

**CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CR1 NAS PRINCIPAIS  
SUBCLASSES LINFOCITÁRIAS DE INDIVÍDUOS ACOMETIDOS  
COM HANSENÍASE: ASSOCIAÇÃO COM AS FORMAS CLÍNICAS**

**YURI SCHEIDEGGER DE CASTRO**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO – UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
FEVEREIRO DE 2020

CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CR1 NAS PRINCIPAIS  
SUBCLASSES LINFOCITÁRIAS DE INDIVÍDUOS ACOMETIDOS  
COM HANSENÍASE: ASSOCIAÇÃO COM AS FORMAS CLÍNICAS

**YURI SCHEIDEGGER DE CASTRO**

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

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

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO DE 2020

CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CR1 NAS PRINCIPAIS  
SUBCLASSES LINFOCITÁRIAS DE INDIVÍDUOS ACOMETIDOS  
COM HANSENÍASE: ASSOCIAÇÃO COM AS FORMAS CLÍNICAS

**YURI SCHEIDEGGER DE CASTRO**

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

Aprovada em 19 de fevereiro de 2020.

Comissão Examinadora:

---

Thatiana Lopes Biá Ventura Simão (Doutora em Biociências e Biotecnologia) -  
PPGCF/UFRJ

---

Elena Lassounskaia (Doutora em Imunologia e alergologia) -LBR/UENF

---

Milton Masahiko Kanashiro (Doutor em Biociências e Biotecnologia) - LBR/UENF

---

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

Participação Especial:

---

Edilbert Pellegrini Nahn Junior (Diretor da Faculdade de Medicina de Campos)

**"A potência intelectual de um  
homem se mede pela dose de humor que ele é  
capaz de usar".**

**(Friedrich Nietzsche)**

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus por me proporcionar força e coragem de enfrentar mais uma etapa de estudos em minha vida.

Agradeço a minha mãe Valdirene e avó Célia pela força que sempre me deram mesmo estando longe de casa, e obrigado por sempre acreditarem em mim e me apoiarem em tudo que eu faço em minha vida, amo vocês.

Agradeço a minha avó Maria das Graças por todo apoio e torcida que ela e o vovô Ariosto (*in memoriam*) sempre tiveram, vocês são especiais e amo vocês.

A professora e orientadora Alba Lucínia Peixoto Rangel, por me dar mais essa tarefa, muito obrigado pelos ensinamentos, paciência, confiança e acreditar no meu potencial.

Aos meus amigos do grupo de pesquisa (Letícia Silva, Rebeka Souza, Bárbara Barcelos, Juliana Azevedo, Luiza Ayres, Lívia Martins, Bianca, Rhônia França, Liliani Elias, Luciana Oliveira, Fernanda Albano, Juliana Pessanha, Jessany Aquino) do LBR que sempre estiveram lá todos os dias, compartilhando não somente do ambiente físico, mas também suas próprias experiências, que muitas vezes não eram boas, mas que no final, tudo se ajustava e funcionava. E a todos os técnicos e alunos do LBR que contribuíram com esse trabalho.

A ASTRAN, por cada carro e tempo disponibilizados para irmos ao Centro de Referência buscar as amostras dos pacientes.

A toda a equipe do Centro de Referência da Hanseníase (Jô, Ila e Dr Edilbert Pellegrini, que estiveram lá por todos esses anos, nos ajudando não somente na coleta do material biológico, mas também em sanar dúvidas e se adequar aos nossos horários e possibilidades para o recolhimento do material. O meu muito obrigado por vocês sempre serem solícitos com cada um de nós da UENF.

Ao Doutor Edilbert Pellegrini, pela colaboração e aprendizado ao longo desses anos em que estamos desenvolvendo os trabalhos.

Agradeço a todos os professores e técnicos da UENF que cruzaram meu caminho e que de algum modo me passaram ensinamentos.

Ainda agradeço à UENF e ao LBR pela estrutura e instalações que foram

utilizadas na minha trajetória de estudante, assim como a FAPERJ e CAPES pelo apoio financeiro.

Por último, agradeço a todos que me ajudaram de alguma maneira no andamento deste trabalho.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Gráfico das taxas de prevalências da hanseníase no Brasil dos anos de 2001/2017. A taxa de prevalência baixa: 0,00-1,00; média: 1,01- 5,00 e alta > 5,01(Fonte: DATASUS).....23
- Figura 2: Representação por dotplot de setagem celular por citometria de fluxo. A-** Gráfico de parâmetros de tamanho (FSC - *Forward Scatter*) e granulosidade (SSC - *Side Scatter*) destacando-se a área circundada (gate) que representa os linfócitos; **B-** Representação de uma marcação dupla positiva para linfócitos T  $\gamma\delta$ , destacando-se o quadrado superior a direita com a porcentagem de células duplamente positivas para os marcadores utilizados (Anti-TCR $\gamma\delta$  e Anti-CD3); **C e D-** exemplo de uma marcação tripla para linfócitos T CD8<sup>+</sup> CD35<sup>+</sup>, em **C** temos a porcentagem de linfócitos T CD8<sup>+</sup> com a marcação dupla de Anti-CD3 e Anti-CD8 e em **D** marcação de Anti-CD35 nos linfócitos, baseado no gate de TCD8<sup>+</sup> do gráfico **C**.....44
- Figura 3. Porcentagem da população de linfócitos totais nas diferentes formas clínicas e indivíduos controles. A** – Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos controles e teste estatístico Mann-Whitney; **B** – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; **C** – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's.....44
- Figura 4. Porcentagem da população de linfócitos T totais nas diferentes formas clínicas e indivíduos controles. A** – Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos controles e teste estatístico Mann-Whitney; **B** – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; **C** – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's.....45
- Figura 5. Porcentagem da população de células TCD8<sup>+</sup> nas diferentes formas clínicas e indivíduos controles. A** – Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos controles e teste estatístico Mann-Whitney; **B** – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; **C** – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's.....46

**Figura 6. Porcentagem da população de células TCD4<sup>+</sup> nas diferentes formas clínicas e indivíduos controles.** **A** – Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos controles e teste estatístico Mann-Whitney; **B** – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; **C** – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's.....46

**Figura 7. Porcentagem da população de células T $\gamma\delta$  nas diferentes formas clínicas e indivíduos controles.** **A** – Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos controles e teste estatístico Mann-Whitney; **B** – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; **C** – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's.....47

**Figura 8. Porcentagem da população de células T reguladoras CD8<sup>+</sup>e CD4<sup>+</sup> nas diferentes formas clínicas da hanseníase e indivíduos controles.** **A e D**– Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Mann-Whitney; **B e E** – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; **C e F** – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's.....48

**Figura 9. Porcentagem da população de células NKT e NK nas diferentes formas clínicas e indivíduos controles.** **A e D**– Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Mann-Whitney; **B e E** – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; **C e F** – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's.....49

**Figura 10. Porcentagem da população de células B CD5<sup>+</sup> nas diferentes formas clínicas e indivíduos controles.** **A** – Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos controles e teste estatístico Mann-Whitney; **B** – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; **C** – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste

estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's.....49

**Figura 11. Porcentagem da população de células B nas diferentes formas clínicas e indivíduos controles.** **A** – Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos controles e teste estatístico Mann-Whitney; **B** – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; **C** – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's.....50

**Figura 12. Percentual de células que expressam CR1 e densidade molecular de receptores CR1 sobre a superfície de linfócitos TCD8<sup>+</sup> dos pacientes e indivíduos saudáveis, baseados no MIF (média da intensidade de fluorescência).** **A e D**– Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Mann-Whitney; **B e E** – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; **C e F** – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's. Os gráficos **A, B e C** - são referentes a porcentagem de células que expressão o CR1 sobre sua superfície; enquanto os gráficos **D, E e F** - representam a densidade molecular de receptores CR1 expressos sobre a superfície celular.....51

**Figura 13. Percentual de células que expressam CR1 e densidade molecular de receptores CR1 sobre a superfície de células TCD4<sup>+</sup> dos pacientes e indivíduos saudáveis, baseados no MIF (média da intensidade de fluorescência).** **A e D**– Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Mann-Whitney; **B e E** – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; **C e F** – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's. Os gráficos **A, B e C** - são referentes a porcentagem de células que expressão o CR1 sobre sua superfície; enquanto gráficos **D, E e F** - representam a densidade molecular de receptores CR1 expressos sobre a superfície celular.....52

**Figura 14. Percentual de células que expressam CR1 e densidade molecular de receptores CR1 sobre a superfície de células NKT dos pacientes e indivíduos saudáveis, baseados no MIF (média da intensidade de fluorescência).** **A e D**– Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Mann-Whitney; **B e E** – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; **C e F** – Classificação de Madrid: as

formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's. Os gráficos **A, B e C** - são referentes a porcentagem de células que expressão o CR1 sobre sua superfície; que os gráficos **D, E e F** - representam a densidade molecular de receptores CR1 expressos sobre a superfície celular.....5

**Figura 15. Percentual de células que expressam CR1 e densidade molecular de receptores CR1 sobre a superfície de células NK dos pacientes e indivíduos saudáveis, baseados no MIF (média da intensidade de fluorescência).** **A e D** – Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Mann-Whitney; **B e E** – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; **C e F** – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's. Os gráficos **A, B e C** - são referentes a porcentagem de células que expressão o CR1 sobre sua superfície; enquanto os gráficos **D, E e F** - representam a densidade molecular de receptores CR1 expressos sobre a superfície celular.....54

**Figura 16. Densidade de células que expressam CR1 e expressão de receptores CR1 baseados no MIF (média da intensidade de fluorescência) sobre a superfície de linfócitos B dos pacientes e indivíduos saudáveis.** **A e D** – Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Mann-Whitney; **B e E** – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; **C e F** – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's. Os gráficos **A, B e C** - são referentes a porcentagem de células que expressão o CR1 sobre sua superfície; enquanto os gráficos **D, E e F** - representam a densidade molecular de receptores CR1 expressos sobre a superfície celular.....55

**Figura 17. Index de absorbância de IgA sobre a produção de anticorpos.** **A** – Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos controles e teste estatístico Mann-Whitney; **B** – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; **C** – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's.....56

**Figura 18. Index de absorbância de IgE sobre a produção de anticorpos.** **A** – Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos controles e teste estatístico Mann-

Whitney; **B** – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; **C** – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's.....57

**Figura 19. Index de absorvância de IgG<sub>1</sub> sobre a produção de anticorpos.** **A** – Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos controles e teste estatístico Mann-Whitney; **B** – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; **C** – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's.....57

**Figura 20. Index de absorvância de IgG<sub>2</sub> sobre a produção de anticorpos.** **A** – Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos controles e teste estatístico Mann-Whitney; **B** – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; **C** – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's.....58

**Figura 21: Index de absorvância de IgG<sub>3</sub> sobre a produção de anticorpos.** **A** – Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos controles e teste estatístico Mann-Whitney; **B** – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; **C** – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's.....58

**Figura 22. Index de absorvância de IgG<sub>4</sub>sobre a produção de anticorpos.** **A** – Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos controles e teste estatístico Mann-Whitney; **B** – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; **C** – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's.....59

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Anticorpos monoclonais utilizados para imunofenotipagem por citometria de fluxo.....	40
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

**B:** “Boderline” – Intermediária  
**BAAR:** Bacilo álcool ácido resistente  
**CAR:** “Complement Activation Receptors” – Receptor de Ativação de Complemento  
**CR1:** “Complement Receptor 1” -Receptor do Complemento do tipo 1  
**D:** Dimorfa  
**DD:** Dimorfa- Dimorfa  
**DT:** Dimorfa-Tuberculoide  
**DV:** Dimorfa - Virchowiana  
**Fc $\gamma$ R:** Receptor do tipo Fc da superfamília de imunoglobulinas  
**HLA:** “Human Leukocyte Antigen” - Antígeno Leucocitário Humano  
**I:** Indeterminada  
**IFN- $\gamma$ :** Interferon Gama  
**IL-10:** Interleucina 10  
**LL:** Lepromatoso/Virchowiano  
**IL-4:** Interleucina 4  
**IL-5:** Interleucina 5  
**MAC:** “Membrane Attack Complex” - Complexo de Ataque a Membrana  
**MB:** Multibacilar  
**OMS:** Organização Mundial da Saúde  
**PB:** Paucibacilar  
**PGL-1:** Antígeno Glicolípido Fenólico -1  
**PQT:** Poliquimioterapia  
**MHC I:** “*Major Histocompatibility Complex I*” - Complexo Principal de Histocompatibilidade I  
**MHC II:** “*Major Histocompatibility Complex II*” - Complexo Principal de Histocompatibilidade II  
**RAC:** Receptores de Ativação do Complemento  
**T  $\gamma\delta$ :** Células T gama/delta  
**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 **TT:** Tuberculoíde  
**T:** Tuberculoide  
**TNF $\alpha$ :** Fator de necrose tumoral alfa  
**TNF $\beta$ :** Fator de necrose tumoral beta  
**V:** Virchowiano  
**VV:** Virchowiana  
**ENH:** Eritema nodoso hansênico  
**MIF:** Média de intencidade de fluorescência

## RESUMO

O receptor do complemento 1 (CR1) pertence à família de receptores de ativação do complemento e possui expressão diferencial em eritrócitos de pacientes portadores de hanseníase, este fato incentiva o estudo nas demais células do sistema imune. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar a expressão de CR1 (CD35) na superfície de subpopulações de linfócitos, bem como a produção de isotipos de imunoglobulinas nas manifestações clínicas da hanseníase. Em geral houve marcada redução do percentual de linfócitos totais nos pacientes portadores de hanseníase (grupo caso), comparado ao controle. Quando as subpopulações foram avaliadas separadamente, constatou-se que esta redução foi referente aos percentuais de linfócitos T totais, TCD8<sup>+</sup>, T $\gamma\delta$ , NK e NKT, enquanto que as subpopulações de células T reguladoras tiveram seus percentuais aumentados significativamente no grupo caso. Em relação ao número de células expressando CR1 na superfície, podemos observar que houve redução significativa somente no percentual de células B de pacientes portadores de hanseníase, enquanto o percentual de células NKT e NK expressando esse receptor foi significativamente elevado nos pacientes comparado ao controle. No que diz respeito a densidade molecular de CR1 na superfície dessas subpopulações celulares, observamos que todas as subpopulações marcadas com anti-CD35 (TCD8<sup>+</sup>, TCD4<sup>+</sup> e B) apresentaram diminuição da média de intensidade de fluorescência (MIF) nos indivíduos portadores da hanseníase comparado aos controles. Contrariamente, células NKT de pacientes apresentaram MIF para CR1 significativamente aumentada em sua superfície. Uma vez que as células B apresentaram diferença significativa, ou seja, reduzida quantidade de expressão e densidade molecular de CR1, avaliamos os efeitos destes na produção de isotipos de imunoglobulinas. Os níveis séricos de IgE, IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub> apresentaram-se diminuídos no grupo dos pacientes comparado aos controles, enquanto IgG<sub>4</sub> apresentou-se aumentado o que se associa a progressão da doença. Em conclusão este trabalho propõe CR1 como uma assinatura imunológica de valor prognóstico para hanseníase, bem como indica IgG<sub>4</sub>, como marcador de progressão da doença.

**Palavras-chave:** CR1, imunoglobulinas, hanseníase, *Mycobacterium leprae*, linfócitos.

## ABSTRACT

Complement 1 receptor (CR1) belongs to the complement activation receptor family and has differential expression in erythrocytes of Hansen's disease, this fact encourages the study in other cells of the immune system. In this sense, this study aimed to evaluate the expression of CR1 (CD35) on the surface of lymphocyte subpopulations, as well as the production of immunoglobulin isotypes in the clinical manifestations of leprosy. In general, there was a marked reduction in the percentage of total lymphocytes in leprosy patients (case group), compared to the control group. When the subpopulations were evaluated separately, it was found that this reduction was related to the percentages of total T lymphocytes, TCD8<sup>+</sup>, T $\gamma\delta$  NK and NKT, while the regulatory T-cell subpopulations had their percentages significantly increased in the case group. Regarding the number of cells expressing CR1 on the surface, it was observed that there was a significant reduction only in the percentage of B cells of leprosy patients, while the percentage of NKT and NK cells expressing this receptor was significantly high elevated in patients compared to the control. With respect to the molecular density of CR1 on the surface of these cell subpopulations, we observed for all subpopulations marked with anti-CD35 (TCD8<sup>+</sup>, TCD4<sup>+</sup> and B) showed a decrease in the mean fluorescence intensity (MIF) in leprosy patients compared to controls. Conversely, NKT cells of patients presented MIF for CR1 significantly increased on their surface. The B cells showed significant difference, reduced amount of expression and molecular density of CR1, we evaluated their effects on the production of immunoglobulin isotypes. Serum levels of IgE, IgG1 and IgG2 were decreased in the group of patients compared to controls, while IgG4 was increased, which is associated with disease progression. In conclusion, this paper proposes CR1 as an immunological signature of prognostic value for leprosy, as well as indicates IgG4 as a marker of disease progression.

**Keywords: CR1, immunoglobulins, *Mycobacterium leprae*, leprosy and lymphocytes.**

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1 Histórico .....	22
2.2 Epidemiologia da hanseníase .....	22
2.3 Características clínicas da infecção por <i>Mycobacterium leprae</i> .....	24
2.4 Classificação da doença quanto as formas clínicas .....	24
2.5 Transmissão da hanseníase.....	25
2.6 Diagnóstico da hanseníase .....	25
2.7 Tratamento da doença .....	26
2.8 Respostas imunológicas do hospedeiro ao patógeno.....	27
2.9 O Receptor CR1 e suas funções .....	28
2.10 Linfócitos T $\alpha\beta$ .....	29
2.11 Linfócitos T $\gamma\delta$ .....	30
2.12 Linfócitos T reguladores .....	30
2.13 Células natural killer (NK) .....	31
2.14 Células T <i>natural killer</i> (NKT) .....	32
2.15 Linfócitos B .....	32
2.16 Resposta imune humoral: Imunoglobulinas .....	33
3. JUSTIFICATIVA .....	35
4. OBJETIVO GERAL .....	37
4.1 Objetivos específicos.....	37
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
5.1 Sujeitos da pesquisa .....	38
5.2 Obtenção das células a partir do sangue periférico.....	38
5.3 Fenotipagem celular, marcação de CR1 e análise por citometria de fluxo ..	39
5.4 Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima (ELISA) de imunoglobulinas: IgA, IgE, IgG <sub>1</sub> , IgG <sub>2</sub> , IgG <sub>3</sub> e IgG <sub>4</sub> .....	40
5.5 Análises estatísticas .....	41
6. RESULTADOS .....	42
6.1 Análises fenotípica de PBMC dos pacientes e controles .....	42
6.2 Quantificação do percentual das diferentes subpopulações de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) em pacientes e controles ....	44

<b>6.3 Avaliação da expressão de receptores CR1 em diferentes subpopulações de células mononucleares do sangue periférico (PBMC).....</b>	<b>50</b>
<b>6.4 Avaliação dos níveis de imunoglobulinas nos pacientes com diferentes formas clínicas e indivíduos controles.....</b>	<b>56</b>
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>70</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>83</b>

## 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) e ainda se dissemina mundialmente (BRITTON; LOCKWOOD, 2004; SCOLLARD et al., 2006; WHO, 2015).

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 auto-segregação 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; CARON; SHIWAKU, 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; CARON; SHIWAKU, 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 1:10mil caso/habitantes (OPS/OMS,2001).

A cidade de Campos dos Goytacazes em 2014 apresentou uma taxa de detecção de 14,1 casos para cada 100.000 habitantes (Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro, 2014). No ano de 2017, foram notificados 48 casos de hanseníase por 100 mil habitantes (DATASUS, 2018). O estudo de Batista em 2011, o qual englobou casos de janeiro de 2008 à setembro de 2010, 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 referida como a 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. A baciloscopia nem sempre é possível. Dessa forma, de acordo com a OMS, 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) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998; c2016 e PARDILLO et al., 2007).

Como não há prevenção primária para a hanseníase, isto é, 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 das três fármacos: Dapsona (DDS), Clofazimina (CFZ) e Rifampicina (RMP) por seis meses para formas PB e de doze meses para os casos MB (MS/SVS, 2016). 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 (YANG et al., 2016; 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 (DE SOUSA Jr; SOTTO; SIMÕES QUARESMA, 2017).

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-Peczalsket al. (1973).

Atualmente, testes que usam quantificar a produção de anticorpos específicos contra um alvo antigênico pode ser útil como marcador para carga bacteriana na hanseníase. Testes que detectam determinadas classes de anticorpos podem potencialmente permitir uma avaliação mais ampla da resposta imune durante a infecção e, proporcionar uma alternativa diagnóstica, porém testes sorológicos baseados na detecção refinada de subclasses de IgG (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>) contra antígenos específicos de micobactérias não foram integralmente investigados (TANGYE et al., 2013). Recentemente, Marçal e colaboradores (2018) demonstraram que as imunoglobulinas, das subclasses IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub>, estavam com seus níveis séricos aumentados em pacientes apresentando a forma multibacilar da doença, permitindo a diferenciação dos pacientes entre os grupos MB e PB utilizando esses isotipos de anticorpos, mais precisamente IgG<sub>1</sub> contra antígenos específicos de *M. leprae*.

