



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – UFPE

CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS – CCM

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

FRANCISCO BEZERRA DE ALMEIDA NETO

O PAPEL DAS CÉLULAS T REGULATÓRIAS $CCR5^{+/+}$ ($CD4+CD25+FOXP3+CCR5^{+/+}$) E
DA PRODUÇÃO DAS QUIMIOCINAS CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 e CXCL10 NA
PATOGENESE DA HANSENÍASE

Recife

2022

FRANCISCO BEZERRA DE ALMEIDA NETO

O PAPEL DAS CÉLULAS T REGULATÓRIAS CCR5^{+/+}
(CD4+CD25+FOXP3+CCR5^{+/+}) E DA PRODUÇÃO DAS QUIMIOCINAS CCL2,
CCL5, CXCL8, CXCL9 e CXCL10 NA PATOGÊNESE DA HANSENÍASE

Tese apresentada ao Programa de
Pós- Graduação em Medicina
Tropical da Universidade Federal
de Pernambuco, como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Doutor em Medicina Tropical.
Área de concentração: Medicina
Tropical.

Orientadora: Profa. Dra. Vláudia Maria Assis Costa.

Recife

2022

Catálogo na fonte:
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4-1790

A447p Almeida Neto, Francisco Bezerra de
O papel das células T regulatórias CCR5+/+
(CD4+CD25+FOXP3+CCR5+/+) e da produção das quimiocinas CCL2,
CCL5, CXCL8, CXCL9 E CXCL10 na patogênese da hanseníase/
Francisco Bezerra de Almeida Neto. - 2022.
105 p.

Orientadora: Vláudia Maria Assis Costa.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de
Ciências Médicas. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical.
Recife, 2022.
Inclui referências e anexos.

1. Hanseníase. 2. Linfócitos T regulatórios. 3. Receptor CCR5. 4.
Quimiocinas. I. Costa, Vláudia Maria Assis (Orientadora). II. Título.

610 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2023-010)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

FRANCISCO BEZERRA DE ALMEIDA NETO

O PAPEL DAS CÉLULAS T REGULATÓRIAS CCR5^{+/+} (CD4+CD25+FOXP3+CCR5^{+/+}) E DA PRODUÇÃO DAS QUIMIOCINAS CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 e CXCL10 NA PATOGÊNESE DA HANSENÍASE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, comoparte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical.

Área de concentração: Medicina Tropical.

Aprovado em: 30/08/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Valdênia Maria Oliveira de Souza (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. Eryvelton de Souza Franco (Examinador Externo)
Centro Universitário Brasileiro (UNIBRA)

Prof^ª. Dr^ª. Francisca Janaína Soares Rocha (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^ª. Dr^ª. Iana Rafaela Fernandes Sales (Examinadora Externa)
Uninassau

Prof. Dra. Vláudia Maria Assis Costa (Presidente da Banca)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Dedico este trabalho em honra e memória aos meus ancestrais. À minha mãe, Terezinha de Jesus Araujo Almeida, aos meus avôs maternos, Francisco Bezerra de Almeida e Nita Araujo Almeida e à minha tia, Zilda Maria Araújo Almeida cujos esforços, dedicação e amor de toda uma vida, permitiram-me chegar até a sua conclusão.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Vláudia Maria de Assis Costa, que em meio a tantas atribuições dedicou alguns momentos de sua vida à minha pessoa, guiando meus passos trôpegos desde o início até a finalização deste trabalho.

A todo o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Patologia, meu reconhecimento, agradecimento e admiração eterna.

À equipe administrativa do Programa de Pós-graduação de Medicina Tropical, especialmente a Walter e Neemias, pela competência e assistência completa ao discente.

A minha colega à época doutoranda Ângela que me auxiliou no momento mais difícil da minha vida quando da partida da minha mãe para o plano espiritual.

Ao meu colega à época doutorando Jorge Belém, que sempre me incentivou a seguir em frente.

Ao meu inestimável amigo e tradutor Dr. Fred Nietto, que desde o início da minha vida acadêmica colaborou e colabora comigo.

A José Amâncio da Silva Sobrinho, cujos prestimosos serviços possibilitam minhas realizações pessoais e aos meus amigos particulares, que dedicaram e dedicam suas preciosas horas vagas em meu auxílio.

Aos meus alunos de Dermatologia do curso de Medicina da UNINASSAU, que foram um dos incentivos a persistir neste trabalho.

A toda a equipe dos Centros de Referência secundárias em hanseníase Amélia de Pontes em Caruaru – PE e Prof. Nilda Buarque no Cabo de Santo Agostinho.

Ao Instituto Lauro de Souza Lima – Bauru – SP, nas pessoas da Dra. Patrícia Rosa, Dra. Andréa Belone e Dr. Djair, que nos momentos decisivos para a defesa desta tese se fizeram presentes, auxiliando-me em sua conclusão.

Aos pacientes que, a despeito de serem acometidos pela hanseníase, permitiram-se solidariamente participar desta pesquisa, vislumbrando a possibilidade de minimizar o sofrimento de outros, em um inquestionável exemplo de doação ao próximo.

“A história é a mestra da vida, repetimos o conhecido aforisma. Possa, destarte, a história da hanseníase no Brasil, desvendando as realidades do passado, trazer alguma contribuição à redenção higiênica de nossa querida Pátria” (MAURANO, 1944, p.16).

RESUMO

A hanseníase é uma doença caracterizada por respostas imunes antagônicas que envolve a participação de diferentes populações celulares direcionando os pacientes para polos de maior ou menor resistência à infecção. A dicotomia da resposta imunológica é classicamente relacionada aos linfócitos TH1 e TH2, embora já ter sido verificado o importante papel de outras subpopulações linfocitárias como a TH17. Para exercerem suas funções, estas células dependem não somente da produção de citocinas, mas também da expressão de quimiocinas, que são ainda pouco exploradas. O presente estudo teve como objetivo avaliar a população de células TH17, de linfócitos Tregs, de linfócitos TregsCCR5^{+/+} e a frequência das quimiocinas CCL2, CCL5 CXCL8, CXCL9 e CXCL10 em 33 pacientes com hanseníase. Os pacientes foram classificados clinicamente (Madrid) e estratificados operacionalmente (Organização Mundial de Saúde). As populações celulares foram cultivadas e estimuladas com a fitohemaglutinina (PHA) e o bacilo de Calmète Guérin (BCG), centrifugadas, ressuspendidas, fixadas, permeabilizadas e marcadas. Os sobrenadantes foram coletados para determinação das quimiocinas utilizando o kit CBA Human Chemokine CXCL8, CXCL9, CXCL10, CCL2 e CCL5. Os testes ANOVA, Kruskal-Wallis, Dunns e Tukey foram empregados na análise estatística sendo considerado significativo $p < 0,05$. Pacientes tuberculóides (TTs) expressaram de maneira significativa mais linfócitos TH17 tanto com o BCG ($0,8 \pm 0,3$ % células) quanto com a PHA ($1,67 \pm 0,6$ % células), sem diferenças na frequência das células Tregs. Pacientes virchowianos (VVs) apresentaram maior frequência de TregsCCR5^{+/+} quando estimulados com PHA ($0,632 \pm 0,38$ % células) ou BCG ($0,335 \pm 0,14$ % células) do que pacientes TTs estimulados com PHA ($0,31 \pm 0,1$ % células) ou BCG ($0,18 \pm 0,07$ % células). CCL2 e CCL5 não apresentaram diferenças estatísticas. CCL5 demonstrou elevadas e uniformes concentrações em comparação com as demais. Houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) na expressão de CXCL8 entre os pacientes TTs estimulados com a PHA e os pacientes VVs sem estímulos, demonstrando se tratar de um bom biomarcador para colaborar com o diagnóstico de pacientes paucibacilares. CXCL9 demonstrou ser um biomarcador possivelmente capaz de colaborar com o diagnóstico de pacientes com infecção latente pelo *Mycobacterium leprae*, por apresentar-se significativamente elevada em pacientes tuberculóides sem estímulo em comparação com pacientes VVs estimulados com PHA ($p < 0,05$). CXCL10 não demonstrou ser útil na distinção entre as formas clínicas e operacionais da hanseníase. Em conclusão, os resultados mostraram uma maior frequência

de células Tregs CCR5^{+/+} em pacientes VVs, sugerindo um papel imunorregulatório relevante na hanseníase. CXCL8 e CXCL9 demonstraram se tratar de potenciais biomarcadores para distinção entre as formas clínicas, necessitando que estudos futuros e extensos sejam realizados para explorarem-se as possibilidades de sua utilização para estratégias diagnósticas, imunoproláticas ou de tratamento nesta doença milenar que permanece negligenciada.

Palavras-Chave: hanseníase; linfócitos T regulatórios; receptor CCR5; quimiocinas.

ABSTRACT

Leprosy is a disease characterized by antagonistic immune responses that involve the participation of different cell populations directing patients to poles of greater or lesser resistance to infection. The dichotomy of the immune response is classically related to TH1 and TH2 lymphocytes, although the important role of other lymphocyte subpopulations such as TH17 has already been verified. To perform their functions, these cells depend not only on the production of cytokines, but also on the expression of chemokines, which are still little explored. The present study aimed to evaluate the population of TH17 cells, Tregs lymphocytes, TregsCCR5^{+/+} lymphocytes and the frequency of chemokines CCL2, CCL5 CXCL8, CXCL9 and CXCL10 in 33 leprosy patients. Patients were clinically classified (Madrid) and operationally stratified (World Health Organization). Cell populations were cultured and stimulated with phytohemagglutinin (PHA) and bacillus Calmète Guérin (BCG), centrifuged, resuspended, fixed, permeabilized and marked. Supernatants were collected for chemokine determination using the CBA Human Chemokine CXCL8, CXCL9, CXCL10, CCL2 and CCL5 kit. The ANOVA, Kruskal-Wallis, Dunns and Tukey tests were used in the statistical analysis, with $p < 0.05$ being considered significant. Tuberculoid patients (T-lep) expressed significantly more TH17 lymphocytes with both BCG (0.8 ± 0.3 % cells) and PHA (1.67 ± 0.6 % cells), with no difference in the frequency of Treg cells. Lepromatous patients (L-lep) had a higher frequency of TregsCCR5^{+/+} when stimulated with PHA (0.632 ± 0.38 % cells) or BCG (0.335 ± 0.14 % cells) than T-lep patients stimulated with PHA (0.31 ± 0.1 % cells) or BCG (0.18 ± 0.07 % cells). CCL2 and CCL5 showed no statistical differences. CCL5 demonstrated high and uniform concentrations compared to the others. There was a significant difference ($p < 0.05$) in the expression of CXCL8 between T-lep patients stimulated with PHA and L-lep patients without stimuli, demonstrating that it is a good biomarker to collaborate with the diagnosis of paucibacillary patients. CXCL9 proved to be a biomarker possibly capable of collaborating with the diagnosis of patients with latent infection by *Mycobacterium leprae*, as it is significantly elevated in T-lep patients without stimulation compared to L-lep patients stimulated with PHA ($p < 0.05$). CXCL10 has not been shown to be useful in distinguishing between clinical and operational forms of leprosy. In conclusion, the results showed a higher frequency of Tregs CCR5^{+/+} cells in VVs patients, suggesting a relevant immunoregulatory role in leprosy. CXCL8 and CXCL9 proved to be potential biomarkers

for distinguishing between the clinical forms, requiring future and extensive studies to be carried out to explore the possibilities of their use for diagnostic, immunoprophylactic or treatment strategies in this millennial disease that remains neglected.

Keywords: leprosy; regulatory T lymphocytes; CCR5 receptor; chemokines.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS DA TESE

<i>Figura 1 -</i>	<i>Proporção de casos novos de hanseníase multibacilar no Brasil (A) e em Pernambuco (B) entre todos os casos novos no período de 2009 a 2021.....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 2 -</i>	<i>Apresentações clínicas da hanseníase.....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 3 -</i>	<i>Variantes clínicas de hanseníase.....</i>	<i>26</i>
<i>Figura 4 -</i>	<i>Reações hansênicas.....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 5 -</i>	<i>Gráfico dot plot representativo da aquisição de linfócitos no FACScaliburTM.....</i>	<i>51</i>

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO 1

<i>Figure 1 -</i>	<i>Representative dot plot graph of Tregs and TregsCCR5^{+/+} lymphocyte acquisition in FACScaliburTM</i>	<i>64</i>
<i>Figure 2 -</i>	<i>Clinical forms of leprosy and the expression of TH17, Tregs, and TregsCCR5^{+/+}.....</i>	<i>64</i>

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO 2

<i>Figura 1 -</i>	<i>CCL2 chemokine.....</i>	<i>71</i>
<i>Figura 2 -</i>	<i>CCL5 chemokine.....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 3 -</i>	<i>CXCL8 (IL-8) chemokine.....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 4 -</i>	<i>CXCL9 chemokine.....</i>	<i>73</i>
<i>Figura 5 -</i>	<i>CXCL10 chemokine.....</i>	<i>75</i>

LISTA DE TABELAS

LISTAS DE TABELAS DA TESE

<i>Tabela 1 -</i>	<i>Principais genes estudados na susceptibilidade à hanseníase.....</i>	<i>30</i>
<i>Tabela 2 -</i>	<i>Citocinas humanas, receptores e principais funções descritas.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabela 3 -</i>	<i>Classificação clínica (Madrid) e operacional (OMS) para hanseníase.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabela 4 -</i>	<i>Categorização dos grupos de pacientes diagnosticados com hanseníase no período elencado para este estudo.....</i>	<i>48</i>

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO 2

<i>Tabela 1 -</i>	<i>Categorization of the groups of patients diagnosed with leprosy.....</i>	<i>69</i>
-------------------	---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BB	Borderline
BCA-1	<i>B-cell-attracting chemokine-1</i>
BRAK	<i>breast and kidney derived chemokine</i>
CCL2	<i>C-C motif chemokine ligand 2</i>
CCL5	<i>C-C motif chemokine ligand 5</i>
CCR5	<i>C-C motif chemokine receptor 5</i>
CD4	<i>Cluster of Differentiation 4</i>
CD8	<i>Cluster of Differentiation 8</i>
CD25	<i>Cluster of Differentiation 25</i>
CD122	<i>Cluster of Differentiation 122</i>
CXCR4	<i>C-X-C motif chemokine receptor 4</i>
CXCL1	<i>C-X-C motif chemokine ligand 1</i>
CXCL2	<i>C-X-C motif chemokine ligand 2</i>
CXCL3	<i>C-X-C motif chemokine ligand 3</i>
CXCL4	<i>C-X-C motif chemokine ligand 4</i>
CXCL5	<i>C-X-C motif chemokine ligand 5</i>
CXCL6	<i>C-X-C motif chemokine ligand 6</i>
CXCL7	<i>C-X-C motif chemokine ligand 7</i>
CXCL8	<i>C-X-C motif chemokine ligand 8</i>
CXCL9	<i>C-X-C motif chemokine ligand 9</i>
CXCL10	<i>C-X-C motif chemokine ligand 10</i>
DC	Célula dendrítica

D	Dimorfo
DD	Dimorfo-Dimorfo
DT	Dimorfo-Tuberculóide
DV	Dimorfo-Virchowiano
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ENH	Eritema nodoso hansênico
FadD9	<i>fatty-acid--CoA ligase</i>
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
<i>folP1</i>	<i>Dihydropteroate synthase</i>
FOXP3	<i>Forkhead box p3</i>
<i>Gyr-A</i>	<i>DNA gyrase subunit A</i>
HH	Hanseníase históide
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HNP	Hanseníase neural primária
I	Indeterminada
IFN- γ	<i>Interferon-gamma</i>
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-17	Interleucina 17
i-NOS	<i>nitric oxide synthase 2</i>

LL	<i>Lepromatous</i>
miR-34a-5p	<i>microRNA 34a-5p</i>
ML	<i>Mycobacterium Leprae</i>
MLP	<i>Mycobacterium Lepromatosis</i>
NFATc	<i>nuclear factor of activated T cells 1</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS-BSA	<i>Phosphate Buffered Saline With Bovine Serum Albumin</i>
PERCP-CY5.5	<i>Peridinin-Chlorophyll-Protein Complex: CY5.5 Conjugate</i>
PGL 1	<i>Phenolic Glycolipid-1</i>
PHA	Fitohemaglutinina
PMNs	Linfócitos polimorfonucleares
PQT	Poliquimioterapia
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
RH-1	Reação hansênica do tipo 1
RH-2	Reação hansênica do tipo 2
<i>rpoB</i>	<i>RNA polymerase subunit beta</i>
<i>ribD</i>	<i>fused diaminohydroxyphosphoribosylaminopyrimidine deaminase/5-amino-6-(5-phosphoribosylamino)uracil reductase</i>
RORgt	<i>Retinoic Acid-Related Orphan Receptor gt</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SARS-Cov-2	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
Syk	Tirosina-quinase
T	Tuberculóide

TCC repeats	<i>Pairing of DNA Fragments Containing (GGA:TCC) n Repeats</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor</i>
TH1	<i>T Helper 1 (lymphocyte)</i>
TH17	<i>T Helper 17 (lymphocyte)</i>
TH2	<i>T Helper 2 (lymphocyte)</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TLR1	<i>Toll-Like Receptor 1</i>
TLR2	<i>Toll-Like Receptor 2</i>
TLR4	<i>Toll-Like Receptor 4</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
Tregs	<i>T regulatory cells</i>
TT	Tuberculóide
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
V	Virchowiana
VV	Virchowiana-Virchowiana
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1	INTRODUÇÃO.....	22
2.2	IMUNOLOGIA DA HANSENÍASE	30
2.2.1	A imunidade inata	30
2.2.2	A imunidade adaptativa.....	34
2.2.3	As implicações do receptor CCR5 na patogênese das doenças infecciosas e o seu papel quando expresso em linfócitos Tregs.....	35
2.2.5	O papel das quimiocinas e seus mecanismos de imunorregulação	38
3	RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	45
4	OBJETIVOS	46
4.1	OBJETIVO GERAL.....	46
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
5	MATERIAL E MÉTODOS	47
5.1	DESENHO DO ESTUDO	47
5.2	POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	47
5.2.1	Critérios de inclusão.....	49
5.2.2	Critérios de exclusão	49
5.3	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	49
5.4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	49
5.4.1	Coleta e cultura de sangue periférico	49
5.4.2	Deteccção das células Tregs e TH17	50
5.4.3	Determinação de quimiocinas por citometria de fluxo (Cytometric Bead Array) – CBA.....	51
5.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
6	RESULTADOS	53

6.1	ARTIGO 1: THE EXPRESSION OF TH17 CELLS, T REGULATORY CELLS CCR5 ^{-/-} , AND T REGULATORY CELLS CCR5 ^{+/+} IN THE POLAR CLINICAL-IMMUNOLOGICAL SPECTRUM OF LEPROSY.....	53
6.2	ARTIGO 2: ROLE OF CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9, AND CXCL10 CHEMOKINES IN THE PATHOGENESIS OF LEPROSY.....	65
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	86
	REFERÊNCIAS	88
	ANEXO A – COMPROVANTES DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 1	101
	ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 2	102
	ANEXO C – PARECER CONSUBSTANCIADO.....	103

1 APRESENTAÇÃO

Na hanseníase, os linfócitos T regulatórios (Tregs) foram estudados por Massone e cols. (2010), que demonstraram pela primeira vez que células CD4+CD25+FOXP3+ estão presentes nas lesões de pacientes com diferentes formas de hanseníase e em reações hansênicas, sobretudo reações hansênicas do tipo 1 (Massone, Nunzi et al. 2010).

Em 2013, Fernandes e cols. Verificaram uma maior frequência de linfócitos Tregs convencionais CD4+ (CD4+CD25+FOXP3+) e TCD8+ (CD8+CD25+FOXP3+) em pacientes multibacilares menores de 15 anos estabelecendo uma correlação com aspectos clínicos (número de lesões) e laboratoriais (índice baciloscópico) da doença (Fernandes, Gonçalves et al. 2013).

Posteriormente em 2015, Parente e cols. Determinaram a frequência destas células também em várias formas clínicas da doença e também em pacientes com reações hansênicas sendo também maior nos pacientes reacionais do tipo 1 (Parente, Talhari et al. 2015).

De Almeida Neto e cols. (2012) demonstraram pela primeira vez a forte expressão de células TH17 e de IL-17 em sangue periférico de pacientes paucibacilares com hanseníase, demonstrando a sua importante contribuição para a resistência à doença, o que despertou neste mesmo autor o interesse em avaliar células com elevado potencial imunossupressor e comparar com seus prévios resultados (de Almeida-Neto, Assis Costa et al. 2015).

Por outro lado, as células Tregs são associadas ao desenvolvimento das formas clínicas disseminadas da doença. A expressão do receptor CCR5 pelas células Tregs subdividiu essa população linfocitária em Tregs CCR5^{+/+} e Tregs CCR5^{-/-}, demonstrando que essas células apresentam de fato o “braço efetor” das células Tregs convencionais, com um potencial imunossupressor de maior relevância (Kallikourdis, Andersen et al. 2007).

A expressão de CCR5 pelas células Tregs, portanto, modifica a sua função. Classicamente estudado na infecção pelo HIV, este receptor tem despertado o interesse na compreensão da imunologia de várias doenças autoimunes e infecciosas, como a paracoccidiodomicose, tuberculose, leishmaniose, doença de Chagas e câncer, sendo a maioria desses estudos voltados para as células T efetoras, sem contudo nunca terem sido estudado na hanseníase quando expresso por esta população linfocitária (Moreira, Cavassani et al. 2008, Jiao, Nawab et al. 2019).

Este trabalho comparou a frequência de células TH17, células Tregs convencionais e células TregsCCR5^{+/+} em pacientes com hanseníase clinicamente estáveis e sem reações hansênicas para verificar o papel dessa subpopulação linfocitária na dinâmica imunológica espectral da hanseníase.

Com a finalidade de ampliar a compreensão na imunorregulação da hanseníase, considerando o papel desempenhado pelas quimiocinas na movimentação leucocitária e a sua migração para os tecidos a partir do sangue periférico, este estudo também se propôs a analisar um painel de quimiocinas representado pelas quimiocinas CCL2, CCL5 CXCL8, CXCL9 e CXCL10 encontrando importantes resultados. Até então, o papel das quimiocinas também é pouco explorado na patogênese da hanseníase.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INTRODUÇÃO

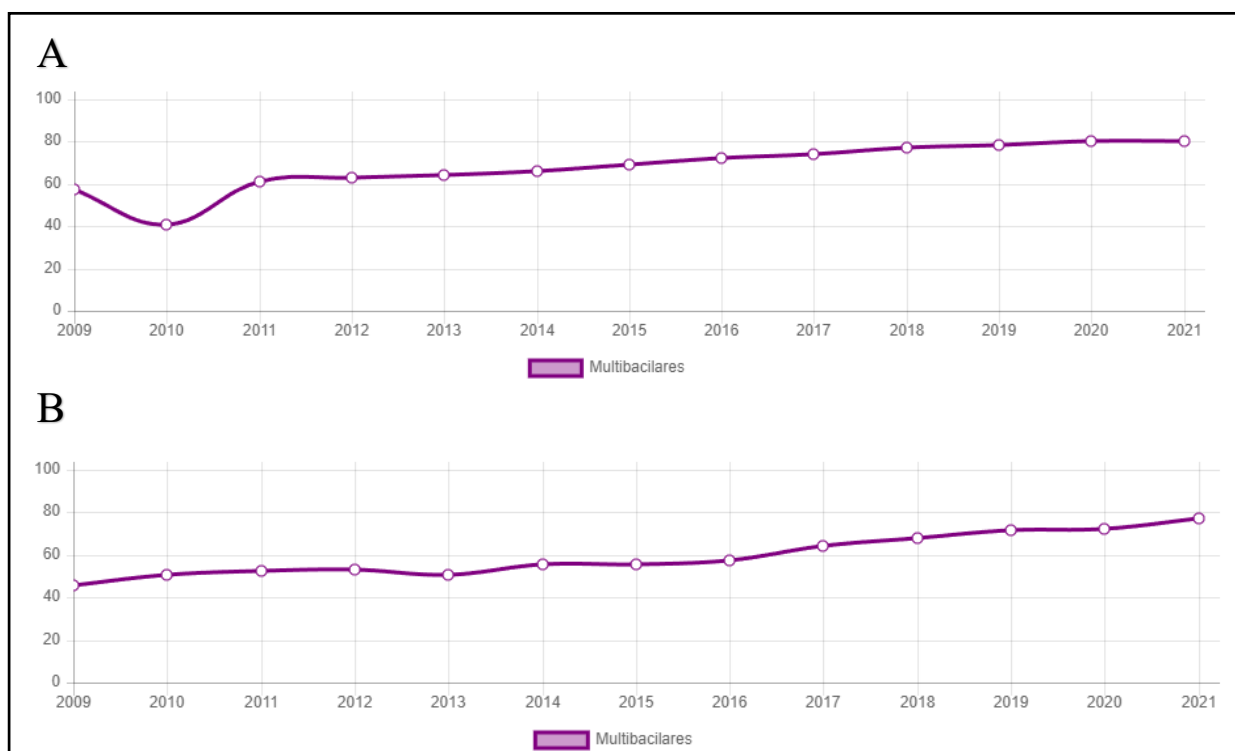
A hanseníase é doença inserida no contexto das doenças negligenciadas, permanecendo, portanto, presente na sociedade moderna desde tempos imemoriais. É agravo de saúde pública que se relaciona a um contexto social de vulnerabilidade, ocupando posição de destaque entre as populações que vivem nas periferias dos aglomerados urbanos. O Brasil responde pelo segundo lugar mundial no quantitativo de diagnósticos de casos novos da doença, com cerca de 30.000 diagnósticos anuais, incluindo crianças menores de 15 anos (BRASIL, 2020).

