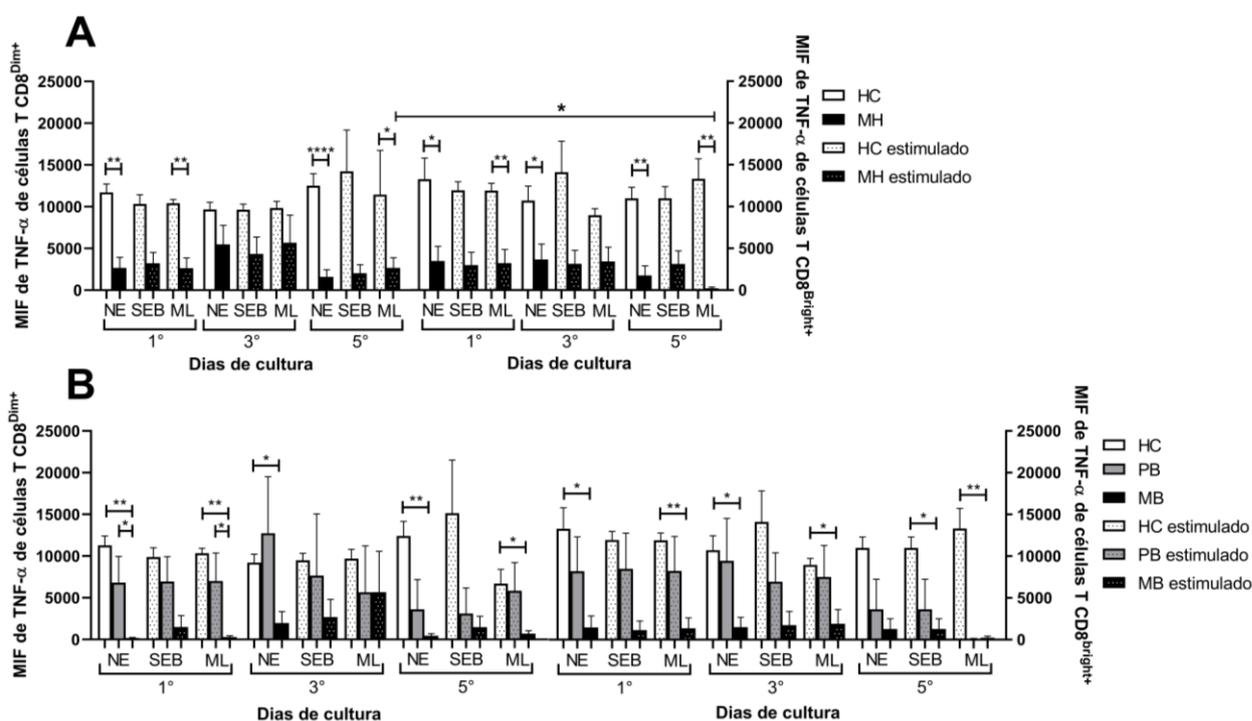
**Figura 7.** Porcentagem de células T CD8<sup>bright+/dim+</sup> em pacientes com hanseníase, estratificados em três grupos de diferentes idades. **A e C-** Classificação quanto a grupos etários. **B e D-** Classificação da OMS correlacionado aos grupos etários. **HC** - Controle saudável e os pacientes foram categorizados em três grupos etários: **Y**, jovens (18-40 anos); **MA**, meia-idade (41-60 anos); e **E**, idosos (acima de 60 anos). Os dados são representados como médias  $\pm$  erro padrão da média (SEM) e analisados usando o teste estatístico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn.

### 6.5 Cinética da produção de citocinas intracelulares e avaliação do perfil dessas citocinas em células TCD8<sup>bright+/dim+</sup> de pacientes e controles sob estímulo específico de *M. leprae*

Foi avaliado o perfil de produção intracelular das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , e anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 nas células TCD8<sup>dim+/bright+</sup> dos indivíduos acometidos com hanseníase e controles saudáveis, estimuladas por *M. leprae* ou não. A cinética de produção intracelular dessas citocinas avaliadas foi observada durante cinco dias de cultura, e cada citocina teve seu pico de produção intracelular verificada nos dias 1<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> dias após início da cultura.

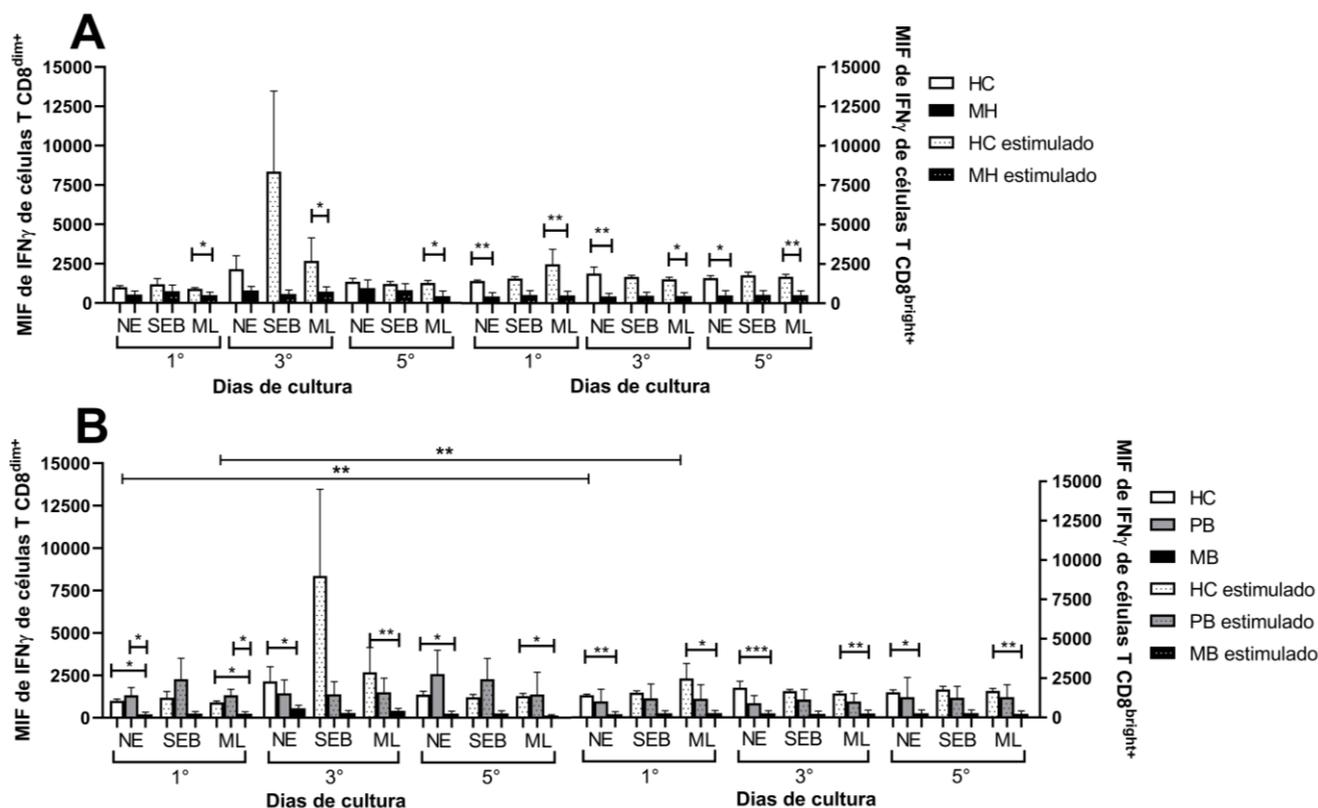
Ao analisarmos a citocina TNF- $\alpha$  observamos que no 1<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> dias, as células TCD8<sup>dim+/bright+</sup> apresentaram uma baixa produção dessa citocina, quando sem estímulo ou com estímulo específico, dos diferentes indivíduos acometidos pela hanseníase quando comparados aos controles saudáveis (**Figura 8A**). Ao agruparmos os indivíduos conforme a classificação da OMS, observamos no 1<sup>o</sup> dia de cultura que, nas células T CD8<sup>dim+</sup> essa redução era significativa nos indivíduos das formas multibacilares quando comparado aos controles saudáveis e aos indivíduos do grupo paucibacilar, quando não estimulados ou sob estímulo por *M. leprae* (**Figura 8B**). De forma similar no 3<sup>o</sup> dia, nos linfócitos T CD8<sup>bright+</sup> observamos que os indivíduos multibacilares também apresentaram essa marcada redução na produção de TNF- $\alpha$ , quando comparados aos controles saudáveis (**Figura 8B**). Podemos também observar que no 3<sup>o</sup> dia de cultura, as células dos indivíduos acometidos por hanseníase apresentam uma tentativa de elevar a produção de TNF- $\alpha$  nos linfócitos TCD8<sup>dim+</sup> comparados aos controles saudáveis e que seriam os indivíduos das formas mais brandas que estariam sendo responsáveis por essa produção (**Figura 8A e B**), e quando analisamos o 5<sup>o</sup> dias de acordo com a classificação da OMS, podemos observar que tanto nos linfócitos TCD8<sup>dim+/bright+</sup> os indivíduos da forma multibacilar apresentam essa redução na produção da citocina TNF- $\alpha$  quando comparados aos controles saudáveis (**Figura 8B**) mesmo quando não estão sob estímulo antigênico inespecífico (SEB) ou específico por *M. leprae* (ML). E ao avaliarmos numa comparação intergrupo, percebemos que os linfócitos T CD8<sup>dim+</sup> dos indivíduos multibacilares e no 5<sup>o</sup> dia de cultura apresentam um aumento da produção de TNF- $\alpha$  quando comparados aos linfócitos T CD8<sup>bright+</sup> nos mesmos indivíduos no 5<sup>o</sup> dia com estímulo específico por ML. Ao olharmos para o estímulo inespecífico (SEB)

percebemos que os pacientes das formas paucibacilares apresentam uma resposta maior, ou seja, uma maior produção de TNF- $\alpha$ , quando comparados aos multibacilares e controles saudáveis (**Figura 8**). De forma geral, isso nos mostra que os indivíduos quando acometidos pela hanseníase mesmo tendo uma redução na produção de TNF- $\alpha$  quando comparados aos controles, exibem o perfil de linfócitos T CD8<sup>dim+</sup> de pacientes paucibacilares como o produtor de TNF- $\alpha$  quando comparados ao grupo multibacilar no 1º dia de cultura, e além disso os linfócitos T CD8<sup>dim+</sup> apresentam a produção de TNF- $\alpha$  no 5º dia de cultura nos pacientes acometidos pelas diferentes formas clínicas da hanseníase comparados aos linfócitos T CD8<sup>bright+</sup>; colocando assim os linfócitos T CD8<sup>dim+</sup> como os produtores de TNF- $\alpha$  na infecção por *M. leprae*.



