



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ – UFC
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

CAMILA FERNANDES

AUMENTO DA FREQUÊNCIA DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS
 $CD4^+CD25^+FOXP3^{high}$ E $CD8^+CD25^+FOXP3^{high}$ EM PACIENTES MENORES DE
15 ANOS COM HANSENÍASE MULTIBACILAR

FORTALEZA

2013

CAMILA FERNANDES

AUMENTO DA FREQUÊNCIA DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS
CD4⁺CD25⁺FOXP3^{high} E CD8⁺CD25⁺FOXP3^{high} EM PACIENTES MENORES DE
15 ANOS COM HANSENÍASE MULTIBACILAR

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Microbiologia Médica.

Orientadora: Professora Dr^a. Lilia Maria Carneiro
Câmara

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca de Ciências da Saúde

F399a Fernandes, Camila.

Aumento da frequência de células T regulatórias CD4⁺CD25⁺FOXP3^{high} e CD8⁺CD25⁺FOXP3^{high} em pacientes menores de 15 anos com hanseníase multibacilar / Camila Fernandes. – 2013.
90 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Mestrado em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2013.

Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Orientação: Profa. Dra. Lilia Maria Carneiro Câmara.

1. Hanseníase. 2. Linfócitos T Reguladores . 3. Crianças. 4. Adolescentes I. Título.

CDD 616.998

À minha mãe, Maria Neuba; à minha orientadora, Lilia Câmara; e ao meu namorado, Ramom

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu força e coragem para superar as adversidades e por ter posto em meus caminhos todas as pessoas que auxiliaram no desenvolvimento desse trabalho.

A todas as crianças/adolescentes e a seus pais/responsáveis, sem os quais não teria sido possível a realização dessa pesquisa.

À minha mãe, Maria Matos Fernandes, que sozinha e apesar de todas as adversidades investiu na minha educação, formação profissional e como ser humano. Obrigada também por todo o seu amor, apoio, empenho, dedicação, paciência e compreensão nos momentos de ausência.

À minha orientadora, Lilia Maria Carneiro Câmara, pela amizade, orientação, ensinamentos acadêmicos e apoio desde a graduação ao mestrado. Agradeço ainda por ter despertado em mim o amor pela imunologia e pela prática docente, por todos os seus conselhos pessoais e profissionais e por toda sua dedicação para a conclusão dessa pesquisa.

Ao meu namorado, Ramom Oliveira Bantim, por sua paciência, compreensão, carinho e apoio durante a elaboração desse trabalho. Agradeço também por sua companhia durante a realização dos experimentos nos finais de semana e de madrugada.

Ao meu sogro, Jocildo Oliveira Bantim, à minha sogra, Terezinha Lizieux Oliveira Bantim e família pelo auxílio e carinho fornecido durante o desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao meu pai, Alexis Fernandes, pelo carinho e por ter me ensinado a enfrentar as dificuldades da vida.

À minha irmã, Ana Carolina Fernandes, pelo amor e por ter despertado em mim o interesse pela enfermagem.

À minha tia e minha segunda mãe, Ana Dária Fernandes, pelo amor e apoio dedicado à minha formação.

Ao Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim, do Centro Especializado em Micologia Médica - UFC, pelo financiamento da pesquisa.

À equipe de enfermeiros do Centro de Dermatologia Dona Libânea, em especial aos enfermeiros José Hélder Loureiro Batista, Regina Célia Nunes Santos e Amanda Xavier de

Albuquerque Machado, pela acolhida, pelo treinamento na assistência ao hanseniano e auxílio na coleta dos dados.

Ao Dr. Heitor de Sá Gonçalves, diretor do Centro de Dermatologia Dona Libânia, pela atenção e autorização para realização da pesquisa no centro.

Às Dras Maria Isabel de Moraes Pinto, da UNIFESP, Vânia Luiza Deperon Bonato, da USP-Ribeirão Preto e Patrícia Vianna Bonini Palma, do Hemocentro de Ribeirão Preto, pelo auxílio nas análises dos dados de citometria de fluxo.

Ao Prof. Dr. André Jalles Monteiro, Depto. Matemática e Estatística (UFC) pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao professor Aldo Ângelo Moreira Lima e sua equipe por permitirem a utilização de um dos equipamentos necessários para realização da pesquisa.

Às minhas amigas de graduação Karolina Rodrigues Silva e Suellen Alves Freire pelo companheirismo, carinho, amizade, compreensão, conselhos e apoio nos momentos de dificuldade.

Às minhas amigas Paula Brito e Cabral, Eliane Nascimento Nunes e Fabrícia Martins Teixeira pela companhia no laboratório ao longo desses dois anos de mestrado e pelos momentos agradáveis proporcionados.

À minha colega de laboratório Fabíola Fernandes Heredia pela companhia e auxílio durante a elaboração da dissertação.

À secretária do programa de pós-graduação em Microbiologia Médica, Carolinda Vilma Soares de Oliveira (Carol), por sua disponibilidade em ajudar sempre que solicitada.

Às colegas enfermeiras Helena Gracielli Carvalho, Emília Caminha, Ivana Rios e Thaís Jormanna pelo auxílio na coleta dos dados e por tornarem os dias no centro de Dermatologia Dona Libânia ainda mais agradáveis.

Ao Prof. Dr. José Ajax Nogueira Queiroz, à Profa. Dra. Vânia Luiza Deperon Bonato e ao Dr. Heitor de Sá Gonçalves, por terem gentilmente aceitado compor a banca examinadora desse trabalho.

"Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo, só depende de nossa vontade e perseverança."

Albert Einstein

RESUMO

A hanseníase é uma doença crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, que representa um importante problema de saúde pública mundial, especialmente no estado do Ceará, Brasil. A incidência nos menores de 15 anos de idade reflete a endemicidade da região e a dificuldade no seu controle. A doença apresenta um espectro variado de manifestações clínicas que está relacionado a resposta imune desenvolvida pelo indivíduo, com as respostas Th1 e Th2 relacionadas com as formas paucibacilar e multibacilar, respectivamente. Células T regulatórias (Tregs) têm recebido atenção especial na literatura e têm sido relacionadas com o desenvolvimento de infecções crônicas, entretanto seu papel na hanseníase nos menores de 15 anos ainda não foi elucidado. Esse trabalho teve por objetivo avaliar a frequência das Tregs $CD4^+CD25^+FOXP3^{high}$, $CD8^+CD25^+FOXP3^{high}$, $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$ e $CD8^+CD25^{high}FOXP3^+$ em pacientes com hanseníase e contatos intradomiciliares, ambos menores de 15 anos. Células mononucleares de sangue periférico foram cultivadas por 72 horas com ativadores (anti-CD3 e anti-CD28) e/ou com *M.leprae* total sonificado. Após cultura, a frequência das Tregs foi identificada por citometria de fluxo. Observamos maior frequência de células $CD4^+CD25^+FOXP3^{high}$ em pacientes do que em contatos, não havendo diferenças entre eles com relação às outras populações avaliadas. Os pacientes multibacilares apresentaram maior frequência de células $CD4^+CD25^+FOXP3^{high}$ e $CD8^+CD25^+FOXP3^{high}$ do que os contatos. Apenas nesses pacientes, as células $CD4^+CD25^+FOXP3^{high}$ foram negativamente correlacionadas com linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$ não-regulatórios e as células $CD8^+CD25^+FOXP3^{high}$ com linfócitos $CD4^+$ não-regulatórios. A maior frequência de Tregs com elevada expressão de FOXP3 nos menores de 15 anos com hanseníase multibacilar, bem como sua correlação inversa com a frequência de linfócitos não regulatórios nesses pacientes sugere a participação dessas células na perpetuação da infecção pelo *M. leprae*.

Palavras-chave: Hanseníase. Linfócitos T reguladores. Crianças. Adolescentes.

ABSTRACT

Leprosy is a chronic disease caused by *Mycobacterium leprae*, which represents an important health problem worldwide, especially in Ceará, Brazil. The incidence in under-15-year-olds reflects the endemicity of the region and the difficulty in its control. The disease presents a wide spectrum of clinical manifestations that reflects the immune response developed, with Th1 and Th2 responses related to the paucibacillary and multibacillary (MB) forms, respectively. Regulatory T cells (Tregs) cells have received special attention in the literature and have been associated with development of chronic infections, however its role in leprosy in children under-15-years-old has not yet been elucidated. This study aimed to evaluate the frequency of CD4⁺CD25⁺FOXP3^{high}, CD8⁺CD25⁺FOXP3^{high}, CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ and CD8⁺CD25^{high}FOXP3⁺ Treg cells in patients with leprosy and household contacts (HHC), both under 15 years. Peripheral blood mononuclear cells were cultured for 72 hours with activators (anti-CD3 and anti-CD28) and/or with *M.leprae* total sonicated. After culture, Treg cells were identified by flow cytometry. We found a greater frequency of CD4⁺CD25⁺FOXP3^{high} cells in patients than in HHC, where there were no differences in the other cell populations evaluated. The multibacillary patients had a higher frequency of CD4⁺CD25⁺FOXP3^{high} and CD8⁺CD25⁺FOXP3^{high} cells compared to HHC. Only these patients, CD4⁺CD25⁺FOXP3^{high} cells were negatively correlated with CD4⁺ and CD8⁺ non-Treg lymphocytes, and CD8⁺CD25⁺FOXP3^{high} cells with CD4⁺ non-Treg lymphocytes. The greater frequency of Tregs with high expression of FOXP3 in individuals with multibacillary leprosy under-15-years-old and its inverse correlation with the frequency of non-regulatory lymphocytes in these patients suggests the involvement of these cells in the perpetuation of *M. leprae* infection.

Key words: Leprosy. Regulatory T cells. Children. Adolescents.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Taxa de detecção de casos novos (incidência) da hanseníase, dados reportados à OMS em Janeiro de 2011.....	17
Figura 2 - Coeficiente de detecção (incidência) dos casos de hanseníase por bairro em Fortaleza, 2008.	19
Figura 3 - Coeficiente de (incidência) dos casos de hanseníase em Fortaleza (por 10.000 habitantes) no período de 2001 a 2010.	20
Figura 4 - Aspectos morfológicos do <i>Mycobacterium leprae</i>	21
Figura 5 - Estrutura da parede celular do <i>Mycobacterium leprae</i>	22
Figura 6 - Interação entre as resposta Th1, Th2 e células T regulatórias, possível papel das Tregs na infecção pelo <i>Mycobacterium. leprae</i>	28
Figura 7 - Esquema simbolizando como a redução ou o aumento no número/função de Tregs pode estar relacionado ao desenvolvimento de diversas enfermidades.	30
Figura 8 - Populações de células T regulatórias classificadas de acordo com as duas subclasses principais: Célula T regulatória naturalmente ocorrente e Célula T regulatória adaptativa.	34
Figura 9 - Mecanismos de supressão mediada por células T regulatórias.	36
Figura 10 - Titulação do anticorpo anti-FOXP3 PE, com os volumes de 5µl (A), 10 µl (B), 15 µl (C) e 20 µl (D), sendo escolhido o volume de 20 µl.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número e detecção de casos de hanseníase por faixa etária no Ceará em 2011.	18
Tabela 2 - Painel de anticorpos, fluorocromos, clones, marcas e volumes utilizados para marcação de Tregs.	76

LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS

APC	<i>Allophycocyanin</i> (Aloficocianina)
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> (Trifosfato de adenosina)
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
CI	Caso índice
CMSP	Células mononucleares de sangue periférico
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i> (Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico)
DD	Dimorfo-Dimorfo
DL	Dimorfo-Lepromatoso
DT	Dimorfo-Tuberculóide
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> (Isotiocianato de fluoresceína)
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>
FSC	<i>Foward scatter</i> (dispersão frontal)
GITR	<i>Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor</i>
IDO	Indoleamina 2,3-dioxygenase
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
IPEX	<i>Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked</i> (Imuno disfunção, poliendocrinopatia enteropatia ligada ao X)
iTreg	Célula T regulatória induzida
LAG	<i>Lymphocyte-activation gene</i> (Gene de ativação de linfócitos)
LIME	Laboratório de Imunologia Médica
LL	Lepromatoso-lepromatoso
MB	Multibacilar
MFI	Média de intensidade de fluorescência
NK	Natural Killer
NKT	Linfócitos Natural Killer
nTreg	Célula T regulatória naturalmente ocorrente
OMS	Organização Mundial de Saúde
PB	Paucibacilar
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Salina tamponada com fosfato)
PDIMs	<i>Phthiocerol dimycocerosates</i> (Dimecoserosatos de fitiocerol)

PE	<i>Phycoerythrin</i> (Ficoeritrina)
PerCP complex	<i>Complexo Peridinin-chlorophyll-protein</i> (Complexo peridinina-clorofila-proteína)
PFA	Paraformaldeído
PGL	<i>Phenolic glycolipid</i> (Glicolípídeo fenólico)
PHA	<i>Phytohaemagglutinin</i> (Fitohemaglutinina)
PNCH	Programa Nacional de Controle da Hanseníase
PQT	Poliquimioterapia
SESA	Secretaria de Saúde
SINAN	Sistema Nacional de Agravos e Notificações
SMS	Secretaria Municipal de Saúde
SSC	<i>Side scatter</i> (dispersão lateral)
TCLE	Termo de consentimento Livre e esclarecido
TCR	<i>T cell receptor</i> (Receptor de célula T)
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i> (Fator de transformação do crescimento β)
Th	<i>T helper</i>
TLR	<i>Tool like receptors</i> (Receptores semelhantes a Tool)
TMN	<i>Trehalose monomycolate</i> (Monomicolato de Trealose)
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor α</i> (Fator de necrose tumoral α)
Tr1	T regulatória tipo 1
Treg	Célula T regulatória
TT	Tuberculóide-Tuberculóide
UFC	Universidade Federal do Ceará

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Evolução histórica da hanseníase	16
1.2 Epidemiologia.....	17
1.3 Agente Etiológico.....	20
1.4 Formas clínicas da doença	23
1.5 Imunopatologia da hanseníase.....	25
1.6 Células T regulatórias: Definição e imunofenótipo.....	29
1.7 Tipos e funções das células T regulatórias	32
1.8 Papel das Tregs na resposta às infecções.....	36
2. HIPÓTESES.....	41
3. OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo Geral.....	43
3.2 Objetivos Específicos.....	43
4. RESULTADOS	45
5. CONCLUSÕES.....	68
ANEXO 1- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	70
APÊNDICE A- MATERIAIS E MÉTODOS.....	71
APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	78
APÊNDICE C-QUESTIONÁRIO DOS PARTICIPANTES.....	79
REFERÊNCIAS.....	81

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A hanseníase, doença granulomatosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, caracteriza-se por lesões cutâneas com alteração de sensibilidade e acometimento neural, podendo resultar em incapacidades e deformidades. Apresenta um espectro variável de manifestações clínicas a depender do padrão de resposta imune desenvolvido pelo indivíduo (GOULART; GOULART, 2009; RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011).

1.1 Evolução histórica da hanseníase

A história da hanseníase é datada desde os primórdios da civilização, mas sua origem exata é incerta (AZIZI; BAHADORI, 2011). Pesquisadores acreditam que tenha sido originada na Ásia (MONOT *et al.*, 2005) ou na África (AZIZI; BAHADORI, 2011) e a partir daí tenha se disseminado a outras partes do mundo.

No Brasil os primeiros relatos da doença são datados do ano de 1600 no Rio de Janeiro, onde foi criado o primeiro leprosário (ARAUJO, 1937). Com o avanço da doença no país, dois séculos após seu surgimento, o governo colonial implementou ações de controle que se limitaram à construção de leprosários e ao isolamento dos doentes. Com o desenvolvimento da agricultura e a necessidade de mão de obra em outras cidades, a doença disseminou-se ainda mais pelo país (EIDT, 2004).

Durante muito tempo sua etiologia permaneceu desconhecida, até que em 1873 o médico Norueguês Armauer Hansen apontou o *M. leprae* como agente causal. Após este fato, em 1970, a doença anteriormente denominada lepra, palavra oriunda do termo grego “lepros” que significa escamoso, foi renomeada de doença de Hansen ou hanseníase em homenagem a Armauer Hansen (OPROMOLLA; MARTELLI, 2005).

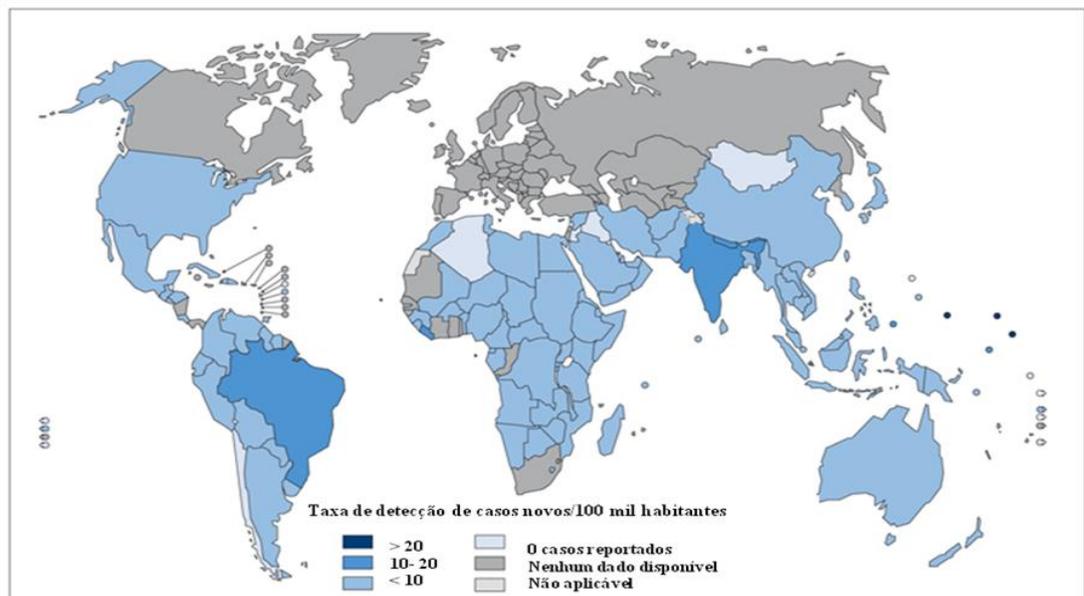
Por volta de 1930, com a introdução de fármacos como dapsona e, posteriormente, rifampicina e clofazimina, a doença tornou-se curável. Em 1950, como consequência a instituição da terapêutica, o tratamento deixou de ser realizado por meio do isolamento dos doentes (EIDT, 2004). Devido ao aparecimento de casos de resistência à terapia, a Organização Mundial de Saúde (OMS) sugeriu a poliquimioterapia (PQT), em 1982, composta pela associação da rifampicina, dapsona e clofazimina (AZIZI; BAHADORI, 2011).

Atualmente, a doença é endêmica no Brasil e apesar dos alertas e informações divulgadas na mídia, ainda existe preconceito contra os portadores. É possível vivenciar, em pleno século XXI, a segregação e a repulsa da sociedade com os doentes, que temem a rejeição social e possuem sentimento de culpa, medo e vergonha de ter a doença (OLIVEIRA; ROMANELLI, 1998).

1.2 Epidemiologia

A hanseníase representa um relevante problema de saúde pública mundial, com maior ocorrência nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, sendo sua erradicação considerada um grande desafio. Segundo dados da OMS, a taxa mundial de detecção de casos novos da doença foi de 4,06/100.000 habitantes no ano de 2011. O Brasil é o país do continente americano que apresenta a maior taxa de detecção de casos novos, como podemos visualizar na figura 1, representando o 2º lugar no ranking mundial da doença. (WHO, 2012).

Figura 1 - Taxa de detecção de casos novos da hanseníase, dados reportados à OMS em Janeiro de 2011.



Fonte: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary>.

Apesar da redução no número de casos ao longo dos anos no Brasil, o país possui regiões com índices alarmantes da doença, como a região da Amazônia Legal que sozinha concentrou 38,9% dos casos novos no ano de 2007. As regiões Nordeste, Norte e Centro-Oeste concentram, aproximadamente, 55% dos casos detectados no Brasil, fato este atrelado a condições socioeconômicas e ambientais dessas regiões (BRASIL, 2008).

A incidência da doença nos menores de 15 anos é um indicador epidemiológico importante, visto que possui relação direta com a endemicidade da região e com a transmissão da doença na comunidade. A redução do número de casos nessa faixa etária é uma meta prioritária do Programa Nacional de Controle da Hanseníase no Brasil (PNCH) (CEARÁ, 2012; BRASIL, 2008). O país apresentou uma taxa de incidência de 4,77/100.000 habitantes nos menores de 15 anos no ano de 2011 (BRASIL, 2012).