A despeito de ter sido declarada “eliminada” como um problema de saúde pública pela Organização Mundial de Saúde (OMS) no ano 2000, cerca de 200.000 casos novos são globalmente reportados a cada ano. A movimentação migratória tem trazido a hanseníase de volta a áreas não-endêmicas, como a Europa e os Estados Unidos e começa a despertar novamente a atenção nessas regiões, onde o conhecimento técnico em campo sobre a doença vem sendo perdido ao longo dos anos (RAMOS et al. 2016; MAYMONE et al., 2020).

Os dados epidemiológicos consistentes nas coortes, exibem que o número de casos novos diagnosticados anualmente no Brasil permanece estagnado em uma média de 30.888 casos novos entre os anos de 2009 a 2019, sendo 20.581 a média de casos multibacilares. A proporção de casos novos multibacilares diagnosticados no Brasil mostra tendência a crescimento, mantendo a transmissão da doença ativa na população. O estado de Pernambuco segue a mesma tendência com uma média de 2.525 casos novos multibacilares diagnosticados no mesmo período, sendo de 1.414 a média de pacientes multibacilares (figura 1) (BRASIL, 2020).

Por ocasião da pandemia provocada pelo SARS-Cov-2, houve uma drástica redução de 41,4% no número de casos diagnosticados no Brasil no ano de 2020. Na população de menores de 15 anos esta redução de diagnósticos foi ainda maior, de 56,82%. Houve um incremento no número de casos novos multibacilares diagnosticados de 8,1%, após a retomada das ações de controle da doença (DA PAZ et al. 2022).

Figura 1: Proporção de casos novos de hanseníase multibacilar no Brasil (A) e em Pernambuco (B) entre todos os casos novos no período de 2009 a 2021.



Fonte: SINAN/SVS/MS

A hanseníase é uma patologia crônica infecciosa, causada pelas micobactérias *Mycobacterium leprae* (ML) e *Mycobacterium lepromatosis* (MLP), que possuem afinidade inicial pela célula de Schwann e posterior pelos macrófagos dérmicos. Consequentemente, manifesta-se na pele, pelo fato de se tratar de um órgão ricamente innervado, mucosas e sistema nervoso periférico; estendendo-se *a posteriori* para outros órgãos e sistemas. Esta predileção peculiar pelo sistema nervoso é responsável por desordens neurológicas que podem resultar em graves incapacidades físicas e deformidades (HAN et al., 2008; WHITE; FRANCO-PAREDES, 2015).

A hanseníase apresenta-se como uma doença espectral, onde a interação dos agentes etiológicos com o indivíduo geneticamente susceptível, proporcionarão o desenvolvimento de diferentes formas clínicas, descritas por Ridley-Jopling (1966), que classificou os doentes em tuberculóides (TT), e subdividiu o grupo dimorfo em Dimorfos-Tuberculóides (DT), Dimorfos-Dimorfos (DD), Dimorfos-Virchowianos (DV) e Virchowianos. (VV). Esta classificação fundamenta-se em aspectos clínicos, imunológicos e histopatológicos (RIDLEY; JOPLING 1966).

Além dessas formas clínicas, existem algumas variantes descritas também espectrais, que são a hanseníase nodular da infância, variante da forma clínica TT e a hanseníase históide (HH), variante da forma clínica virchowiana (WADE 1963; FAKHOURI et al. 2003).

A forma clínica inicial da doença, denominada de indeterminada (I) foi descrita em uma classificação anterior, denominada de classificação de Madrid (1953), sendo esta a classificação adotada oficialmente no Brasil e que desconsidera as subdivisões do grupo dimorfo bem como as suas variantes clínicas. Por outro lado, a classificação de Ridley-Jopling desconsidera a classificação clínica indeterminada (MADRID, 1953).

Finalmente, há ainda uma forma clínica de hanseníase onde não existem lesões cutâneas evidentes, mas um comprometimento neural progressivo e incapacitante, definida como hanseníase neural pura ou primária (HNP). As diversas apresentações clínicas da hanseníase estão apresentadas na figura 2. (RAO; SUNEETHA, 2016).

Durante o decurso da hanseníase, antes, durante ou após o tratamento a estabilidade clínica dos pacientes pode ser interrompida por episódios inflamatórios agudos, que são denominados de reações hansênicas. A exacerbação da resposta imune imunocelular leva a ocorrência de reações hansênicas do tipo 1 (RH-1) quando existe a infiltração súbita de lesões cutâneas pré-existentes, neurites e/ou fenômenos inflamatórios em outros órgãos e sistemas. O tratamento é conduzido com corticoterapia sistêmica (figura 3) (CHEN et al. 1976; ANDRADE, et al. 2015).

A formação de imunocomplexos nos pacientes bacilíferos que ocorre principalmente devido à degradação bacilar e a ativação do complemento, leva por sua vez à ocorrência das reações hansênicas do tipo 2 (RH-2), cuja manifestação clínica principal é o surgimento de nódulos eritematosos subcutâneos denominados de eritema nodoso hansênico (ENH) (figura 4). O surgimento destes nódulos é acompanhado de sintomatologia geral, como febre, leucocitose e prostração. Esta reação hansênica trata-se de um fenômeno imunológico no qual admite-se a deposição de imunocomplexos nas paredes dos vasos do tecido adiposo subcutâneo, comparável à reação imunológica de Arthus, decorrente da morte de grande número de bacilos, seja pelo discreto desenvolvimento de competência imunológica imunocelular, seja por ação direta do tratamento na carga bacilar. Por esta razão, esta reação acomete os pacientes com maiores índices baciloscópicos, dentro da classificação espectral, os pacientes DVs e VVs (WEMAMBU, et al. 1969).

A principal droga para o tratamento da RH-2 no Brasil é a talidomida, que obedece a rigoroso ato médico prescricional, necessário devido à conhecida teratogenicidade. A eficácia

da talidomida na RH-2 foi descrita pela primeira vez por Languillon, (1968). (LANGUILLON, et al. 1968).

Existe uma forma clínica de hanseníase na qual os pacientes são completamente anérgicos do ponto de vista imunológico, descrita por Rafael Lúcio e Ignacio Alvarado (1852), no México, onde toda a pele do paciente é infiltrada de maneira uniforme, configurando um aspecto brilhante, lúcido, que recebeu a denominação de hanseníase de Lúcio-Alvarado-Latapi, mais conhecida no Brasil simplesmente como hanseníase de Lucio. Considerada forma grave da doença, Esta forma de hanseníase cursa com o desenvolvimento de necrose cutânea clinicamente apresentando-se como extensas áreas necrohemorrágicas, devido ao vasto comprometimento do endotélio, que é colonizado pelo ML e MLP. Este fenômeno é conhecido como fenômeno de Lucio, considerado uma variante das reações hansênicas (DIOGENES et al., 2001; VARGAS-OCAMPO 2007; HAN et al., 2012).

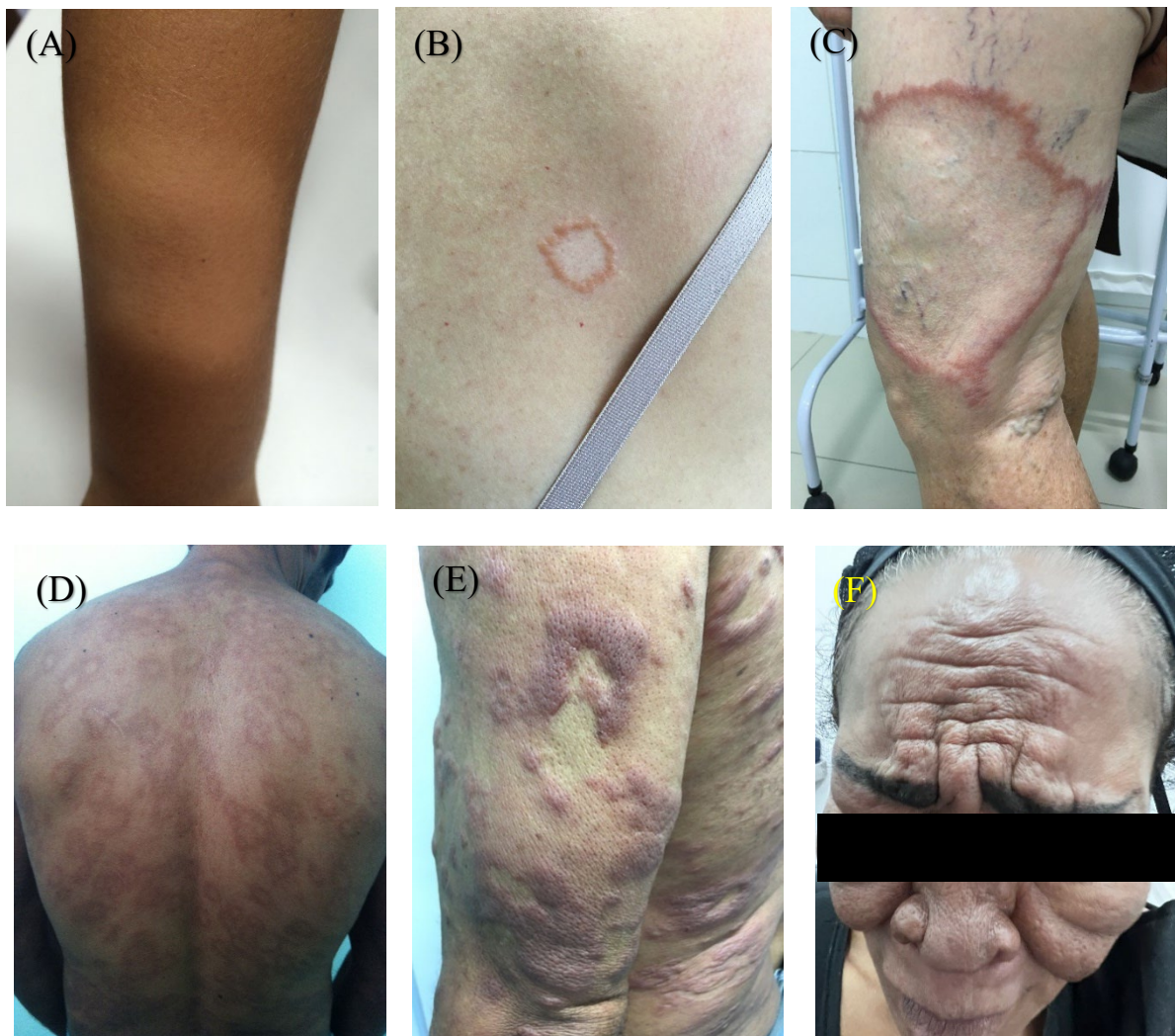


Figura 2 – Apresentações clínicas da hanseníase. Fonte: Acervo particular do autor (A): Hanseníase indeterminada. Mácula hipocrômica de limites mal definidos com alteração de sensibilidade. (B) Hanseníase tuberculóide. Pequena placa de bordos eritemato-infiltrados e alterações pronunciadas de sensibilidade. (C) Hanseníase dimorfa-tuberculóide. Grande placa de bordos eritemato-infiltrados espalhando-se pelas laterais. A paciente apresentava comprometimento do nervo fibular comum. (D) Hanseníase dimorfa-dimorfa. Lesões foveolares dispersas por toda a pele e comprometimento de vários troncos nervosos periféricos. (E) Hanseníase dimorfa-virchowiana. Fovéolas mal definidas entremeadas por lesões nodulares, exibindo características de hanseníase dimorfa e virchowiana simultaneamente. (F): Hanseníase virchowiana. Ausência de lesões dermatológicas caracterizáveis. Presença de grande área de infiltração da inervação supraorbitária, desabamento da pirâmide nasal por destruição septal e madarose, imperceptível pela tatuagem nas sobrancelhas realizada pela paciente.

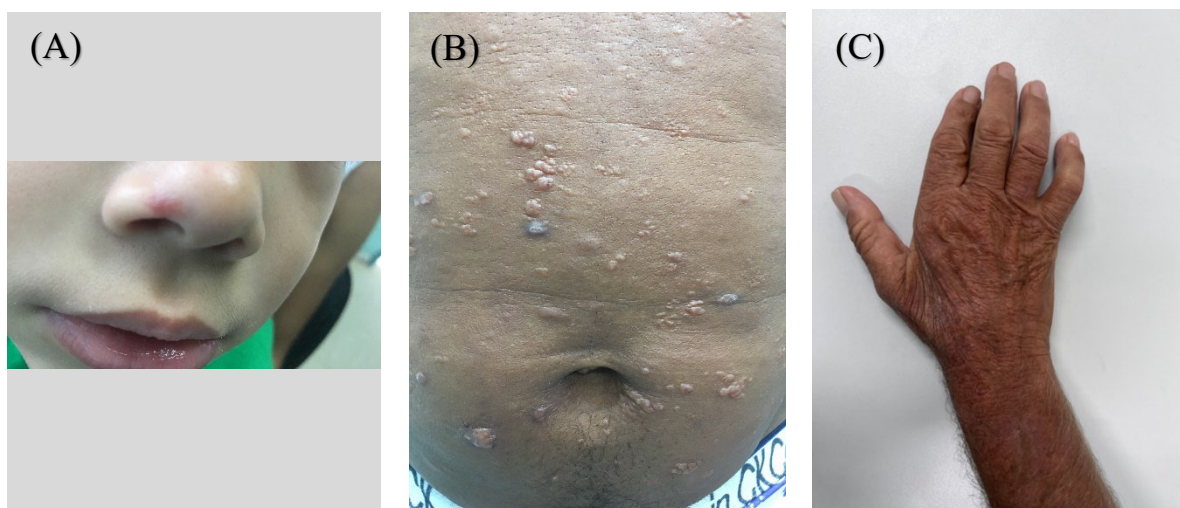


Figura 3: Variantes Clínicas da Hanseníase. Fonte: Acervo particular do autor. (A): Hanseníase nodular da infância. Pequena pápula eritematosa localizada em asa nasal direita. A mãe da criança apresentava hanseníase dimorfa-dimorfa. (B) Hanseníase históide. Tubérculos (hansenomas) disseminados pela pele sob pele aparentemente normal e também infiltrada em algumas áreas. (C) Hanseníase neural primária. Observa-se flexão dos 4 e 5º quirodáctilos, amiotrofias interquirodâctilas, mais pronunciada entre o pólux e o 2º quirodáctilo, por comprometimento do adutor breve do polegar, cuja inervação é de responsabilidade do nervo ulnar.



Figura 4 – Reações hansênicas. Fonte: Acervo particular do autor, exceto em (F), que foi gentilmente cedida como cortesia pelo Dr. Jailson Barreto (Instituto Lauro de Souza Lima – Bauru – SP). (A): Reação hansênica do tipo 1. Infiltração das lesões pré-existentes, denotando grande placa eritemato-infiltrada em tórax, d'antes inaparente. (B e C) Reação hansênica do tipo 2. Nódulos subcutâneos, sendo um com o aspecto de pústula, prestes a ulcerar-se, caracterizando o eritema nodoso hansênico. (D): Eritema polimorfo-like reaction. Paciente virchowiano apresentando placas eritemato-infiltradas onde antes não existiam lesões aparentes. (E): Extensa ulceração em reação hansênica do tipo 2 complicada com fasciíte necrotizante (E) Fenômeno de Lúcio. Áreas necróticas de infartos cutâneos denunciando o comprometimento endotelial da microvascularização cutânea.

O diagnóstico da hanseníase permanece sendo essencialmente clínico com instrumentos rudimentares para uso em campo, como tubos de ensaio, agulhas e algodão, com a finalidade de aferição da sensibilidade cutânea.

Recentemente tenha houve a incorporação para o Sistema Único de Saúde de dois testes diagnósticos sendo um deles utilizando biologia molecular para a detecção do ML, e outro para a avaliação imunocromatográfica qualitativa do anticorpo anti-PGL-I, ainda em processo de avaliação em campo. O antígeno PGL-I é produzido em grande monta pelo ML e sua detecção quantitativa por ELISA, apesar de algumas limitações, tem se mostrado de grande utilidade inclusive em casos de hanseníase neural primária (SANTOS et al. 2017).

Para fins de tratamento da hanseníase, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estratifica os pacientes em dois grandes grupos, denominados de paucibacilares, no qual os indivíduos doentes apresentam até 5 lesões de pele sem baciloscopia positiva; ou multibacilares que apresentam mais de 5 lesões ou baciloscopia positiva ou um único nervo comprometido independentemente da presença ou quantidade de lesões cutâneas. Os paucibacilares, portanto, compreendem os pacientes indeterminados e TTs, enquanto as demais formas clínicas representam os pacientes multibacilares (WHO 2018).

O tratamento proposto permanece o mesmo há mais de 40 anos, denominado no Brasil de poliquimioterapia única (PQT-U). Consiste da administração de três drogas subdivididas em um regime próprio de administração que compreende uma dose denominada de “supervisionada” composta por rifampicina, dapsona e clofazimina que é oferecida ao paciente a cada 28 dias e de doses diárias, compostas por dapsona e clofazimina. As posologias das drogas são ajustadas para adultos e crianças. A duração do tratamento é de 6 doses supervisionadas para os pacientes classificados como paucibacilares e de 12 doses supervisionadas para os pacientes classificados como multibacilares, podendo no Brasil, ser estendida por mais 12 doses nos pacientes com casos clínicos avançados e com sinais de doença em atividade após a conclusão do tempo preconizado. Alternativamente para os pacientes que não podem utilizar alguns dos fármacos deste esquema há a disponibilização de ofloxacino e minociclina (BRASIL, 2016).

Um dos problemas enfrentados em relação ao tratamento proposto trata-se da resistência medicamentosa. A combinação de múltiplos fármacos atende às principais hipóteses do desenvolvimento de resistência medicamentosa do ML: as resistências medicamentosas primárias e secundárias. Nas resistências medicamentosas primárias, ocorrem mutações cromossômicas nos genes que codificam os alvos das drogas, espontaneamente ou como resultados de erros inerentes à replicação de DNA, principalmente devido ao longo período de incubação da doença associado por vezes ao longo período para o início de tratamento, o que proporciona a disseminação de bacilos resistentes entre uma população anteriormente susceptível, com o surgimento de casos novos resistentes. Na resistência medicamentosa secundária, os mecanismos de resistência bacteriana são estimulados devido à tratamentos inadequados. Nesses casos, um paciente torna-se resistente, não sendo contaminado previamente por bacilos mutantes e sim passando a disseminá-los (BROWN-ELLIOTT et al., 2012).

A resistência à dapsona é relacionada a mutações no gene *folP1* e a maioria dos trabalhos científicos apontam como sendo a principal droga envolvida na resistência medicamentosa,

devido ao longo período da monoterapia sulfônica. As mutações associadas à resistência à rifampicina em 95% das vezes estão localizadas em uma pequena região de 81 pares de bases do gene *rpoB* denominada de “região determinante da resistência à rifampicina” (*rifampicina resistance-determining region–RRDR*). Até o presente momento, mutações fora desta região somente estão bem definidas para o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (GILLIS; WILLIAMS, 2000).

Na hanseníase existem escassos registros de resistência medicamentosa à clofazimina *in vivo* através da técnica de inoculação em pata de camundongo. Ainda não existe a possibilidade de identificação de resistência à clofazimina através de técnicas de biologia molecular que estejam amplamente disponíveis (SHETTY et al., 2003).

As recomendações para o uso do ofloxacino na hanseníase inicialmente eram para o tratamento com esquemas simplificados de curta duração. Posteriormente, passou-se a utilizá-la em casos de intolerância a qualquer componente da poliquimioterapia tradicional e, atualmente, é uma droga utilizada como substituta às demais em casos de resistência medicamentosa comprovada, sendo considerada pela OMS como droga de “segunda linha” (WHO, 2018).

A maioria dos casos de resistência à ofloxacina em hanseníase está associada a região determinante de resistência à quinolonas (*quinolone resistance-determining region –QRDR*), que determina mutações no interior de um sítio altamente conservado do gene *gyrA* em seu códon ALA91 (CAMBAU et al., 1994).

A real dimensão do problema da resistência medicamentosa em hanseníase é desconhecida, pois mesmo os dados globais são de uma amostra muito pequena, considerando a ocorrência de cerca de 200.000 casos novos diagnosticados por ano. Cambau et al, 2018 analisou globalmente 1932 casos, sendo 1143 casos de recidiva da doença e 789 casos novos, encontrando 8% de resistência medicamentosa a dapsona, rifampicina ou ofloxacino isoladamente ou com a combinação dessas drogas (CAMBAU et al., 2018).

Ademais, um estudo multicêntrico realizado em 25 países, inclusive no Brasil, Benjak et al (2018) identificaram uma vasta gama de mutações associadas à resistência medicamentosa, como aquelas associadas aos genes *ribD* e *fadD9*, além de mutações *nonsense* no gene de reparo de excisão *nth* (*nth excision repair gene*), associadas a vários diferentes polimorfismos de nucleotídeos únicos (*Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs*) (BENJAK et al., 2018).

Há ainda estudos (Reja, 2018), que tratam sobre outro mecanismo de resistência medicamentosa devido à redução genômica do ML que ocorre durante o tratamento

poliquimioterápico através de um mecanismo denominado de “*TCC repeats*”, cuja mensuração da problemática é totalmente desconhecida, vez que também se trata de recente descoberta, cuja análise foi restrita à academia (REJA et al., 2018).

2.2 IMUNOLOGIA DA HANSENÍASE

2.2.1 A imunidade inata

A hanseníase apresenta um atrativo modelo para que sejam exploradas todas as possibilidades conhecidas da intrincada cascata de eventos que ocorrem durante a exposição de um hospedeiro aos patógenos que provocam a doença. Há muito se tenta compreender os elementos que conferem resistência ou susceptibilidade ao desenvolvimento da doença, atravessando-se inicialmente pela susceptibilidade genética, quando até a descoberta do ML era doença considerada de transmissão hereditária (MENKE et al., 2010).

Pensou-se inicialmente em variações da virulência do agente etiológico, contudo, até mesmo após a descoberta do MLM, inicialmente associado à hanseníase de Lúcio, forma clínica completamente anérgica. Esta teoria isoladamente não se sustentou, pois foram identificados pacientes com hanseníase TT infectados pelo MLM. A forma clínica TT é diametralmente oposta a hanseníase de Lúcio em relação à resistência imunológica (HAN, 2017).

A susceptibilidade genética à infecção pelo ML é, portanto, complexa e pode ser influenciada por diversos componentes relacionados aos patógenos, ao hospedeiro e a fatores epigenéticos (Gibbs, Schott et al. 2022). Os principais genes estudados em relação à susceptibilidade à infecção e suas respectivas funções, encontram-se resumidos na tabela 1.

Tabela 1: Principais genes estudados na susceptibilidade à hanseníase

SÍMBOLO OFICIAL	NOME OFICIAL COMPLETO	FUNÇÃO PRINCIPAL
TLR2–TLR1 HETERODIMERS	<i>Toll-like receptors (TLRs)</i>	Mediar a ativação imunológica de células humanas.

HLA-DRB1	<i>Major histocompatibility complex, class II, DRB1.</i>	Apresentação de antígenos extracelulares para células T CD8+.
IL-10 GEN	<i>Gen interleucina-10.</i>	Citocina com propriedades anti-inflamatórias.
PARK2/PACRG SNPS	<i>Parkinson protein 2, E3 ubiquitin protein ligase/Parkin co-regulated gene) Single Nucleotide Polymorphisms.</i>	Proteólise mediada por ubiquitinas.
NOD 2	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2</i>	Receptor intracitoplasmático que desempenha um papel na resposta imune contra lipopolissacarídeos bacterianos intracelulares.
TNF-Alpha	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>	Citocina pró-inflamatória.
RIPK2	<i>Receptor-interacting serine-threonine kinase 2</i>	Integrante da família de interação protéica da serina/teonina proteína-quinases.
JAGGED-1	<i>jagged canonical Notch ligand 1</i>	Participação na diferenciação macrofágica

Admitindo-se a transmissão da hanseníase por via aérea, os primeiros eventos imunológicos relacionam-se à imunidade inata, havendo a participação de determinadas células como as células dendríticas (DCs) e os macrófagos. As DCs reconhecem o ML através dos seus receptores de padrões de superfície (PPRs), internalizando antígenos e promovendo a produção de IFN- γ , que por sua vez induzirá a sua autofagia e apoptose através da fusão de fagolisossomos e lisossomos, promovendo a apresentação destes antígenos às células da linhagem TCD4+ (DANG et al., 2019).

Da mesma maneira que as DCs, os macrófagos derivados dos monócitos (MCDM) reconhecem os PPRs do ML principalmente através dos TLRs e do domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos contendo proteína 2 (NOD2), mediado pelos receptores do complemento CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18) e CR4 (CD11c/CD18). Curiosamente a ativação do IFN- γ inibe a função do receptor do complemento e a fagocitose desta bactéria (SCHLESINGER; HORWITZ, 1991).

Este fato sugere a necessidade de equilíbrio nesses eventos iniciais entre a autofagia promovida pelas DCs e a produção de IFN- γ , para que a ativação dos heterodímeros TLR1/TLR2, superexpressos em pacientes com hanseníase TT, induza a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e a interleucina 12 (IL-12), uma vez que já está bem determinado o papel protetor do IFN- γ e também do fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), que aumentam a expressão de TLR1 em monócitos e DCs, durante a resposta imune adaptativa (KRUTZIK et al., 2003).

Outra hipótese a ser considerada na susceptibilidade à doença, mas que não encontra ainda a elucidação satisfatória, diz respeito ao amplo parasitismo macrofágico detectado nos pacientes com hanseníase virchowiana, tornando essa célula completamente subvertida em sua função primordial. Nos pacientes VVs, a diferenciação macrofágica predominante de macrófagos é do tipo M2 (CD68+CD163+) e M4 (CD68+ MRP8+). Macrófagos M2 e M4 apresentam elevada capacidade fagocitária contribuindo para a reparação tecidual, mas são inefetivos na resposta microbicida necessária à eliminação do ML, contribuindo para a resposta imunossupressora na forma disseminada da doença. Para uma efetiva resposta imune imunoprotetora, é requerida a predominância na diferenciação dos macrófagos para o fenótipo M1 (CD68+CD163-), observada nos pacientes TTs, pois, esta população celular produz TNF-

α , IFN- γ e óxido nítrico sintase (Inos), dando origem a radicais livres capazes de destruir o bacilo. (SIMOES QUARESMA et al., 2012; DE SOUSA et al., 2018).