**Figura 8. Cinética de produção da citocina TNF- $\alpha$  em cultura celular de PBMC sob estímulo antigênico por *M. leprae*. A - Classificação categórica quanto ao acometimento ou não da doença, **NE**- poço de células não estimuladas, **SEB**- poço com estimulação antigênica por SEB (*Staphylococcus aureus*, *Enterotoxin Type B*) e **ML**- poço com estimulação por *M. leprae* irradiado. Onde **HC**- controle saudável e **MH**- indivíduos acometidos com os diferentes tipos de formas clínicas da hanseníase. **B** - Classificação segundo a OMS, onde **HC**- controles saudáveis, **PB**- indivíduos paucibacilares e **MB**- indivíduos multibacilares. Os valores de p, foram usados como: \*, onde  $p < 0,05$ ; \*\*=  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*=  $p \leq 0,0001$  e \*\*\*\*=  $p \leq 0,00001$ . Os dados são representados como médias de intensidades de fluorescências (MIF)  $\pm$  erro padrão da média (SEM) e analisados usando o teste estatístico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn e teste U de Mann Whitney.**

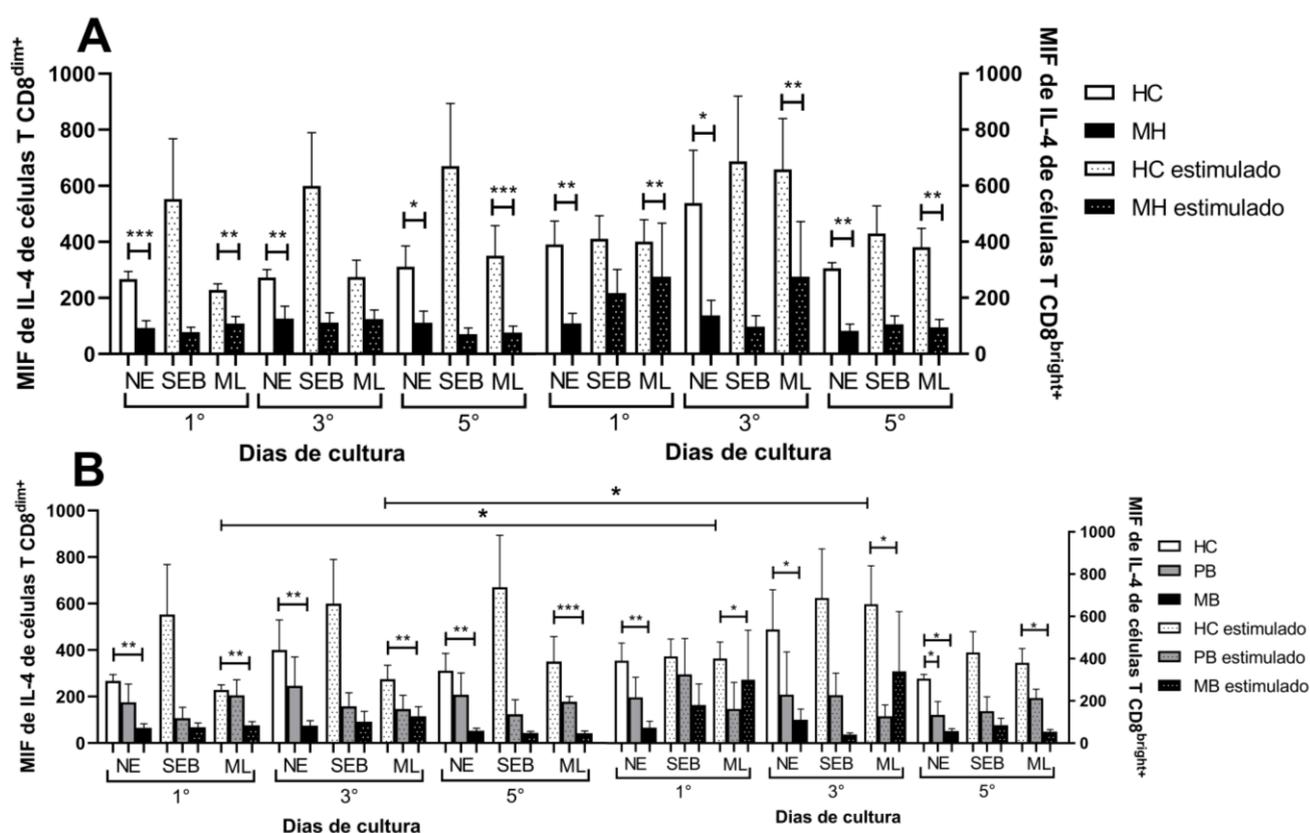
Em relação a produção de IFN- $\gamma$  observamos que, os indivíduos acometidos pelas diferentes formas clínicas da hanseníase apresentaram baixa produção de IFN- $\gamma$  nos linfócitos TCD8<sup>dim+</sup> quando comparados aos controles saudáveis, quando estimulados por *M. leprae* (**Figura 9A**), ao segregarmos de acordo com a OMS, observamos no 1° dia que os indivíduos das formas multibacilares apresentaram uma redução dos níveis de IFN- $\gamma$  quando comparados aos controles saudáveis e indivíduos paucibacilares, quando não são estimuladas ou sob estímulo específico (ML) (**Figura 9B**). Quando avaliamos os linfócitos TCD8<sup>bright+</sup>, em todos os marcos de dias da cultura os indivíduos acometidos pelas diferentes formas clínicas da hanseníase apresentaram baixa produção de IFN- $\gamma$  quando não estimulados ou sob estímulo específico (ML) quando comparados aos controles saudáveis (**Figura 9A**). Notamos que essa redução na produção dessa citocina está nos indivíduos multibacilares quando não estimulados e sob o estímulo por *M. leprae* quando comparados aos controles (**Figura 9B**). Quando analisados intergrupo, percebemos que os controles saudáveis, apresentam um aumento na produção de IFN- $\gamma$  na população de células *bright+* quando comparados aos linfócitos do perfil *dim+*. Ao analisarmos a produção dessa citocina quando estimuladas com SEB, percebemos que os indivíduos controles tiveram seu pico de produção no 3° dia, pelas células T CD8<sup>dim+</sup>; e já nos pacientes, observamos que os linfócitos T CD8<sup>dim+</sup> apresentam aumento na produção de IFN- $\gamma$  do 1° ao 5° dia de cultura (**Figura 9B**). Dessa forma, os linfócitos T CD8<sup>dim+</sup> parecem direcionar o perfil de produção de IFN- $\gamma$  nos indivíduos das formas paucibacilares, enquanto os T CD8<sup>bright+</sup> são baixos produtores dessa citocina na hanseníase.



**Figura 9. Cinética de produção da citocina IFN- $\gamma$  em cultura celular de PBMC sob estímulo antigênico por *M. leprae*.** **A** - Classificação categórica quando ao acometimento ou não da doença, **NE**- poço de células não estimuladas, **SEB**- poço com estimulação antigênica por SEB (*Staphylococcus aureus*, Enterotoxin Type B) e **ML**- poço com estimulação por *M. leprae* irradiado. Onde HC- controle saudável e MH- indivíduos acometidos com os diferentes tipos de formas clínicas da hanseníase. **B** - Classificação segundo a OMS, **HC**- controles saudáveis, **PB**- indivíduos paucibacilares e **MB**- indivíduos multibacilares. Os valores de p, foram usados como: \*, onde  $p < 0,05$ ; \*\*=  $p \leq 0,001$  e \*\*\*=  $p \leq 0,0001$ . Os dados são representados como médias de intensidades de fluorescências (MIF)  $\pm$  erro padrão da média (SEM) e analisados usando o teste estatístico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn e teste U de Mann Whitney.

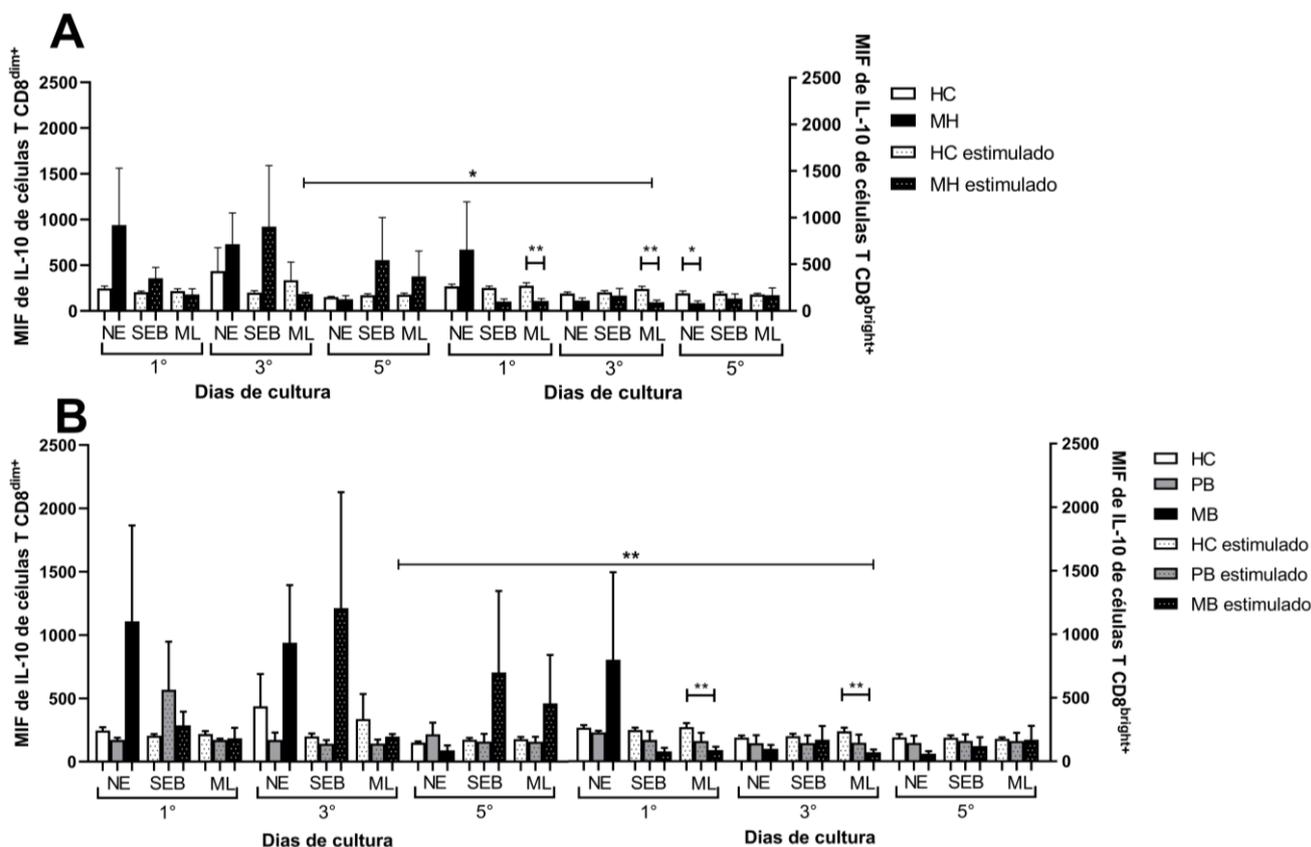
A produção de IL-4 também foi avaliada, e quando analisamos, podemos notar que os linfócitos TCD8<sup>dim+/bright+</sup> apresentam uma redução dessa citocina, quando comparamos os indivíduos acometidos com a hanseníase e controles saudáveis, tanto sob estímulo específico (ML) ou sem estímulo (**Figura 10A**). Observamos ainda que os indivíduos das formas multibacilares, mostraram ser o grupo de menor produção dessa citocina, tanto quando não estimuladas ou sob estímulo específico (ML) (**Figura 10B**). E podemos também observar no 1° dia de cultura que essa redução da produção de IL-4 que também se mostrou nos linfócitos TCD8<sup>bright+</sup>, porém de forma menos discrepante nos indivíduos acometidos pela doença, ou nas formas multibacilares, quando comparados aos controles saudáveis, sob estímulo por ML

(Figura 10B). Quando avaliamos intergrupos, percebemos maior produção de IL-4 nos indivíduos controles saudáveis, quando estimulados por ML no 1° e 3° dias de cultura, no perfil de célula T CD8<sup>bright+</sup> quando comparados com T CD8<sup>dim+</sup>. A mesma resposta ocorre nos indivíduos quanto ao estímulo não específico por SEB, em que o perfil de células T CD8<sup>bright+</sup> também se mantém como maior produtor de IL-4 quando comparados com os T CD8<sup>dim+</sup>, porém isso acontece nos pacientes das formas paucibacilares (Figura 10B). Logo, o perfil de linfócitos T CD8<sup>bright+</sup> produz maiores níveis de IL-4 durante os dias de cultura nos indivíduos acometidos por hanseníase, no polo multibacilar da doença.