O receptor CR1 pertence à família de reguladores de ativação do

complemento (RAC) sendo expresso em uma ampla variedade de células, tais como eritrócitos, monócitos, eosinófilos, macrófagos, subpopulação de linfócitos T: CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, NKT, linfócitos B, células dendríticas, podócitos glomerulares e células de Langerhans (WEISS et al., 1989; RODGAARD et al., 1991; FANG et al., 1998; XINFENG et al., 2014). O CR1 (CD35) é uma glicoproteína integral de membrana que se liga a C3, C3bi, assim como a C4b durante a cascata do complemento (KRYCH-GOLDBERG; ATKINSON, 2001). Esse receptor possui diversas propriedades regulatórias para o funcionamento do sistema complemento, haja vista acelerar o decaimento de C3, clivando enzimas tanto das vias clássica quanto alternativa, e agir como cofator para o Fator I na degradação da cadeia alfa de fragmentos de C3b e C4b, convertendo-os para as suas formas inativas (XINFENG et al., 2014).

Outra importante função do receptor CR1 é auxiliar na remoção de imunocomplexos, uma vez que esses receptores presentes na superfície das hemácias são capazes de se ligar a imunocomplexos opsonizados de C3b/C4b (YOSHIDA; YUKIYAMA; MIYAMOTO, 1986) e ancorá-los à superfície das hemácias. Esses complexos imunes são carregados pelas hemácias aos macrófagos do fígado e baço (COSIO et al., 1990; CRAIG et al., 2002). As células de Kupffer e outros fagócitos presentes nestes dois órgãos englobam e metabolizam esses complexos imunes que foram carregados pelas hemácias (VAN ES; DAHA, 1984; SKOGH et al., 1985).

Como na literatura os dados referentes ao percentual de linfócitos presentes no em sangue periférico, assim como os níveis séricos de subclasses de imunoglobulinas de indivíduo acometidos por hanseníase são escassos, e dado os avanços na medicina com a universalização do PQT, este estudo possibilitou compreender quais células e imunoglobulinas estão mais intimamente envolvidas em cada tipo clínico da hanseníase, assim como propusemos CR1 como uma assinatura imunológica relevante para o manejo clínico adequado desta doença.

## **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, tendo indícios que mostram que seja originária da Ásia (JOPLING e McDOUGALL, 1991 e BRASIL, 1989). Porém, acredita-se que a África seja o berço desta doença (BRASIL, 1989). Ainda hoje, muitos anos após sua descoberta discute-se se a hanseníase é de origem asiática ou africana.

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 (Serviço Nacional de Lepra, 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).

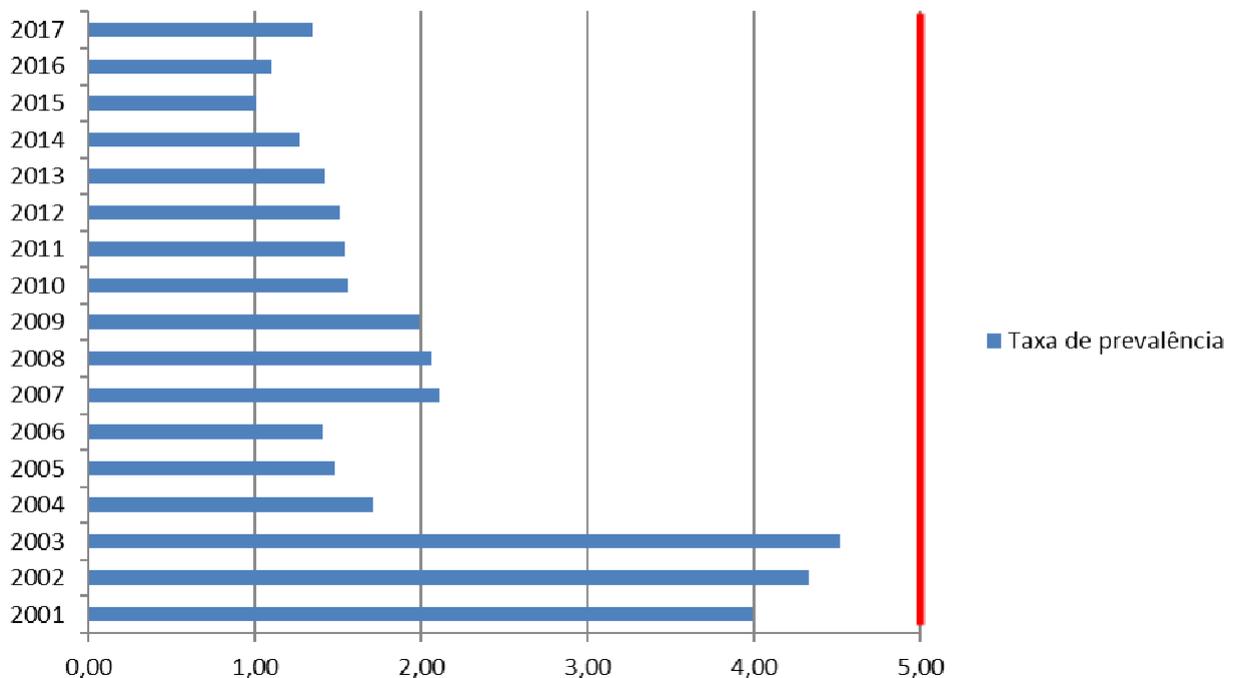
### **2.2 Epidemiologia da hanseníase**

A 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, e sua notificação deve ser de modo compulsório e investigação obrigatória (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; SINAN, 2019). A hanseníase representa, ainda hoje, um grave problema de saúde pública no Brasil. 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 auto-segregação 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; CARON; SHIWAKU, 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 (YAMANOUCHI; CARON; SHIWAKU, 1993), encontra-se entre 0,4 a 17 casos por 10 mil habitantes (**figura1**) (BRASIL, 2001).

### Taxa de prevalência da hanseníase, Brasil



**Figura 1.** Gráfico das taxas de prevalências da hanseníase no Brasil dos anos de 2001/2017. A taxa de prevalência baixa: 0,00-1,00; média: 1,01- 5,00 e alta > 5,01 (Fonte: DATASUS).

Em 2017 a taxa de prevalência da doença foi de 1,35 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. O estado do Rio de Janeiro apresentou um coeficiente de prevalência de 0,60 casos (DATASUS/SINAN, 2018). Adicionalmente, no mesmo ano a cidade de Campos dos Goytacazes apresentou uma taxa de detecção de casos novos de 8,97 (DATASUS/SINAN, 2018).

### **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, 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, 2001).

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 (GAYLORD e BRENNAN, 1986).

### **2.4 Classificação da doença quanto as formas clínicas**

A doença foi classificada de acordo com 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).

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 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

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 boderline (B) ou dimorfa (D) (Languillon; Carayon, 1986).

## **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 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

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 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010), para manifestação dos sintomas.

## **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 a 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).

## **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 (PQT/OMS), que contém a Rifampicina, Dapsona e Clofazimina. A implementação da PQT/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 ocorra em conformidade ótima. Os fármacos são administrados através de esquema padrão, de acordo com a classificação operacional do doente em paucibacilar, onde se administram as doses de rifampicina e dapsona e multibacilar, com o acréscimo da clofazimina em períodos e dosagens específicas para cada grupo. A informação sobre a classificação clínica do doente é fundamental para se selecionar o esquema de tratamento adequado ao seu caso. Para crianças acometida 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 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

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

A polarização da resposta imune (Th1/Th2 tendenciosa) 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., 2015).

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 Schawnn, 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 apresentam-se em grande número nos macrófagos. Nas formas intermediárias os dois tipos de respostas podem ser concomitantes (Abulafia e Vignale, 1999).

Existem diferentes espectro clínico, bacteriológico e histológico 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).

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 glicolipídio fenólico (PGL-1), antígeno da parede celular 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 (PORTELA, 2008).

## **2.9 O Receptor CR1 e suas funções**

O receptor CR1 pertence à família de reguladores de ativação do complemento (RAC) e é expresso em uma ampla variedade de células, tais como eritrócitos, monócitos, eosinófilos, macrófagos, subpopulação de células TCD4<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup>, linfócitos B, células dendríticas, podócitos glomerulares, leucócitos e células de Langerhans (WEISS et al., 1989; RODGAARD et al., 1991; FANG et al., 1998; XINFENG et al., 2014). O CR1 (CD35) é uma glicoproteína integral de membrana que se liga a C3, e C3bi, assim como a C4b durante a cascata do complemento (KRYCH-GOLDBERG; ATKINSON, 2001). Esse receptor possui diversas propriedades regulatórias para o funcionamento do sistema complemento, haja vista acelerar o decaimento de C3, clivando enzimas tanto das vias clássica e alternativa e agir como cofator para o Fator I na degradação da cadeia alfa de fragmentos de C3b e C4b, convertendo-os para as suas formas inativas (XINFENG et al., 2014).

Outra importante função do receptor CR1 é auxiliar na remoção de imunocomplexos, uma vez que esses receptores presentes na superfície das hemácias são capazes de se ligar a imunocomplexos opsonizados de C3b/C4b (YOSHIDA; YUKIYAMA; MIYAMOTO, 1986) e ancorá-los à superfície das

hemácias. Esses imunocomplexos são carregados pelas hemácias aos macrófagos do fígado e baço (COSIO et al., 1990; CRAING et al., 2002). As células de Kupffer e outros fagócitos presentes nesses órgãos, englobam e metabolizam esses imunocomplexos que foram carregados pelas hemácias (VAN ES; DAHA, 1984 e SKOGH et al., 1985).

É sabido que CR1 é expresso na superfície de subpopulações de linfócitos T (WILSON; TEDDER; FEARON, 1983; COHEN et al., 1989; RODGAARD et al., 1991; YASKANIN; THOMPSON; WAXMAN, 1992). Os linfócitos T expressando CR1 são encontrados em uma subpopulação de linfócitos positiva para o receptor Fc $\gamma$ . A fração de linfócitos T positivos para CR1 em alguns estudos com doadores saudáveis foi encontrado estar abaixo de 10% (COHEN et al., 1989; RODGAARD et al., 1991; YASKANIN; THOMPSON; WAXMAN, 1992) e em outro estudo, cerca de 14% (WILSON; TEDDER; FEARON, 1983). A densidade dos receptores na superfície dessas células é baixa; cerca de 3.000 receptores/célula T (YASKANIN; THOMPSON; WAXMAN, 1992). Os linfócitos T expressando CR1 existem tanto em subpopulação de TCD4<sup>+</sup> como em TCD8<sup>+</sup>. Além disso, foi demonstrado que linfócitos T que expressam CR1 são maiores e mais granulados comparado aos linfócitos T em geral, indicando que os linfócitos T positivos para CR1 constituem uma população recentemente estimulada (RODGAARD et al., 1991).

## **2.10 Linfócitos T $\alpha\beta$**

As células T são responsáveis pela imunidade mediada por células (IMC) / hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) desenvolvida contra microrganismos intracelulares e extracelulares, como micobacterioses, leishmaniose e outras doenças. A resposta imune mediada por essas células ocorre através da imunidade adquirida e envolve interação específica entre os microrganismos (antígenos) e os receptores de células T (TCR). Os pacientes com hanseníase apresentam respostas das células T do tipo Th1 e Th2; e, de células B com produção de anticorpos anti-*M. leprae* (MODLIN, 2010).

Os linfócitos T e B desempenham papel fundamental na resposta imune do hospedeiro, uma vez que participam de mecanismos que levam ao desenvolvimento de resposta microbida ou humoral dentro do espectro da hanseníase (ISMAIL; BRETSCHER, 1999; NATH; SAINI; VALLURI, 2015; IYER et al., 2007). Os dois tipos principais de linfócitos T que são estudados mais

extensivamente são: 1) os linfócitos TCD4<sup>+</sup> do tipo Th1, associados com a forma tuberculoide da doença; 2) os linfócitos TCD4<sup>+</sup>Th2 associados com resposta desenvolvida durante a manifestação da forma virchowiana (ZHOU; ZHANG; AUNE, 2003; WALKER; LOCKWOOD, 2006; SPELLBERG; EDWARDS, 2001); e 3) os linfócitos T CD8<sup>+</sup> que são envolvidos, principalmente, com processos de citotoxicidade (PARIDA et al., 1992; AB et al., 1990).

### **2.11 Linfócitos T $\gamma\delta$**

Os linfócitos T $\gamma\delta$  foram descobertos em 1987 e foram assim denominados por expressarem as cadeias  $\gamma$  e  $\delta$  do TCR na sua superfície (BRENNER et al., 1987; BORST et al., 1987). As células T $\gamma\delta$  são um subconjunto com menor abundância na circulação, cerca de 1 a 5%, entre as células T circulantes, mas estão presentes em abundância no tecido linfóide da mucosa, nela compreendendo até 50% das células T. Os dois subconjuntos principais são células T V $\delta$ 1 e V $\delta$ 2 (CARDING E EGAN, 2002).

Essas células possuem a capacidade de reconhecerem antígenos não proteicos e moléculas induzidas pelo estresse via TCR, TLR e receptores de células NK como o NKG2D. Na maior parte das vezes, a ativação dessas células ocorre de forma indireta através da secreção de citocinas pró-inflamatórias pelas células dendríticas e devido ao seu fenótipo pré-ativado, a sua ativação ocorre de forma rápida. Destacam-se como funções efetoras para as células T $\gamma\delta$  a: morte de células infectadas via CD95-CD95L; TRAIL e perforinas e granzimas; síntese de citocinas (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-4, IL-5, IL-13, TGF- $\beta$ , IL-10); e, produção de substâncias líticas e/ou bacteriostáticas como granulinas e defensinas (BONNEVILLE; O'BRIEN; BORN, 2010).

### **2.12 Linfócitos T reguladores**

Os linfócitos T reguladores (Treg) abrangem cerca de 1% a 2% dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> no sangue periférico dos humanos e podem suprimir uma ampla variedade de células, sendo fundamental para manter a homeostase (BAECKER- ALLAN et al., 2001; SAKAGUCHI et al., 2010).

Os linfócitos Treg representam uma subpopulação de linfócitos com perfil fenotípico CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, os quais se envolvem na resposta imunopatológica da hanseníase. As citocinas TGF- $\beta$  e IL-10 são as principais envolvidas na

diferenciação celular, sob o controle da regulação do fator de transcrição FoxP3. Na hanseníase, os linfócitos Treg são as células responsáveis por manter o equilíbrio da resposta entre os linfócitos Th1 e Th2 (BOBOSHA et al., 2014; KUMAR et al., 2013; SAINI; RAMESH; NATH, 2014).

O trabalho de TAYLOR; CROSS; LLEWELYN (2011) demonstrou que linfócitos Treg CD8<sup>+</sup> isolados de humanos saudáveis, expressavam CD25 e FOXP3, além de produzirem IL-10 e apresentam funcionalidade de supressão quando estimuladas *in vitro*. Apesar das células Treg CD8<sup>+</sup> serem pouco exploradas em estudos disponíveis na literatura, a existência dessas células está bem estabelecida, uma vez que podem expandir após estimulação frente a diversos antígenos (TSAI; CLEMENTE-CASARES; SANTAMARIA, 2011).

### **2.13 Células natural killer (NK)**

As células NK foram a princípio identificadas em 1975 e foram descritas como linfócitos grandes e granulares, que apresentam citotoxicidade natural contra células tumorais (KIESSLING; KLEIN; WIGZELL, 1975). Posteriormente, passaram a ser classificadas como linhagem linfocítica distinta com funções efetoras específicas, compondo a linha de defesa inicial não somente contra tumores, mas também contra infecções (VIVIER et al., 2008). São classificadas como componentes da imunidade inata, porém possuem importante papel na modulação da imunidade adaptativa (ANDONIOU; COUDERT; DEGLI-ESPOSTI, 2008).

Essas células expressam em sua superfície um conjunto de receptores específicos denominados receptores de ativação ou de inibição, além de vários TLRs e CD16 (receptor para a porção Fc dos anticorpos). A resposta da célula NK ao estímulo depende da transdução de sinal desencadeada após ativação dos receptores específicos. Dessa forma, os receptores de inibição reconhecem moléculas de MHC de classe I expressas nas células-alvo, o que impede, na maioria das vezes, a ação das células NK sobre células próprias, a não ser que estejam alteradas como ocorre no desenvolvimento de tumores e infecções. Além disso, existe um limite crítico de sinalização em que a ativação dos receptores de ativação pode exceder a inibição desencadeada pelos receptores inibitórios, o que propicia a formação de uma resposta imune favorável (LANIER, 2008).

Via de regra, as células NK interagem não somente com células alteradas, mas também com outros leucócitos, incluindo macrófagos e células dendríticas e

essa interação pode ocorrer de forma direta através da ligação entre receptores ou de forma indireta, mediada pela ação das citocinas (MORETTA, 2002). Além das células NK serem descritas como linha de defesa inicial contra um microrganismo, auxiliando na resolução da infecção antes mesmo do desenvolvimento da imunidade adaptativa, e sua participação numa segunda exposição aos antígenos, atuando como células de memória (BIRON, 2010; PAUS; SENMAN; VON ANDRIAN, 2010).

#### **2.14 Células T *natural killer* (NKT)**

As células NKT, receberam esse nome devido a co-expressão do receptor de célula T (TCR) e receptores de superfície das células NK. Constituem uma pequena população de linfócitos T derivados do timo, restrita à apresentação antigênica via a molécula CD1 e subdividem-se em dois tipos: tipo 1 ou iNKT, por expressarem a cadeia  $\alpha$  do TCR invariante; e tipo 2, que possui maior repertório de TCR. Estas células fazem parte da imunidade inata por efetuarem morte rápida e produzirem citocinas sem a necessidade de extensiva diferenciação e divisão celular (BENDELAC; SAVAGE; TEYTON, 2007; BERZINS; SMYTH; BAXTER, 2011).

As NKT geralmente reconhecem antígenos de origem lipídica apresentados via CD1 expressos na superfície das células apresentadoras de antígenos. Em humanos e na maioria dos mamíferos, existem 5 isoformas da proteína CD1 (CD1a, b, c, d, e) (MOODY; ZAJONC; WILSON, 2005). As próprias células NKT são produtoras de IFN- $\gamma$  e exercem atividade citotóxica via perforina, CD95-CD95L e/ou TNF- $\alpha$  (BERZINS; SMYTH; BAXTER, 2011). Entretanto, merecem destaque pela habilidade em secretarem grandes quantidades de IL-4 e outras citocinas relacionadas ao padrão Th2 como IL-13 (YOSHIMOTO; PAUL, 1994).

#### **2.15 Linfócitos B**

As células B possibilitam a imunidade humoral específica ao antígeno, pela formação de anticorpos altamente específicos durante a resposta imune primária. Os linfócitos B no tecido linfóide do corpo: ossos, medula óssea, baço e linfonodos, proliferam-se e transformam-se em células plasmáticas pela ação de substâncias antigênicas, que por sua vez, produzem imunoglobulinas que se ligam a antígenos semelhantes (MARTIN; CHAN, 2006).

As células B são ativadas por microrganismos via receptor de célula B específico para antígeno (BCR) ou receptores de reconhecimento de padrões não específicos (NOTHELFER; SANSONETTI; PHALIPON, 2015).

Apesar das células B serem tradicionalmente conhecidas como precursoras das células plasmáticas secretoras de anticorpos, elas também podem atuar como células apresentadoras de antígenos (APC) e desempenhar um papel importante no início e na regulação da resposta das células T e B (MARTIN; CHAN, 2006; HAMPE, 2012).

## **2.16 Resposta imune humoral: Imunoglobulinas**

Uma das principais características da resposta imune humoral adaptativa é a seleção clonal de células B, um processo tipicamente dependente da ajuda das células T CD4, que leva à geração de anticorpos de alta afinidade (MESIN; ERSCHING; VICTORA, 2016). Enquanto IgM é o primeiro anticorpo produzido em uma resposta humoral, a troca de classe de imunoglobulina é um evento de maturação que envolve o rearranjo genético para gerar respostas de isotipo da imunoglobulina (subtipos de IgG, IgE ou IgA), que é regulado por ativadores de células B na presença de citocinas derivadas de células T. Essa troca de classe de imunoglobulina possibilita que os anticorpos aprimorem sua função efetora, contribuindo assim para a diversidade da resposta imune (TANGY et al. 2002, 2013; GOWTHAMAN; CHODISETTI; AGREWALA, 2010).

A imunoglobulina A (IgA) é o isotipo predominante de anticorpos no sistema imunológico de mucosa, a qual existe amplamente no trato gastrointestinal, trato respiratório, trato vaginal, lágrimas, saliva e colostro. Frequentemente a IgA sérica mostra uma estrutura monomérica, enquanto a IgA da mucosa é polimérica (LEONG; DING, 2014). Nos seres humanos, a IgA possui dois subconjuntos denominados IgA1 e IgA2 (WOOF; RUSSELL, 2011).

Apesar de ser um dos isotipos de anticorpos menos abundantes, a produção excessiva de IgE pode ter consequências graves quando desencadeia a anafilaxia, uma reação alérgica grave e com risco de vida (FINKELMAN et al., 2005).

