



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Otto Castro Nogueira

Estudo de subpopulações de linfócitos B na hanseníase

Rio de Janeiro

2017

Otto Castro Nogueira

Estudo de subpopulações de linfócitos B na hanseníase

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Dr. Geraldo Moura Pereira Batista
Co-orientadora Dra. Cristiana Santos de Macedo

Rio de Janeiro

2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

N 778 Nogueira, Otto Castro.

Estudo de subpopulações de linfócitos B na hanseníase / Otto Castro
Nogueira. – 2017.
52 f.

Orientador: Dr. Geraldo Moura Pereira Batista
Coorientadora Dra. Cristiana Santos de Macedo

Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Universidade do
Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Hanseníase - Teses. 2. Linfócitos – Teses. 3. Citometria de fluxo -
Teses. 4. Linfócitos B. I. Batista, Geraldo Moura Pereira. II. Macedo,
Cristiana Santos de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616-002.73

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta
dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Otto Castro Nogueira

Estudo de subpopulações de linfócitos B na hanseníase

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 22 de maio de 2017.

Orientador Prof. Dr. Geraldo Moura Pereira Batista

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Co-orientadora Dra. Cristiana Santos de Macedo

Fundação Oswaldo Cruz

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Luciana Rodrigues

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Ana Luiza de Mattos Guaraldi

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Roberta Olmo Pinheiro

Fundação Oswaldo Cruz

Prof.^a Dra. Wania Ferraz Pereira Manfro

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Carla Cardozo Pinto de Almeida

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Rio de Janeiro

2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, por ter me dado a permissão de chegar até aqui, e por toda a força concedida na concretização desse sonho.

Dentre todos, agradeço em primeiro lugar a quem me ajudou a integrar esse ambiente. Raquel Correa, muito obrigado pela amizade, estímulo à pesquisa e pelo empurrãozinho dado para que eu conhecesse e integrasse o grupo de pesquisa.

Agradeço também à minha família e à minha amada Rachel Araujo, pelo amor, compreensão e palavras reconfortantes nos momentos difíceis.

Ao longo destes 2 anos do meu mestrado tive a oportunidade de conhecer e conviver com muitas pessoas, as quais além de contribuírem direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, também compartilharam comigo seus conhecimentos e amizade. A essas pessoas ofereço minha gratidão, pois esta dissertação é também fruto desta troca e, portanto, é obra de todos nós – Iris Alvin, Natasha Cabral, Fernanda Marques e Vilma Figueiredo.

Aos meus orientadores Dr Geraldo Pereira e Dra Cristiana Macedo, obrigada pela confiança depositada em mim desde o princípio.

Agradecimento muito especial à Dra Maria Cristina Vidal Pessolani, pelo investimento e por acreditar no meu trabalho.

Dra. Wania Ferraz Pereira Manfro, Dra. Roberta Olmo Pinheiro, Dra. Luciana Silva Rodrigues, Dra. Carla Cardozo Pinto de Almeida e Dra. Ana Luiza de Mattos Guaraldi agradeço a cortesia em aceitarem integrar a banca de exame desta dissertação.

E por fim, a Dra Mariana Gandini. Tem uma música do Renato Russo que diz o seguinte: “Quando tudo está perdido, sempre existe uma luz. ” É exatamente isso. Serei eternamente grato, muito obrigado por ser minha luz!

***Quando tudo está perdido
Sempre existe um caminho
Quando tudo está perdido
Sempre existe uma luz.***

Renato Russo

RESUMO

NOGUEIRA, Otto Castro. *Estudo de subpopulações de linfócitos B na hanseníase*. 2017. 52 f.. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

A hanseníase é, até os dias de hoje, um importante problema de saúde pública. Apesar da poliquimioterapia (PQT) ter reduzido de forma significativa a prevalência da doença de 5,4 milhões para algumas centenas de milhares, a incidência de novos casos continua ocorrendo nas regiões endêmicas. Embora representem apenas 1% a 7% dos leucócitos, os linfócitos B desempenham papéis importantes na defesa imunológica. Essas células podem, além de produzir anticorpos, apresentar antígenos e secretar diversas citocinas. Indivíduos com alterações nessas células podem desenvolver autoimunidade, câncer, imunodeficiências e alergias. O TLR9 possui um papel importante na indução de linfócitos B produtores de IL-10. Essas células são capazes de inibir a diferenciação de células T CD4⁺ virgens em T helper 1 e T helper 17, através da produção de agentes anti-inflamatórios. Além disso, existem poucos estudos referentes ao papel das subpopulações de linfócitos B na hanseníase. As subpopulações foram discriminadas com base na expressão de CD24 e CD38. Nossos resultados mostraram um indício de que os linfócitos B podem estar atuando na modulação da resposta imune em pacientes com hanseníase e de que essa modulação está ligada à capacidade que o paciente tem de responder ao *M. leprae*.

Palavras-chave: Hanseníase, Linfócito B, TLR9, Citometria de fluxo, CpG, Hlp.

ABSTRACT

NOGUEIRA, Otto Castro. *Study of subpopulations of B lymphocytes in leprosy*. 2017. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Leprosy is, to this day, a major public health problem. Although multidrug therapy (MDT) has significantly reduced the disease prevalence from 5.4 million to a few hundred thousand, the incidence of new cases continues to occur in endemic regions. Although they represent only 1% to 7% of leukocytes, B lymphocytes play important roles in immune defense. These cells may, in addition to producing antibodies, present antigens and secrete various cytokines. Individuals with defective changes in these cells may develop autoimmunity, cancer, immunodeficiencies and allergies. TLR9 plays an important role in the induction of IL-10 producing B lymphocytes. These cells are able to inhibit the differentiation of naive CD4 + T cells into T helper 1 and T helper 17 by producing anti-inflammatory agents. In addition, there are few studies on the role of B-cell subpopulations in leprosy, which were discriminated based on the expression of CD24 and CD38. Our results indicate that B lymphocytes may be acting in the modulation of the immune response in patients with leprosy and that this modulation is linked to the patient's ability to respond to *M. leprae*.

Keywords: Leprosy, B cell, TLR9, Flow cytometry, CpG, Hlp

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Distribuição geográfica dos novos casos de hanseníase, 2015.....	13
Gráfico 1–	Taxa de detecção geral de casos novos de hanseníase, estados, Brasil, 2015.....	14
Figura 2 –	Representação esquemática do perfil espectral da hanseníase baseada a classificação de Ridley e Jopling, 1966.....	16
Figura 3–	Morfologia do <i>M. leprae</i> , cultivo em pata de camundongo e tatu de nove bandas.....	17
Figura 4 -	Modelo esquemático dos componentes básicos da parede celular <i>M. leprae</i>	19
Figura 5 –	Estágios de desenvolvimento dos linfócitos B	26
Tabela 1_	Dados epidemiológicos dos doadores incluídos nesse estudo.....	35
Figura 6 –	Estratégia de seleção da região para analisar os linfócitos B em CMS totais	36
Figura 7 –	Frequência de linfócitos B CD19+ em pacientes e doadores saudáveis	37
Figura 8 –	Frequência de linfócitos B memória em pacientes e doadores saudáveis.....	39
Figura 9 –	Frequência de plasmoblastos em pacientes e doadores saudáveis	39
Figura 10 –	Frequência de linfócitos B em transição em pacientes e doadores saudáveis.....	40
Figura 11 –	Linfócitos T CD3+ em cultura com linfócitos T estimulados ou não com <i>M. leprae</i> e linfócitos B estimulados ou não com complexo CPG/HLP	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AID	Activation-induced cytidine deaminase
APRIL	A-proliferation inducing ligand
BAFF	B-cell activating factor
BCR	Receptor de célula B
CpG	Oligodeoxynucleotides
CR	Receptores de complemento
ENL	Eritema nodoso leproso
FO	Follicular
Foxp3	Forkhead Box P3
FSC-A	Forward scatter –area
FSC-H	Forward scatter - height
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos
IB	Índice bacilar
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
kD	Kilodalton
LILRA2	leukocyte Ig-like receptor
LL	Lepromatoso
LPS	Lipopolissacárido
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
MAMPs	Padrões moleculares associados a micróbios
MB	Multibacilar
MHC-II	Complexo principal de histocompatibilidade de classe II
MZ	Zona marginal
°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMPs	Padrões moleculares associados ao patógeno
PB	Paucibacilar
pDCs	Células dendríticas plasmocitoides

PGL-I	Glicolípídeo fenólico-I
PQT	Poliqumioterapia
SHM	Hipermutações somáticas
STAT3	Signal transducer and activator of transcription-3
Th1	Linfócito T helper-1
Th2	Linfócito T helper-2
TT	Tuberculóide polar

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	11
1	OBJETIVOS	30
1.1	Objetivo geral	30
1.2	Objetivos específicos	30
2	MATERIAIS E MÉTODOS	31
2.1	População estudada e critérios de inclusão	31
2.2	Separação e obtenção de células mononucleares de sangue periférico (cms) .	31
2.3	Análise de moléculas de superfície de membrana celular por citometria de fluxo	32
2.4	Separação celular e cultura de linfócitos B com CpG-HLP	32
2.5	Materiais e reagentes	33
2.5.1	<u>Meios de cultura e suplementos</u>	33
2.5.2	<u>Reagentes</u>	33
2.5.3	<u>Anticorpos</u>	33
2.6	Análise estatística	34
3	RESULTADOS	35
3.1	Dados epidemiológicos dos doadores incluídos no estudo	35
3.2	Determinação de subpopulações de linfócitos B por citometria de fluxo	35
3.3	Ativação de TLR9 em linfócitos B de pacientes multibacilares	40
3.3.1	<u>Análise da população de linfócitos T CD3+ e linfócitos T ativados CD3+CD25+</u> .	40
4	DISCUSSÃO	42
	REFERÊNCIAS	46

INTRODUÇÃO

Hanseníase e aspectos gerais

A hanseníase é uma das doenças humanas mais antigas que se tem conhecimento, cujos registros remontam a 4000 antes de Cristo em papiros egípcios (1). Estudos antigos apoiavam a hipótese de que a hanseníase tinha se originado na Índia e teria sido introduzida na Europa por soldados gregos que retornaram da campanha indiana de Alexandre, o grande. Porém, com o surgimento da tecnologia genômica comparativa, foi possível estabelecer relações genealógicas com maior precisão. Com o uso dessas tecnologias, Monot e seu grupo encontraram evidências de que as diferentes cepas do *Mycobacterium leprae* vieram de um ancestral comum que se originou no leste africano (2).

Esse mesmo estudo mostrou que a doença foi importada para o Brasil em navios negreiros oriundos da África durante o período colonial brasileiro, em que o tráfico de escravos era uma prática comum (2). Em 1700, com o crescimento do número de casos de hanseníase no Brasil, autoridades coloniais e entidades filantrópicas criaram a Santa Casa de Misericórdia para tratamento dos doentes, e também leprosários, que tinham como objetivo deixá-los longe da sociedade. No início do século XIX, as pessoas doentes eram discriminadas, perseguidas e isoladas, como aconteceu em 1713 no Recife, 1740 no Rio de Janeiro, 1771 em Minas Gerais, 1787 na Bahia, 1796 em Pernambuco e 1802 em São Paulo (3).

Na década de 1970, no Brasil, o dermatologista Abraão Rotberg iniciou uma campanha para substituir a nomenclatura médica lepra pelo termo hanseníase, em homenagem a Gerhard H. A. Hansen, descobridor do agente etiológico da hanseníase, com vista à integração social das pessoas atingidas pela doença. No mesmo período, ocorria no país o fim dos leprosários e a reorganização da rede pública de saúde por meio da assistência ambulatorial regionalizada. Nas décadas de 1980 e 1990, foi implantada a poliquimioterapia (PQT), bem como a descentralização do diagnóstico e vigilância na Atenção Primária de Saúde (4).