**Figura 10. Cinética de produção da citocina IL-4 em cultura celular de PBMC sob estímulo antigênico por *M. leprae*.** **A** - Classificação categórica quando ao acometimento ou não da doença, **NE**- poço de células não estimuladas, **SEB**- poço com estimulação antigênica por SEB (*Staphylococcus aureus*, *Enterotoxin Type B*) e **ML**- poço com estimulação por *M. leprae* irradiado. Onde **HC**- controle saudável e **MH**- indivíduos acometidos com os diferentes tipos de formas clínicas da hanseníase. **B** - Classificação segundo a OMS, **HC**- controles saudáveis, **PB**- indivíduos paucibacilares e **MB**- indivíduos multibacilares. Os valores de p, foram usados como: \*, onde p < 0,05; \*\*= p ≤ 0,001 e \*\*\*= p ≤ 0,0001. Os dados são representados como médias de intensidades de fluorescências (MIF) ± erro padrão da média (SEM) e analisados usando o teste estatístico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn e teste U de Mann Whitney.

A produção de IL-10 mostrou-se diminuída no 1° e 3° dias somente nos linfócitos TCD8<sup>bright+</sup> quando estimulados por *M. leprae* de indivíduos acometidos com hanseníase, quando comparados aos controles saudáveis (**Figura 11A**) e no 5° dia quando não estimulados; e essa redução foi observada nas formas multibacilares no 1° e 3° dias de cultura, quando comparados aos controles saudáveis (**Figura 11B**). Porém quando avaliamos os grupos de linfócitos *dim+* versus os *bright+*, podemos perceber que os linfócitos T CD8<sup>dim+</sup> apresentam uma produção de IL-10 maior no 3° dia de cultura do que o perfil CD8<sup>bright+</sup>, porém esse aumento não é específico ao estímulo, já que ao olharmos o mesmo dia com estímulo de SEB, também podemos inferir que houve um aumento na produção de IL-10 quando sob esse estímulo antigênico. Contudo podemos observar uma leve tendência de elevação dos níveis de IL-10 nos indivíduos acometidos por hanseníase com formas multibacilares comparados aos controles e àqueles com formas paucibacilares, quando sem estímulo no 1° e 3° dias nos linfócitos TCD8<sup>dim+</sup> e de mesmo modo no 1° dia nos linfócitos TCD8<sup>bright+</sup> (**Figura 11A e B**). Dessa forma, existe um nível basal de produção de IL-10 nos linfócitos T CD8<sup>dim+</sup>, o que precisa ser avaliado com uma quantidade de pacientes maior, para que o poder estatístico possa aumentar e efetivar essa tendência em produção de IL-10 por esse perfil de células.

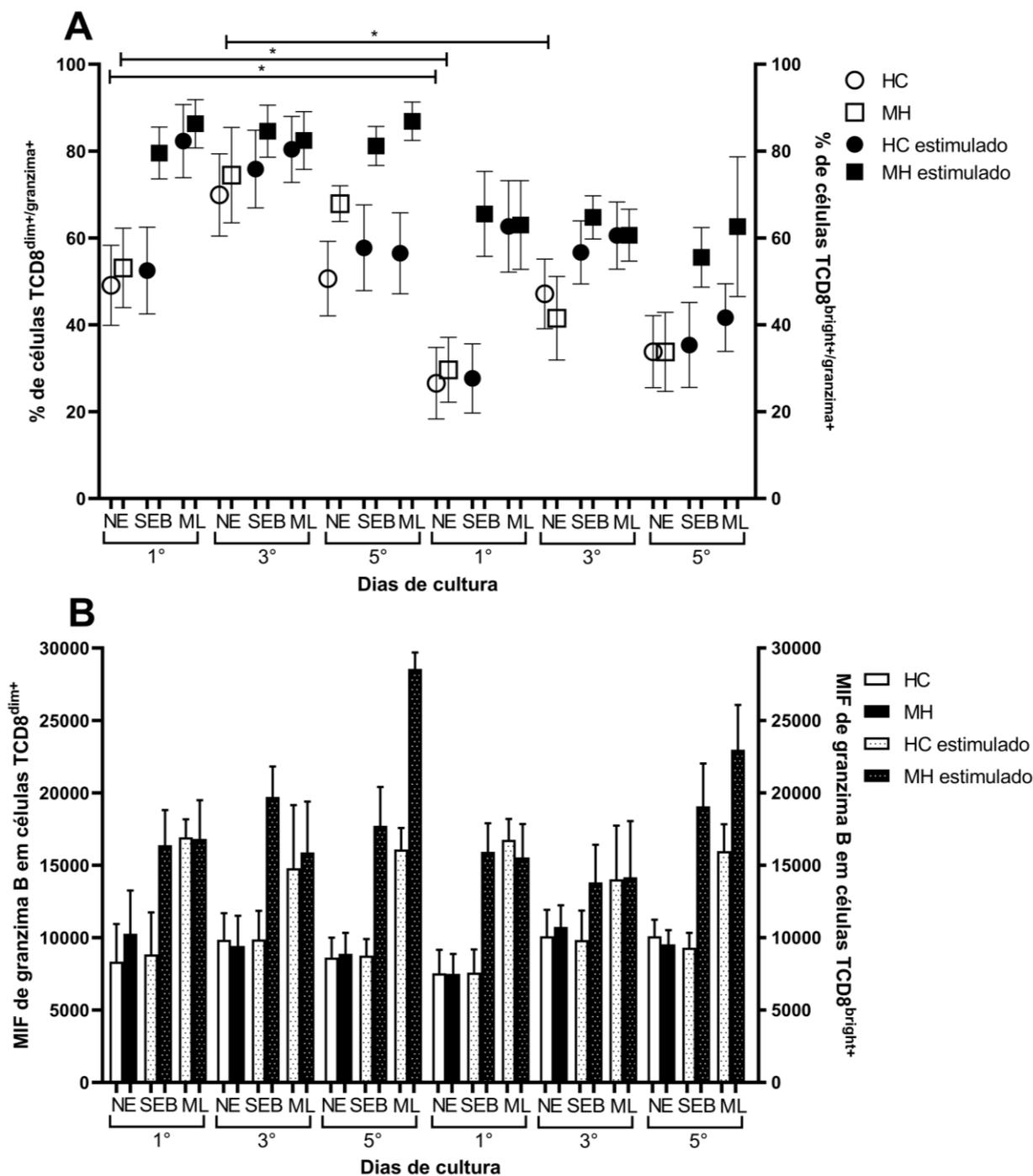


**Figura 11. Cinética de produção da citocina IL-10 em cultura celular de PBMC sob estímulo antigênico por *M. leprae*.** **A** - Classificação categórica quando ao acometimento ou não da doença, **NE**- poço de células não estimuladas, **SEB**- poço com estimulação antigênica por SEB (*Staphylococcus aureus*, *Enterotoxin Type B*) e **ML**- poço com estimulação por *M. leprae* irradiado. Onde **HC**- controle saudável e **MH**- indivíduos acometidos com os diferentes tipos de formas clínicas da hanseníase. **B** - Classificação segundo a OMS, **HC**- controles saudáveis, **PB**- indivíduos paucibacilares e **MB**- indivíduos multibacilares. Os valores de p, foram usados como: \*, onde  $p < 0,05$ ; \*\*=  $p \leq 0,001$  e \*\*\*=  $p \leq 0,0001$ . Os dados são representados como médias de intensidades de fluorescências (MIF)  $\pm$  erro padrão da média (SEM) e analisados usando o teste estatístico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn e teste U de Mann Whitney.

## 6.6 Análises da cinética de produção de grânulos intracelulares por células TCD8<sup>dim+/bright+</sup> de pacientes com hanseníase estimulados por *M. leprae*.

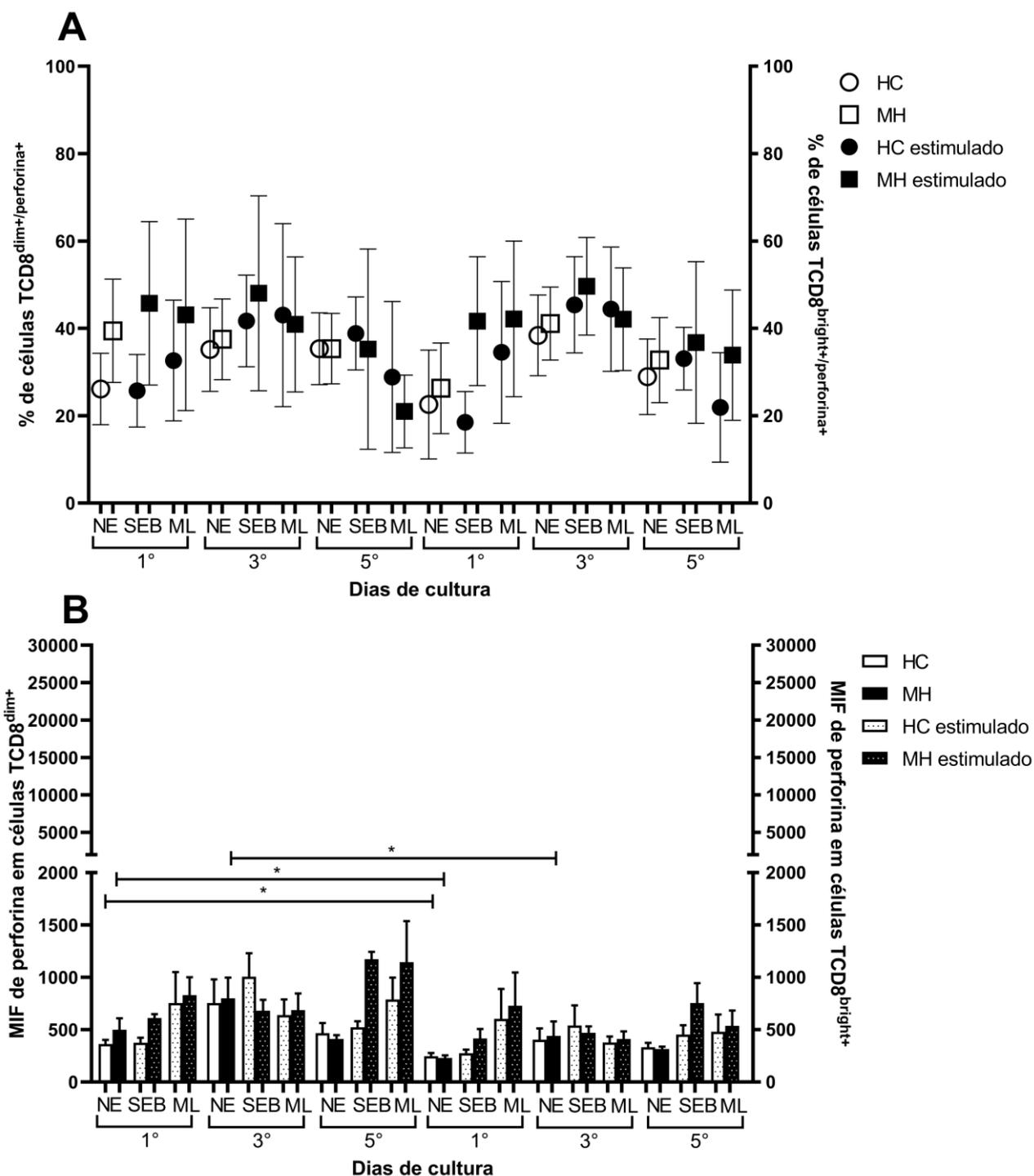
Os grânulos citotóxicos produzidos foram avaliados em termos de percentual de células TCD8<sup>+</sup> que expressam e de quantidade de proteínas intracelulares produzidas em cada subpopulação desses linfócitos sob diferentes estímulos antigênicos. Podemos perceber que o percentual de linfócitos T CD8<sup>dim+</sup> que expressam granzima B, apresentam um aumento em relação aos linfócitos T CD8<sup>bright+</sup> no 1° e 3° dias, quando não estão sob estímulos antigênicos (**Figura 12A**). Ao analisarmos a quantidade desses grânulos intracelulares nessa mesma subpopulação