Dos estados brasileiros o Ceará ocupa o 13º lugar em número de casos e o 4º lugar da região Nordeste. É classificado, segundo o Ministério da Saúde, como uma região com "muito alta" endemicidade para doença, apresentando, em 2011, um coeficiente de detecção de casos novos de 23,7/100.000 habitantes na população geral e de 5,0/100.000 habitantes nos menores de 15 anos (CEARÁ, 2012). O número de casos da doença no estado apresenta distribuição variável conforme a faixa etária, com poucos casos na idade de 1 a 4 anos e maior incidência com o avanço da idade (Tabela 1).

Tabela 1 - Número e detecção de casos (incidência) de hanseníase por faixa etária no estado do Ceará em 2011.

Faixa Etária	Nº de Casos	Detecção por 100.000hab
1 – 4	2	0,4
5 – 9	29	4,2
10 – 14	82	9,7
15 – 19	83	9,8
20 – 29	196	12,5
30 – 39	296	24,0
40 – 49	398	39,0
50 +	917	57,4
Total	2003	23,7

Fonte: Ceará, Secretaria de Saúde do Estado (2012).

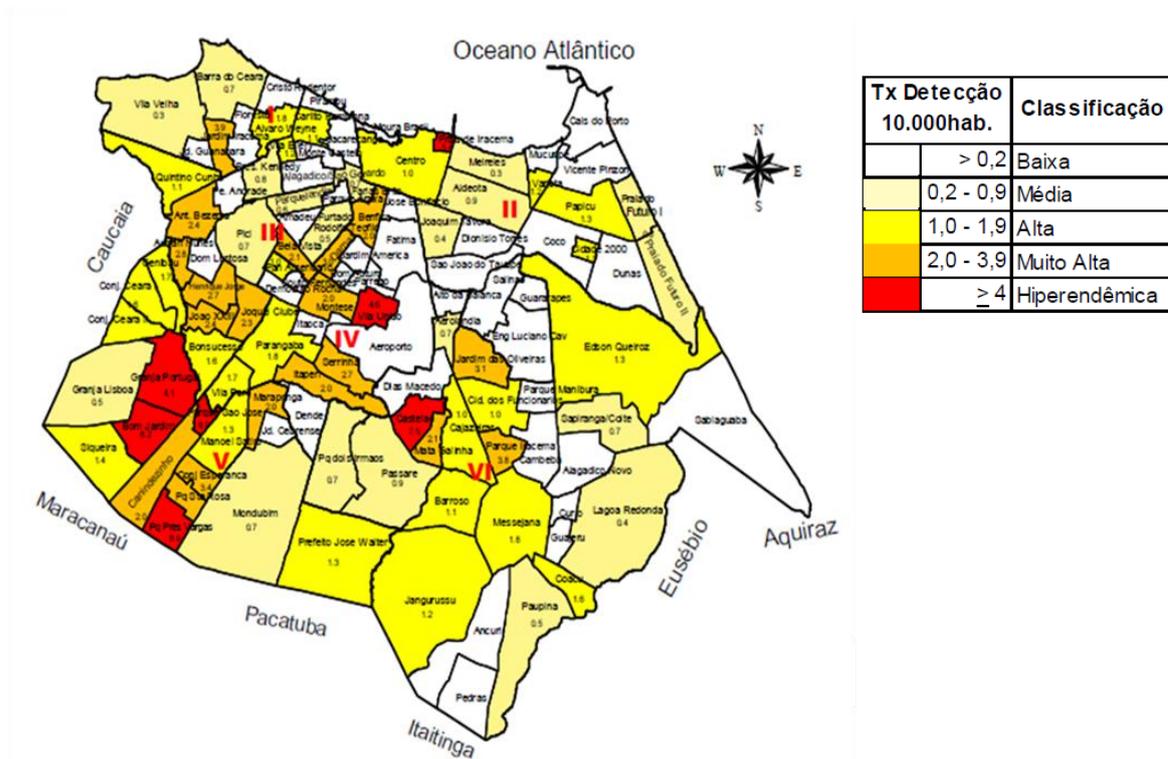
Como estratégia para o diagnóstico precoce e quebra na cadeia de transmissão da doença o Ministério da Saúde preconiza o exame dos contatos intradomiciliares, que residem ou residiram nos últimos 5 anos com o caso índice. Além do exame dermatoneurológico dos contatos, aplica-se a vacina BCG (bacilo de Calmette-Guérin) (BRASIL, 2002). Essa vacina, apesar de possuir eficácia variada na literatura contra hanseníase (ZODPEY 2007), é utilizada nos contatos intradomiciliares saudáveis, com administração de uma dose aos que possuem somente uma ou nenhuma dose anterior de BCG (BRASIL, 2007). A taxa de cobertura vacinal dos contatos no estado do Ceará foi de 60,6% em 2011, bem menor do que a observada em 2002 (91,5%) (CEARÁ, 2012).

Rodrigues *et al.*(2007), em estudo de caso-controle conduzido no estado do Ceará, relataram, por meio da análise da presença de cicatriz vacinal, uma proteção de 86% da vacina BCG contra hanseníase na faixa etária de 18 a 29 anos. Entretanto, apesar da eficácia sugerida na literatura e da elevada cobertura vacinal ao nascer no Brasil, de quase 100% (RODRIGUES *et al.*, 2007), o número de casos da doença em adultos e menores de 15 anos permanece elevado no país (BRASIL, 2008).

O município de Fortaleza apresenta "muito alta" endemicidade para doença, com coeficiente de detecção de casos novos de 26,1/100.000 habitantes na população geral em 2011 (CEARÁ, 2012) e de 0,86/10.000 habitantes nos menores de 15 anos em 2010 (FORTALEZA, 2011). Houve uma tendência crescente no número de casos no município ao longo de 15 anos, este fato acompanhado da subnotificação de casos torna a situação da doença na região preocupante (CEARÁ, 2012).

A figura 2 ilustra a taxa de detecção de casos novos da doença na cidade de Fortaleza, com a regional V (região sudoeste do mapa) representando a área com maior taxa de detecção (FORTALEZA, 2008).

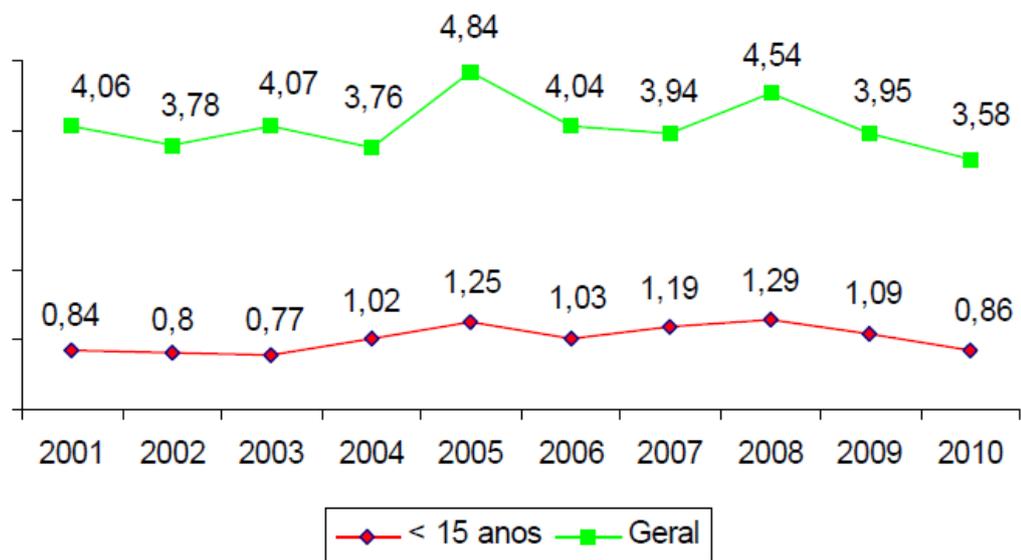
Figura 2- Coeficiente de detecção dos casos de hanseníase por bairro em Fortaleza, 2008.



Fonte: Fortaleza, Secretaria Municipal de Saúde (2008).

Entre os menores de 15 anos, a elevada endemicidade da doença na cidade (FORTALEZA, 2011) sugere a presença de focos de transmissão ativos (BRASIL, 2008). A figura 3 ilustra a evolução na taxa de detecção de casos novos da doença na população geral e em menores de 15 anos ao longo dos anos de 2001-2010. Observa-se uma tendência ao declínio da incidência em 2009 e 2010, o que não reflete o controle da doença, tendo em vista que ela cursa com 30% de prevalência oculta (FORTALEZA, 2011).

Figura 3 - Taxa de detecção de casos novos de hanseníase em Fortaleza (por 10.000 habitantes) no período de 2001 a 2010.



Fonte: Fortaleza, Secretaria Municipal de Saúde (2011).

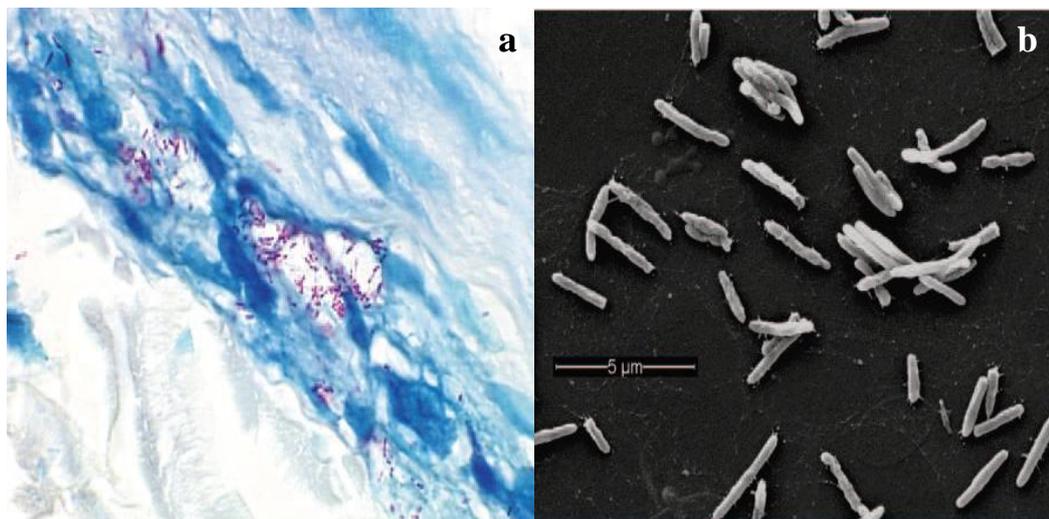
1.3 Agente Etiológico

M. leprae foi o primeiro microorganismo associado à doença em humanos (PARKASH; SINGH, 2012). Taxonomicamente é pertencente à ordem *Actinomycetalis* e à família *Mycobacteriaceae* (EICHELMANN *et al.*, 2012). É um bacilo álcool ácido-resistente (SCOLLARD *et al.*, 2006), ou seja, que resiste a descoloração com álcool-ácido devido à rica composição lipídica da sua parede celular (EISENSTADT; HALL, 1995) (Fig.4a, pág.21). Além disso, apresenta-se como um bacilo reto ou ligeiramente curvo (Fig.4b, pág.21), imóvel, não formador de esporos que sobrevive bem em ambiente de microaerofilia (SCOLLARD *et al.*, 2006; PARKASH; SINGH, 2012). Possui preferência por regiões corporais com temperatura inferior 37°C, como pele, mucosa nasal e nervos periféricos (FUKUTOMI *et al.*, 2008, *apud* BRAND, 1959).

É uma bactéria intracelular obrigatória, com crescimento lento de cerca de 12 a 14 dias (SUZUKI *et al.*, 2012) e tropismo por células de Schwann no nervo periférico e macrófagos (PARKASH; SINGH, 2012). O *M. leprae* não cresce em meios de cultura artificiais, por isso, seu crescimento tem sido restrito a modelos de estudo em tatus e camundongos (SCOLLARD *et al.*, 2006).

O genoma total de *M. leprae* possui 3.3 Mbp, em que somente a metade contém genes que codificam proteínas, enquanto o restante é composto por pseudogenes e regiões não codificadoras. Ele perdeu durante o processo evolutivo cerca de 1500 genes, o que prejudicou sua capacidade metabólica, tornando-o exigente para o crescimento (PARKASH; SINGH, 2012).

Figura 4 - Aspectos morfológicos do *Mycobacterium leprae*.

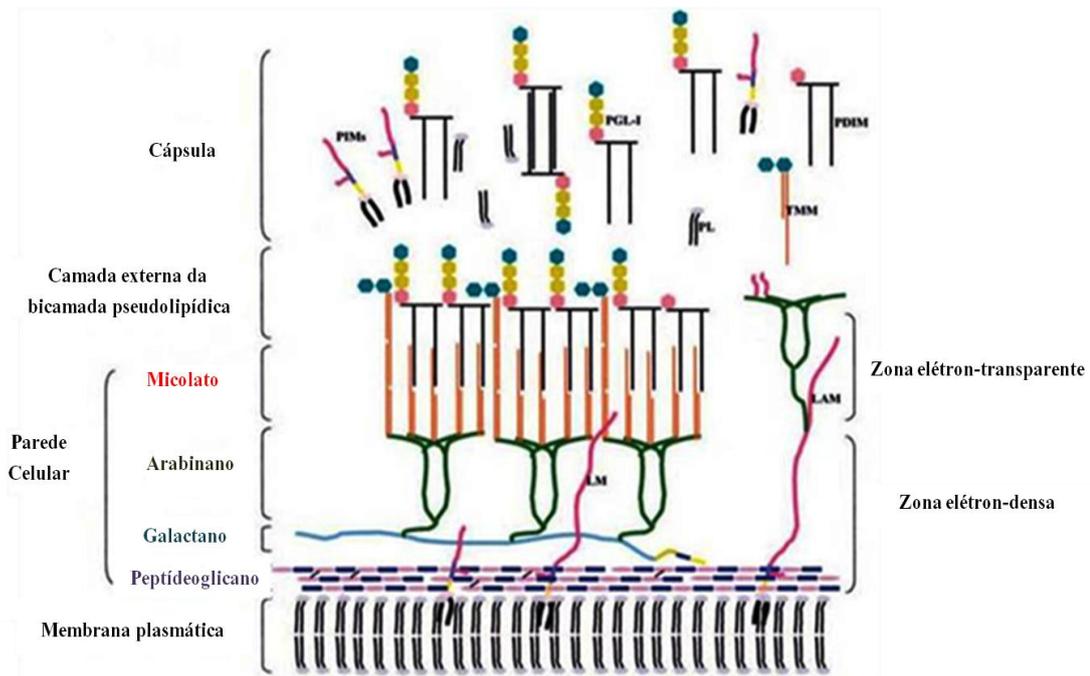


Fonte: Scollard *et al.* (2006).

a) *M. leprae* (em lilás) corado pelo método de Fite-Faraco, no interior de nervo periférico humano. Aumento de aproximadamente 800X. b) Microscopia eletrônica de varredura de uma suspensão de *M. leprae* derivado de pata de camundongo. *M. leprae*, assim como as outras micobactérias, tende a organizar-se em aglomerados. Aumento de aproximadamente 12.000X.

Possui parede celular semelhante as outras micobactérias com um complexo covalentemente ligado de peptidoglicano e arabinogalactano, formando uma zona elétron-densa. Os ácidos micólicos ligados à porção terminal do arabinano compõem a bicamada pseudolipídica. A camada mais externa desta é formada por monomicolatos de trealose (TMM), dimecoserosatos de fitiocerol (PDIMs) e glicolipídeos fenólicos (PGLs) (Fig.5, pág.22) (SCOLLARD *et al.*, 2006).

Figura 5 - Estrutura da parede celular do *Mycobacterium leprae*.



Fonte: Scollard *et al.* (2006).

A membrana plasmática é coberta pela parede celular que é formada pelo peptídeoglicano ligado covalentemente ao galactano por uma unidade de arabinogalactano. Três cadeias de arabinano são ligadas ao galactano, formando, juntamente com o peptídeoglicano, uma zona elétron-densa em torno de *M. leprae*. A camada interna da bicamada pseudolipídica é formada por ácidos micólicos ligados à cadeia terminal do arabinano. A camada mais externa desta é formada por monomicolatos de trealose (TMM) e ácido micocerosoico de dimecoserosatos de fitocerosol (PDIM) e glicolipídios fenólicos (PGLs), formando a zona elétron-transparente. A cápsula é composta por grande quantidade de PGL-1, PDIMs, PIMs (Manosídeo fosfatidilinositol) e PLs (Fosfolipídios). Lipoarabinomanan (LAM) e Lipomanan (LM), encontrados ancorados na membrana plasmática, também podem estar presentes na cápsula.

O glicolípido fenólico-1 (PGL-1) é a molécula lipídica dominante, específica e imunogênica da parede celular de *M. leprae*, compondo cerca de 2% da sua estrutura (SCOLLARD *et al.*, 2006). A porção trissacarídica da molécula é responsável pela penetração nas células de Schwann no nervo periférico por se ligar ao domínio G da cadeia $\alpha 2$ da laminina-2 na lâmina basal (RAMBUKKANA *et al.*, 1997; NG *et al.*, 2000). É considerado um fator de virulência de *Mycobacterium leprae*, relacionado com a sobrevivência do microorganismo em macrófagos, possivelmente pela regulação negativa na produção de superóxido (SCOLLARD *et al.*, 2006). Além disso, pode facilitar a infecção de macrófagos por se ligar a proteína C3 do sistema complemento

levando à opsonização. A ligação de C3 a seu receptor não acarreta um estresse oxidativo significativo, podendo *M.leprae* sobreviver no interior dos macrófagos após a opsonização (SCHLESINGER; HORWITZ, 1991).

A dosagem de anticorpos séricos anti-PGL-1, especialmente anticorpos IgM anti-PGL-1, tem sido utilizada nos estudos epidemiológicos para o rastreamento de infecção (BAZAN-FURINE *et al.*, 2011; CARDONA-CASTRO *et al.*, 2009; MOURA *et al.*, 2008), estando a soropositividade associada ao maior risco de adoecimento (MOURA *et al.*, 2008). Entretanto, os ensaios para a detecção desses anticorpos não possuem sensibilidade e especificidade suficiente para serem utilizados no diagnóstico da hanseníase (SCOLLARD *et al.*, 2006).

Apesar da transmissão não estar totalmente compreendida, a principal forma é através de gotículas das vias aéreas superiores de um indivíduo infectado. Após a infecção, um longo período de incubação é necessário ao adoecimento (SUZUKI *et al.*, 2012), geralmente de 2 a 7 anos (BRASIL, 2002). Outras supostas fontes de transmissão têm ganhado espaço na literatura, como o solo (TURANKAR *et al.*, 2012), a água (WAHYUNI *et al.*, 2010) ou até mesmo tatus infectados (RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011). Uma possível hipótese para sustentar a possibilidade de viabilidade do *M. leprae* no solo ou água é a sua capacidade de manter-se viável por até 72 horas no interior de *Acanthamoeba castellanii*, uma ameba de vida livre (LAHIRI; KRAHENBUHL, 2008).

Apesar destas evidências, as fontes de transmissão da doença ainda permanecem incertas. Sabe-se, porém, que os contatos de pacientes multibacilares possuem maior risco para o desenvolvimento da doença do que contatos de pacientes paucibacilares (FINE *et al.*, 1997). A intensidade do risco varia com a frequência do contato e carga bacilar do caso-índice, sendo os contatos intradomiciliares a população de maior risco (RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011).

1.4 Formas clínicas da doença

A hanseníase manifesta-se principalmente por sinais e sintomas dermatoneurológicos, caracterizando-se por lesões cutâneas com alteração de sensibilidade e acometimento neural. As lesões podem ser manchas, geralmente

hipocrômicas; placas; nódulos e infiltrações; que cursam na maioria das vezes com anestesia ou hipoestesia, rarefação de pelos e anidrose (BRASIL, 2002).

Podem acometer qualquer parte do corpo, sendo mais frequentes em face, nádegas, orelha, membros superiores, inferiores e tórax posterior. Além disso, a doença pode cursar com lesões em nervos periféricos, caracterizada por dor, espessamento neural e perda da sensibilidade e da força muscular nas áreas inervadas pelo nervo acometido (BRASIL, 2002).

Possui formas clínicas variáveis a depender do padrão de resposta imunológica desenvolvida pelo indivíduo. Desde cedo, sentiu-se a necessidade de classificar estas formas para facilitar o tratamento e o manejo do doente (LOCKWOOD; SARNO; SMITH, 2007).

Em 1966, Ridley e Jopling classificaram a doença baseando-se em critérios clínicos, histológicos e imunológicos e complementaram a classificação de Madri sugerindo cinco formas da doença, além da indeterminada (I): Tuberculóide-tuberculóide (TT), Dimorfo Tuberculóide (DT), Dimorfo-dimorfo (DD), Dimorfo Lepromatoso (DL) e Lepromatoso-lepromatoso (LL) (LOCKWOOD; SARNO; SMITH, 2007).