Em humanos IgG1 e IgG3 compartilham as habilidades de poderem fixar complemento e se ligar a antígenos proteicos. Para humanos, embora os subconjuntos Th1 e Th2 tenham sido identificados com base em seus perfis de citocinas (Romafnani, 1991; Salgame et al., 1991). O requisito bem distinto para

mudança de isotipo, foi demonstrado por King e Nutman (1993), onde IL-4 regulou positivamente para os isotipos IgG4 e IgE.

### 3. JUSTIFICATIVA

O envolvimento do complemento em uma grande variedade de funções biológicas é bem estudado, desde seu envolvimento na neutralização e opsonização de estruturas estranhas e células apoptóticas, até na iniciação e direcionamento da imunidade adaptativa. O componente mais abundante do complemento é a proteína C3, da qual os primeiros produtos de clivagem são o peptídeo anafilatóxico C3a e o maior fragmento C3b. O C3b recém-gerado tem a capacidade de se ligar covalentemente à superfície de ativação e, além de ser um elemento indispensável da rota lítica, também serve como ligante para várias estruturas da membrana celular, incluindo o receptor do complemento Tipo 1 (CR1, CD35).

Além da regulação da atividade de convertases do complemento, o CR1 tem várias outras importantes funções. O CR1 humano expresso em eritrócitos desempenha um papel de depuração de complexos imunes (DUNKELBERGER; SONG, 2010; CRAIG; BANKOVICH; TAYLOR, 2002; HESS; SCHIFFERLI, 2003).

Em monócitos, macrófagos, granulócitos e neutrófilos medeiam a captação de partículas opsonizadas por complemento e imunocomplexos e na superfície de células dendríticas foliculares (CDF), o CR1 mantém antígenos opsonizados em forma nativa, acessível por um longo tempo que é importante para a manutenção da memória imunológica. Outra importante função para o CR1 demonstrou que a ligação cruzada de CD35 e CD21 em Células B humanas inibia a ativação e diferenciação para células produtoras de anticorpos, mediada por BCR. Embora o CR1 possua uma cauda intracelular contendo 38 resíduos de aminoácidos com um sítio de fosforilação caseína-quinase II, o qual poderia mediar eventos desinalização intracelular, não há trabalhos que demosntrem isso (LLOYD E KLINKSTEIN, 2000; LIU; NIU, 2009).

Trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo têm confirmado as descrições da literatura sobre a expressão diferencial de CR1 na superfície de eritrócitos de pacientes portadores de diferentes formas clínicas da hanseníase, associando uma menor quantidade de CR1 expresso na superfície destas células com a hanseníase per se e com a apresentação clínica da forma mais severa desta doença. Portanto, conhecer a relação da expressão de CR1 na superfície das demais células do sistema imunológico em associação com as formas clínicas da hanseníase, bem como a influência desta expressão na produção de

imunoglobulinas é de grande importância na complementação dos nossos estudos e nortearia os mesmos quanto ao(s) tipo(s) celular(es) expressando CR1 mais intimamente relacionados a esta doença e, potencialmente, envolvidos no direcionamento da resposta imune protetora ou susceptível à infecção por *M. leprae*.

#### **4. OBJETIVO GERAL**

Caracterizar a expressão de CR1 na superfície de subpopulações de linfócitos, bem como a produção de isotipos de imunoglobulinas nas manifestações clínicas da hanseníase.

##### **4.1 Objetivos específicos**

- 1) Avaliar o percentual de células TCD8<sup>+</sup>, TCD4<sup>+</sup>, T $\gamma\delta$ , TCD25<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, TCD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, NKT, NK e BCD5<sup>+</sup> e B nos grupos de pacientes com as diferentes formas clínicas e indivíduos controles;
- 2) Analisar o percentual de cada subpopulação de linfócitos expressando o receptor CR1 (CD35<sup>+</sup>) em pacientes portadores de diferentes formas clínicas da hanseníase e indivíduos controles;
- 3) Determinar a densidade molecular de CR1 expresso na superfície das subpopulações celulares de pacientes e controles;
- 4) Avaliar os níveis séricos de IgA, IgE, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub> nos grupos casos e controles;
- 5) Relacionar a expressão de CR1 nas subpopulações celulares com a manifestação clínica da doença por meio de análises estatísticas intra e inter grupos.

## **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 143, sendo 49 de sangue periférico de portadores da hanseníase, 119 plasmas e 24 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.

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.

Grupo Controle: 40 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 194/96, 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 (CEP) pela plataforma Brasil e aprovado sobre o CAAE: 32510914.7.0000.5244.

### **5.2 Obtenção das células 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 1 mL 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.

*M. leprae* é classificado como patógeno de risco Classe II de acordo com as Normas do Ministério da Saúde, por isso toda manipulação das amostras biológicas foi feita em condições estéreis, em capela de fluxo laminar e com uso de EPI (luvas, calça comprida, máscara e jaleco), exceto a contagem das células.

### **5.3 Fenotipagem celular, marcação de CR1 e análise por citometria de fluxo**

As PBMCs fracionadas (*ex vivo*) foram plaqueadas em placa de 96 poços com fundo arredondado (U), cinquenta mil células por poço (50.000 células/poço) e processadas para imunofluorescência com anticorpos monoclonais anti-“cluster of differentiation” (CD) conjugados a fluorocromos para fenotipagem celular e marcação de CR1 (CD35) na superfície das células, como especificado na Tabela 1. Foram adicionados 5µL de cada um dos anticorpos monoclonais específicos para cada subpopulação de células, incubados por 30 minutos a 4°C e, após esse período, foram feitas duas lavagens com o meio RPMI a 1000 x g a 4°C durante 10 minutos. As células foram fixadas com Max FacsFix (0,1M de NaCl, 1,0% de paraformaldeído e 47,65 mM de cacodilato de sódio, pH 7,2) e a determinação fenotípica foi realizada por citometria de fluxo (FACS Calibur - BD). As análises do percentual de células e da densidade molecular de expressão de CR1 sobre as células foram realizadas utilizando-se o programa Cell-quest Pro.

**Tabela 1:** Anticorpos monoclonais a serem usados para imunofenotipagem por citometria de fluxo.

<b>Anticorpos</b>	<b>Fluorocromos</b>	<b>Subpopulação celular</b>	<b>Fabricante</b>
<b>Anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD45.</b>	PE, FITC, PercP e APC	TCD4e TCD8	BD
<b>Anti-CD16 e anti-CD56</b>	FITC e PE	NK	BD
<b>Anti-CD3, anti-CD56 e anti-CD35</b>	PeCy5, FITC e PE	NKT CD35 <sup>+</sup>	BD
<b>Anti-CD3 e anti-T<math>\gamma\delta</math></b>	PeCy5 e FITC	T $\gamma\delta$	BD
<b>Anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD25</b>	FITC, PercP e PE	Treg CD4 <sup>+</sup>	BD
<b>Anti-CD5 e anti-CD19</b>	PE e FITC	Linfócito B ativados	BD
<b>Anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD35</b>	FITC, PercP e PE	TCD4 CD35 <sup>+</sup>	BD
<b>Anti-CD3, anti-CD8 e anti-CD35</b>	FITC, PercP e PE	TCD8 CD35 <sup>+</sup>	BD
<b>Anti-CD3, anti-CD8 e anti-CD25</b>	FITC, PercP e PE	Treg CD8 <sup>+</sup>	BD
<b>Anti-CD19 e anti-CD35</b>	FITC e PE	Linfócito B CD35 <sup>+</sup>	BD

#### **5.4 Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima (ELISA) de imunoglobulinas: IgA, IgE, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>**

As placas de ELISA de 96 poços foram sensibilizadas com o seguinte reagente doado gentilmente pelo BEI Resources, NIAID, NIH: *Mycobacterium lepra* phenolic glycolipid-1 (PGL-1), (NR-19342) na concentração de 2,0 µg/mL por poço em 100µL de tampão carbonato/bicarbonato 0,1M (pH 9,6) durante 18-20 horas à

4°C. Após a sensibilização foram adicionados os plasmas dos pacientes de hanseníase e controles em duplicatas, diluídos 1:10 em 100 µL tampão Tris/Tween 0,05% 15mM (pH 7,5) contendo 5,0% albumina de soro bovino (BSA – Sigma-Aldrich), e incubados durante 2 horas a 37°C. Após o período de incubação os anticorpos anti-imunoglobulinas (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub> – SoutherBiotec) foram diluídos em 100µL de Tris/Tween 0,05 % 15mM (pH 7,5) contendo 5,0% de BSA, e as placas foram novamente incubadas por 2 horas à 37°C. Posteriormente foram realizadas três lavagens com Tris/Tween 0,05% 15mM (pH 7,5), e adicionados estreptavidina-peroxidase diluída 1:2500 em 100µL de Tris/Tween 0,05% 15mM (pH 7,5) contendo 5,0% de BSA, e a placa foi incubada por 30 min à 37 °C. Após esse período, os poços foram lavados três vezes com Tris/Tween 0,05% 15mM (pH 7,5) e foi adicionada solução substrato ABTS (ácido 2,2 azinobis; 3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico) para revelar, e mantidas ao abrigo da luz durante 15 à 20 minutos. A leitura das placas foi realizada em leitor de placas (EPOCH- BioTek) e o filtro utilizado foi o de 405nm.

## **5.5 Análises estatísticas**

As análises estatísticas intra e intergrupos, para comparar o número de células, expressão de receptores CR1 e níveis de imunoglobulinas, foram realizadas utilizando-se o programa estatístico Prisma (GraphPad Prism 5.0), onde utilizamos as classificações de Madrid (1953) e da OMS (1982) para comparação de pacientes e controles. 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  $p < 0,05$ .

Para as análises das imunoglobulinas, foi realizada a média de cada paciente e esse valor foi dividido pela média do branco de cada placa de ELISA. Dessa forma, os valores de índice foram calculados e analisados estatisticamente.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Análises fenotípica de PBMC dos pacientes e controles

Células T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, T  $\gamma\delta$ , Treg CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, NKT, NK e B/CD5<sup>+</sup> foram analisadas dentro da população de linfócitos, quanto ao percentual de número de células e quanto ao percentual de número de células expressando CR1 (CD35) em pacientes e controles, e os percentuais foram determinados de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC - *Forward Scatter*) e granulocidade (SSC - *Side Scatter*) (**Figura 2**).

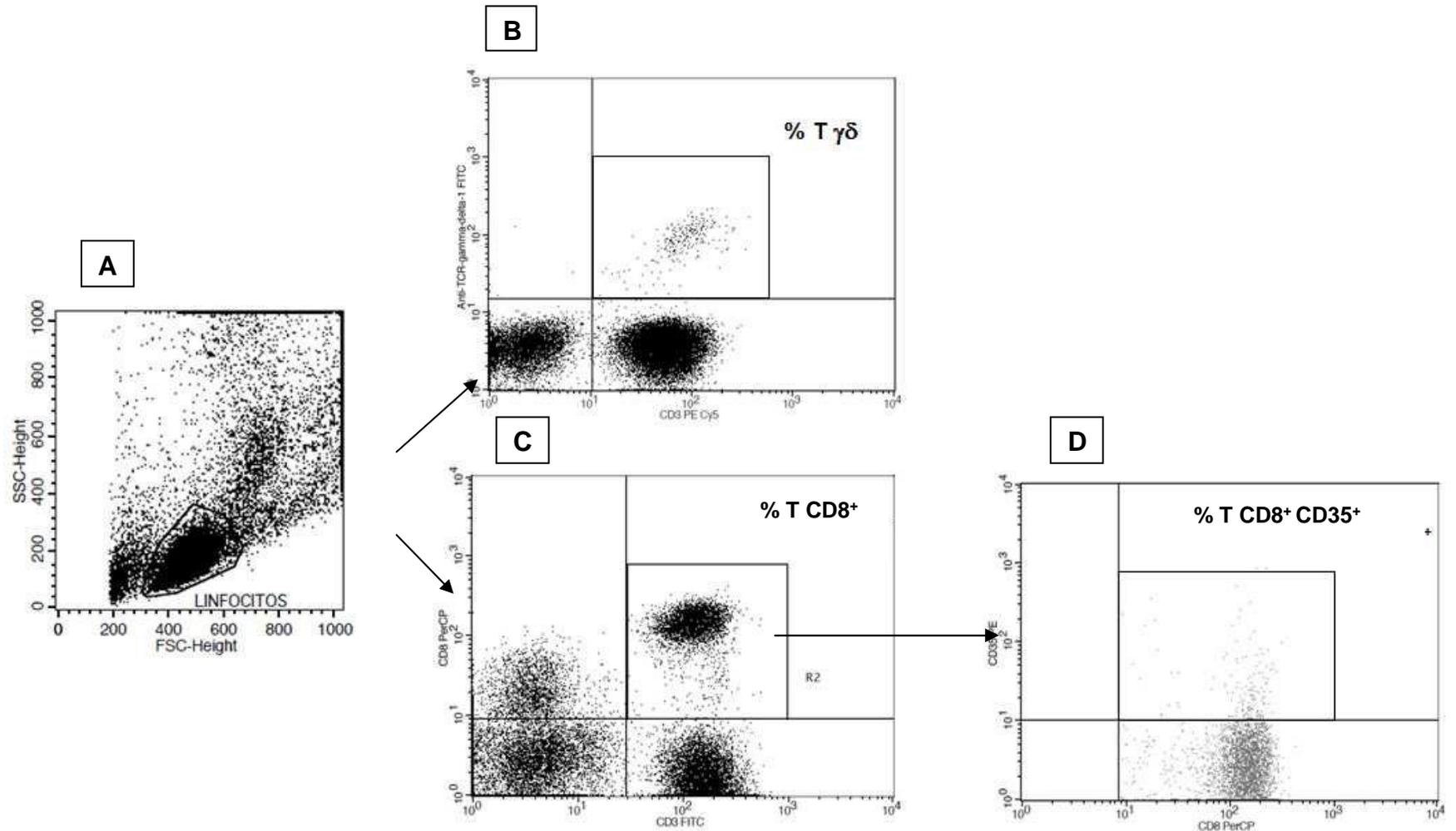
As células T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, foram definidas segundo suas expressões de CD3 $\epsilon$ , componente do complexo TCR; CD45 - antígeno comum de leucócitos (LCA); CD4, glicoproteína monomérica de 59kDa que contém quatro domínios (D1, D2, D3, D4) de tipo imunoglobulinas e CD8, glicoproteína transmembranar que atua como um co-receptor para o receptor de células T (TCR).

Enquanto as células T  $\gamma\delta$  foram caracterizadas segundo a expressão das moléculas CD3 $\epsilon$  e  $\gamma\delta$ , cadeias componentes do TCR (CD3<sup>+</sup> $\gamma\delta$ <sup>+</sup>).

As células T reguladoras foram caracterizadas pela marcação da molécula de CD25, que é o domínio  $\alpha$  do receptor de interleucina 2 (IL-2), é expresso em células T ativadas (Waldmann, 1989).

As células NK e NKT foram definidas segundo a expressão das moléculas CD3 $\epsilon$ , componente do complexo TCR; CD16, componente do receptor Fc do tipo Fc $\gamma$ III e CD56 - molécula de adesão à células neurais (NCAM).

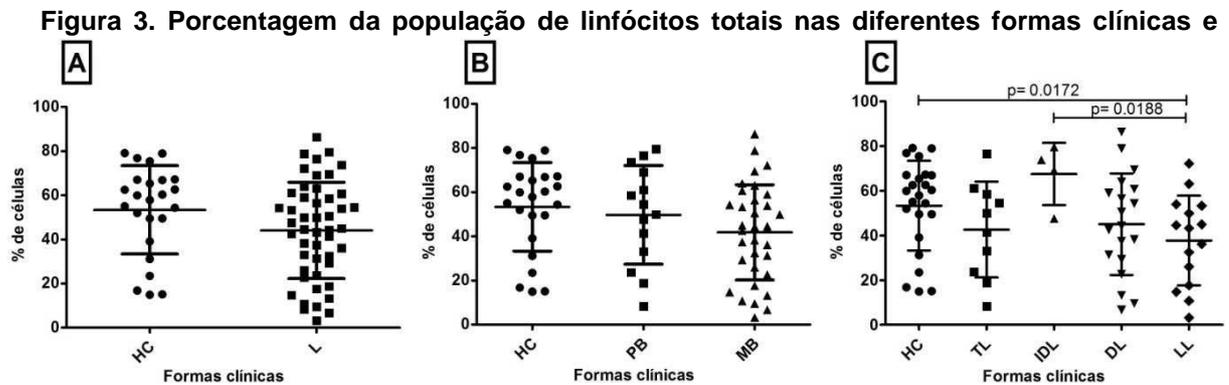
Os linfócitos B foram reconhecidos pelo CD19 sobre sua superfície, o qual é um membro da superfamília da imunoglobulina (Ig) expresso apenas nas células B e nas células dendríticas foliculares, dessa forma ele é considerado um marcador pan de células B (SADHU; MITRA, 2018). As células B ativadas (B1a) foram discriminadas, com o uso do CD5, as quais constituem 15–25% da população de células B em tecidos linfoides secundários e até 47% do total de células B no sangue periférico normal em adultos (ILHAN et al., 2007).



**Figura 2: Representação por dotplot de setagem celular por citometria de fluxo.** **A-** Gráfico de parâmetros de tamanho (FSC - *Forward Scatter*) e granulosidade (SSC - *Side Scatter*) destacando-se a área circundada (gate) que representa os linfócitos; **B-** Representação de uma marcação dupla positiva para linfócitos T  $\gamma\delta$ , destacando-se o quadrado superior a direita com a porcentagem de células duplamente positivas para os marcadores utilizados (Anti-TCR $\gamma\delta$  e Anti-CD3); **C e D-** exemplo de uma marcação tripla para linfócitos T CD8<sup>+</sup> CD35<sup>+</sup>, em **C** temos a porcentagem de linfócitos T CD8<sup>+</sup> com a marcação dupla de Anti-CD3 e Anti-CD8 e em **D** marcação de Anti-CD35 nos linfócitos, baseado no gate de TCD8<sup>+</sup> do gráfico **C**.

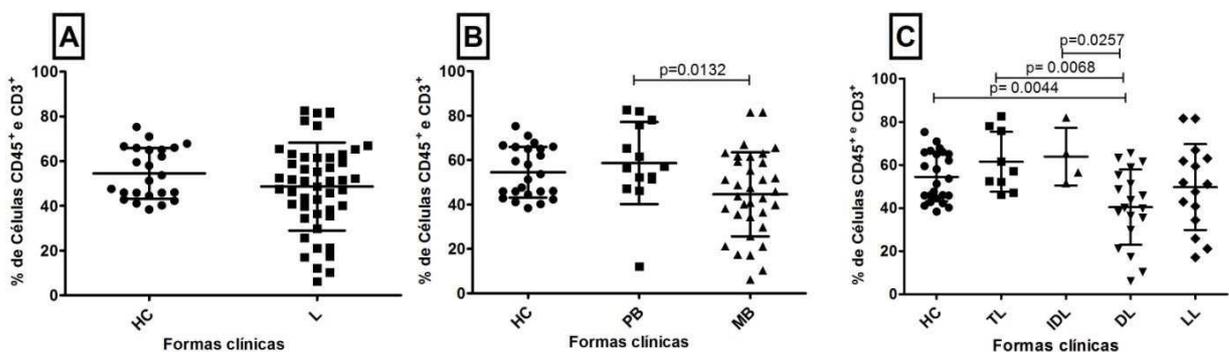
## 6.2 Quantificação do percentual das diferentes subpopulações de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) em pacientes e controles

Os gráficos da **Figura 3** apresentam os valores de porcentagem celular de linfócitos totais no sangue periférico dos indivíduos acometidos pelas diferentes formas clínicas da hanseníase e controles saudáveis. Na **Figura 3A** foi feita uma classificação categórica em nível de desenvolvimento da doença: L (com hanseníase) HC (controles). Na **Figura 3B** os pacientes foram agrupados de acordo com a classificação da OMS, em MB – multibacilar e PB – paucibacilar. Também não foram observadas diferenças significativas em relação ao percentual dessas células nesses grupos. No entanto, a fim de verificar mais especificamente dentro do espectro clínico da doença os pacientes foram agrupados segundo a classificação de Madrid (**Figura 3C**), onde LL são pacientes apresentando a forma virchowiana, DL – dimorfas, IDL – indeterminada, TL - tuberculoide e HC os controles. E de uma forma geral observou-se que os indivíduos da forma virchowiana possuem uma marcada redução do número de linfócitos totais quando comparado aos indivíduos controles e aos pacientes da forma indeterminada.



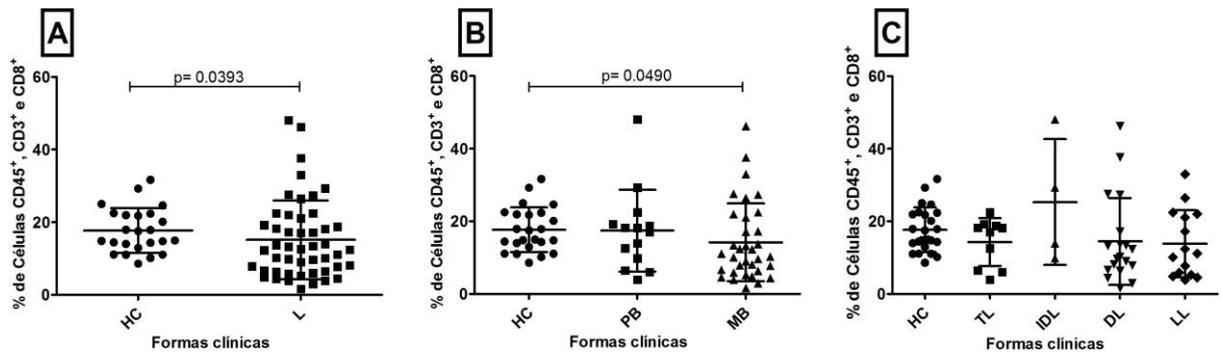
**individuos controles. A** – Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos controles e teste estatístico Mann-Whitney; **B** – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; **C** – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's.