de linfócito (T CD8<sup>dim+</sup>), observamos que no 5° dia de cultura, sob estímulo específico (ML), os pacientes acometidos pelas diferentes formas clínicas da hanseníase, apresentam um aumento na quantidade de granzima B quando comparados aos controles saudáveis (**Figura 12B**). Ao avaliarmos o estímulo inespecífico (SEB) observamos que tanto nos linfócitos T CD8<sup>dim+</sup> e CD8<sup>bright+</sup> apresentam seu pico de produção de granzima B no 3° dia de cultura sob este estímulo (**Figura 12**). Dessa forma, podemos entender que os linfócitos TCD8<sup>dim+</sup> apresentam o perfil de expressão de granzima B no espectro da hanseníase; e os TCD8<sup>bright+</sup> não exibem essa característica na doença.



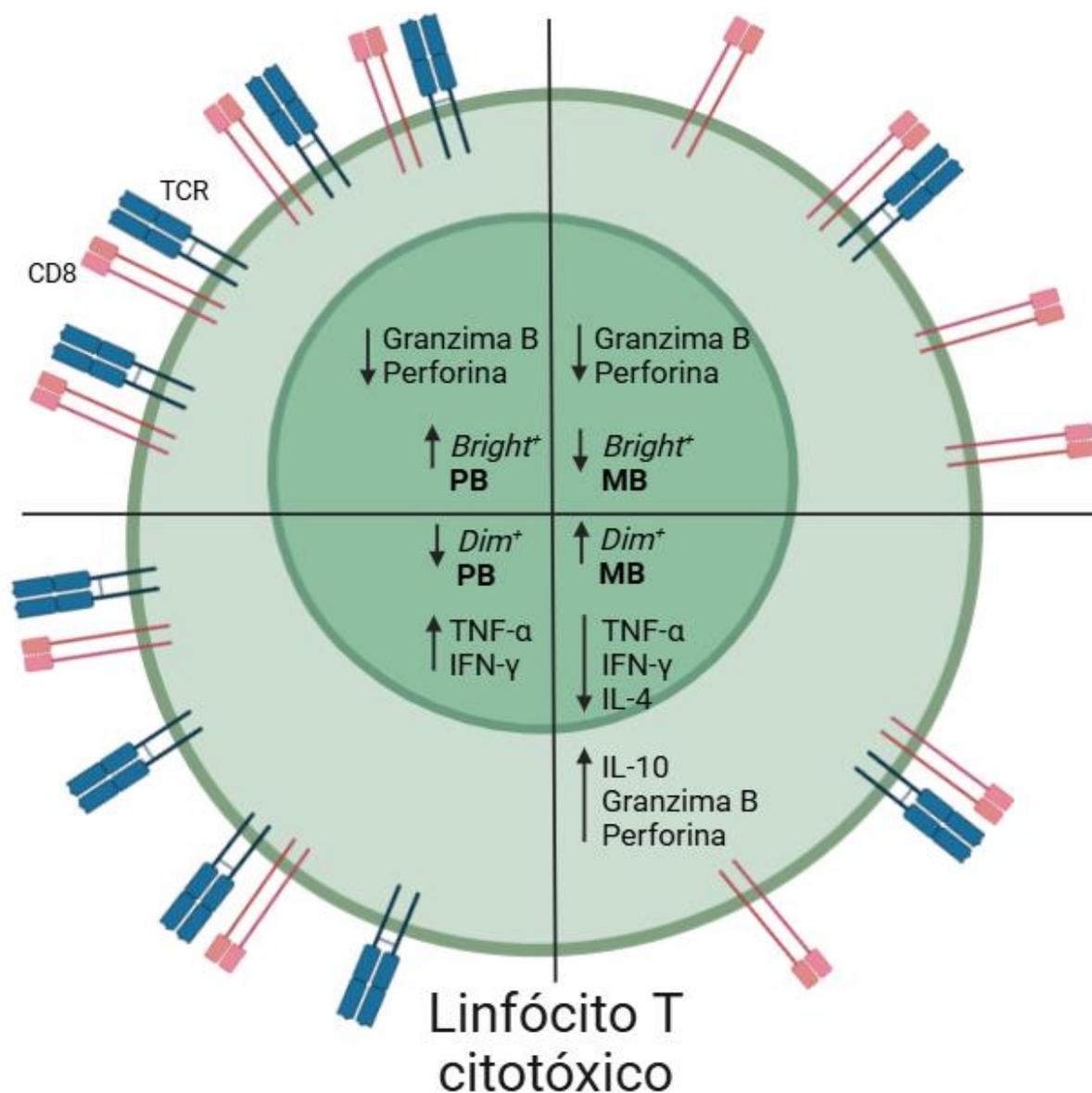
**Figura 12. Expressão e produção de granzima B nos linfócitos T CD8<sup>dim+</sup>/bright+ em cultura celular sob estímulo antigênico por *M. leprae*. A - Porcentagem de linfócitos T CD8<sup>dim+</sup> e T CD8<sup>bright+</sup> que produzem granzima B. B - MIF de granzima B sobre os linfócitos T CD8<sup>dim+</sup> e T CD8<sup>bright+</sup>. Classificação categórica quando ao acometimento ou não da doença, **HC**- controle saudável e **MH**- indivíduos acometidos com os diferentes tipos de formas clínicas da hanseníase. **NE**- poço sem estímulo, **SEB**- poço com estímulo por SEB e **ML**- poço com estímulo por *M. leprae* irradiado. Os dados são representados como médias de intensidades de fluorescências  $\pm$  erro padrão da média (SEM) e analisados usando o teste estatístico U de Mann Whitney.**

Ao analisarmos o perfil de produção de perforina nos perfis de linfócitos T CD8<sup>dim+</sup> e T CD8<sup>bright+</sup> observamos que não há diferença estatística sobre o número de células que expressão esse grânulo durante os dias de cultura com estimulação antigênica por SEB ou ML (**Figura 13A**). Porém ao avaliarmos a quantidade de produção de perforina nos perfis de linfócitos T CD8<sup>dim+</sup> e T CD8<sup>bright+</sup> observamos que o média de intensidade de fluorescência (MIF) do perfil de célula T CD8<sup>dim+</sup> dos indivíduos controles saudáveis e das diferentes formas clínicas da hanseníase apresentaram um aumento em relação ao perfil T CD8<sup>bright+</sup> no 1º dia de cultura, quando não estimulados; e já no 3º dia somente os indivíduos acometidos pela doença, apresentaram essa elevação na produção de perforina nos linfócitos T CD8<sup>dim+</sup> comparados aos linfócitos T CD8<sup>bright+</sup> quando não estimulados (**Figura 13B**). Além disso, podemos também notar que o perfil de células T CD8<sup>dim+</sup> tendem a aumentar a produção desse grânulo ao longo dos dias de cultura e o perfil T CD8<sup>bright+</sup> em diminuir e só voltar a aumentar no 5º dia, quando estimulados por ML. Quando observamos a produção de perforina sob estímulo por SEB, podemos perceber que o pico de produção da mesma, se deu no 3º dia do perfil T CD8<sup>dim+</sup> e 5º dia no perfil T CD8<sup>bright+</sup> (**Figura 13B**). Esses dados mostram que o perfil de célula T CD8<sup>dim+</sup> está atrelado à produção de grânulos citotóxicos na hanseníase, enquanto o perfil T CD8<sup>bright+</sup> apresenta baixa produção de perforina.



**Figura 13. Expressão e produção de perforina nos linfócitos T CD8<sup>dim+/bright+</sup> em cultura celular sob estímulo antigênico por *M. leprae*.** **A** - Porcentagem de linfócitos T CD8<sup>dim+</sup> e T CD8<sup>bright+</sup> que produzem perforina. **B** - MIF de perforina sobre os linfócitos T CD8<sup>dim+</sup> e T CD8<sup>bright+</sup>. Classificação categórica quando ao acometimento ou não da doença, **HC**- controle saudável e **MH**- indivíduos acometidos com os diferentes tipos de formas clínicas da hanseníase. **NE**- poço sem estímulo, **SEB**- poço com estímulo por SEB e **ML**- poço com estímulo por *M. leprae* irradiado. Os dados são representados como médias de intensidades de fluorescências  $\pm$  erro padrão da média (SEM) e analisados usando o teste estatístico U de Mann Whitney.

O resumo esquemático apresentado na **figura 14**, elucida e agrupa nossos principais achados em relação aos perfis de células T  $CD8^{\text{bright+}/\text{dim+}}$  nos diferentes indivíduos acometidos pela hanseníase.



**Figura 14.** Resumo esquemático dos principais achados relacionados aos perfis de células T  $CD8^{\text{bright+}/\text{dim+}}$  nos indivíduos acometidos pela hanseníase, destacando as diferenças observadas entre os grupos paucibacilares e multibacilares.

## 7. DISCUSSÃO

No nosso estudo, observamos linfócitos T CD8<sup>bright+</sup> e CD8<sup>dim+</sup> em pacientes com hanseníase, com a porcentagem delas variando entre as formas clínicas da doença. Adicionalmente, as células T CD8<sup>dim+</sup> parecem dirigir o espectro de gravidade da doença, já que a porcentagem dessas células está aumentada nos casos multibacilares (**Figura 5**). Na literatura as células CD8<sup>bright+</sup> foram relatadas como apresentando uma maior capacidade de controlar a viremia do HIV em comparação com as células CD8<sup>dim+</sup> (ELLER *et al.*, 2016). Além disso, as células T CD8<sup>dim+</sup> foram associadas à carga viral do HIV, significando que uma maior carga viral correspondia a uma quantidade aumentada dessas células (ELLER *et al.*, 2016). Subpopulações de células T CD8<sup>dim+</sup> também foram documentadas com um papel em mecanismos que inibem a resposta imune celular ou nas estratégias de evasão dos microrganismos durante a infecção pelo vírus da imunodeficiência felina (FIV) (GEBHARD *et al.*, 1999). Outro estudo mostrou células T CD8<sup>dim+</sup> na infecção por esporotricose em gatos, onde os níveis elevados dessas células foram correlacionados com uma maior carga fúngica, indicando também que esse grupo de células está associada à falta de controle sobre a esporotricose e à gravidade da condição clínica (MIRANDA *et al.*, 2013; MIRANDA *et al.*, 2016). No entanto, em nossos dados, essa exposição prolongada ao antígeno não pode ser correlacionada à carga bacteriana, uma vez que os dois polos da doença podem ter uma alta frequência de células T CD8<sup>dim+</sup>, mesmo com baixa carga bacteriana (**Figura 6**). Dado isso, pensamos que essas células podem ser influenciadas por outros mecanismos imunológicos, como a idade do indivíduo e a senescência celular natural em resposta à infecção por *M. leprae*.