Na tentativa de facilitar a classificação, para fins de tratamento, a OMS criou, em 1982, a classificação operacional que divide a doença em duas formas, paucibacilar (PB) e Multibacilar (MB) (LOCKWOOD; SARNO; SMITH, 2007). Segundo Souza *et al.* (2009) a forma PB caracteriza-se pela presença de até cinco lesões cutâneas, baciloscopia negativa e ausência de troncos nervosos acometidos, enquanto que a forma MB caracteriza-se pela presença de mais de cinco lesões e/ou baciloscopia positiva e/ou pelo menos um tronco nervoso acometido.

As classificações de Ridley e Jopling e a operacional da OMS correlacionam-se, sendo as formas I e TT e DT classificadas como PB e as formas DD, DL e LL como MB (PARDILLO *et al.*, 2007, *apud* RIDLEY; JOPLING, 1966). A forma DT é algumas vezes classificada como uma forma MB da doença (SOUZA, 1997), já que alguns pacientes com essa forma clínica apresentam mais de 5 lesões.

A classificação operacional da OMS é amplamente utilizada em todo o mundo e permite o tratamento e manejo do doente nas regiões mais pobres onde a

classificação de Ridley e Jopling não pode ser realizada (PARKASH, 2009), devido à maior complexidade e à necessidade de profissionais patologistas para sua realização. Além disso, a classificação operacional simplifica o reconhecimento da doença e a instituição da poliquimioterapia (LOCKWOOD; SARNO; SMITH, 2007).

A reação do hospedeiro à presença do bacilo é determinante na definição da forma clínica a ser desenvolvida, tendo a resposta imunológica inata e adaptativa, um importante papel na imunopatologia da doença (SCOLLARD *et al.*, 2006).

1.5 Imunopatologia da hanseníase.

O paradigma da resposta imunológica adaptativa polarizada por duas subpopulações de linfócitos T auxiliares, Th1 e Th2, foi por muito tempo utilizado para explicar as formas clínicas da doença e a susceptibilidade ao adoecimento, uma vez que o seu espectro de manifestações é dependente da resposta imunológica do hospedeiro. Entretanto, a resolução da infecção requer o desenvolvimento de uma resposta imune que controle o crescimento do patógeno, mas que, ao mesmo tempo, limite a lesão tecidual causado por uma resposta exacerbada (BELKAID, 2008). A resposta mediada por células T regulatórias (Tregs) tem sido relacionada com a homeostasia e susceptibilidade à infecção (BELKAID; TARBELL, 2009) e tem ganhado espaço na imunopatogenia da hanseníase (OTTENHOFF, 2012; KUMAR *et al.*, 2011).

Muita especulação faz-se até hoje para explicar os fatores que levam algumas pessoas a desenvolver resistência e outras susceptibilidade à doença. Características genóticas dos indivíduos têm sido relacionadas ao adoecimento e polimorfismos em vários genes, incluindo em receptores semelhantes ao Toll -TLR (*Toll Like Receptors*) I e II, têm sido relacionados com alterações na resposta inata e adaptativa na hanseníase (GOULART; GOULART, 2009). Polimorfismo de genes que codificam citocinas, como IL-10 (MALHOTRA *et al.*, 2005) e TNF- α (SETTIN *et al.*, 2007) foram associados com o risco ao desenvolvimento de formas mais graves da doença. Polimorfismos em HLA também foram relacionados ao desenvolvimento da doença, com o haplótipo HLA-DRB1*10 estando associado a susceptibilidade e o HLA-DRB1*04 a resistência (VANDERBORGHT *et al.*, 2007). Entretanto, atualmente, não há um marcador que isoladamente seja um bom preditor de risco para infecção ou para desenvolvimento da doença (GOULART; GOULART, 2009).

A primeira linha de defesa frente à infecção é a resposta inata, no sítio inicial da infecção, que por sua vez é em parte responsável pelo tipo de resposta adaptativa a ser desenvolvido pelo indivíduo (MODLIN, 2010). Uma resposta inata eficiente, associada à baixa virulência do *M. leprae*, pode refletir na resolução da infecção pela maioria das pessoas. As células dendríticas podem ser as primeiras a reconhecer o bacilo e a captá-los na mucosa nasal, local inicial da infecção (SCOLLARD *et al.*, 2006). Entretanto, o bacilo pode modular a resposta de células dendríticas em prol de sua sobrevivência, visto que a infecção dessas células por *M. leprae* pode acarretar a redução na expressão de moléculas de MHC classe I e classe II (GULIA; FRIED; MASSONE, 2010).

Padrões moleculares associados ao *M. leprae* são inicialmente reconhecidos por TLRs expressos por células apresentadoras de antígeno, principalmente macrófagos e células dendríticas. O reconhecimento por esses receptores acarreta a produção de produtos antimicrobianos e fornece o sinal inicial para expressão de moléculas co-estimulatórias e produção de citocinas, guiando a resposta adaptativa (SCOLLARD *et al.*, 2006). Alterações nos TLRs têm sido relacionadas ao adoecimento para as formas mais graves da doença. Kang e Chae (2001), evidenciaram que a substituição de citosina por timina no nucleotídeo 2029 do códon de iniciação do gene TLR2 esteve presente apenas nos pacientes com a forma lepromatosa da doença.

O padrão de citocinas presentes no microambiente da apresentação antigênica induz ativação dos diferentes padrões de resposta imune celular efetora. A Interleucina-12 (IL-12) estimula a diferenciação do linfócito T virgem para o padrão Th1 com conseqüente produção de interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e ativação macrófágica. O TNF- α induz ao aumento da produção de enzimas líticas e de radicais livres de oxigênio pelo macrófago, limitando a sobrevivência do *M. leprae*. Em contrapartida, a liberação de IL-4 guia a diferenciação linfocitária para um padrão Th2, com produção de IL-10 e IL-4, induzindo a produção de anticorpos anti PGL-1 e inibindo a ativação macrófágica, fator que propicia a sobrevivência do *M. leprae*. (LIEW, 2002; FOSS, 1997).

O predomínio de um determinado padrão de resposta é mediado por citocinas liberadas pelas próprias células efetoras. A IL-4 produzida por células Th2 limita a

proliferação de células Th1 e o IFN- γ liberado por estas células limita a resposta Th2 (LIEW, 2002). Atualmente foi demonstrado que células Th1 podem produzir IL-10 como uma forma de auto-regulação, para controlar o dano colateral causado pela inflamação (TRINCHIERI, 2007).

Esse balanço entre as respostas Th1/Th2 ainda é utilizado por muitos autores para explicar as diferenças nas formas clínicas da hanseníase. O pólo tuberculóide é caracterizado pela resposta mediada por células, com predomínio de citocinas do padrão Th1, limitação da proliferação bacilar e resistência relativa ao patógeno (SCOLLARD *et al.*, 2006). As lesões nessa forma da doença estão infiltradas por células CD4⁺ produtoras de IFN- γ , com formação de granulomas bem delimitados e raros bacilos nas lesões (BRITTON; LOCKWOOD, 2004).

Ao contrário, o pólo lepromatoso é caracterizado pelo predomínio do padrão Th2, com intensa multiplicação bacilar (SCOLLARD *et al.*, 2006), grande número de lesões, intensa infiltração da pele e nervos periféricos e aumento nos níveis séricos de anticorpos anti-PGL1. Nas lesões estão presentes macrófagos espumosos repletos de bacilos e não há a formação de um granuloma bem definido (BRITTON; LOCKWOOD, 2004). Esses macrófagos repletos de lipídeos, denominados células de Virchow, são característicos dessa forma da doença. De fato, *M. leprae* possui a capacidade de induzir o acúmulo de lipídeos em macrófagos e esse fato é acompanhado pela maior produção de PGE₂, um imunomodulador que regula negativamente a resposta Th1 (MATTOS *et al.*, 2010).

A polarização entre as respostas Th1 e Th2 tem sido questionada com a descoberta das células T regulatórias (ROOK *et al.*, 2004). Essas células podem estar relacionadas à hiporesponsividade da célula T observada nos pacientes lepromatosos (BRITTON; LOCKWOOD, 2004).

Kumar *et al.* (2011) analisou por PCR em tempo real os níveis de RNAm para 84 genes relacionados com a resposta imune Th1, Th2 e Th3 em pacientes com hanseníase e controles saudáveis. Eles identificaram que a hanseníase MB, BL/LL, cursa com redução na expressão do RNAm de genes característicos da resposta Th1 e Th2 e com o predomínio da resposta imune Th3 (mediada por Treg produtora de TGF- β), negando a noção prévia do desvio para o padrão Th2 na forma MB da doença.

1.6 Células T regulatórias: Definição e imunofenótipo

As células T regulatórias compõem cerca de 1% a 2% dos linfócitos TCD4⁺ no sangue periférico humano (BAECHER-ALLAN *et al.*, 2001) e são responsáveis pela manutenção da tolerância e homeostasia (SAKAGUCHI *et al.*, 2010). Desde cedo a existência de células supressoras vem sendo debatida. Gerson e Kondo (1970), em estudo de tolerância a antígenos estranhos em camundongos, propuseram que células T de origem tímica poderiam ter um papel na indução de tolerância.

De início, alguns marcadores, em murinos, foram relacionados a essas células, como a expressão de Lyt-1⁺(CD5), Lyt-2⁺(CD8) (SAKAGUCHI; WING; MIAYRA, 2007). Por volta de 1980, os estudos com células T supressoras decaíram quando foi demonstrado, por biologia molecular, no camundongo, que uma suposta região I-J no complexo MHC, responsável por codificar moléculas envolvidas na regulação da resposta imune, na verdade não existia (KRONENBERG *et al.*, 1983; SAKAGUCHI; WING; MIAYRA, 2007). Na década de 1990 pesquisas sugeriram a existência de células Treg produtoras de IL-10 (Tr1), e de células Treg produtoras de TGF- β (Th3) em modelos animais (SAKAGUCHI; WING; MIAYRA, 2007).

Em 1995, Sakaguchi *et al.* verificaram que a transferência de uma suspensão de células CD4⁺ depletadas de CD25 a camundongos atímicos induziu várias doenças autoimunes, que foram prevenidas pela administração de células CD4⁺CD25⁺. A partir desse estudo as células CD4⁺CD25⁺ foram relacionadas com a manutenção da homeostasia.

Em 2001, as células Treg foram caracterizadas pela primeira vez em humanos como células CD4⁺CD25^{+/high} (SAKAGUCHI *et al.*, 2010). Em 2003, o gene FOXP3 (forkhead box P3) foi identificado como o principal regulador destas células, sendo responsável por seu desenvolvimento e função em camundongos (FONTENOT *et al.*, 2003) e posteriormente em humanos (WALKER *et al.*, 2003). Em 2005, os primeiros anticorpos monoclonais anti-FOXP3 humano estiveram disponíveis para uso em citometria de fluxo (RONCADOR *et al.*, 2005).

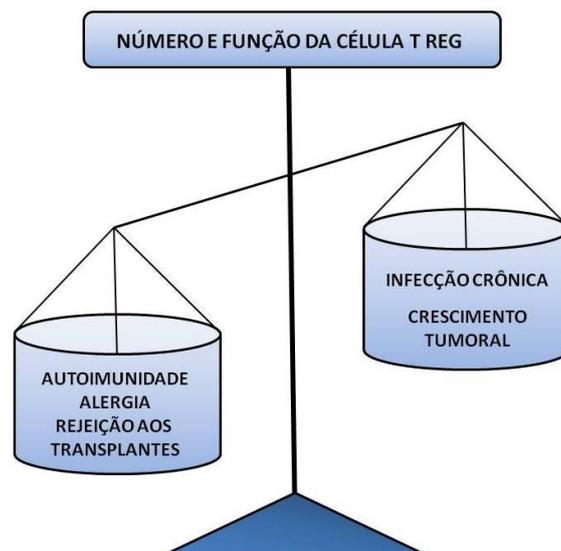
Com a descoberta de novos marcadores e com evolução dos equipamentos de citometria de fluxo ao longo dos anos, que se tornaram cada vez mais utilizados pelos pesquisadores, foi possível realizar a imunofenotipagem dessas células através da

análise de vários marcadores simultaneamente, de forma rápida e quantitativa (SHAPIRO, 2004).

Mutações espontâneas no gene FOXP3 causam doenças autoimunes linfoproliferativas ligadas ao X e sua perda resulta na ausência de Treg e morte de camundongos. Em humanos, as mutações estão associadas com a Síndrome IPEX (Síndrome da Imuno disfunção, poliendocrinopatia enteropatia ligada ao X), caracterizada pelo desenvolvimento de doenças autoimunes, como diabetes tipo 1 (RONCAROLO; GREGORI, 2008). Apesar do gene FOXP3 ser um importante regulador da função supressora, ele pode ser expresso transitoriamente em célula T efetora ativada sem conferir a elas atividade supressora (GAVIN *et al.*, 2006; ALLAN *et al.*, 2007). Entretanto, em células Treg a expressão dessa molécula é estável e mais elevada do que em células ativadas (ALLAN *et al.*, 2007).

Apesar da importância dessas células para manutenção da tolerância e homeostasia do sistema imunológico, o desequilíbrio em seu número e função está relacionado com o desenvolvimento de diversas enfermidades (SHALEV *et al.*, 2011), como ilustrado na figura 7.

Figura 7 - Esquema simbolizando como a redução ou o aumento no número/função de Tregs pode estar relacionado ao desenvolvimento de diversas enfermidades.



Fonte: Adaptado de Shalev *et al.* (2011).

Apesar das Tregs terem sido caracterizadas inicialmente pela expressão de $CD4^+CD25^+$, outros marcadores podem ser utilizados para identificação dessas

células. Nos murinos, as células $CD4^+CD25^+$ representam uma população homogênea de Tregs, mas em humanos esses marcadores são insuficientes para sua caracterização, visto que células T $CD8^+$ podem exercer funções regulatórias e que células T ativadas podem expressar CD25 em níveis intermediários. Diante disto, as Tregs humanas são identificadas pela elevada expressão de CD25 ($CD25^{high}$). Um problema para identificação dessas células por citometria de fluxo é a variabilidade na definição da intensidade de fluorescência que define a população de $CD25^{high}$, levando a diferentes frequências dessa população de Treg pelos diversos autores (BANHAM; POWRIE; SURI-PAYER, 2006).

A molécula CD25 (receptor de IL-2) não é apenas um marcador para sua identificação, é também importante para sua função e sobrevivência (QUINTANA; COHEN, 2008). Camundongos com deficiência de IL-2 desenvolvem grave manifestação autoimune e inflamação, com redução do número de células $CD4^+CD25^+$ (SAKAGUCHI; WING; MIAYRA, 2007). Assim como nos camundongos, células T humanas são dependentes da IL-2 para funções regulatórias e necessitam dessa citocina para sustentar a expressão de FOXP3 (MATTHEW *et al.*, 2006). Apesar da dependência da IL-2, as células Tregs não a produzem e dependem do fornecimento por células T efectoras, principalmente do fenótipo $CD4^+CD25^{low}$, como demonstrado em camundongos (SETOGUCHI *et al.*, 2005).

Steinborn *et al.* (2008) descreveram ainda outra população de célula Treg caracterizada pela expressão de $CD4^+CD25^+FOXP3^{high}$, que foram relacionadas a maior capacidade supressora *in vitro* em mulheres gestantes. De fato, células T expressando altos níveis de FOXP3 possuem maior capacidade supressora, sendo a expressão de FOXP3 mais crítica para supressão do que a expressão de CD25 (BANHAM; POWRIE; SURI-PAYER, 2006). Estas células são consideradas uma população de Treg madura e funcional, diferenciada na presença de IL-2 (BAYER *et al.*, 2008).

Vários outros marcadores foram relacionados às células Tregs. $CD62L^+$ (L-selectina) é expresso em algumas populações de Tregs e, apesar de não ser um marcador exclusivo dessas células, é expresso naquelas com maior capacidade supressora (FU *et al.*, 2004). Outros marcadores como CD95 (FAS), GITR e CTLA-4 (CD152) são superexpressos por Tregs (BLUESTONE; ABBAS, 2003; SAKAGUCHI

et al., 2010; TRZONKOWSKI *et al.*, 2009). O marcador CD127 (receptor para IL-7) é ausente ou expresso em menor quantidade em Tregs, uma vez que elas não necessitam da IL-7 para sobrevivência, ao contrário de células T efetoras (SAKAGUCHI *et al.*, 2010; TRZONKOWSKI *et al.*, 2009). Além disso, as células Tregs podem ser caracterizadas pela elevada expressão de CD39 e CD73, ectonucleotidases envolvidas na função de supressão pela catabolização do ATP em adenosina (TRZONKOWSKI *et al.*, 2009).

1.7 Tipos e funções das células T regulatórias

Existem várias subclasses de células Tregs que expressam receptores variados e desempenham suas funções por mecanismos diferentes. São subdivididas em duas populações principais, célula Treg naturalmente ocorrente (nTreg) e célula Treg adaptativa/induzida (a/iTreg) (BLUESTONE; ABBAS, 2003; SHALEV *et al.*, 2011; WHITESIDE, 2012).

Células nTreg desenvolvem-se no timo e requerem reconhecimento de antígenos próprios via TCR e co-estimulação com CD28 para seu desenvolvimento a partir de precursores imaturos (BLUESTONE; ABBAS, 2003). A estimulação com anti-CD3 e a co-estimulação com anti-CD28 induz a expansão dessas células *in vitro* (TANG *et al.*, 2004). Elas compartilham muitos marcadores de superfície com as células T virgens, como CD45RA e CD62L, e não expressam marcadores de ativação (HALL *et al.*, 2011). Podem suprimir células T por contato direto célula-célula, sem a necessidade de citocinas, com indução de apoptose por mecanismos diferentes (GOLEVA *et al.*, 2005; SHALEV *et al.*, 2011).

As células iTreg são convertidas na periferia durante o processo inflamatório na presença de citocinas regulatórias, como TGF- β , e medeiam a supressão principalmente pela produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β (VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008). A ligação da molécula CTLA-4, expressa nas células iTregs, com CD80/CD86 na APC fornece um sinal co-estimulatório importante para seu desenvolvimento e ativação (MIYARA; SAKAGUCHI, 2007; SHALEV *et al.*, 2011; BILATE; LAFAILLE, 2012).

Apesar das células Treg do fenótipo CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ terem sido melhor caracterizadas na literatura, outros tipos de Tregs não convencionais já foram

relatadas. A célula Tr1 representa uma subpopulação de célula Treg induzida na periferia após estimulação antigênica de células T virgens na presença de IL-10, e que produzem altos níveis de IL-10. Elas não expressam a molécula FOXP3 (VIEIRA *et al.*, 2004), mas têm sido relacionadas com várias doenças autoimunes e com controle da resposta imune adaptativa aos patógenos em humanos (SHALEV *et al.*, 2011). A célula T regulatória helper 3 (Th3) é outro tipo de Treg induzida na periferia, fenotipicamente semelhante às células Tr1, mas que produz TGF- β (KONDĚLKOVÁ *et al.*, 2010). Elas suprimem a proliferação e a produção de citocinas por células Th1, controlando a inflamação mediada por estas células (SHALEV *et al.*, 2011).

Várias subclasses de células T CD8⁺ regulatórias já foram identificadas, e timócitos CD8⁺CD25⁺, similares em fenótipo às células nTreg CD4⁺, foram recentemente caracterizados. Essas células CD8⁺ expressam níveis elevados de RNAm para FOXP3, GITR e CTLA-4 e são capazes de suprimir as células T de forma contato-dependente, provavelmente via CTLA-4 (SHALEV *et al.*, 2011; JARVIS *et al.*, 2005). Clones de linfócitos T CD8⁺ expressando CD25⁺ e FOXP3⁺, isolados do sangue periférico humano, foram capazes de inibir a proliferação de células TCD4⁺ *in vitro* (JARVIS *et al.*, 2005). Essas células estiveram relacionadas a várias doenças como a hanseníase, especialmente da forma lepromatosa; diabetes tipo 1; esclerose múltipla e infecção pelo vírus HIV (JOOSTEN; OTTENHOFF, 2008).