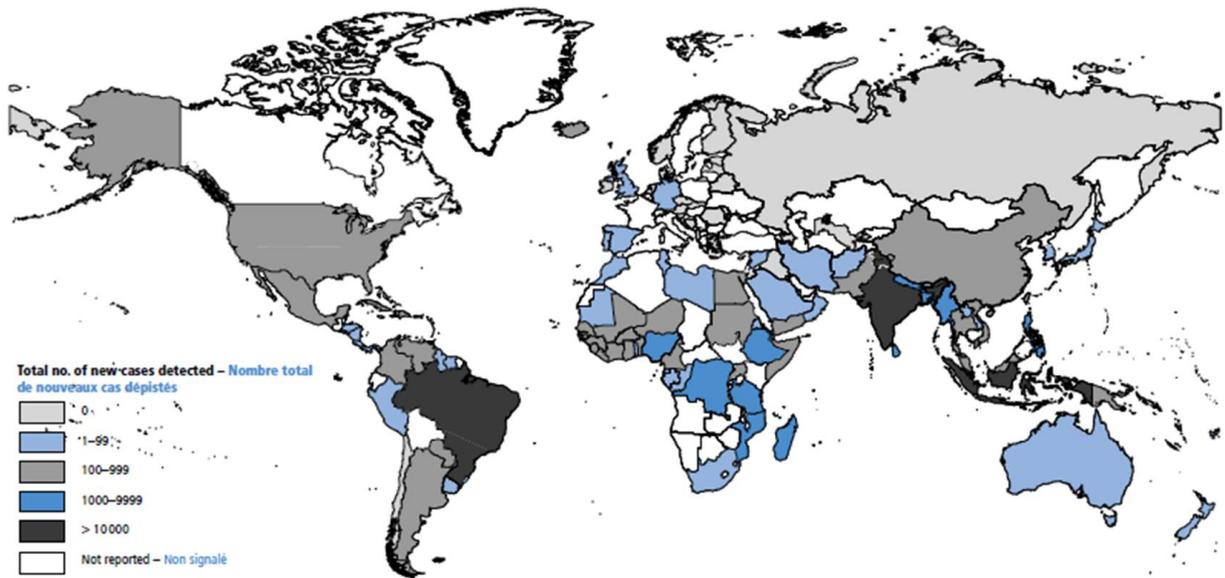
A hanseníase pode estar associada à distribuição geográfica, pobreza, condições higiênicas desfavoráveis e movimentos migratórios. As manifestações clínicas da doença contrastam com a baixa variabilidade do bacilo, sugerindo que a variação e a suscetibilidade à doença estariam associadas também à variabilidade genética do hospedeiro (5, 6). A fonte

mais importante de infecção são os doentes não tratados com alta carga bacilar, uma vez que seus contatos possuem um risco de adoecer dez vezes maior que a população geral (7). Além disso, a existência de bacilos em animais selvagens como o tatu de nove bandas, *Dasypus novemcinctus* e esquilo vermelho, *Sciurus vulgaris*, teria também sérias implicações para o programa de controle e erradicação da doença em humanos (8, 9).

Epidemiologia

A hanseníase é, até os dias de hoje, um importante problema de saúde pública. Apesar da PQT ter reduzido de forma significativa a prevalência da doença de 5.4 milhões para algumas centenas de milhares, a incidência de novos casos continua ocorrendo nas regiões endêmicas. Dados epidemiológicos mostram que 95% dos novos casos no mundo estão concentrados em 14 países (Figura 1). Durante o ano de 2015 foram detectados 210 758 novos casos de hanseníase no mundo. O Brasil é o país com a maior taxa de incidência da hanseníase na América do Sul, e encontra-se em segundo lugar em número de casos, perdendo apenas para a Índia. Segundo o Ministério da Saúde, o Brasil teve 28761 casos novos, correspondendo a um coeficiente de detecção geral de 14.07/100 mil habitantes (10, 11).

Figura 1 – Distribuição geográfica dos novos casos de hanseníase, 2015.

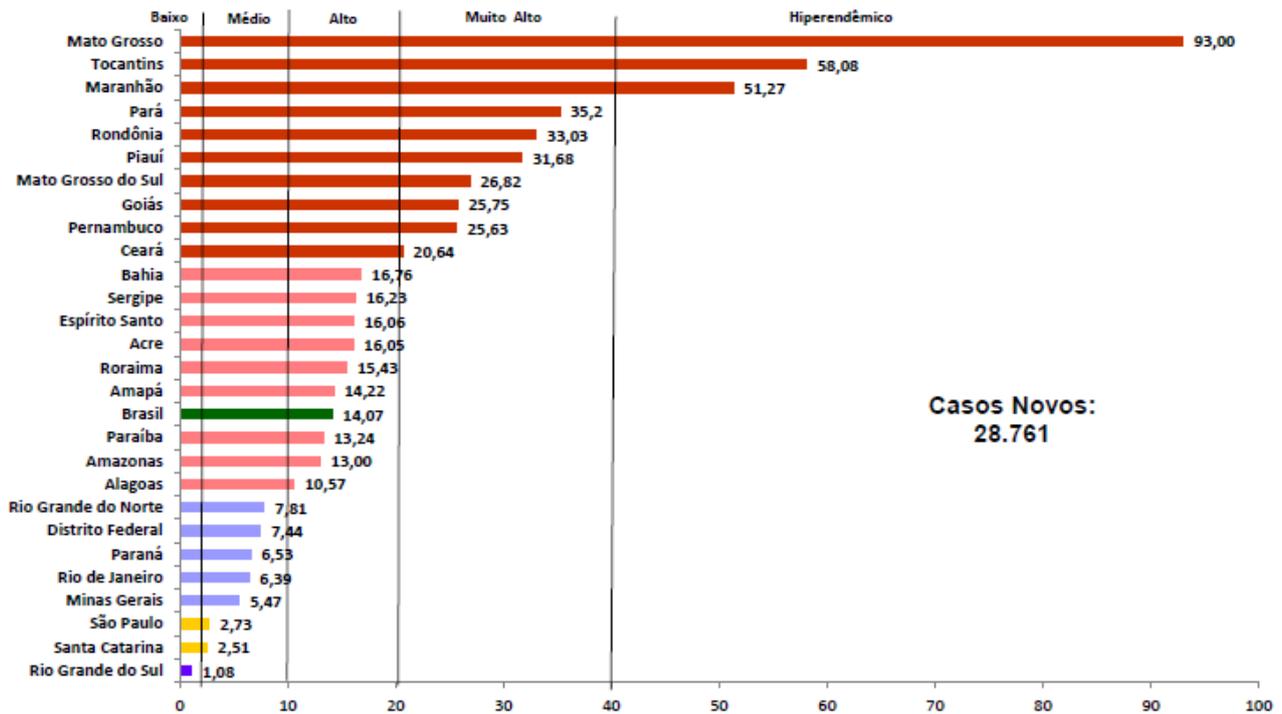


Legenda: Adaptado de WHO, 2017.

Fonte: WHO, 2017 .

Dos casos registrados no Brasil, a maioria dos casos novos concentra-se na região Nordeste com 12848, seguida pela a região Centro-oeste com 5667 e norte com 5181 casos detectados. Os estados com as maiores taxas de casos novos foram Mato Grosso, Tocantins e Maranhão. Rio Grande do Sul foi o estado com a menor taxa de detecção, apresentando aproximadamente um novo caso por 100 mil habitantes (Gráfico 1). Esses dados demonstram que o Brasil precisa concentrar mais esforços para diminuir a incidência de Hanseníase (10).

Gráfico 1 - Taxa de detecção geral de casos novos de hanseníase, estados, Brasil, 2015.



Fonte: Ministério da Saúde 2017.

Formas clínicas da Hanseníase

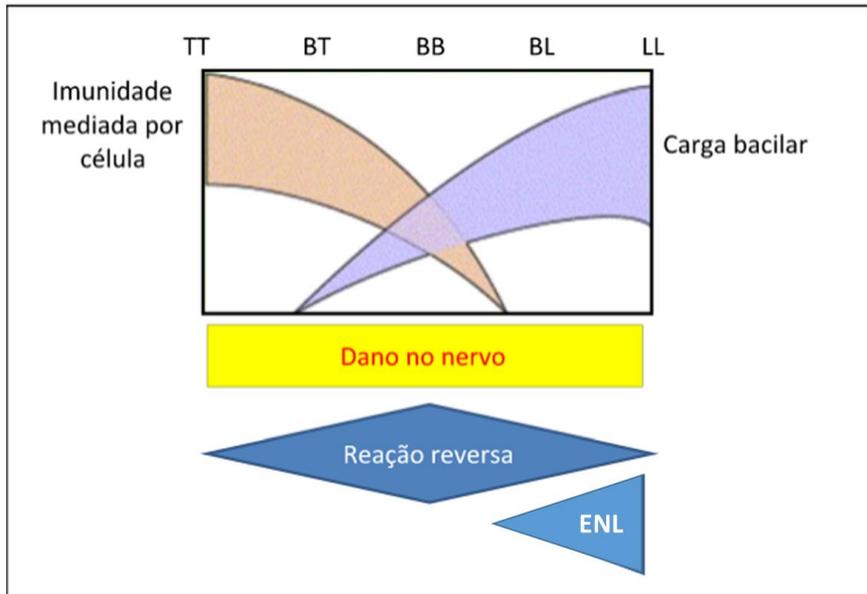
O diagnóstico da hanseníase é clínico, baseando-se no aparecimento de manchas avermelhadas ou regiões hipopigmentadas na pele com alterações de sensibilidade, apoiado por exames laboratoriais como a observação de bacilos em esfregaço (baciloscopia), e análise histopatológica das lesões cutâneas. O número de lesões depende da imunidade celular do doente. Indivíduos que apresentam uma resposta imune celular vigorosa e respostas imunes humorais limitadas a *M. leprae* geralmente apresentam poucas lesões cutâneas. Índice bacilar (IB) é um parâmetro diretamente relacionado à carga bacteriana, sendo o número estimado de todas as bactérias, independentemente da sua forma, presentes em um esfregaço. A baciloscopia pode ser feita através do raspado dérmico de lesão, lóbulos das orelhas e cotovelos. Os resultados são expressos em escala logarítmica, 1+ (Pelo menos 1 bacilo em cada 100 campos), 2+ (pelo menos 1 bacilo em cada 10 campos), 3+ (pelo menos 1 bacilo em cada campo) e assim por diante. Em 1982, a Organização Mundial de Saúde (OMS), para regime

de tratamento, classificou a hanseníase em duas categorias: são classificados como pacientes com a forma paucibacilar (PB) aqueles que têm índice bacilar menor que 2+. E multibacilar (MB) os pacientes que possuem índice bacilar maior ou igual a 2+.