Um outro exemplo é o aumento das células T CD8<sup>dim+</sup> circulantes entre pacientes com HBV crônico, em que pacientes com maior duração da doença tendem a exibir uma maior frequência de células T CD8<sup>dim+</sup> (OUYANG *et al.*, 2013). Essas células exibem sensibilidade reduzida ao antígeno e possuem a capacidade de inibir a responsividade de suas contrapartes CD8<sup>bright+</sup>, potencialmente alcançada através da produção de TGF- $\beta$  (MAILE *et al.*, 2006). No estudo de CLUTTON e colaboradores em 2022, as células T CD8<sup>dim+</sup> foram associadas a uma frequência aumentada, sinais de senescência (CD57) e alterações mitocondriais em indivíduos afetados pelo HIV sob terapia antirretroviral (CLUTTON *et al.*, 2022). Nossos dados indicam que a população expandida de células T CD8<sup>dim+</sup> está associada ao polo MB e não

apresenta relação com pacientes idosos (E) (**Figuras 5 e 7**), sugerindo uma população celular ineficaz no controle da infecção por *M. leprae*. Essa ineficiência pode estar ligada a mecanismos associados à senescência das células CD8, anergia do sistema imunológico e ao processo de envelhecimento no contexto da infecção.

Assim, a função citotóxica das células T CD8<sup>+</sup> poderia estar ligada à população de células CD8<sup>bright+</sup>, enquanto as células CD8<sup>dim+</sup> poderiam apresentar uma funcionalidade comprometida em relação a produção de citocinas pró-inflamatórias e citotoxicidade. Essas descobertas podem direcionar para outros mecanismos pelos quais patógenos intracelulares manipulam a resposta imune do hospedeiro para melhorar sua sobrevivência e proliferação dentro das células hospedeiras.

O processo de envelhecimento leva a inúmeras adaptações nos sistemas imunológicos inato e adaptativo, resultando em uma resposta vacinal reduzida, maior suscetibilidade a infecções e uma maior incidência de câncer (MCELHANEY; EFFROS, 2009). Embora essas alterações estejam relacionadas às respostas imunológicas mediadas por células T, os mecanismos pelos quais aumentam a suscetibilidade a doenças infecciosas permanecem desconhecidos (HAKIM; GRESS, 2007). Esses fatores foram investigados recentemente em indivíduos idosos afetados pela infecção por SARS-CoV-2 (CUNHA *et al.*, 2020). Embora *M. leprae* possa infectar muitas pessoas, apenas uma minoria desenvolve a doença (SCOLLARD *et al.*, 2006), os fatores por trás do início tardio da doença associado às mudanças nas subpopulações de linfócitos T permanecem obscuros. Em nossos dados, encontramos uma predominância de formas multibacilares (76,8%) sobre formas paucibacilares (23,2%) da doença, com uma notável preponderância da forma clínica dimórfica (56,6%) (**Tabela 1**). Esta descoberta é consistente com o estudo de Vieira e colaboradores em 2014, que relataram em seu estudo uma maior prevalência da forma dimórfica em todas as faixas etárias, correspondendo a 42,2% dos casos.

A maior prevalência da hanseníase MB em homens já foi descrita anteriormente, mostrando um aumento progressivo com a idade (OLIVEIRA *et al.*, 2009; NOBRE *et al.*, 2017). Modelos experimentais de patógenos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis* (SNIDER *et al.*, 2009), *Leishmania* (BINI *et al.*, 2014) e *Paracoccidioides brasiliensis* (PINZAN *et al.*, 2010) mostraram que a testosterona pode elevar os níveis de citocinas anti-inflamatórias Th2, como IL-10 e IL-4, enquanto o estrogênio induz uma resposta Th1, incluindo IL-2 e IFN- $\gamma$ . Essas descobertas

podem explicar a maior suscetibilidade dos homens ao desenvolvimento da forma multibacilar (65,21%) da hanseníase em nossos dados (**Tabela 1**).

O TNF- $\alpha$  é um mediador pró-inflamatório potente, capaz de amplificar a resposta lítica contra patógenos e promover a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, desempenhando um papel crucial na defesa imunológica (DE LIMA SILVEIRA *et al.*, 2015). Em nossos resultados observamos que indivíduos das formas paucibacilares, sem estímulo apresentam níveis elevados de TNF- $\alpha$  sobre os linfócitos TCD8<sup>dim+</sup> quando comparados aos das formas multibacilares (**Figura 8B**), e o aumento dessa citocina já foi reportado na literatura, uma vez que os pacientes diagnosticados com a forma tuberculoide da hanseníase apresentam uma elevação de produção nos níveis de TNF- $\alpha$  (DE LIMA SILVEIRA *et al.*, 2015), o que evidencia o papel dessa citocina na resposta imunológica pró-inflamatória característica dessa manifestação clínica. Ao contrário do observado nos indivíduos das formas multibacilares, os quais apresentaram baixa produção de TNF- $\alpha$  tanto nos linfócitos T CD8<sup>dim+</sup> quando nos CD8<sup>bright+</sup> (**Figura 8B**).

A presença de IFN- $\gamma$  é absolutamente essencial no combate às infecções por micobactérias, devido à sua capacidade de regular diversas funções protetoras e de sustentar a atividade das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (GREEN; DIFAZIO; FLYNN, 2013). Em nossos resultados, observamos que o pico de produção de IFN- $\gamma$  intracelular se deu no 1º dia de cultura (**Figura 9B**), onde os indivíduos com hanseníase, sendo das formas multibacilares, apresentam uma redução na produção de IFN- $\gamma$ , e os paucibacilares um aumento na produção dessa citocina, o que é similar a literatura (YAMAMURA *et al.*, 1991). Em pacientes paucibacilares, há uma expressão predominante de IFN tipo II (IFN- $\gamma$ ), o que leva à ativação de genes antimicrobianos que impedem a propagação de micobactérias. Em contraste, pacientes multibacilares apresentam uma maior ativação do IFN- $\beta$  (TELES *et al.*, 2013). A resposta mediada por IFN- $\beta$  pode desencadear a ativação de IL-10, dependente de IL-27, um mecanismo imunossupressor bem documentado na hanseníase, que favorece o crescimento e a disseminação das micobactérias (TELES *et al.*, 2015). Adicionalmente os linfócitos T CD8<sup>dim+</sup> apresentaram redução na expressão de IFN- $\gamma$  nos indivíduos acometidos por hanseníase (**Figura 9**) o que leva o curso clínico para o polo mais severo da doença, já que o IFN- $\gamma$  em outra micobacteriose como a tuberculose, tem a marca registrada de induzir resposta imune celular e de inflamação

orquestrada por IFN- $\gamma$  (FLYNN; CHAN, 2001). Uma explicação é que a perda de CD8 na superfície dos linfócitos T afeta negativamente a citotoxicidade e a produção de IFN- $\gamma$  (KIENZLE *et al.*, 2005).

A citocina IL-4 desempenha um papel central na diferenciação das células Th2, que são fundamentais no controle de infecções por parasitas extracelulares e na mediação de respostas alérgicas (PAUL; ZHU, 2010; PAUL, 2015). Além disso, essa citocina pode induzir a polarização de macrófagos para o perfil M2, contribuindo para o controle da infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (WIRTH; KIERSZENBAUM; ZLOTNIK, 1989). SIELING e colaboradores em 1993, mostraram que células T CD8<sup>+</sup> de pacientes com hanseníase wirchowiana demonstraram a capacidade de suprimir as respostas de células T CD4<sup>+</sup>, em parte, por meio da liberação de IL-4. Em nossos resultados, vimos que no primeiro dia de cultura sob estímulo, as células T CD8<sup>dim+</sup> apresentaram uma marcada redução na produção de IL-4, o que levaria a uma menor diferenciação para o perfil Th2 (**Figura 10**). No estudo de KIENZLE e colaboradores em 2005, foi demonstrado que células T CD8<sup>+</sup> *naïve* possuem a capacidade de diferenciar-se em células T CD8<sup>dim+</sup> e que há probabilidade dessa escolha ser modulada por citocinas como a IL-4, ou até mesmo pela exposição a antígenos. Em camundongos cronicamente infectados com *Trypanosoma cruzi*, a maioria das células T CD8 específicas para o parasita apresentou redução na expressão de CD8 e TCR na superfície (GRISOTTO *et al.*, 2001). Da mesma forma, células T CD8<sup>dim+</sup> foram detectadas no baço de camundongos infectados com *Echinococcus multilocularis* (KIZAKI *et al.*, 1991). Sendo assim esses estudos indicam que infecções crônicas e a persistência de antígenos são fatores relevantes para a diferenciação de células T CD8<sup>dim+</sup> já que na hanseníase, os indivíduos das formas multibacilares apresentam muitos bacilos nas lesões, logo a persistência do antígeno estaria contribuindo para essa polarização em células do perfil *dim*<sup>+</sup>.

Os linfócitos T CD8<sup>bright+</sup> apresentam uma leve tendência em produzir níveis mais elevados de IL-4 (**Figura 10B**), e essas células se apresentam em redução nos indivíduos multibacilares, o que poderia também estar atrelado ao fato da doença nesse polo ter muitos bacilos nas lesões, e o microambiente da cultura, estaria simulando a condição de exposição sucessivas por dias de cultura ou até mesmo as células apresentarem uma anergia. Já que esse processo ocorre, pois, a progressão da hanseníase na forma lepromatosa (LL) está associada a um comprometimento da resposta imunológica do hospedeiro, decorrente de mecanismos ainda não totalmente

elucidados, culminando na anergia celular específica direcionada ao *Mycobacterium leprae* (ROJAS-ESPINOSA, 2007); e nessa forma a anergia parece estar associada à ativação por componentes microbianos e ao comprometimento das vias responsáveis pela produção de IL-2, uma citocina essencial para a proliferação de células T. Em contraste, a anergia não é observada na forma tuberculoide, caracterizada por uma evolução menos agressiva da doença e, em muitos casos, regressão espontânea (DAGUR *et al.*, 2010; DAGUR *et al.*, 2012).