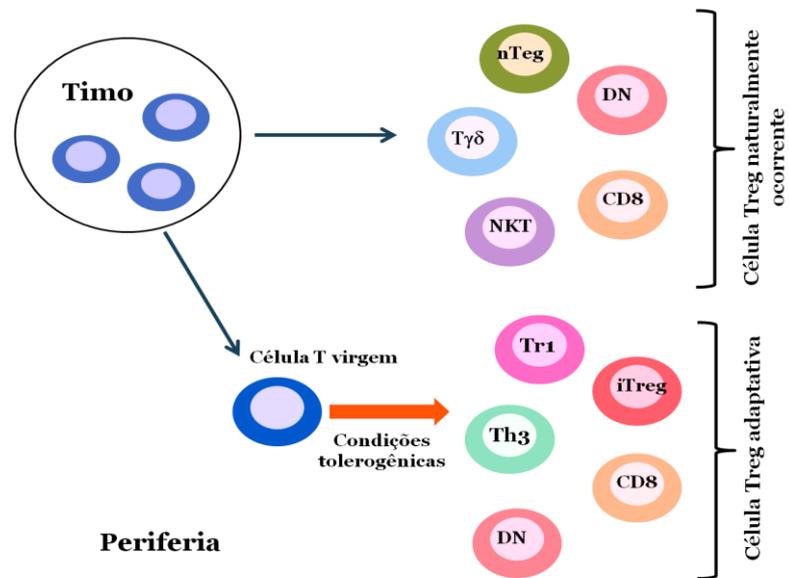
Além das populações de células Tregs aqui descritas, várias outras subclasses de células T também possuem função regulatória, como ilustrado na figura 8 (pág.34).

As células Tregs podem mediar a supressão de células T CD4⁺, TCD8⁺, linfócitos B e células do sistema imune inato por vários mecanismos diferentes (SEHRAWAT; ROUSE, 2011). Podem regular a resposta imune por produção de citocinas anti-inflamatórias, privação de citocinas, lise das células efetoras, alterações metabólicas na célula-alvo e inibição das funções da célula dendrítica (SHALEV *et al.*, 2011; SAKAGUCHI *et al.*, 2009).

Como as células Tregs são dependentes da IL-2 para sobrevivência e função de supressão e expressam altos níveis do receptor de IL-2 (CD25), elas competem com a célula efetora pela utilização desta citocina, resultando em apoptose dessas células por privação de IL-2 (PANDIYAN *et al.*, 2007). Além disso, nos humanos, a célula nTreg

ativada pode expressar preferencialmente granzima A e a célula iTreg granzima B o que leva à apoptose da célula alvo através do contato direto por liberação de perforinas e granzimas (GROSSMAN *et al.*, 2004).

Figura 8 - Populações de células T regulatórias classificadas de acordo com as duas subclasses principais: Célula T regulatória naturalmente ocorrente e Célula T regulatória adaptativa.



Abreviações: DN= células T duplo negativas; nTreg= $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ naturalmente ocorrente; iTreg= $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ induzidas; NKT= células natural Killer; $\gamma\delta T$ = linfócitos com TCR $\gamma\delta$.

Fonte: Adaptado de Shalev *et al.* (2011).

A adenosina, produzida pela hidrólise do ATP extracelular pelas ectoenzimas CD39 e CD73, regula a resposta inflamatória, possuindo função inibitória sobre a célula a T via o receptor de adenosina A2A. A adenosina pode ainda atravessar a membrana da célula T efetora via junções gap (VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008). Ela inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias e radicais superóxido. Além disso, a ligação da adenosina a seu receptor induz à dessensibilização dos receptores de quimiocinas, importantes para quimiotaxia de leucócitos (DWYER *et al.*, 2007).

A produção de citocinas inibitórias é outro mecanismo utilizado para imunossupressão. A IL-10 e o TGF- β têm recebido especial atenção na literatura, não só pela capacidade supressora, mas também por estarem relacionadas com a indução de células iTreg *in vivo* e *in vitro*. Apesar disso, seu papel na função das células nTregs

é discutível, porque estas células medeiam a supressão principalmente por mecanismos dependente do contato célula-célula (VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008). Células Treg também podem expressar TGF- β em sua superfície, o que parece mediar a supressão de outras células de uma forma contato-dependente (NAKAMURA; KITANI; STROBER, 2001). A IL-35, uma citocina inibitória, é produzida principalmente por Tregs e é importante para sua capacidade supressora (COLLISON *et al.*, 2007; VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008). Ela suprime a proliferação da célula T ao bloquear o ciclo celular na fase G1, sem indução de apoptose (VIGNALI; KUCHROO, 2012).

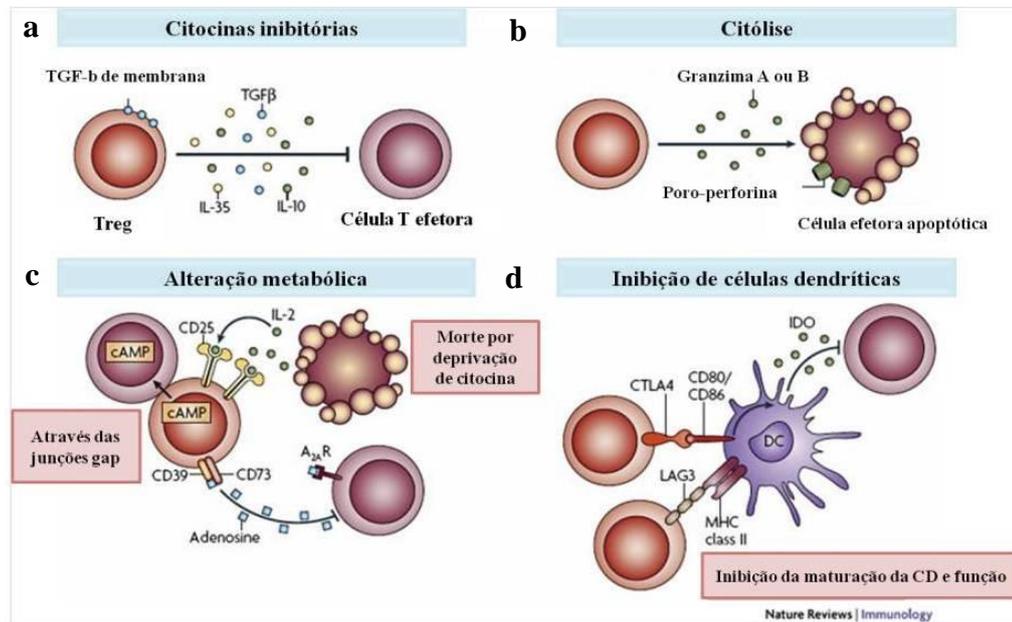
As células Tregs, além de agirem sobre células T, podem interferir com a maturação e função das células dendríticas. Elas podem induzir a expressão de IDO (indoleamina 2,3-dioxygenase) e diminuir a expressão de moléculas co-estimulatórias em células dendríticas, por um mecanismo dependente da ligação do CTLA-4 às moléculas CD86/CD80 (SHALEV *et al.*, 2011; WING; SAKAGUCHI, 2012). A enzima IDO é responsável pelo catabolismo do triptofano, resultando na depleção deste aminoácido e na produção de metabólitos pró-apoptóticos (GROHMANN; FALLARINO; PUC CETI, 2003). Além disso, a IL-10 e o TGF- β produzidos por Tregs modulam negativamente a expressão de CD86/CD80, CD40 e IL-12 em células dendríticas, interferindo na ativação da célula T (BLUESTONE; TANG, 2005). A molécula LAG-3 expressa em Tregs, ao se ligar à molécula de MHC classe II nas células dendríticas, inibe a maturação e função dessas células (SHALEV *et al.*, 2011).

A figura 9 (pág.36) resume os principais mecanismos da supressão mediada por células Tregs, tais como: produção de citocinas inibitórias, lise da célula efetora, alteração metabólica e inibição das células dendríticas.

Ainda não foi completamente elucidado se as células Tregs possuem naturalmente a capacidade de suprimir diversos tipos celulares, ou se podem adaptar-se a suprimir tipos específicos de acordo com o ambiente em que se encontram. Entretanto, evidências apontam que conforme o tecido e condições inflamatórias, elas podem expressar fatores de transcrições diferentes, resultando em Tregs tecido-específicas diferentes em função. A molécula T-bet, um fator de transcrição importante para diferenciação de células Th1 efectoras, pode ser expresso em Tregs, induzindo a expressão CXCR3 que facilita a migração dessas células ao sítio da

resposta Th1. A ausência desse fator de transcrição em Tregs as torna incapazes de inibir a resposta Th1 (JOSEFOWICZ; LU; RUDENSKY, 2012).

Figura 9 - Mecanismos de supressão mediada por células T regulatórias.



Fonte: Vignali; Collison; Workman (2008).

a) Produção de citocinas inibitórias: TGF- β (Fator de transformação do crescimento β), IL-10 (Interleucina-10) e IL-35. b) Citólise induzida por perforina e granzimas. c) Apoptose induzida por privação de IL-2; inibição mediada por cAMP (AMP cíclico); e imunossupressão mediada pela adenosina, gerada pela clivagem do ATP por CD39 e CD73. d) Inibição da maturação da célula dendrítica (CD) pela ligação da molécula LAG3 (gene de ativação de linfócitos 3) ao MHC II; indução de IDO (indoleamina 2,3-dioxigenase) na CD pela interação entre o CTLA-4 (antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico) e CD80/CD86.

1.8 Papel das Tregs na resposta às infecções.

As Tregs podem ser ativadas ou induzidas, a depender da natureza do patógeno e interações com o hospedeiro, podendo reconhecer epítomos de antígenos microbianos. O microambiente da infecção, com a presença de IL-10, IL-2 e TGF- β , pode induzir a proliferação dessas células (SEHRAWAT; ROUSE, 2011).

Outros fatores, como a vacinação, estão relacionados à indução dessas células. Belkaid *et al.* (2008), ao revisarem o papel das Tregs nas infecções, relataram que a vacinação com BCG pode induzir células Treg *in vivo* e que estas células acumulam no sítio da infecção na pele.

Ding, Xu e Bromberg (2012), ao revisarem a recirculação de células Tregs em modelos animais e em humanos, afirmam que durante a resposta imune inflamatória as Tregs recirculam entre o sangue, sítio da infecção e linfonodos de drenagem. Nos linfonodos, elas podem suprimir a resposta de células efetoras, interagir com células dendríticas residentes e expressar receptores que permitem sua migração a tecidos específicos.

Durante o curso de uma infecção crônica o desenvolvimento de células Tregs é importante para prevenir o dano tecidual causado pela resposta imune. A homeostasia induzida, entre o micro-organismo e o hospedeiro, pode ser mutuamente benéfica, mas em caso de controle exacerbado pode favorecer o crescimento e a persistência do patógeno (BELKAID *et al.*, 2008).

O papel das células Tregs na supressão da resposta imune já foi demonstrado em vários modelos de infecções. Netea *et al.* (2004) observaram que a depleção de dessas células em camundongos infectados por *Candida albicans* resultou numa redução de 10 vezes no crescimento fúngico. El-Badawy *et al.* (2012) encontraram maior frequência de células Tregs e menor frequência de células CD4⁺ produtoras de IFN- γ em pacientes com hepatite B crônica quando comparados a controles saudáveis, sugerindo a participação das Tregs na supressão de células efetoras e na persistência da infecção viral. Campanelli *et al.* (2006) purificaram e expandiram células CD4⁺CD25⁺ das lesões de pacientes com leishmaniose cutânea e demonstraram que essas células suprimem a proliferação de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) a estimulação com fitohemaglutinina.

Infecções por micobactérias também estão associadas a indução de Tregs, que parecem estar envolvidas na perpetuação dessas infecções. Esse fato foi inicialmente demonstrado em 1974, onde a transferência de timócitos de ratos imunizados com BCG a receptores singênicos exerceu efeito supressor na resposta a estimulação posterior com BCG (HA;WAKSMAN; TREFFERS, 1974). Scott-Browne *et al.* (2007) demonstraram que a depleção de células Tregs reduz a carga bacilar nos pulmões de camundongos infectados com *Mycobacterium tuberculosis*. Em pacientes com tuberculose ativa a depleção de Tregs em mononucleares de sangue periférico aumentou a produção de IFN- γ frente antígeno de *M.tuberculosis in vitro* (HOUGARDY *et al.*, 2007). Singh *et al.* (2012) encontraram maior frequência de

células $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ em pacientes com tuberculose pulmonar quando comparados a controles saudáveis, sendo esta frequência maior naqueles com carga bacilar elevada. Shafiane *et al.* (2010) demonstraram que Tregs específicas para *M.tuberculosis* foram capazes de retardar o aparecimento de células efectoras $CD4^+$ e $CD8^+$ e de aumentar a carga bacilar nos pulmões de camundongos infectados com *M.tuberculosis*.

Apesar desses indícios da importância das Tregs na perpetuação de infecções crônicas, seu papel na hanseníase não está claro. A hiporesponsividade de pacientes com hanseníase lepromatosa foi desde cedo um aspecto intrigante da doença (REA, 1983). Numerosos estudos nos anos 80 (NATH *et al.*, 1980; OTTENHOFF *et al.*, 1986; MODLIN *et al.*, 1986; SASIAIN *et al.*, 1989) sugeriram o papel de células supressoras na hanseníase, entretanto com achados controversos.

Sasiain *et al.*(1989), ao cultivar CMSP, previamente estimuladas com *M.leprae*, com CMSP autólogas na presença de fitohemaglutinina ou concavalina A, observou menor supressão das CMSP dos pacientes com a forma lepromatosa da doença. Resultados semelhantes foram encontrados por outros (NATH *et al.*, 1980), sugerindo que os pacientes lepromatosos teriam maior dificuldade para montar uma resposta de T supressor adequada.

Outros grupos, contrariamente, defendiam o papel de células supressoras na anergia observada em pacientes lepromatosos. Ottenhoff *et al.* (1986) isolaram clones de linfócitos T supressor do sangue periférico de paciente com hanseníase lepromatosa e verificaram que todos os clones foram capazes de suprimir a resposta de CMSP à estimulação com *M.leprae*. Nesse estudo, os clones eram do fenótipo $CD3^+CD8^+$, sendo alguns $CD3^+CD8^+CD4^+$. Achados semelhantes foram encontrados por Modlin *et al.* (1986), em que clones de linfócitos T $CD8^+$ supressor isolados das lesões de pacientes lepromatosos suprimiram a resposta de CMSP e de células $CD4^+$ a estimulação com concanavalina A. Entretanto, a ausência de marcadores específicos para essas células nessa época e variações nas metodologias utilizadas nos ensaios de supressão pode ter influenciado a geração de achados divergentes.

Mesmo após a descoberta de marcadores que caracterizam as populações de células Tregs, poucos estudos recentes avaliaram a frequência de células Treg $CD4^+$ em pacientes com hanseníase e nenhum estudo identificou a frequência de células

Treg CD8⁺. Attia *et al.* (2010), avaliaram a frequência de células CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ no sangue periférico total de pacientes com hanseníase e observaram que aqueles com a forma tuberculóide da doença possuíam maior frequência dessas células do que os controles. Os autores utilizaram a expressão de CD25 em células CD8 para definição da população CD25^{high}, uma vez que linfócitos CD8 possuem apenas níveis intermediários dessa molécula. Contrariamente, Palermo *et al.* (2012), após a estimulação de CMSP com antígenos de parede celular de *M.leprae* (MLCwA), relataram o aumento na frequência de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ em pacientes lepromatosos, defendendo o papel dessas células na patogênese da doença. As condições diferentes dos ensaios e as variações na estratégia de *gate* para identificação das Tregs pode ter gerado esses achados diferentes.

Diante da importância epidemiológica dos menores de 15 anos com hanseníase e da ausência de estudos avaliando as células Tregs CD4⁺ ou CD8⁺ nos pacientes e contatos nessa faixa etária, investigamos a frequência de diferentes populações de células Tregs em pacientes com hanseníase e contatos intradomiciliares, ambos menores de 15 anos e formulamos os seguintes questionamentos: As Tregs podem estar envolvidas na patogênese da hanseníase nos menores de 15 anos? Existem diferenças na frequência de células T regulatórias entre os pacientes e contatos? Essa diferença pode ser influenciada pela forma clínica do paciente?

HIPÓTESES



2. HIPÓTESES

Os indivíduos menores de 15 anos com hanseníase apresentam um perfil imunológico de suscetibilidade à doença, com maior frequência de células T regulatórias no sangue periférico do que o contato, a depender da forma clínica da doença.

As células T regulatórias correlacionam-se negativamente com a frequência de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ não regulatórios nos pacientes, podendo este fato ser influenciado pela forma clínica da doença.

OBJETIVOS



3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar as populações de células T regulatórias em indivíduos com hanseníase e contatos, abaixo de 15 anos, que possam estar relacionadas à susceptibilidade em adoecer.

3.2 Objetivos Específicos

Identificar a frequência de diferentes populações de células T regulatórias em pacientes e contatos, menores de 15 anos.

Relacionar a frequência de células T regulatórias com a forma clínica do paciente.

Correlacionar a frequência de células T regulatórias com a frequência dos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ não regulatórios.

RESULTADOS- ARTIGO CIENTÍFICO

4. RESULTADOS

Camila Fernandes¹, Heitor S. Gonçalves², Paula B. Cabral³, Lilia M.C. Câmara¹

Increased frequency of CD4⁺CD25⁺FOXP3^{high} and CD8⁺CD25⁺FOXP3^{high} regulatory T cells in individuals under 15 years with multibacillary leprosy.

¹ Federal University of Ceará, Pathology and Legal Medicine, Medical Laboratory Immunology, 1315 Coronel Nunes de Melo Street, Fortaleza, Ceará, Brazil.

² Dermatology Center Dona Libânia, 1033 Pedro I Street, Fortaleza, Ceará, Brazil.

³Walter Cantídio University Hospital, 1290 Rua Capitão Francisco Pedro Street, Fortaleza, Ceará, Brazil

Correspondence Address: Camila Fernandes. Phone number: 55-85-3366-8641, e-mail address: camilabantim@hotmail.com, Fax Number: 55-85-3366-8303.

Abstract

Purpose. Leprosy is a chronic disease caused by *Mycobacterium leprae*, which represents a serious public health problem in Ceará State, Brazil. The incidence in under-15-year-olds reflects the difficulty in its control. The spectrum of manifestations reflects the immune response developed, with Th1 and Th2 responses related to the paucibacillary and multibacillary (MB) forms, respectively. Regulatory T cells (Treg) cells have received special attention and are implicated in homeostasis as well as susceptibility to infection. We evaluated the frequency of the Treg cells CD4⁺CD25⁺FOXP3^{high}, CD8⁺CD25⁺FOXP3^{high}, CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ and CD8⁺CD25^{high}FOXP3⁺ in patients with leprosy and household contacts (HHC), under 15 years. **Methods.** PBMC from 12 patients and 17 HHC were cultured for 72 hours with anti-CD3 and anti-CD28 (activators) or with activators associated with total sonicated fraction of *M. leprae* (MLT). After culture, CD4⁺CD25⁺FOXP3^{high}, CD8⁺CD25⁺FOXP3^{high}, CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ e CD8⁺CD25^{high}FOXP3⁺ Treg cells were identified by flow cytometry. **Results.** We found a greater frequency of CD4⁺CD25⁺FOXP3^{high} cells in patients than in HHC, where there were no differences in the other cell populations evaluated. The MB patients had a higher frequency of CD4⁺CD25⁺FOXP3^{high} and CD8⁺CD25⁺FOXP3^{high} compared to HHC. In these patients, CD4⁺CD25⁺FOXP3^{high} were negatively correlated with CD4⁺ and CD8⁺ non-Treg lymphocytes, and CD8⁺CD25⁺FOXP3^{high} with CD4⁺ non-Treg lymphocytes. **Conclusions.** These findings suggest that the greater frequency of Tregs with high expression of FOXP3 in MB patients, can be related to the anergy observed in leprosy.

Key words. Leprosy; Regulatory T cells; Household contacts; Patients; Under 15 years.

Introduction

Leprosy is a chronic disease caused by *Mycobacterium leprae*, which is characterized by skin lesions with changes in sensitivity and neural damage, with possible incapacitation and deformities [1]. It represents an important public health problem in Ceará State, Brazil, with an incidence of 5 cases/100,000 inhabitants among individuals under 15 years old in 2011, a worrisome fact since these cases are directly related to active transmission foci [2].

The contacts of leprosy patients (index case) have a high risk of acquiring the disease, a fact that is influenced by the age and sex of the contact and presence of a BCG vaccination scar and by the clinical form of the index case. Among children and adolescents, this risk increases in the age range of 10 to 19 years [3].

For treatment purposes, the Brazilian Ministry of Health together with the World Health Organization classifies leprosy in two forms: paucibacillary (PB) and multibacillary (MB), according to the number of lesions, degree of neural compromise and/or bacilloscopy result. The PB form is characterized by the presence of up to 5 characteristic lesions, negative bacilloscopy and no nerve affected, whereas the MB form with more than 5 lesions and/or positive bacilloscopy and/or at least one nerve trunk compromised [4].