De acordo com a classificação de Ridley e Jopling, a hanseníase se manifesta através de um espectro de manifestações clínicas cuja caracterização se baseia em critérios clínicos, bacteriológicos, histopatológicos e imunológicos. Os pacientes do polo tuberculoide (TT) são indivíduos com alto grau de imunidade mediada por células e hipersensibilidade retardada, apresentando uma lesão única, presença de um granuloma bem desenvolvido, sem bacilos detectáveis, hipopigmentação central e diminuição de sensibilidade. Em pacientes de pele clara, as lesões são eritematosas, ou de cor cobre em indivíduos de pele escura. Estas lesões mostram uma superfície seca, e devido à anidrose são ásperas ao toque. As lesões no rosto podem apresentar sensibilidade normal, pois esta área é rica em inervações sensoriais que compensam os nervos danificados. Já no outro extremo do espectro encontramos o polo lepromatoso (LL), que se caracteriza por pacientes com resistência mais comprometida ao *M. leprae*, e que por isso apresentam infecção disseminada com numerosas lesões. Além disso, apresentam espessamento neural periférico e eventualmente podem desenvolver ceratite (infecção que afeta a córnea), uveíte (inflamação intraocular que compromete total ou parcialmente a íris), madarose (perda ou queda de cílios), ulceração do nariz e destruição óssea. Na biópsia de pele desses pacientes são encontrados macrófagos com aspecto espumoso contendo uma grande quantidade de bacilos. Entre esses polos, podemos encontrar as formas intermediárias: “borderline”- tuberculoide (BT), “borderline”-“borderline” (BB), “borderline” – lepromatosa (BL), onde a resposta celular pode variar de acordo com a proximidade dos polos.

Podem ocorrer dois tipos de episódios reacionais na hanseníase: A reação reversa (RR), também conhecida como reação de tipo 1, quando ocorre a ativação súbita de inflamação com perfil T helper1 (Th1) em resposta aos antígenos do *M. leprae*. Ocorre com maior frequência, embora não exclusivamente, em formas intermediárias (BL, BT ou BB). Aproximadamente 30% dos pacientes podem desenvolver reações (12). O eritema nodoso leproso (ENL), também conhecido como reação de tipo 2, é uma condição inflamatória aguda que envolve altos níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), infiltração de tecido por células CD4 e neutrófilos, e aumento na produção de citocinas. Os casos reacionais do tipo 2 ocorrem normalmente em pacientes com alto índice bacilar (Figura 5) (13-15).

Figura 2 – Representação esquemática do perfil espectral da hanseníase baseada a classificação de Ridley e Jopling, 1966.



Legenda: TT (tuberculoide), BT (“borderline” tuberculoide), BB (“borderline borderline”), BL (“borderline” lepromatosa), LL (lepromatosa). Estão incluídos aspectos da resposta imune do paciente e os episódios reacionais, denominados RR (reação reversa) e ENL (Eritema Nodoso Lepromatoso), os quais acometem principalmente indivíduos das formas clínicas indicadas para cada tipo de episódio reacional (adaptado de Ridley e Jopling, 1966).

Fonte: Adaptado Coura, 2005.

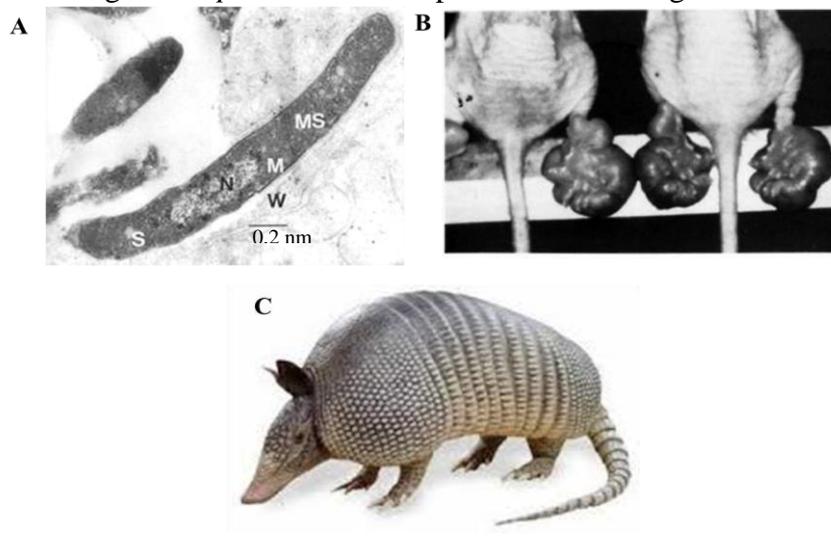
Mycobacterium leprae

Identificado pelo norueguês Gerhard Armauer Hansen em 1873, o *M. leprae* é um patógeno intracelular obrigatório, uma bactéria Gram positiva com tropismo por fagócitos mononucleares e células de Schwann dos nervos periféricos. Taxonomicamente, esta bactéria pertence ao reino Monera, classe Schizomycetes, ordem Actinomycetales, família Mycobacteriaceae e gênero *Mycobacterium*. A reprodução ocorre por fissão binária, e possui um crescimento lento, com o tempo de geração de cerca de 14 dias. A temperatura ótima para o crescimento é inferior a 37°C, isso explica sua maior incidência em áreas superficiais, como

pele, nervos periféricos, testículos e vias aéreas superiores e menor comprometimento visceral (16-18).

Morfologicamente, o *M. leprae* é uma haste reta ou ligeiramente curvada, medindo entre 1.5 a 8 micra de comprimento por 0.2 a 0.5 micron de diâmetro, e que pode existir como bastonetes isolados ou agrupados. Uma peculiaridade da parede celular de micobactérias é a grande quantidade de lipídeos, o que lhes confere características únicas como a resistência a ácidos, extrema hidrofobicidade, e a impermeabilidade a diversos compostos. Para coloração, utiliza-se o método de Ziehl-Nielsen (Figura 3A) (18).

Figura 3 - Morfologia *M. leprae*, cultivo em pata de camundongo e tatu de nove bandas.



Legenda: A) *M. leprae* em um corte de pele de um paciente MB: N (material nuclear), M (membrana plasmática), S (estoque de grânulos), W (parede celular); MS (mesossoma); B) Patas traseiras de camundongo *nude* inoculadas com *M. leprae*; C) tatu de nove bandas (*D. novemcinctus*).

Fontes: A) R J W Rees, 1985 B) Yogi Y, 1999 C) <http://wikifaunia.com>.

Um dos fatores importantes que regulam a transmissão da doença é a viabilidade do *M. leprae* fora do corpo humano. Isso foi durante muitos anos difícil de avaliar, uma vez que o organismo não é cultivável *in vitro* (19). Shepard, em 1960, demonstrou que era possível cultivar *in vivo* o bacilo em camundongo, que possui uma temperatura média de 32°C, porém o bacilo se mantém somente na região do coxim plantar, portanto sem envolvimento sistêmico (Figura 3B). No começo da década de 1970, Kirchheimer e Storrs mostraram que o *M. leprae* manifesta-se em tatu de nove bandas, *Dasyus novemcinctus*, como uma infecção

disseminada sistêmica com alterações estruturais e patológicas semelhantes às observadas em tecidos e nervos de humanos com hanseníase (**Figura 3C**). Robert e Carl, em 1976, mostraram um novo modelo de infecção experimental em camundongos “nude”, que não possuem resposta imunológica adaptativa eficaz devido à falta de linfócitos T, sendo que esse modelo possibilitou a obtenção de grande quantidade de bacilos viáveis e é utilizado nos dias atuais (20-22).

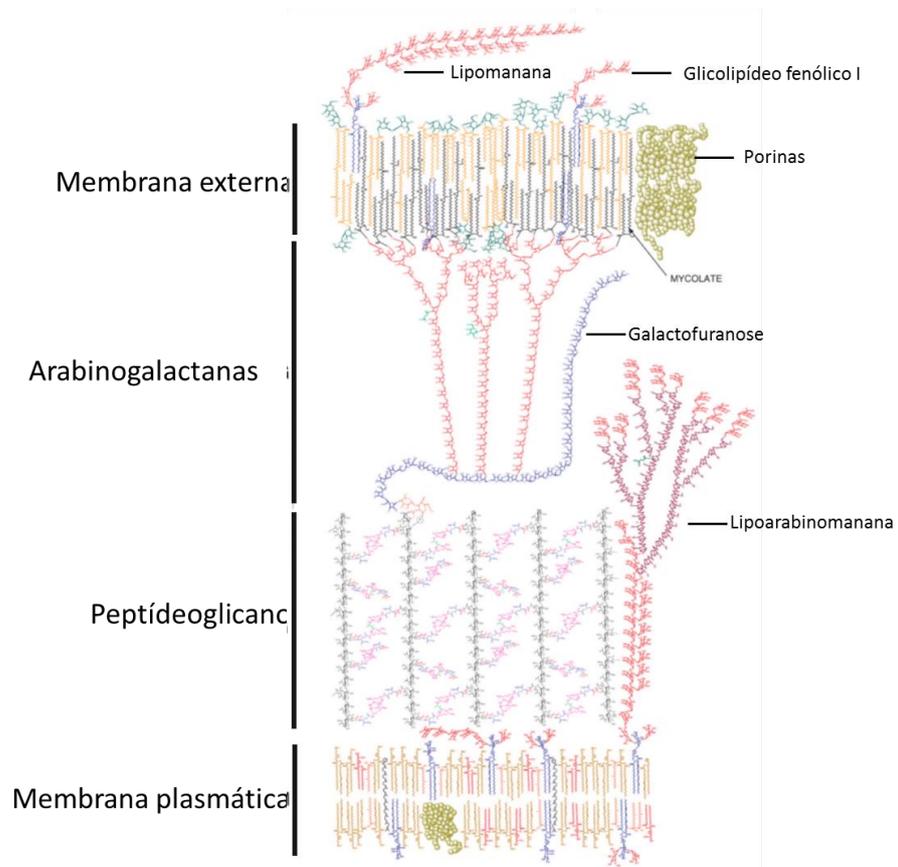
No começo dos anos 2000, Cole e colaboradores sequenciaram o genoma do *M. leprae*. Quando comparado ao genoma do *M. tuberculosis*, observa-se um genoma menor, rico em genes inativos ou suprimidos, sugerindo que o *M. leprae* teria sofrido evolução redutiva. Somente 49.5% dos genes codificam proteínas, e 27% são pseudogenes. Essa deleção de genes resultou em perda de vias metabólicas, da cadeia respiratória anaeróbica, dos sistemas catabólicos e de seus circuitos regulatórios. Essa redução pode explicar o porquê de o bacilo exigir condições específicas para crescer; e também responderia à mudança drástica no estilo de vida da bactéria, que era de vida livre, e passou a ser intracelular obrigatória. Essa redução evolutiva também foi relatada em outros agentes patogênicos intracelulares como *Mycoplasma*, *Chlamydia* e *Rickettsia*. No entanto, com aproximadamente 50% do genoma aparentemente desprovido de função, o *M. leprae* possui a maior proporção de pseudogenes em comparação com outras bactérias patogênicas (23, 24).

Parede celular do *M. leprae*

No final da década de 70 do século XX, Brennan e colaboradores definiram a composição estrutural da parede celular do *M. leprae*. A parede contém peptidoglicana ligada à camada de galactana, à qual se ligam cadeias ramificadas de arabinana, formando juntamente com a camada de peptidoglicana, uma zona elétron-densa em torno do *M. leprae*. Os ácidos micólicos estão ligados aos terminais das cadeias arabinana para formar o folheto interno de uma falsa bicamada lipídica. O folheto externo é composto de uma rica variedade de ácidos micólicos, ácidos micoserosóicos, lipomanana, fosfatidilinositol manosídeo, lipídeos dimicocerosatos de fitiocerol assim como glicolípideos fenólicos (PGLs), formando uma zona eletrotransparente, representados na Figura 4 (25, 26). Os componentes da parede celular micobacteriana são os primeiros a entrarem em contato com o hospedeiro e conseqüentemente irão desencadear os sinais associados à resposta imune inata. Essas

moléculas microbianas são PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) que induzem a ativação da expressão gênica e a síntese de várias de moléculas como citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e imunorreceptores, que irão direcionar a resposta imune adaptativa a patógenos invasores (27).

Figura 4 _ Modelo esquemático dos componentes básicos da parede celular *M. leprae*.