Ao avaliarmos a produção de IL-10, percebemos que a redução de IL-10 quando as células são estimuladas por *M. leprae* poderiam influenciar na expressão de TLRs, o que pode levar a uma menor contenção da infecção e influencie na progressão da doença, o que foi mostrado por KRUTZIK e colaboradores em 2003, onde o tipo de perfil de citocina, seja Th1 ou Th2 influencia no grau de ativação de TLRs em células dendríticas e monócitos nas lesões de indivíduos acometidos por hanseníase. No nosso trabalho, as citocinas produzidas pelos linfócitos T CD8<sup>bright</sup> e CD8<sup>dim</sup>, que são células que apresentam receptores do tipo *toll*, nos indivíduos das formas multibacilares, apresentam uma tendência de níveis mais altos de IL-10 basal (**Figura 11**) e quando estimulados por 5 dias, aumentam a expressão dessa citocina (**Figura 11A**), esse perfil pode estar direcionando a infecção para o polo mais severo da doença, já que TLR1-TLR2 são inibidos por IL-10, e esse tipo de receptor reconhece lipopeptídeos bacterianos e impulsiona uma resposta anti-inflamatória que sustenta a infecção, reduzindo a inflamação e a geração de imunidade adaptativa, fornecendo assim um nicho para a sobrevivência e persistência do patógeno (TAKEUCHI *et al.*, 2002 e CYKTOR; TURNER, 2011). A secreção de IL-10 desempenha um papel crucial na modulação da resposta inflamatória, reduzindo diretamente a produção de TNF e, conseqüentemente, minimizando a inflamação e a morte celular associada. Esse mecanismo tem sido observado em infecções por diversos patógenos, como *Toxoplasma gondii* (GAZZINELLI *et al.*, 1996) e *Trypanosoma cruzi* (HÖLSCHER *et al.*, 2000). Em condições normais, essas infecções promovem um aumento na produção de TNF e quimiocinas, levando ao recrutamento de neutrófilos e à morte celular por apoptose ou necrose. No entanto, sem a modulação exercida pela IL-10, esses processos podem resultar em danos teciduais severos (CYKTOR; TURNER, 2011). Em nossos resultados, na presença de IL-10, os linfócitos T CD8<sup>bright+</sup> e CD8<sup>dim+</sup>, apresentam uma baixa produção de TNF nos indivíduos acometidos por hanseníase e do grupo multibacilar (**Figura 8**), o que

estaria levando a uma resposta pro polo anti-inflamatório e deixando de exercer sua função de induzir morte celular mediada por TNF, deixando assim de conter a disseminação do bacilo e levando a danos nas lesões de indivíduos acometidos por *M. leprae*.

As granzimas são serina-proteases presentes na forma de grânulos citotóxicos. Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> (citotóxicos) e as células NK são conhecidos por sua capacidade de produção de granzimas. Essas células utilizam a via perforina/granzima como um dos principais mecanismos para eliminar células infectadas por patógenos e células tumorais (GROSSMAN *et al.*, 2004). Um dos mecanismos que elas desempenham é papel crucial no processo de apoptose, sendo responsável pela fragmentação do DNA, um marcador característico dessa via de morte celular. Um estudo envolvendo a purificação da granzima B nativa de células natural killer (NK) de ratos demonstraram que essa protease, ao ser transportada pela perforina, induz efetivamente a fragmentação do DNA nas células-alvo (SHI *et al.*, 1992). Essa função apoptótica foi confirmada para as variantes humana e murina da granzima B, utilizando tanto a forma nativa quanto a recombinante da protease, entregues às células-alvo pela perforina; esse mecanismo ocorre durante a exocitose simultânea da perforina e da granzima, quando o linfócito citotóxico estabelece um conjugado funcional com a célula-alvo (CULLEN *et al.*, 2007; KAISERMAN *et al.*, 2006 e SUTTON *et al.*, 2000). Na nossa pesquisa os linfócitos T CD8<sup>dim+</sup> apresentaram variação no número de células que expressam granzima B e na produção de perforina (**Figura 12 e 13**), esse resultado inédito surpreende pois os indivíduos que não conseguem conter a infecção e desenvolvem a hanseníase, estão produzindo mais grânulos citotóxicos, do que os pacientes com a forma paucibacilar. Na literatura, esse aumento de granzima B por exemplo, se dá pelas CTLs adquirem maior expressão da proteína granzima B em condições pró-inflamatórias, sugerindo um possível mecanismo para a regulação positiva da função citotóxica (MELLOR-HEINEKE *et al.*, 2013), coincidentemente com a produção de granzimas na nossa pesquisa o perfil T CD8<sup>dim+</sup> apresenta maiores produções de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  no 1º dia de cultura (**Figura 8 e 9**), o que pode estar contribuindo para a elevação da expressão desse grânulo citotóxico. Porém, não há um controle do curso clínico da doença, uma vez que as funções dessas serino-proteases não estariam acontecendo ou não de forma suficiente, como por exemplo a indução de apoptose, e conseqüentemente o controle da infecção e espraiamento do bacilo, além disso esse grupo de células é aumentado

durante a infecção por *M. leprae* nos indivíduos multibacilares (**Figura 5**), que apresentam muitos bacilos nas lesões. No estudo de KIENZLE e colaboradores em 2005, a proliferação do perfil de células T CD8<sup>dim+</sup> se mostrou efetiva, quando na presença de IL-2, IL-4 e anti-IFN- $\gamma$ , o que gerava células com baixa expressão de grânulos citotóxicos como perforina, granzima B e C. Entretanto neste estudo observamos que o número de células produtoras de granzima B e quantidade de produção de perforina, foi maior nos indivíduos acometidos com as diferentes formas clínicas da hanseníase no 1° e 3° dias de cultura, sob essa subpopulação T CD8<sup>dim+</sup> (**Figura 12A e 13B**), e tal condição pode ter acontecido, já que ao longo do período de cultura, existe uma baixa produção de IL-4 nos mesmos indivíduos (**Figura 10A**).

Observamos que linfócitos T CD8<sup>bright+</sup> apresentaram baixa produção dessas serino-proteases, porém existe elevação ao longo dos dias de cultura, sendo o 5° dia para granzima B e 1° dia para a perforina (**Figura 12B e 13B**), porém não foi possível analisar na perspectiva da OMS, o que seria de grande elucidação para poder entender qual grupo estaria de fato sendo o maior produtor desses grânulos nos perfis de linfócitos T CD8<sup>dim+</sup> e CD8<sup>bright+</sup>. Durante o curso clínico da infecção o aumento de produção de granzima B e perforina pelas células *bright+* pode vir acontecer, uma vez que essas células foram apontadas como uma subpopulação de células T que em indivíduos infectados pelo HIV mostram-se significativamente mais eficazes na inibição da replicação viral, destacando seu papel central na resposta imunológica contra o vírus (ELLER *et al.*, 2016). Os indivíduos desta pesquisa com as formas mais severas da doença, apresentam uma redução no número desses linfócitos TCD8<sup>bright+</sup> (**Figura 5**), e levando em consideração que esse perfil pode no decorrer dos dias se tornar o produtor de granzima B e perforina, levaria esses indivíduos a terem um comprometimento da função de promover a morte das células infectadas, já que eles perdem essa subpopulação quando possuem as formas severas da hanseníase, o que agravaria mais a doença, e a não depuração de células infectadas por *M. leprae*. Ao contrário do que acontece com os indivíduos das formas paucibacilares (**Figura 5**), os quais apresentam um aumento de linfócitos T CD8<sup>bright+</sup> e estariam assim mais capazes de conter a infecção, dado a esse aumento a longo prazo na expressão desses grânulos citotóxicos, o que direcionaria às formas clínicas mais brandas.

Um das limitações do trabalho é a baixa representabilidade de grupos etários distintos, incluindo idosos, o que seria uma oportunidade de aprofundar o conhecimento sobre as relações entre idade, subpopulações de linfócitos T CD8<sup>dim+</sup> e

CD8<sup>bright+</sup> quanto a produção de citocinas e grânulos citotóxicos. Essa abordagem permitiria não apenas identificar possíveis alterações nos padrões desses perfis de linfócitos, mas também correlacioná-las com a gravidade da doença ou com seu curso clínico. Outra limitação está na não replicação do experimento de dosagem de citocinas e grânulos citotóxicos, uma vez que a amostra é toda processada e não existia sobra do material para uma possível replicação. E por fim outra limitação é a não informação sobre o início da doença nos pacientes, ou seja, o tempo de duração da doença, desde o primeiro sintoma, o que pode inclusive ser um fator determinante para a senescência celular.

## CONCLUSÃO

- Os pacientes das formas multibacilares apresentam uma redução no perfil de linfócitos T CD8<sup>bright+</sup> e aumento do perfil CD8<sup>dim+</sup>. O que nunca foi mostrado na hanseníase.
- Nossos dados indicam que as células T CD8<sup>dim+</sup> e as células T CD8<sup>bright+</sup> não estão associadas à maior carga bacteriana na hanseníase.
- A idade não influencia significativamente as subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> em pacientes com hanseníase, uma vez que observamos uma diminuição notável nas células T CD8<sup>bright+</sup> e um aumento nas células T CD8<sup>dim+</sup> em indivíduos idosos das formas multibacilares da doença, mas não quando desenvolvem as formas brandas, isso em comparação com indivíduos mais jovens e controles saudáveis. Essas descobertas sugerem que a infecção por *M. leprae* direcione essa tendência celular e isso não está relacionado a idade do indivíduo.
- Os Linfócitos T CD8<sup>dim+</sup> em pacientes paucibacilares e nas diferentes formas clínicas da hanseníase estão envolvidos na produção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , direcionando a resposta imunológica para o polo Th1. No entanto, esses linfócitos apresentam baixa produção dessas citocinas e de IL-4 em formas severas da doença.
- Os Linfócitos T CD8<sup>dim+</sup> tendem a ser produtores de IL-10, especialmente em formas multibacilares da hanseníase, sugerindo um papel na modulação de uma resposta anti-inflamatória. Além disso, essas células apresentam aumento na expressão e produção de grânulos citotóxicos (granzima B e perforina), associados a formas severas da hanseníase. Em contraste, linfócitos T CD8<sup>bright+</sup> têm baixa capacidade de produção de citocinas IL-10 e expressão de grânulos citotóxicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARÃO, T. L. DE S. et al. Relationship between growth factors and its implication in the pathogenesis of leprosy. **Microbial pathogenesis**, v. 77, p. 66–72, 2014.

ABULAFIA, J.; VIGNALE, R. A. Leprosy: pathogenesis updated. **International journal of dermatology**, v. 38, n. 5, p. 321–334, 1999.

ALEXANDER, M. A. et al. Correlation between CD8 dependency and determinant density using peptide-induced, Ld-restricted cytotoxic T lymphocytes. **The journal of experimental medicine**, v. 173, n. 4, p. 849–858, 1991.

AMIN, J.; BOCHE, D.; RAKIC, S. What do we know about the inflammasome in humans?: The inflammasome in humans. **Brain pathology (Zurich, Switzerland)**, v. 27, n. 2, p. 192–204, 2017.

ANDRADE, P. R. et al. Inflammatory cytokines are involved in focal demyelination in leprosy neuritis. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 75, n. 3, p. 272–283, 2016.

ARAÚJO, M. G. Hanseníase no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 3, p. 373–382, 2003.

BARBIERI, R. R. et al. Quantitative polymerase chain reaction in paucibacillary leprosy diagnosis: A follow-up study. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 3, p. e0007147, 2019.

BALIN, S. J. et al. Human antimicrobial cytotoxic T lymphocytes, defined by NK receptors and antimicrobial proteins, kill intracellular bacteria. **Science immunology**, v. 3, n. 26, p. eaat7668, 2018.

BATISTA, ES et al. Socio-demographic profile and clinical-epidemiological study of patients diagnosed with leprosy in Campos of Goytacazes, RJ. **Rev Bras Clin Med**. São Paulo, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 101-6, 2011.