As análises estatísticas de todas as células foram feitas de acordo com os mesmos agrupamentos da **Figura 3**. Podemos observar que não houve diferença estatística quanto ao percentual de linfócitos T totais entre pacientes (L) e controles (HC) (**Figura 4A**). No entanto, na **Figura 4B** observamos uma marcada redução do percentual de linfócitos T nos indivíduos com as formas mais severas da doença (MB) quando comparado aos indivíduos com a forma mais branda (PB). Na **Figura 4C**, podemos observar que os indivíduos apresentando a forma dimorfa (DL) apresentaram um percentual de linfócitos T totais reduzido quando comparado aos indivíduos tuberculoides (TL) e indeterminados (IDL) controles (HC).



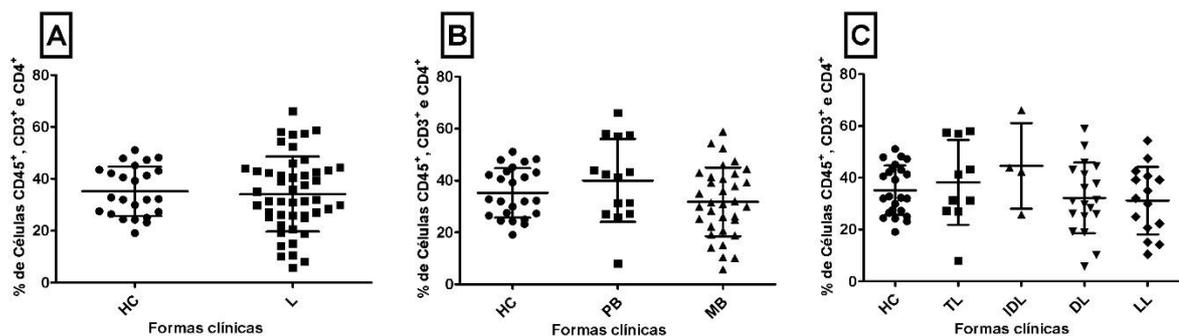
**Figura 4. Porcentagem da população de linfócitos T totais nas diferentes formas clínicas e indivíduos controles.** **A** – Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos controles e teste estatístico Mann-Whitney; **B** – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; **C** – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's.

Na **Figura 5**, avaliamos o percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup> dos pacientes e controles. Observamos que os indivíduos acometidos pela hanseníase possuem um menor percentual dessas células, comparado aos indivíduos controle (**Figura 5A**). E que essa redução do percentual de TCD8<sup>+</sup> dentre os portadores de hanseníase é mais evidente nos pacientes portadores das formas mais severas da doença, os multibacilares (MB), quando comparado aos controles (**Figura 5B**). Entretanto, quando comparamos os controles (HC) as formas clínicas não houve uma variação significativa em percentual dessas células (**Figura 5C**).



**Figura 5. Porcentagem da população de células TCD8<sup>+</sup> nas diferentes formas clínicas e indivíduos controles.** **A** – Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos controles e teste estatístico Mann-Whitney; **B** – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; **C** – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's.

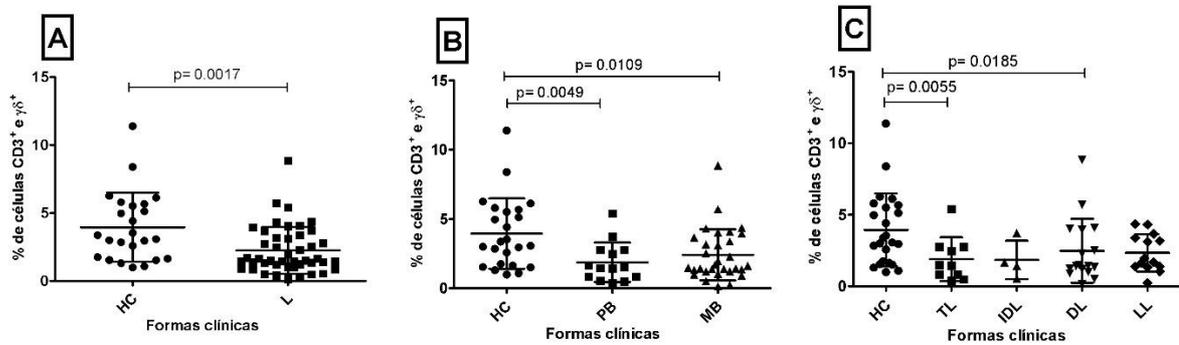
Quanto as células T CD4<sup>+</sup>, não houve uma variação significativa em percentual dessas células entre os indivíduos acometidos pela hanseníase e controles (**Figura A6**), como também quando analisado os grupos PB e MB (**Figura 6B**) ou em relação aos espectros clínicos (**Figura 6C**).



**Figura 6. Porcentagem da população de células TCD4<sup>+</sup> nas diferentes formas clínicas e indivíduos controles.** **A** – Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos controles e teste estatístico Mann-Whitney; **B** – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; **C** – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's.

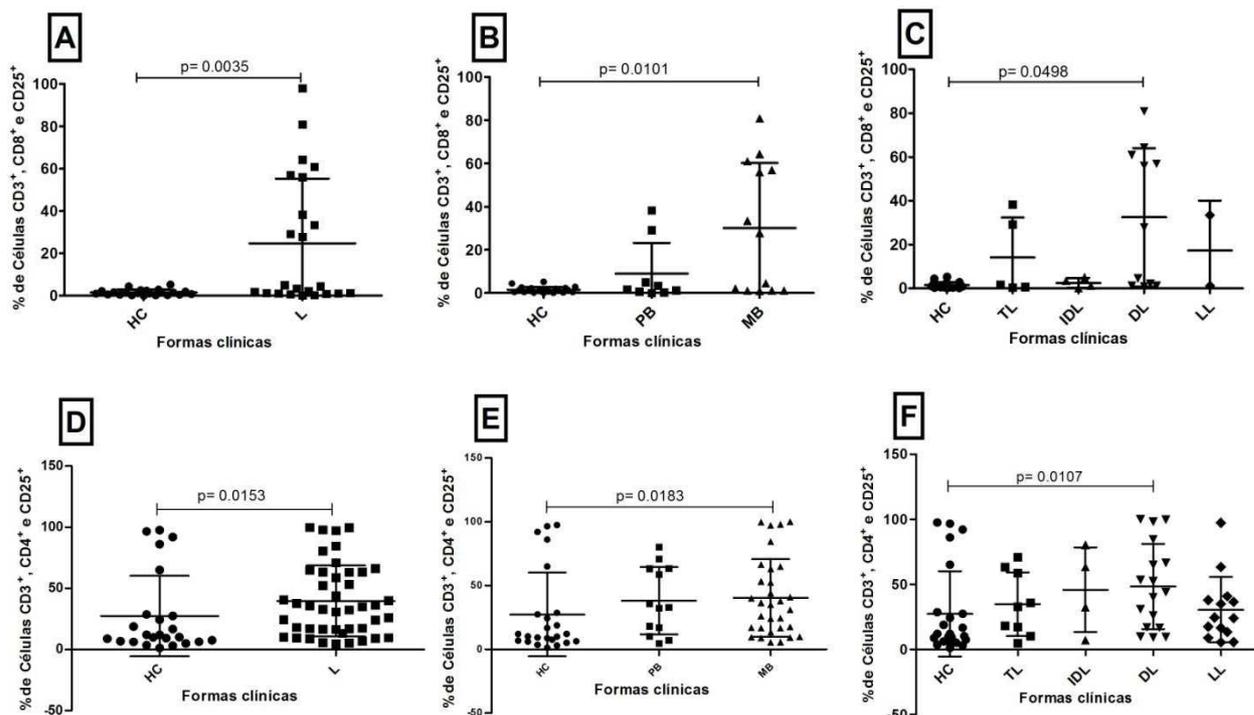
O número de linfócitos T $\gamma\delta$  dos indivíduos que desenvolveram a doença apresentaram uma marcada redução quando comparados aos indivíduos controles (**Figura 7A**). Quando avaliados quanto a severidade da doença, percebemos que tanto os indivíduos das formas paucibacilares como os portadores das formas

multibacilares, apresentaram uma nítida diminuição desses linfócitos quando comparados aos indivíduos controles (**Figura 7B**). Essa redução do percentual de linfócitos T  $\gamma\delta$  se manteve significativa nas formas tuberculoide e dimorfa em relação aos controles (**Figura 7C**).



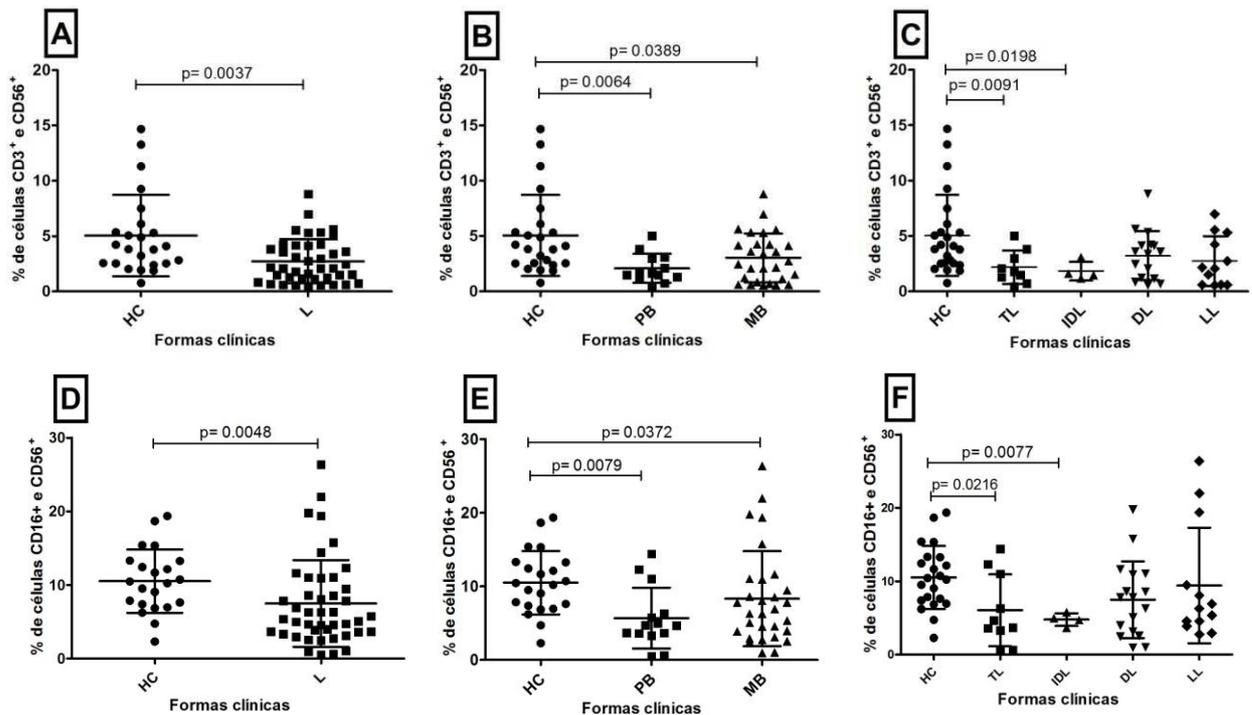
**Figura 7. Porcentagem da população de células T $\gamma\delta$  nas diferentes formas clínicas e indivíduos controles.** **A** – Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos controles e teste estatístico Mann-Whitney; **B** – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; **C** – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's.

As células Treg de um modo geral, apresentaram um aumento em seu número nos indivíduos acometidos pela hanseníase, em comparação aos controles (**figura 8 A/D**). Esse aumento pode ser visto também, quando foi realizado o agrupamento dos indivíduos de acordo com a OMS, onde os indivíduos MB apresentaram uma elevação significativa no número dessas células (**figura 8 B/E**) em comparação aos indivíduos controles. O aumento significativo foi visto estar relacionado aos indivíduos da forma dimorfa comparado aos indivíduos controles (**figura 8 C/F**).



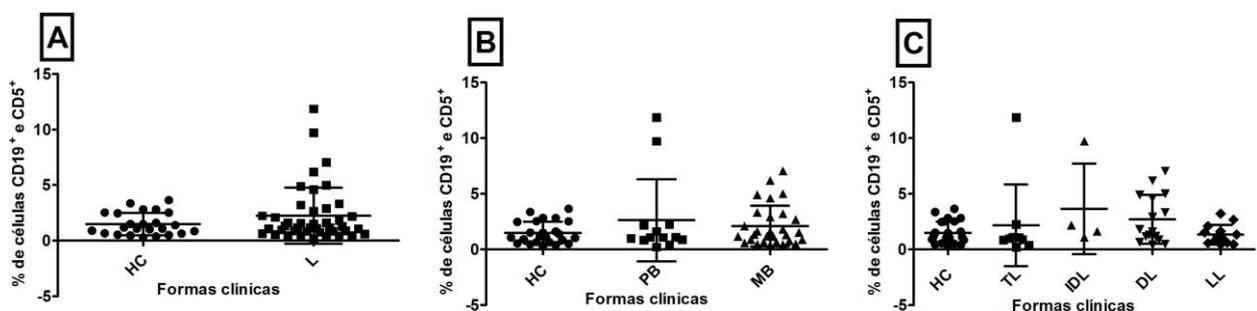
**Figura 8. Porcentagem da população de células T reguladoras CD8<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> nas diferentes formas clínicas da hanseníase e indivíduos controles. A e D** – Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Mann-Whitney; **B e E** – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; **C e F** – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's.

As células NKT e NK, apresentaram uma marcada redução, em número percentual, nos indivíduos acometidos pela hanseníase em relação aos indivíduos controle (**Figura 9 A/D**). Os grupos PB e MB também tiveram uma evidente redução do número percentual de células NKT e NK circulantes, quando comparado aos controles (**Figura 9 B/E**). Quando analisamos de acordo com as formas clínicas, segundo a classificação de Madrid podemos perceber que as formas clínicas tuberculoide e indeterminada, apresentaram uma redução significativa do percentual dessas células (**Figura 8C/F**).



**Figura 9. Porcentagem da população de células NKT e NK nas diferentes formas clínicas e indivíduos controles.** A e D – Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Mann-Whitney; B e E – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; C e F – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's.

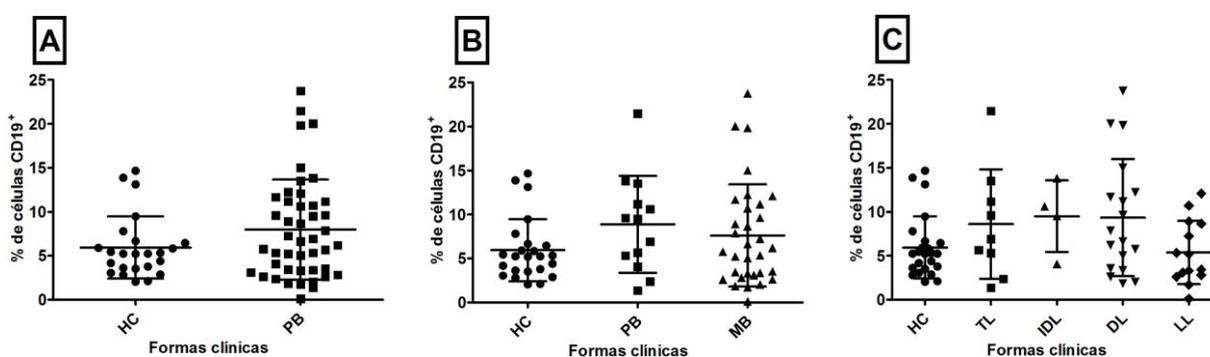
Na **Figura 10** observamos os dados referentes aos linfócitos B CD5<sup>+</sup> (linfócitos ativados). Observou-se uma discreta tendência do aumento do número dessas células nos indivíduos acometidos pela doença (**Figura 10**), no entanto essa diferença não foi significativa.



**Figura 10. Porcentagem da população de células B CD5<sup>+</sup> nas diferentes formas clínicas e indivíduos controles.** A – Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos controles e teste estatístico Mann-Whitney; B – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's.

por Dunn's; **C** – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's.

Da mesma forma que observado na **Figura 10**, os linfócitos B de indivíduos acometidos pela hanseníase, apresentaram-se em maior número do que os controles (**Figura 11A**), do mesmo modo que os indivíduos PB e MB apresentam essa leve tendência de terem seus linfócitos B aumentados em relação aos controles (**Figura 10B**), bem como o aumento no decorrer do espectro clínico, exceto pela forma clinica virchowiana, a qual teve uma discreta redução (**Figura 10C**), porém essas diferenças não foram significativas.



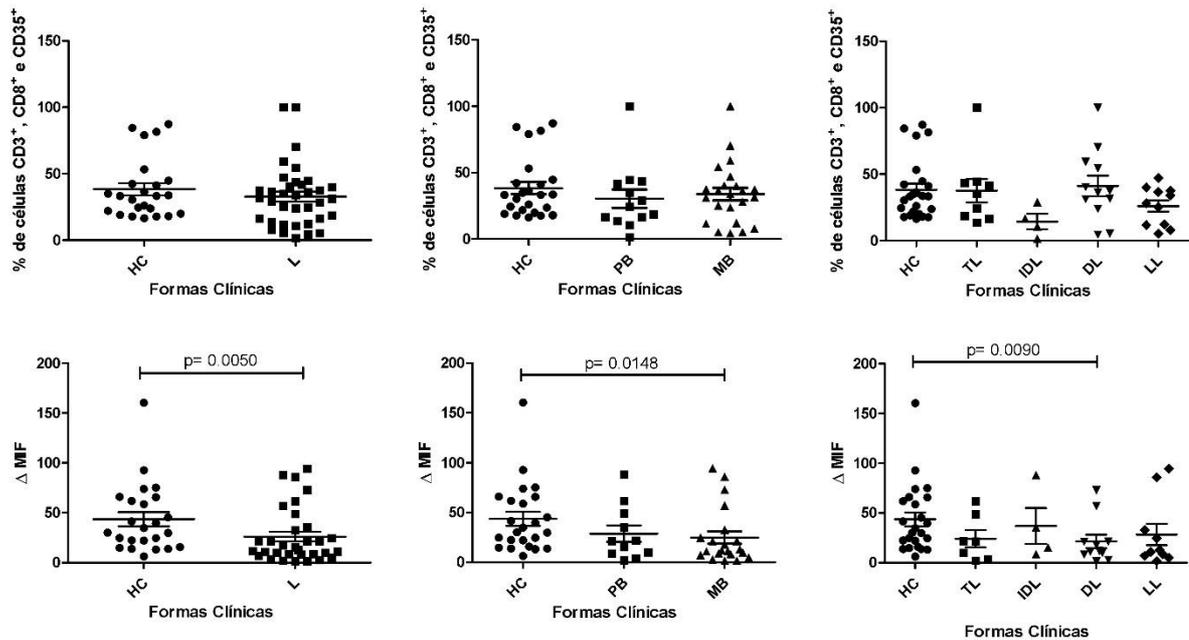
**Figura 11. Porcentagem da população de células B nas diferentes formas clínicas e indivíduos controles.** **A** – Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos controles e teste estatístico Mann-Whitney; **B** – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; **C** – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's.

### 6.3 Avaliação da expressão de receptores CR1 em diferentes subpopulações de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

A fim de verificar a diferença na expressão do receptor CR1 sobre as principais células do sistema imunológico, as células foram analisadas em relação ao percentual de células que expressaram CR1 e em relação a densidade desse receptor expresso na superfície dessas células.