The majority of individuals infected by *M. leprae* do not get sick, with only a small portion developing clinical manifestations [5]. This makes the disease even more intriguing, and raises questions about the factors responsible for the greater susceptibility of some persons. The balance between Th1 and Th2 responses was for a long time utilized to explain the clinical forms of the disease and the susceptibility to getting sick, since the spectrum of clinical manifestations is related to the immunological response pattern of the host. The PB form is characterized by the cell-mediated immune response, with a predominance of Th1 cytokines, limitation of bacillary proliferation and relative resistance to the pathogen, while the MB form is characterized by the lack of Th1 response and predominance of Th2 response, with intense bacillary multiplication [6]. However, the development of the immune response that controls the growth of the pathogen and that also limits the tissue lesion caused by an exacerbated response is important for the resolution of the infection [7]. The response mediated by regulatory T cells (Treg) has been related to both homeostasis and susceptibility to infection [8] and has gained ground in understanding the

immunopathogenesis of leprosy, bringing into question the paradigm of Th1 and Th2 response [9].

CD4⁺CD25^{high} Tregs comprise about 1-2% CD4⁺ T lymphocytes in human peripheral blood [10] and are responsible for maintaining tolerance and homeostasis [11]. The first investigations on suppressor lymphocytes emerged in the mid-1960s, beginning with studies on tolerance to foreign antigens [12]. However, CD4⁺CD25⁺ cells were characterized in humans for the first time in 2001. In 2003, the gene FOXP3 (Forkhead box P3) was identified as the “master” regulator of these cells, shown to be responsible for their development and function in mice and later in humans [11].

The expression of FOXP3 in naive T cells can induce regulatory functions, a finding that reinforces the importance of this molecule in its suppressor function [13]. Currently, it is known that Tregs in humans are heterogeneous populations [14] that have higher expression of CD25 (IL-2 receptor α -chain) than T effector cells upon activation [15].

Recently, the greater frequency of CD4⁺CD25⁺FOXP3^{high} Treg cells in pregnant women in the first and second trimester was correlated with the greater suppressor capacity of Treg cells *in vitro*, in contrast to CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ cells [16]. CD4⁺FOXP3^{high} cells were negatively correlated with CD3⁺CD8⁺ cells in healthy non-pregnant women [17]. In mice, CD4⁺CD25⁺FOXP3^{high} Treg cells have been considered to be mature and functional regulatory cells, differentiated in the presence of IL-2 [18].

CD4⁺ regulatory T cells have been more clearly characterized in the literature [11], while CD8⁺ T cells have received less attention [19]. However, it is now well established the existence of CD8 regulatory T lymphocytes, which can expand after stimulation with different antigens [20]. Currently, despite the heterogeneity of these cells, it has been demonstrated that CD8⁺ Tregs induced *in vitro* express CD25 and FOXP3, as do other Tregs, in patients with multiple sclerosis, and that these cells regulate CD4⁺ T cells, produce IL-10 and TGF- β and can condition dendritic cells to exert suppressive activity [19]. Cultured peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy individuals, stimulated with anti-CD3, induced CD8⁺CD25⁺ T cell population, of which 30% express FOXP3 [21]. Tregs can mediate the suppression of CD4⁺ and CD8⁺ T cells, B lymphocytes and innate immune system cells by various

different mechanisms [22]. They can regulate the immune response through the production of anti-inflammatory cytokines, deprivation of cytokines, lysis of effector cells, metabolic alterations in target cells and inhibition of dendritic cell functions [23].

Although Tregs are important in homeostasis and the control of collateral damage caused by inflammation [11, 22], during the course of chronic infection, the exacerbated control exerted by them can favor the growth and persistence of the pathogen [24], where they are referred to as a "dangerous necessity," because of their double role in the response to infections [25]. The importance of Tregs in the perpetuation of chronic infections has been demonstrated in infections by other intracellular microorganisms. In mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*, there was an induction of antigen-specific Tregs capable of preventing the expansion and mobilization of effector T cells to the infection site, promoting the survival of the microorganism [26]. Hisaeda *et al.* demonstrated that the depletion of Treg cells protects mice from death due to infection by the lethal strain of *Plasmodium yoelii* [27].

However, there are few studies that have examined the role of Treg cells in leprosy [28, 29, 30], and no work has investigated the frequency of these cells in patients and household contacts (HHC) under 15 years. In this study, we evaluated the frequency of Tregs in patients with leprosy and HHC, both under 15 years, and the relation with the clinical forms of the disease, to suggest for the first time its role in the pathogenesis of the disease in this age group.

Methods

Characterization of patients and HHC.

Patients and HHC were seen in the period of March to June of 2012, in the Centro de Dermatologia Sanitária Dona Libânia, a reference center for the diagnosis and treatment of leprosy in Ceará State, Brazil. HHC were defined as those who lived with the index case at diagnosis. All participants had been vaccinated at birth with BCG, evidenced by the presence of the vaccination scar and/or vaccination registration card from the Brazilian Ministry of Health. A dermatological-neurological examination of HHC was carried out by professionals of the reference center to rule out the presence of the disease. None of patients and HHC were on

immunosuppressive therapy or had associated comorbidities. The patients included had clinical and laboratory diagnosis of leprosy and were excluded those with type 1 or 2 reaction. After authorization from the legal guardian and signed informed consent, a questionnaire was filled out for information regarding identification, BCG vaccination, physical examination and laboratory tests of the patient or HHC and of their index case, and 10 ml of peripheral venous blood were collected by a trained professional. The blood sample was then transported refrigerated within 4 h, for peripheral blood mononuclear cell (PBMC) culture and flow cytometry. The study was approved by the ethics committee of Federal University of Ceará under protocol No. 161/11.

Twenty-nine individuals were evaluated, including 12 non-treated patients and 17 HHC. Among the 12 patients who participated in the study, there were 5 females and 7 males, and the median age was 12 years (range 5 to 15 years). Six patients had the MB form and the other 6 had the PB form. Among the 17 HHC, there were 11 males and 6 females, with a median age of 5 years (range 1 to 14 years) and where 8 HHC were of MB patients and 9 of PB patients. The median time of treatment of the index case was 14 days (range 1 to 37 days). The contacts had adults as index case, with the exception of two who were contacts of two individuals under 15 years who participated in the survey.

Stimulation of PBMC.

The culture of PBMC was adapted from that described by Spencer *et al.* [31]. PBMCs were obtained by separation on a Ficoll gradient (GE Healthcare, USA), and the concentration was adjusted to 2.5×10^6 cells/ml in AIM-V culture medium (GIBCO, USA). PBMC samples of patients and contacts were stimulated with antibodies anti-CD3, clone UCHT1 (BD Biosciences, USA), and anti-CD28, clone CD28.2 (BD Biosciences)[32], soluble and both at a concentration of 0.5 $\mu\text{g/ml}$, and with anti-CD3 and anti-CD28 combined with the total sonicated fraction of *M. leprae* (MLT) at a concentration of 20 $\mu\text{g/ml}$. A 200- μL aliquot of cell suspension was distributed, in duplicate, in a 96-well plate (BD Biosciences) and cultivated for 72 h in a 5% CO_2 incubator at 37°C.

Reagents for characterization of Tregs.

Clone 259D/C7 (BD Biosciences) conjugated with PE was chosen because of the good separation between FOXP3⁻ and FOXP3⁺ cells and lower nonspecific binding

[33], besides good stability in the detection of FOXP3 in cells stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 after several days of culture [34]. The antibodies anti-CD25 FITC, clone M-A251 (BD Biosciences), anti-CD4 PerCP-Cy5.5, clone RPA-T4 (Ebioscience, USA), anti-CD8 PerCP-Cy5.5, clone RPA-T8 (Ebioscience), anti-CD8 APC, clone RPA-T8 (BD Biosciences) and anti-CD3 APC clone OKT.3 (BioLegend, USA, and Ebiosciences) were titrated, as well as anti-FOXP3, where the best concentration was chosen, based on the highest percentage of positive cells and mean fluorescence intensity (MFI). The fixation and permeabilization buffer from BD Biosciences was used for permeabilization.

Preparation of cells for flow cytometry.

After culture, 2 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) was added to dislodge the adherent cells. The cells were labeled with surface antibodies for 30 min at 21°C in the dark. Intracellular labeling of FOXP3 was performed according to the specifications of the manufacturer (BD Biosciences). The cells were fixed in 1% paraformaldehyde and stored at 4°C; flow cytometry was carried out within 24 h of cell preparation.

Data acquisition and analyses.

The data were collected using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences), with measurements up to 400,000 events per sample in the lymphocyte gate. The results were analyzed in the FlowJo program (version 7.6.5; Treestar US, Ashland, OR).

Statistical Analysis.

The data were analyzed using the statistics program GraphPad Prism version 5. The unpaired two-tailed t-test was used to determine differences between variables, ANOVA for comparisons between 3 or more groups and Pearson's test for correlation analyses. $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Gating strategy for identification of Tregs.

We determined the frequency of the Tregs $CD4^+CD25^{\text{high}}FOXP3^+$, $CD4^+CD25^+FOXP3^{\text{high}}$, $CD8^+CD25^{\text{high}}FOXP3^+$ and $CD8^+CD25^+FOXP3^{\text{high}}$. In each individual, positivity for CD25 and for FOXP3 was defined on the basis of the isotypic

controls. The gate in CD25^{high} was defined according to the expression of CD25 in 3 control healthy individuals, which allowed the selection of more than 90% of FOXP3⁺ cells (Fig.1a). The value for FOXP3^{high} was defined by the MFI over 10² as illustrated (Fig.1b). The parameters of CD25^{high} and FOXP3^{high} were maintained in all analyses. Representative FACS plots of the frequency of CD4⁺Treg cells in household contact of leprosy patient, paucibacillary patient and multibacillary patient is shown in Figure 2.

Downregulation of Tregs after stimulation with MLT combined with anti-CD3 and anti-CD28.

When compared with PBMC cells stimulated only with anti-CD3 and anti-CD28 (activators), the combination of MLT antigen with activators induced the downregulation of Tregs whose median varied between 6.15% and 36%, depending on the Treg population analyzed, where there was no difference between patients and HHC. Considering the occurrence of this phenomenon, we decided to analyze the data obtained with the cells stimulated simultaneously with MLT and the activators.

Greater frequency of CD4⁺CD25⁺FOXP3^{high} and CD8⁺CD25⁺FOXP3^{high} cells is found in MB patients.

In this study, the frequency of CD4⁺CD25⁺FOXP3^{high} Treg cells was significantly greater in patients than in HHC (Fig. 3a; Table 1). On separating the patients according to clinical form (PB and MB), we found that there was a significant difference ($p= 0.0107$) only between the MB patients (8.88 ± 4.67) and the HHC (4.14 ± 2.89). The PB patients showed an intermediate frequency compared to these two groups (6.46 ± 1.28) (Fig. 3b).

Two patients in the MB group, with a high bacterial index, 4.5 and 4.8, stood out from the others by the high percentage of CD4⁺CD25⁺FOXP3^{high}, 14.5% and 15.15%, respectively. It should be noted that the patient with the higher bacteriological index, had more than 30 lesions on the whole body and the greatest frequency of Tregs compared to all others.

There was no significant difference in the frequency of CD8⁺CD25⁺FOXP3^{high} cells between the patients and HHC (Fig. 3c; Table 1). However, the MB patients (2.73 ± 2.16) showed a greater frequency of these cells than did HHC (1.00 ± 1.17) ($p =$

0.0385) (Fig. 3d). We did not observe a difference in the frequency of CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ and CD8⁺CD25^{high}FOXP3⁺ between patients and HHC (Table 1). In comparing the groups PB patients, MB patients and HHC, the frequency of CD25^{high} cells also did not differ between them (CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺, $p=0.1714$ and CD8⁺CD25^{high}FOXP3⁺, $p=0.2722$) (data not shown).

In MB patients, Tregs correlate negatively with CD4⁺ and CD8⁺ non-regulatory lymphocytes.

CD4⁺ or CD8⁺ non-regulatory lymphocytes (non-Tregs) were obtained by subtracting the percentage of CD4⁺CD25^{high}FOXP3^{high} or CD8⁺CD25^{high}FOXP3^{high} from the CD4⁺ or CD8⁺ population, respectively. CD4⁺CD25^{high}FOXP3^{high} cells were significantly and negatively correlated with the frequency of CD4⁺ non-Treg lymphocytes ($r= -0.860$; $p=0.0281$) (Fig. 4a) and with the frequency of CD8⁺ non-Treg lymphocytes ($r= -0.8444$; $p=0.0346$) (Fig. 4c). CD8⁺CD25^{high}FOXP3^{high} cells showed a negative correlation only with the CD4⁺ non-Treg lymphocytes ($r= -0.815$, $p=0.0483$) (Fig. 4b). This same phenomenon of negative correlation was not observed in PB patients or in HHC (data not shown). In PB patients in contrast, there was a strong positive correlation between the frequency of CD8⁺CD25^{high}FOXP3^{high} Tregs and frequency of CD4⁺ non-Tregs ($r= 0.8632$, $p=0.0268$) (data not shown).

Discussion

This is the first work that investigated CD4⁺ and CD8⁺ Tregs in leprosy patients and HHC, in the under 15 years age group. Although it has been many years since the existence of a suppressor population was described in patients with leprosy [35, 36], there is still controversy over its role in the emergence of the disease and in its different clinical presentations.

Macrophage activation is an important step for the control of infection by *M. leprae*, and progression for the most serious forms of leprosy is characterized by a state of hyporesponsiveness of T cells, with consequent loss of the microbicidal capacity of macrophages [37]. The presence of suppressor cells [35] and reduced expression of co-stimulatory molecules (CD80, CD86 and CD28) [38] can be involved in hyporesponsiveness in lepromatous patients. Kumar *et al.* analyzed the profile of various genes in patients with leprosy and found that leprosy progresses with presence

of immune response mediated by Treg cells, with increased of TGF- β , as a favorable factor for the growth and survival of *M. leprae* [9].

In this study, we showed that in individuals under 15 years the population of CD4⁺CD25⁺FOXP3^{high} Tregs is increased in patients with leprosy, mainly in MB, when compared to HHC. This was not observed for CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺, CD8⁺CD25⁺FOXP3^{high} and CD8⁺CD25^{high}FOXP3⁺ Treg cells. Atia *et al.* studied Tregs *ex-vivo* and observed a greater frequency of the CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ population in adult patients with the tuberculoid form of leprosy when compared with controls [29]. However, they did not examine other Treg populations, and the gating strategy utilized to define CD25^{high} differed from ours, which can explain at least in part the discrepant results.

The literature proposes that CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ and CD4⁺CD25⁺FOXP3^{high} cells represent two different populations of Tregs that are functionally different [16]. T cells expressing high levels of FOXP3 possess remarkable regulatory function, with greater suppressor capacity, where the expression of FOXP3 is more critical for the suppression than the expression of CD25 [14]. Despite that activated cells express FOXP3 in a transitory manner, only regulatory cells express elevated levels of this molecule [39]. In addition, cells with low expression of FOXP3 can differentiate into Th2 or Th17 cells [40].

The analysis of the CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ population has been utilized for the characterization of Tregs in humans by many authors, however, after activation the expression of CD25 also increase in effector cells [39], making difficult to differentiate these cells. Furthermore, this analysis includes non-regulatory cells, such as CD4⁺CD25^{high}CD45RA⁻FOXP3^{low} cells, which do not demonstrate suppressor capacity in humans [41].

We found a higher frequency of CD4⁺CD25⁺FOXP3^{high} and CD8⁺CD25⁺FOXP3^{high} Tregs in MB patients than in HHC. Our results are similar to those of Palermo *et al.*, who found in lepromatous patients an increase in the CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ population after culture with cell wall antigens of *M. leprae* (MLCwA), and increase in expression of negative regulatory molecules in biopsies of lesions [28]. However, the population analyzed included activated cells without regulatory function.

An evaluation of Tregs in biopsies of patients with leprosy with different clinical forms demonstrated an increase in the frequency of FOXP3⁺ cells only in patients with reversal reaction [30]. However, this study showed only the expression of FOXP3 and in a small number of patients, which made it difficult to obtain significant results.

CD8⁺ T cells called suppressors, were initially identified in the lesions of patients with lepromatous leprosy, and were capable of suppressing the response of PBMC to stimulation with concanavalin A [42]. CD8⁺ cells of patients with lepromatous leprosy suppressed the response of specific cells T for *M. leprae* antigens *in vitro* [43]. The suppression observed in lepromatous leprosy is associated with the predominance of CD8⁺ T lymphocytes in lesions [44].

We found that CD4⁺CD25⁺FOXP3^{high} Tregs showed a negative correlation with the populations of CD4⁺ or CD8⁺ non-Tregs lymphocytes only in MB patients. In these patients, CD8⁺CD25⁺FOXP3^{high} cells only showed a negative correlation with CD4⁺ non-regulatory lymphocytes. These findings may suggest that Tregs can be related to the inhibition of the proliferation of lymphocytes CD4⁺ and CD8⁺ that control the bacillary load seen in these patients.

It is not clear how Treg cells may be expanded in the setting of *M. leprae* infection, however, it is known that pathogens can modulate the immune system in favor of their survival [24]. It is speculated that lipids of mycobacterial origin may have a regulatory function. The mannose-capped lipoarabinomannan, glycolipid expressed by *M. tuberculosis* and *M. leprae* [45], is able to expand Tregs cells in healthy tuberculin reactors [46]. Phenolic glycolipid-1 (PGL-1), specific antigen of *M. leprae*, may also perform immunosuppressive properties [6]. This glycolipid can decrease the synthesis of inflammatory cytokines and induce the production of inhibitory molecules such IL-1Ra by human monocytes [47]. This molecule may induce Foxp3 expression in PBMC from patients with rheumatoid arthritis [48]. Furthermore, lepromatous leprosy patients showed a higher number of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)- positive cells than borderline tuberculoid patients and *M. leprae* increases IDO expression in PBMC of healthy controls [49]. IDO is an enzyme that can suppress effector T cells by degrading tryptophan and by induce Treg cells [50]. These factors may suggest that components of *M. leprae* can modulate the immune response through induction of Tregs, which corroborates with our finding of a greater frequency of Tregs in two patients with the higher bacteriological index.

One limitation of our study is that it was not possible to conduct assays to assess the functional suppressive capacity of these cells or mechanisms of suppression. However, we do not believe that the higher frequency of cells CD4⁺CD25⁺FOXP3^{high} and CD8⁺CD25⁺FOXP3^{high} in MB patients simply reflects the more immune activation, because the negative correlation between the frequency of Tregs and non-Tregs lymphocytes, only in those patients, suggests a regulatory role of these cells in MB patients.

Conclusion

We suggest that CD4⁺ and CD8⁺ Treg cells with high expression of FOXP3 play an important role in the suppression observed in MB leprosy in those less than 15 years old. Our results allow us to speculate that infection by *M. leprae* can modulate the immune response, with the induction of Tregs, for creation of a favorable environment for its survival.

Acknowledgments

We are grateful to Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Post-Graduation Program in Medical Microbiology for financial support, especially for Dr. Jose Julio Costa Sidrim. We also thank Dr. John Spencer of the Colorado State University, USA, for providing the MLT and the nurses Helena Gracielle de Carvalho Almeida and Regina Célia Nunes Santos for help with data collection. Dr. A. Leyva helped with English translation and Dr. André Jalles Monteiro with statistical analyzes.

Conflicts of interest

The authors have no conflict of interest, financial or commercial.

References

- [1] Rodrigues LC, Lockwood DNJ. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. *Lancet Infect Dis.* 2011; 11: 464-70.
- [2] Ceará, Governo do Estado do Ceará. Informe Epidemiológico Hanseníase. Junho de 2012; 1-5.
- [3] Moet FJ, Pahan D, Schuring RP, Oskam L, Richardus JH. Physical distance, genetic relationship, age, and leprosy classification are independent risk factors for leprosy in contacts of patients with leprosy. *J Infect Dis.* 2006; 193: 346-53.