O processo de diferenciação macrófágica na hanseníase vem sendo cada vez mais explorado. Células endoteliais participam deste processo, quando estimuladas sobretudo pelo IFN- γ via Jagged-1. O miR-34^a-5p controla a expressão de *JAG1* e encontra-se superregulado em pacientes VVs (SALGADO et al., 2018).

Outras importantes vias metabólicas celulares são exploradas na compreensão da imunidade inata da hanseníase. A via antimicrobiana vitamina D-dependente foi bem caracterizada em pacientes TT, contribuindo para o controle da doença. A inibição de dois peptídeos antimicrobianos através do hsa-mir-21, interfere na expressão de TLR2/1 e induz a superexpressão de IL-10, cuja atividade imunossupressora na hanseníase já se encontra bem caracterizada. Zavala et al. (2018) estudaram o papel da vitamina D em pacientes com hanseníase, sugerindo que a mera suplementação é ineficaz para alterar as respostas imunocelulares nos locais da infecção pelo ML, pois a ativação antimicrobiana vitamina D-dependente é inibida nos macrófagos parasitados pelo ML, que tonam-se incapazes de converter a 25D circulante em 1,25D. Desta forma, sugere que além da suplementação, faz-se necessário o manejo simultâneo do sistema metabólico da vitamina D para que possivelmente se alcance o benefício terapêutico esperado, não somente na hanseníase, mas em outras doenças provocadas por micobactérias. (LIU et al., 2012; Zavala et al., 2018).

De grande interesse é o antígeno PGL-1 do ML e o seu papel na imunidade inata. O PGL-1 é um antígeno específico do ML encontrado em sua parede celular, e é considerado o ligante bacteriano que direciona o patógeno para as células preferenciais de seu parasitismo. Este antígeno induz à produção de anticorpos anti-PGL-1, facilmente detectáveis por ELISA nos casos multibacilares e em contatos intradomiciliares, mesmo assintomáticos e, portanto, com grandes chances de desenvolver a doença. Embora de utilidade limitada para diagnóstico de casos precoces de hanseníase, foi identificada uma via imunológica onde há a interação do PGL-1 com o receptor do complemento (CR3) de macrófagos, DCs e neutrófilos polimorfonucleares (PMNs), ativando a tirosina-quinase (Syk) e induzindo a translocação nuclear dependente de calcineurina do fator de transcrição NFATc, que por sua vez aumenta seletivamente a produção de IL-2 por DCs, IL-10 por PMNs e IL-1 β por macrófagos. Este eixo foi definido como CR3-Syk-NFATc. (DOZ-DEBLAUWE; CARRERAS et al., 2019).

Os avanços na compreensão dos mecanismos da imunidade inata são essenciais para que sejam desenvolvidas futuras estratégias de imunoprofilaxia e quimioprofilaxia para a doença.

2.2.2 A imunidade adaptativa

Uma vez vencidas as barreiras da imunidade inata, os linfócitos desempenharão uma função primordial nos desfechos da infecção pelo ML. Para o controle da doença, linfócitos TH1 através da produção de citocinas como a IL-2 e o IFN- γ promoverão a ativação e diferenciação dos macrófagos para o fenótipo M1. Em contrapartida, a atuação de linfócitos TH2 e a produção de citocinas como a IL-4, a IL-5 e a IL-10, oportunizarão a sobrevivência do ML e a evolução da hanseníase para as formas clínicas de doença disseminada (YASMIN et al., 2021).

Após a caracterização dos linfócitos TH17 e a sua efetiva contribuição para o direcionamento da evolução da hanseníase para a forma clínica TT, o interesse nas diversas populações linfocitárias expandiu-se, com as investigações direcionadas aos polos da doença e, consequentemente aos linfócitos promotores de uma resposta imune efetiva ou aos linfócitos com perfil imunossupressor (SAINI et al., 2013; DE ALMEIDA-NETO et al. 2015).

Várias citocinas e vias imunológicas foram descritas como participantes da ativação dos linfócitos TH17 na hanseníase, principalmente a IL-17. A plasticidade dos linfócitos demonstrou que a IL-21 e IL-22 desempenham um importante estímulo para a produção de IL-17, além da IL-23 também se encontrar envolvida nesta diferenciação, tanto em sangue periférico quanto em lesões de pele de pacientes com hanseníase (SHI et al., 2022).

A despeito dessas primeiras verificações dos linfócitos TH17 na hanseníase, recentemente outros autores exploraram estas células nos pacientes reacionais, com interessantes contribuições e demonstrando a atuação dos linfócitos Tregs nesta imunomodulação, sobretudo os linfócitos CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ (Tregs convencionais) (XAVIER et al., 2021; SAINI et al., 2022).

As células Tregs são essenciais para a manutenção da tolerância imunológica periférica (*self-tolerance*) colaborando para a prevenção de doenças autoimunes, incrementando a atividade antitumoral, controlando reações relacionadas à rejeição de transplantes e limitando

a destruição tecidual provocada por doenças inflamatórias crônicas (SHIMIZU et al., 1999; TAKAHASHI et al., 2000; GOIS et al., 2022).

Massone e cols. (2010), demonstraram pela primeira vez que células Tregs convencionais estão presentes nas lesões de pacientes com diferentes formas de hanseníase, sendo preponderantes em reações hansênicas, sobretudo reações hansênicas do tipo 1 (MASSONE et al., 2010).

Posteriormente, Fernandes et al. (2013), verificaram uma maior frequência de linfócitos Tregs convencionais (CD4+) e TCD8+ (CD8+CD25+FOXP3+) em pacientes multibacilares menores de 15 anos estabelecendo uma correlação com aspectos clínicos (número de lesões) e laboratoriais (índice baciloscópico) da doença (FERNANDES et al., 2013).

Reconhecendo-se os efeitos imunológicos antagônicos entre os linfócitos TH17 e as células Tregs, Sadhu et al (2016), verificaram esta interação, encontrando elevada expressão de CD4+CD25(high)FOXP3+ em pacientes DVs e VVs e baixa expressão em pacientes TTs e DTs. O aumento da expressão de células TH17 demonstrou comportamento oposto, encontrando-se elevados em pacientes TTs e DTs e diminuídos em pacientes DVs e VVs. (SADHU, et al. 2016).

A interrupção da estabilidade clínica da hanseníase para os estados reacionais é acompanhada de profundas modificações no perfil imunológico dos pacientes com hanseníase e há muito vêm sendo exploradas. A TR-1 modifica a arquitetura do granuloma epitelióide, com o influxo de linfócitos, sobretudo com um perfil TH1 e TH17, incrementa a produção de várias citocinas como IFN- γ , TNF- α , IL-6 IL-23^a e TGF- β sendo este último, em conjunto com outros fatores, associado ao desenvolvimento de células Tregs periféricas, TH17, TH9 e TFh. Um efeito sinérgico de imunorregulação via TGF- β *versus* IL-6 é verificado tanto na T1-R quanto na TR-2 e demonstra um importante mecanismo a ser considerado para a contribuição no desenvolvimento das reações hansênicas (NAAFS; VAN HEES, 2016, SAINI et al., 2020; SANJABI et al., 2017).

2.2.4 As implicações do receptor CCR5 na patogênese das doenças infecciosas e o seu papel quando expresso em linfócitos Tregs

Os receptores de quimiocinas em seu conjunto, se constituem de uma complexa rede de 23 proteínas de superfície celular que até então reconhecem 50 quimiocinas em células humanas. Reconhecidamente esses receptores são fundamentais para coordenar a migração e o posicionamento celular e já foram estudados em muitas doenças inflamatórias e neoplásicas, bem como na formação de tumores e metástases (VIOLA; LUSTER, 2008).

Este reconhecimento receptor-quimiocina não é exclusivo, havendo receptores que se ligam a múltiplas quimiocinas e vice-versa, resultando sinalizações enviesadas com seletividade funcional entre ligantes, receptores, células e tecidos. Existem diferentes ligantes (no mesmo receptor), diferentes receptores (com o mesmo ligante) ou diferentes tecidos ou células para o mesmo par receptor-ligante. (STEEN et al., 2014).

A expressão do receptor CCR5 vem despertando o interesse em várias doenças, surgindo a partir da infecção pelo HIV quando os pacientes que conviviam com este vírus, por um *CCR5-knockout* geneticamente determinado, demonstravam ser capazes de controlar a progressão da doença, possibilitando o desenvolvimento de drogas que notadamente apresentam a função de inibir este receptor. Essas drogas já vêm sendo experimentadas em outras condições, como o adenocarcinoma pancreático, influenza e COVID-19. (FERRERO et al., 2021; FILES et al. 2022; WANG et al., 2022).

Recentemente, O receptor CCR5 demonstrou desempenhar um importante papel na ativação e diferenciação de células TCD8+, verificado em primatas infectados com o vírus da imunodeficiência dos símios (SIV). Nestes animais, o bloqueio deste receptor reduziu a inflamação, mas prejudicou a resposta à infecção por linfócitos T específicos. Por sua vez, entre outras funções, os linfócitos Tregs são responsáveis pela diferenciação e ativação de linfócitos TCD8+. A partir deste fato, torna-se compreensível que em pessoas vivendo com HIV, a interação entre células TCD8+ e Tregs é influenciada pela capacidade alterada de *homing* dependente de CCR5 de células TCD8 e Tregs (VAN EEKERENI et al., 2022).

Ao longo dos anos, estudos verificaram que o CCR5 é altamente expresso durante a ativação das células TH1 que desempenham um papel crítico nas respostas imunes do hospedeiro contra as doenças provocadas por micobactérias, certos parasitas e fungos (JENKINS et al. 2006; CAMARGO et al., 2009; CHANG et al., 2013).

Na tuberculose, uma das infecções que mais se aproxima do tipo de resposta imunológica em relação à hanseníase, foi demonstrado que o *Mycobacterium tuberculosis* utiliza a sinalização do CCR5 como uma importante estratégia para subverter as respostas

imunes do hospedeiro. Nesta doença, ocorre um aumento da expressão de CCR5 na superfície dos macrófagos, que promove por sua vez um mecanismo regulatório positivo para a produção de IL-10. A IL-10 é associada à regulação negativa da expressão de MHC-II dos macrófagos, juntamente com a regulação positiva da expressão de CCR5 através do envolvimento de STAT-3 criando-se um mecanismo favorável para a subversão das respostas imunes necessárias para a eliminação do patógeno (DAS et al., 2014).

Yurchenko et al. (2006), estudando a leishmaniose, verificaram a importância do receptor CCR5 no trânsito de células CD4+CD25+ para os sítios de infecção. Neste estudo, células CD4+CD25+CCR5^{-/-} promoveram uma resposta imunológica de grande magnitude através da produção de IFN- γ parasita-específico por linfócitos TCD4+. Essa resistência paradoxalmente foi relacionada com uma migração deficiente destas mesmas células CCR5^{-/-} aos locais da infecção, demonstrando que é a expressão ou não de CCR5 pelas próprias células Tregs que determinam o retorno das células CD4+CD25+CCR5^{+/+} aos locais de infecção, promovendo o estabelecimento e a sobrevivência de longo prazo do parasita (YURCHENKO et al., 2006).

A expressão do receptor CCR5⁺ foi estudada em camundongos na paracoccidiodomicose por Moreira et al (2008). Esta doença apresenta uma resposta imunológica também dicotômica cujo adequado controle da infecção depende da formação de granulomas, de forma semelhante à hanseníase. Os autores verificaram que camundongos CCR5^{-/-} eram mais eficientes em controlar o crescimento e a disseminação fúngica em relação aos camundongos CCR5^{+/+} e esse mecanismo era dependente da menor migração de células Tregs aos sítios da infecção, propiciando a formação de granulomas e levando ao controle da infecção (MOREIRA et al., 2008).

Woodward Davis et al. (2020), demonstraram que 65% de linfócitos TCD4+ residentes-teciduals (CD69+) expressam o receptor CCR5 próximos as camadas epiteliais de barreira. Esses linfócitos CCR5^{+/+} não são somente do tipo TH1, mas também TH17 e Tregs. Os resultados encontrados neste estudo, apontam que estes linfócitos TCD4+CD69+ em seu conjunto, necessitam expressar CCR5 para que sejam mantidas como uma população celular estável tanto em tecidos saudáveis como também em tecidos inflamados. Interessantemente este estudo demonstrou também que os linfócitos TH17 são muito mais abundantes nas células TCD4+CD69+ do que nos linfócitos circulantes (TCD4+CD69-), fortalecendo as propriedades de barreira imunológica nas mucosas. (CARVALHO et al. 2018; WOODWARD DAVIS et al., 2019).

Estas importantes descobertas sobre os linfócitos TH1, TH17, Tregs, o receptor CCR5, e as citocinas envolvidas na patogênese de diversas doenças são de grande relevância, principalmente quando a imunidade da mucosa é estudada, considerando que é a principal porta de entrada e também de eliminação do *Mycobacterium leprae* para o meio ambiente, relacionando-se diretamente com a cadeia epidemiológica de transmissão da doença (CARVALHO et al., 2018).

Considerando o importante papel do receptor CCR5 na orquestração da migração de células, sobretudo leucócitos em resposta à inflamação tissular, sabe-se que aquelas que expressam CCR5 são recrutadas aos sítios de inflamação em resposta às quimiocinas CCL3 (MIP-1As), CCL4 (MIP-1 β) e CCL5 (RANTES) (GRIFFITH et al., 2014).

Contudo, a maioria dos trabalhos caracterizam a expressão do receptor CCR5 nas células T efectoras, com poucos estudos que verificaram-no nas células Tregs. Foi demonstrado pela primeira vez, que as células Tregs desprovidas de CCR5 em sua superfície eram menos efetivas na prevenção da mortalidade causada pela doença enxerto *versus* hospedeiro (WYSOCKI et al., 2005).

Para compreender mecanismos de rejeição materno-fetal, Kallikourdis et al. (2007), concluíram que, com base na expressão do receptor CCR5, as células Tregs elas podem ser divididas em uma subpopulação TregsCCR5^{+/+}, altamente supressora, e uma subpopulação TregsCCR5^{-/-}, muito menos supressora, considerando, portanto, as primeiras, como o “braço efector” das células Tregs (KALLIKOURDIS et al., 2007).

Até então, salvo melhor conhecimento deste autor, não existem estudos que avaliem a população TregsCCR5^{+/+} na patogênese da hanseníase. Apenas um trabalho verificou o receptor CCR5 na hanseníase em populações linfocitárias, executado por Mendonça et al (2008), que não encontrou diferenças significativas na expressão de CCR5 nas populações linfocitárias TCD4⁺ e TCD8⁺ em sangue periférico de pacientes com hanseníase (MENDONÇA et al., 2008).

2.2.4 O papel das quimiocinas e seus mecanismos de imunorregulação

O termo quimiocina pode ser compreendido como uma contração de citocina quimiotática. As quimiocinas compreendem pequenas citocinas que são polipeptídios de cerca

de 8 a 12Kd. São subdivididas em quatro famílias fundamentadas na localização e na quantidade de resíduos de cisteína N-terminais. As duas principais famílias são as quimiocinas CC e CXC. Um pequeno número de quimiocinas apresenta uma cisteína única © ou duas cisteínas separadas por aminoácidos (CX3C). Elas são produzidas por leucócitos e várias outras células como fibroblastos, células endoteliais e células de diferentes epitélios (MILLER; MAYO, 2017).

As funções desses polipeptídios são fundamentadas em mecanismos de quimioatração, estimulando a movimentação de clones específicos de leucócitos e regulando a sua migração do sangue para os tecidos (LUSTER, 1998).

Em condições fisiológicas e para a manutenção da homeostase imunológica, existe a expressão de seus receptores pelos linfócitos TH1, TH2, TH17 e Tregs. Linfócitos TH1 preferencialmente expressam os receptores de quimiocinas CXCR3 e CCR5 enquanto linfócitos TH2 expressam CCR3 e CCR8. Linfócitos TH17 e Tregs expressam os receptores CCR4 e CCR7 (WATANABE et al., 2020).

A expressão dos receptores CCR2, CCR3, CCR5 e CXCR4 foi avaliada por citometria de fluxo na superfície de linfócitos de sangue periférico de pacientes com hanseníase e de indivíduos saudáveis. Neste trabalho somente foram observadas diferenças na expressão do receptor CXCR4, que se mostrou baixa nos pacientes com hanseníase, especificamente nos pacientes TTs, sugerindo que este receptor pode desempenhar um papel relevante no controle da infecção. O receptor CXCR4 é o receptor da quimiocina CXCL12/fator 1^a derivado de células estromais (MENDONÇA et al., 2011).

As quimiocinas e seus receptores compõem, portanto, um sofisticado mecanismo de comunicação entre todas as células do organismo, atuantes tanto em respostas fisiológicas quanto em respostas patológicas, sendo estas últimas o principal gatilho que estimula a sua produção. Respostas precoces como a produção de IL-1, TNF- α , presença de lipopolissacarídeos bacterianos e infecções virais promovem tanto o seu surgimento quanto a expressão de seus receptores. (SHARMA, 2010).

As principais famílias de quimiocinas, seus receptores e suas prováveis funções encontram-se resumidas na tabela 2.

Tabela 2: Citocinas humanas, receptores e principais funções descritas

NOME PRINCIPAL	NOME ALTERNATIVO	RECEPTOR	PRINCIPAIS FUNÇÕES DESCRITAS
FAMÍLIA CXC			
CXCL1	GRO α	CXCR2	Recrutamento de neutrófilos
CXCL2	GRO β	CXCR2	Recrutamento de neutrófilos
CXCL3	GRO γ	CXCR2	Recrutamento de neutrófilos
CXCL4	PF4	?	Agregação plaquetária
CXCL5	ENA-78	CXCR2	Recrutamento de neutrófilos
CXCL6	GCP-2	CXCR1, CXCR2	Recrutamento de neutrófilos
CXCL7	NAP-2	CXCR1, CXCR2	Recrutamento de neutrófilos
CXCL8	IL-8	CXCR1, CXCR2	Recrutamento de neutrófilos
CXCL9	Mig	CXCR3	Recrutamento linfócitos T efetores
CXCL10	IP-10	CXCR3	Recrutamento linfócitos T efetores
CXCL11	I-TAC	CXCR3	Recrutamento linfócitos T efetores
CXCL12	SDF-1 α / β	CXCR4	Recrutamento de vários leucócitos / correceptor do HIV
CXCL13, CXCL16	BCA-1	CXCR5, CXCR6	Direcionamento de linfócitos B aos folículos pilosos
CXCL14	BRAK	?	Estímulo à migração de várias células imunes e ação antimicrobiana
CXCL17		GPR35 (?)	Efeito benéfico no prognóstico de algumas neoplasias
FAMÍLIA CCL			
CCL1	I-309	CCR8	Recrutamento de monócitos e migração através de células endoteliais
CCL2	MCP-1	CCR2	Recrutamento de diferentes leucócitos
CCL3	MIP-1As	CCR1, CCR5	Recrutamento de diferentes leucócitos
CCL3LI	MIP-1Ap	CCR1, CCR5	Inibidor de proliferação de células hematopoéticas primitivas
CCL4	MIP-1 β	CCR5	Recrutamento de linfócitos T, células dendríticas, monócitos, células NK e correceptor do HIV
CCL5	RANTES	CCR1, CCR3,	Recrutamento de diferentes leucócitos
CCL7	MCP-3	CCR5	Recrutamento de diferentes leucócitos
CCL8	MCP-2	CCR1, CCR2,	Recrutamento de diferentes leucócitos
CCL11	Eotaxina	CCR3	Recrutamento de eosinófilos, linfócitos TH2 e basófilos
CCL12	?	CCR2, CCR5	
CCL13		CCR3	Recrutamento de diferentes leucócitos
CCL14	MCP-4		Recrutamento de diferentes leucócitos
CCL14	HCC-1	CCR2 (?)	Aumento da proliferação de células progenitoras mielóides CD34 ⁺ . Possui fraca atuação em monócitos
CCL15		CCR1, CCR2	
CCL15	HCC-2	CCR1	Recrutamento de diferentes leucócitos e diferenciação de eosinófilos na leucemia eosinofílica humana
CCL16		CCR1, CCR3	Recrutamento de monócitos e linfócitos
CCL17	HCC-4		Recrutamento de células T e basófilos
CCL17	TARC		Direcionamento de células dendríticas e e linfócitos

CCL18	PARC	CCR1, CCR3	Estímulo à migração de células dendríticas e linfócitos T para zonas
CCL19	MIP-3 β / ELC	CCR4	parafoliculares dos gânglios linfáticos
		?	Inibição da replicação do HIV
CCL20	MIP-3 α	CCR7	Estímulo à migração de células dendríticas e linfócitos T para zonas
CCL21	SLC		parafoliculares dos gânglios linfáticos.
		CCR6	Estímulo à migração de linfócitos TH17
		CCR7	(<i>in mice</i>).
CCL22	MDC		Marcador de macrófagos M2, quimioatração de linfócitos Tregs
			CD4+CD25+FOXP3+, recrutamento de
		CCR4	basófilos
CCL23	MPIF-1		Recrutamento de linfócitos T e monócitos,
			inibição da proliferação de células
		CCR1	progenitoras mielóides e promoção de
CCL24	Eotaxina-2		angiogênese
			Recrutamento de linfócitos TH2,
CCL25	TECK	CCR3	eosinófilos e basófilos
			Quimioatração de macrófagos M1 e
CCL26	Eotaxina-3	CCR9	linfócitos TCD4+
			Recrutamento de linfócitos TH2,
CCL27	CTACK	CCR3	eosinófilos e basófilos
			Manutenção da homeostase em epitélios
		CCR10	de barreira, expresso principalmente em
CCL28	MEC		queratinócitos.
		CCR10	Atividade antimicrobiana contra bactérias
			Gram positivas, Gram negativas e fungos,
			através do recrutamento de linfócitos T e
			B. além de células plasmacitóides
			produtoras de IgA.
FAMÍLIA XC			
XCL1	Linfotactina		
		XCR1	Colabora com a resposta imune citotóxica
			mediada por células dendríticas, além de
			ser expressa no timo, promovendo a
XCL2	SCM-1 β		geração de linfócitos Tregs e a
			manutenção da <i>self-tolerance</i> .
		XCR1	
FAMÍLIA CX3C			
CX3CL1	Fractalquina		As suas funções ainda são exploradas.
			Apresenta efeito protetor na infecção pelo
			<i>Mycobacterium tuberculosis</i> via estímulo
		CX3CR1	da proteína Wag31 (Rv2145c)
			Produzida por neurônios, tem o seu
			receptor nas células da micróglia do
			sistema nervoso central. Já foi constatada
			sua importância como apresentando efeito
			protetor na doença renal crônica. Recruta
			células T, NK e macrófagos e ativa
			linfócitos T citotóxicos e também as

Fontes: SCHULZ-KNAPPE et al., 1996; OTTERSBAACH et al., 2001, KIM et al., 2005, CAO et al., 2008, MIZUKAMI et al., 2008; LEE; KIM, 2010; SHARMA, 2010; LEI; TAKAHAMA, 2012; LU et al., 2016; ARRUDA-SILVA et al., 2017; MOHAN et al., 2017; BINTI MOHD AMIR et al., 2018; KORBECKI et al., 2021, MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ; MONTEAGUDO, 2021; SPINNEN et al., 2021; ZHANG et al., 2021; DAVILA et al., 2022; HAO et al., 2022; PANDUR et al., 2022; TSUJIHANA et al. 2022; WANG et al., 2022.

Existe uma participação ainda pouco explorada das quimiocinas e as suas importantes funções biológicas durante o desenvolvimento da resposta imune nos pacientes com hanseníase. Lew et al (2002) pela primeira vez interessam-se por esses biomarcadores e encontram uma correlação positiva na expressão de CXCL10 com o índice baciloscópio (IB) em pacientes 42ioinformati, com diferenças significantes em relação aos controles (LEW et al., 2002).

Posteriormente, Kirkaldi et al (2003), detiveram-se a analisar a expressão de algumas quimiocinas e seus receptores diretamente nas lesões de pacientes com diferentes formas clínicas de hanseníase. Neste estudo, não encontraram diferenças entre a expressão de CXCL8, CCL2 e CCL5, exceto em pacientes borderline-tuberculóides durante a reação hansênica do tipo 1, os quais apresentaram uma elevação da expressão de CCL2 e CCL5 (KIRKALDY et al., 2003).

A CXCL8 foi explorada na hanseníase, onde os autores verificaram que essa quimiocina desempenha uma importante função, assumindo um papel fundamental no recrutamento de células efectoras em pacientes com hanseníase virchowiana quando na ausência de ativação de IFN- γ e TNF- α (HASAN et al., 2004).

Hasan et al. (2006), observaram elevados níveis séricos de CCL2 e baixos níveis séricos de CCL5 em pacientes VVs, comparando-os com indivíduos com tuberculose pulmonar e indivíduos saudáveis de áreas endêmicas. Os autores infectaram monócitos e posteriormente verificaram a expressão dessas quimiocinas espontaneamente e estimulando as culturas com o próprio *Mycobacterium leprae* (obtido de tatus), o *Mycobacterium tuberculosis* e o bacilo de Calmete-guerin (BCG). A expressão espontânea de CCL2 somente foi verificada após os estímulos utilizados nos pacientes com hanseníase, demonstrando neste trabalho que esta quimiocina desempenhou um importante papel na disseminação da doença (HASAN et al., 2006).