Na **Figura 12** foram mostrados os gráficos referentes aos linfócitos T CD8<sup>+</sup> que expressaram o CR1, no qual podemos notar que não houve diferença significativa entre indivíduos acometidos pela doença ou controles saudáveis (**Figura 12 A, B e C**). Porém, quando avaliada a densidade molecular, ou seja, o

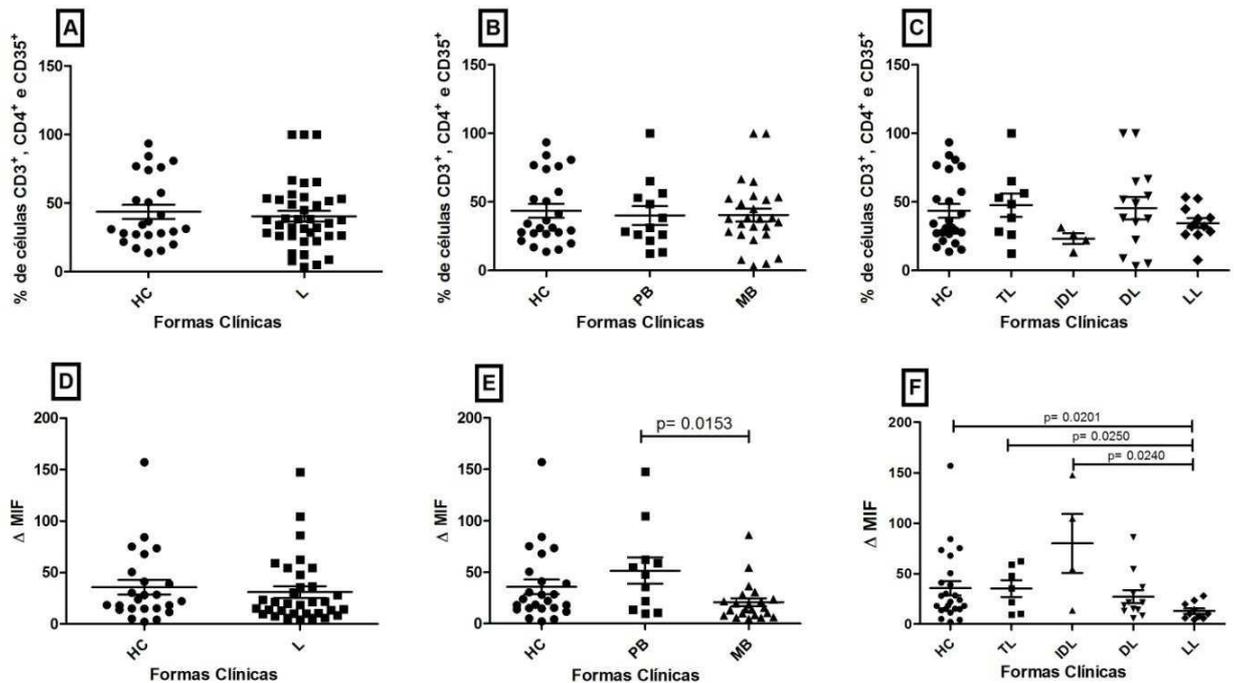
número de receptores sobre a superfície dessas células, podemos ver nitidamente que os indivíduos que desenvolveram a hanseníase apresentaram uma significativa redução do número de CR1 dispostos na superfície desses linfócitos quando comparados aos indivíduos controles (**Figura 12D**). E que essa redução do número de CR1 expresso na superfície de linfócitos TCD8<sup>+</sup> estava relacionada as formas mais severas (MB) da doença (**Figura 12E**), especificamente os portadores da forma clínica dimorfa (**Figura 12F**).



**Figura 12. Percentual de células que expressam CR1 e densidade molecular de receptores CR1 sobre a superfície de linfócitos TCD8<sup>+</sup> dos pacientes e indivíduos saudáveis, baseados no MIF (média da intensidade de fluorescência). A e D – Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Mann-Whitney; B e E – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; C e F – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoides, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's. Os gráficos A, B e C - são referentes a porcentagem de células que expressam o CR1 sobre sua superfície; enquanto os gráficos D, E e F - representam a densidade molecular de receptores CR1 expressos sobre a superfície celular.**

Em relação ao percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> que expressam o CR1, podemos notar que não houve uma diferença significativa entre indivíduos acometidos pela doença ou controles (**Figura 13 A, B, C e D**). Porém, quando avaliada a densidade molecular, pudemos ver nitidamente que os indivíduos das formas mais severas (MB) apresentaram uma redução do número de CR1

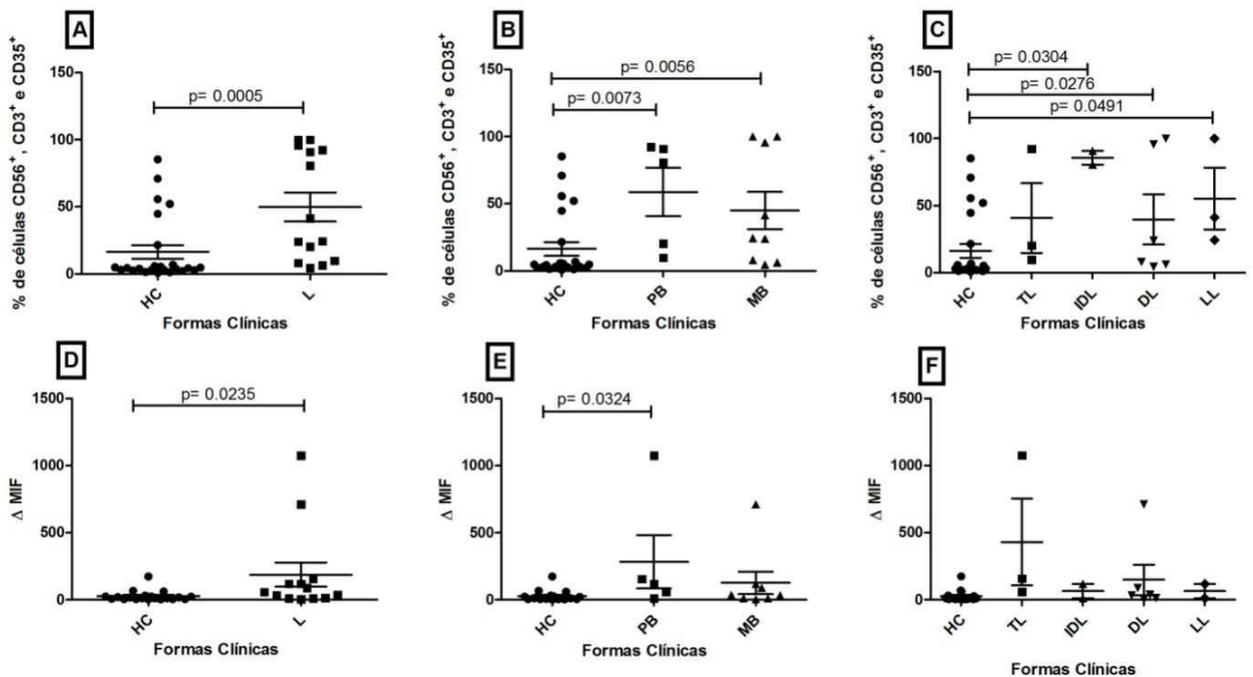
expresso, quando comparado aos indivíduos das formas mais brandas (PB) (**Figura 13E**), e quando desmembramos as observações em formas clínicas, fica claro que de fato a forma lepromatosa apresenta uma evidente redução na densidade molecular de CR1 expresso em células TCD4<sup>+</sup>, quando comparada aos indivíduos controles e formas tuberculoide e indeterminada (**Figura 13F**).



**Figura 13. Percentual de células que expressam CR1 e densidade molecular de receptores CR1 sobre a superfície de células TCD4<sup>+</sup> dos pacientes e indivíduos saudáveis, baseados no MIF (média da intensidade de fluorescência). A e D – Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Mann-Whitney; B e E – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; C e F – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's. Os gráficos A, B e C - são referentes a porcentagem de células que expressão o CR1 sobre sua superfície; enquanto gráficos D, E e F - representam a densidade molecular de receptores CR1 expressos sobre a superfície celular.**

O estudo das células T *natural killer* (NKT), mostrou que os indivíduos acometidos pela doença apresentaram um aumento no percentual de NKT que expressam o CR1 quando comparados aos indivíduos controles (**Figura 14A**); e ambos os indivíduos das formas PB e MB apresentaram essa elevação no número de células que expressam o CR1 (**Figura 14B**). Quando examinados pelas formas clínicas, percebemos que as formas severas (dimorfa e virchowiana) e o estágio inicial da doença (indeterminado) apresentaram valores significantes para essa elevação

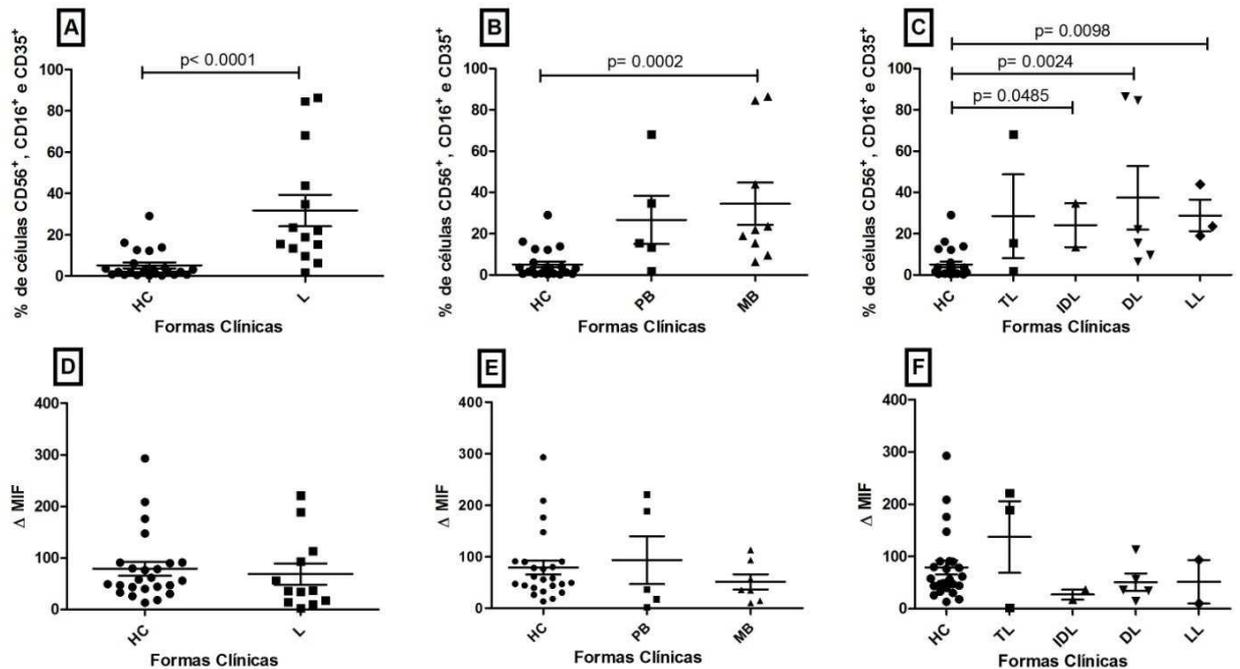
quando comparados aos controles (**Figura 14C**). A avaliação do número de receptores sobre a superfície dessas células, mostrou que existe um acentuado aumento do número de receptores CR1 nos indivíduos acometidos pela doença quando comparados aos controles (**Figura 14D**), e quando foram agrupados conforme a classificação da OMS percebemos que, os indivíduos da forma PB mostraram um aumento nessa expressão em relação aos indivíduos controles (**Figura 14E**). Embora não tenham ocorrido diferenças significativas entre as formas clínicas (**Figura 14F**).



**Figura 14.** Percentual de células que expressam CR1 e densidade molecular de receptores CR1 sobre a superfície de células NKT dos pacientes e indivíduos saudáveis, baseados no MIF (média da intensidade de fluorescência). **A e D** – Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Mann-Whitney; **B e E** – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; **C e F** – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's. Os gráficos **A, B e C** - são referentes a porcentagem de células que expressão o CR1 sobre sua superfície; que os gráficos **D, E e F** - representam a densidade molecular de receptores CR1 expressos sobre a superfície celular.

As análises das células *natural killer* (NK) mostraram que os indivíduos acometidos pela doença apresentaram um aumento do número de NK que expressam o CR1 quando comparados aos indivíduos controles (**Figura 15A**); embora haja uma tendência dos PB apresentarem um aumento no número de células

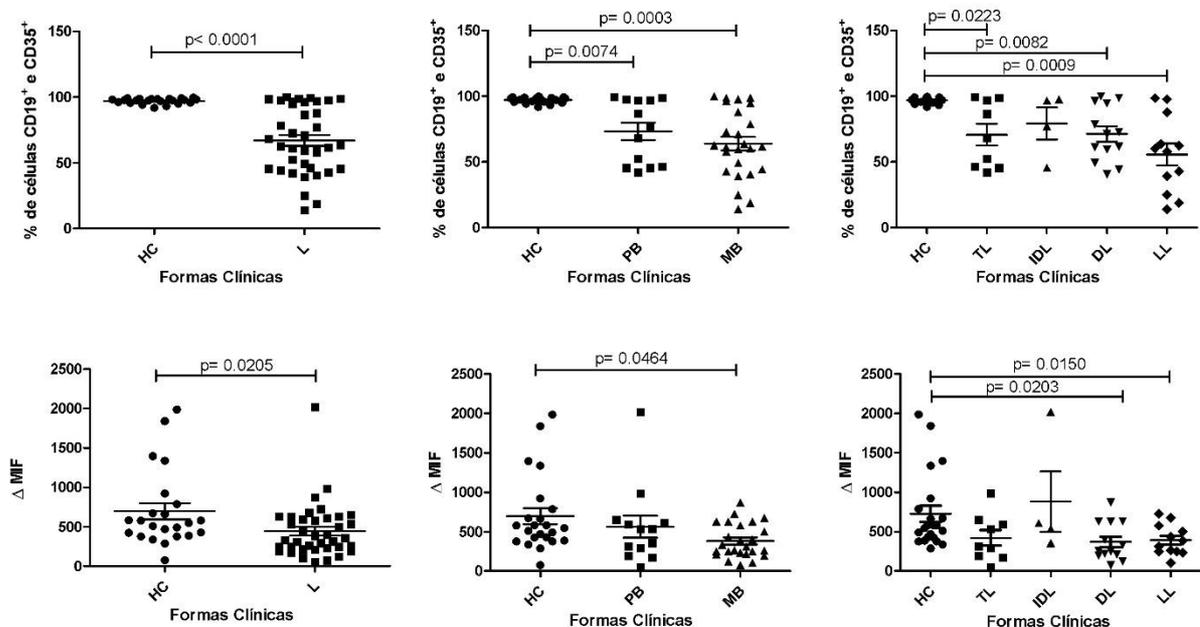
NK expressando CR1, os indivíduos das formas MB apresentaram valores significativos em relação a essa elevação no percentual de células que expressam o CR1 (**Figura 15B**); quando examinados pelas formas clínicas, percebemos que as formas severas (dimorfa e virchowiana) e o estágio inicial da doença (indeterminado) apresentaram valores significantes para essa elevação (**Figura 15C**), quando comparado aos controles. Porém, quando avaliados quanto ao número de receptores sobre a superfície, não apresentaram diferenças significantes (**Figura 15D-F**).



**Figura 15. Percentual de células que expressam CR1 e densidade molecular de receptores CR1 sobre a superfície de células NK dos pacientes e indivíduos saudáveis, baseados no MIF (média da intensidade de fluorescência). A e D – Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Mann-Whitney; B e E – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; C e F – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's. Os gráficos A, B e C - são referentes a porcentagem de células que expressão o CR1 sobre sua superfície; enquanto os gráficos D, E e F - representam a densidade molecular de receptores CR1 expressos sobre a superfície celular.**

Na **Figura 16**, podemos observar os dados referentes a expressão de CR1 nos linfócitos B, bem como a densidade desses receptores em sua superfície. Notou-se claramente uma redução do número de células B que expressam o CR1 nos indivíduos acometidos pela hanseníase, quando comparados aos controles (**Figura 16A**), e que esta redução está relacionada tanto paucibacilares como aos

multibacilares (**Figura 16B**). Considerando as formas clínicas na classificação de Madrid, podemos observar que essa redução se manteve nos indivíduos das formas tuberculoide dimorfa e virchowiana, comparado aos indivíduos controles. E essa redução se apresentou nas formas mais severas (LL e DL) bem como sobre os pacientes TL quando comparados aos controles (**Figura 16C**). Quando analisamos a densidade molecular de CR1 sobre essas células, também percebemos que houve uma redução da quantidade dos receptores CR1 em linfócitos B de indivíduos acometidos pela doença (L), em comparação aos controles (HC) (**Figura 16D**), sendo essa redução evidente nos pacientes multibacilares (MB) (**Figura 16E**). Na **figura 16F**, percebemos que esse padrão de redução se manteve nas formas severas, uma vez que as formas dimorfa e virchowiana tiveram uma redução em números de CR1, comparados aos controles.

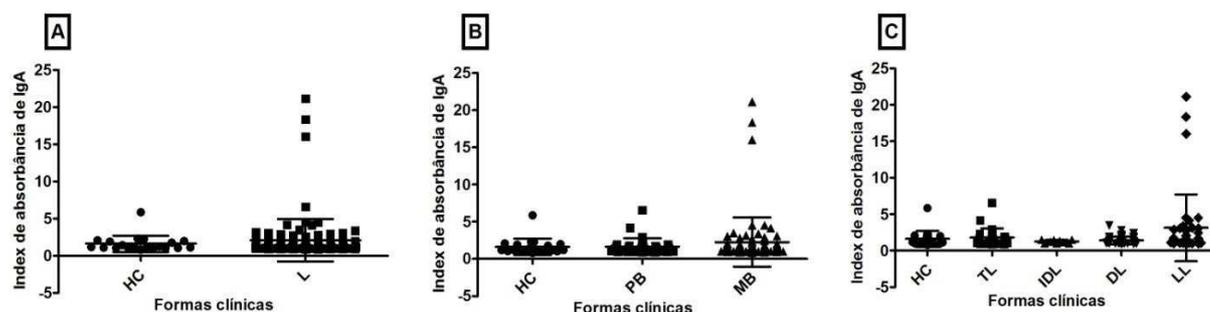


**Figura 16. Densidade de células que expressam CR1 e expressão de receptores CR1 baseados no MIF (média da intensidade de fluorescência) sobre a superfície de linfócitos B dos pacientes e indivíduos saudáveis. A e D – Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Mann-Whitney; B e E – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; C e F – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's. Os gráficos A, B e C - são referentes a porcentagem de células que expressão o CR1 sobre sua superfície; enquanto os gráficos D, E e F - representam a densidade molecular de receptores CR1 expressos sobre a superfície celular.**

## 6.4 Avaliação dos níveis de imunoglobulinas nos pacientes com diferentes formas clínicas e indivíduos controles

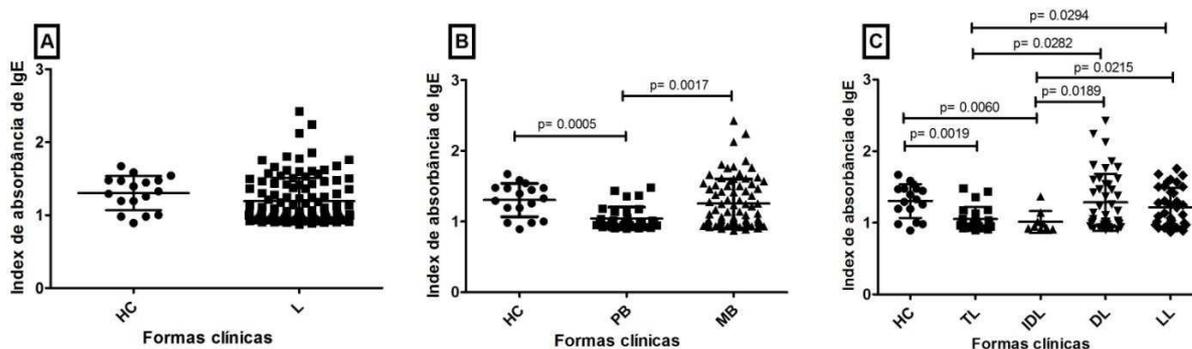
Os anticorpos (IgA, IgE, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) produzidos por plasmócitos foram avaliados no intuito de se identificar se existia variação na produção dos mesmos entre os pacientes com diferentes classificações clínicas da doença e os indivíduos controles.

Na **Figura 17**, observamos que a produção de anticorpos IgA nos indivíduos acometidos pela hanseníase e controles não apresentaram diferenças significativas.



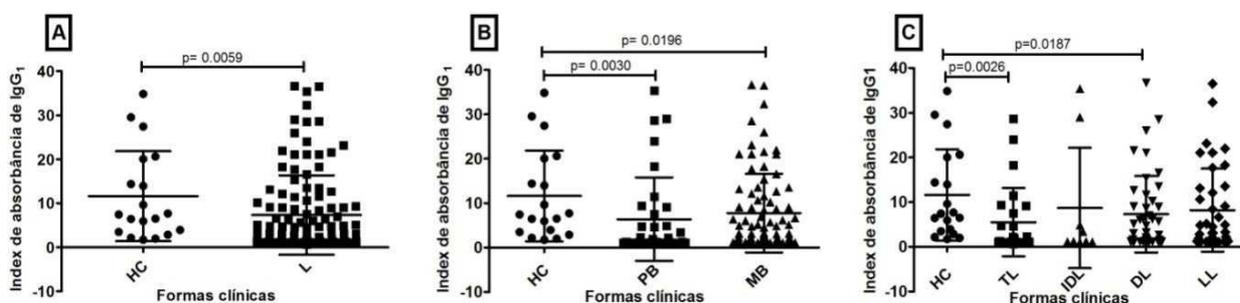
**Figura 17. Index de absorbância de IgA sobre a produção de anticorpos.** **A** – Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos controles e teste estatístico Mann-Whitney; **B** – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; **C** – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's.

Quando analisamos a produção de IgE no plasma proveniente do grupo de pacientes e controles, observamos que existe uma acentuada redução do número de anticorpos IgE nos indivíduos PB quando comparado aos apresentados pelos indivíduos controles e multibacilares (**Figura 18B**). De acordo a classificação de Madrid, observamos que as formas mais brandas (tuberculoide e indeterminada) apresentavam uma marcada redução do index de produção de IgE, quando comparadas aos controles e as formas mais severas da doença (dimorfa e virchowiana). (**figura 18C**).