Fonte: Adaptado de Kaur D, 2009

PGL-I, aspectos gerais.

O PGL-I, descoberto em 1981, é encontrado de forma abundante na parede celular do *M. leprae*, representando cerca de 3% do peso total do bacilo. Apresenta um trissacarídeo distinto [3,6-di- O-Me-glucosopiranosil (1-4) 2,3-di-O-Me-ramnosopiranosil (1-2) 3-O-Me-ramnopiranosil [(1-fenol)], que o faz um marcador exclusivo do *M. leprae*. Os níveis de PGL-I no soro correlacionam-se com o índice bacilar (IB), com níveis mais altos detectados em indivíduos MB. Correlacionam-se também com infiltração difusa de nódulos cutâneos em indivíduos lepromatosos polares com IB > 5.0. Os níveis no soro diminuem ao longo do tratamento, refletindo a diminuição da síntese devido à morte dos bacilos. O PGL-I se liga especificamente à laminina-2, que é uma glicoproteína envolvida na montagem da lâmina basal, presente nas células de Schwann. Desempenha um papel importante na regulação da resposta imune, inibindo a maturação e ativação das células dendríticas, facilitando a entrada de bacilos em macrófagos e células de Schwann, contribuindo assim para a persistência do patógeno. Um outro trabalho mostrou que células mononucleares incubadas com PGL-I perdem a capacidade de secretar interleucina 1-beta (IL-1 β) e TNF- α em resposta ao lipopolissacarídeo (LPS), sugerindo que o PGL-I modula negativamente a expressão de citocinas. Embora os com quec teste positivo para anticorpos anti-PGL-I tenham um risco oito vezes maior de desenvolver hanseníase, a triagem dos anticorpos PGL-I na população geral não é útil, porque nem toda pessoa que desenvolve a doença é anti-PGL-I positiva (26, 28-30).

Tratamento

O tratamento para a hanseníase baseia-se em uma combinação de antibióticos, a poliquimioterapia (PQT). A PQT, desenvolvida pela OMS, consiste na combinação de rifampicina, clofazimina e dapsona e tenta evitar a resistência medicamentosa do bacilo. Desde 1981, a OMS fornece a PQT gratuitamente para pacientes com hanseníase em todos os países endêmicos. Para pacientes PB a OMS recomenda um regime baseado em uma dose mensal supervisionada de rifampicina (600 mg) e dapsona (100 mg) e doses diárias auto administradas de dapsona (100 mg). Devem ser administradas seis doses em até nove meses.

Na 6ª dose, os pacientes são submetidos a exame dermatológico, à avaliação neurológica simplificada e do grau de incapacidade física e recebem alta por cura. Para pacientes MB é preconizado o uso combinado de uma dose mensal supervisionada de rifampicina (600 mg), clofazimina (300 mg) e dapsona (100 mg) e doses diárias auto administradas de clofazimina (50 mg) e dapsona (100 mg). Devem ser administradas doze doses. Na 12ª dose, os pacientes são submetidos ao mesmo protocolo de avaliação que os PB (10, 11).

Transmissão

O mecanismo preciso de transmissão do *M. leprae* ainda é desconhecido, porém, acredita-se que os bacilos presentes nas vias aéreas superiores e pele de pacientes com alta carga bacilar não tratados representem a principal via de transmissão (31, 32). Alguns autores sugerem a existência de reservatórios não humanos para o *M. leprae* tais como solo, água, plantas ou em várias outras espécies de animais como amebas, insetos, peixes, primatas, tatus e esquilos. A hanseníase tem sido observada em indivíduos que não relatam história de exposição ao *M. leprae* e que foram identificados em áreas específicas, tais como áreas próximas a fontes de água (8, 25, 33).

Resposta imune inata e adquirida na hanseníase.

A capacidade de sobrevivência está relacionada ao desenvolvimento de estratégias não específicas, mas que evolutivamente direcionam a uma resposta contra partículas estranhas que conseguem ultrapassar as barreiras superficiais do organismo. Esta habilidade constitui a imunidade, que rápida e eficientemente defende o hospedeiro de patógenos invasores (34).

Os receptores Toll-Like (TLR) reconhecem padrões moleculares específicos que estão presentes em componentes microbianos. A estimulação de diferentes TLR induz padrões distintos de expressão gênica, o que não apenas leva à ativação da imunidade inata, mas também instrui o desenvolvimento de imunidade adquirida específica para antígenos. Inicialmente, o bacilo é reconhecido através de receptores da imunidade inata. O *M. leprae* ativa inicialmente receptores TLR1 e TLR2 em monócitos. Lipoproteínas triaciladas

microbianas desencadeiam respostas do hospedeiro via TLR2 levando a ativação de heterodímeros TLR2/1 (35).

Análises de imunohistoquímica revelaram que TLR1 e TLR2 são mais expressos nas lesões de pacientes com a forma TT quando comparados com os pacientes com a forma disseminada da doença (LL). A célula de Schwann também podem expressar TLR2 e a ativação desta célula pode contribuir para o dano do nervo na hanseníase. Padrões de citocinas de tipo 1 e tipo 2 podem influenciar de forma diferente a ativação de TLR2/1 através de lipopeptídeos de *M. leprae*. As citocinas do tipo Th1 interferon gama-IFN- γ , fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos-GM-CSF, IL-12 e IL-18 provocam a ativação de heterodímeros TLR2/1, enquanto que as citocinas de tipo Th2 (IL-4 e IL-10), inibem a ativação. Citocinas do tipo Th1 estão relacionadas principalmente com a defesa mediada por fagocitose contra agentes infecciosos intracelulares, já as citocinas do tipo Th2 estão relacionadas com a produção de anticorpos e reações imunes mediadas por eosinófilos e mastócitos contra patógenos extracelulares, alérgenos e helmintos (36). Logo, o padrão de citocinas durante a infecção regula o sistema imune inato através de dois mecanismos diferentes e independentes, um que afeta diretamente a ativação e outro que modula a expressão. A ativação do receptor LILRA2 (do inglês *leukocyte Ig-like receptor*), que é mais expresso em monócitos/macrófagos (CD209+) de pacientes LL, inibe a liberação de IL-12 induzida por TLR2/1, mas preserva a liberação de IL-10. A molécula CD209 é essencial para a endocitose do bacilo pelos macrófagos. Logo, o aumento da expressão dessa molécula favorece o aumento da carga bacilar. Similarmente, os fosfolipídeos oxidados também são capazes de inibir a liberação de IL-12 e preservam a liberação de IL-10 (37).

Um estudo recente do nosso grupo mostrou que a ativação de TLR9, que tem a função de detectar DNA, tem um papel crucial na geração de citocinas pró-inflamatórias durante o ENL. Essa ativação é inicialmente desencadeada pelo complexo DNA-histona bacteriana e potencializada por ácidos nucleicos próprios. O TLR9 é altamente expresso em células de lesões e células mononucleares de sangue periférico de pacientes hanseníacos MB. Monócitos, linfócitos B e células dendríticas plasmocitoides (pDCs) são as células que apresentam maior expressão deste receptor (37).

Os macrófagos são fagócitos altamente heterogêneos e podem ser classificados segundo sua polarização em M1 e M2. O M1 é classicamente induzido por citocinas como IFN- γ , TNF, GM-CSF (do inglês *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) ou ainda estímulos patogênicos como LPS. Os macrófagos M2 estão associados com a supressão da resposta Th1, através da secreção de IL-10(38). Os macrófagos que produzem IL-10 (M2),

possuem alta expressão de receptores de lectina do tipo C (CD209 e CD206) e receptores *scavengers* (CD163, SR-A, CD36 e MARCO). O CD163 controla a captação do complexo hemoglobina-haptoglobina, assim provendo uma fonte de ferro para a sobrevivência micobacteriana. Grande parte dos receptores de lectina do tipo C e *scavengers* está relacionada à captação de células apoptóticas, apolipoproteína B, lipídeos e lipoproteínas, que são fontes de nutrientes para *M. leprae* (37). Outras lectinas do tipo C, os receptores de manose, em conjunto com os receptores de complemento, CR1, CR3 e CR4 podem promover a captação do *M. leprae* por macrófagos, promovendo o aumento da carga bacilar (37, 39-41). Bleharski e seu grupo, em 2003, analisou os perfis da expressão gênica das lesões de pacientes com hanseníase e mostrou que os genes do metabolismo lipídico do hospedeiro foram regulados de forma diferente nas lesões de pacientes MB e PB. Micobactérias metabolizam ácidos graxos para geração de ATP durante o crescimento (42). O metabolismo de ácidos graxos derivados do hospedeiro é necessário para síntese de lipídeos bacterianos e fatores de virulência (43). O acúmulo de fosfolipídeos oxidados derivados do hospedeiro, o aumento das vias metabólicas lipídicas do hospedeiro nas lesões de pacientes lepromatosos e a dependência de *M. leprae* do metabolismo lipídico do hospedeiro sugerem uma ligação entre o metabolismo lipídico do hospedeiro e a imunidade inata, contribuindo para a patogênese da infecção micobacteriana (37).

As células dendríticas funcionam como uma ponte entre a imunidade inata e adquirida, pois essas células são apresentadoras profissionais de antígeno. Após o contato com esses últimos, elas migram para o linfonodo e apresentam o antígeno para as células T virgens, que depois de estimuladas, podem se diferenciar em diversas subpopulações. As células dendríticas processam o antígeno e apresentam à célula T CD8+ via moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e CD4+ via moléculas de MHC de classe II. A polarização da resposta imune específica para o *M. leprae* é um elemento importante na patogênese e na determinação das manifestações clínicas. A resposta a citocinas do perfil Th1 como IFN- γ , IL-2, IL-15 e TNF- α tem sido mostrada nas lesões de pacientes PB. Além disso, esses pacientes possuem alta resposta de linfócitos T e contenção de bacilos em granulomas bem formados. Em pacientes MB, é observada produção de IL-10, diminuição de frequência de células T CD4+ *M. leprae*-específicas produtoras de IFN- γ , maior frequência de células T reguladoras (T regs) e de linfócitos T CD8+, e maiores níveis de anticorpos contra antígenos do *M. leprae*. Entretanto, todos esses mecanismos são incapazes de restringir o crescimento do bacilo (44). A IL-10 e o fator de crescimento tumoral beta (TGF- β), secretados por células Tregs FoxP3+, contribuem para a atividade supressiva dessas células. O TGF- β está associado

com a anergia de células T e a indução da expressão de FoxP3+ em células T de memória e virgens durante a progressão da doença. As células com o perfil Th17 também possuem um papel importante na hanseníase e têm frequências mais altas em pacientes PB. A citocina IL-17, secretada por essas células, possui papel protetor no início da infecção por *M. leprae*, ativando macrófagos, recrutando neutrófilos e aumentando a expressão de células efetoras com o perfil Th1, levando ao controle da carga bacilar. Por outro lado, as células Tregs inibem a função de diferentes células efetoras, tais como Th1 e Th17. A presença de citocinas de células Th17 diminuiu consideravelmente o número de células Treg FoxP3+ (45-47). Os pacientes com o perfil MB, além do defeito da resposta Th1, também possuem resposta humoral *M. leprae* específica mais elevada que os PB (41).