Um interessante estudo que ressalta a importância das quimiocinas na resposta imune protetora para a hanseníase foi conduzido por Mitra et. Al (2009). Os autores utilizaram altas

doses de lepromina, (no Brasil conhecida como antígeno de Mitsuda) com a finalidade de verificarem a indução da resposta imunológica de hipersensibilidade retardada ao estímulo, fundamentando-se na análise nos níveis das quimiocinas para verificarem os níveis de citocinas e quimiocinas em pacientes curados de hanseníase. Em relação às quimiocinas, observaram que nas células gigantes multinucleadas do granuloma formado, houve a expressão de CCL5, CCL3, CXCL9 e do receptor CXCR3 que é um ligante para a quimiocina CXCL10. Este mesmo padrão foi observado em lesões de pacientes com hanseníase TT, sugerindo uma similaridade imunohistopatológica entre pacientes TT e pacientes curados de hanseníase (MITRA et al., 2009).

Ainda em 2009, Stefani et al conduziram um estudo buscando marcadores para a TR-1 e TR-2, identificando a CXCL10 e a IL-17 como potenciais biomarcadores para a ocorrência dos episódios de TR-1 (STEFANI et al., 2009).

Mendonça et al (2007) encontrou CCL3 e CCL11 elevados em pacientes com hanseníase, em comparação com indivíduos saudáveis, e posteriormente (2010) verificou os níveis de CCL8, CCL3, CCL11 e CCL24 no plasma de pacientes com hanseníase antes e após o tratamento, comparando-os com indivíduos saudáveis. Os pacientes antes do tratamento apresentaram elevados níveis de CCL11 e CCL24, com decréscimo na CCL24 após o tratamento, considerando que esta quimiocina pode representar um importante biomarcador para a resposta satisfatória ao tratamento (Mendonça et al., 2007, 2010).

Prosseguindo-se na busca de biomarcadores da infecção pelo ML, foi verificada que a expressão isolada de IFN- γ às respostas imunes contra proteínas específicas do patógeno não foram capazes de distinguir pacientes e contatos em uma área endêmica para a hanseníase. Todavia, a proteína ML2478 demonstrou ser potencialmente antigênica, induzindo à altas concentrações de CCL2, CCL4 e IL-1 β em pacientes de uma área endêmica. Já a expressão de CXCL10 e mesmo de IFN- γ em relação a esta proteína, diferiram entre contatos de áreas com diferentes prevalências de hanseníase (GELUK et al., 2012).

Níveis de expressão de Mrna das quimiocinas CCL17 e CCL18 foram analisados na pele de pacientes com hanseníase, encontrando-se um aumento da expressão dérmica de CCL17 nos pacientes TTs, e de CCL18 em pacientes VVs, fato que suscitou questionamentos por partes dos autores. Até então, a quimiocina CCL17 havia sido associada a polarização da resposta imune para o espectro TH2. Da mesma maneira, a elucidação para a expressão de CCL18 em pacientes VVs foi hipotetizada como possível através de um ciclo de feedback positivo que

estimularia o desenvolvimento de células voltadas para o fenômeno de tolerância imunológica (BERRINGTON et al., 2014).

As quimiocinas CXCL10 e CCL2 em estudo que envolveu pacientes com hanseníase neural primária, se mostraram relevantes, com maior expressão em relação a indivíduos saudáveis. Adicionalmente, a expressão de CCL2 demonstrou importante correlação com a fibrose do sistema nervoso periférico, que é responsável pelo desenvolvimento das incapacidades (MEDEIROS et al., 2015).

A expressão do gene i-NOS, CXCL10 e seu receptor CXCR3 foi avaliada como preditor da TR-1. Neste trabalho, os autores verificaram que em pacientes DTs, DDs, e DVs havia uma maior expressão de CXCL10, contudo, apenas em pacientes BTs a expressão do CXCR3 demonstrou o potencial para vir a ser um biomarcador imunohistoquímico capaz de prever e controlar a RH-1 (SHARMA et al., 2015).

A avaliação do risco de adoecimento entre os contatos de pacientes com hanseníase é uma importante estratégia para o controle da doença. Queiroz et al (2020), em uma coorte prospectiva, observaram um aumento nos níveis sorológicos de CCL2, encontrando uma associação e uma correlação negativa entre CCL2 e IFN- γ , sugerindo que estes dois fatores analisados em conjunto, podem se tornar importantes biomarcadores para infecção subclínica nos contatos intradomiciliares de hanseníase (QUEIROZ et al., 2021).

A redução do índice baciloscópico (IB) é um importante parâmetro a ser considerado na avaliação da resposta ao tratamento com a PQT. Recentemente, um estudo observou o decréscimo na produção de IFN- γ e CXCL10 nos macrófagos de lesões da pele de pacientes multibacilares após a conclusão de 12 doses do tratamento com a PQT. Contudo, os níveis séricos de CXCL10 foram significativamente aumentados nos pacientes que apresentaram redução no IB após o tratamento, enquanto que naqueles pacientes sem redução do IB, os níveis séricos de CXCL10 foram significativamente menores, sugerindo que a esta quimiocina também pode ser um relevante biomarcador para a resposta ao tratamento (FERREIRA et al., 2021).

3 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A realidade epidemiológica do Brasil em relação à hanseníase demonstra que a doença se encontra muito distante de atingir o patamar de doença “eliminada” como problema de saúde pública. Nos países que atingiram à meta proposta pela OMS os dados epidemiológicos demonstram que a transmissão continua, com a doença ressurgindo lentamente. Estudos de busca ativa de casos encontram até seis vezes mais casos do que seriam esperados com base nos dados relatados (BARRETO et al., 2012).

Acrescente-se a contínua perda do conhecimento aprofundado da hanseníase, problema que se inicia na formação acadêmica dos profissionais de saúde e se reflete no campo de atuação, quando a necessidade de descentralização de diagnósticos culmina por não atingir os objetivos esperados, seguindo-se a uma curva decrescente na detecção de casos novos da doença, mas que mantém a estabilidade no número total de casos verificado nas coortes desde a implantação da poliquimioterapia (OMS, 2021).

As estratégias para prevenção da transmissão da hanseníase são ainda bastante limitadas, representadas pelo provisionamento da poliquimioterapia para os pacientes diagnosticados ou a quimioprofilaxia pós-exposição, que no Brasil é representada pela aplicação da vacina BCG, e em alguns países, de acordo com recomendações da OMS vem sendo empregada mediante a tomada de uma única dose de rifampicina, com resultados contraditórios. Há ainda alguns estudos em andamento na Índia com a utilização da vacina *Mycobacterium indicus pranii* (MiP) e o desenvolvimento de uma nova vacina nos Estados Unidos da América chamada LepVax, que se encontra na fase 1 de escalonamento para otimização da dose antigênica (SCHOENMAKERS et al., 2020).

Todas as possibilidades de profilaxia e interrupção da cadeia de transmissão dependem do aprofundamento no conhecimento da imunologia da hanseníase. A produção de citocinas, quimiocinas e a estimulação das populações linfocitárias são os marcadores imunológicos que definem ou não a eficácia das táticas utilizadas até o momento.

Dessa forma a compreensão do comportamento desses biomarcadores nos pacientes com hanseníase torna-se fundamental para que sejam ampliadas as possibilidades de imunoprofilaxia, quimioprofilaxia, controle e tratamento da infecção bem como a avaliação do uso de novas drogas e esquemas terapêuticos.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a frequência de células TH17, de linfócitos TregsCCR5^{-/-}, de linfócitos TregsCCR5^{+/+} e a expressão das quimiocinas CCL2, CCL5 CXCL8, CXCL9 e CXCL10 entre as formas clínicas e/ou operacionais de pacientes com hanseníase sem reações hansênicas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Verificar a frequência de células TH17 (CD4⁺IFN- γ ^{-/-}IL-17^{+/+}), TregsCCR5^{-/-} (CD4⁺CD25⁺FOXP3CCR5^{-/-}) e TregsCCR5^{-/-} (CD4⁺CD25⁺FOXP3CCR5^{-/-}) em pacientes diagnosticados com hanseníase, sem reações hansênicas e sem tratamento, comparando os resultados com as formas clínicas espectrais e/ou operacionais (TT e VV) da doença.
- Verificar a expressão das quimiocinas CCL2, CCL5 CXCL-8 CXCL9 e CXCL10 em pacientes diagnosticados com hanseníase, sem reações hansênicas e sem tratamento, comparando os resultados com a classificação clínica e operacional da doença.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 DESENHO DO ESTUDO

O presente estudo trata-se de um estudo observacional do tipo transversal com análise exploratória.

5.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Os pacientes participantes deste estudo foram oriundo do Centro Municipal de Referência secundária em Hanseníase Amélia de Pontes, localizado na cidade de Caruaru – PE. O local é um tradicional ambulatório de Dermatologia Sanitária e de Infectologia, que acolhe pacientes com hanseníase por demanda espontânea e também referenciados a partir das unidades de atenção primária e especializada à saúde. Os casos de difícil condução clínica ou oriundos de áreas descobertas de assistência primária, permanecem em acompanhamento neste serviço até a alta por cura. Os demais casos são contra-referenciados à unidade de atenção primária de origem, permanecendo em acompanhamento compartilhado. É de responsabilidade das equipes de atenção primária o monitoramento pós alta, bem como a investigação dos contatos intradomiciliares por ocasião do diagnóstico. O diagnóstico é realizado obedecendo a critérios clínicos com o apoio da baciloscopia do raspado intradérmico que também é realizada neste local.

Os pacientes foram classificados clinicamente de acordo com a classificação de Madrid com as formas I, TT, DD e VV e operacionalmente de acordo com os a OMS em paucibacilares e multibacilares (tabela 3). Entre os anos de 2017 a 2019 foram coletadas amostras sanguíneas de 33 pacientes diagnosticados com hanseníase, cuja estratificação encontra-se definida na tabela 4. As amostras sanguíneas e as análises estatísticas foram processadas no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) localizado no Campus Universitário da Universidade Federal de Pernambuco.

Tabela 3: Classificação clínica (Madrid) e operacional (OMS) para hanseníase.

Conceito	Categorias
Forma clínica de hanseníase:	Indeterminada: (I): pacientes apresentando lesão hipocrômica de bordos mal definidos e alteração de sensibilidade ou área cutânea sem mancha, com ou sem rarefação pilosa e alteração de sensibilidade.
Apresentação clínica da doença de acordo com a classificação de Madrid.	Tuberculóides (TT): pacientes apresentando até 5 lesões dermatológicas de bordos infiltrados e bem circunscritas, com alteração de sensibilidade, com ou sem envolvimento neurológico periférico. Dimorfo (DD): pacientes apresentando lesões foveolares disseminadas pelo tegumento com alteração de sensibilidade, com ou sem envolvimento neurológico periférico clinicamente evidenciável. Virchowiana (VV): Pacientes apresentando um ou mais dos seguintes sintomas: infiltração de pavilhões auriculares, áreas de infiltração cutânea, hansenomas disseminados com ou sem sintomatologia pertinente ao comprometimento neurológico periférico.
Classificação operacional da hanseníase de acordo com a OMS	Paucibacilares: casos com até 5 lesões de pele e baciloscopia negativa Multibacilares: casos com mais de 5 lesões de pele e/ou baciloscopia positiva ou negativa e/ou comprometimento de pelo menos um tronco nervoso periférico.

Tabela 4: Categorização dos grupos de pacientes diagnosticados com hanseníase no período elencado para este estudo.

Forma clínica de hanseníase	Número de indivíduos	Idade Media/min-max	Gênero	Classificação operacional
Tuberculoide	13	29,1 / 6-70	8 femininos / 4 masculinos	Paucibacilar

Dimorfa	12	46,25 / 25-83	7 femininos / 5 masculinos	Multibacilar
Virchowiana	8	47,8 / 23-75	3 femininos / 5 masculinos	Multibacilar

5.2.1 Critérios de inclusão

- Casos novos de hanseníase em qualquer forma de classificação clínica espectral levando-se em consideração a classificação de Madrid, sem reações hansênicas, sem tratamento e operacionalmente classificados como paucibacilares ou multibacilares.

5.2.2 Critérios de exclusão

- Casos novos de hanseníase que apresentaram no momento do diagnóstico quaisquer coinfeções ou doenças de natureza autoimune.
- Casos novos de hanseníase que desenvolveram reações hansênicas antes do diagnóstico.
- Recidivas de hanseníase.

5.3 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente projeto foi aprovado após análise do comitê de ética da Universidade Federal de Pernambuco através da emissão do parecer consubstanciado de número 879.625. Todos os pacientes envolvidos neste estudo foram voluntários e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

5.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.4.1 Coleta e cultura de sangue periférico

Foram coletados 10ml de sangue de 33 pacientes mediante punção de veia periférica cefálica ou basílica em prega flexural de um dos antebraços utilizando-se de “butterfly” (escalpe) ou suporte de coleta para tubos “Vacutainer®”. As culturas de sangue periférico foram realizadas em tubos de polipropileno de 14 ml (BD System™). Foram utilizados 500µl de sangue total em 1 ml de meio RPMI 1640 com glutamina (2Mm), gentamicina 50mg/ml (Sigma), 10Mm HEPES (Sigma) e 10% soro fetal bovino (Cultilab). As células do sangue periférico foram estimuladas separadamente com 10 µg/ml de Fitohemaglutinina (PHA) (GIBCO™/ Invitrogen Corporation) e BCG (1µg/ml), na presença de 0,5µl de BD GolgiStop Protein Transpor Inhibitor (BD bioscience) nas últimas 5 horas de incubação. Os tubos foram incubados a 37°C, 5% CO₂ por 24 horas. Os sobrenadantes das culturas foram coletados, centrifugados a 300 x g por 5 minutos, aliquotados e congelados para posterior determinação de quimiocinas por citometria de fluxo com o uso do Cytometric Bead Array – CBA. As suspensões celulares foram utilizadas para determinação dos linfócitos TH17, Tregs e TregsCCR5^{+/+}.

5.4.2 Detecção das células Tregs e TH17

As suspensões celulares foram lavadas com 8 ml PBS-BSA 0,5% (tampão fosfato Ph 7,2 com soro albumina bovina) à 300 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado, deixando um volume de aproximadamente 500µl. Foram retirados 100µl do sangue (suspensão celular) e colocados em tubos de poliestireno (5ml) (tubos falcon BD System™ N°352059) e acrescentados 2ml de Solução de Lise (BD FACS™ Lysing Solution Catalog No. 349202), sob agitação em Vortex, a suspensão foi incubada ao abrigo da luz, por 5 minutos, à temperatura ambiente. Para bloquear a reação adicionou-se 1 ml de PBS-BSA 0,5%. As suspensões foram centrifugadas a 300 x g por 5 minutos. As células lisadas foram lavadas duas vezes com 2ml de PBS-BSA 0,5% à 300 x g por 5 minutos e em seguida, fixadas com 500µl de BD Cytofix™(BD Catálogo N° 554655) por 20 minutos e em seguida lavadas duas vezes com PBS-BSA 0,5%. As células fixadas foram permeabilizadas em 1ml de BD Perm/Wash™ (BD Catálogo N° 554723) e incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugadas à 300 x g por 10 minutos, removendo-se o sobrenadante. As suspensões celulares foram marcadas com os anticorpos monoclonais específicos (CD4 PERCP, CD25 APC, FOXP3 PE, CCR5 FITC, CD4 APC, FOXP3 PE, CD4 PE-CY5.5, IL17A PE, IFN GAMA FITC) por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após

coloração as suspensões foram lavadas duas vezes com 1ml de BD Perm/Wash™ e centrifugadas à 300 x g por 10 minutos. As células foram ressuspensas com 400ml de BD Cytotfix™.

As amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo (FACScalibur, BD Pharmingen™). A aquisição e análise das amostras foram realizadas no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT)/ IAM/FIOCRUZ. A população de linfócitos foi selecionada utilizando o dot plot FSC versus SSC, sendo adquirido 10000 eventos dentro da janela de interesse (R1), onde as subpopulações de linfócitos T e as citocinas intracitoplasmáticas foram analisadas pela obtenção de gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência. Para realizar a análise da expressão de IL17 em células CD4+IFN γ ^{-/-} (Células TH17) foi selecionada a janela de interesse R3 no gráfico FL3 versus FL1. Para avaliação das CD4+CD25+FOXP3+CCR5^{+/+} foi selecionada a janela de interesse R4 para CD4+CD25+FOXP3+ no gráfico FL2 versus FL3 e para marcação de CCR5^{+/+} foi selecionada a janela de interesse R5 no gráfico FL4 versus FL3 e o percentual de células foi avaliado (figura 4).

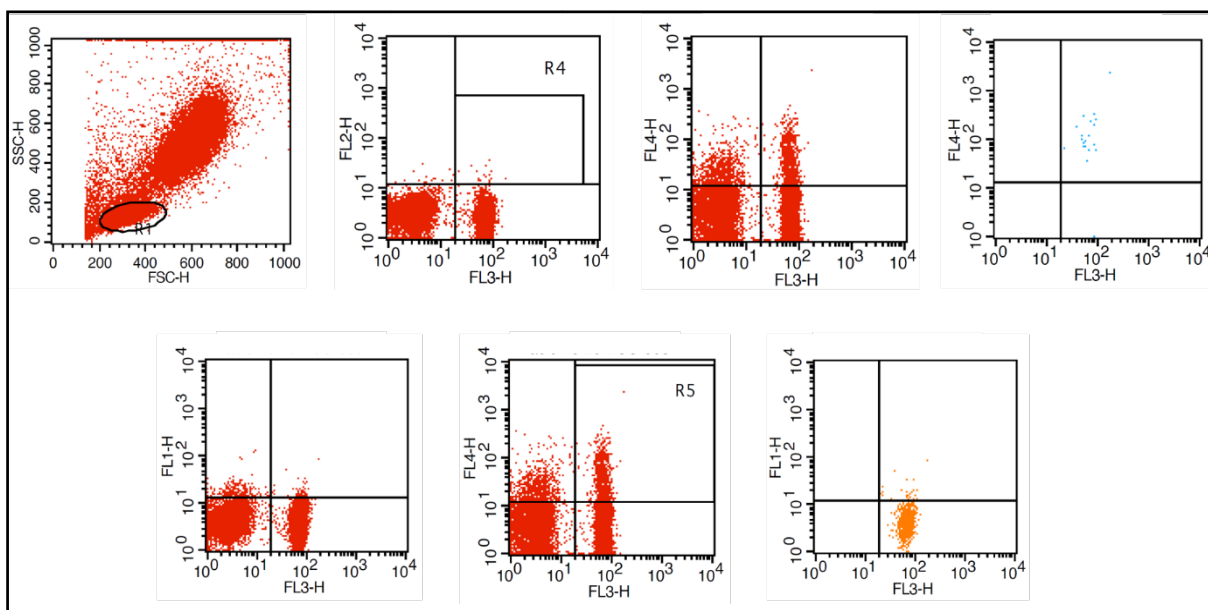


Figura 5 : Gráfico dot plot representativo da aquisição de linfócitos no FACScalibur™.

5.4.3 Determinação de quimiocinas por citometria de fluxo (Cytometric Bead Array – CBA)

Os sobrenadantes das culturas celulares foram identificados para posterior dosagem das quimiocinas, utilizando-se o kit *Human Chemokine* CXCL8, CXCL9, CXCL10, CCL2 e CCL5 (BD Pharmigen™, CA, USA). Cinco esferas de poliestireno, com diferentes intensidades de fluorescência foram recobertas com os anticorpos específicos para as quimiocinas humanas detectadas no canal FL-4. Posteriormente, 50 µl da mistura de esferas de captura, marcadas com os anticorpos anti- CCL2, anti- CCL5, anti- CXCL8/IL-8, anti- CXCL9 e anti- CXCL10 foram adicionadas em tubos devidamente identificados. Em seguida adicionou-se 50 µl do sobrenadante e do reagente *Human Chemokine PE Detection* marcado com ficoeritrina (PE). As amostras foram incubadas por 3 horas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após as incubações, adicionou-se 1ml da solução de lavagem, procedendo-se a centrifugação por 10 minutos a 300 x g. O sobrenadante foi desprezado. As amostras foram ressuspensas com 300µl da solução tampão de lavagem para posterior leitura no citômetro de fluxo. Para a detecção de CXCL10 e CCL2, as amostras foram diluídas na proporção de 1:10 e 1:4, respectivamente, conforme orientação do fabricante (BD Pharmigen™, CA, USA). As análises foram realizadas através do Software FCAP Array versão 3.01 (Becton Dickson). Os limites de detecção do CBA Human Chemokine são: CXCL8 (0,2 pg/ml), CCL5 (1 pg/ml), CXCL9 (2,5 pg/ml), CCL2 (2,7 pg/ml), CXCL10 (2,8 pg/ml). A aquisição e análise das amostras foram realizadas no núcleo de Plataforma Tecnológica (NPT) do IAM/Fiocruz, utilizando o citômetro de fluxo FACScalibur™ E20200030, BD Pharmingen® (BD Biosciences®) com o emprego do software CellQuestPro® e Software FCAP Array versão 3.01 (Becton Dickson). O software avalia o tamanho (Forward Scatter-FSC) e granulosidade das células (Side Scatter-SSC), além da fluorescência tipo 2 (FL2) e tipo 4 (FL4).

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram codificados e a análise estatística foi realizada através do software GraphPad PRISM 9.4.0.0® (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Na avaliação da frequência de linfócitos, TH17, TregsCCR5^{-/-} e TregsCCR5^{+/+} foi realizada análise de variância ANOVA e diante da heterogeneidade das amostras foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunns. Na avaliação da expressão das quimiocinas foi realizada análise de variância ANOVA seguida do teste de Tukey para verificar as diferenças entre os grupos. Os achados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 ARTIGO 1: THE EXPRESSION OF TH17 CELLS, T REGULATORY CELLS CCR5^{-/-}, AND T REGULATORY CELLS CCR5^{+/+} IN THE POLAR CLINICAL-IMMUNOLOGICAL SPECTRUM OF LEPROSY

Abstract

Leprosy is a disease characterized by antagonistic immune responses that, involving different cell populations, direct patients to poles of higher and lower resistance to infection. Tregs lymphocytes play an important immunosuppressive role in the course of the disease. The expression of the CCR5 receptor by Tregs lymphocytes represent a critical factor in the outcome of several diseases. We investigated the expression of TH17 lymphocytes, conventional Treg lymphocytes (CD4+CD25+FOXP3+CCR5^{-/-}) and CCR5^{+/+} Treg lymphocytes (CD4+CD25+FOXP3+CCR5^{+/+}) among patients with tuberculoid and lepromatous clinical forms of Hansen's disease. Two different stimuli (phytohemagglutinin and Calmette Guerin Bacillus) were used in the cells cultures. The cells were labelled for immunophenotyping and analyzed by flow cytometry. Tuberculoids patients present more TH17 lymphocytes with PHA (0.24 ± 0.1 %cells) and BCG (0.3 ± 0.1 %cells) stimuli, showed significant differences between the two groups studied. Conventional Tregs cells were present without significant differences, while lepromatous patients presents more CD4+CD25+FOXP3+CCR5^{+/+} with PHA (0.632 ± 0.38 %cells) or BCG (0.335 ± 0.14 %cells) stimuli. These results suggest that the identification of Tregs cells that express the CCR5 receptor is in fact that contribute to the immunosuppression provided by this lymphocytic subpopulation in patients with lepromatous leprosy, as well as that there is a need of balance this TregsCCR5^{+/+} and TH17 cells in order to maintain clinical stability of patients with leprosy.

Keywords: leprosy; CCR5 receptor; TH17 cells; Tregs cells.

1 Introduction

Some diseases whose clinical manifestations depend on immunological responses that are completely dichotomous to each other, due to the heterogeneity and plasticity in the differentiation of T cells, among which leprosy, allow to expand the knowledge about various processes that make up parts of the intricate and delicate puzzles of the system human immune system. In these pathologies, there is the participation of different phenotypes of cell populations, especially TCD4 lymphocytes, which include effector cells (T-helper), innate lymphoid cells (Ilcs), and regulatory T cells (Tregs). Tregs are recognized among other aspects through the expression of specific lineage genes that encode effector cytokines, cell surface markers, and key transcription factors [1, 2].

Leprosy is an infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* (ML) and *Mycobacterium lepromatosis*, which remains hyperendemic in countries such as India, Brazil and Indonesia, with an estimate of more than 200.000 cases diagnosed annually. The definition of the clinical evolution of leprosy is immunologically mediated, with the predominance in the development of immune responses predominantly TH1 in paucibacillary clinical forms and predominantly TH2 responses in multibacillary clinical forms. Several cell populations have been studied to help understand these immunological mechanisms, including TH17 and Treg cells [3, 4, 5].

TH17 lymphocytes actively participate in the immunology of leprosy, being predominant in the paucibacillary forms of the disease, as well as having their expression increased in type 1 and 2 leprosy reactions. To date, conventional Tregs cells are referenced with greater expression in lepromatous patients, mainly due to the production of TGF- β in lepromatous leprosy as compared to tuberculoid leprosy. Furthermore, Tregs cells promote

negative regulation in patients with type 1 leprosy reaction due to the synergistic effect of TGF- β and IL-6 [6, 7, 8, 9].

CCR5 is a G protein-coupled receptor (GPCR) that, together with its ligands, plays a role in different pathological conditions, highlighting its well-known role in HIV infection. Individuals carrying the CCR5 Δ 32 mutation are warranted a natural barrier to HIV-1 infection. When CCR5 is expressed by Tregs cells, it promotes an increase in suppressive activity demonstrated in autoimmune conditions such as psoriasis, neoplastic such as squamous cell carcinoma, inflammatory ones like atherosclerosis, and infectious ones such as Chagas disease and cutaneous leishmaniasis [10-14].

All these studies demonstrate the importance of CCR5 receptor expression in the outcome of several diseases, making their investigation important in a neglected disease such as leprosy. This study investigated for the first time the differences between the expression of TH17 cells, Tregs cells, and CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺CCR5^{+/+} (TregsCCR5^{+/+}) in patients with tuberculoid leprosy (T-lep) and lepromatous leprosy (L-lep), without leprosy reactions.