- [4] Souza AD, el-Azhary RA, Foss NT. Management of chronic diseases: an overview of the Brazilian governmental leprosy program. *Int J Dermatol.* 2009; 48: 109-16.
- [5] Geluk A, Ottenhoff THM. HLA and Leprosy in the Pre and Postgenomic Eras. *Hum Immunol.* 2006; 67: 439 -45.
- [6] Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The Continuing Challenges of Leprosy. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19: 338-81.
- [7] Belkaid Y. Role of Foxp3-positive regulatory T cells during infection. *Eur J Immunol.* 2008; 38:918-21.
- [8] Vignali DAA. How many mechanisms do regulatory T cells need? *Eur J Immunol.* 2008; 38: 908-11.
- [9] Kumar S, Naqvi RA, Khanna N, Pathak P, Rao DN. Th3 Immune responses in the progression of leprosy via molecular cross-talks of TGF- β , CTLA-4 and Cbl-b. *Clin Immunol.* 2011; doi: 10.1016/j.clim.2011.06.007.
- [10] Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25^{high} Regulatory Cells in Human Peripheral Blood. *J Immunol.* 2001. 167:1245-53.
- [11] Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10: 490-500.
- [12] Chess L, Jiang H. Resurrecting CD8⁺ suppressor T cells. *Nat Immunol.* 2004; 5:469-471.
- [13] Wing JB, Sakaguchi S. Multiple Treg suppressive modules and their adaptability. *Front Immunol.* 2012; 3:178.
- [14] Banham AH, Powrie FM, Suri-Payer E. FOXP3⁺regulatory T cells: Current controversies and future perspectives. *Eur J Immunol.* 2006; 36:2832-36.
- [15] Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, et al. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol.* 2007; 19:345-54.
- [16] Steinborn A, Haensch GM, Mahnke K, Schmitt E, Toermer A, Meuer S, et al. Distinct subsets of regulatory T cells during pregnancy: Is the imbalance of these subsets involved in the pathogenesis of preeclampsia? *Clin Immunol.* 2008; 129:401-12.
- [17] Lee SK, Kim, JY, Jang BW, Hur SE, Na BJ, Lee M, et al. Foxp3^{high} and Foxp3^{low} Treg cells differentially correlate with T helper 1 and natural killer cells in peripheral blood. *Hum Immunol.*2011; 72: 621-26.

- [18] Bayer AL, Lee JY, de la Barrera A, Surh CD, Malek TR. A function for IL-7R for CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ T regulatory cells. *J Immunol.* 2008; 181: 225-34.
- [19] Correale J, Villa A. Role of CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ Regulatory T Cells in Multiple Sclerosis. *Ann Neurol.* 2010; 67:625-38.
- [20] Tsai S, Clemente-Casares X, Santamaria P. CD8⁺ Tregs in autoimmunity: learning “self”-control from experience. *Cell Mol Life Sci.* 2011; 68:3781-95.
- [21] Ablamunits V, Bisikirska B, Herold KC. Acquisition of regulatory function by human CD8⁺ T cells treated with anti-CD3 antibody requires TNF. *Eur J Immunol.* 2010; 40:2891-2901.
- [22] Sehrawat S, Rouse BT. Tregs and infections: on the potential value of modifying their function. *J Leukoc Biol.* 2011; 90:1079-87.
- [23] Shalev I, Schmelzle M, Robson SC, Levy G. Making sense of regulatory T cell suppressive function. *Semin Immunol.* 2011; 23: 282-92.
- [24] Belkaid Y, Tarbell K. Regulatory T Cells in the Control of Host-Microorganism Interactions. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27: 551-89.
- [25] Belkaid Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7: 875-88.
- [26] Shafiani S, Tucker-Heard G, Kariyone A, Takatsu K, Urdahl KB. Pathogen-specific regulatory T cells delay the arrival of effector T cells in the lung during early tuberculosis. *J Exp Med.* 2010; 207:1409-20.
- [27] Hisaeda H, Maekawa Y, Iwakawa D, Okada H, Himeno K, Kishihara K, et al. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Med.* 2004; 10: 29-30.
- [28] Palermo ML, Pagliari C, Trindade MAB, Yamashitafuji TM, Duarte AJS, Cacere CR, et al. Increased Expression of Regulatory T Cells and Down-Regulatory Molecules in Lepromatous Leprosy. *Am J Trop Med Hyg.* 2012; 86: 878-83.
- [29] Attia EAS, Abdallah M, Saad AA, Afifi A, El Tabbakh A, El-Shennawy D, et al. Circulating CD4⁺ CD25^{high} FoxP3⁺ T cells vary in different clinical forms of leprosy. *Int J Dermatol.* 2010; 49:1152-58.
- [30] Massone C, Nunzi E, Ribeiro-Rodrigues R, Talhari C, Talhari S, Schettini APM, et al. T regulatory Cells and Plasmacytoid Dendritic Cells in Hansen Disease: A new Insight into Pathogenesis ? *Am J Dermatopathol.* 2010; 32:251-56.

- [31] Spencer JS, Dockrell HM, Kim HJ, Marques MAM, Williams DL, Martins MVSB, et al. Identification of specific proteins and peptides in *Mycobacterium leprae* suitable for the selective diagnosis of leprosy. *J Immunol*. 2005; 175:7930-38.
- [32] Long SA, Cerosaletti K, Bollyky PL, Tatum M, Shilling H, Zhang S, et al. Defects in IL-2R signaling contribute to diminished maintenance of FOXP3 expression in CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cells of type 1 diabetic subjects. *Diabetes*. 2010; 59:407-15.
- [33] Law JP, Hirschhorn DF, Owen RE, Biswas HH, Norris PJ, Lanteri MC. The Importance of Foxp3 Antibody and Fixation/Permeabilization Buffer Combinations in Identifying CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Regulatory T Cells. *Cytometry A*. 2009; 75A:1040-50.
- [34] Presicce P, Moreno-Fernandez ME, Lages CS, Orsborn KI, Chougnet CA. Association of Two Clones Allows for Optimal Detection of Human FOXP3. *Cytometry A*. 2010; 77A: 571-79.
- [35] Rea TH. Suppressor cell activity and phenotypes in the blood or tissues of patients with leprosy. *Clin Exp Immunol*. 1983; 54: 298-304.
- [36] Bloom BR, Mehra V. Immunological unresponsiveness in leprosy. *Immunol Rev*. 1984; 80: 5-28.
- [37] Modlin R L. The innate immune response in leprosy. *Curr Opin Immunol*. 2010; 22:48-54.
- [38] Schlienger K, Uyemura K, Jullien D, Sieling P. A, Rea TH, Linsley PS, et al. B7-1, but not CD28, is crucial for the maintenance of the CD4⁺ T cell responses in human leprosy. *J Immunol*. 1998; 161:2407-13.
- [39] Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, et al. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol*. 2007; 19:345-54.
- [40] Curiel JT. Regulatory T-cell development: is Foxp3 the decider? *Nat Med*. 2007; 13: 250-253.
- [41] Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, et al. Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4⁺ TCells Expressing the FoxP3 Transcription Factor. *Immunity*. 2009; 30:899–911.
- [42] Modlin RL, Kato H, Mehra V, Nelson EE, Fan XD, Rea TH, et al. Genetically restricted suppressor T-cell clones derived from lepromatous leprosy lesions. *Nature*. 1986; 322:459-61.

- [43] Ottenhoff THM, Elferink DG, Klatser PR, de Vries RRP. Cloned suppressor T cells from a lepromatous leprosy patient suppress *Mycobacterium leprae* reactive helper T cells. *Nature*. 1986; 322:462-64.
- [44] Goulart LR, Goulart IMB. Leprosy pathogenetic background: a review and lessons from other mycobacterial diseases. *Arch Dermatol Res*. 2009; 301:123-37.
- [45] Dagur PK, Sharma B, Upadhyay R, Dua B, Rizvi A, Khan NA, et al. Phenolic-glycolipid-1 and lipoarabinomannan preferentially modulate TCR- and CD28-triggered proximal biochemical events, leading to T-cell unresponsiveness in mycobacterial diseases. *Lipids Health Dis*. 2012; 11:119.
- [46] Garg A, Barnes PF, Roy S, Quiroga MF, Wu S, García VE, et al. Mannose-capped lipoarabinomannan- and prostaglandin E2-dependent expansion of regulatory T cells in human *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur J Immunol*. 2008; 38: 459-469.
- [47] Manca C, Peixoto B, Malaga W, Guilhot C, Kaplan G. Modulation of the Cytokine Response in Human Monocytes by *Mycobacterium leprae* Phenolic Glycolipid-1. *J Interferon Cytokine Res*. 2012; 32: 27-33.
- [48] Niu X, He D, Deng S, Li W, Xi Y, Xie C, et al. Regulatory immune responses induced by IL-1 receptor antagonist in rheumatoid arthritis. *Mol Immunol*. 2011; 49: 290-296.
- [49] Sales JS, Lara FA, Amadeu TP, Fulco TO, Nery JAC, Sampaio EP, et al. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in lepromatous leprosy immunosuppression. *Clin Exp Immunol*. 2011; 165: 251-263.
- [50] Andersen MH. The specific targeting of immune regulation: T-cell responses against Indoleamine 2,3-dioxygenase. *Cancer Immunol Immunother*. 2012; 61:1289-1297.

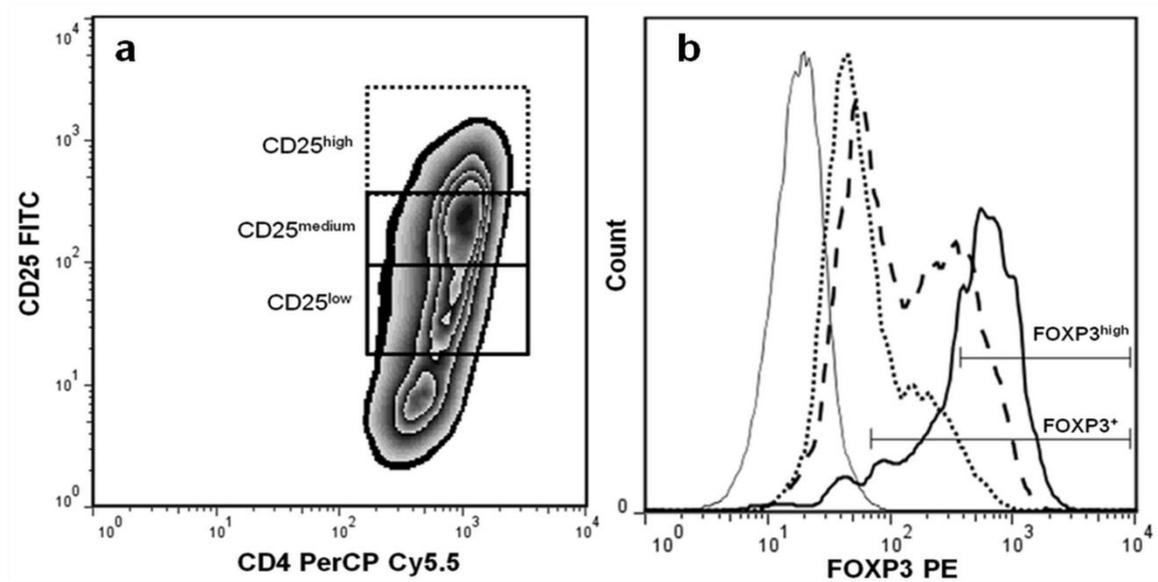


Fig. 1 Gating strategy for CD25^{high} and FOXP3^{high}. a) CD25⁺ cells were divided into 3 regions, i.e., CD25^{high}, CD25^{medium} and CD25^{low}, differing in expression of FOXP3. b) Expression of FOXP3 in CD25^{high} gates (thick solid line), CD25^{medium} (dashed line) and CD25^{low} (dotted line). CD25^{high} cells showed more than 90% positivity for FOXP3. MFI for FOXP3 in CD25^{high}, CD25^{medium} and CD25^{low} gates was 646, 335 and 214, respectively. The gate for FOXP3⁺ was defined on the basis of the isotypic control (fine solid line), and the definition of FOXP3^{high} is shown as having an FOXP3 MFI of 809.

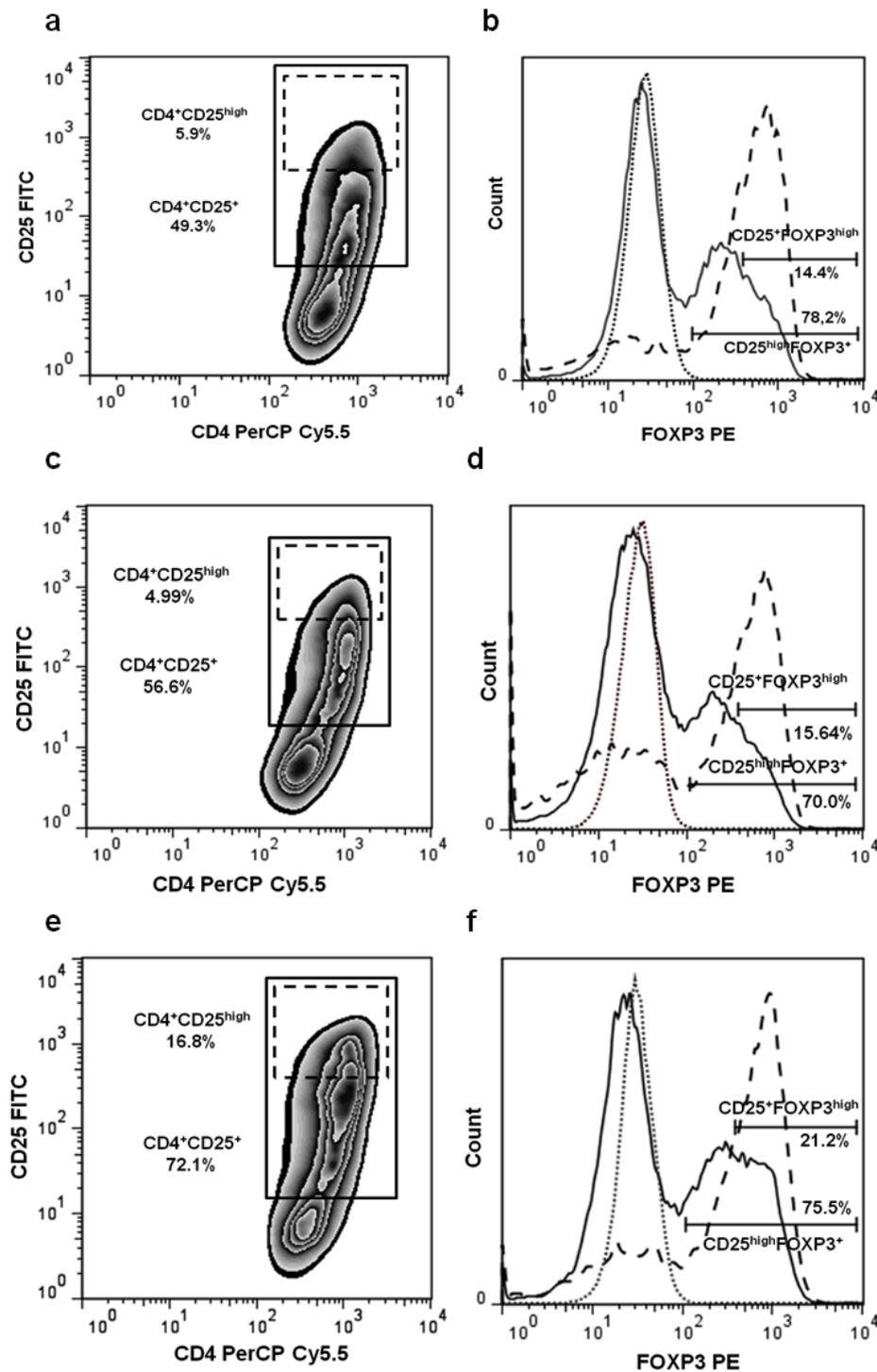


Fig. 2. Representative FACS plots of the frequency of CD4⁺Treg cells after 72 hours culture of PBMC with anti-CD3 and anti-CD28 associated with total sonicated fraction of *M. leprae*. Identification of CD4⁺CD25⁺FOXP3^{high} and CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ cells in household contact of leprosy patient (a and b), paucibacillary patient (c and d) and multibacillary patient (e and f). a, c and e shows the frequency of CD4⁺CD25⁺ (solid line) and CD4⁺CD25^{high} (dashed line) cells in the CD4⁺ lymphocytes gate. b, d and f shows the frequency of FOXP3^{high} in the CD4⁺CD25⁺ gate (represented at CD25⁺FOXP3^{high} - solid line) and of FOXP3⁺ in the CD4⁺CD25^{high} gate (represented at CD25^{high}FOXP3⁺ - dashed line).

CD4⁺CD25^{high} gate (represented at CD25^{high}FOX⁺- dashed line). After discounting the positive for the isotype control (dotted line in b, d and f), the frequency of CD4⁺CD25⁺FOXP3^{high} and CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ cells in the CD4⁺ lymphocytes gate was, respectively, 7,1% and 4,6% in this household contact of leprosy patient, 8,85% and 3,5% in this paucibacillary patient and 15,15% and 12,7% in this multibacillary patient.

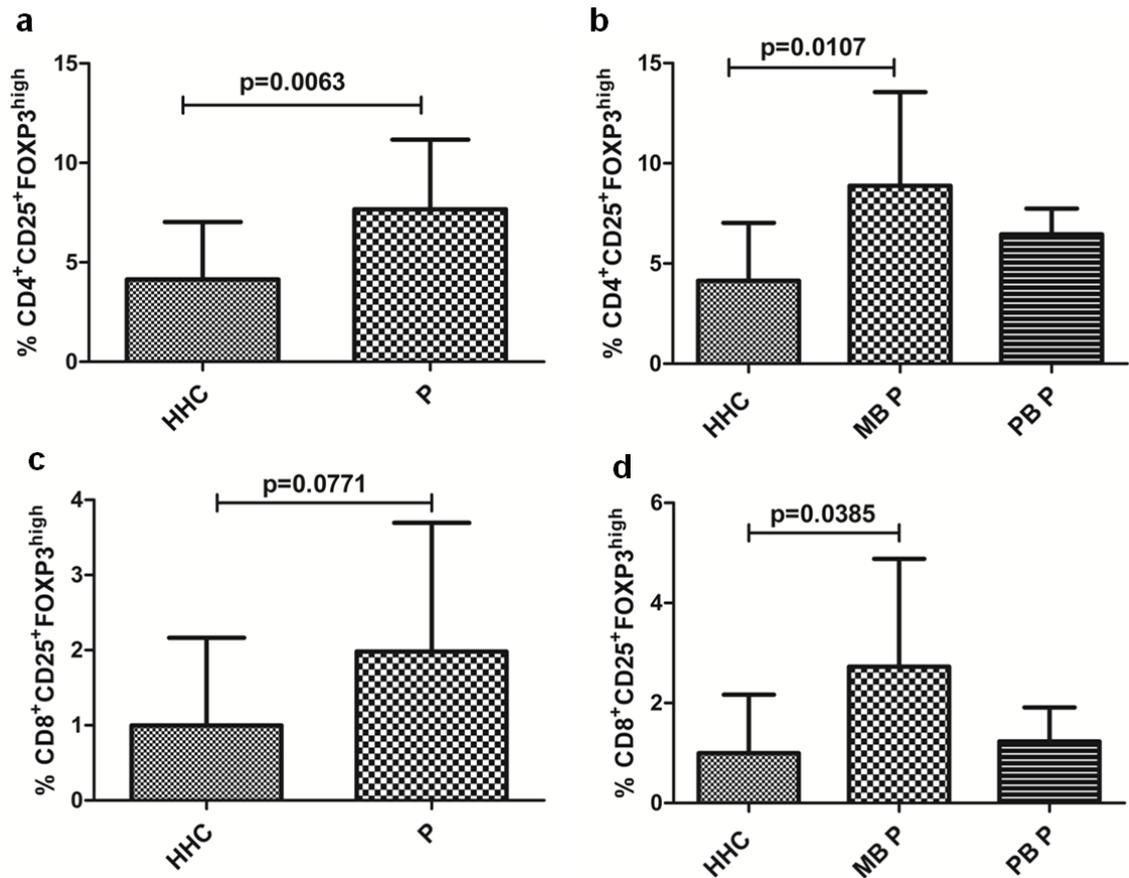


Fig. 3 Frequency of Treg cells after 72 hours culture of PBMC with anti-CD3 and anti-CD28 associated with total sonicated fraction of *M. leprae*. Comparison between household contacts (HHC) and patients (P), with regard to frequency of CD4⁺CD25⁺FOXP3^{high} (a) and of CD8⁺CD25⁺FOXP3^{high} (c). Comparison between HHC, multibacillary patients (MB P) and paucibacillary patients (PB P), with regard to frequency of CD4⁺CD25⁺FOXP3^{high} (b) and CD8⁺CD25⁺FOXP3^{high} (d). Unpaired two-tailed Student t-test (a and c) and ANOVA (b and d). $P < 0.05$ was considered significant. Results are presented as mean with SD.