Linfócitos B

Em 1890, Emil von Behring e Shibasaburo Kitasato relataram a importância das antitoxinas circulantes na imunidade à difteria e ao tétano. A compreensão da natureza física dos anticorpos como primeiro passo para a compreensão da relação antígeno-anticorpo começou na década de 1930, quando, através da técnica de eletroforese, foi possível demonstrar que anticorpos são γ -globulinas (48). A identificação da fonte celular de anticorpos ocorreu mais de uma década depois, em 1948, quando foi observado que o desenvolvimento de plasmócitos se correlacionava com as respostas de anticorpo após a imunização. Estudos de defeitos hereditários de imunidade em seres humanos também forneceram uma visão dos componentes humorais. A primeira doença de imunodeficiência foi descrita em 1951 por Ogden Bruton. Ele observou a ausência de γ -globulinas séricas em um menino que sofria de infecções bacterianas de repetição. O pesquisador interpretou este achado como uma indicação da incapacidade do menino para produzir anticorpos. Assim, Bruton o tratou com γ -globulinas de doadores saudáveis para fornecer proteção contra infecções subsequentes (49). Em 1959, Gerald Edelman e Rodney revelaram a composição das quatro cadeias de anticorpos, formada por cadeias pesadas emparelhadas e cadeias leves ligadas por ligações de dissulfeto (50). Em 1970, Martin Weigert e seus colaboradores descobriram que a região variável da cadeia leve pode ser diversificada somaticamente e isto alimentou um debate duradouro sobre a contribuição da “germline” para a diversidade

somática do anticorpo (51). O advento da tecnologia de DNA recombinante forneceu uma nova forma de abordagem para resolver muitos dos problemas não resolvidos de diferenciação de células B. Utilizando essa tecnologia, foi possível saber que os segmentos de genes das regiões variáveis e constantes das cadeias de imunoglobulinas sofrem rearranjo somático durante a diferenciação de células B (52).

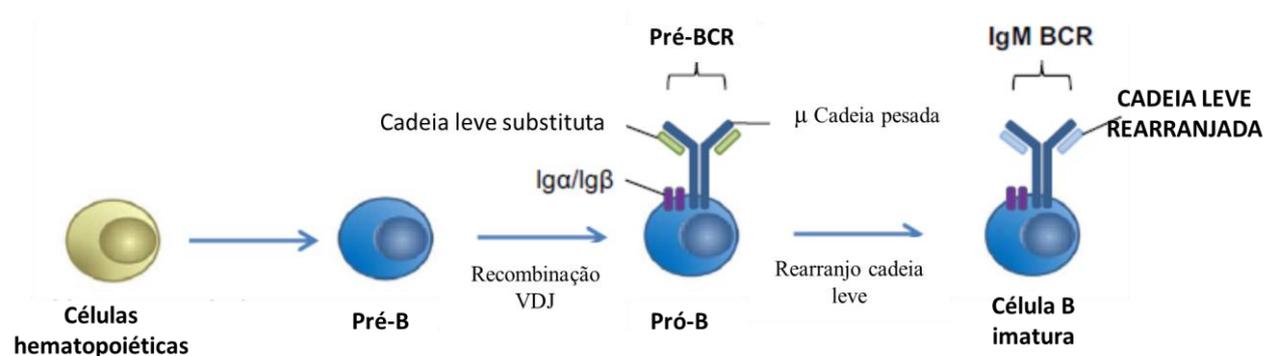
Maturação dos linfócitos B

Embora representem apenas 1% a 7% dos leucócitos, os linfócitos B desempenham papéis importantes na defesa imunológica. Essas células podem, além de produzir anticorpos, apresentar antígenos e secretar diversas citocinas. Indivíduos com defeitos nessas células podem desenvolver autoimunidade, câncer, imunodeficiências e alergias. Em seres humanos após o nascimento, assim como em todos os mamíferos, o desenvolvimento dos linfócitos B ocorre na medula óssea a partir de células hematopoiéticas. Dentro da medula ocorre o processo de rearranjo funcional dos segmentos do gene da imunoglobulina (53).

As células hematopoiéticas proliferam, gerando um grande número de células pró-B que se desenvolvem em células pré-B através do processo de recombinação V, D e J no locus da cadeia pesada da imunoglobulina. A proteína μ da cadeia pesada da imunoglobulina se liga às cadeias leves e juntamente com as proteínas de sinalização $Ig\alpha/Ig\beta$, forma o receptor associado à membrana (pré-BCR). Moléculas de IgM são formadas e expressas na superfície celular. O pré-BCR desencadeia o rearranjo no locus da cadeia leve e a proteína resultante associa-se com a cadeia pesada μ resultando no BCR completo na superfície de uma célula B imatura. As células B imaturas saem da medula óssea como células B de transição e migram, através da circulação, para o baço para completar a maturação. Existem dois subconjuntos de células B maduras, folicular (FO) e de zona marginal (MZ). As células B FO circulam no organismo, e são encontradas no baço e no linfonodo (LN), enquanto as células B MZ residem no baço. A manutenção das células B maduras virgens depende de citocinas de sobrevivência tais como BAFF (do inglês *B-cell activating factor*) e APRIL (do inglês *A-proliferation inducing ligand*), reconhecimento de antígenos próprios e BCR. Os pontos de verificação ocorrem ao longo do desenvolvimento das células B para eliminar as células B auto reativas. Na medula, as células B que se ligam aos antígenos próprios, alteram a sua especificidade de receptor (edição de receptor), tornam-se anérgicas ou são eliminadas por

apoptose, num processo chamado tolerância central. As células B que reconhecem antígeno na ausência de células T helper tornam-se anérgicas. A tolerância periférica é mais flexível, uma vez que também depende da competição interclonal, da força de sinalização do BCR, e dos sinais de citocinas (Figura 6) (54).

Figura 5_ Estágios de desenvolvimento dos linfócitos B



Fonte: Adaptado Natalie Burrows, 2017.

Ativação de linfócitos B

A ativação de células B dependente de células T ocorre no centro germinativo no baço e nos gânglios linfáticos. Essa ativação conduz ao desenvolvimento de plasmócitos e *switch* das células B de memória. A ativação das células B no centro germinativo aumenta a AID (do inglês, *activation-induced cytidine deaminase*), uma enzima crucial para aumentar as hipermutações somáticas (SHM) da IgM. Este processo faz parte da maquinaria enzimática que gera SHMs na região variável do gene de imunoglobulina expresso pela célula. Hipermutações aumentam ou diminuem a afinidade dos anticorpos para os antígenos. Esse processo se torna importante para que os anticorpos se tornem ferramentas altamente específicas contra antígenos patogênicos. Em paralelo, as imunoglobulinas alteram as suas funções efetoras substituindo a região constante de IgM por IgG, IgA ou IgE. Os linfócitos B de memória e os plasmócitos podem residir nos órgãos linfóides ou migrar para a medula óssea. Bortnick, em 2012, mostrou que os linfócitos B podem se desenvolver em plasmócitos de forma T-independente. Nesse tipo de resposta, as células B são induzidas a expressar AID e submetem-se ao *switch* de classe após acoplamento duplo dos seus receptores TLR e BCR a

padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e ligantes antigênicos (55, 56). Células B imaturas, maduras e os plasmoblastos (precursores de plasmócitos) têm a capacidade de se diferenciar em células B reguladoras (Breg). As Breg são capazes de produzir citocinas anti-inflamatórias como IL-10, IL-35 e TGF- β . Possuem a capacidade de limitar a inflamação na pele e em outras regiões, como o sistema nervoso central, articulações e cólon (57, 58). As células Breg suprimem a diferenciação das células Th1 e Th17 convertendo células T CD4+ efectoras em CD4+FOXP3, que são células T regs (58). Além disso, através da produção de TGF- β , as células B ativadas com lipopolissacarídeo (LPS) podem induzir apoptose de CD4+ e anergia em células T CD8+ efectoras (59). As citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e GM-CSF, combinadas com IL-15 podem induzir a diferenciação dessas células em camundongos. LPS e oligodeoxynucleotídeos- b (CpG-b) induzem a diferenciação e ativação de Bregs por meio da sinalização de TLR9. Ou seja, a inflamação pode servir como um gatilho para a diferenciação de Bregs, que seriam então parte de um loop de “feedback” negativo que evita danos excessivos devido à resposta imune contra patógenos (60).

Marcadores de subpopulações de linfócitos B do sangue periférico

O primeiro estágio de células B que pode ser detectado na circulação periférica é denominado "célula B de transição". Essas células são imaturas e representam a população recém emigrada da medula óssea. As células de transição podem ser distinguidas de outras células B por expressarem marcadores de superfície celulares como CD10, CD19, CD38, CD24 e IgM e serem negativas para o marcador de superfície CD27. Em relação aos marcadores de superfície de linfócitos B do sangue periférico, sabe-se que CD10 está envolvido no desenvolvimento das células B, e se liga a peptídeos biologicamente ativos; CD19 é uma glicoproteína transmembranar de tipo I, de 95 kD também conhecida como B4, e está envolvida no desenvolvimento, ativação e diferenciação das células B; CD38 é uma glicoproteína que participa da ativação de linfócitos B e de adesão celular; CD24 é uma glicoproteína com papel na maturação e proliferação de linfócitos B; IgM é o primeiro tipo de anticorpo que aparece em resposta à exposição a um antígeno; e, finalmente, CD27 é um marcador de memória em células B (61). As células B de transição constituem o menor subgrupo de células B circulantes em adultos (2.4%). No entanto, elas representam uma alta proporção de células B no sangue do cordão umbilical (4%). No sangue periférico de

crianças, as frequências diminuem com o tempo. Aos 13 anos já ocorre uma distribuição de células B de transição semelhantes à dos adultos (62, 63). As células de memória são derivadas dos linfócitos B de transição. Essa população é aumentada nos idosos e expandida em estado de estimulação crônica. Essa subpopulação possui os marcadores CD19+CD24++CD38-IgD+CD27+(64). Os plasmoblastos podem ser encontrados transitoriamente na corrente sanguínea, o que não ocorre com os plasmócitos que residem na medula óssea. A maioria das células secretoras de anticorpos na circulação é plasmoblasto, e o aumento dessa população está associado a doenças autoimunes e à evolução da tuberculose. Essas são células de vida curta e podem expressar IgA ou IgG na superfície (65). Em mamíferos, grande parte da resposta de anticorpos precoce é provavelmente realizada por essas células (66). Os plasmoblastos possuem os marcadores CD19+CD24-CD38+ (67, 68).

Apresentação de antígeno

Nas respostas de anticorpos T-dependentes, as células B captam antígenos através do BCR, processam e apresentam através do MHC II para associação com o TCR da célula T CD4+. Estas irão induzir ativação, proliferação e diferenciação das células B em combinação com antígeno. O processamento de antígeno para a apresentação dependente de MHC II é mediado por endossomas e lisossomas, enquanto a apresentação de antígeno dependente de MHC I é mediada pelo retículo endoplasmático. A autofagia também desempenha um papel importante na apresentação de antígenos MHC II-dependente em células B e células dendríticas, nas quais os autofagossomos se fundem continuamente em compartimentos multivesiculares carregados com MHC II. Os linfócitos B podem apresentar peptídeos que são BCR- e autofagossoma- dependentes (69).