2 Methods

Patients were selected at the Amélia Pontes Health Centre, located in Caruaru municipality, Pernambuco, Brazil, a well-recognized leprology centre). In the period established for blood sample collections, 25 patients arrived at this leprology centre, and all agreed to participate in this study. Twenty patients had L-lep, and five patients had T-lep. The clinical form was considered the clinical occurrence of the disease in diagnosed individuals, according to the classification of Madrid (1953). All patients diagnosed with leprosy in this period were without complications or comorbidities that could interfere with the expected evolution of the disease. The procedures followed the ethical standards set by the committee responsible for human experimentation at the Federal University of Pernambuco, 466/2012

Brazilian ethical resolution, and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983. All persons involved in this study signed a disclosed consent form.

2.1 Collection of samples and culture of peripheral blood

A 10ml blood sample was collected from 25 patients. Peripheral blood cultures will be performed in 14ml polypropylene tubes (BD System™). 500µl of whole blood was used in 1 ml of RPMI 1640 medium with glutamine (2Mm), 50mg/ml gentamicin (Sigma®), 10Mm HEPES (Sigma®), and 10% fetal bovine serum (Cultilab®). Peripheral blood cells were stimulated separately with Phytohemagglutinin (PHA) (GIBCO™/Invitrogen Corporation®) (10µg/ml) and BCG (1µg/ml) in the presence of 0.5µl of BD GolgiStop Protein Transpose Inhibitor (BD Biosciences™) in the last 5 hours. Since 1993, BCG has been a recognized stimulus for assays that assess leprosy immune responses, being more potent than ML itself [15]. The tubes were incubated at 37°C, with 5% CO₂ for 24 hours.

2.2 Analysis of TH17, Tregs and CCR5 expression by flow cytometry

Cell suspensions were washed with 8 ml PBS-0.5% BSA (phosphate buffer Ph 7.2 with bovine serum albumin) at 300 x g for 10 minutes at room temperature. The supernatant was discarded, leaving a volume of approximately 500µl. 100µl of blood (cell suspension) was removed and placed in polystyrene tubes (5ml) (falcon tubes BD System™ N° 352059) and 2ml of Lysis Solution (BD FACS™ Lysing Solution Catalog No. 349202) was added, under Vortex agitation, to lyse the red blood cells the suspension was incubated in the dark for 5 minutes at room temperature. To block the reaction, 1 ml of 0.5% PBS-BSA was added. The suspensions were centrifuged at 300 x g for 5 minutes. Cells were washed twice with 2ml of 0.5% PBS-BSA at 300 x g for 5 minutes and then fixed with 500µl of BD Cytofix™ (BD Catalog No. 554655) for 20 minutes and then washed twice with 0.5% PBS-BSA. Fixed cells were permeabilized in 1ml of BD Perm/Wash™ (BD Catalog No. 554723), incubated at room

temperature for 15 minutes, and centrifuged at 300 x g for 10 minutes, removing the supernatant. After staining, the suspensions were washed twice with 1ml of BD Perm/Wash™ and centrifuged at 300 x g for 10 minutes. Cells were resuspended with 400µl of BD Cytofix™. Cell suspensions were labelled with specific monoclonal antibodies (CD4 PERCP, CD25 APC, FOXP3 PE, CCR5 FITC, CD4 APC, FOXP3 PE, CD4 PE-CY5.5, IL17A PE, and IFN GAMMA FITC) for 30 minutes at room temperature and under the light. After staining, the suspensions were washed twice with 1ml of BD Perm/Wash™ and centrifuged at 300 x g for 10 minutes. Cells were resuspended with 400µl of BD Cytofix™. Samples were analysed on a flow cytometer (FACScalibur, BD Pharmingen). The acquisition and analysis of samples were performed at the Nucleus of Technological Platforms (NPT)/ IAM/FIOCRUZ. The lymphocyte population was selected using the FSC versus SSC dot plot, and 10000 events were acquired within the window of interest (R1), where T lymphocyte subpopulations and intracytoplasmic cytokines were analysed by obtaining two-dimensional graphs of point distribution of fluorescence. To perform the analysis of IL17 expression in CD4+IFN γ -/- cells (TH17 cells), the R3 window of interest was selected in the FL3 versus FL1 graph. To evaluate CD4+CD25+FOXP3+CCR5^{+/+}, the window of interest R4 was selected for CD4+CD25+FOXP3+ in the FL2 versus FL3 graph and for CCR5^{+/+} to inform, the R5 window of interest in the FL4 versus FL3 graph and the percentage of cells was evaluated (fig. 1).

Fig.1 here

3 Statistical analysis

The data of expression of CCR5 and cellular immunophenotyping were performed via the software GraphPad PRISM 9.0 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA 92037 USA). Analysis of variance (ANOVA), Kruskal–Wallis test followed by the Dunns test was performed and assigned the heterogeneity of the samples. $P < 0.05$ was considered significant.

4 Results

The frequency of TH17 were higher in T-Lep patients with both stimuli, BCG ($0,8 \pm 0,3$ %cells) and PHA ($1,67 \pm 0,6$ %cells), in comparison with L-Lep patients BCG ($0,3 \pm 0,1$ %cells) and PHA ($0,24 \pm 0,1$ %cells), corroborating previous results of this research group [5].

The results show no significant difference in the frequency of Tregs cells with both stimuli between L-Lep and T-Lep patients. However, L-Lep patients present more TregsCCR5^{+/+} when stimulated with PHA ($0,632 \pm 0,38$ %cells) or BCG ($0,335 \pm 0,14$ %cells) than T-Lep patients stimulated with PHA ($0,31 \pm 0,1$ %cells) or BCG ($0,18 \pm 0,07$ %cells). (fig.1).

(Fig. 2 here)

5 Discussion

The characterization of lymphocytic subpopulations, as well as the knowledge about their surface receptors, demonstrate the need to expand on the knowledge acquired so far about the pathogenesis of the most diverse conditions. The TH1/TH2 dichotomy of inflammatory responses in diseases such as leprosy needs to be reviewed and expanded. Since the recognition of TH17 cells, the understanding of these aspects has undergone profound changes [16].

Few studies have investigated the frequency of these cells in leprosy in patients without leprosy reactions. Saini et al. (2013) demonstrated the presence of TH17 lymphocytes in leprosy patients without defined TH1/TH2 polarization (TH0; IFN- γ +IL-4+). Subsequently, we demonstrated that they are present throughout the clinical spectrum of patients with leprosy, especially in paucibacillary clinical forms, in addition to verifying that after the beginning of treatment, there is also a tendency to increase their expression in L-lep patients, suggesting which are also associated with the process of immune cell restoration in patients with disseminated disease. This study corroborated these previous results, demonstrating once again

that TH17 lymphocytes are expressed with a significantly different frequency between T-lep patients and L-lep patients. [6, 17].

Recognizing the antagonistic immunological effects between TH17 lymphocytes and Treg cells, Sadhu et al (2016) verified this interaction, finding high expression of CD4⁺CD25(high)FOXP3⁺ in DVs and VVs patients and low expression in TTs and TDs. The increase in the expression of TH17 cells. This fact showed this opposite behaviour, being elevated in TTs and DTs patients and decreased in DVs and VVs patients [18].

The activation, differentiation and plasticity of lymphocytic subpopulations is one of the factors that need to be better elucidated, because, as already exhaustively demonstrated, the mere expression of a surface receptor in effector lymphocytes or Tregs, considerably modifies its role in the outcomes of the most diverse illnesses. The protocols described in the literature for its recognition are very different, but little by little, they add pieces to this puzzle, despite showing discordant results. [19].

Unless these authors know better, the expression of the CCR5 receptor by Treg lymphocytes has never been verified in patients with leprosy. TregsCCR5^{+/+} were called the “effector arm” of this cell population, being implicated in the immune responses concerning maternal-infant rejection. In infections such as leishmaniasis and 59ioinformatics59mycosis, TregsCCR5^{+/+} was also found to provide a 59ioinforma immune response for the survival of pathogens [20, 21, 22, 23].

In a disease such as leprosy, which presents similar immune responses, our results are in agreement with these studies, demonstrating a higher expression of TregsCCR5^{+/+} lymphocytes in L-Lep patients when compared to T-Lep patients. Surprisingly, conventional Treg lymphocytes did not show any difference between the poles of the disease, suggesting that it is only when they express the CCR5 receptor that these differences can be established.

6 Conclusion

Conventional Treg lymphocytes showed no differences in their expression in the T-Lep and L-Lep poles of leprosy patients. However, TH17 cells are more expressed in T-lep patients and Tregs CCR5+/+ cells are more expressed in L-lep patients. Considering the need for a dynamic balance between various lymphocyte subpopulations, this brief report suggests the need for expansion in the phenotypic analysis of Treg lymphocytes so that the clinical stability and outcome of patients with leprosy can be better understood.

Data availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Author's contributions

FBAN and BCCS conceived the study; VMAC and VMOS designed the study protocol; FBAN and BCCS carried out the clinical assessment; VMAC, CBSO and VMBL carried out the immunoassays, Immunophenotyping determination and flow cytometry. VACM and FBAN carried out analysis and interpretation of these data. FBAN and PDAS drafted the manuscript; VMAC and PDAS critically revised the manuscript for intellectual content. All authors read and approved the final manuscript. FBAN and VMAC are guarantors of the paper.

Acknowledgments

We acknowledge Dr. Fred Nietto (Ph.D) for contribution to the translation of this manuscript.

Funding statements

This work was supported by Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação (PROPESQI-UFPE); Pró-Reitoria de Pós-Graduação (PROPG-UFPE); Programa de Apoio à Pós-Graduação (PROAP-UFPE) of the Pernambuco's Federal University, and, in part by Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Finance Code 001), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Declaration of competing interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

1. Zhu J. T Helper Cell Differentiation, Heterogeneity, and Plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2018;10(10):a030338.
2. Fang D, Zhu J. Dynamic balance between master transcription factors determines the fates and functions of CD4 T cell and innate lymphoid cell subsets. *J Exp Med* 2017;214(7):1861-1876.
3. Blok DJ, De Vlas SJ, Richardus JH. Global elimination of leprosy by 2020: are we on track? *Parasit Vectors* 2015;8:548.
4. Saini C, Tarique M, Rai R, Siddiqui A, Khanna N, Sharma A. T helper cells in leprosy: An update. *Immunol Lett* 2017;184:61-66.
5. Parente JN, Talhari C, Schettini AP, Massone C. T regulatory cells (TREG)(TCD4+CD25+FOXP3+) distribution in the different clinical forms of leprosy and reactional states. *An Bras Dermatol* 2015;90(1):41-47.
6. de Almeida-Neto FB, Assis Costa VM, Oliveira-Filho AF, et al. TH17 cells, interleukin-17 and interferon- γ in patients and households contacts of leprosy with multibacillary and paucibacillary forms before and after the start of chemotherapy treatment. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015;29(7):1354-1361.
7. Costa MB, Hungria EM, Freitas AA, et al. In situ T regulatory cells and Th17 cytokines in paired samples of leprosy type 1 and type 2 reactions. *PloS One*. 2018;13(6):e0196853.

8. Palermo ML, Pagliari C, Trindade MA, et al. Increased expression of regulatory T cells and down-regulatory molecules in lepromatous leprosy. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;86(5):878-883.
9. Saini C, Siddiqui A, Ramesh V, Nath I. Leprosy Reactions Show Increased Th17 Cell Activity and Reduced FOXP3⁺ Tregs with Concomitant Decrease in TGF- β and Increase in IL-6. *PloS Negl Trop Dis.* 2016;10(4):e0004592.
10. Soler DC, Sugiyama H, Young AB, Massari JV, McCormick TS, Cooper KD. Psoriasis patients exhibit impairment of the high potency CCR5(+) T regulatory cell subset. *Clin Immunol* 2013;149(1):111-118.
11. de Oliveira CE, Gasparoto TH, Pinheiro CR, et al. CCR5-Dependent Homing of T Regulatory Cells to the Tumor Microenvironment Contributes to Skin Squamous Cell Carcinoma Development. *Mol Cancer Ther* 2017;16(12):2871-2880.
12. Butcher MJ, Filipowicz AR, Waseem TC, et al. Atherosclerosis-Driven Treg Plasticity Results in Formation of a Dysfunctional Subset of Plastic IFN γ ⁺ Th1/Tregs. *Circ Res* 2016;119(11):1190-1203.
13. de Oliveira AP, Ayo CM, Bestetti RB, Brandão de Mattos CC, Cavasini CE, de Mattos LC. The role of CCR5 in Chagas disease – a systematic review. *Infect Genet Evol* 2016;45:132-137
14. Barros N, Vasquez N, Woll F, Sanchez C, Valencia B, Llanos-Cuentas A, et al. Regulatory T-Cell Dynamics in Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg* 2018;98(3):753-758.
15. Suzuki K, Fukutomi Y, Matsuoka M, Torii K, Hayashi H, Takii T et al. Differential production of interleukin 1 (IL-1), IL-6, tumor necrosis factor, and IL-1 receptor antagonist by human monocytes stimulated with *Mycobacterium leprae* and *M. bovis* BCG. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1993;61(4):609-618.

16. Misra DP, Agarwal V. Th17.1 lymphocytes: emerging players in the orchestra of immune-mediated inflammatory diseases. *Clin Rheumatol*. 2022;41(8):2297-2308.
17. Meitei HT, Lal G. T cell receptor signaling in the differentiation and plasticity of CD4(+) T cells. *Cytokine & growth factor reviews*. 2022.
18. Sadhu S, Khaitan BK, Joshi B, Sengupta U, Nautiyal AK, Mitra DK. Reciprocity between Regulatory T Cells and Th17 Cells: Relevance to Polarized Immunity in Leprosy. *PloS Negl Trop Dis*. 2016;10(1):e0004338. Published 2016 Jan 11. Doi:10.1371/journal.pntd.0004338
19. Saini C, Tarique M, Rai R, Siddiqui A, Khanna N, Sharma A. T helper cells in leprosy: An update. *Immunology letters*. 2017;184:61-6.
20. Kallikourdis M, Andersen KG, Welch KA, Betz AG. Alloantigen-enhanced accumulation of CCR5+ 'effector' regulatory T cells in the gravid uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(2):594-599.
21. Yurchenko E, Tritt M, Hay V, Shevach EM, Belkaid Y, Piccirillo CA. CCR5-dependent homing of naturally occurring CD4+ regulatory T cells to sites of *Leishmania* major infection favors pathogen persistence. *J Exp Med* 2006;203(11):2451-2460.
22. de Oliveira CE, Gasparoto TH, Pinheiro CR, Amôr NG, Nogueira MRS, Kaneno R, et al. CCR5-dependent regulatory T cell migration mediates fungal survival and severe immunosuppression. *J Immunol* 2008;180(5):3049-3056.
23. Moreira AP, Cavassani KA, Massafra Tristão FS, Campanelli AP, Martinez R, Rossi MA, et al. CCR5-dependent regulatory T cell migration mediates fungal survival and severe immunosuppression. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2008;180(5):3049-56.

Figures and legend

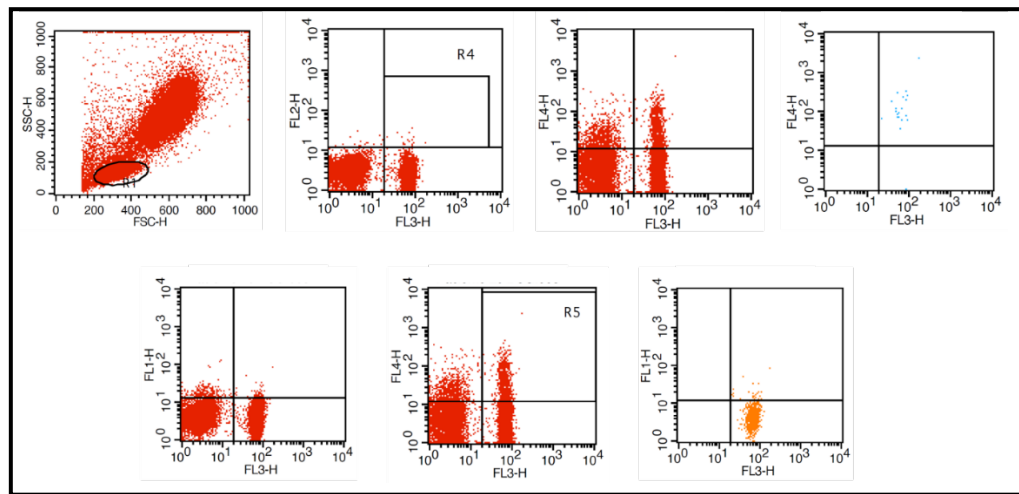


Fig. 1 Representative dot plot graph of Tregs and TregsCCR5^{+/+} lymphocyte acquisition in FACSscalibur™. To evaluate CD4+CD25+FOXP3+CCR5^{+/+}, the window of interest R4 was selected for CD4+CD25+FOXP3+ in the FL2 versus FL3 graph, and for CCR5^{+/+} labelling, the R5 window of interest in the FL4 versus FL3 graph and the percentage of cells was evaluated.

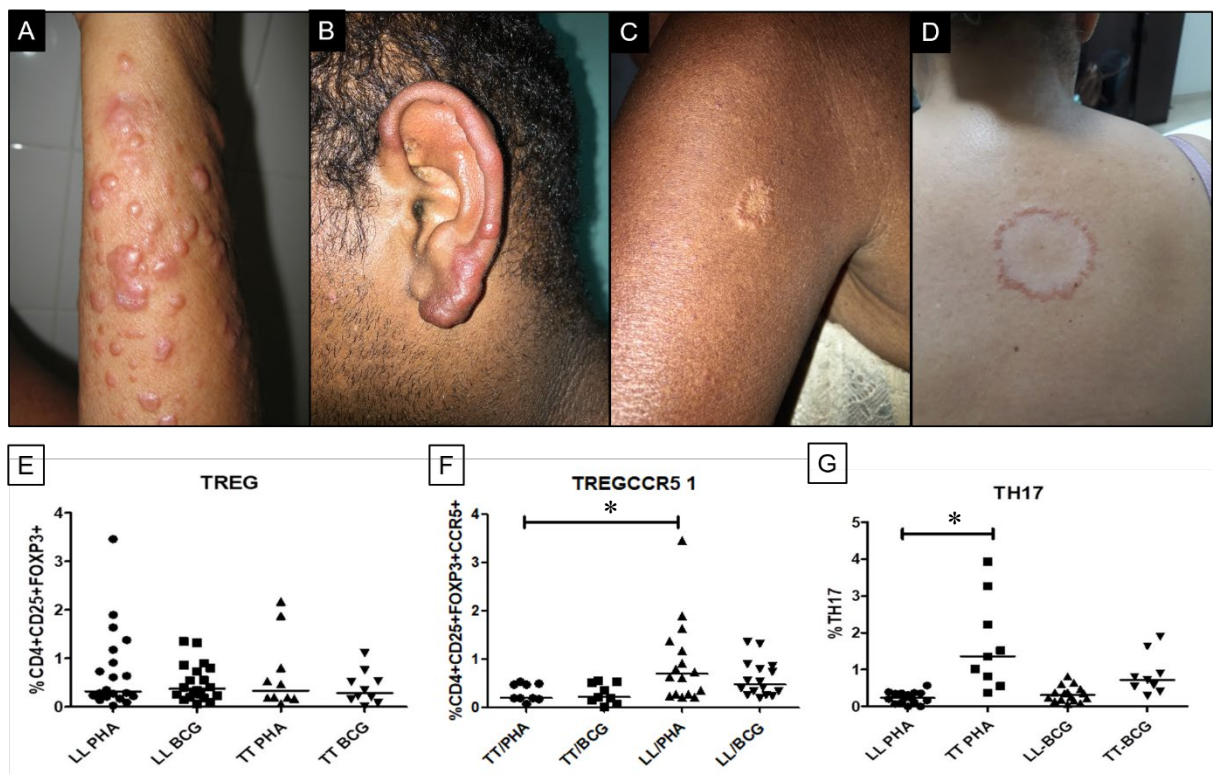


Figure 2: Clinical forms of leprosy and the expression of TH17, Tregs, and TregsCCR5^{+/+}. A, B: L-lep patients; C, D: T-lep patients; E: comparative frequency of conventional Tregs cells (%CD4+CD25+FOXP3+); F: comparative frequency of TregsCCR5^{+/+} cells (%CD4+CD25+FOXP3+CCR5^{+/+}); G: comparative frequency of TH17 (%CD4+IFN-γ-IL-17^{+/+}) cells. Peripheral blood cells stimulated with phytohaemagglutinin (PHA) (10μg/ml) and Bacillus Calmette-Guerin (BCG) (1μg/ml) for 24h (*p < 0.05).

6.2 ARTIGO 2: ROLE OF CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9, AND CXCL10 CHEMOKINES IN THE PATHOGENESIS OF LEPROSY

Abstract

Abstract

Leprosy is considered a chronic infectious and immunological disease whose clinical outcomes are directly related to inflammatory responses developed during its evolution course. In this sense, studies directed to immunological responses in the pathogenesis of leprosy are essential not only for their understanding but also for the identification of possible biomarkers. Chemokines are important chemoattraction cytokines that play an important role in infectious diseases and are little explored in leprosy. This study evaluated by Cytometric Beads Array, the major chemokines CCL2, CCL5, CXCL-8, CXCL9, and CXCL10 in leprosy patients, according to Madrid clinical classification and operational classification established by the World Health Organization. The samples were analyzed without stimulus and with stimuli by phytohemagglutinin and BCG. There were no significant differences in the expression of chemokine CCL2 and CCL5 along the clinical and operational spectrum of leprosy; however, chemokine CCL5 showed high and uniform concentrations in all patients. CXCL8 able to distinguish the clinical or operational forms of leprosy, especially paucibacillary patients, which are still a major challenge in the search for effective laboratory tests for diagnosis. CXCL9 and CXCL10 showed significant differences ($p < 0.05$) between all groups studied, but not were potential leprosy biomarkers. These findings may, as a whole, contribute to the investigation of future strategies for diagnosis, treatment, and chemoprophylaxis for leprosy.

Keywords: Leprosy; Chemokines; Immunology; Biomarkers.

1 Introduction

Leprosy is a chronic infectious disease caused by the mycobacteria *Mycobacterium leprae* (ML) and *Mycobacterium lepromatosis* (MLP), which have an initial affinity for Schwann cells and later by dermal macrophages consequently reaching the peripheral nervous system innervation network and structures such as the skin, mucous membranes, and peripheral nerve trunks, extending to other organs and systems [1, 2].

Despite being declared “eliminated” as a public health problem by the World Health Organization (WHO) in 2000, about 200,000 new leprosy cases are reported each year globally. The migratory movement has brought leprosy back to non-endemic areas such as Europe and the United States, where technical knowledge of the disease has been lost over the years and attention to the disease has re-awaken. Worldwide, 208,619 new cases of the disease were diagnosed in 2018, 30,957 of which in the Americas region. Brazil alone diagnosed 28,660 leprosy patients (92.6%). Of this total, 1,705 (5.9%) were in children under 15 years of age. The state of Pernambuco diagnosed 2,517 new cases of leprosy alone, 165 of which were in children under 15 years of age. The COVID 19 pandemic significantly impacted these numbers around the world, and the 2021 data does not correspond to the epidemiologic reality of leprosy. [3, 4, 5].

Since leprosy is caused by pathogens that can't be cultured in vitro, all its immunological aspects represent an attractive model to better understand the different clinical outcomes of the disease; in turn, they depend briefly on the performance of innate and adaptive immunity developed from the initial onset of the infection [6].

Classically, these aspects were described from the TH1/TH2 dichotomy, however, the discovery of lymphocytic subpopulations such as TH17 lymphocytes and regulatory T lymphocytes (Tregs), cytokines, chemokines, and their receptors added another chapter to a difficult to solve intricate puzzle [7].

The term chemokine can be understood as a chemotactic cytokine contraction. Chemokines are polypeptides with about 8 to 12Kd, subdivided into four families based on the location and amount of N-terminal cysteine residues. The two main families are chemokines CC and CXC. A few chemokines have a single cysteine I or two cysteines separated by amino

acids (CX3C). They are produced by leukocytes and several other cells such as fibroblasts, endothelial cells, and different epithelium cells [8].

The functions of these polypeptides are based on chemoattraction mechanisms, stimulating the movement of specific clones of leukocytes and regulating their migration from blood to tissues [9].

The regulation promoted by chemokines has gradually been better understood, and its production happens both by stimuli of recognition of microorganisms by the innate immune system, as well as by stimuli inherent to the adaptive immune system, such as the production of TNF, IFN- γ , and other interleukins produced in the various inflammatory responses during infectious, autoimmune and neoplastic diseases [10].

Little has been explored about the role of chemokines in the pathogenesis of leprosy. Wook Lew et al. (2002), for the first time, were interested in these biomarkers and found a positive correlation in the expression of CXCL10 with the bacilloscopic index (IB) in lepromatous patients, with significant differences concerning the controls [11].

Kirkaldi et al. (2003) analyzed the expression of some chemokines and their receptors directly in the lesions of patients with different clinical forms of leprosy. In this study, they did not find differences between the expression of CXCL8, CCL2, and CCL5, except in borderline-tuberculoid patients during the type 1 leprosy reaction, which presented an increase in the expression of CCL2 and CCL5 [12].

Hazan et al. (2004) found that chemokine CXCL8 (IL-8) plays a fundamental role in the development of immune response in patients with lepromatous leprosy (LL) in the absence of TNF- α and IFN- γ . In 2006, together with other collaborators, the same author verified high serum levels of CCL2 and low serum CCL5 levels in LL patients, comparing them with individuals with pulmonary tuberculosis and healthy individuals from endemic areas [13, 14].

The expression of CCL5, CCL3, CXCL9, and the CXCR3 receptor, which is a linker for CXCL10, was verified in the cells of the granuloma induction by the Mitsuda antigen in patients treated and cured for leprosy. A similar pattern was perceived in patients with tuberculoid leprosy (TT), suggesting a protective role of these chemokines in the immune response of delayed hypersensitivity [15].