**Figura 18. Index de absorbância de IgE sobre a produção de anticorpos.** **A** – Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos controles e teste estatístico Mann-Whitney; **B** – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; **C** – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's.

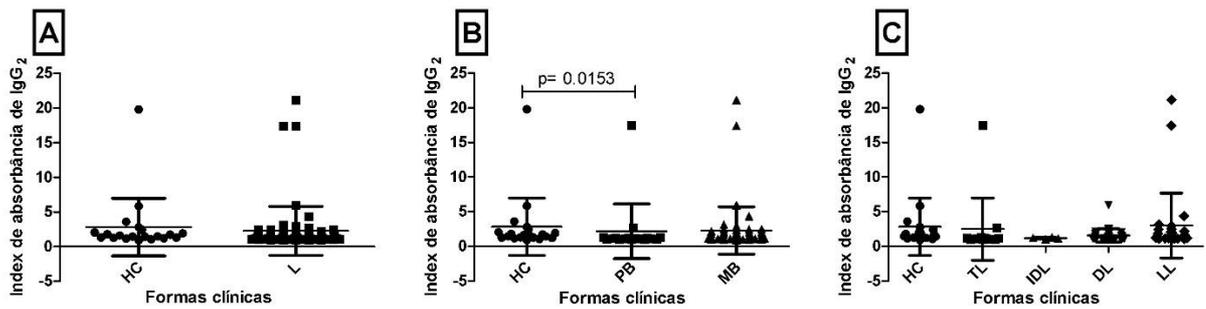
Ao analisarmos a produção de IgG<sub>1</sub>, observamos que existiu uma acentuada redução do número dessa imunoglobulina comparada aos controles (**Figura 19A**), e essa redução é apresentada tanto pelos indivíduos PB como MB em relação aos controles (**Figura 19B**). Quando verificamos as formas clínicas, podemos notar que essa redução se deu nas formas tuberculoide e dimorfa em relação grupo controle (**Figura 19C**).



**Figura 19. Index de absorbância de IgG<sub>1</sub> sobre a produção de anticorpos.** **A** – Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos controles e teste estatístico Mann-Whitney; **B** – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; **C** – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's.

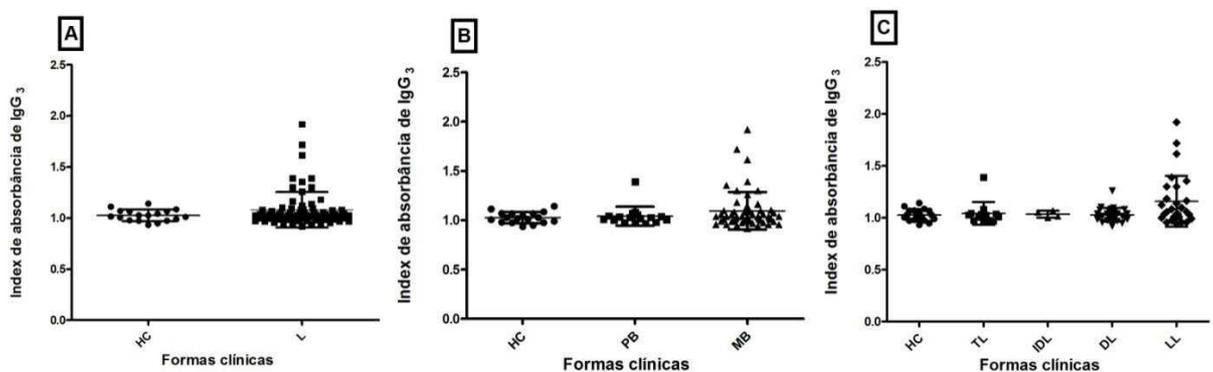
A imunoglobulina IgG<sub>2</sub>, apresentou uma redução em sua produção nas formas mais brandas da doença (PB) quando comparada aos controles (**Figura 20B**). Embora não tenha sido observado diferença significativa no index de imunoglobulinas IgG<sub>2</sub> entre os indivíduos acometidos pela doença em relação ao

controle e quando examinado as formas clínicas (**Figura 20AeC**).



**Figura 20. Index de absorvância de IgG<sub>2</sub> sobre a produção de anticorpos.** **A** – Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos controles e teste estatístico Mann-Whitney; **B** – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; **C** – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's.

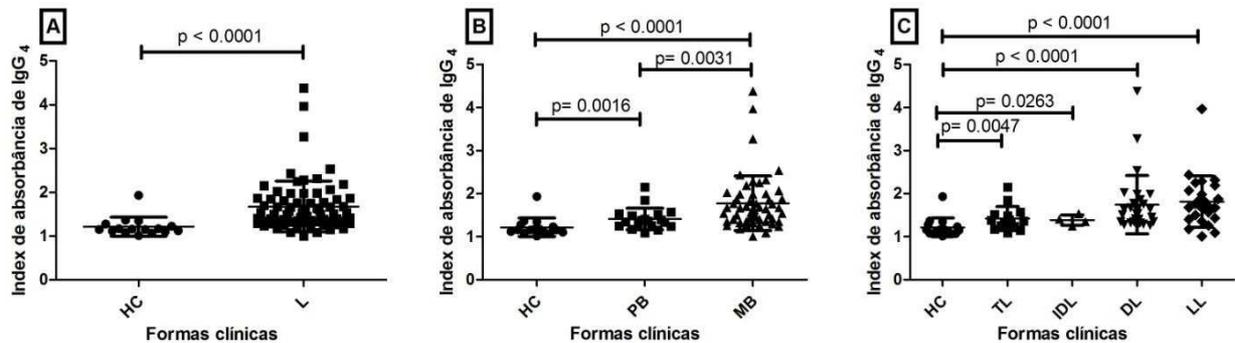
Na **Figura 21**, observamos que a produção de anticorpos IgG<sub>3</sub> nos indivíduos acometidos pela hanseníase e controles não apresentaram diferenças significativas.



**Figura 21: Index de absorvância de IgG<sub>3</sub> sobre a produção de anticorpos.** **A** – Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos controles e teste estatístico Mann-Whitney; **B** – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; **C** – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's.

Ao avaliarmos a produção de IgG<sub>4</sub>, percebemos que os indivíduos acometidos pela doença apresentam um aumento na produção dessa imunoglobulina (**Figura 22A**), bem como um marcado aumento da produção de IgG<sub>4</sub> nas formas MB, quando comparados aos controles e indivíduos das formas PB, muito embora os indivíduos apresentando formas PB também apresentaram

uma elevação significativa quando comparado ao controle (**Figura 22B**). Ao observar a produção de IgG<sub>4</sub> nas diferentes formas clínicas, é notável que as formas LL e DL (severas) apresentaram um aumento na produção de IgG<sub>4</sub>, não obstante, as formas IDL e TL também exibiram maior produção de IgG<sub>4</sub>, quando comparados aos indivíduos controles (HC) (**Figura 22C**).



**Figura 22. Index de absorbância de IgG<sub>4</sub> sobre a produção de anticorpos.** **A** – Classificação categórica: onde L – Desenvolvimento da doença, HC- Indivíduos controles e teste estatístico Mann-Whitney; **B** – Classificação OMS: MB- Multibacilares, PB- Paucibacilares, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's; **C** – Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepomatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL- Tuberculoide, HC- Indivíduos saudáveis (controle) e teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's.

## 7. DISCUSSÃO

A resposta imune inata, é a primeira linha de defesa contra *M. leprae*, sendo considerada um fator crucial para o desenvolvimento de uma resposta contra o bacilo, uma vez que possui componentes efetores essenciais para combater o patógeno e é capaz de direcionar a imunidade adaptativa (MODLIN, 2010). A maioria dos indivíduos expostos ao *M. leprae* não desenvolve a doença, o que pode ser explicado, pelo menos em parte, pela resistência inata fornecida pelo histórico genético do indivíduo (FITNESS; TOSH; HILL, 2002). Como os dados referentes ao percentual de linfócitos totais na literatura são escassos em relação à hanseníase, nossos dados mostraram-se como inovadores em caracterizar os percentuais dos mesmos ao longo do espectro clínico da doença, onde os indivíduos da forma LL (lepromatosa) apresentaram uma marcada redução de linfócitos quando comparados aos indivíduos das formas IDL e controles, o que sugerem que a baixa no números de linfócitos circulantes nessa forma clínica possa direcionar uma resposta deficiente do sistema imune, o que geraria possivelmente uma susceptibilidade para o desenvolvimento dessa forma lepromatosa (**Figura 3C**).

Experimentos realizados com pacientes da forma lepromatosa, revelaram que os valores percentuais médios de linfócitos T foram significativamente menores nesses pacientes em comparação com os valores médios de indivíduos controles (MENDES; KOPERSZTYCH; MOTA, 1974). Bullock et al. (1982) mostraram que pacientes com hanseníase não-reacionais apresentaram uma proporcional redução do valor absoluto do número de células T. Do mesmo modo, nossos resultados referentes a percentuais de células T, mostraram uma marcada redução em número dessas células em indivíduos multibacilares, quando comparados aos indivíduos apresentando a forma PB (**Figura 4B**) e comparados aos controles (**Figura 4C**), o que corrobora com as descrições da literatura, e dessa forma o estabelecimento das porcentagens de linfócitos T do sangue periférico, podem representar um método adicional de avaliação do status imunológico de pacientes com hanseníase, contudo possíveis mudanças nessas proporções durante o curso da doença, sua relação entre a duração a PQT necessitam ser esclarecidas.

As células T CD8<sup>+</sup> estão localizadas na periferia dos granulomas formados na infecção por hanseníase (MODLIN et al., 1983). No estudo de Balin et al. (2018),

foi sugerida uma função possível dessas células, na qual elas atuariam como “guardiãs” do granuloma, eliminando macrófagos infectados pelo bacilo, evitando a sua saída do granuloma, reduzindo assim a disseminação da infecção. O que se confirmou na **Figura 5** com os nossos dados sobre linfócitos T CD8<sup>+</sup>, uma vez que os indivíduos das formas mais severas (MB) apresentaram uma redução em número dessas células circulantes comparados aos controles (**Figura 5B**). Como na forma virchowiana (lepromatosa) prevalece a não formação de granulomas, então existe uma disseminação dos bacilos.

Linfócitos expressando TCR- $\gamma\delta$  estão envolvidos tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa e o seu subconjunto no sangue periférico (Vgamma9Vdelta2) mostra uma ampla reatividade contra agentes microbianos, autoimunidade e tumores (CARDING; EGAN, 2002; HAYDAY, 2009; ASOTHAI et al., 2015). As células T  $\gamma\delta$  produzem uma alta quantidade de IL-17, incluindo IFN- $\gamma$ , que contribuem para o recrutamento precoce de células efetoras para direcionar a depuração de patógenos, além dessas células reconhecerem os fosfoantígenos de *Mycobacterium* de maneira independente ao MHC e sofrerem proliferação *in vitro* (ROARK et al., 2008; MODLIN et al., 1988).

No estudo de MODLIN et al. (1988) observou 5-8 vezes mais frequência de células T  $\gamma\delta$  no sangue periférico e pele de reações granulomatosas em pacientes com hanseníase, enquanto porcentagem normal foi observada nos tecidos linfoides. Os mesmos autores também sugeriram que as células T  $\gamma\delta$  desempenham um papel crucial na estimulação da formação de granuloma em pacientes com hanseníase. SAINI et al. (2018) mostraram que as células T  $\gamma\delta$  aumentavam significativamente tanto em indivíduos com reação reversa (RR) quanto nos pacientes com eritema nodoso hansênico (ENH). Nossos dados sobre essas células são controversos a literatura, já que o indivíduos acometidos pela doença apresentaram uma marcada redução na porcentagem dessas células quando comparados aos controles (**Figura 7**). Uma possível razão, está no fato de que diferente do observado por SAINI et al, os indivíduos não apresentavam estágios reacionais. Porém, nossos dados se contrapõem aos obtidos por MODLIN et al. (1988), uma vez que as células T  $\gamma\delta$  parecem ter dificuldade em modular uma resposta Th1 efetora, e sua diminuição nas formas mais brandas não favorece estas formas clínicas da doença. A alta frequência de células T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> em pacientes PB, pode refletir a ativação imune e resposta mediada por células

nesses pacientes e foi relatado por FERNANDES et al. (2013). SCOLLARD et al. (2006) também observou que a alta frequência de células T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de maneira mais prevalentes em pacientes da forma LL. A infecção por *M. leprae* ainda permanece obscura, assim como a expansão do envolvimento sobre o papel de T reg na hanseníase. Entretanto, alguns trabalhos têm mostrado ser necessário saber como *M. leprae* pode modular o sistema imunológico a favor de sua sobrevivência, e, especulou-se que lipídios de origem micobacteriano podem ter uma função reguladora (BELKAID; TARBELL, 2009; DAGUR et al., 2012).

As células Treg podem favorecer a persistência de vários patógenos, como *Mycobacterium tuberculosis*. O número de células Treg aumenta no sangue e nos locais de infecção nos pacientes com tuberculose ativa (SCOTT-BROWNE et al, 2007; KURSAR et al., 2007; CHEN et al., 2007). Dessa forma, nossos resultados referentes aos linfócitos T reguladores CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> se mostram semelhantes àqueles descritos na literatura, já que os indivíduos das formas mais severas (MB) da hanseníase apresentaram uma elevada frequência no número de células T reg quando comparados aos indivíduos do grupo controle (**Figura 8**). Dessa forma podemos entender que os altos índices de bacilos que esses indivíduos apresentam podem estar influenciando na regulação da expansão de células Treg, como mecanismo de evasão da própria micobactéria.

As células NK exercem citotoxicidade espontânea não restrita ao MHC contra células neoplásicas e portadoras de patógenos, embora CD3<sup>-</sup> essas células compartilham muitas características com células T CD3<sup>+</sup> citotóxicas. Enquanto o número de células NK no sangue foi descrito por se manter similar em todo o espectro da hanseníase, foi relatado uma diminuição acentuada destas células na circulação quando os pacientes estavam com reação ENH (HUMPHRES; GELBER; KRAHENBUHL, 1982; SCOLLARD et al., 2006). Entretanto, essa situação inverteu-se quando a reação do ENH diminuiu. Humphres; Gelber; Krahenbuhl (1982) demonstraram que essa perda da atividade de NK sobre indivíduos com episódios de ENH era proveniente da atividade de monócitos que possuíam a capacidade de suprimir a atividade de NK nesses pacientes. As células NK parecem ser recrutadas para lesões LL injetadas com IL-2, onde podem ser responsáveis pela subsequente depuração local dos bacilos (KAPLAN et al., 1989). Dessa forma, os dados referentes as células NK são contrários, já que observamos uma marcada redução em número dessas células circulantes nos indivíduos

acometidos pela doença, quando comparado aos controles (**Figura 9**), e esses não apresentavam qualquer tipo de reação adversa. Portanto, presumimos que os monócitos podem estar influenciando nos no número dessas células, uma vez que os monócitos são as células alvo de *M. leprae*.

Há cerca de três décadas, o receptor CR1 foi identificado como mediador da entrada de *Mycobacterium leprae* em fagócitos (SCHLESINGER; HORWITZ, 1990) e várias funções de CR1 vem sendo descritas desde então.

A cultura de *M. leprae* acrescida de soro humano ativa o sistema complemento, tornando o bacilo opsonizado por fragmentos C3 que podem ser reconhecidos por CR1 e CR3, receptores do complemento e, após opsonização do patógeno, o mesmo pode ser fagocitado por monócitos humanos (TYAGI et al., 1990). Esses experimentos *in vitro* sugerem que a ativação *in vivo* do sistema complemento pode ser crítica para controlar tanto a carga de bacilos nos tecidos quanto os complexos imunes em circulação encontrados na forma mais grave da hanseníase (GOMES et al., 2008). Entretanto, MERLE et al. (2015) demonstrou que a ligação de CR1 em alvos revestidos por C3b para fagocitose não é suficiente para que a mesma ocorra. Porém, a ligação de CR1-C3b aprimora a fagocitose mediada por Fc $\gamma$ R de alvos carregados de IgG e C3b. Adicionalmente, os estudos em questão tendem sempre a reportar a capacidade de CR1 em facilitar a fagocitose de patógenos e até o momento a descrição de CR1 em células não apresentadoras de antígenos permanecem de maneira escassa.

O CR1 na superfície de células B se liga aos componentes do complemento C3b e C4b, atuando como um cofator para facilitar sua clivagem pelo fator I ao iC3b, um substrato para CR2 (CD21) e iC4b, respectivamente (MASAKI et al., 1992). Enquanto o CD21 promove a ativação das células B, o CD35 tem um efeito antagônico, suprimindo a ativação e proliferação das células B (JÓZSI et al., 2002). No estudo de RODGAARD et al. (1991) demonstrou que pessoas saudáveis apresentavam CR1 expresso na superfície de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>; e que esta expressão ocorria em cerca de 8% dos linfócitos T, tendo esta expressão possivelmente regulada.

Wagner et al. (2006) demonstraram que o tratamento de células T humanas periféricas não separadas e ativadas por CD3 durante cinco dias, e, com anticorpo anti-CR1 induzia funções reguladoras negativas associadas à diminuição da proliferação. TÖRÖK et al. (2015) demonstrou que o envolvimento de CR1 em

células Th ativadas via CD3 isoladas, seja por seu ligante natural ou por anticorpos específicos de CR1, elevaram os níveis de CD11a e CD25, bem como a expressão de granzima B. Além disso, os mesmos autores mostraram que a ligação do CR1 aumenta a produção de IL-10 e reduz a liberação de IFN $\gamma$  pelas células T CD4<sup>+</sup> na presença de IL-2. Dessa maneira, a inibição mediada por CR1 da proliferação de células T descrita por Wagner et al. (2006) possivelmente foi mediada pelas células Treg produtoras de IL-10 e pela ausência de IL-2.

Há evidências de que C3, ligante de CR1, desempenha um papel crítico no aprimoramento das respostas das células T a uma infecção bacteriana intracelular, promovendo a expansão proliferativa de células T CD8<sup>+</sup> desencadeadas por antígeno. Esse conceito foi proposto por NAKAYAMA (2009) com modelo de infecção por *Listeria monocytogenes*, a bactéria causadora da listeriose.

Nossos resultados, sobre a expressão de CR1 em linfócitos TCD8<sup>+</sup>, apresentaram uma marcada redução da densidade molecular desses receptores nos pacientes acometidos por hanseníase (MB e DL) quando comparados aos controles (**Figura 12**). Nossa hipótese é que essa marcada redução de expressão nos indivíduos acometidos pela hanseníase pode estar ajudando a reduzir a responsividade de células T, já que pouco CR1 estaria se ligando a C3, e conseqüentemente, evitando o favorecimento da ativação da cascata do complemento.

O CD35 (CR1) em Células T foi envolvido com a redução das taxas de proliferação e secreção de IL-2, bem como manter a célula em fase G1, o que acarreta numa inibição da proliferação celular de linfócitos T (Wagner et al., 2006). Kolev e colaboradores (2013) demonstraram que iC3b que se liga à CR1 só pode ser gerado subsequentemente após a geração e ativação de C3b, o qual é necessário para a estimulação de CD46 (receptor inibidor do complemento) e a indução de uma resposta Th1. Sugerindo assim, um modelo em que os primeiros fragmentos de ativação do complemento, por exemplo C3a e C3b, sustentam o modo efetor de células T, enquanto que os outros "produtos de degradação" envolvem receptores com capacidade reguladora negativa. Os dados obtidos quanto a densidade molecular de CR1 na superfície dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> são consistentes com os descritos na literatura, já que os indivíduos das formas mais severas (MB) apresentaram uma marcada redução da densidade molecular de CR1 quando comparados aos indivíduos das formas mais brandas e controles (**Figura**

**13E/F**). A pouca quantidade de CR1 expresso na superfície dessas células pode estar sustentando uma resposta de células T. Porém, isso não ocorre, uma vez que na forma lepromatosa prevalece uma resposta humoral de produção de anticorpos.

Os resultados referentes as células NKT e NK expressando CR1 são inéditos na literatura, dessa forma nossos dados são promissores uma vez que estamos inferindo que os indivíduos acometidos pela hanseníase apresentam um aumento do número destas células expressando CR1 quando comparados aos controles (**Figura 14A e 15A**). Adicionalmente, as células NKT apresentaram também um aumento da expressão de CR1 sobre sua superfície quando comparados aos controles (**Figura 14E**). Sendo assim, possivelmente as células NKT e NK que expressam o CR1 podem estar atuando em mecanismos que levem a progressão da doença. Isso precisa ser esclarecido futuramente, com a avaliação da produção de citocinas e dos mecanismos de citotoxicidade dessas células durante o curso clínico da doença.

Jozsi et al. (2002) mostrou que o receptor CR1 era capaz de mediar a inibição de proliferação de células B, ou seja, nossos resultados sobre os linfócitos B (**Figura 16**) confirmam que CR1 diminuiu a proliferação dessas células, uma vez que os indivíduos acometidos pelas formas MB apresentaram uma redução do número de células B que expressam o CR1, bem como na densidade desses receptores. Portanto, presumimos que essas formas terão mais ativação de linfócitos B, o que pode levar a uma maior produção de anticorpos.