Receptores Toll-Like (TLR) nos linfócitos B

Os linfócitos B expressam um subconjunto distinto de famílias de receptores TLR que determinam a capacidade de responder aos padrões microbianos. A base molecular e o significado funcional da expressão TLR restrita em células B ainda não está clara. A expressão de TLRs em células B realça que estas células evoluíram para a detecção direta de micróbios. As células B virgens humanas expressam níveis baixos de TLRs, enquanto que as células B ativadas e de memória expressam níveis significativos de TLR1, TLR4, TLR6, TLR7, TLR9 e TLR10 e baixos níveis de TLR2. Os TLRs têm aumento de expressão em células B humanas após a ativação através de BCR ou estimulação de CD40, e isso é especialmente visto no caso do TLR9 e TLR10 (70, 71). Lin e colaboradores, em 2004, mostraram que, além de promover o *switch* através da regulação positiva da desaminase induzida pela ativação, os TLRs podem influenciar nos isotipos de imunoglobulinas. Por exemplo, o LPS induz *switch* para IgG3, ao passo que LPS mais IL-4 promove IgG1 e IgG3. Em contraste, os CpGs promovem a expressão de subgrupos de imunoglobulinas como IgG2a, IgG2b e IgG3 e suprimem IgG1 e IgE (72). A ativação excessiva de TLR7 e TLR9 foi vista várias doenças inflamatórias e autoimunes crônicas, incluindo lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide e psoríase, enquanto os antagonistas destes receptores controlam essas patologias. Além disso, foi visto em um trabalho recente de nosso grupo um aumento na expressão de TLR9 em pacientes com a forma MB da hanseníase (39). O TLR9 possui um papel importante na indução de linfócitos B produtores de IL-10. Essas células são capazes de inibir a diferenciação de células T CD4⁺ virgens em T helper 1 e T helper 17, através da produção de agentes anti-inflamatórios como a IL-10, IL-35, IgG4, convertendo essas em células T CD4⁺FoxP3⁺, reguladoras (Esse quadro pode contribuir para permanência do patógeno em pacientes hansenícos. Além disso, existem poucos estudos referentes ao papel das subpopulações de linfócitos B na hanseníase. Logo, a análise de subpopulações buscando o entendimento do papel destas na doença se faz necessário.

1 OBJETIVOS

1.1. Objetivo geral

Investigar o papel de subpopulações de linfócitos B em diferentes formas clínicas da hanseníase.

1.2 Objetivos específicos

- A- Avaliar a relação e frequência de subpopulações de linfócitos B em indivíduos saudáveis e pacientes com hanseníase;
- B- Avaliar o papel da ativação de linfócitos B, quando estimulados com CpG-c ligada a Hlp, em ativação funcional de linfócitos T.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 População estudada e critérios de inclusão

Foram incluídos neste estudo indivíduos sadios e pacientes recém-diagnosticados com hanseníase PB e MB sem e com reação do tipo eritema nodoso leproso, HIV-negativos, que não estiveram em uso de corticoesteroides por, pelo menos, três meses, negativos para diabetes e com idades entre 18 e 65 anos. Os pacientes com hanseníase foram recrutados no ambulatório Souza Araújo (IOC-FIOCRUZ), seguindo a classificação de Ridley e Jopling (1966). Os doadores foram devidamente informados sobre a pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz da Fiocruz (CAAE 30621514.4.0000.5248, parecer CEP IOC-Fiocruz 951.494)

2.2 Separação e obtenção de células mononucleares de sangue periférico (CMS).

As amostras de sangue periférico foram coletadas por punção venosa em tubos heparinizados (Vacutainer– BD Biosciences, EUA). Posteriormente, o sangue coletado foi diluído em uma proporção de 1:1 em PBS e centrifugado a 900 x g sobre gradiente de Ficoll-Paque™ Plus, por 30 minutos à temperatura ambiente. O anel contendo as CMS foi coletado, lavado com PBS, e centrifugado a 300 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e as células lavadas novamente com 10 mL de PBS gelado, seguido de centrifugação a 500x g durante 10 minutos a 4°C, por duas vezes. As células viáveis foram determinadas pelo método de exclusão por meio de coloração pelo azul de tripan (Sigma Life Science), e avaliadas em câmara de Neubauer para estimativa da concentração de células viáveis. Todo o processamento do sangue foi realizado em câmara de fluxo laminar, respeitando as normas e precauções para manipulação de material biológico.

2.3 Análise de moléculas de superfície de membrana celular por citometria de fluxo.

Após isolamento das células mononucleares de sangue periférico, aproximadamente 1×10^6 células foram utilizadas para marcação de antígenos extracelulares. Antes da marcação, as células foram bloqueadas com solução PBS-BSA-EDTA contendo 5% de plasma humano inativado por 30 min a 4°C. As células foram lavadas com solução contendo Soro fetal bovino 2% (v/v) e EDTA 1mM em HBSS e, em seguida, marcadas por 30 min a 4°C com os anticorpos descritos a seguir. Para observar as subpopulações de linfócitos B foram usados os anticorpos CD24-FITC, IgD-PE, CD38-PC5.5, CD27-PECY7, CD3-PACIFIC BLUE e CD19-APCCY7. Para análise de linfócitos B reguladores, foram utilizados os anticorpos CD3-PACIFIC BLUE, CD19-FITC, CD20-PE, CD25-APC. As células foram fixadas com PFA por 20 min a 4°C e lidas em até 24 h no citômetro de fluxo FACS AriaIIu (BD®) da plataforma de sorting celular e citometria de fluxo RPT08A da Fiocruz-RJ. As análises das populações em suas regiões de interesse foram realizadas com o programa FlowJo 10.2 (TreeStar®)

2.4 Separação celular e cultura de linfócitos B com CpG/Hlp

Cerca de 40 mL de sangue foram coletados por punção venosa de um paciente com hanseníase lepromatosa, com 2 meses de tratamento com PQT. Após o isolamento em gradiente de ficol-hipaque, foram destinadas 4×10^6 de células mononucleares para cultura com estímulo (*M. leprae* ou SEB) ou sem estímulo. As células mononucleares restantes foram direcionadas para a separação celular por citometria de fluxo. A população de linfócitos B CD19+CD20+ foi isolada e estimulada ou não por 72 horas com 0,50 μ M de CpG - c e 0,25 μ M de Hlp. Após a cultura, os linfócitos B estimulados ou não foram colocados em cocultura com as células mononucleares inicialmente depletadas de linfócitos B por *sorting*, estimuladas com SEB ou *M. leprae*. A proporção utilizada foi de 1 linfócito B para cada 4 linfócitos T estimulados. Após 24h de incubação, as células foram recuperadas e analisadas por citometria de fluxo.

2.5 Materiais e reagentes

2.5.1 Meios de cultura e suplementos

Produto	Código	Fabricante
Tampão HBSS	14170	Gibco/Life Technologies
L-glutamina 100x	25030	Gibco/Life Technologies
Soro Fetal Bovino	12657	Gibco/Life Technologies
PBS 1X	10010023	Gibco/Life Technologies
AIM-V	12055083	Gibco/Life Technologies

2.5.2 Reagentes

Produto	Código	Fabricante
Ficoll-Hypaque	17-1440-2	GE Healthcare Life Sciences
Tampão EDTA	AM9261	Ambion
Azul Tripano	T8154	Sigma-Aldrich
Paraformaldeído	Sigma-Aldrich	Sigma-Aldrich
DMSO	D4540	Sigma-Aldrich

2.5.3 Anticorpos

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Fabricante	Número catálogo
CD24	FITC	ML5	BD Biosciences	555427
IgD	PE	IA6-2	Beckman Coulter	B30653
CD38	PC 5.5	LS198-4-3	Beckman Coulter	A70205
CD27	PECY7	1A4CD27	Beckman Coulter	A54823
CD3	PAC. BLUE	HIT3a	Biologend	300330
CD19	APCCY7	SJ25C1	BD Biosciences	557791

2.6 Análise estatística

Os dados referentes a populações celulares foram analisados utilizando o teste não pareado e não paramétrico de Mann-Whitney, em que $p < 0.05$ foi considerada estatisticamente significativa. Os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (Graphpad Software, La Jolla, EUA).

3 RESULTADOS

3.1 Dados epidemiológicos dos doadores incluídos no estudo

Foram recrutados pacientes com até três meses de tratamento e doadores saudáveis, totalizando 22 indivíduos. Na Tabela 1 é possível observar os dados epidemiológicos e informações sobre o diagnóstico dos doadores incluídos nesse estudo. Não foram encontradas diferenças estatísticas quando foram comparados os parâmetros idade e sexo.

Tabela 1– Dados epidemiológicos dos doadores incluídos nesse estudo.

Grupo	Indivíduos	F	M	Idade Mediana (Máx. e mín.)	IB
Saudáveis	8	5	4	41.22 (29-57)	0
Multibacilares LL+BL	6	3	3	43.67(24-60)	4.67
Paucibacilares BT	4	1	2	42.33(20-57)	0
ENL	4	1	3	33(24-45)	4.3

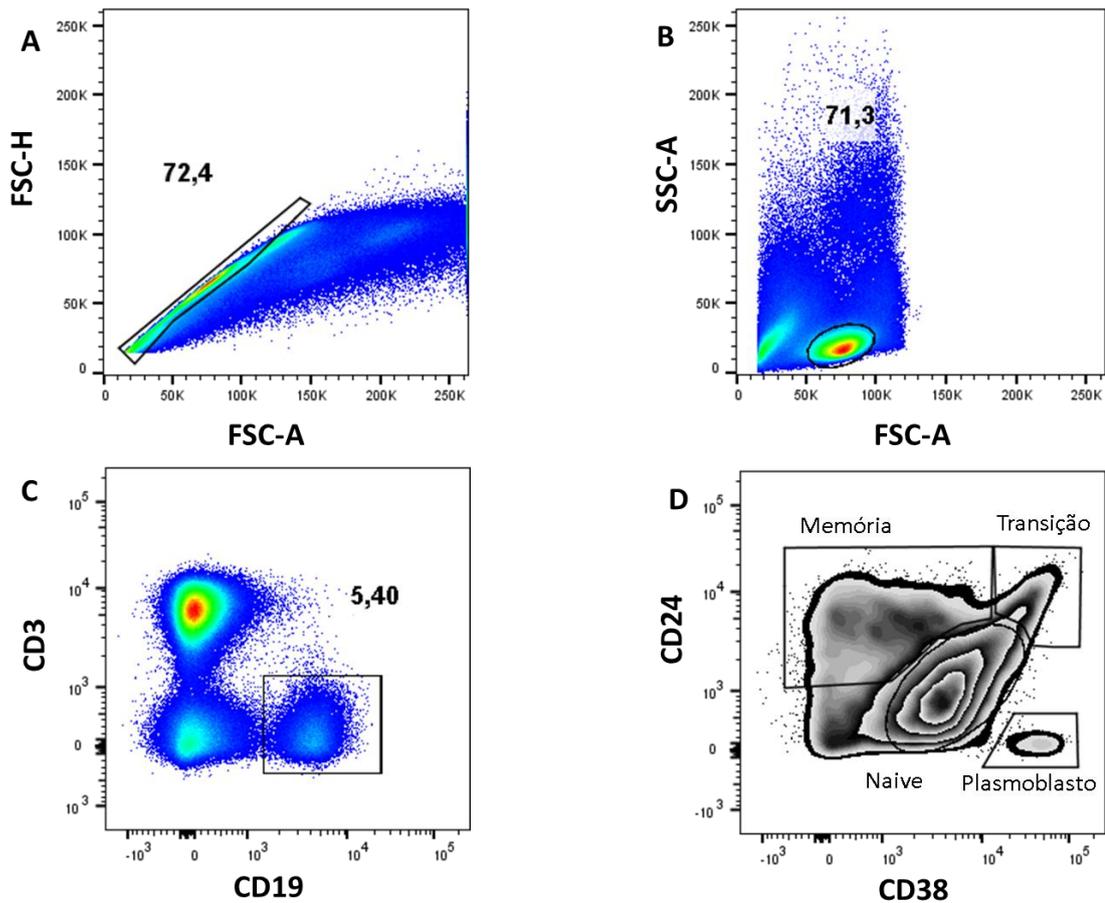
Legenda: LL + BL (Lepromatoso Lepromatoso, Borderline Lepromatoso); BT (Borderline Tuberculóide); ENL (Eritema Nodoso Lepromatoso); IB (média Índice bacilar).