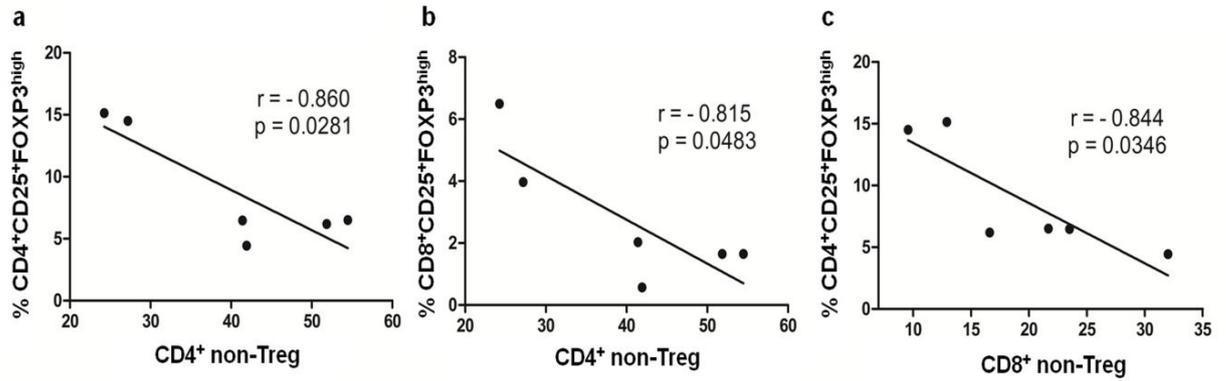


Fig. 4 Analyses of correlation between Tregs and non-Tregs in multibacillary patients. CD4⁺ or CD8⁺ non-Treg cells were obtained by subtraction of the percentage of CD4⁺CD25⁺FOXP3^{high} or CD8⁺CD25⁺FOXP3^{high} from CD4⁺ or CD8⁺ populations, respectively. Negative correlation between the CD4⁺ non-Treg lymphocytes and CD4⁺CD25⁺FOXP3^{high} (A) and CD8⁺CD25⁺FOXP3^{high} (B). Negative correlation between CD8⁺ non-Treg lymphocytes and CD4⁺CD25⁺FOXP3^{high} lymphocytes (C). Pearson test. $P < 0.05$ was considered significant.

Table 1. Frequency of Tregs in patients and household contacts.

	PATIENTS (N=12)	HHC ^a (N=17)	<i>p</i> -value ^b
	Mean±SD	Mean±SD	
CD4 ⁺ CD25 ^{high} FOXP3 ⁺	4.50+3.08	3.09+2.83	0.2142
CD8 ⁺ CD25 ^{high} FOXP3 ⁺	0.85+1.01	0.63+1.06	0.5740
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ^{high}	7.67± 3.50	4.14± 2.89	0.0063
CD8 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ^{high}	1.98±1.71	1.00±1.17	0.0771

^aHousehold contacts.

^bUnpaired two-tailed Student t-test. *P* < 0.05 was considered significant.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

- A maior frequência de células T regulatórias $CD4^+CD25^+FOXP3^{high}$ e $CD8^+CD25^+FOXP3^{high}$ nos pacientes multibacilares menores de 15 anos, bem como sua correlação inversa com a frequência de linfócitos não regulatórios, sugere a participação dessas células na supressão de células T na hanseníase multibacilar.
- Sugerimos que células T regulatórias $CD4^+$ e $CD8^+$ com alta expressão de FOXP3 estão envolvidas na patogênese da hanseníase nos menores de 15 anos, especialmente na forma multibacilar, podendo ter um papel importante na perpetuação da infecção pelo *M.leprae*.

ANEXOS E APÊNDICES



ANEXO 1- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 195/11

Fortaleza, 19 de setembro de 2011

Protocolo COMEPE nº 161/11

Pesquisador responsável: Camila Fernandes

Título do Projeto: “Em busca de um marcador biológico parasusceptibilidade à hanseníase em indivíduos menores de 16 anos, estudo do perfil imunológico de doentes e contatos”

Levamos ao conhecimento de V.S^a. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou o protocolo e o TCLE do projeto supracitado na reunião do dia 15 de setembro de 2011.

Outrossim, informamos, que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório final do referido projeto.

Atenciosamente,



Dr. Fernando A. Faria Bezerra
Coordenador do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC

APÊNDICE A- MATERIAIS E MÉTODOS

Tipo de Estudo

Estudo experimental, explicativo com abordagem quantitativa. Os estudos experimentais são caracterizados pela manipulação direta das variáveis em questão, para determinar interação entre elas e explicar o fenômeno pesquisado. Pesquisas explicativas são complexas e caracterizadas pela identificação de fatores que podem ser a causa de fenômenos (GIL, 2007). Os estudos quantitativos são aqueles que necessitam de recursos estatísticos para traduzir em números, opiniões e informações, para classificá-las e analisá-las (SILVA; MENEZES, 2005).

Casuística e local de execução do estudo

Foram incluídos no estudo 12 pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de hanseníase e 17 contatos intradomiciliares, na faixa etária até 15 anos, ambos atendidos no período de março a junho de 2012 no Centro de Dermatologia Sanitária Dona Libânia, referência no diagnóstico e tratamento da doença no estado do Ceará, Brasil. Foram incluídos os pacientes virgem de tratamento e os contatos cujo caso índice (indivíduo doente adulto ou menor de 15 anos) possuía até um mês de tratamento. Os pacientes foram diagnosticados por critérios clínicos e laboratoriais por profissionais do centro de referência. Os participantes possuíam uma dose de vacinação com BCG ao nascer, verificada pela presença da cicatriz vacinal e/ou registro da mesma no cartão de vacinação do Ministério da Saúde. Foram excluídos aqueles revacinados com a BCG e os doentes com reação hansênica tipo I ou II. Foi realizada a avaliação dermatoneurológica dos contatos por profissionais do centro de referência, lócus do estudo, para descartar a presença de doença. Nenhum dos participantes fazia uso de terapia imunossupressora ou possuía comorbidades associadas.

Procedimento de coleta de dados

Tanto o responsável legal como a criança/jovem, objeto de estudo, foram esclarecidos sobre as condições da pesquisa (objetivos, finalidade, riscos, benefícios), sendo convidados a participar do estudo e solicitados a assinar o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) (Apêndice B). Após a autorização do

responsável legal e consentimento da criança/adolescente foi preenchido um questionário (APÊNDICE C) com dados de identificação, vacinação com BCG, dados do exame físico e exames laboratoriais, do paciente ou do contato e do seu caso índice, e coletado 10 ml de sangue venoso periférico por profissional treinado, para realização da cultura de mononucleares de sangue periférico. O sangue foi coletado na unidade de saúde e transportado sob refrigeração em até 4 horas ao Laboratório de Imunologia Médica (LIME) da Universidade Federal do Ceará (UFC) para realização da cultura de células seguida de ensaio de citometria.

Ensaio de estimulação das células mononucleares de sangue periférico

A cultura das células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foi adaptada de SPENCER *et al.*, 2005. A coleta de sangue foi realizada em tubos de heparina de sódio (Becton Dickinson, Estados Unidos), tendo em vista que este anticoagulante mantém maior estabilidade das subclasses leucocitárias por vários dias de cultura (LANZA *et al.*, 2009). O sangue foi diluído 1:2 em salina tamponada com fosfato estéril- PBS (SIGMA, Estados Unidos) e adicionado cuidadosamente à 20 ml de Ficoll histopaque (Gehealthcare, Estados Unidos), centrifugado em seguida (Eppendorf Centrifuge 5810R) por 30 minutos, 2000 rpm (671g), 21°C, seguido de duas lavagens de 10 minutos, 5°C, 1500 rpm (377g), com 10 ml de PBS. Em seguida, as células foram resuspensas em 1 ml de meio de cultura AIM-V (GIBCO, Estados Unidos) contendo L-glutamina, 50 mg/ml de estreptomicina e 10 mg/ml de gentamicina, sendo a concentração ajustada, após contagem com azul de tripan (SIGMA, Estados Unidos) em câmara de Neubauer, para $2,5 \times 10^6$ células/ml. Após o ajuste da concentração as células foram estimuladas com anticorpos anti-CD3, clone UCHT1 (BD Biosciences, Estados Unidos) e anti-CD28, clone CD28.2 (BD Biosciences, Estados Unidos) (LONG *et al.*, 2010), solúveis e ambos na concentração de 0,5µg/ml e/ou com a fração total sonicada do *M.leprae* (MLT; 20µg/ml), gentilmente cedida pelo Dr. John Spencer da Universidade do Estado do Colorado, Estados Unidos. Foram distribuídas em duplicata em placa de 96 poços (BD Biosciences, Estados Unidos) 200µl/poço, e cultivadas por 72 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

Anticorpos e reagentes para caracterização das células T regulatórias

O painel de anticorpos foi cuidadosamente selecionado para utilização do melhor clone, fluorocromo e tampão para ótima marcação de FOXP3 e com menor

ligação inespecífica. O clone 259D/C7 (BD Biosciences, Estados Unidos) conjugado com PE foi escolhido por sua boa separação entre células FOXP3⁻ e FOXP3⁺ e menor inespecificidade do que o clone PCH101 (LAW *et al.*, 2009), além de manter a estabilidade na detecção de FOXP3 em células estimuladas com anti-CD3 e anti-CD28 após vários dias de cultura (PRESICCE *et al.*, 2010). Os anticorpos anti-CD25 FITC clone M-A251 (BD Biosciences, Estados Unidos), anti-CD3 APC clone OKT.3 (BioLegend, Estados Unidos), anti-CD3 APC clone OKT.3 (Ebiosciences, Estados Unidos), anti-CD4 PerCP-Cy5.5 clone RPA-T4 (Ebioscience, Estados Unidos), anti-CD8 PerCP-Cy5.5 clone RPA-T8 (Ebioscience, Estados Unidos) ou anti-CD8 APC clone RPA-T8 (BD Biosciences, Estados Unidos) foram selecionados e titulados, assim como o anti-FOXP3, sendo escolhido o melhor volume para detecção do maior percentual de células positivas e da maior média de intensidade de fluorescência (MFI). Para permeabilização foram utilizados os tampões de fixação e permeabilização da BD Biosciences. A definição da positividade para CD25 e FOXP3 foi realizada com os respectivos controle isotópicos. Foram realizados dois painéis de anticorpos para marcação das Tregs: CD3⁺CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ e CD3⁺CD8⁺CD25⁺FOXP3⁺.

Ensaio de preparação das células para citometria de fluxo

Após cultura, a placa foi centrifugada (Eppendorf Centrifuge 5810R) a 1500rpm (453g), 21°C por 10 minutos para retirada do sobrenadante, que foi estocado a -80°C. EDTA 2Mm (Ethylenediamine tetraacetic acid) foi utilizado para remoção das células aderentes, com agitação por 2 minutos em agitador de Kline e incubação por 5 minutos à temperatura ambiente (21°C), seguido de centrifugação. As células foram lavadas com 1 ml de tampão de lavagem contendo PBS, Soro Fetal Bovino 1% e Azida Sódica 0,1% e um pool das duplicatas realizado e transferidos para tubos Falcon de poliestireno, 12x75mm, de 5 ml (BD Biosciences, Estados Unidos). Cada duplicada correspondeu a um tubo, para a marcação do painel de anticorpos. A incubação com os anticorpos de superfície foi realizada por 30 minutos à temperatura ambiente no escuro, seguido de nova lavagem. A marcação intracelular de FOXP3 foi realizada conforme as especificações do fabricante (BD Biosciences, Estados Unidos). Adicionou-se de 2 ml do tampão A, agitando gentilmente no vórtex, e incubou-se por 10 minutos à temperatura ambiente no escuro. Após lavagem adicionou-se 500µl do tampão C por 30 minutos à temperatura ambiente no escuro. Os tampões de fixação e

permeabilização foram preparados imediatamente antes do uso e mantidos à temperatura ambiente. Após duas lavagens com 1 ml de tampão de lavagem, adicionou-se os anticorpos para marcação intracelular, por 30 minutos à temperatura ambiente no escuro. Lavou-se novamente 2x, adicionou-se paraformaldeído 1% e armazenou-se a 4°C no escuro, com a leitura sendo realizada em até no máximo 24 horas.

Calibração do aparelho

O aparelho foi calibrado para reduzir as variações de experimento para experimento, monitorando a performance do instrumento ao longo do tempo. BD CaliBRITE beads (BD Bioscience, Estados Unidos) foram utilizadas para ajustar as configurações do aparelho, definir a compensação da fluorescência e chegar a sensibilidade do instrumento. Foram utilizadas beads não marcadas, marcadas com PE, PerCP, FITC ou APC. As beads foram armazenadas entre 2°C e 8°C conforme as recomendações do fabricante.

Compensação do aparelho

O aparelho foi compensado com cada fluorocromo utilizado no painel para identificação das Tregs. Células provenientes do sangue total de um indivíduo adulto saudável (200 µl) foram colocadas em tubos Falcon de 12x75mm e marcadas, separadamente, com CD16 FITC, 5 µl (Clone CB16; Ebioscience, Estados Unidos), CD56 PE, 5 µl (Clone CMSSB; Ebioscience, Estados Unidos), CD4 PerCP-Cy5.5 (2 µl), CD3 APC (2µl). Além disso, utilizou-se também um tubo com células não marcadas. Após 30 minutos de incubação a 4°C, no escuro, adicionou-se 2 ml de solução de lise (BD Biosciences, Estados Unidos), preparada 1x antes do uso e mantida à 21°C (temperatura ambiente), incubando por 15 minutos à temperatura ambiente no escuro, conforme as recomendações do fabricante. Em seguida, centrifugou-se a 1500 r.p.m (377g) por 10 minutos e o sobrenadante foi retirado cuidadosamente. Lavou-se 2x com 2ml de tampão de lavagem contendo PBS, Soro Fetal Bovino 1% (SIGMA) e Azida Sódica 0,1% (SIGMA) e o *pellet* foi ressuspensão em 500 µl de PFA 1% (SIGMA). A leitura foi realizada em seguida.

O tubo não marcado foi utilizado para o ajustes das voltagens e definição do threshold, enquanto que os tubos marcados unicamente com cada fluorocromo foram

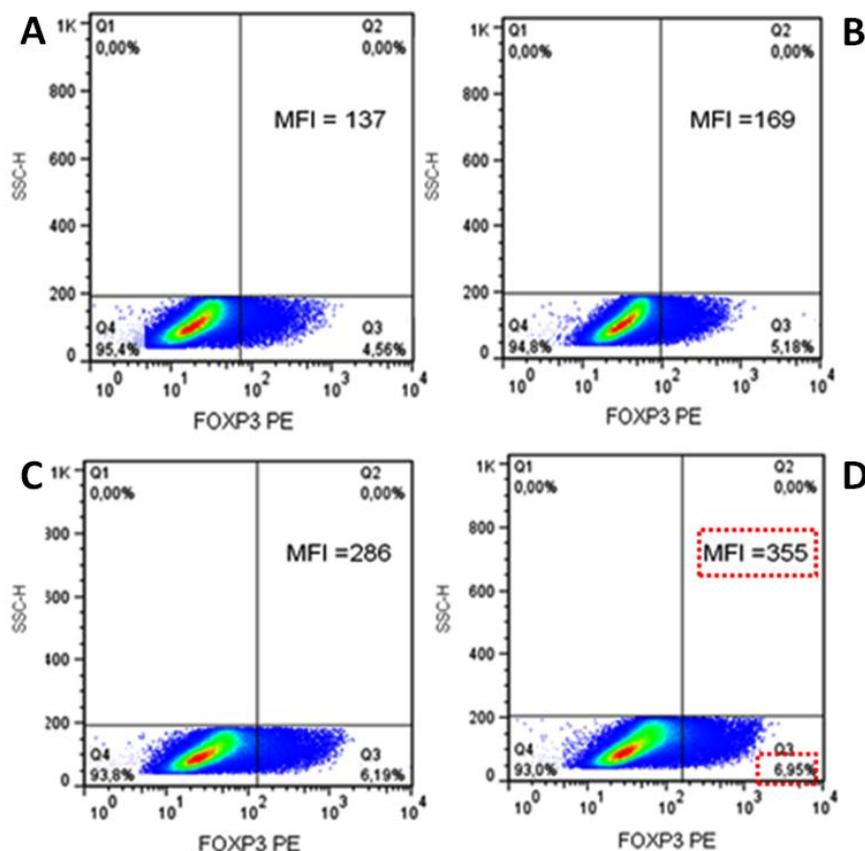
utilizados para o ajuste das compensações das fluorescências, com aquisição de 10.000 eventos na *gate* de linfócitos.

Titulação dos anticorpos:

Para a titulação dos anticorpos, CMSPs, $2,5 \times 10^6$ cels/ml, de um adulto saudável foram cultivadas com $1\mu\text{g/ml}$ de fitohemaglutinina (PHA) em duplicata em placa de 96 poços, com $200\mu\text{l/poço}$, por 72 horas em estufa com 37°C e 5% de CO_2 . Após cultura realizou-se um *pool* das duplicadas e adicionou-se em tubos de citometria, seguindo-se o protocolo de preparação das células para citometria de fluxo, descrito mais acima. Foram utilizados volumes diferentes de anticorpos para obtenção do melhor volume baseado no maior percentual de células detectadas e na melhor média de intensidade de fluorescência de cada anticorpo.

A figura 10 exemplifica os critérios utilizados na titulação, com a escolha da melhor concentração do anticorpo-anti-FOXP3, baseado na MFI e no número de células detectadas. Os quadrantes foram definidos com base no controle isotípico (de $5\mu\text{l}$ a $20\mu\text{l}$).

Figura 10 - Titulação do anticorpo anti-FOXP3 PE, com os volumes de $5\mu\text{l}$ (A), $10\mu\text{l}$ (B), $15\mu\text{l}$ (C) e $20\mu\text{l}$ (D), sendo escolhido o volume de $20\mu\text{l}$.



Na tabela 2 encontram-se os diferentes anticorpos, fluorocromos e os volumes escolhidos após a titulação para marcação de Tregs.

Tabela 2 - Painel de anticorpos, fluorocromos, clones, marcas e volumes utilizados para marcação de Tregs.

ANTICORPO	FLUOROCROMO	CLONE	MARCA	VOLUME
CD3	APC	OKT.3	BioLegend	7 µl
CD3	APC	OKT.3	Ebiosciences	4µl
CD4	PerCP-Cy5.5	RPA-T4	Ebiosciences	4 µl
CD8	PerCP-Cy5.5	RPA-T8	Ebiosciences	4 µl
CD8	APC	RPA-T8	BD Bioscience	5 µl
CD25	FITC	M-A251	BD Bioscience	10 µl
FOXP3	PE	259D/C7	BD Bioscience	20 µl

Aquisição e análises dos dados

A aquisição de até 400,000 eventos na *gate* de linfócitos foi realizada utilizando o citometro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences, Estados Unidos). A análise dos resultados foi realizada no programa FlowJo (Versão 7.6.5; Treestar US, Ashland, OR).

Análise estatística:

Os dados relacionados a cada uma das variáveis foram organizados em planilhas do software Microsoft Excel[®] 2007, e posteriormente analisados por meio do pacote estatístico Graph Pad Prism versão 5.0. Utilizou-se o Teste T não pareado bicaudal para comparação entre dois grupos, ANOVA e pós teste de Tukey para comparação entre 3 ou mais grupos e o teste de Pearson para as análises de correlação. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes.

Aspectos éticos

O trabalho foi submetido ao comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal do Ceará, de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde-CONEP e foi aprovado em reunião dia 15 de setembro de 2011, sob o protocolo 161/11 (ANEXO 1). Como referido, os responsáveis pelos jovens foram consultados sobre o interesse em permitir a participação do mesmo no estudo e esclarecidos sobre

o objetivo, finalidades e procedimentos metodológicos, recebendo a garantia do sigilo conferido às informações e identidades e direito de desistência a qualquer momento.

APÊNDICE C-QUESTIONÁRIO DOS PARTICIPANTES

Entrevistador: _____ DATA: ___/___/___

1. IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____ Prontuário: _____

Responsável: _____

Telefone: _____ Nasc. ___/___/___ Idade: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Município: _____

Escolaridade: _____ Família N°: _____ : _____ > 15 anos _____ < 15 anos

Conhece alguém com hanseníase? () Sim () Não Parentesco _____

Convívio: () Diário () Semanal () Mensal () Esporádico

2. EXAME FÍSICO

Tempo de aparecimento dos primeiros sinais e sintomas (doentes) _____

BCG ao nascer: () Não () Sim/ Data ___/___/___ Escara: () Sim () Não

2º dose: () Não () Sim Data ___/___/___ Escara: () Sim () Não

Classificação operacional(doentes) () PB () MB

Nº de lesões/local (doentes): _____

3. EXAMES LABORATORIAIS

Teste de Mitsuda: () Sim () Não Resultado: _____ Data: ___/___/___

Baciloscopia: () Sim () Não Resultado: _____ Data: ___/___/___

Biópsia : () Sim () Não Resultado: _____ Data: ___/___/___

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ALLAN, S. E. *et al.* Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. **International Immunology**, v. 19, p. 345-354, 2007.

ARAÚJO, H. C. S. A lepra e as organizações anti-leprosas do Brasil em 1936. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 32, p. 111-160, 1937.

ATTIA, E. A. *et al.* Circulating CD4⁺ CD25^{high} FoxP3⁺ T cells vary in different clinical forms of leprosy. **International Journal of Dermatology**, v. 49, p. 1152-1158, 2010.