Guerreiro et al. (2013) verified that schwann cells infected with live *Mycobacterium leprae* expressed some chemokines genes, including CCL2, CCL3, CXCL8 (IL8) and SOD2 with specific leprosy signatures [16].

More recently, Queiroz et al. (2021), seeking immunological signaling for subclinical leprosy infection, conducted a longitudinal study between 2014 and 2015 in a hyperendemic region for leprosy in Brazil. The authors evaluated a panel of cytokines TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-2, IL-17A, IL-4, and IL-10 and chemokines CXCL8 (IL-8), CCL2, and CXCL9, comparing the result between paucibacillary, multibacillary and leprosy contacts, found only in this subgroup a negative correlation between IFN- γ and CCL2 [17].

Most studies have analyzed the role of chemokines in situ. In the case of molecules related to chemoattraction, it is also essential to observe the behavior of these components of the immune system in peripheral blood, thus helping to understand the direction of effector cells involved in immune responses related to leprosy.

The present study evaluated the role of significant chemokines according to their functions in leprosy patients free of leprosy reactions, looking for patterns of expression associated with disease progression.

2 Material and Methods

2.1 Study design and population

The patients participating in this study came from the Municipal Secondary Referral Center for Leprosy Amélia de Pontes, located in the city of Caruaru – PE – Brazil. The place is a traditional clinic of Sanitary Dermatology and Infectious Diseases, which welcomes patients with leprosy on spontaneous demand, referred from primary and specialized health care sites. Cases that are difficult to manage clinically or from uncovered areas of primary care remain under follow-up at this service until discharge due to cure. The other cases are counter-referred to the primary care site of origin, remaining in shared follow-up. It is the responsibility of the primary care teams to monitor after discharge, as well as to investigate household contacts at the time of diagnosis. The diagnosis is made according to clinical criteria with the support of slit-skin-smear of the intradermal scraping, which is also performed at this location.

Patients were classified clinically according to the Madrid classification with forms I, TT, DD and VV and operationally according to the WHO as paucibacillary and multibacillary (Table 3). Between 2017 and 2019, blood samples were collected from 33 patients diagnosed with leprosy, whose stratification is defined in table 4. Blood samples and statistical analyzes were processed at the Keizo Asami Immunopathology Laboratory (LIKA) located on the University Campus from the Federal University of Pernambuco.

Table 1: Categorization of the groups of patients diagnosed with leprosy.

Leprosy clinical classification	Number of individuals	Age Media/min- max	Gender	Operacional classification
Indeterminate	0	-	-	-
Tuberculoid	13	29,1 / 6-70	8 female / 4 male	Paucibacillary
Borderline	12	46,25 / 25-83	7 female / 5 male	Multibacillary
Lepromatous	8	47,8 / 23-75	3 female / 5 male	Multibacillary

The study selected only new cases of leprosy, had never undergone specific treatment for the disease, who had never developed leprosy reactions, and were free of autoimmune or infectious comorbidities that could interfere with the interpretation of the results. All borderlines patients were operationally classified as multibacillary.

This study was conducted by signing a free and informed consent form (TCLE), with the protocol approved by the ethics committee of the Federal University of Pernambuco following Resolution 466/12 with a substantiated opinion number 879.625.

2.2 Collection and culture of peripheral blood

A 10ml blood sample was collected from 33 patients. Peripheral blood cultures were performed in 14 ml polypropylene tubes (BD SystemTM). 500µl of whole blood was used in 1 ml of RPMI 1640 medium with glutamine (2Mm), gentamicin 50mg/ml (Sigma), 10Mm HEPES (Sigma), and 10% bovine fetal serum (Cultilab). Peripheral blood cells were stimulated separately with 10 µg/ml phytohemagglutinin (PHA) (GIBCOTM /Invitrogen Corporation) and

BCG (1µg/ml) in the presence of 0.5µl BD GolgiStop Protein Transport Inhibitor (BD bioscience) for 5 hours. The tubes were incubated at 37°C, 5% CO₂ for 24 hours. The crop supernatants were collected, centrifuged at 1000rpm for 5 minutes, aliquoted, and frozen for subsequent determination of chemokines. BCG has been a recognized stimulus for assays that assess leprosy immune responses, being more potent than ML itself [18].

2.3 Determination of chemokines by flow cytometry (Cytometric Bead Array – CBA)

Cell culture supernatants were identified for subsequent chemokine dosage using the Human Chemokine CXCL8, CXCL9, CXCL10, CCL2, and CCL5 kit (BD Pharmigen™, CA, USA). Five polystyrene spheres with different fluorescence intensities were coated with antibodies specific to human chemokines detected in the FL-4 channel. Subsequently, 50 µl of the capture ball mixture, marked with anti-CCL2, anti-CCL5, anti-CXCL8/IL-8, anti-CXCL9, and anti-CXCL10 antibodies were added to properly identified tubes. Next, 50 µl of sample and human chemokine PE detection marked with phycoerythrin (PE) (FL2 channel) were added. The samples were incubated for 3 hours at room temperature and under a light. After incubation, 1ml of the washing solution was added, and centrifugation for 10 minutes at 300 x g. The overhead was despised. The samples were resuspended with 300Ml of the washing buffer solution for later reading on the flow cytometer. For the detection of CXCL10 and CCL2, serum samples were diluted in the proportion of 1:10 and 1:4, respectively, according to the manufacturer's recommendations (BD Pharmigen™, CA, USA). The detection limits of CBA Human Chemokine are CXCL8 (0.2 pg/ml), CCL5 (1 pg/ml), CXCL9 (2.5 pg/ml), CCL2 (2.7 pg/ml), CXCL10 (2.8 pg/ml). The acquisition and analysis of the samples were carried out in the Technological Platform (NPT) nucleus of IAM/Fiocruz, using the FACScalibur™ flow cytometer, BD Pharmingen® (BD Biosciences®) with the use Software BD CellQuest™ and Software FCAP Array versão 3.01 (Becton Dickson). The software evaluated the size (Forward Scatter-FSC) and cell granularity (Side Scatter-SSC), in addition to fluorescence type 2 (FL2), and type 4 (FL4).

3 Statistical analysis

The data were coded, and the statistical analysis of chemokine expression was performed using GraphPad PRISM 9.4.0.0® software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). ANOVA one-way variance analysis was performed, following Tukey's post-test of multiple comparisons. P values < 0.05 were considered statistically significant.

4 Results

The measurement of the CCL2 cytokine did not show significant differences in stratification by clinical forms or in the operational classification of leprosy patients (Fig. 1).

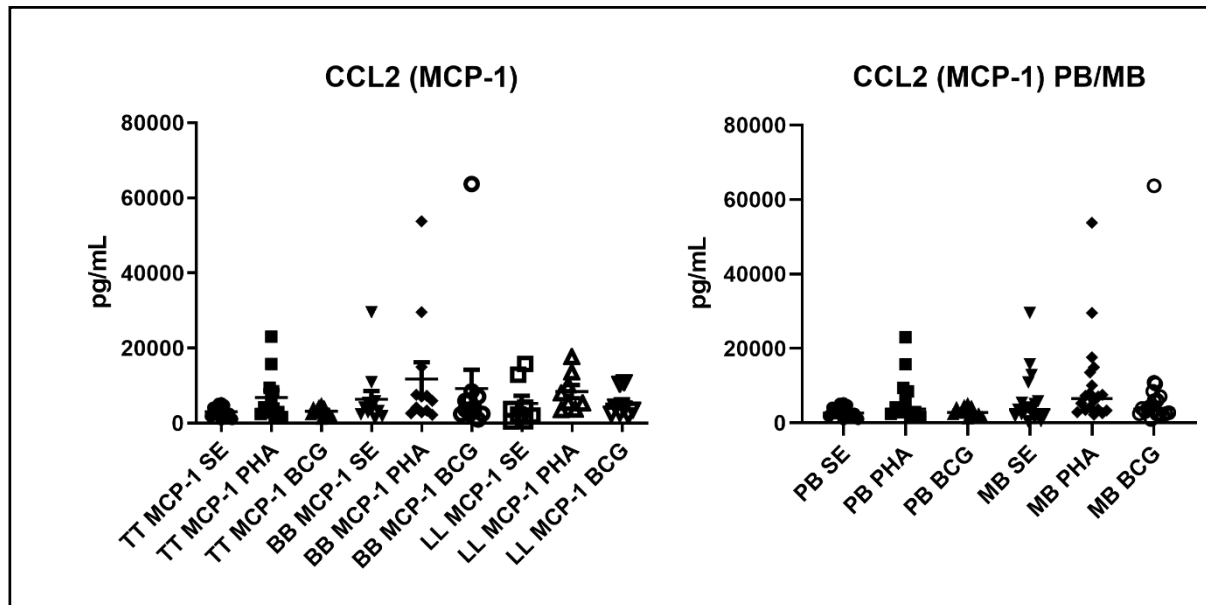


Fig. 1 – CCL2 chemokine. Quantitative analysis of chemokine CCL2 through clinical stratification. TT = tuberculoid patients; BB = borderline patients; VV = lepromatous patients. SE = no stimulus. PHA = stimulated with phytohaemagglutinin. BCG = stimulated with BCG. Operational classification: PB = paucibacillary patients, MB = multibacillary patients. There were no significant differences in CCL2 expression along the clinical or operational classification spectrum of leprosy patients.

In respect to the chemokine CCL5, there was an increase in its expression uniformly throughout the spectrum of clinical and operational classification (fig. 2), however, without statistical significance in the comparative analysis among all groups studied. CCL5 did not respond to any of the stimuli used in this present study, although its expression with PHA was slightly higher in lepromatous patients, however without statistical significance

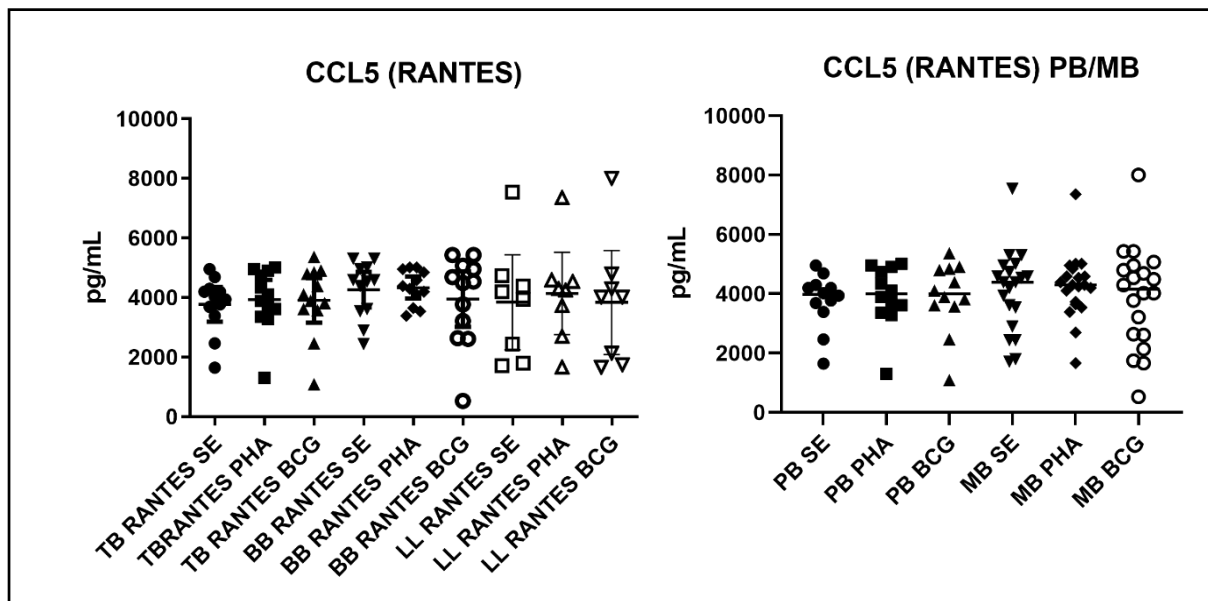


Fig. 2 – CCL5 chemokine. Quantitative analysis of chemokine CCL5 through clinical stratification TT = tuberculoid patients; BB = borderline patients; LL = lepromatous patients. SE = no stimulus. PHA = stimulated with phytohaemagglutinin; BCG = stimulated with BCG. Operational classification: PB = paucibacillary patients; MB = multibacillary patients. There were no significant differences in the expression of CCL5 along the clinical or operational classification spectrum of leprosy patients.

There was a difference in the expression of CXCL8 (IL-8) between the groups of tuberculoid patients stimulated with PHA and lepromatous without stimulation along the clinical classification spectrum of leprosy patients. The operational classification did not show statistically significant differences.

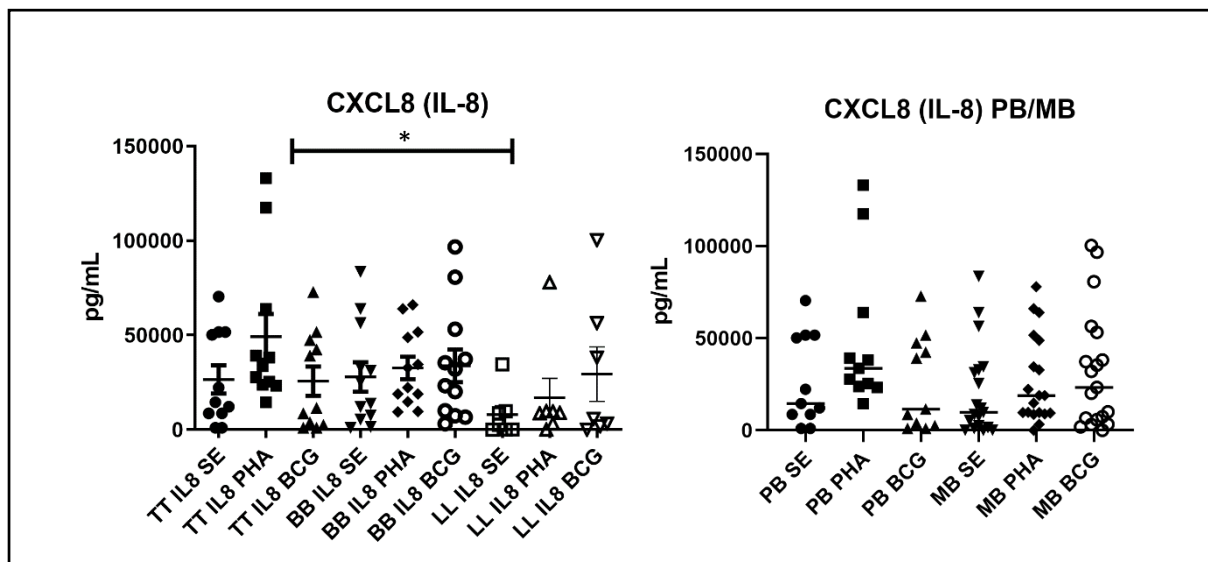


Fig. 3 – CXCL8 (IL-8) chemokine. Quantitative analysis of chemokine CXCL8 (IL-8) through clinical stratification. (* $p < 0.05$). TT = tuberculoid patients; BB = borderline patients; LL = lepromatous patients. SE = no stimulus. PHA = stimulated with phytohaemagglutinin; BCG = stimulated with BCG. Operational classification: PB = paucibacillary patients; MB = multibacillary patients. There was a difference in the expression of CXCL8 (IL-8) between the groups of tuberculoid patients stimulated with PHA and lepromatous without stimulation along the clinical classification spectrum of leprosy patients. The operational classification did not show statistically significant differences. The data were analysed using the one-way ANOVA and followed by a multiple-way test using the Tukey test. Tukey p values were reported, illustrating the differences observed between the groups.

Significant CXCL9 chemokine expression was observed among the groups analyzed along the clinical classification spectrum of patients with and without stimuli. No differences were noted when patients were operationally classified (fig. 4).

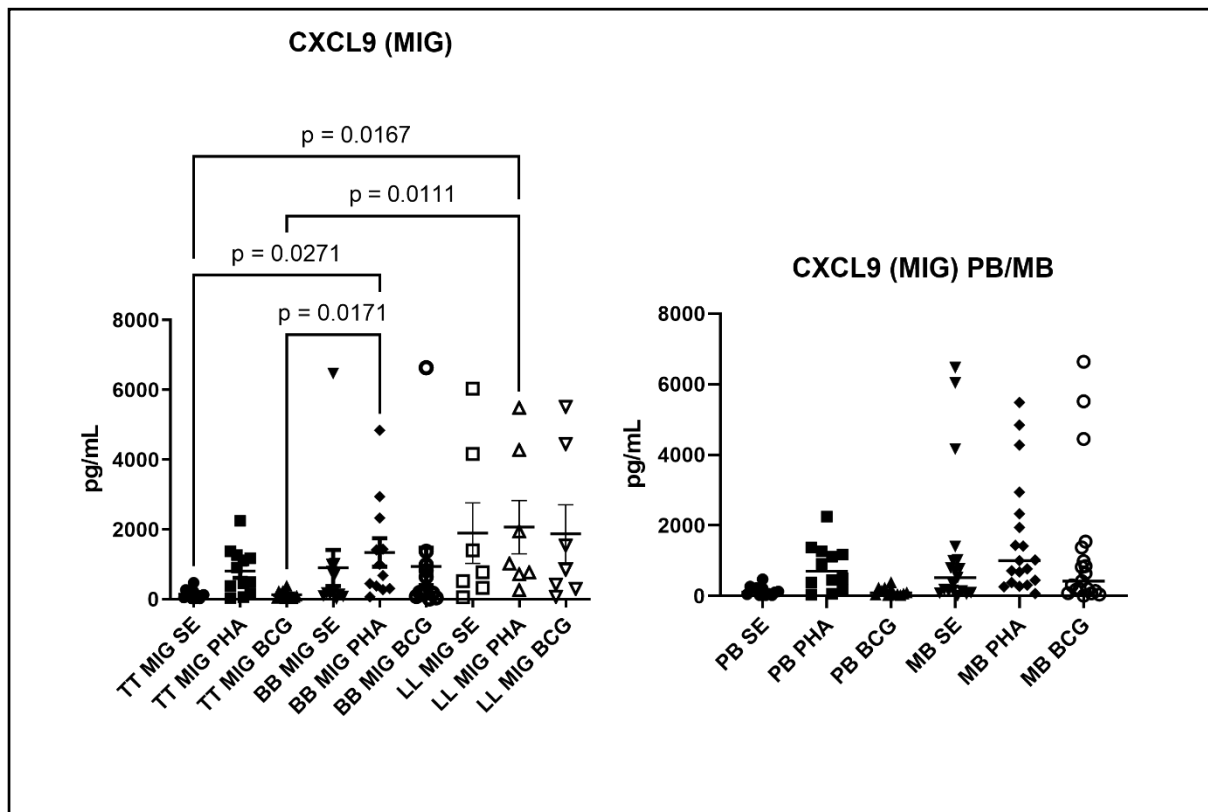


Fig. 4 – CXCL9 chemokine. Quantitative analysis of chemokine CXCL9 through clinical stratification (A). TT = tuberculoid patients; BB = borderline patients; LL = lepromatous

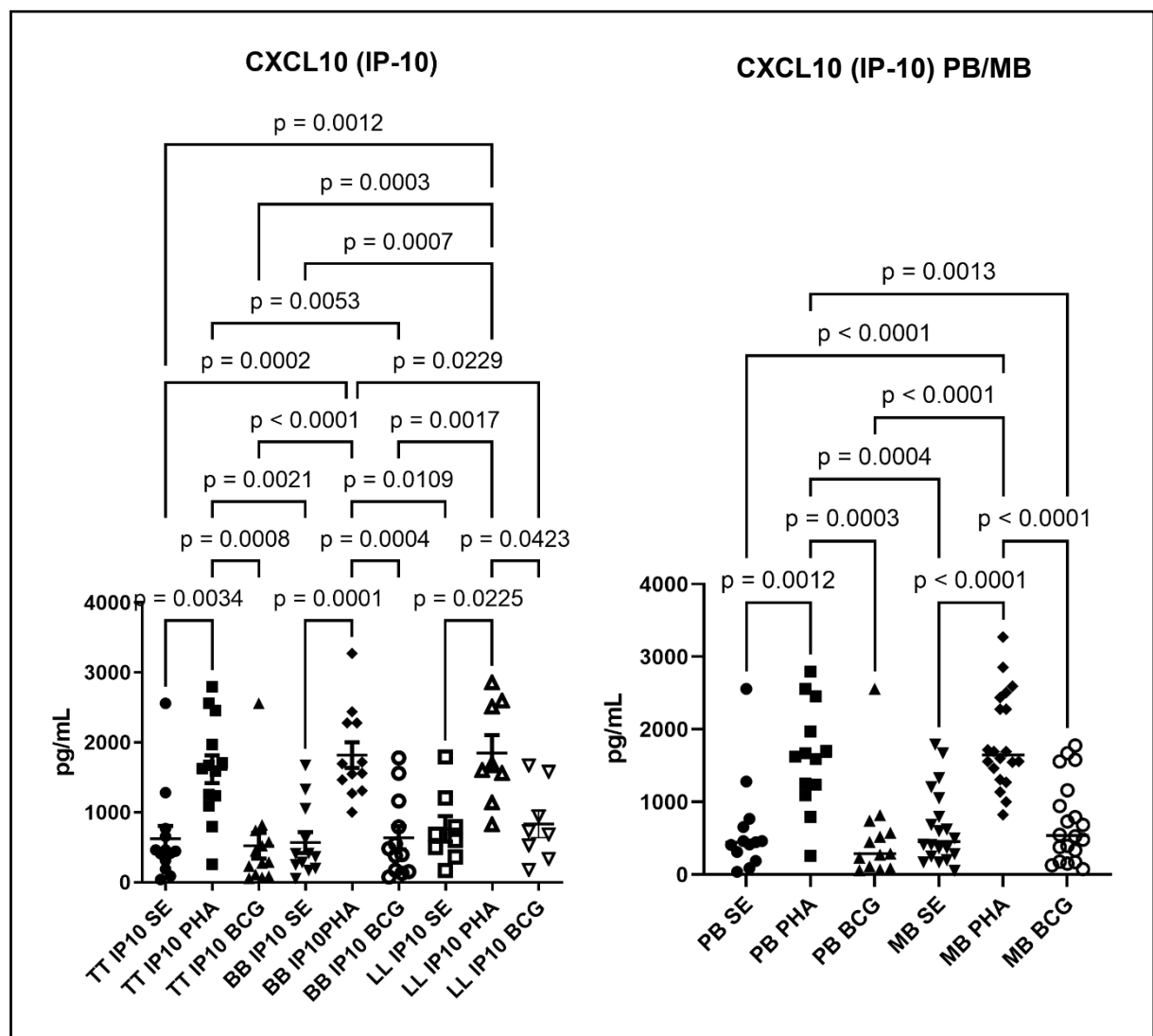


Fig. 5 – CXCL10 chemokine. Quantitative analysis of chemokine CXCL10 through clinical stratification. TT = Tuberculoid patients; BB = borderline patients; VV = lepromatous patients. SE = no stimulus. PHA = stimulated with BCG phytohaemagglutinin = stimulated with BCG. Operational classification: PB = paucibacillary patients; MB = multibacillary patients. There was a significant difference in the expression of CXCL10 along the clinical and operational classification spectrum of leprosy patients with and without the stimuli. The data were analyzed using the one-way ANOVA and followed by a multiple-way test using the Tukey test. Tukey p values were reported, illustrating the differences observed between the groups.

5 Discussion

Chemokines play an important role in orchestrating immune responses during the early stages of infectious diseases by collaborating with protective immunity. However, in certain conditions such as tuberculosis, cytokines can guide the inflammatory response, increasing the risk of tissue damage to the pulmonary parenchyma and providing a favorable environment for the pathogen [19, 20].

Few studies evaluate the behavior of chemokines in leprosy immunology. In the case of chemotactic molecules, their analysis in peripheral blood along the spectrum of leprosy classification can be explored in the search for identification of biomarkers for disease progression.

This study investigated the potential of peripheral blood analysis to verify the expression of a chemokine panel among the various clinical leprosy forms according to Madrid's classification. In addition, the expression of the chemokines was observed when patients were operationally classified. Of the five chemokines studied, CXCL8 (IL-8), CXCL9, and CXCL10 were expressed significantly differently among the different groups analyzed ($p < 0.05$), and there was uniform in CCL5 expression in all groups studied.

CCL2 is a chemokine of the CC chemokine subfamily that has potent chemotactic and activating properties for monocytes, macrophages, dendritic cells, and CD4⁺ T cells that plays an important role in granuloma formation. In tuberculosis, its higher expression is associated with higher severity of the disease. Allergic patients infected with *Schistosoma mansoni* have low expression of CCL2 and increased CXCL8 (IL-8) [21].

Although the analysis performed between the groups did not show significant differences, in this study, a slight increase in CCL2 was observed in the group of borderlines patients, who are the group of patients considered immunologically unstable, eliciting TH1, TH2, and TH17 responses and, therefore, with a higher risk of developing leprosy reactions. Additionally, the expression of CCL2 showed an important association with excessive deposit of extracellular matrix, macrophage recruitment, and fibrosis of the peripheral nervous system following reactional inflammatory neuritis responsible for the nerve damage and development of disabilities [22, 23].

This aspect suggests the need for intrinsic or extrinsic immunoregulatory factors, which, associated with low expression of CCL2, maintain the immune balance and contribute to the non-occurrence of leprosy reactions in leprosy patients.

Three-gene signature CXCL8 (IL-8), CCL2, and SERP were verified through of transcriptomic analysis of *Mycobacterium leprae*-stimulated response in peripheral blood mononuclear cells, as potential biomarkers for early diagnosis of leprosy. Paradoxically CCL2 serum increases is elevated in lepromatous leprosy patients with high BI, and that this correlates with disease severity [24, 25].