Partindo desse pressuposto, as imunoglobulinas foram avaliadas nos indivíduos infectados por *M. leprae* e controles. A resposta imune humoral adaptativa é mediada por anticorpos secretados pelos linfócitos B. Os anticorpos (também chamados imunoglobulinas) podem ser classificados em classes distintas, ou isotipos, com base nas diferenças em suas regiões constantes da cadeia pesada, permitindo-lhes desempenhar funções biológicas distintas, que podem variar de benéficas como: neutralizar patógenos e manter a homeostase intestinal, até prejudiciais como: envolvimento em distúrbios autoimunes e alergias (MARICHAL et al., 2013; GALLI et al., 2016). Estudos de respostas de anticorpos concentram-se principalmente em sua utilidade como ferramenta sorológica de diagnóstico, com pouca atenção dada à esclarecer os níveis de isotipos e níveis de subclasses em relação à patogênese de doenças (HUSSAIN; KIFAYET; CHIANG,

1995).

Ferramentas de diagnóstico para ajudar na detecção precoce da hanseníase e fornecimento de tratamento adequado são de essencial necessidade, uma vez que visam interromper a progressão da doença em direção às deficiências físicas, as quais os indivíduos podem desenvolver (GOULART et al. 2008). Atualmente, o diagnóstico imunológico da hanseníase é tecnicamente inviável, tornando importante a necessidade de técnicas que possam ser sensíveis e rápidas para detectar todas as formas clínicas e de testes que possam ser aplicados na área de estudo (GELUK; DUTHIE; SPENCER, 2011, BAHMANYAR et al., 2016). Considerando também a nossa hipótese de que a produção de anticorpos seria elevada uma vez que o CR1 estaria modulando uma ativação maior de células B, uma vez que o CR1 estava sendo expresso em baixas quantidades. A dosagem de isotipos e níveis de subclasses de anticorpos foram realizadas nesse trabalho como intuito de entender a modulação da produção de anticorpos a respeito da progressão da doença e até mesmo a utilização de alguns subtipos de imunoglobulinas como marcadores da progressão da doença bem como possibilitar futuramente para diagnósticos.

Em relação à produção de IgE, já foi descrito na literatura que pacientes com hanseníase apresentaram níveis séricos de IgE aumentados durante a infecção por *M. leprae*. Quando o indivíduo recebe o tratamento, ele tem seus níveis estabilizados para níveis similares aos controles (ELLERTSEN et al., 2005). Níveis totais séricos de IgE foram relatados como normais em pacientes com hanseníase por alguns autores (GRABOSZ; DERBLOM; GODAL, 1973; LYNCH et al., 1983). Mas também como elevados em todas as formas clínicas da hanseníase (YOKOYAMA et al., 1979; SAHA; DUTTA; DAGUPGA, 1975;

PETCHCLAI et al., 1977; NUTI et al., 1982; SMITH et al., 1990), apenas na forma virchowiana (WRIGHT et al., 1985) ou em pacientes recém diagnosticados (Hamburguer et al., 1974).

Smith et al. (1990), ressalta que nenhuma outra infecção bacteriana foi relatada por promover a produção de IgE, e é possível que a hanseníase seja peculiar devido ao envolvimento proeminente da pele, uma vez que nervos e pele sejam acometidos pela doença. Isso por si só pode causar um aumento policlonal de IgE, como é o caso da dermatite atópica e outras doenças da pele (YUNGINGER, 1988; BAHNA, 1989). Além dessa, a IgE pode desempenhar um

papel dual, favorável ou desfavorável, na cronicidade da hanseníase.

Como o nível de síntese de IgE é regulado por fatores produzidos pelas células T que podem melhorar ou suprimir a síntese da mesma (ISHIZAKA, 1984), a doença, pelo menos do tipo virchowiano está associada à produção suprimida da citocina IFN $\gamma$  (NOGUEIRA et al., 1983). Essa última é responsável por regular negativamente a produção de IgE (DELPRETE et al., 1988). Dessa forma, nossos resultados sobre IgE (**Figura 18**) foram divergentes aos encontrados por outros autores na literatura, mesmo não tendo um consenso sobre a produção dessa classe de imunoglobulina na hanseníase. Porém, podemos entender que a baixa produção de IgE sobre as formas mais brandas (PB) comparadas aos controles (**Figura 18B**) pode ser pelo fato da resposta Th1 que essas formas possuem predominantemente, onde há elevada produção de IFN $\gamma$ , suprimindo a produção de IgE. Quando comparamos os indivíduos que apresentam forma severas (MB) aos PB, percebemos uma aumento da produção de IgE nessas formas, uma vez que na forma virchowiana, os indivíduos apresentam majoritariamente uma resposta do tipo Th2, a qual apresenta baixa produção da citocina IFN $\gamma$ , que pode estar influenciando na alta produção de IgE.

O estudo de HUSSAIN; KIFAYET; CHIANG (1995) demonstraram que os níveis de IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>3</sub>, foram aumentados durante a infecção por *M. leprae* em todo o espectro clínico da doença. Adicionalmente, os autores relataram que IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> possuíam uma relação com a carga bacteriana e que esses anticorpos poderiam ser marcadores para a progressão da doença. Amorim et al. (2019) mostraram que as formas multibacilares da hanseníase apresentaram uma maior produção de IgG<sub>1</sub> quando comparados aos indivíduos paucibacilares, mas que a IgG<sub>2</sub> apresentou uma significativa redução em seus níveis séricos quando comparados à indivíduos contactantes. Nossos resultados sobre IgG<sub>1</sub> (**Figura 19**) e IgG<sub>2</sub> (**Figura 20**) demonstraram que os indivíduos acometidos pela doença apresentaram níveis séricos de produção dessas imunoglobulinas reduzidos no decorrer do espectro da doença, comparado a indivíduos controles, o que em relação a IgG<sub>1</sub> é contrário ao descrito na literatura. Porém, a redução da produção de IgG<sub>1</sub> nas formas mais severas (MB) é menor do que o observado nas formas mais brandas (PB), o que mostra que por mais que diminua, ela poderia estar relacionada a progressão da doença já que esperava-se que os indivíduos das LL e DL tivessem uma maior produção desse anticorpo. Apesar disso, os dados sobre

as IgG<sub>2</sub> confirmam em parte os achados de Amorim et al. (2019). Nesse trabalho, nós comparamos os indivíduos com a doença sempre com indivíduos controles saudáveis e essa redução foi observada somente na **Figura 20B**. Porém, mesmo com essa variável, os contactantes não deixam de ser pessoas que não foram diagnosticadas com a hanseníase, e mesmo sendo expostas elas conseguiram apresentar valores séricos maiores, ou seja, diferentes aos observados em indivíduos acometidos pela hanseníase. Este fato permite inferir que nossos dados estejam de acordo com esse perfil dos indivíduos com hanseníase terem seus níveis séricos de IgG<sub>2</sub> reduzidos.

A mudança de isotipo de IgG foi demonstrada por King e Nutman (1993) em humanos experimentalmente pela utilização de IL-4, o qual demonstrou que esta citocina regula positivamente a troca de subclasse para IgG<sub>4</sub> e IgE. Em nossos resultados para as IgG<sub>4</sub> (**Figura 22A**), podemos perceber que houve um marcado aumento em seus níveis séricos de forma geral e quando avaliamos os dois grandes grupos referentes as formas clínicas (**Figura 22B**). Os indivíduos das formas mais severas da doença (MB) apresentaram elevado nível de produção de IgG<sub>4</sub> aumento em relação aos controles e até mesmo em relação as formas mais brandas (PB), o que pode ser explicado pelo fato das formas LL e DL (**Figura 22C**) apresentarem uma resposta preferencialmente do perfil Th2. Nesse contexto, a IL-4 é altamente produzida por células T, o que acabam que regulam positivamente para uma alta produção de IgG<sub>4</sub> nesses indivíduos, levando a um aumento desta subclasse de imunoglobulinas de forma gradual de acordo com espectro clínico. Sendo assim, apontamos para que novos estudos sejam realizados a fim de embasar a adoção de IgG<sub>4</sub> como marcador de progressão da hanseníase.

## CONCLUSÃO

- Indivíduos portadores de hanseníase apresentam percentuais de linfócitos totais e T diminuídos;
- O percentual de células imunes expressando CR1 apresentou-se diminuído nos casos em relação aos controles em células B. Mas aumentados sobre NKT e NK, sendo este dado inédito;
- A densidade de CR1 em células T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e B, apresentou-se diminuída, enquanto que para as células NKT foram aumentadas de forma estatisticamente significativa;
- A produção de anticorpos apresentou-se de forma diminuída nos indivíduos acometidos pela hanseníase, exceto a IgG<sub>4</sub>.
- IgG<sub>4</sub> parece promissor como marcador de progressão da doença. Seu uso deve ser mais estudado para que no futuro possa contribuir com o manejo clínico da doença.
- A utilização de CR1 como assinatura imunológica de valor prognóstico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

<[http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/sinannetbd/hanseniaase/hans\\_indicadores.htm](http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/sinannetbd/hanseniaase/hans_indicadores.htm)>

Acesso em janeiro de 2020.

A. T. Diagnóstico In: TALHARI, S.; PENNA, G. O.; GONÇALVES, H. S.; OLIVEIRA, M. L. W. HANSENÍASE 5.a. ed Manaus: **Divilivros**. 13:157-172. 2015.

AB, BK et al. Induction of antigen-specific CD4+ HLA-DR-restricted cytotoxic T lymphocytes as well as nonspecific nonrestricted killer cells by the recombinant mycobacterial 65-kDa heat-shock protein. **Eur J Immunol**. [s. l.], v. 20, n. 2, p. 369–77, 1990, doi:10.1002/eji.1830200221

ABULAFIA, J. M. D.; VIGNALE, R. <sup>a</sup> M. D. Leprosy: pathogenesis updated, **Int J Dermatology** 38: 321-334. 1999.

**Am. J. Trop. Med. Hyg.** [s. l.], v. 78, n. 4, p. 605–610, 2008.

AMORIM, FM et al. Differential immunoglobulin and complement levels in leprosy prior to development of reversal reaction and erythema nodosum leprosum. **PLoS ANDONIOU, CE; COUDERT, JD; DEGLI-ESPOSTI, MA. Killers and beyond:**

ARAÚJO, MG. Hanseníase no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** Uberaba, v.36, n.3, p. 373-382, 2003.

ASOTHAI, R et al. Distinctive Treg associated CCR4-CCL22 expression profile with altered frequency of Th17/Treg cell in the immunopathogenesis of Pemphigus Vulgaris. **Immunobiology**. [s. l.], v. 220, p. 1129- 1135, 2015.

autoimmunity: learning “self”-control from experience. **Cell Mol Life Sci**. [s. l.], v. 68, n, 1, p. 3781–3795, 2011.

BAECHER-ALLAN, C et al CD4+ CD25high Regulatory Cells in Human Peripheral Blood. **J Immunol**. [s. l.], v. 167, p. 245–1253, 2001.

BAHMANYAR, ER et al. Leprosy diagnostic test development as a prerequisite towards elimination: requirements from the user’s perspective. **PLoS Negl Trop Dis**. [s. l.], v. 10, n. 2,p. e0004331, 2016.

BAHNA, SL. A 21-year salute to IgE. **Ann Allergy**. [s. l.], v. 62, p. 471-8, 1989.

BALIN, SJ et al. Human antimicrobial cytotoxic T lymphocytes, defined by NK

receptors and antimicrobial proteins, kill intracellular bacteria. **Sci Immunol.** [s. l.], v. 3, n. 26, p. eaat7668, 2018, doi: 10.1126/sciimmunol.aat7668.

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.

BELKAID, Y; TARBELL, K. Regulatory T Cells in the Control of Host- Microorganism Interactions. **Annu Rev Immunol.** [s. l.], v. 27, p. 551–589, 2009.

BENDELAC, A; SAVAGE, BP; TEYTON, L. The Biology of NKT Cells. **Annu. Rev. Immunol.** [s. l.], v. 25p. 297–336, 2007.

BERZINS, SP; SMYTH, MJ; BAXTER, AG. Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. **Nat Rev Immunol.** [s. l.], v. 11, n. 2, p. 131-42, 2011.

BIRON, CA. Expansion, maintenance, and memory in NK and T cells during viral infections: responding to pressures for defense and regulation. **PLoS Pathog.** [s. l.], v. 6, n. 3, p. e1000816, 2010.

BOBOSHA, K et al. T-cell regulation in lepromatous leprosy. **PLoS Negl Trop Dis.** [s. l.], v. 8, n. 4, p. e2773, 2014, doi:10.1371/journal.pntd.0002773.

BONNEVILLE, M; O'BRIEN, RL; BORN, WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. **Nat Rev Immunol.** [s. l.], v. 10, n. 7, p. 467-78, 2010.

BORST, J et al. A T-cell receptor gamma/CD3 complex found on cloned

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

BRENNER, MB et al. Two forms of the T-cell receptor gamma protein found on peripheral blood cytotoxic T lymphocytes. **Nature.** [s. l.], v. 325, n. 6106, p. 689- 94, 1987.

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

BULLOCK, WE ET AL. Aberrant immunoregulatory control of B lymphocyte function in lepromatous leprosy. **Clin. Exp. Immunol.** [s. l.], v. 49, n. 1, p. 105- 114, 1982.

CARDING, SR; EGAN, PJ. [Gamma][delta] T cells: functional plasticity and heterogeneity. **Nat Rev Immunol.** [s. l.], v. 2, n. 5, p. 336–45, 2002

CHEN, X et al. CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells suppress Mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease. **Clin. Immunol.** [s. l.], v. 123, p. 50–59, 2007.

COHEN, JHM et al. Human T lymphocytes expressing the C3b/C4b receptor type one (CR1, CD35) belong to Fet receptor- positive CD4-positive T cells. **Cell Immuno.** [s. l.] v.121, n. 2, p. 121:383-390, 1989.

COSIO, et al. Evaluation of the mechanisms responsible for the reduction in erythrocyte complement receptors when immune complexes form in vivo in primates. **J. Immunol.** [s. l.], v. 145, p. 4198–4206, 1990.

CRAIG, ML; BANKOVICH, AJ; TAYLOR, RP. Visualization of the transfer reaction: tracking immune complexes from erythrocyte complement receptor 1 to macrophages. **Clin. Immunol.** [s. l.], v. 105, n. 1, p. 36–47, 2002.

DAGUR, PK et al. Phenolicglycolipid- 1 and lipoarabinomannan preferentially modulate TCR- and CD28- triggered proximal biochemical events, leading to T-cell unresponsiveness in mycobacterial diseases. **Lipids Health Dis.** [s. l.], v. 11, p. 119, 2012.

Datasus/SINAN(2018)

DE SOUSA Jr, J.; SOTTO, MN; SIMÕES QUARESMA, JA. Leprosy as a complex

DELPRETE, G et al. IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants. **J Immunol.** [s. l.], v. 140, p. 4193-8, 1988.

DNS. Serviço Nacional De Lepra. Manual de leprologia. Rio de Janeiro: Departamento Nacional de Saúde. 1960.

DUNKELBERGER, JR; SONG, WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell Res.** [s. l.], v. 20, n. 1, p. 34–50, 2010.

DWYER, JM; BULLOCK, WE; FILDS, JP. Disturbance of the blood T. B lymphocytes ratio in lepromatous leprosy. **New Engl. J. Med.**, USA, v. 288, n. 20, p. 1036-1039, 1973.

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

- ELLERTSEN, L et al. Allergic Sensitisation in Tuberculosis and Leprosy Patients. **Int Arch Allergy Immunol.** [s. l.], v. 138, p. 217-224, 2005, doi: 10.1159/000088722.
- FACER, P ET. al. Do nerve growth factor-related mechanisms contribute to loss of cutaneous nociception in leprosy? **Pain.** v. 85, p. 231–8, 2000. doi:10.1016/S0304-3959(99)00273-0.
- FANG, Y. et al. Expression of complement receptors 1 and 2 on follicular dendritic cells is necessary for the generation of a strong antigen-specific IgG response. **J. Immunol.** [s. l.], v.160, n. 11, p. 5273–5279, 1998.
- FERNANDES, C et al. Increased frequency of CD4 and CD8 regulatory T cells in individuals under 15 years with multibacillary leprosy. **PloS one**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. e79072, 2013, doi:10.1371/journal.pone.0079072.
- FINKELMAN, FD et al. Molecular mechanisms of anaphylaxis: lessons from studies with murine models. **J Allergy ClinImmunol.** [s. l.], v. 115, p. 449-457, 2005.
- FITNESS, J; TOSH, K; HILL, AVS. Genetics of susceptibility to leprosy. **Genes Immun.** [s. l.],v. 3, n. 8, p. 441–53, 2002, doi:10.1038/sj.gene.6363926
- FONSECA, AB et al. The influence of innate and adaptative immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy. **Infect Dis Poverty.** [s. l.], v. 6, n. 1, p. 5, 2017, doi:10.1186/s40249-016-0229-3.
- FOSS, N. T. Hanseníase: aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos. **Anais Brasileiros de Dermatologia** 74: 113-19. 1999.
- Front Immunol.** [s. l.], v. 9, p. 604, 2018.
- functional lymphocytes. **Nature.** [s. l.], v. 325, n. 6106, p. 683-8, 1987.
- GAJ-PECZALSKA, KJ et al. - B and T lymphocytes in primary immu- nodeficiency disease in man. **J Clin. Invest.** [s. l.], v. 52, n. 4, p. 919-928, 1973.
- GALLI, SJ et al. Mast cells and IgE in defense against venoms: possible “good side” of allergy? **Allergol Int.** [s. l.], v. 65, n. 1, p. 3-15, 2016
- 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.
- GAYLORD H.; BRENNAN P.J. Leprosy: Antigens and host-parasite interactions.

Pearson TW (ed) Parasite Antigens. Toward New Strategies for Vaccines. Marcel Dekker. 1986.

GELUK, A; DUTHIE, MS; SPENCER, JS. Postgenomic *Mycobacterium leprae* antigens for cellular and serological diagnosis of *M. leprae* exposure, infection and leprosy disease. **Lepr Rev.** [s. l.], v. 82, n. 4, p. 402-21, 2011.

germinal centers: putting the jigsaw together. **Int Rev Immunol.** [s. l.], v. 29, n. 4, p. 403-420, 2010.

GOMES, GI et al.. The Functional State of the Complement System in Leprosy.

GOULART, I.M.B. & GOULART, L.R. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. **Arch Dermatol Res.** 300: 269. 2008.

GOWTHAMAN, U; CHODISETTI, SB; AGREWALA, JN. T cell help to B cells in

GRABOSZ, JAJ; DERBLOM, H; GODAL, T. IgE serum levels in leprosy. Acta Path 01 Microbial Immunol Stand [B]. [s. l.], v. 81, p. 806-7, 1973.

HAMBURGER, RN et al. The relationship of the P-K titre to the serum IgE level in patients with leprosy. **Clin Exp Immunol.** [s. l.], v. 17, p. 253-60, 1974.

HAMPE, CS. B Cells in Autoimmune Diseases. **Scientifica.** Cairo, p. 1–18, 2012.

HAYDAY AC. Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response.

HESS, C; SCHIFFERLI, JA. Immune adherence revisited: novel players in an old game. **News PhysiolSci.** [s. l.], v. 18, p. 104–8, 2003.

HUMPHRES, R C; GELBER, RH; KRAHENBUHL, JL. Suppressed natural killer cell activity during episodes of erythema nodosum leprosum in lepromatous leprosy. **Clin. Exp. Immunol.** [s. l.], v. 49, n. 3, p. 500–508, 1982.

HUSSAIN, R; KIFAYET, A; CHIANG, TJ. Immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG3 antibodies are markers of progressive disease in leprosy. **Infect Immun.** [s. l.], v. 63, n. 2, p. 410-5, 1995.

ILHAN, F et al. CD5<sup>+</sup> B cells ratio in lepromatous leprosy. J ClinDiagn Res. [s. l.], v. 3, pp. 138-141, 2007.

**Immunity.** [s. l.], v. 31, p. 184-196, 2009.

**Immunity**. [s. l.], v. 45, n. 3, p. 471-482, 2016.

**Immunology**. [s. l.], v. 55, n. 4, p. 585–594, 1985.

infection: breakdown of the Th1 and Th2 immune paradigm in the immunopathogenesis of the disease. **Front Immunol**. [s. l.], v. 8, p. 1635, 2017, doi:10.3389/fimmu.2017.01635.

**Int J Lepr Other Mycobact Dis**. [s. l.], v. 51, n. 2, p. 169-73, 1983.

ISHIZAKA, K. Regulation of IgE synthesis. **Ann Rev Immunol**. [s. l.], v. 2, p. 159-82, 1984.

ISMAIL, N; BRETSCHER, PA. The Th1/Th2 nature of concurrent immune responses to unrelated antigens can be independent. **J Immunol**. [s. l.], v. 163, n. 90, p. 4842–50, 1999.

IYER, AM et al. Leprosy-specific B-cells within cellular infiltrates in active leprosy lesions. **Hum Pathol**. [s. l.], v. 38, n. 7, p. 1065–73, 2007, doi:10.1016/j.humpath.2006.12.017.