3.2 Determinação de subpopulações de linfócitos B por citometria de fluxo

Para estudar as subpopulações de linfócitos B, inicialmente foram excluídos os grumos e monócitos utilizando os parâmetros de dispersão frontal medida pela área (FSC-A) (do inglês *forward scatter - área*), versus dispersão frontal medida pela altura, FSC-H (do inglês *forward scatter - height*; Figura 6A). Em seguida, foi selecionada a região de linfócitos por FSC-A e dispersão lateral medida pela área SSC-A (do inglês *side scatter*; Figura 6B), e nesta região os linfócitos B (CD3-CD19+) foram detectados (Figura 6C). A partir dessa

estratégia, foi possível identificar quatro subpopulações de linfócitos B: Memória CD24⁺⁺CD38^{-/+}; Transição CD24^{hi}CD38^{hi}; Plasmoblastos CD24⁻CD38⁺; Naive CD24^{int}CD38^{int}, mostrados na (Figura 6D) (75).

Figura 6 Estratégia de seleção da região para analisar os linfócitos B em CMS totais

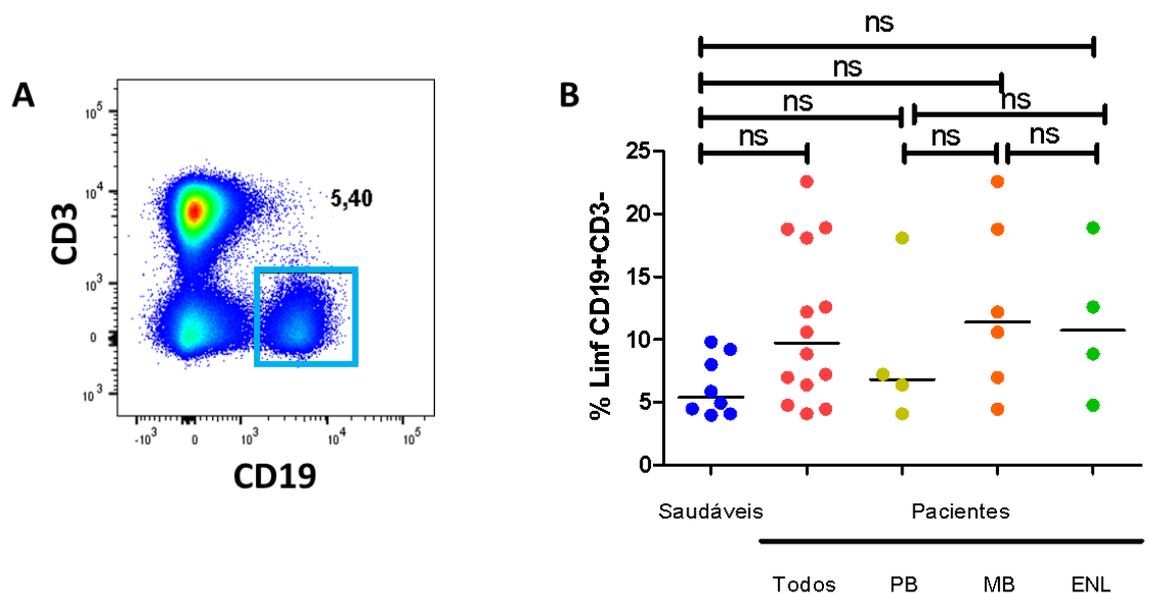


Legenda: As CMS de pacientes e doadores saudáveis foram coletadas por punção venosa, separadas por gradiente de densidade e imediatamente fenotipadas com CD24-FITC, IgD-PE, CD38-PerCPCy5.5, CD24-PECy7, CD19-APCCy7 e CD3-Pacific Blue por citometria de fluxo. A) Exclusão de eventuais grumos e monócitos usando gráfico FSC-H versus FSC-A; B) Região de linfócitos selecionadas; C) Linfócitos B CD3-CD19⁺; D) Subpopulações de linfócitos B memória CD24⁺CD38^{-/+}, transição CD24⁺CD38⁺, plasmoblastos CD24⁻CD38⁺, células naive CD24^{int}CD38^{int}. n=1.

Uma vez que nós observamos linfócitos B em biópsias de pacientes (76), buscamos analisar a frequência dessas populações em sangue periférico de pacientes com hanseníase com as formas PB, MB (com e sem ENL) e doadores saudáveis. Na Figura 7A, pode ser observada a região onde se encontram os linfócitos B CD3⁻CD19⁺. Nos pacientes com o perfil paucibacilar (mediana 6,81%, n=4), a frequência de células B CD3⁻CD19⁺ foi parecida

com os doadores saudáveis (mediana 5,41%, $n=8$, $p=0,6098$). Ainda, quando comparamos doadores saudáveis (mediana 5,41% $n=8$) ao grupo de pacientes, denominado aqui de “todos” (MB+PB+ENL: mediana 9,73% $n=14$ $p=0,0653$), verificamos uma maior frequência de linfócitos CD19+, porém de maneira borderline significativa (Figura 7B). Também foi borderline significativa a diferença entre doadores saudáveis e pacientes MB (mediana 11,4% $n=6$ $p=0,0593$) (Figura 7B).

Figura 7_ Frequência de linfócitos B CD19+ em pacientes e doadores saudáveis.

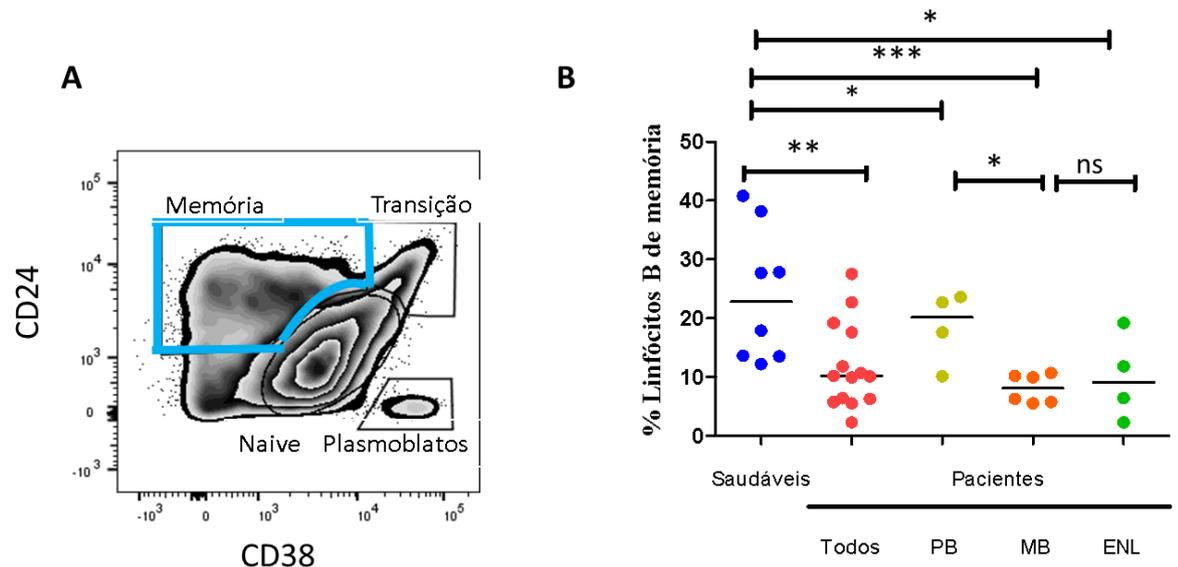


Legenda: As CMS de pacientes e doadores saudáveis foram coletadas por punção venosa, separadas por gradiente de densidade e imediatamente fenotipadas por citometria de fluxo. A) Estratégia de seleção da região para analisar os linfócitos B; B) Todos (PB + MB + ENL), pacientes PB (paucibacilar), MB (multibacilar), ENL (Eritema Nodoso Lepromatoso). Valores foram submetidos ao teste estatístico de Mann-Whitney em que * $p<0,05$ e ** $p<0,005$. $n=22$.

Nós estudamos três subpopulações no sangue periférico: plasmoblastos, linfócitos B de transição e linfócitos B de memória. Entre as células CD19+, essas populações foram discriminadas com base na expressão de CD24 e CD38, (figura 7A). Através de análise por citometria *ex vivo* de células do sangue periférico, foi observado que doadores saudáveis possuem maior frequência de células B de memória CD24+CD38- (mediana 22,80%, $n=8$) quando comparados aos pacientes com hanseníase (todos) (mediana 8,1%, $n=14$, $p=0,0057$).

Também foi observado que existe redução da frequência destas células em pacientes com a forma MB (mediana 8,1%, n=6, $p=0,0007$) e em MB com ENL, quando comparados com o grupo saudável (mediana 9,1%, n=12, $p=0,0485$). Foi visto que pacientes PB possuem frequências de células B de memória (mediana 20,15%, n=4, $p=0,4606$) semelhantes aos indivíduos saudáveis (mediana 8,1%, n=8). Além disso, pacientes com a forma PB (mediana 20,15%, n=4) possuem frequências de células B de memória diferentes dos pacientes com a forma MB (mediana 8,1%, n=10; $p=0,0381$) (figura 7B).

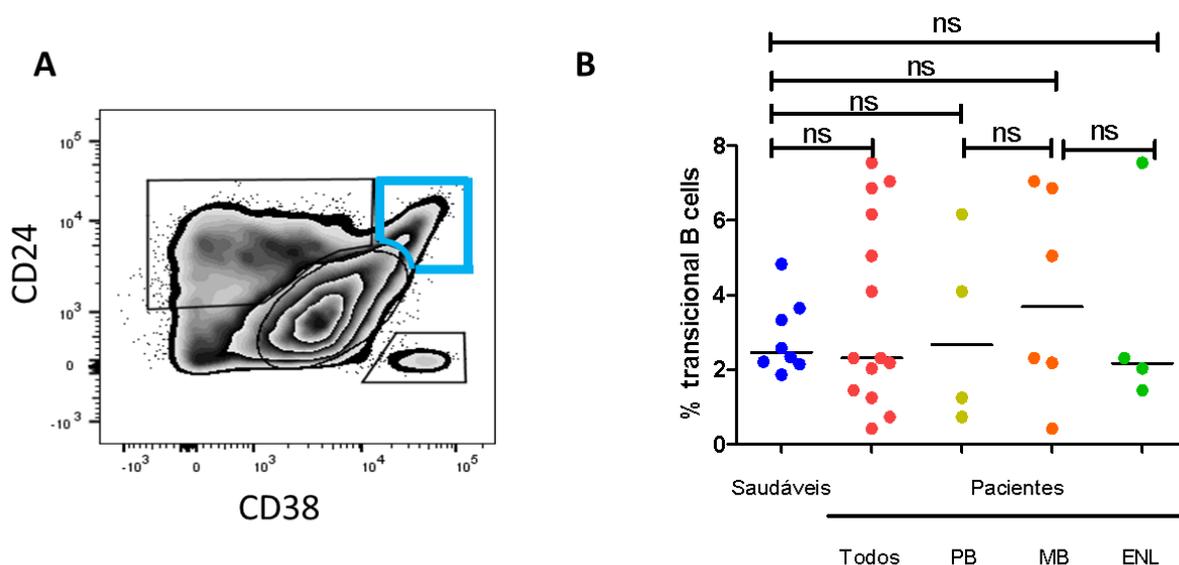
Figura 8_ Frequência de linfócitos B de memória em pacientes e doadores saudáveis.



Legenda: As CMS de pacientes e doadores saudáveis foram coletadas por punção venosa, separadas por gradiente de densidade e imediatamente fenotipadas por citometria de fluxo. A) Estratégia de seleção da região para analisar os linfócitos B de memória CD24+CD38-; B) Frequência de linfócitos B de memória entre indivíduos saudáveis, Todos (PB + MB + ENL), pacientes PB (paucibacilar), MB (multibacilar), ENL (Eritema Nodoso Lepromatoso). Valores foram submetidos ao teste estatístico de Mann-Whitney em que * $p<0.05$ e ** $p<0.005$. n=22.