These observations in part meeting the results in the present study. Because the lepromatous clinical form presents a predominantly immunosuppressive response pattern in a disseminated disease, it may justify the higher CCL2 expression also in this patients group. Tuberculoid patients, in turn, present disease limited to some sites and effective immunological response, which are compatible with lower chemokine level in the serum without any stimuli.

This interpretation contrasts with the study by Geluk et al. (2015), which indicated a higher expression of CCL2 in patients with tuberculoid and borderline tuberculoid leprosy. However, the authors did not measure or compare the expression of this chemokine with lepromatous patients [26].

On the other hand, the study of Queiroz et al. (2021), established a negative correlation of CCL2 and IFN- γ between the groups of household contacts (HHC) and leprosy patients, demonstrating that this finding was a predictor for subclinical infection in the HCC group. This correlation was not found in the paucibacillary and multibacillary leprosy patients [27].

CCL5 is also a member of the CC chemokine subfamily and is chemoattractive to memory TCD4⁺ lymphocytes, monocyte, and eosinophils. It plays a crucial role in activating effector T cells and is expressed in various cell types such as respiratory epithelial mucosa cells, lymph nodes, endothelium, synovia, liver, spleen, myeloid cells, and macrophages. It plays a vital role in the formation of granulomas, showing to be expressed in macrophages of granulomas related to *Mycobacterium tuberculosis* infection [28-29].

Surprisingly, this CCL5 study was shown uniform expression throughout the clinical/operational spectrum of leprosy without demonstrating statistical differences between the polar forms of leprosy. This result differs from the study by Kirkaldy et al. (2003), which evaluated different chemokines in lesions of leprosy patients, finding significant differences in this chemokine between the clinical forms TT and VV, possibly due to the predominant role of this chemokine in granuloma formation [12].

Considering the fact that leprosy is an infection that affects several organs and systems and the demonstration of CCL5 expression in almost all organ cells known to be compromised by the disease, it is possible that peripheral blood analysis demonstrates more appropriately the behavior of this chemokine in leprosy. This observation may become an important biomarker to be better explored for detection of early infection, even in paucibacillary clinical forms, which except for the histopathological evaluation, remains to this day a challenge when based on laboratory assays.

CXCL8 (IL-8) is a member of the subfamily of Chemokines CXCs, which mostly account for neutrophil chemoattraction. In leprosy, the role of neutrophils is studied during the onset of leprosy reactions, especially the type 2 leprosy reaction [30, 31].

However, Kirkaldy et al. (2003) evaluated the expression of CXCL8 (IL-8) in lesions of leprosy patients who did not exhibit neutrophils, demonstrating that this chemokine is involved in the chemoattraction of monocytes and lymphocytes during the immunological response of the disease [12].

Hasan et al. (2004) compared the expression of CXCL8 (IL-8) with the expression of TNF- α among lepromatous patients and healthy controls living in areas endemic to leprosy, observing that there was a higher expression of CXCL8 (IL-8) to the detriment of TNF- α in the group of lepromatous patients. The author suggested a mechanism of immunoregulation

between these two cytokines where CXCL8 (IL-8) plays a major role in the immunological response in the absence of TNF- α . The interpretation of the results, however, may vary because the patients analyzed had been treated for different periods [13].

In the present study, on the other hand, all patients were evaluated at diagnosis. An increase in CXCL8 (IL-8) expression was observed in all clinical forms of leprosy, except for lepromatous patients not stimulated with PHA and BCG. Tuberculoid patients produced more CXCL8 (IL-8) compared to lepromatous patients. There was also a significant difference ($p = 0.0309$) between tuberculoid patients stimulated with PHA and without stimulation, demonstrating that CXCL8 (IL-8) may play a role in controlling the disease, therefore considered a biomarker of protective response.

Integrating the CXC subfamily, CXCL9 is a chemokine produced in a wide range of inflammatory and infectious conditions, sharing with CXCL10 the recruitment function of effector T lymphocytes and the CXCR3 receptor [32, 33].

This study verifies distinct CXCL9 expression in all groups analyzed with a predominant mean elevation in lepromatous patients. Statistical analysis showed significance not only between the polar spectral forms of the disease ($p = 0.0167$) but also among patients of clinical forms stimulated by PHA. This result is in line with the study by Queiroz et al. (2021), which verified increased expression of CXCL9 in multibacillary patients. Surprisingly, the stimulus with BCG did not elevate the mean expression of CXCL9 in tuberculoid or lepromatous patients.

One of the strategies adopted in Brazil as immunoprophylaxis for leprosy is strengthening the BCG vaccination in HHC of leprosy patients, which is one of the reasons for this stimulus in this study. CXCL9 was the only chemokine that behaved indifferently to the stimulus with BCG in patients with tuberculoid leprosy. This is a fact of major concern, once immunological stimulation is considered for the control of *Mycobacterium leprae* infection [34].

The CXCR3/CXCL10 axis was recognized as a potent inducer of immunological responses concerning the “training” of innate immunity, which may or may not determine the efficacy of the BCG vaccine. This training involves the persistence of the altered functional state of the innate immune system cells that remains after the elimination of the initial stimulus,

allowing an expanded response to the restimulation of these same cells and of different pattern recognition receptors. This finding demonstrates the necessary link between innate and adaptive cells for controlling mycobacterial growth [35].

Notably, all individuals diagnosed with leprosy have been vaccinated with BCG. The BCG vaccination in the national territory is intended for immunoprophylaxis against tuberculosis. Thus, only one dose of BCG is ineffective *ab initio* to confer protection against infection by the *Mycobacterium leprae* [36, 37]

Few studies have reported latent infection by *Mycobacterium leprae*. RT-PCR techniques with the pathogen-specific repetitive sequence (RLEP – *Mycobacterium leprae*-specific repetitive sequence) are used in research with promising results but are unavailable in the field. Da Silva (2021), using the RLEP and the anti-PGL-I ELISA, verified a high casuistry of double positive cases (PGL-I+RLEP+) with an innovative concept on the theme, verifying that these individuals not only contribute to the spread of the disease but also have greater chances for the development of the disease [38].

Since the enhancement of immunization is the strategy adopted for HHC of leprosy patients and the low expression of CXCL9 in tuberculoid patients stimulated with BCG, CXCL9 could be a candidate biomarker to verify protection offered by BCG.

CXCL10 conceptually is an IFN- γ -induced protein. This chemokine plays a vital role in the recruitment of TH1 cells to sites of inflammation, pointed out as an essential biomarker capable of distinguishing between individuals with latent *Mycobacterium tuberculosis* infection and individuals with active tuberculosis. [39].

In a pioneering way, Kaplan et al. (1987) evaluated the presence of CXCL10 in keratinocytes and dermal macrophages of patients with 79iointegumentary leishmaniasis, tuberculoid leprosy, and lepromatous leprosy, verifying the presence of this chemokine associated with IFN- γ in patients with LTA and tuberculoid leprosy [40].

Hungria et al. (2017) evaluated the potential of CXCL10 as a diagnostic tool for leprosy, correlating it with the expression of IFN- γ , verifying that this association was helpful for the diagnosis of paucibacillary leprosy patients, without, however, contributing to distinguishing between sick individuals and individuals with subclinical infection [41].

This study confirmed the expression of CXCL10 in all clinical forms of leprosy, however, in the present study CXCL10 only statistically significantly distinguished the groups when compared without stimulation and with stimulation with PHA and BCG, demonstrating that it is not a good biomarker for distinguishing between the clinical and operational classification spectrum of leprosy.

6 Study limitations

This study evaluated a panel of the main chemokines looking exclusively at leprosy patients without treatment and free of leprosy reactions. The extension of these evaluations to patients with leprosy reactions, HHCs, and healthy individuals, would allow determining the role of these chemokines for early disease detection and prediction of reactional episodes.

7 Conclusion

Leprosy is accompanied by a broad and diverse expression of chemokines that can contribute to the understanding of the direction of immunological responses of leprosy patients. CCL5 could not distinguish the clinical forms of the disease. CXCL8 (IL-8) may contribute to the diagnosis of paucibacillary patients, which to this day remains a challenge. CXCL9 may collaborate to identify patients with latent *Mycobacterium leprae* infection and increased risk of developing the disease. CXCL10 it is not a good biomarker able to distinguish the clinical or operational forms of leprosy. As a whole, chemokines need to be widely explored in the pathogenesis of leprosy. Future and extensive studies will be necessary to verify the possibilities of being used as diagnostic strategies, immunoprophylaxis, and treatment in this millenary disease that remains neglected and challenging.

Author's contributions

FBAN and BCCS conceived the study; VMAC and VMOS designed the study protocol; FBAN and BCCS carried out the clinical assessment; VMAC, CBSO and VMBL carried out the immunoassays, Immunophenotyping determination and flow cytometry. VACM and FBAN carried out analysis and interpretation of these data. FBAN and PDAS drafted the manuscript; VMAC and PDAS critically revised the manuscript for intellectual content. All authors read and approved the final manuscript. FBAN and VMAC are guarantors of the paper.

Acknowledgments

We acknowledge Dr. Fred Nietto (Ph.D) for contribution to the translation of this manuscript and Dr. Patrícia Sammarco Rosa (Ph.D) (Lauro de Souza Lima Institute, Bauru – São Paulo – Brazil), for the critical reading of this manuscript and final contributions.

Funding statements

This work was supported by Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação (PROPESQI-UFPE); Pró-Reitoria de Pós-Graduação (PROPG-UFPE); Programa de Apoio à Pós-Graduação (PROAP-UFPE) of the Pernambuco's Federal University, and, in part by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Finance Code 001), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Declaration of competing interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

1. White C, Franco-Paredes C. Leprosy in the 21st century. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(1):80-94.
2. Han XY, Seo YH, Sizer KC, et al. A new *Mycobacterium* species causing diffuse lepromatous leprosy. *Am J Clin Pathol.* 2008;130(6):856-864.
3. Ramos JM, Romero D, Belinchón I. Epidemiology of Leprosy in Spain: The Role of the International Migration. *PloS Negl Trop Dis.* 2016;10(3):e0004321.
4. Maymone MBC, Laughter M, Venkatesh S, et al. Leprosy: Clinical aspects and diagnostic techniques. *J Am Acad Dermatol.* 2020;83(1):1-14.
5. BRAZIL MOHO. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico. Número especial, jan. 2020. Available from http://antigo.aids.gov.br/sites/default/files/media/pagina/2021/67488_/anexo_2_-_indicadores_epidemiologicos_e_operacionais_de_hanseniose_brasil_2000_a_2020.pdf
6. Yasmin H, Varghese PM, Bhakta S, Kishore U. Pathogenesis and Host Immune Response in Leprosy. *Adv Exp Med Biol.* 2021;1313:155-177.
7. Froes LAR Junior, Sotto MN, Trindade MAB. Leprosy: clinical and immunopathological characteristics. *An Bras Dermatol.* 2022;97(3):338-347.
8. Miller MC, Mayo KH. Chemokines from a Structural Perspective. *Int J Mol Sci.* 2017;18(10):2088.
9. Luster AD. Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med.* 1998;338(7):436-445.
10. Sharma M. Chemokines and their receptors: orchestrating a fine balance between health and disease. *Crit Rev Biotechnol.* 2010;30(1):1-22.
11. Lew W, Chang SK, Kwahck H, Tada Y, Nakamura K, Tamaki K. Serum monocyte chemoattractant protein-1 is elevated in lepromatous leprosy patients with high bacterial indices. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2002;70(2):129-131.
12. Kirkaldy AA, Musonda AC, Khanolkhar-Young S, Suneetha S, Lockwood DN. Expression of CC and CXC chemokines and chemokine receptors in human leprosy skin lesions. *Clinical and experimental immunology.* 2003;134(3):447-53.

13. Hasan Z, Mahmood A, Zafar S, Khan AA, Hussain R. Leprosy patients with lepromatous disease have an up-regulated IL-8 response that is unlinked to TNF-alpha responses. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases*. 2004;72(1):35-44.
14. Hasan Z, Jamil B, Zaidi I, Zafar S, Khan AA, Hussain R. Elevated serum CCL2 concomitant with a reduced mycobacterium-induced response leads to disease dissemination in leprosy. *Scandinavian journal of immunology*. 2006;63(3):241-7.
15. Mitra DK, Joshi B, Dinda AK, et al. Induction of 83ioinform reactivity in cured lepromatous leprosy patients: impaired chemokine response dissociates protective immunity from delayed type hypersensitivity. *Microbes Infect*. 2009;11(14-15):1122-1130.
16. Guerreiro LT, Robottom-Ferreira AB, Ribeiro-Alves M, et al. Gene expression profiling specifies chemokine, mitochondrial and lipid metabolism signatures in leprosy. *PloS One*. 2013;8(6):e64748.
17. Queiroz EA, Medeiros NI, Mattos RT, et al. CCL2 and IFN- γ serum levels as biomarkers for subclinical infection in household contacts of leprosy patients. *Microb Pathog*. 2021;150:104725.
18. Suzuki K, Fukutomi Y, Matsuoka M, Torii K, Hayashi H, Takii T et al. Differential production of interleukin 1 (IL-1), IL-6, tumor necrosis factor, and IL-1 receptor antagonist by human monocytes stimulated with *Mycobacterium leprae* and *M. bovis* BCG. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1993;61(4):609-618.
19. Monin L, Khader SA. Chemokines in tuberculosis: the good, the bad and the ugly. *Semin Immunol*. 2014;26(6):552-558.
20. Hasan Z, Cliff JM, Dockrell HM, et al. CCL2 responses to *Mycobacterium tuberculosis* are associated with disease severity in tuberculosis. *PloS One*. 2009;4(12):e8459.
21. de Oliveira Nóbrega CG, do Nascimento WRC, Santos PDA, et al. *Schistosoma mansoni* infection is associated with decreased risk of respiratory allergy symptoms and low production of CCL2. *Trop Med Int Health*. 2021;26(9):1098-1109.
22. Saini C, Srivastava RK, Tarique M, et al. Elevated IL-6R on CD4⁺ T cells promotes IL-6 driven Th17 cell responses in patients with T1R leprosy reactions. *Sci Rep*. 2020;10(1):15143.

23. Medeiros MF, Rodrigues MM, Vital RT, et al. CXCL10, MCP-1, and other immunologic markers involved in neural leprosy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2015;23(3):220-229.
24. Yuan YH, Liu J, You YG, et al. Transcriptomic Analysis of *Mycobacterium leprae*-Stimulated Response in Peripheral Blood Mononuclear Cells Reveal Potential Biomarkers for Early Diagnosis of Leprosy. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:714396.
25. Lew W, Chang SK, Kwahck H, Tada Y, Nakamura K, Tamaki K. Serum monocyte chemoattractant protein-1 is elevated in lepromatous leprosy patients with high bacterial indices. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 2002;70(2):129-131.
26. Geluk A, Bobosha K, van der Ploeg-van Schip JJ, et al. New biomarkers with relevance to leprosy diagnosis applicable in areas hyperendemic for leprosy. *J Immunol*. 2012;188(10):4782-4791.
27. Alam R, Stafford S, Forsythe P, et al. RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. *J Immunol*. 1993;150(8 Pt 1):3442-3448.
28. Rump L, Matthey DL, Kehoe O, Middleton J. An initial investigation into endothelial CC chemokine expression in the human rheumatoid synovium. *Cytokine*. 2017;97:133-140.
29. He Y, Zhou Y, Wang H, et al. Identifying potential biomarkers in hepatitis B virus infection and its response to the antiviral therapy by integrated bioinformatics analysis. *J Cell Mol Med*. 2021;25(14):6558-6572.
30. Chenoweth MJ, Mian MF, Barra NG, et al. IL-15 can signal via IL-15R α , JNK, and NF- κ B to drive RANTES production by myeloid cells. *J Immunol*. 2012;188(9):4149-4157.
31. Tanabe MB, Groiup AR, Rincon L, Stryjewska BM, Sarria JC. Persistent Infection Versus Type 2 Immunological Reaction in Lepromatous Leprosy. *J Investig Med High Impact Case Rep*. 2020;8:2324709620927884.
32. Schmitz V, Tavares IF, Pignataro P, et al. Neutrophils in Leprosy. *Front Immunol*. 2019;10:495.
33. Groom JR, Luster AD. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol Cell Biol*. 2011;89(2):207-215.

34. Van Raemdonck K, Van den Steen PE, Liekens S, Van Damme J, Struyf S. CXCR3 ligands in disease and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015;26(3):311-327.
35. Gomes RR, Antunes DE, Dos Santos DF, Sabino EFP, Oliveira DB, Goulart IMB. BCG vaccine and leprosy household contacts: Protective effect and probability to becoming sick during follow-up. *Vaccine.* 2019;37(43):6510-6517.
36. Joosten SA, van Meijgaarden KE, Arend SM, et al. Mycobacterial growth inhibition is associated with trained innate immunity. *J Clin Invest.* 2018;128(5):1837-1851.
37. Marques-Neto LM, Piwowarska Z, Kanno AI, et al. Thirty years of recombinant BCG: new trends for a centenary vaccine. *Expert Rev Vaccines.* 2021;20(8):1001-1011.
38. da Silva MB, Li W, Bouth RC, et al. Latent leprosy infection identified by dual RLEP and anti-PGL-I positivity: Implications for new control strategies. *PloS One.* 2021;16(5):e0251631.
39. Fisher KL, Moodley D, Rajkumar-Bhugeloo K, et al. Elevated IP-10 at the Protein and Gene Level Associates With Pulmonary TB. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12:908144.
40. Kaplan G, Luster AD, Hancock G, Cohn ZA. The expression of a gamma interferon-induced protein (IP-10) in delayed immune responses in human skin. *J Exp Med.* 1987;166(4):1098-1108.
41. Hungria EM, Freitas AA, Pontes MA, et al. Antigen-specific secretion of IFN γ and CXCL10 in whole blood assay detects *Mycobacterium leprae* infection but does not discriminate asymptomatic infection from symptomatic leprosy. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017;87(4):328-334.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os linfócitos TH17 estão com a sua frequência elevada nas formas clínicas paucibacilares da hanseníase mesmo na ausência de reações hansênicas, corroborando nossos resultados de estudo anterior realizado.
- Os linfócitos Tregs convencionais (CD4+CD25+FOXP3+CCR5^{-/-}) estão presentes em todas as formas clínicas de hanseníase, contudo, sem apresentar diferenças estatisticamente significantes entre as formas polares da doença.
- Os linfócitos TregsCCR5^{+/+} (CD4+CD25+FOXP3+CCR5^{+/+}) estão presentes em todas as formas clínicas de hanseníase estando com a frequência significativamente aumentada nos pacientes com hanseníase virchowiana em comparação com aqueles com a forma clínica tuberculóide.
- CCL2 encontra-se com baixa expressão e sem apresentar significância estatística entre as formas clínicas e operacionais da hanseníase, apesar de maior expressão em pacientes virchovianos.
- CCL5 apresentou uniforme expressão em todas as formas clínicas e operacionais da hanseníase, sem apresentar significância estatística entre os grupos, demonstrando potencial para se tornar um biomarcador capaz de contribuir no diagnóstico da doença. Falar que está aumentada também no basal
- CXCL8 (IL-8) demonstrou expressão significativa entre as formas polares da doença apresentando-se com expressão aumentada em pacientes multibacilares, com potencial a ser explorado como um biomarcador capaz de verificar a progressão da doença e distinguir pacientes paucibacilares de multibacilares. Por esta razão pode vir a colaborar como um teste diagnóstico para pacientes paucibacilares.
- CXCL9, assim como a IL-8 também foi expressa com significância entre as formas polares do espectro clínico da hanseníase, tendo sua expressão reduzida quando estimulada com o BCG, nos grupos tuberculóides podendo colaborar para verificação das estratégias atuais de imunoprevenção e possivelmente como um biomarcador de infecção subclínica.
- CXCL10 somente distinguiu os grupos estudados quando comparados com os estímulos utilizados neste estudo, tanto na classificação clínica quanto na classificação operacional da hanseníase e, por esta razão, não demonstrou ser um potencial

biomarcador para realizar a distinção entre a classificação clínica e operacional de pacientes com hanseníase.

REFERÊNCIAS

- ALCAÏS, A. et al. Genetic dissection of immunity in leprosy. **Curr Opin Immunol**. V. 17, n. 1, p. 44-48, fev. 2005.
- ANDRADE, P. R. et al. Type 1 reaction in leprosy: a model for a better understanding of tissue immunity under an immunopathological condition. **Expert Rev Clin Immunol**. V. 11, n. 3, p. 391-407, mar. 2015.
- ARRUDA-SILVA, F. et al. (2017). Human Neutrophils Produce CCL23 in Response to Various TLR-Agonists and TNF α . **Front Cell Infect Microbiol**. V. 7, art. 176, mai. 2017. 7: 176.
- BARRETO J.G.S. et al. High rates of undiagnosed leprosy and subclinical infection amongst school children in the Amazon Region. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. V. 107 Suppl 1, p. 60-67, dez. 2012.
- BENJAK, A. et al. Phylogenomics and antimicrobial resistance of the leprosy bacillus *Mycobacterium leprae*. **Nat Commun** v. 9, n. 1, art. 352, jan. 2018.
- BERRINGTON, W.R. et al. Differential dermal expression of CCL17 and CCL18 in tuberculoid and lepromatous leprosy. **PloS Negl Trop Dis** v. 8 n. 11, e3263, nov 2014.
- BINTI MOHD AMIR, N.A.S. et al. Evidence for the Existence of a CXCL17 Receptor Distinct from GPR35. **J Immunol**. V. 201 n. 2, p. 714-724, jul. 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública : manual técnico-operacional [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 58 p. : il. Disponível em: <www.saude.gov.br/svs>. ISBN 978-85-334-2348-0. Acesso em 30/07/2022.

BROWN-ELLIOTT B.A., NASH K.A., WALLACE R.J. JR. Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanisms, and therapy of infections with nontuberculous mycobacteria. **Clin Microbiol Rev.** v. 25 n. 3, p. 545-582, jul. 2012.

CAMARGO J. F. et al. CCR5 expression levels influence NFAT translocation, IL-2 production, and subsequent signaling events during T lymphocyte activation. **J Immunol.** V. 182 n. 1, p. 171-182, jan. 2009.

CAMBAU, E. et al. Antimicrobial resistance in leprosy: results of the first prospective open survey conducted by a WHO surveillance network for the period 2009-15. **Clin Microbiol Infect.** V. 24 n. 12, p. 1305-1310, dez. 2018.

CAMBAU E., SOUGAKOFF W., JARLIER V. Amplification and nucleotide sequence of the quinolone resistance-determining region in the gyrA gene of mycobacteria. **FEMS Microbiol Lett.** V. 116 n. 11, p. 49-54, fev. 1994.

CAO, W. et al. Mycobacterium tuberculosis antigen Wag31 induces expression of C-chemokine XCL2 in macrophages. **Curr Microbiol.** V. 57 n. 3, p. 189-194, set. 2008.

CARVALHO, R. S. et al. Early detection of M. leprae by Qpcr in untreated patients and their contacts: results for nasal swab and palate mucosa scraping. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** V. 37 n. 10, p. 1863-1867, out. 2018.

CHANG, C. C. et al. Chemokine levels and chemokine receptor expression in the blood and the cerebrospinal fluid of HIV-infected patients with cryptococcal meningitis and cryptococcosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome. **J Infect Dis.** V. 208 n. 10, p. 1604-1612, nov. 2015.

CHEN TS, DRUTZ DJ, WHELAN GE. Hepatic granulomas in leprosy. Their relation to bacteremia. **Arch Pathol Lab Med.** V. 100 n. 4, p. 182-185, abr. 1976.

DA PAZ, W. S. et al. Impact of the COVID-19 pandemic on the diagnosis of leprosy in Brazil: An ecological and population-based study. **Lancet Reg Health Am.** N. 9 art. 100181, mai. 2022.

DANG, A. T. et al. Autophagy links antimicrobial activity with antigen presentation in Langerhans cells. **JCI Insight**. V. 4 n. 8, e126955, abr. 2019.

DAS, S. et al. Immune subversion by *Mycobacterium tuberculosis* through CCR5 mediated signaling: involvement of IL-10. **PloS One**. V. 9 n. 4, e92477, abr. 2014.

DAVILA, M. L., et al. CCL27 is a crucial regulator of immune homeostasis of the skin and mucosal tissues. **IScience**. V. 25 n. 6, art. 104426, mai. 2018. **25**(6): 104426.

DE ALMEIDA-NETO et al. TH17 cells, interleukin-17 and interferon- γ in patients and households contacts of leprosy with multibacillary and paucibacillary forms before and after the start of chemotherapy treatment. **J Eur Acad Dermatol Venereol**. V. 29 n. 7, p. 1354-1361, jul. 2015.

DE SOUSA, J. R. et al. Immunohistochemical characterization of the M4 macrophage population in leprosy skin lesions. **BMC Infect Dis**. V. 18 n. 1, p. 576, nov. 2018.

DIOGENES, M. J. et al. The Lucio-Alvarado-Latapi form of leprosy. **Lepr Rev**. v. 72 n. 3, p. 360-362, set. 2001.

DOZ-DEBLAUWE, É. Et al. CR3 Engaged by PGL-I Triggers Syk-Calcineurin-NFATc to Rewire the Innate Immune Response in Leprosy. **Front Immunol**. N. 10 art. 2913, eCollection, dez 2019.

FAKHOURI, R., M. N. SOTTO, M. I. MANINI, L. C. MARGARIDO. Nodular leprosy of childhood and tuberculoid leprosy: a comparative, morphologic, immunopathologic and quantitative study of skin tissue reaction. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**. V. 71 n. 3, p. 218-226, set. 2003.

FERNANDES, C. et al. Increased frequency of CD4 and CD8 regulatory T cells in individuals under 15 years with multibacillary leprosy. **PloS One**. V. 8 n. 11, e79072, nov. 2013.

FERREIRA, H., et al. Potential Role of CXCL10 in Monitoring Response to Treatment in Leprosy Patients. **Front Immunol**. V. 12, art. 662307, jul. 2021.