AZIZI, M. H.; BAHADORI, M. A. History of Leprosy in Iran during the 19th and 20th Centuries. **Archives of Iranian Medicine**, v. 14, p. 425-430, 2011.

BAECHER-ALLAN, C. *et al.* CD4⁺CD25^{high} Regulatory Cells in Human Peripheral Blood. **The Journal of Immunology**, v. 167, p. 1245-1253, 2001.

BANHAM, A. H.; POWRIE, F. M.; SURI-PAYER, E. FOXP3⁺ regulatory T cells: Current controversies and future perspectives. **European Journal of Immunology**, v. 36, p. 2832-2836, 2006.

BAYER, A. L. *et al.* A function for IL-7R for CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ T regulatory cells. **Journal of Immunology**, v. 181, p. 225-234, 2008.

BAZAN-FURINE, R. *et al.* Early detection of leprosy by examination of household contacts, determination of serum anti-PGL-1 antibodies and consanguinity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.106, p.536-540, 2011.

BELKAID, Y. Role of Foxp3-positive regulatory T cells during infection. **European Journal of Immunology**, v. 38, p. 901-937, 2008.

BELKAID, Y.; TARBELL, K. Regulatory T Cells in the Control of Host Microorganism Interactions. **Annual Reviews Immunology**, v. 27, p. 551-589, 2009.

BILATE, L.; LAFAILLE, J. J. Induced CD4⁺Foxp3⁺ Regulatory T Cells in Immune Tolerance. **Annual Review of Immunology**, v. 30, p. 733–758, 2012.

BLUESTONE, J. A.; ABBAS, A. K. Natural versus adaptive regulatory T cells. **Nature reviews in Immunology**, v.3, p. 253-257, 2003.

BLUESTONE, J. A.; TANG, Q. How do CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control autoimmunity? **Current Opinion in Immunology**, v. 17, p. 638-642 , 2005.

BRAND, P. W. Temperature variation and leprosy deformity. **International Journal of Leprosy**. v. 27, p. 1-7, 1959.

BRASIL. Ministério da Saúde, 2012. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/coef_prev_detec_geral_menor_15_hans_reg_br2011.pdf>. Acesso em: 28 jun. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia para o controle da Hanseníase**, Brasília, DF. 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia para o controle da Hanseníase**. Brasília, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância em saúde: situação epidemiológica da hanseníase no Brasil**. Brasília, DF. 2008.

BRITTON, W. J.; LOOCKWOOD, D. N. J. Leprosy. **The Lancet**, v. 363, p. 1209-1219, 2004.

CAMPANELLI, A. P. *et al.* CD4⁺CD25⁺ T Cells in Skin Lesions of Patients with Cutaneous Leishmaniasis Exhibit Phenotypic and Functional Characteristics of Natural Regulatory T Cells. **The Journal of Infectious Diseases**, v.193, p.1313-1322, 2006.

CARDONA-CASTRO, N.; BELTRÁN-ALZATE, J. C.; ROMERO-MONTOYA, M. Clinical, bacteriological and immunological follow-up of household contacts of leprosy patients from a post-elimination area - Antioquia, Colombia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, p. 935-936, 2009.

CEARÁ. Secretaria da Saúde do Estado. **Informe Epidemiológico Hanseníase**, Jun. 2012.

COLLISON, L.W. *et al.* The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. **Nature**, v. 450, p. 566-569, 2007.

DING, Y.; XU, J.; BROMBERG, J. S. Regulatory T cell migration during an immune response. **Trends in Immunology**, v.33, p. 174-180, 2012.

DWYER, K. M. *et al.* CD39 and control of cellular immune responses. **Purinergic Signalling**, v. 3, p. 171-180, 2007.

EICHELMANN, K. *et al.* Lepra: puesta al día. Definición, patogénesis, clasificación, diagnóstico y tratamiento. **Actas dermo-sifiliográficas**, 2012, doi:org/10.1016/j.ad.2012.03.003.

EIDT, M. L. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. **Saúde e Sociedade**, v.13, p.76-88, 2004.

EISENSTADT, J.; HALL, G. S. Microbiology and classification of Mycobacteria. **Clinics in Dermatology**, v.13, p. 197-206, 1995.

EL-BADAWY, O. *et al.* Relations of regulatory T cells with hepatitis markers in chronic hepatitis B virus infection. **Human Immunology**, v.73, p. 335-341, 2012.

FINE, P. E. *et al.* Household and dwelling contact as risk factors for leprosy in northern Malawi. **American Journal of Epidemiology**, v. 146, p. 91-102, 1997.

FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. **Nature Immunology**, 2003, doi:10.1038/ni904.

FORTALEZA. Secretaria Municipal de Saúde. **Boletim de Saúde de Fortaleza: hanseníase**, Fortaleza, v. 15, n. 1, 2011.

FORTALEZA. Secretaria Municipal de Saúde. **Informe epidemiológico: hanseníase**, Fortaleza, Ceará. 2008.

FOSS, N. T. Aspectos imunológicos da hanseníase. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 30, p. 335-339, 1997.

FU, S. *et al.* CD4⁺CD25⁺CD62⁺ T-Regulatory Cell Subset Has Optimal Suppressive and Proliferative Potential. **American Journal of transplantation**, v.4, p.65-78, 2004.

GAVIN, M. A. *et al.* Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 103, p. 6659-6664, 2006.

GERSON, R. K.; KONDO, K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. **Immunology**, v.18, p. 723-737, 1970.

GIL, A. C. **Como Elaborar Projetos de Pesquisa**. São Paulo: Atlas, 2007.

GOLEVA, E. *et al.* Factors that regulate naturally occurring T regulatory cell-mediated suppression. **Basic and Clinical Immunology**, v.116, p. 1094-1100, 2005.

GOULART, L. R.; GOULART, I. M. B. Leprosy pathogenetic background: a review and lessons from other mycobacterial diseases. **Archives of dermatological research**, v. 301, p. 123–137, 2009.

GROHMANN, U.; FALLARINO, F.; PUC CETTI. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. **Trends in Immunology**, v.24, p. 242-248, 2003.

GROSSMAN, W.J. *et al.* Human T Regulatory Cells Can Use the Perforin Pathway to Cause Autologous Target Cell Death. **Immunity**, v.21, p. 589-601, 2004.

GULIA, A.; FRIED, I.; MASSONE, C. New insights in the pathogenesis and genetics of leprosy. **F1000 Medicine Reports**, v.2, p.1-5, 2010.

HA, T. Y.; WAKSMAN, B. H.; TREFFERS, H. P. The thymic suppressor cell. I. Separation of subpopulations with suppressor activity. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 139, p.13-23, 1974.

HALL, B. M. *et al.* Distinct regulatory CD4⁺ T cell subsets; differences between naive and antigen specific T regulatory cells. **Current Opinion in Immunology**, v. 23, p. 641-647, 2011.

HOUGARDY, J. M. *et al.* Regulatory T cells depress immune responses to protective antigens in active tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.176, p. 409-416, 2007.

IGNOTTI, E.; PAULA, R. C. Situação epidemiológica da hanseníase no Brasil: análise de indicadores selecionados no período de 2001 a 2010. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, Ministério da Saúde, p. 185-201, 2010.

JARVIS, L. B. *et al.* Autoreactive human peripheral blood CD8⁺T cells with a regulatory phenotype and function. **European Journal of Immunology**, v. 35, p. 2896-2908, 2005.

JOOSTEN, S. A.; OTTENHOFF, T. H. M. Human CD4 and CD8 regulatory T cells in infectious diseases and vaccination. **Human Immunology**, v.69, p. 760-770, 2008.

JOSEFOWICZ, S. Z.; LU, L. F.; RUDENSKY, A.Y. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. **Annual Reviews in Immunology**, v.30, p. 531-564, 2012.

KANG, T. J.; CHAE, G. T. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.31, p.53-58, 2001.

KONDĚLKOVÁ, K. *et al.* Regulatory t cells (treg) and their roles in immune system with respect to immunopathological disorders. **Acta Medica**, v. 53, p. 73-77, 2010.

KRONENBERG, M. *et al.* RNA transcripts for I-J polypeptides are apparently not encoded between the I-A and I-E subregions of the murine major histocompatibility complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, p. 5704-5708, 1983.

KUMAR, S. *et al.* Th3 immune response in the progression of leprosy via molecular cross-talks of TGF- β , CTLA-4 and Cbl-b. **Clinical Immunology**, 2011, doi: 10.1016/j.clim.2011.06.007.

LAHIRI, R.; KRAHENBUHL, J. L. The role of free-living pathogenic amoeba in the transmission of leprosy: a proof of principle. **Leprosy Review**, v. 79, p. 401-409, 2008.

LANZA, F. Toward Standardization of FoxP3⁺ Regulatory T-cell Measurement in Clinical Settings. **Cytometry Part B**, v.76B, p. 67-68, 2009.

LAW, J. P. *et al.* The Importance of Foxp3 Antibody and Fixation/ Permeabilization Buffer Combinations in Identifying CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Regulatory T Cells. **Cytometry Part A**, v. 75A, p.1040-1050, 2009.

LIEW, F. Y. TH1 and TH2 cells: a historical perspective. **Nature Reviews Immunology**, v.2, p. 55-60, 2002.

LOCKWOOD, D. N. J.; SARNO, E.; SMITH, W. C. Classifying leprosy patients - searching for the perfect solution? **Leprosy Review**, v. 78, p. 317-320, 2007.

LONG, S. A. *et al.* Defects in IL-2R Signaling Contribute to Diminished Maintenance of FOXP3 Expression in CD4⁺CD25⁺ Regulatory T-Cells of Type 1 Diabetic Subjects. **Diabetes**, v.59, p. 407-415, 2010.

MALHOTRA, D. *et al.* IL-10 promoter single nucleotide polymorphisms are significantly associated with resistance to leprosy. **Human Genetics**, v.118, p.295-300, 2005.

MATTHEW, R. M. *et al.* Upregulation of Foxp3 Expression in Mouse and Human Treg Is IL-2/STAT5 Dependent Implications for the NOD STAT5B Mutation in Diabetes Pathogenesis. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 1079, p.198-204, 2006.

MATTOS, K. A. *et al.* Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and Mycobacterium leprae pathogenesis. **Journal of Leukocyte Biology**, v.87, p. 371-384, 2010.

MIYARA, M.; SAKAGUCHI, S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. **Trends in Molecular Medicine**, v.13, p.108-116, 2007.

MODLIN, R. L. *et al.* Genetically restricted suppressor T-cell clones derived from lepromatous leprosy lesions. **Nature**, v. 322, p. 459-461, 1986.

MODLIN, R. L. The innate immune response in leprosy. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, p. 48-54, 2010.

MONOT, M. *et al.* On the Origin of Leprosy. **Science**, v. 308, p. 1040-1042, 2005.

MOURA, R. S. *et al.* Leprosy serology using PGL-I: a systematic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, p.11-18, 2008.

NATH, I. *et al.* Natural suppressor cells in human leprosy: the role of HLA-D-identical peripheral lymphocytes and macrophages in the in vitro modulation of lymphoproliferative responses. **Clinical and Experimental Immunology**, v.42, p. 203-210, 1980.

NAKAMURA, K.; KITANI, A. STROBER, W. Cell Contact-dependent Immunosuppression by CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells Is Mediated by Cell Surface-bound Transforming Growth Factor. **The Journal of Experimental Medicine**, v.194, p. 629-644, 2001.

NETEA, M. G. *et al.* Toll-Like Receptor 2 Suppresses Immunity against *Candida albicans* through Induction of IL-10 and Regulatory T Cells. **The Journal of Immunology**, v.172, p. 3712-3718, 2004.

NG, V. *et al.* Role of the Cell Wall Phenolic Glycolipid-1 in the Peripheral Nerve Predilection of *Mycobacterium leprae*. **Cell**, v.103, p.511-524, 2000.

OLIVEIRA, M. H. P.; ROMANELLI, G. Os efeitos da hanseníase em homens e mulheres: um estudo de gênero. **Caderno de Saúde Pública**, v.14, p 51-60, 1998.

OPROMOLLA, P. A.; MARTELLI, A. C. C. A terminologia relativa à hanseníase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, p. 293-294, 2005.

OTTENHOFF, T. H. M. *et al.* Cloned suppressor T cells from a lepromatous leprosy patient suppress *Mycobacterium leprae* reactive helper T cells. **Nature**, v. 322, p. 462-464, 1986.

OTTENHOFF, T. H. M. New pathways of protective and pathological host defense to mycobacteria. **Trends in Microbiology**, 2012.
doi.org/10.1016/j.tim.2012.06.002.

PALERMO, M. L. *et al.* Increased expression of regulatory T cells and down-regulatory molecules in lepromatous leprosy. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, p. 878-883, 2012.

PANDIYAN, P. *et al.* CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4⁺ T cells. **Nature Immunology**, v.8, p. 1353-1362, 2007.

PARKASH, O. Classification of leprosy into multibacillary and paucibacillary groups: an analysis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.55, p.1-5, 2009.

PARKASH, O.; SINGH B. P. Advances in Proteomics of *Mycobacterium leprae*. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 75, p. 369-782, 2012.

PRESICCE, P. *et al.* Association of Two Clones Allows for Optimal Detection of Human FOXP3. **Cytometry Part A**, v.77A, p. 571-579, 2010.

QUINTANA, F. J.; COHEN, I. R. Regulatory T cells and immune computation. **European Journal of Immunology**, v. 38, p. 901-937, 2008.

RAMBUKKANA, A. *et al.* Neural Targeting of *Mycobacterium leprae* Mediated by the G Domain of the Laminin- α 2 Chain. **Cell**, v.88, p.811-821, 1997.

REA, T. H. Suppressor cell activity and phenotypes in the blood or tissues of patients with leprosy. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 54, p. 298-304, 1983.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity: a five-group system. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v.34, p. 255-273, 1966.

RODRIGUES, L. C. *et al.* **Long lasting BCG protection against leprosy. *Vaccine***, v.25, p. 6842–6844, 2007.

RODRIGUES, L. C.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and gaps. ***The Lancet Infectious Disease***, v.11, p. 464–470, 2011.

RONCADOR, G. *et al.* Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells at the single-cell level. ***European Journal of Immunology***, v.35, p. 1681-1691, 2005.

RONCAROLO, M. G.; GREGORI, S. Is FOXP3 a *bona fide* marker for human regulatory T cells. ***European Journal of Immunology***, v. 38, p. 901-937, 2008.

ROOK, G. A. W. *et al.* Mycobacteria and other environmental organisms as immunomodulators for immunoregulatory disorders. ***Springer Seminars in Immunopathology***, v. 25, p.237-255, 2004

SAKAGUCHI, S. *et al.* FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. ***Nature Reviews Immunology***, v.10, p. 490-500, 2010.

SAKAGUCHI, S. *et al.* Pillars Article: Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T Cells Expressing IL-2 Receptor α -Chains (CD25). Breakdown of a Single Mechanism of Self-Tolerance Causes Various Autoimmune Diseases. ***The Journal of Immunology***, v.155, p.1151-1164, 1995.

SAKAGUCHI, S. *et al.* Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? ***International Immunology***, v. 21, p.1105-1111, 2009.

SAKAGUCHI, S.; WING, K.; MIAYRA, M. Regulatory T cells- a brief history and perspective. ***European Journal of Immunology***, v. 37, s. 1, p. S116-23, 2007.

SASIAIN, M. D. *et al.* Reduced suppressor cell response to *Mycobacterium leprae* in lepromatous leprosy. ***Infection and Immunity***, v. 57, p. 951-956, 1989.

SCHLESINGER, L. S.; HORWITZ, M. A. Phenolic Glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* Binds Complement Component C3 in Serum and Mediates Phagocytosis by

Human Monocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 174, p. 1031-1038, 1991.

SCOLLARD, D.M. *et al.* The continuing challenges of leprosy. **Clinical Microbiology reviews**, v. 19, p.338-381, 2006.

SCOTT-BROWNE, J. P. *et al.* Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v.204, p. 2159-2169, 2007.

SEHRAWAT, S.; ROUSE, B. T. Tregs and infections: on the potential value of modifying their function. **Journal of Leukocyte Biology**, v.90, p.1079-1087, 2011.

SETOGUCHI, R. *et al.* Homeostatic maintenance of natural Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, p. 723-735, 2005.

SETTIN, A. *et al.* Association of Cytokine Gene Polymorphism with Susceptibility and Clinical Types of Leprosy. **International Journal of Health Sciences**, v.1, p. 25-33, 2007.

SHAFIANE, S. *et al.* Pathogen-specific regulatory T cells delay the arrival of effector T cells in the lung during early tuberculosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 207, p. 1409-1420, 2010.

SHALEV, I. Making sense of regulatory T cell suppressive function. **Seminars in Immunology**, 2011, doi: 10.1016/j.smim.2011.04.003.

SHAPIRO, H. M. The Evolution of Cytometers. **Cytometry Part A**, v. 58A, p. 13-20, 2004.

SILVA, E. L.; MENEZES, E. M. **Metodologia da pesquisa e elaboração da dissertação**. Florianópolis: UFSC, 2005.

SINGH, A. *et al.* Foxp3⁺ Regulatory T Cells among Tuberculosis Patients: Impact on Prognosis and Restoration of Antigen Specific IFN- γ Producing T Cells. **PLOS ONE**, v.7, p.1-10, 2012.

SOUZA, A. D.; EL-AZHARY, R. A.; FOSS, N. T. Management of chronic diseases: an overview of the Brazilian governmental leprosy program. **International Journal of Dermatology**, v.48, p. 109–116, 2009.

SOUZA, C. S. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 30, p.325-334, 1997.

SPENCER, J. S. *et al.*. Identification of specific proteins and peptides in *Mycobacterium leprae* suitable for the selective diagnosis of leprosy. **The journal of Immunology**, v.175, p. 7930, 2005.

STEINBORN, A. *et al.* Distinct subsets of regulatory T cells during pregnancy: is the imbalance of these subsets involved in the pathogenesis of preeclampsia? **Clinical Immunology**, v. 129, p. 401-412, 2008.

SUZUKI, K. *et al.* Current status of leprosy: Epidemiology, basic science and clinical perspectives. **Journal of Dermatology**, v. 39, p.121–129, 2012.

SCOTT-BROWNE, J. P. *et al.* Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. **The Journal of experimental Medicine**, v.204, p. 2159-2169 , 2007.

TANG, Q. *et al.* In Vitro–expanded Antigen-specific Regulatory T Cells Suppress Autoimmune Diabetes. **The Journal of Experimental Medicine**, v.199, p. 1455-1465, 2004.

TRINCHIERI, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. **Journal of Emergency Management**, v. 204, p. 239-243, 2007.

TRZONKOWSKI, P. *et al.* Ex vivo Expansion of CD4⁺CD25⁺ T regulatory Cells for Immunosuppressive Therapy. **Cytometry Part A**, v. 75A, p. 175-188, 2009.

TURANKAR R. P. *et al.* Dynamics of *Mycobacterium leprae* transmission in environmental context: Deciphering the role of environment as a potential reservoir. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 121–126, 2012.

VANDERBORGHT, P. R. *et al.* HLA-DRB1 *04 and DRB1*10 are associated with resistance and susceptibility, respectively, in Brazilian and Vietnamese leprosy patients. **Genes and Immunity**, v.8, p. 320-324, 2007

VIEIRA, P. L. *et al.* IL-10-Secreting Regulatory T Cells Do Not Express Foxp3 but Have Comparable Regulatory Function to Naturally Occurring CD4⁺CD25⁺Regulatory T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 172, p. 5986-5993, 2004.

VIGNALI, D. A. A.; COLLISON, L. W.; WORKMAN, C. J. How regulatory T cells work. **Nature Reviews Immunology**, v.8, p. 523-532, 2008.

VIGNALI, D. A. A.; KUCHROO, V. K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. **Nature Immunology**, v.13, p. 722-728, 2012.

WAHYUNI, R. *et al.* *Mycobacterium leprae* in daily water resources of inhabitants Who live in leprosy endemic area of East Java. **Indonesian Journal of Tropical and Infectious disease**, v.1, p.65-68, 2010.

WALKER, M. R. *et al.* Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4⁺CD25⁻ T cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v.112, p. 1437-1443, 2003.

WING, J. B.; SAKAGUCHI, S. Multiple Treg suppressive modules and their adaptability. **Frontiers in Immunology**, v.3, p. 178, 2012.

WHITESIDE, T. L. Disarming suppressor cells to improve immunotherapy. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 61, p. 283-288, 2012.

WHO, World Health Organization. **Weekly epidemiological record**. n. 34, v. 87, p. 317-328, 2012.

ZODPEY, S. P. Protective effect of bacillus Calmette Guirin (BCG) vaccine in the prevention of leprosy: A meta-analysis. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 73, p. 86-93, 2007.