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

JOZSI, M et al. Complement receptor type 1 (CD35) mediates inhibitory signals in human B lymphocytes. **J Immunol**. [s. l.], v. 168, n. 6, p. 2782–2788, 2002.

KAPLAN, G et al. The reconstitution of cell-mediated immunity in the cutaneous lesions of lepromatous leprosy by recombinant interleukin 2. **J. Exp. Med**. [s. l.], v. 169, n.3, p. 893–907, 1989.

KIESSLING, R; KLEIN, E; WIGZELL, H. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. **Eur J Immunol**. [s. l.], v. 5, n. 2, p. 112-7, 1975.

KING, CL; NUTMAN, TB. IgE and IgG subclass regulation by IL4 and IFN gamma in human helminth infections. **J. Immunol**. [s. l.], v. 151, p. 458–465, 1993.

KRYCH-GOLDBERG, M; ATKINSON, J.P. Structure–function relationships of complement receptor type 1. **Immunol**. [s. l.], v. 180, n.1, p. 112–22, 2001.

KUMAR, S et al. IL-10 production from dendritic cells is associated with DC SIGN in human leprosy. **Immunobiology**. [s. l.], v. 218, n. 12, p. 1488–96, 2013.

doi:10.1016/j.imbio.2013.05.004

KURSAR, M et al. Cutting edge: Regulatory T cells prevent efficient clearance of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Immunol.** [s. l.], v. 178, p. 2661–65, 2007.

LANGUILLON, J. & CARAYON, A.. Lésions cutanées.

LANIER, LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. **Nat Immunol.** [s. l.], v. 9, n. 5, p. 495-502, 2008.

LEONG, KW; DING, JL. The unexplored roles of human serum IgA. **DNA and Cell Biology.** [s. l.], v. 33, n. 12, pp. 823–829, 2014.

LIU, D; NIU, ZX. The structure, genetic polymorphisms, expression and biological functions of complement receptor type 1 (CR1/CD35). **Immuno pharmacol Immunotoxicol.** [s. l.], v. 31, n. 4, p. 524–35, 2009.

LOYD, B; KLICKSTEIN, JMM. **CR1**. In: Walport BJ Ma MJ, editor. The Complement Facts Book. Elsevier, 2000, p. 136–45.

LYNCH, NR et al. IgE in leprosy: effects of a *Mycobacterium leprae*-BCG vaccine. LYON, S.; GROSSI, M. A. F. Diagnóstico e tratamento da hanseníase In: Alves, E. D.; Ferreira, T. L. F. I. N. Hanseníase avanços e desafios Brasília 1ª ed. Brasília. 2014.

MARÇAL, PHF et al. Utility of immunoglobulin isotypes against LID-1 and NDO- LID for, particularly IgG1, confirming the diagnosis of multibacillary leprosy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 113, n. 5, p. e170467, 2018.

MARICHAL, T et al. A beneficial role for immunoglobulin E in host defense against honeybee venom. **Immunity.** [s. l.], v. 39, p. 963-975, 2013.

MARTIN, F; CHAN, AC. B cell Immunobiology in Disease: Evolving Concepts from the Clinic. **Annu. Rev. Immunol.** [s. l.], v. 24, p. 467–96, 2006.

MASAKI, T et al.. Factor I-dependent inactivation of human complement C4b of the classical pathway by C3b/C4b receptor (CR1, CD35) and membrane cofactor protein (MCP, CD46). **J Biochem.** [s. l.], v. 111, n. 5, p. 573-8, 1992.

MENDES NF; KOPERSZTYCH, S; MOTA, NG. T and B lymphocytes in patients with lepromatous leprosy. **Clin Exp Immunol.** [s. l.], v. 16, n. 1, p. 23-9, 1974.

MESIN, L; ERSCHING, J; VICTORA, GD. Germinal center B cell dynamics.

MINISTERIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde. - Volume 49 - Nº4 – 2018

MODLIN RL. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. **J Invest Dermatol**, 102, n. 6, p. 828–32, 1994, doi:10.1111/1523-1747.ep12381958.

MODLIN, RL et al. Kaposi's sarcoma in homosexual men: an immunohistochemical study. **J Am Acad Dermatol**. [s. l.], v. 8, n. 5, p. 620-7, 1983.

MODLIN, RL et al. Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. **Proc Natl Acad Sci U S A**. [s. l.], v. 85, n. 4, p. 1213-1217, 1988.

MODLIN, RL. The innate immune response in leprosy. **Curr Opin Immunol**. [s. l.], v. 22, n. 1, p. 48-54, 2010, doi: 10.1016/j.coi.2009.12.001.

MOODY, DB; ZAJONC, DM; WILSON, IA. Anatomy of CD1-lipid antigen complexes. **Nat Rev Immunol**. [s. l.], v. 5, n. 5, p. 387-99, 2005.

MORETTA, A. Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. **Nat Rev Immunol**. [s. l.], v. 2, n. 12, p. 957–64, 2002.

MS/SVS - Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública: manual técnico-operacional. Brasília: Ministério da Saúde; 2016.

NAKAYAMA, Y. C3 promotes expansion of CD8+ and CD4+ T cells in a *Listeria monocytogenes* infection. **J Immunol**. [s. l.], v. 183, n. 5, p. 2921-31, 2009.

NATH, I; SAINI, C; VALLURI, VL. Immunology of leprosy and diagnostic challenges. **Clin Dermatol**. [s. l.], v. 33, n. 1, p. 90–8, 2015, doi:10.1016/j.clindermatol.2014.07.005.

**neglected tropical diseases**. [s. l.], v. 13, n. 1, p. e0007089. 2019, doi:10.1371/journal.pntd.0007089.

NK-cell-mediated control of immune responses. **Eur J Immunol**. [s. l.], v. 38, n. 11, p. 2938–42, 2008.

NOGUEIRA, N., KAPLAN, G., LEVY, E., SARNO, E. N., KUSHNER, P., GRANELLI-PIPERNO, A., VIEIRA, L., COLOMER GOULD, V., LEVIS, W., & STEINMAN, R. Defective gamma interferon production in leprosy. Reversal with antigen and

- interleukin 2. **The Journal of experimental medicine**, 158(6), 2165– 2170. 1989.
- NOTHELFER, K; SANSONETTI, PJ; PHALIPON, A. Pathogen manipulation of B cells: the best defence is a good offence. **Nat Rev Microbiol**. [s. l.], v. 13, n. 3, p. 173–84, 2015.
- NUTI, M et al IgE in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. [s. l.], v. 50, p. 217-8, 1982.
- OMS. Organización Panamericana De La Salud/Organizacion Mundial De La Salud. **Lepra al día: situacion de la eliminación de la lepra em algunos paises de la America Latina**. Boletín Eliminación de la Lepra de las Américas, 2001.
- OPROMOLLA, DVA. Terapêutica da hanseníase. **Medicina Ribeirão Preto**. Ribeirão Preto. v. 30, p. 345-350, 1997.
- PALERMO, M. L. et al. Differential expression of the costimulatory molecules CD86, CD28, CD152 and PD-1 correlates with the host-parasite outcome in leprosy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 107: 167-173. 2012.
- PARDILLO, FE et al. Methods for the classification of leprosy for treatment purposes. **Clin Infect Dis**. [s. l.], v. 44, p. 1096–9, 2007, doi:10.1086/512809
- PARIDA, SK et al. Serum tumor necrosis factor and interleukin 1 in leprosy and during lepra reactions. **Clin Immunol Immunopathol**. [s. l.], v. 63, p. 23–7, 1991, doi:10.1016/0090-1229(92)90088-6
- PARK, AJ et al.. Leprosy as a model to understand cancer immunosurveillance and T cell anergy. **J Leukoc Biol**. [s. l.], v. 100, n. 1, p. 47–54, 2016, doi:10.1189/jlb.5RU1215-537RR,
- PAUST, S; SENMAN, B; VON ANDRIAN, UH. Adaptive immune responses mediated by natural killer cells. *Immunol Rev*. [s. l.], v. 235, n. 1, p. 286-96, 2010.
- PETCHCLAI, B et al. Serum IgE levels in leprosy. **J Med Assoc Thai**. [s. l.], v. 60, p. 19-21, 1977.
- PORTELA, C. Resposta Imune na Hanseníase. (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ensino Superior de Florianópolis (FAESF), 2008.
- Précis de léprologie** 2<sup>o</sup> ed: 62-101. 1986.

PREVEDELLO F.C.; MIRA M.T.. Hanseníase: uma doença genética? **An Bras Dermatol** 82:451-9. 2007.

RIDLEY D.S.; JOPLING W.H. Classification of leprosy according to immunity: a five group system. **International Journal of Leprosy**. [s. l.], v. 34, p. 255-273, 1966.

ROARK, CL et al. Gammadelta T cells: an important source of IL-17. *Curr Opin Immunol*. [s. l.], v. 20, p. 353-357, 2008.

RODGAARD, A et al. Complement receptor type 1 (CR1, CD35) expression on peripheral T lymphocytes: both CD4- and CD8-positive cells express CR1. **Complement Inflamm**. [s. l.], v. 8 ,p. 303–309, 1991.

SADHU, S; MITRA, DK. Emerging concepts of adaptive immunity in leprosy.

SAHA, K; DUTTA, RN; DAGUPGA, A. Immunologic aspects of leprosy with special reference to the study of immunoglobulin E. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**. [s. l.], v. 43, p. 314-9, 1975.

SAINI, C et al. T cells are associated with inflammation and immunopathogenesis of leprosy reactions. **Immunology Letters**. [s. l.], v. 200, p. 55-65, 2018, doi. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.07.005>.

SAINI, C; RAMESH, V; NATH, I. Increase in TGF-beta secreting CD4(+) CD25(+)FOXP3(+) T regulatory cells in anergic lepromatous leprosy patients. **PLoS Negl Trop Dis**. [s. l.], v. 8, n. 1, p. e2639, 2014, doi:10.1371/journal.pntd.0002639.

SAKAGUCHI, S et al. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. **Nat Rev Immunol**. v., 10, n. 7, p. 490–500, 2010.

SCHLESINGER, LS; HORWITZ, MA. Phagocytosis of leprosy bacilli is mediated by complement receptors CR1 and CR3 on human monocytes and complement component C3 in serum. **J Clin Invest**. [s. l.], v. 85, n. 4, p. 1304-14, 1990.

Scollard, D. M., Adams, L. B., Gillis, T. P., Krahenbuhl, J. L., Truman, R. W., & Williams, D. L. (2006). The continuing challenges of leprosy. *Clinical microbiology reviews*, 19(2), 338–381. doi:10.1128/CMR.19.2.338-381.2006

SCOLLARD, DM et al. The continuing challenges of leprosy. **Clin Microbiol Rev**. [s. l.], v. 19, n. 2, p. 338–81, 2006. doi:10.1128/CMR.19.2.338-381.2006.

SCOLLARD, DM; JOYCE, MP; GILLIS, TP. Development of leprosy and type 1 leprosy reactions after treatment with infliximab: a report of 2 cases. **Clin. Infect. Dis.** [s. l.], v. 43, n. 2, p. 19–22, 2006.

SCOTT-BROWNE, JP et al.. Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. **J. Exp. Med.** [s. l.], v. 204, p. 2159–69, 2007.

Secretaria De Estado De Saúde Do Rio De Janeiro. **Reunião de avaliação estadual** – 2015. Rio de Janeiro: Gerência de dermatologia sanitária, 2014.

SKOGH, T et al. Hepatic uptake of circulating IgG immune complexes.

SMITH, DL et al. Atopy and IgE in patients with leprosy. **J Allergy Clin Immunol.** [s. l.], v. 85, n. 4, p. 795-800, 1990.

SPELLBERG, B; EDWARDS, JE Jr. Type 1/type 2 immunity in infectious diseases. **Clin Infect Dis.** [s. l.], v. 32, n. 1, p. 76–102, 2001. doi:10.1086/317537

TALHARI, S.; GONÇALVES, H. S.; PONTES, M. A. A.; SILVEIRA, M. I. S.; ORSI, TANGYE, SG et al. The good, the bad and the ugly - TFH cells in human health and disease. **Nature reviews. Immunology.** [s. l.], v. 13, n. 6, p; 412-26, 2013.

TANGYE, SG et al. Isotype switching by human B cells is division-associated and regulated by cytokines. **J Immunol.** [s. l.], v. 169, n. 8, p. 4298-306, 2002.

TAYLOR, AL; CROSS, ELA; LLEWELYN, MJ. Induction of contact-dependent CD8<sup>+</sup> Regulatory T cells through stimulation with staphylococcal and streptococcal superantigens. **Immunology.** [s. l.], v. 135, n. 2, p. 158–167, 2011.

TEIXEIRA, M. A.G. Polimorfismos do gene NRAMP1 em indivíduos com reações hansênicas, atendidos em dois Centros de Referência no Recife, nordeste do Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop** 43: 281-286. 2010.

Török, K et al. Complement receptor type 1 (CR1/CD35) expressed on activated human CD4<sup>+</sup> T cells contributes to generation of regulatory T cells. **Immunol Lett.** [s. l.], v. 164, p. 117–24, 2015, doi: 10.1016/j.imlet.2015.02.009

TSAI, S; CLEMENTE-CASARES, X; SANTAMARIA, P. CD8<sup>+</sup> Treg in

TYAGI, P et al. Activation of complement by circulating immune complexes isolated from leprosy patients. **Int J Lepr Other Mycobact Dis.** [s. l.], v. 58, p. 31– 38, 1990.

VAN ES, LA; DAHA, MR. Factors influencing the endocytosis of immune complexes. **Adv.Nephrol. Necker Hosp.** v. 13, p. 341–367, 1984.

WALKER, SL; LOCKWOOD, DN. The clinical and immunological features of leprosy. **Br Med Bull.** [s. l.], v. 77–78, p. 103–21, 2006, doi:10.1093/bmb/ldl010

WEISS, L. et al. The human C3b receptor (CR1). **Adv. Nephrol. Necker Hosp.** v. 18, p. 249–269, 1989.

WHO. Global leprosy update, 2015: time for action, accountability and inclusion.

WILSON, JG; TEDDER, TF; FEARON DT. Characterization of human T-lymphocytes that express the C3b receptor. **J Immunol.** [s. l.] , v.131, n. 2, p. 684-689, 1983.

**WklyEpidemiolRec.** [s. l.], v. 91, n. 35, p. 405–20, 2015.

WOOF, JM; RUSSELL, MW. Structure and function relationships in IgA. **Mucosal Immunology.** [s. l.], v. 4, n. 6, pp. 590–597, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Classification of leprosy. c2016. Disponível em: <<http://www.who.int/lep/classification/en/>> Acesso em: 10 janeiro de 2020.

WRIGHT, EP et al. Serum immunoglobulins, including IgG subclasses, in Vietnamese leprosy patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* [s. l.], v. 53, p. 225- 32, 1985.

XINFENG, YU. Tag SNPs in complement receptor-1 contribute to the susceptibility to non-small cell lung cancer. **Molecular Cancer.** [s. l.], v. 13, n. 56, p. 1-7, 2014.

YAMANOUCHI, AA; CARON, CR; SHIWAKU, DT. Hanseníase e sociedade: um problema sempre atual. **An bras Dermatol.** [s. l.], v. 68, p. 396-404, 1993.

YANG D et al. Mycobacterium leprae-infected macrophages preferentially primed regulatory T cell responses and was associated with lepromatous leprosy. **PLoS Negl Trop Dis.** [s. l.], v. 10, n. 1, p.:e0004335, 2016, doi:10.1371/journal.pntd.0004335.

YASKANIN, DD; THOMPSON, LF; WAXMAN, FJ. Distribution and quantitative expression of the complement receptor type I (CR1) on human peripheral blood T lymphocytes. **Cell Immunol.** [s. l.] ;,142, n.1, p. 159-176, 1992.

YOKOYAMA, M et al. Studies on humoral immune response in leprosy. **Kurume Med J.** [s. l.], v. 26, p. 387-95, 1979.

YOSHIDA, K; YUKIYAMA, Y; MIYAMOTO, T. Interaction between immune complexes and C3b receptors on erythrocytes. *Clin. Immunol. Immunopathol.* [s. l.] , v. 39, p. 213–221, 1986.

YOSHIMOTO, T; PAUL, EW. CD41<sup>pos</sup>,NK1.1<sup>pos</sup>T Cells Promptly Produce Interleukin 4 in Response to In Vivo Challenge with Anti-CD3. **The Journal of Experimental Medicine.** [s. l.], v. 179, n. 4, p. 1285-1295, 1994.

Yunginger JW. **Clinical significance of IgE.** In: Middleton E Jr, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF Jr, Yunginger JW, eds. Allergy: principles and practice. 3rd ed. St. Louis: CV Mosby, p. 849-60, 1988.

ZHOU, W; ZHANG, F; AUNE, TM. Either IL-2 or IL-12 is sufficient to direct Th1 differentiation by nonobese diabetic T cells. **J Immunol.** v. 170, n. 2, p. 735–40, 2003. doi:10.4049/jimmunol.170.2.735.

## ANEXO I

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa intitulada:

“Determinação da densidade molecular e polimorfismos genéticos de receptores CR1 em células de indivíduos acometidos por diferentes formas clínicas da hanseníase no município de Campos dos Goytacazes”.

### A JUSTIFICATIVA, OS OBJETIVOS E OS PROCEDIMENTOS:

O motivo que nos leva a estudar o problema da hanseníase é o fato de sabermos que nesta região do estado do Rio de Janeiro esta doença afeta muitas pessoas, e em muitos casos com gravidade doentes. A pesquisa se justifica porque tentando entender o que acontece no sistema imunológico das pessoas com a hanseníase e naquelas sem a hanseníase poderemos planejar melhor para lidar com esta doença, ou seja, podemos tratar os casos de forma diferente e acompanhar como estão evoluindo, por exemplo. A hanseníase pode causar incapacidades físicas irreversíveis quando o diagnóstico é tardio, pois esta doença atinge nervos. O objetivo desse projeto é avaliar a presença e quantidade de uma molécula do nosso sistema imunológico que é importante na defesa do nosso organismo, chamada CR1. Além disso, estamos nos propondo a estudar o que determina a nível genético a variação na quantidade desta molécula importante na defesa contra a *Mycobacterium leprae*, o microrganismo que causa a hanseníase. Estudando isso, poderemos no futuro ajudar aos médicos com proposta de tratamento mais eficaz no combate a hanseníase e específico para cada pessoa. O procedimento de coleta de amostras de sangue será da seguinte forma: durante sua consulta médica, no **Centro de Referência da Hanseníase, pertencente à Secretaria Municipal de Saúde**, profissionais habilitados coletarão seu sangue em tubos a vácuo, como ocorre numa coleta de sangue de rotina para fazer um hemograma por exemplo. Será coletado no total 30mL de sangue, equivalente a 3 tubos. Essas amostras irão para Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) onde vão ser processadas para o estudo que explicamos acima.

### DESCONFORTOS E RISCOS E BENEFÍCIOS:

Existe um desconforto e risco mínimo para você que se submeter à coleta

do sangue para o estudo da hanseníase, sendo que se justifica pelo fato de que poderemos ajudar a entender porque o sistema imunológico de uma pessoa ajuda ela a não ter a doença na sua forma mais severa e de outra não.

#### **FORMA DE ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA:**

Em caso de você ter a doença hanseníase diagnosticada clinicamente, você será acompanhado durante o período do tratamento. Você retornará ao médico dermatologista do Centro de Referência da Hanseníase de acordo como ele determinar. Além disso, assistência lhe será prestada quando você julgar necessário voltar ao dermatologista durante o período de tratamento.

#### **GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO:**

Você será esclarecido (a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

Os pesquisadores e médicos irão tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados do exame clínico, laboratorial da pesquisa e quaisquer outros serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma via deste consentimento informado será arquivada no Laboratório de Biologia do Reconhecer da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e outra será fornecida a você.

#### **CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO POR**

**EVENTUAIS DANOS:** A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional, visto que a coleta das amostras de sangue a serem utilizadas nesta pesquisa ocorrerão na ocasião da sua ida ao Centro de Referência da Hanseníase para consulta médica. Portanto, sua participação não acarretará custos extras pra você, mas caso você venha a ter qualquer despesa extra como consequência da sua participação nesta pesquisa, tais como transporte, alimentação e hospedagem você será ressarcido.

#### **DECLARAÇÃO DA PARTICIPANTE OU DO RESPONSÁVEL PELA**

**PARTICIPANTE:** Eu, \_\_\_\_\_ fui

informado (a) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e mudar minha decisão se assim o desejar. A professora Alba Lucinia Peixoto Rangel e Dr. Edilbert Pellegrini Nahn Junior certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dúvidas poderei chamar o Dr. Edilbert ou a Professora Alba nos telefones (22) 999839552 ou (22) 999 721 002 ou 2739 7255 ou ainda Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Campos situado à Avenida Alberto Torres, 111 Centro, Campos dos Goytacazes RJ (22) 2101-2929.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma via deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas. Ainda, fui informado que este termo foi elaborado em duas únicas vias, tendo sido uma via entregue a mim e a outra via ficado em posse dos pesquisadores responsáveis pela pesquisa.

Nome	Assinatura do Participante	Data
Nome	Assinatura do Pesquisador	Data
Nome	Assinatura do Pesquisador	Data
Nome	Assinatura da Testemunha	Data