BAUME, D. M. et al. Differential expression of CD8 alpha and CD8 beta associated with MHC-restricted and non-MHC-restricted cytolytic effector cells. **Cellular immunology**, v. 131, n. 2, p. 352–365, 1990.

BINI, E. I. et al. The influence of sex steroid hormones in the immunopathology of experimental pulmonary tuberculosis. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e93831, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Controle da hanseníase: uma proposta de integração ensino-serviço**. 1989. Rio de Janeiro: DNDS/NUTES.

Brasil. Ministério da Saúde. Divisão Nacional de Saúde. Serviço Nacional de Lepra. **Manual de leprologia**. Rio de Janeiro; Serviço Nacional de Lepra; 1960. 171 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Nota técnica n.º 16/2021/CGDE/DCCI/SVS/MS**. 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. Brasília, DF: MS, 2021.

BRITTON, W. J.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy. **Lancet**, v. 363, n. 9416, p. 1209–1219, 2004.

BROZ, P.; DIXIT, V. M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. **Nature reviews. Immunology**, v. 16, n. 7, p. 407–420, 2016.

BUSCH, D. H. et al. Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection. **Immunity**, v. 8, n. 3, p. 353–362, 1998.

CLUTTON, G. T. et al. An expanded population of CD8dim T cells with features of mitochondrial dysfunction and senescence is associated with persistent HIV-associated Kaposi’s sarcoma under ART. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 10, p. 961021, 2022.

COUEDEL, C. et al. Selection and long-term persistence of reactive CTL clones during an EBV chronic response are determined by avidity, CD8 variable contribution compensating for differences in TCR affinities. **The journal of immunology**, v. 162, n. 11, p. 6351–6358, 1999.

CULLEN, S. P. et al. Human and murine granzyme B exhibit divergent substrate preferences. **The journal of cell biology**, v. 176, n. 4, p. 435–444, 2007.

CUNHA, L. L. et al. Remodeling of the immune response with aging: Immunosenescence and its potential impact on COVID-19 immune response. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 1748, 2020.

CYKTOR, J. C.; TURNER, J. Interleukin-10 and immunity against prokaryotic and eukaryotic intracellular pathogens. **Infection and immunity**, v. 79, n. 8, p. 2964–2973, 2011.

DAGUR, P. K. et al. Mycobacterial antigen(s) induce anergy by altering TCR- and TCR/CD28-induced signalling events: insights into T-cell unresponsiveness in leprosy. **Molecular immunology**, v. 47, n. 5, p. 943–952, 2010.

DAGUR, P. K. et al. Phenolic-glycolipid-1 and lipoarabinomannan preferentially modulate TCR- and CD28-triggered proximal biochemical events, leading to T-cell unresponsiveness in mycobacterial diseases. **Lipids in health and disease**, v. 11, n. 1, p. 119, 2012.

DE LIMA SILVEIRA, E. et al. New immunologic pathways in the pathogenesis of leprosy: role for Th22 cytokines in the polar forms of the disease. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 72, n. 4, p. 729–730, 2015.

DE SOUSA, J. R. et al. Th9 cytokines response and its possible implications in the immunopathogenesis of leprosy. **Journal of clinical pathology**, v. 70, n. 6, p. 521–527, 2017.

DOTIWALA, F. et al. Killer lymphocytes use granulysin, perforin and granzymes to kill intracellular parasites. **Nature medicine**, v. 22, n. 2, p. 210–216, 2016.

DUPNIK, K. M. et al. Transcriptional changes that characterize the immune reactions of leprosy. **The journal of infectious diseases**, v. 211, n. 10, p. 1658–1676, 2015.

DWYER, J. M.; BULLOCK, W. E.; FIELDS, J. P. Disturbance of the blood T:B lymphocyte ratio in lepromatous leprosy. Clinical and immunologic correlations: Clinical and immunologic correlations. **The New England journal of medicine**, v. 288, n. 20, p. 1036–1039, 1973.

EIDT, LM. **O mundo da vida do ser hanseniano: sentimentos e vivências. Dissertação.** 2000. 242 p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Educação da PUCRS. Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

ELLER, M. A. et al. Expansion of inefficient HIV-specific CD8 T cells during acute infection. **Journal of virology**, v. 90, n. 8, p. 4005–4016, 2016.

FACER, P. et al. Do nerve growth factor-related mechanisms contribute to loss of cutaneous nociception in leprosy? **Pain**, v. 85, n. 1–2, p. 231–238, 2000.

FAVRE, D. et al. HIV disease progression correlates with the generation of dysfunctional naive CD8(low) T cells. **Blood**, v. 117, n. 7, p. 2189–2199, 2011.

FLYNN, J. L.; CHAN, J. Immunology of tuberculosis. **Annual review of immunology**, v. 19, n. 1, p. 93–129, 2001.

FONSECA, A. B. DE L. et al. The influence of innate and adaptative immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy. **Infectious diseases of poverty**, v. 6, n. 1, p. 5, 2017.

FROES, L. A. R., Junior; SOTTO, M. N.; TRINDADE, M. A. B. Leprosy: clinical and immunopathological characteristics. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 97, n. 3, p. 338–347, 2022.

GAJL-PECZALSKA, K. J. et al. B and T lymphocytes in primary immunodeficiency disease in man. **The journal of clinical investigation**, v. 52, n. 4, p. 919–928, 1973.

GALLO, M, NERY, JAC; GARCIA, CC. Intercorrências pelas drogas utilizadas nos esquemas poliquimioterápicos em hanseníase. **Hansenologia Internationalis**. [s. l.], v. 20, p; 46-50, 1995.

GAO, G. F.; JAKOBSEN, B. K. Molecular interactions of coreceptor CD8 and MHC class I: the molecular basis for functional coordination with the T-cell receptor. **Immunology today**, v. 21, n. 12, p. 630–636, 2000.

GAZZINELLI, R. T. et al. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. **The journal of immunology**, v. 157, n. 2, p. 798–805, 1996.

GEBHARD, D. H. et al. Progressive expansion of an L-selectin-negative CD8 cell with anti-feline immunodeficiency virus (FIV) suppressor function in the circulation of FIV-infected cats. **The journal of infectious diseases**, v. 180, n. 5, p. 1503–1513, 1999.

GHORPADE, A. Inoculation (tattoo) leprosy: a report of 31 cases. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV**, v. 16, n. 5, p. 494–499, 2002.

GOULART, I. M. B.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 363–375, 2002.

GREEN, A. M.; DIFAZIO, R.; FLYNN, J. L. IFN- $\gamma$  from CD4 T cells is essential for host survival and enhances CD8 T cell function during *Mycobacterium tuberculosis* infection. **The journal of immunology**, v. 190, n. 1, p. 270–277, 2013.

GRISOTTO, M. G. et al. Most parasite-specific CD8+ cells in *Trypanosoma cruzi*-infected chronic mice are down-regulated for T-cell receptor-alpha-beta and CD8 molecules: CD8+ cells in *T. cruzi*-infected mice. **Immunology**, v. 102, n. 2, p. 209–217, 2001.

GROSSMAN, W. J. et al. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. **Blood**, v. 104, n. 9, p. 2840–2848, 2004.

HAKIM, F. T.; GRESS, R. E. Immunosenescence: deficits in adaptive immunity in the elderly. **Tissue antigens**, v. 70, n. 3, p. 179–189, 2007.

HALL, A. Conference Scene: T-cell subset phenotype and function. **Immunotherapy**, v. 3, n. 6, p. 719–721, 2011.

HARRINGTON, L. E. et al. Recombinant vaccinia virus-induced T-cell immunity: quantitation of the response to the virus vector and the foreign epitope. **Journal of virology**, v. 76, n. 7, p. 3329–3337, 2002.

HAY, Z. L. Z.; SLANSKY, J. E. Granzymes: The molecular executors of immune-mediated cytotoxicity. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 3, p. 1833, 2022.

HOLLER, P. D.; KRANZ, D. M. Quantitative analysis of the contribution of TCR/pepMHC affinity and CD8 to T cell activation. **Immunity**, v. 18, n. 2, p. 255–264, 2003.

HÖLSCHER, C. et al. Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in Trypanosoma cruzi-infected interleukin 10-deficient mice. **Infection and immunity**, v. 68, n. 7, p. 4075–4083, 2000.

HUNTER, S. W.; GAYLORD, H.; BRENNAN, P. J. Structure and antigenicity of the phosphorylated lipopolysaccharide antigens from the leprosy and tubercle bacilli. **The journal of biological chemistry**, v. 261, n. 26, p. 12345–12351, 1986.

INTERNATIONAL CONGRESS OF LEPROSY, Madrid. Report of the committee on classification. 21:504-16. **Int J Lepr.** 1953.

JACOBSON, R. R.; KRAHENBUHL, J. L. Leprosy. **Lancet**, v. 353, n. 9153, p. 655–660, 1999.

JOPLING, W. H.; McDOUGALL, A. C. **Manual de hanseníase**. 4a. ed. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu Editora. 1991.

KAISERMAN, D. et al. The major human and mouse granzymes are structurally and functionally divergent. **The journal of cell biology**, v. 175, n. 4, p. 619–630, 2006.

KIENZLE, N. et al. Progressive differentiation and commitment of CD8+ T cells to a poorly cytolytic CD8low phenotype in the presence of IL-4. **The journal of immunology**, v. 174, n. 4, p. 2021–2029, 2005.

KIZAKI, T. et al. Immune suppression induced by protoscoleces of Echinococcus multilocularis in mice. Evidence for the presence of CD8dull suppressor cells in spleens of mice intraperitoneally infected with E. multilocularis. **The journal of immunology**, v. 147, n. 5, p. 1659–1666, 1991.

KRUTZIK, S. R. et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. **Nature medicine**, v. 9, n. 5, p. 525–532, 2003.

KUMAR, S. et al. CD4+CD25+ T regs with acetylated FoxP3 are associated with immune suppression in human leprosy. **Molecular immunology**, v. 56, n. 4, p. 513–520, 2013.

LANIER, L.L., LE, A.M., CIVIN, C.I., LOKEN, M.R. AND PHILLIPS, J.LL. 1986. The relationship of CD16 (Leu- 11) and Lcu-10 (NKH-I) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. **J. Immunol.** 136. 4480.

LANIER, L.L..ENGLICMAN, E.G., GATENBY, P., BABCOCK, G.F., WARNER, N.L. AND LLERZENBERG, L.A. 1983. Correlation of functional properties of human lymphoid cell subsets and surface marker phenotypes using multiple parameter analysis and flow cytometry.**Immunol.Rev.** 74, 143.

MAGGI, E. et al. Th2-like CD8+ T cells showing B cell helper function and reduced cytolytic activity in human immunodeficiency virus type 1 infection. **The journal of experimental medicine**, v. 180, n. 2, p. 489–495, 1994.

MAILE, R. et al. Antigen-specific modulation of an immune response by in vivo administration of soluble MHC class I tetramers. **The journal of immunology**, v. 167, n. 7, p. 3708–3714, 2001.

MAILE, R. et al. Low-avidity CD8<sup>lo</sup> T cells induced by incomplete antigen stimulation in vivo regulate naive higher avidity CD8<sup>hi</sup> T cell responses to the same antigen. **European journal of immunology**, v. 36, n. 2, p. 397–410, 2006.

MCELHANEY, J. E.; EFFROS, R. B. Immunosenescence: what does it mean to health outcomes in older adults? **Current opinion in immunology**, v. 21, n. 4, p. 418–424, 2009.