FERRERO M.R., TAVARES L.P., GARCIA C.C. The Dual Role of CCR5 in the Course of Influenza Infection: Exploring Treatment Opportunities. **Front Immunol.** V. 12, art. 826621, jan 2022.

FILES, D. C. et al. Rationale of using the dual chemokine receptor CCR2/CCR5 inhibitor cenicriviroc for the treatment of COVID-19.” **PloS Pathog.** V. 18 n. 6, e1010547, jun. 2022.

GELUK, A., et al. New biomarkers with relevance to leprosy diagnosis applicable in areas hyperendemic for leprosy. **J Immunol.** V. 188 n. 10, p. 4782-4791 mai. 2012.

GIBBS K.D., SCHOTT B.H., Ko, D.C. The Awesome Power of Human Genetics of Infectious Disease. **Annu Rev Genet.** Doi: 10.1146/annurev-genet-080320-010449. [Online ahead of print], jun 2022.

GILLIS, T. P., WILLIAMS, D. L. Dapsone resistance in *Mycobacterium leprae*. **Lepr Rev.** v. 71 Suppl: S91-95, 2000.

GOIS, B. M. (2022). Regulatory T cells in acute and chronic human Chikungunya infection. **Microbes Infect.** V. 24, n.3, art.104927, abr.-mai., 2022.

GRIFFITH, J.W., SOKOL, C.L., LUSTER, A.D. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. **Annu Rev Immunol.** V. 32, p. 659-702, 2014.

HAN, X. Y. Detection of the Leprosy Agent *Mycobacterium lepromatosis* in South America and Europe. **Am J Trop Med Hyg.** V. 96, n. 1, art. 260, jan 2017.

HAN, X. Y. et al. A new *Mycobacterium* species causing diffuse lepromatous leprosy. **Am J Clin Pathol.** V. 130, n. 6, p. 856-864, dez. 2008.

HAN, X. Y. et al. The leprosy agents *Mycobacterium lepromatosis* and *Mycobacterium leprae* in Mexico. **Int J Dermatol.** V. 51 n. 8, p. 952-959, ago. 2012.

HAO, J. et al. Expression and clinical significance of CXCL17 and GPR35 in endometrial carcinoma. **Anticancer Drugs.** V. 33, n. 5, p. 467-477, jun. 2022.

HASAN, Z. et al. (2006). "Elevated serum CCL2 concomitant with a reduced mycobacterium-induced response leads to disease dissemination in leprosy. **Scand J Immunol.** V. 63, n. 3, p. 241-247, mar. 2006.

HASAN, Z. et al. Leprosy patients with lepromatous disease have an up-regulated IL-8 response that is unlinked to TNF-alpha responses. **Int J Lepr Other Mycobact Dis.** V. 72, n. 1, p. 35-44, mar. 2004.

JENKINS, N. E. et al. The effect of Plasmodium falciparum infection on expression of monocyte surface molecules. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** V. 100, n. 11, p. 1007-1020, nov. 2006.

JIAO, X. et al. Recent Advances Targeting CCR5 for Cancer and Its Role in Immunology. **Cancer Res.** V. 79, n. 19, p. 4801-4807, out. 2019.

KALLIKOURDIS, M. et al. Alloantigen-enhanced accumulation of CCR5+ 'effector' regulatory T cells in the gravid uterus. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 104, n. 2, p. 594-599, jan. 2007.

KIM, I. S., et al. Differential CCR1-mediated chemotaxis signaling induced by human CC chemokine HCC-4/CCL16 in HOS cells. **FEBS Lett.** V. 579, n. 27, p. 6044-6048, nov. 2005.

KIRKALDY, A. A., et al. Expression of CC and CXC chemokines and chemokine receptors in human leprosy skin lesions. **Clin Exp Immunol.** V. 134, n. 3, p. 447-453, dez. 2003.

KORBECKI, J., et al. The Effect of Hypoxia on the Expression of CXC Chemokines and CXC Chemokine Receptors-A Review of Literature. **Int J Mol Sci.** v. 22, n. 2, art. 843 jan. 2021.

KRUTZIK, S. R., et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. **Nat Med.** V. 9, n. 5, p. 525-532, mai. 2003.

LANGUILLON, J., J. M. KLEIN, GIRAUDEAU, P. Treatment of leprous reaction of the erythema nodosum type with thalidomide (N-phthalimidoglutaramide). **Bull Soc Med Afr. Noire Lang Fr.** V. 13, n. 1, p. 116-118, 1968.

LEE, J. S., KIM I. S. Leukotactin-1/CCL15 induces cell migration and differentiation of human eosinophilic leukemia EoL-1 cells through PKCdelta activation. **Mol Biol Rep.** v. 37, n. 5, p. 2149-2156, jun. 2010.

LEI, Y., TAKAHAMA, Y. XCL1 and XCR1 in the immune system. **Microbes Infect.** V. 14, n. 3, p. 262-267, mar. 2012.

LEW, W., et al. Serum monocyte chemoattractant protein-1 is elevated in lepromatous leprosy patients with high bacterial indices. **Int J Lepr Other Mycobact Dis.** V. 70, n. 2, p. 129-131, jun. 2002.

LIU, P. T., et al. MicroRNA-21 targets the vitamin D-dependent antimicrobial pathway in leprosy. **Nat Med.** V. 18, n. 2, p. 267-273, jan. 2012.

LU, J., et al. CXCL14 as an emerging immune and inflammatory modulator. **J Inflamm (Lond).** V. 13, n. 1, eCollection, jan. 2016.

LUSTER, A. D. Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation. **N Engl J Med.** V. 338, n. 7, p. 436-445, fev. 1998.

MADRID. Propositions of a group of leprologists of Madrid regarding the classification of leprosy. **Actas Dermosifiliogr.** V. 44, n. 9, p. 706-708, jun. 1953.

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, M., MONTEAGUDO C. CCL27 Signaling in the Tumor Microenvironment. **Adv Exp Med Biol.** N. 1302, p. 113-132, 2021.

MASSONE, C., et al. T regulatory cells and plasmacytoid dendritic cells in hansen disease: a new insight into pathogenesis? **Am J Dermatopathol.** V. 32, n. 3, p. 251-256, mai. 2010.

MAURANO, Flávio. Tratado de Leprologia – História da lepra no Brasil e sua distribuição geográfica. Rio de Janeiro: **Serviço Nacional de Lepra**, 1944.

MAYMONE, M. B. C., Leprosy: Clinical aspects and diagnostic techniques. **J Am Acad Dermatol**. V. 83 , n. 1, p. 1-14, jul. 2020.

MEDEIROS, M. F., et al. CXCL10, MCP-1, and other immunologic markers involved in neural leprosy. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**. V. 23 , n. 3, p. 220-229, jul. 2020.

MENDONÇA, V. A., et al. Expression of the chemokine receptor CXCR4 on lymphocytes of leprosy patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. V. 44 , n. 12, p. 1256-1260, dez. 2011.

MENDONÇA, V. A., et al. Plasma levels of chemokines during leprosy specific treatment. **Acta Trop**. V. 113 , n. 2, p. 151-154, fev. 2010.

MENDONÇA, V. A., et al. Differentiation of patients with leprosy from non-infected individuals by the chemokine eotaxin/CCL11. **Am J Trop Med Hyg**. V. 77 , n. 3, p. 547-550, set. 2007.

MENDONÇA, V. A., et al. Analysis of chemokine receptors on the surface of circulating leukocytes of individuals infected with *Mycobacterium leprae*: preliminary results. **Rev Soc Bras Med Trop**. V. 41 , Suppl 2, p. 95-98, 2008.

MENKE, H. E., W. R. FABER, PIETERS T. Charles Louis Drogat Landré and Gerhard Henrik Armauer Hansen; contribution from a Dutch colony to the discovery of the leprosy bacterium. **Lepr Rev**. v. 81 , n. 1, p. 82-86, mar. 2010.

MILLER, M. C., MAYO K. H. Chemokines from a Structural Perspective. **Int J Mol Sci**. V. 18 , n. 10, art. 2088, out. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis – DCCI. Boletim Epidemiológico Especial. Número Especial, 51p. jan. 2020. Disponível em:

<<http://www.aids.gov.br/system/tdf/pub/2016/67123/boletim-hanseniaze-2020-web.pdf?file=1&type=node&id=67123&force=1>>. Acesso em 30/07/2022.

MITRA, D. K., et al. Induction of lepromin reactivity in cured lepromatous leprosy patients: impaired chemokine response dissociates protective immunity from delayed type hypersensitivity. **Microbes Infect.** V. 11 , n. 14-15, p. 1122-1130, dez. 2009.

MIZUKAMI, Y., et al. CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3⁺ regulatory T cells in gastric cancer. **Int J Cancer.** V. 122 , n. 10, p. 2286-2293, mai. 2008.

MOHAN T, DENG L, WANG BZ. CCL28 chemokine: An anchoring point bridging innate and adaptive immunity. **Int Immunopharmacol.** V. 51 , p. 165-170, out. 2017.

MOREIRA, A. P., et al. CCR5-dependent regulatory T cell migration mediates fungal survival and severe immunosuppression. **J Immunol.** V. 180 , n. 5, p. 3049-3056, mar. 2008.

NAAFS B, VAN HEES CL. Leprosy type 1 reaction (formerly reversal reaction). **Clin Dermatol.** V. 34 , n. 1, p. 37-50, jan.-fev. 2016.

OTTERSBACH, K., et al. Macrophage inflammatory protein-1alpha uses a novel receptor for primitive hemopoietic cell inhibition. **Blood.** V. 98 , n. 12, p. 3476-3478, dez. 2001.

PANDUR, E., et al. Modulatory Effects of Fractalkine on Inflammatory Response and Iron Metabolism of Lipopolysaccharide and Lipoteichoic Acid-Activated THP-1 Macrophages. **Int J Mol Sci.** v. 23 , n. 5, art. 2629, fev. 2022.

PARENTE, J. N., et al. T regulatory cells (TREG)(TCD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) distribution in the different clinical forms of leprosy and reactional states. **An Bras Dermatol.** V. 90 , n. 1, p. 41-47, jan. – fev. 2015.

QUEIROZ, E. A., et al. CCL2 and IFN- γ serum levels as biomarkers for subclinical infection in household contacts of leprosy patients. **Microb Pathog.** V. 150 , art. 104725, jan. 2021.

RAMOS JM, ROMERO D, BELINCHÓN I. Epidemiology of Leprosy in Spain: The Role of the International Migration. **PloS Negl Trop Dis.** V. 10, n. 3, eCollection art. 0004321, mar. 2016.

RAO, P. N., SUNEETHA, S. Pure neuritic leprosy: Current status and relevance. **Indian J Dermatol Venereol Leprol.** V. 82 , n. 3, p. 252-261, mai. 2016.

REJA, A. H. H., et al. Genomic Reduction at TTC Repeats in the Bacterial Genome of Treated Cases of Hansen's Disease: A Possible Survival Mechanism of Mycobacterium leprae. **Indian J Dermatol.** V. 63 , n. 6, p. 449-454, nov. – dec., 2018.

RIDLEY, D. S., JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **Int J Lepr Other Mycobact Dis.** V. 34 , n. 3, p. 255-273, jul. – set, 1966.

SADHU, S., et al. Reciprocity between Regulatory T Cells and Th17 Cells: Relevance to Polarized Immunity in Leprosy. **PloS Negl Trop Dis.** V. 10, n. 1, eCollection art. 0004338, jan. 2016.

SAINI, C., RAMESH, V., NATH, I. CD4⁺ Th17 cells discriminate clinical types and constitute a third subset of non Th1, Non Th2 T cells in human leprosy. **PloS Negl Trop Dis.** V. 7, n. 7, eCollection art. 0002338, jul. 2013.

SAINI, C., et al. Elevated IL-6R on CD4(+) T cells promotes IL-6 driven Th17 cell responses in patients with T1R leprosy reactions. **Sci Rep.** v. 10, n. 1, art. 15143, set. 2020.

SAINI, C., et al. IL-21 plays an important role in modulating “Th17-Treg” cell axis in leprosy Type 1 reactions. **Cytokine.** V. 152, art. 155821, abr. 2022.

SALGADO, C. G., et al. miRNome Expression Analysis Reveals New Players on Leprosy Immune Physiopathology. **Front Immunol.** V. 9, eCollection art. 00463, mar. 2018.

SANTOS, D. F. D., et al. Revisiting primary neural leprosy: Clinical, serological, molecular, and neurophysiological aspects. **PloS Negl Trop Dis.** V. 11, n. 11, eCollection art. 0006086, nov. 2017.

SANJABI S., OH S.A., LI M.O. Regulation of the Immune Response by TGF- β : From Conception to Autoimmunity and Infection. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** V. 9, n. 6, art. N. 022236, jun, 2017.

SCHLESINGER, L. S., HORWITZ, M. A. Phagocytosis of Mycobacterium leprae by human monocyte-derived macrophages is mediated by complement receptors CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18), and CR4 (CD11c/CD18) and IFN-gamma activation inhibits complement receptor function and phagocytosis of this bacterium. **J Immunol.** V. 147, n. 6, p. 1983-1994, set. 1991.

SCHOENMAKERS, A., et al. The State of Affairs in Post-Exposure Leprosy Prevention: A Descriptive Meta-Analysis on Immuno- and Chemo-Prophylaxis. **Res Rep Trop Med.** V. 11, n. 11, eCollection art. 190300, p. 97-117, out. 2020.

SCHULZ-KNAPPE, P., et al. HCC-1, a novel chemokine from human plasma. **J Exp Med.** V. 183, n. 1, p. 295-299, jan. 1996.

SCHURR E, ALCAÏS A, DE LÉSÉLEUC L, ABEL L. Genetic predisposition to leprosy: A major gene reveals novel pathways of immunity to Mycobacterium leprae. **Semin Immunol.** V. 18, n. 6, p. 404-410, dez. 2006.

SHARMA, I., et al. Is CXCL10/CXCR3 axis overexpression a better indicator of leprosy type 1 reaction than inducible nitric oxide synthase? **Indian J Med Res.** V. 142, n. 6, p. 681-689, dez. 2015.

SHARMA, M. Chemokines and their receptors: orchestrating a fine balance between health and disease. **Crit Rev Biotechnol.** V. 30, n. 1, p. 1-22, mar. 2010.

SHETTY, V. P., et al. Viability and drug susceptibility testing of M. leprae using mouse footpad in 37 relapse cases of leprosy. **Int J Lepr Other Mycobact Dis.** V. 71, n. 3, p. 210-217, set. 2003.

SHI, C., et al. Elevated IL-23 in skin promotes IL-23 derived Th17 responses in leprosy patients. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. *On line* antes da impressão, jun 2022. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1440-1681.13689#accessDenialLayout>>.

Acesso em 30/07/2022.

SHIMIZU, J., YAMAZAKI, S., SAKAGUCHI, S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. **J Immunol**. V. 163, n. 10, p. 5211-5218, nov. 2015.

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

SPINNEN, J., et al. Therapies with CCL25 require controlled release via microparticles to avoid strong inflammatory reactions. **J Nanobiotechnology**. V. 19, n. 1, art. 83, mar. 2021.

STEEN, A., et al. Biased and g protein-independent signaling of chemokine receptors. **Front Immunol**. V. 5, eCollection art. 277, jun. 2014.

STEFANI, M. M., et al. Potential plasma markers of Type 1 and Type 2 leprosy reactions: a preliminary report. **BMC Infect Dis**. V. 9, art. 75, mai. 2009.

TAKAHASHI, T., et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. **J Exp Med**. V. 192, n. 2, p. 303-310, jul. 2000.

TSUJIHANA, K., et al. Circadian protection against bacterial skin infection by epidermal CXCL14-mediated innate immunity. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 119, n. 25, art. 2116027119, jun. 2022.

VAN EEKEREN, L. E., et al. People with HIV have higher percentages of circulating CCR5+ CD8+ T cells and lower percentages of CCR5+ regulatory T cells. **Sci Rep**. v. 12, n. 1, art. 11425, jul. 2022.

VARGAS-OCAMPO, F. Diffuse leprosy of Lucio and Latapí: a histologic study. **Lepr Rev.** v. 78, n. 3, p. 248-260, set. 2007.

VIOLA, A., LUSTER, A. D. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** V. 48, n. 1, p. 171-197, fev. 2008.

WADE, H. W. (1963). "The Histoid Variety Of Lepromatous Leprosy. **Int J Lepr.** N. 31, p. 129-142, abr. – jun. 1963.

WANG, J., et al. CCR2/CCR5 inhibitor permits the radiation-induced effector T cell infiltration in pancreatic adenocarcinoma. **J Exp Med.** V. 219, n. 5, art. 1631, mai. 2022.

WANG, Q., et al. CCL22-Polarized TAMs to M2a Macrophages in Cervical Cancer In Vitro Model. **Cells.** V. 11, n. 13, art. 2027, jun. 2022.

WANG, W., et al. CCL21 contributes to Th17 cell migration in neuroinflammation in obese mice following lead exposure. **Toxicol Lett.** V. 366, p. 7-16, *On line* antes da impressão, ago. 2022. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S037842742200128X?via%3Dihub>>. Acesso em 30/07/2022.

WATANABE, S., YAMADA, Y., MURAKAMI H. Expression of Th1/Th2 cell-related chemokine receptors on CD4(+) lymphocytes under physiological conditions. **Int J Lab Hematol.** V. 42, n. 1, p. 68-76, fev. 2020.

WEMAMBU, S. N., et al. Erythema nodosum leprosum: a clinical manifestation of the Arthus phenomenon. **Lancet.** V. 2, art. 7627, p. 933-935, nov. 1969.

WHITE, C., FRANCO-PAREDES, C. Leprosy in the 21st century. **Clin Microbiol Rev.** v. 28, n. 1, p. 80-94, jan. 2015.

WHO (World Health Organization). Guidelines for the diagnosis, treatment and prevention of leprosy. World Health Organization. Regional Office for South-East Asia. 86p. ago. 2018.

Disponível em <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274127/9789290226383-eng.pdf?sequence=58&isAllowed=y>>. Acesso em 30/07/2022.

_____. Global leprosy (Hansen disease) update, 2020: impact of COVID-19 on global leprosy control –Situation de la lèpre (maladie de Hansen) dans le monde, 2020: impact de la COVID-19 sur les activités mondiales de lutte contre la lèpre. **Weekly Epidemiological Record= Relevé épidémiologique hebdomadaire**. V. 96 , n. 36, p. 421-444, 2020. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/345051>>. Acesso em 30/07/2022.

WOODWARD DAVIS, A. S., et al. The human tissue-resident CCR5(+) T cell compartment maintains protective and functional properties during inflammation. **Sci Transl Med**. V. 11, n. 521, art. 8718, dez. 2019.

WYSOCKI, C. A., et al. Critical role for CCR5 in the function of donor CD4+CD25+ regulatory T cells during acute graft-versus-host disease. **Blood**. V. 106, n. 9, p. 3300-3307, nov. 2005.

XAVIER, M.B. et al. The expression of FOXP3 in lesions of several forms of leprosy in patients co-infected with HIV. **PloS Negl Trop Dis**. V. 15, n. 11, eCollection art. 0009887, nov. 2021.

YASMIN, H., et al. Pathogenesis and Host Immune Response in Leprosy. In: Kishore, U. (eds) Microbial Pathogenesis. **Adv Exp Med Biol**. V. 1313, p. 155-177, 2021.

YURCHENKO, E., et al. CCR5-dependent homing of naturally occurring CD4+ regulatory T cells to sites of Leishmania major infection favors pathogen persistence. **J Exp Med**. V. 203, n. 11, p. 2451-2460, out. 2006.

ZAVALA K, GOTTLIEB C.A., TELES R.M., et al. Intrinsic activation of the vitamin D antimicrobial pathway by M. leprae infection is inhibited by type I IFN. **PloS Negl Trop Dis**. V. 12, n. 10, eCollection art. 00068158, out. 2018.

ZHANG, F., et al. Decreased MIP-3 α Production from Antigen-Activated PBMCs in Symptomatic HIV-Infected Subjects. **Pathogens**. V. 11, n. 1, art. 7, dez. 2021.

ANEXO A – COMPROVANTES DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 1

Microbes and Infection

Editorial Manager

HOME • LOGIN • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS • POLICIES

Role: Author Username: francisban@gmail.com

← Submissions Being Processed for Author

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Results per page: 10

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
View Submission Send E-mail		The expression of TH17 cells, T Regulatory cells CCR5-/-, and T Regulatory cells CCR5+/- in the polar clinical-immunological spectrum of leprosy	Aug 17, 2022	Aug 17, 2022	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Results per page: 10

Submission Confirmation

Calha de entrada x

Microbes and Infection em@editorialmanager.com para mim

22:15 (há 9 minutos)

inglês > português Traduzir mensagem Desativar para: inglês x

Dear Francisco,

We have received your article "The expression of TH17 cells, T Regulatory cells CCR5-/-, and T Regulatory cells CCR5+/- in the polar clinical-immunological spectrum of leprosy" for consideration for publication in Microbes and Infection.

Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned.

To track the status of your paper, please do the following:

- Go to this URL: <https://www.editorialmanager.com/micinf/>
- Enter these login details:
Your username is: francisban@gmail.com
If you need to retrieve password details, please go to:
http://ees.elsevier.com/micinf/automail_query.asp
- Click [Author Login]
This takes you to the Author Main Menu.
- Click [Submissions Being Processed]

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Editorial Manager
Microbes and Infection

ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 2

Experimental Dermatology
Research Article

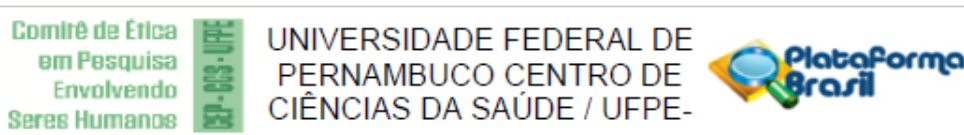
ROLE OF CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9, and CXCL10 CHEMOKINES IN THE PATHOGENESIS OF LEPROSY

Submission Status	Submitted
Submitted On	19 August 2022 by Francisco Almeida
Submission Started	19 August 2022 by Francisco Almeida

This submission has been sent to the editorial office and cannot be edited. Further instructions will be emailed to you from Manuscript Central.

[View Submission Overview](#)

ANEXO C – PARECER CONSUBSTANCIADO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Determinação da frequência de células T regulatórias e verificação da associação entre a produção das quimiocinas CXCL8, CCL2, CCL5, CXCL10, CXCL9 e expressão do receptor CCR5 com as formas clínicas da hanseníase.

Pesquisador: BEATRIZ DA CUNHA COSTA SOUZA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 37758814.1.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 879.625

Data da Relatoria: 19/11/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um Projeto para Tese de doutorado, da Farmacêutica Beatriz da Cunha Costa Souza, aluna do programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, que está sob a orientação da Profa. Dra. Vlândia Maria Assis Costa, que buscará investigar se existe uma associação entre a frequência das células T, e a produção das quimiocinas CXCL8, CCL2, CCL5, CXCL10, CXCL9 e a expressão do receptor CCR2, quantificados a partir de cultura de células de sangue periférico, em pacientes com hanseníase.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a presença de células T reguladoras bem como a produção das quimiocinas CXCL8, CCL2, CCL5, CXCL10, CXCL9 e expressão do receptor CCR5 e verificar se há associação com as formas clínicas tuberculóide e virchowiana da hanseníase.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisadora deixa claro os riscos e benefício de sua pesquisa, estando os mesmos adequados a sua proposta.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

**Comitê de Ética
em Pesquisa
Envolvendo
Serres Humanos**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-**



Continuação do Parecer: 879.625

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo analítico do tipo corte transversal, em que a amostra será composta de 30 indivíduos, sendo 16 hansênicos tuberculóides (TT) e 14 hansênicos virchowianos (VV), que nunca realizaram tratamento para a doença. Estes serão recrutados no serviço de Dermatologia do HC-UFPE, após sua consulta médica e diagnóstico da doença. Estes serão convidados para participarem da pesquisa dando seu consentimento através do TCLE. Em seguida, serão coletados 10mL de sangue periférico, que serão levados para o Laboratório de Imunologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – UFPE com a colaboração do Departamento de Imunologia e no Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz, para o desenvolvimento dos experimentos laboratoriais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora Responsável anexou:

- 1- Carta de anuência do Serviço de Dermatologia do HC.
- 2- Carta de anuência do Lika.
- 3- Folha de rosto devidamente preenchida e carimbada pelo gerente de pesquisa do HC.
- 4- Orçamento,
- 5- O TCLE.
- 5- Cronograma está compatível com projeto;
- 6- O curriculum vitae da pesquisadora e orientadora estão anexados.

Recomendações:

Sem Recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O Projeto poderá ser executado desde que a pesquisadora apresente:

- 1- Carta de anuência do Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz;
- 2- Colocar na Plataforma Brasil, no campo da metodologia como e onde serão recrutado os participantes, como também onde serão processadas as amostras.
- 3- O TCLE precisa melhorar a linguagem, está muito técnica e o participante terá dificuldade de entendimento.
- 4- Colocar os objetivos secundários na plataforma Brasil, pois só encontra-se no projeto de formato Word.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588

E-mail: oepocs@ufpe.br

**Comitê de Ética
em Pesquisa
Envolvendo
Serres Humanos**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-**



Continuação do Parecer: 879.625

Situação do Parecer:

Pendente

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o mesmo encontra-se em pendência. O(A) pesquisador(a), deverá atender as considerações do parecer consubstanciado e corrigindo as pendências indicadas, diretamente no projeto de pesquisa(PBrasil) e no projeto completo em WORD e, caso necessário, no modelo do TCLE- estacando todas as modificações com MARCADOR AMARELO, nos 2(dois)projetos. O (A) pesquisador (a) tem 60 dias para responder aos quesitos formulados pelo CEP em seu parecer. Após esse prazo, o projeto será considerado arquivado (res.466/12).

RECIFE, 20 de Novembro de 2014

Assinado por:
GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588

E-mail: oepocs@ufpe.br