MELLOR-HEINEKE, S. et al. Elevated granzyme B in cytotoxic lymphocytes is a signature of immune activation in hemophagocytic lymphohistiocytosis. **Frontiers in immunology**, v. 4, p. 72, 2013.

MINISTERIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico. **Secretaria de Vigilância em Saúde**. - Volume 49 - N°4 – 2018

MIRANDA, L. H. M. et al. Feline sporotrichosis: histopathological profile of cutaneous lesions and their correlation with clinical presentation. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 36, n. 4, p. 425–432, 2013.

MIRANDA, L. H. M. et al. Severe feline sporotrichosis associated with an increased population of CD8<sup>low</sup> cells and a decrease in CD4<sup>+</sup> cells. **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 54, n. 1, p. 29–39, 2016.

MODLIN, R. L. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. **The journal of investigative dermatology**, v. 102, n. 6, p. 828–832, 1994.

MOEBIUS, U. et al. Expression of different CD8 isoforms on distinct human lymphocyte subpopulations. **European journal of immunology**, v. 21, n. 8, p. 1793–1800, 1991.

NAEHER, D.; LUESCHER, I. F.; PALMER, E. A role for the alpha-chain connecting peptide motif in mediating TCR-CD8 cooperation. **The journal of immunology**, v. 169, n. 6, p. 2964–2970, 2002.

NAJI, A. et al. CD3<sup>+</sup>CD4<sup>low</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>low</sup> are induced by HLA-G: novel human peripheral blood suppressor T-cell subsets involved in transplant acceptance. **Blood**, v. 110, n. 12, p. 3936–3948, 2007.

NATH, I. et al. The effect of antigen presenting cells on the cytokine profiles of stable and reactional lepromatous leprosy patients. **Immunology letters**, v. 75, n. 1, p. 69–76, 2000.

NOBRE, M. L. et al. Multibacillary leprosy by population groups in Brazil: Lessons from an observational study. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 2, p. e0005364, 2017.

OCHOA, M. T. et al. T-cell release of granulysin contributes to host defense in leprosy. **Nature medicine**, v. 7, n. 2, p. 174–179, 2001.

OLIVEIRA, J. S. DE S. et al. Leprosy in elderly people and the profile of a retrospective cohort in an endemic region of the Brazilian Amazon. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 9, p. e0007709, 2019.

OMS. Organización Panamericana De La Salud/Organizacion Mundial De La Salud. **Lepra al día: situación de la eliminación de la lepra em algunos países de la America Latina**. Boletín Eliminación de la Lepra de las Ameritas, 2001.

OPROMOLLA, D. V. A. Terapêutica da hanseníase. **Medicina (Ribeirao Preto Online)**, v. 30, n. 3, p. 345–350, 1997.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Diretrizes para o diagnóstico, tratamento e prevenção da hanseníase. **Nova Deli: Organização Mundial da Saúde, Escritório Regional do Sudeste Asiático**, 2019. ISBN 978-92-9022-707-6.

OUYANG, L. et al. CD8<sup>low</sup> T-cell subpopulation is increased in patients with chronic hepatitis B virus infection. **Molecular immunology**, v. 56, n. 4, p. 698–704, 2013.

PALERMO, M. DE L. et al. Differential expression of the costimulatory molecules CD86, CD28, CD152 and PD-1 correlates with the host-parasite outcome in leprosy. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107 Suppl 1, p. 167–173, 2012.

PARK, A. J. et al. Leprosy as a model to understand cancer immunosurveillance and T cell anergy. **Journal of leukocyte biology**, v. 100, n. 1, p. 47–54, 2016.

PAUL, W. E. History of interleukin-4. **Cytokine**, v. 75, n. 1, p. 3–7, 2015.

PAUL, W. E.; ZHU, J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? **Nature reviews. Immunology**, v. 10, n. 4, p. 225–235, 2010.

PINZAN, C. F. et al. Immunological basis for the gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **PloS one**, v. 5, n. 5, p. e10757, 2010.

PLOEMACHER, T. et al. Reservoirs and transmission routes of leprosy; A systematic review. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 4, p. e0008276, 2020.

PREVEDELLO, F. C.; MIRA, M. T. Hanseníase: uma doença genética? **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 82, n. 5, p. 451–459, 2007.

PRINCE, H. E.; BERMUDEZ, S.; PLAEGER-MARSHALL, S. Preparation of CD8<sup>bright</sup> and CD8<sup>dim</sup> lymphocyte populations using two positive selection methods in tandem. **Journal of immunological methods**, v. 165, n. 2, p. 139–148, 1993.

RICHARDS, S. J. et al. Relationships between 2H4 (CD45RA) and UCHL1 (CD45RO) expression by normal blood CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>dim</sup>+, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> and CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> lymphocytes. **Clinical and experimental immunology**, v. 81, n. 1, p. 149–155, 1990.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association**, v. 34, n. 3, p. 255–273, 1966.

ROJAS-ESPINOSA O. Anergia en lepra Dónde está el defecto? **Fontilles Rev. Leprol.** 2007; 26:121–142.

SADHU, S. et al. Reciprocity between Regulatory T cells and Th17 cells: Relevance to polarized immunity in leprosy. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004338, 2016.

SAMPAIO, L. H. et al. Evaluation of various cytokines elicited during antigen-specific recall as potential risk indicators for the differential development of leprosy. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 7, p. 1443–1451, 2012.

SCHMITZ, J. E. et al. Expression of the CD8alpha beta-heterodimer on CD8(+) T lymphocytes in peripheral blood lymphocytes of human immunodeficiency virus- and human immunodeficiency virus+ individuals. **Blood**, v. 92, n. 1, p. 198–206, 1998.

SCHOTT, E.; PLOEGH, H. L. Mouse MHC class I tetramers that are unable to bind to CD8 reveal the need for CD8 engagement in order to activate naive CD8 T cells. **European journal of immunology**, v. 32, n. 12, p. 3425–3434, 2002.

SCOLLARD, D. M. et al. The continuing challenges of leprosy. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 2, p. 338–381, 2006.

SHI, L. et al. A natural killer cell granule protein that induces DNA fragmentation and apoptosis. **The journal of experimental medicine**, v. 175, n. 2, p. 553–566, 1992.

SIELING, P. A. et al. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. In vitro modulation of T cell responses in leprosy. **The journal of immunology**, v. 150, n. 12, p. 5501–5510, 1993.

SIMOES QUARESMA, J. A. et al. Transforming growth factor  $\beta$  and apoptosis in leprosy skin lesions: possible relationship with the control of the tissue immune response in the Mycobacterium leprae infection. **Microbes and infection**, v. 14, n. 9, p. 696–701, 2012.

SIMPSON, R. J. et al. High-intensity exercise elicits the mobilization of senescent T lymphocytes into the peripheral blood compartment in human subjects. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 103, n. 1, p. 396–401, 2007.

SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), Indicadores e Dados Básicos de Hanseníase nos Municípios Brasileiros, 2024. Disponível em: <<https://indicadoreshanseniaze.aids.gov.br/>> Acesso em novembro de 2024.

SINSIMER, D. et al. Actively modulates the cytokine response in naïve human monocytes. **Infection and immunity**, v. 78, n. 1, p. 293–300, 2010.

SLIFKA, M. K.; WHITTON, J. L. Functional avidity maturation of CD8(+) T cells without selection of higher affinity TCR. **Nature immunology**, v. 2, n. 8, p. 711–717, 2001.

SNIDER, H. et al. Sex hormones and modulation of immunity against leishmaniasis. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 2, p. 106–113, 2009.

STENGER, S. et al. Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. **Science (New York, N.Y.)**, v. 276, n. 5319, p. 1684–1687, 1997.

SUSANTO, O.; TRAPANI, J. A.; BRASACCHIO, D. Controversies in granzyme biology: Controversies in granzyme biology. **Tissue antigens**, v. 80, n. 6, p. 477–487, 2012.

SUTTON, V. R. et al. Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. **The journal of experimental medicine**, v. 192, n. 10, p. 1403–1414, 2000.

TAKEUCHI, O. et al. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. **The journal of immunology**, v. 169, n. 1, p. 10–14, 2002.

TALHARI, S.; PENNA, G. O.; GONÇALVES, H. S.; OLIVEIRA, M. L. W. HANSENÍASE 5. ed Manaus: Divilivros. 2015. 13:157-172p.

TEIXEIRA, M. A. G. et al. NRAMP1 gene polymorphisms in individuals with leprosy reactions attended at two reference centers in Recife, northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 3, p. 281–286, 2010.

TELES, R. M. B. et al. Type I interferon suppresses type II interferon-triggered human anti-mycobacterial responses. **Science (New York, N.Y.)**, v. 339, n. 6126, p. 1448–1453, 2013.

TRAUTMANN, A. et al. Human CD8 T cells of the peripheral blood contain a low CD8 expressing cytotoxic/effector subpopulation. **Immunology**, v. 108, n. 3, p. 305–312, 2003.

VIEIRA, G. DE D. et al. Hanseníase em Rondônia: incidência e características dos casos notificados, 2001 a 2012. **Epidemiologia e serviços de saúde: revista do Sistema Unico de Saude do Brasil**, v. 23, n. 2, p. 269–275, 2014.

WALCH, M. et al. Cytotoxic cells kill intracellular bacteria through granulysin-mediated delivery of granzymes. **Cell**, v. 157, n. 6, p. 1309–1323, 2014.

WALKER, P. R. et al. Distinct phenotypes of antigen-selected CD8 T cells emerge at different stages of an in vivo immune response. **The journal of immunology**, v. 155, n. 7, p. 3443–3452, 1995.

WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N. J. The clinical and immunological features of leprosy. **British medical bulletin**, v. 77–78, n. 1, p. 103–121, 2006.

WIRTH, J. J.; KIERSZENBAUM, F.; ZLOTNIK, A. Effects of IL-4 on macrophage functions: increased uptake and killing of a protozoan parasite (*Trypanosoma cruzi*). **Immunology**, v. 66, n. 2, p. 296–301, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Towards zero leprosy: global leprosy (Hansen's disease) strategy 2021–2030. **New Delhi: World Health Organization**, Regional Office for South-East Asia, 2021. ISBN 978-92-9022-850-9.

WYNN, T. A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 445–455, 2013.

XU, H. et al. CD8 down-regulation and functional impairment of SIV-specific cytotoxic T lymphocytes in lymphoid and mucosal tissues during SIV infection. **Journal of leukocyte biology**, v. 93, n. 6, p. 943–950, 2013.

YAMAMURA, M. et al. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. **Science (New York, N.Y.)**, v. 254, n. 5029, p. 277–279, 1991.

YAMANOUCHI, Ana Azussa; CARON, Carlos Roberto; SHIWAKU, Darwin T.; SOARES, Fabiana Burigo; NICOLODELLI, Marco Antonio; ADUR, Regina Célia Adur; TAMURA, Sirlene Yoshiko. Hanseníase e sociedade: um problema sempre atual / Leprosy: social aspects. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 68, n. 6, p. 396-404, nov./dez. 1993.

ZAMBONI, D. S.; LIMA-JUNIOR, D. S. Inflammasomes in host response to protozoan parasites. **Immunological reviews**, v. 265, n. 1, p. 156–171, 2015.

ZHOU, W.; ZHANG, F.; AUNE, T. M. Either IL-2 or IL-12 is sufficient to direct Th1 differentiation by nonobese diabetic T cells. **The journal of immunology**, v. 170, n. 2, p. 735–740, 2003.