Uma vez que os plasmoblastos e células em transição são as maiores fontes de IL-10 entre as células B em humanos (77), a frequência de plasmoblastos no sangue periférico de pacientes e doadores saudáveis foi analisada. A estratégia de *gate* foi semelhante a figura anterior, porém selecionamos a região CD24-CD38+ (figura 9A). Ao comparar a frequência de plasmoblastos entre indivíduos saudáveis (mediana 0,97 % n=6) versus pacientes (todos) (mediana 0,55 % n=14), vimos que não existe diferença estatisticamente significativa ($p=0,2901$). Houve diferença entre doadores saudáveis e pacientes PB (mediana 0,24% n=12;

Figura 10_ Frequência de linfócitos B em transição de pacientes e doadores saudáveis.



Legenda: As CMS de pacientes e doadores saudáveis foram coletadas por punção venosa, separadas por gradiente de densidade e imediatamente fenotipadas por citometria de fluxo. A) Estratégia de seleção da região para analisar os linfócitos B em transição; B) Frequência de linfócitos B naive entre indivíduos saudáveis. Todos (PB + MB + ENL), pacientes PB (paucibacilar), MB (multibacilar), ENL (Eritema Nodoso Lepromatoso). Valores foram submetidos ao teste estatístico de Mann-Whitney em que * $p < 0.05$ e ** $p < 0.005$. $n = 22$.

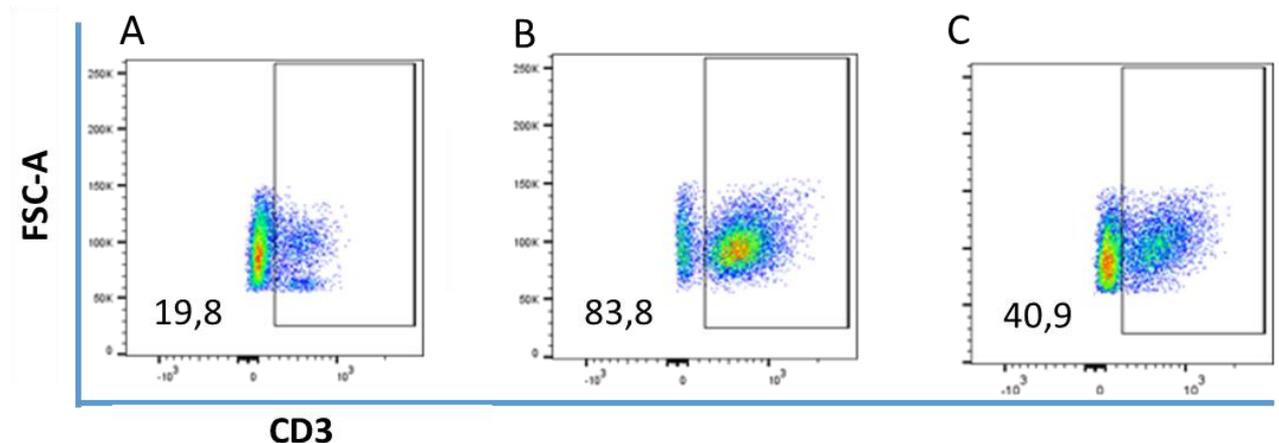
3.3 Ativação de TLR9 em linfócitos B de pacientes multibacilares

3.3.1 Análise da população de linfócitos T CD3+ e linfócitos T ativados CD3+CD25+

Os complexos DNA-Hlp derivados de *M. leprae* constituem provavelmente um dos principais gatilhos iniciais de ativação endosomal de TLR9. Já foi mostrado em 2016, por nosso grupo, que pacientes MB e ENL tendem a ter maior expressão de TLR9 em células B quando comparados a indivíduos saudáveis (39). Além disto, aproximadamente 1 a 4% dos linfócitos B secretam IL-10 em resposta à estimulação com TLR9 (73). Decidimos então investigar o papel dos linfócitos B estimulados com ligantes de TLR9 em pacientes com hanseníase. CMS depletadas de linfócitos B por *sorting*, foram estimuladas ou não com *M. leprae* por 72 horas. Em paralelo, linfócitos B isolados por *sorting* simultaneamente com a depleção também foram estimulados ou não por 72 horas com CpG-c /Hlp. Após a cultura

inicial, foi feita co-cultura destas duas populações por 24 horas. Na figura 11, pode-se observar a frequência de linfócitos T (CD3+) em co-culturas estimuladas ou não com o complexo CPG/HLP e *M. leprae*. A frequência mais baixa frequência de linfócitos T foi observada em co-cultura das duas populações sem estímulo prévio (19,8 %). Pode ser visto um aumento de quatro vezes na frequência de linfócitos T quando células inicialmente incubadas com *M. leprae* foram cultivadas com linfócitos B previamente estimulados com o complexo CpG/Hlp (Figura 11B). A co-cultura das CMS previamente estimuladas com *M. leprae* com linfócitos B não-estimulados previamente com CpG/Hlp levou a uma redução de 50% na frequência de linfócitos T na cultura (Figura 11C).

Figura 11_ Linfócitos T CD3+ em cultura com linfócitos T estimulados ou não com *M.leprae* e linfócitos B estimulados ou não com complexo CPG-c/HLP.



Legenda: As CMS de paciente com hanseníase lepromatosa foram coletadas por punção venosa e isoladas por gradiente de densidade. Os linfócitos B CD19+ e CMS depletadas de linfócitos B foram selecionados por “sorting” e estimulados ou não por 72 horas com CpG-c 0,50 μ M e HLP 0,25 μ M. As CMS depletadas de linfócitos B (CD19+) foram estimuladas ou não com *M. leprae* por 72 horas. Após a cultura inicial, foi feita co-cultura por 24 horas dessas células e fenotipagem por citometria de fluxo. A) CMS – Não estimuladas + Linfócitos B - Não estimulados; B) CMS – *M. leprae* + Linfócitos B – CPG-c/HLP; C) CMS – *M. leprae* + Linfócito B - Não estimulados

4 DISCUSSÃO

Apesar da redução significativa de novos casos com a introdução da PQT, a hanseníase ainda constitui um grave problema de saúde pública em alguns países, inclusive no Brasil, que é o segundo país em número de novos casos mundialmente (11). A resposta imune tem papel fundamental na defesa contra agentes infecciosos e se constitui no principal impedimento para a ocorrência de infecções disseminadas. É também conhecido o fato de que, para a quase totalidade das doenças infecciosas, o número de indivíduos expostos à infecção é bem superior ao dos que apresentam doença, indicando que a maioria das pessoas tem condições de destruir esses microrganismos e impedir a progressão de infecções. Em contraste, as deficiências imunológicas, sejam da imunidade inata (disfunções de células fagocitárias e deficiência de complemento) ou da imunidade adaptativa (deficiência de produção de anticorpos ou deficiência da função de células T) são fortemente associadas com aumento de susceptibilidade a infecções (78, 79). A variabilidade das manifestações clínicas da hanseníase é paralela aos padrões de resposta imune do hospedeiro ao *M. leprae*. A dicotomia entre as respostas de células T e de anticorpos poderiam estar de acordo com o conceito de subconjuntos Th1 e Th2 de células T helper (80). Porém explicações alternativa como resposta Th1 em pacientes paucibacilares, associada a supressão de resposta Th1 e expansão de resposta humoral induzida por vias não clássicas com TLR e outras populações efetoras, como células NKT, por exemplo, devem ser levadas em conta. Pacientes TT e BT mostram respostas Th1 mais dominantes que limitam o crescimento de *M. leprae*. Os pacientes BL e LL não apresentam usualmente altos níveis desta resposta, criando uma condição mais permissiva ao crescimento do bacilo. Os doentes TT e BT, em geral, apresentam respostas celulares elevadas e baixos títulos de anticorpos contra antígenos de *M. leprae*. Por outro lado, os pacientes LL e BL são, exceto com manifestações reacionais, incapazes de gerar respostas de células Th1 específicas para *M. leprae*, mostram títulos elevados de anticorpos para antígenos de *M. leprae*, apresentando numerosos bacilos nas suas lesões (81).

Em 2013, Nathalie Mar e seus colaboradores mostraram que as células Th2 proporcionam ajuda às células B naive tanto *in vitro* como *in vivo*, e que para isso é preciso que seja expresso o fator de transcrição STAT3 (do inglês: *signal transducers and activators of transcription*), que possui papel fundamental na geração de células B efetoras, e citocinas como IL-4, IL-6, IL-21 também são fundamentais para que esse processo ocorra (82, 83).

Além da produção de anticorpos, que é um dos pilares da resposta imune adaptativa, os linfócitos B também contribuem substancialmente para a magnitude e o destino da resposta imune através da apresentação de antígenos, secreção de citocinas e organização do tecido linfoide. Por isso, desde o começo dos anos 2000 até os dias atuais a importância da complexa biologia de células B foi reconhecida em respostas imunitárias patológicas alteradas, tais como asma e alergias; reatividade imune crônica a antígenos (alérgenos) em indivíduos sensibilizados; autoimunidade, falta de controle da resposta imunológica patológica aos auto-antígenos; imunidade antitumoral com resposta imune insuficiente a antígenos tumorais; aceitação ou rejeição de órgãos transplantados; e doenças infecciosas crônicas (84-86). Em relação a doenças cutâneas como psoríase e leishmaniose cutânea, os linfócitos B podem contribuir para o desenvolvimento e manutenção de granulomas. Bosio e seu grupo mostrou em 2000 que em camundongos deficientes em células B, em modelo experimental para tuberculose, houve diminuição dos granulomas, as lesões eram menores, havia pouco infiltrado celular, e um atraso na disseminação de bactérias para baço e fígado (87). Na hanseníase, ainda não existe análise de perfil fenotípico de subpopulações de células B do sangue periférico em diferentes formas da doença. Portanto, a primeira parte do nosso trabalho se baseou nessas análises.

Anand M. Iyer e seu grupo, em 2007, analisaram linfócitos B CD138+ e CD20+ no infiltrado celular de lesões de pacientes com hanseníase. Foi observado que pacientes MB possuem mais linfócitos B nas lesões que os pacientes PB (76). Em nossa análise de células B no sangue periférico, foi observado que pacientes MB com e sem ENL tinham maiores frequências de células B CD3-CD19+ (Figura 7B). Sabe-se que existe produção mais elevada de imunoglobulinas no polo multibacilar (88). Além disso, algumas células B CD3-CD19+ podem se tornar linfócitos B reguladores (76) e poderiam modular a resposta imune ao patógeno. Logo, esses dados sugerem uma participação de linfócitos B, contribuindo para a permanência do patógeno e evolução da doença.

A imunidade protetora depende da longevidade e de rápida resposta de populações de memória aos antígenos (89). Subpopulações de linfócitos B, que possuem alta afinidade para o antígeno, são formadas durante a resposta imunológica inicial à infecção e são geradas principalmente nos centros germinativos (90). A heterogeneidade da população de células B de memória fornece a diversidade funcional necessária para o sistema imunológico combater infecções e doenças. Os subgrupos de linfócitos B de memória podem ser segregados com base no isotipo de imunoglobulina expresso e fenótipo. Foi observado em alguns estudos que a frequência de algumas subpopulações de células B de memória aumenta no sangue

periférico em doenças infecciosas como malária, HIV e tuberculose (59, 62, 68, 91). Porém, os nossos resultados foram distintos, a frequência de células B de memória CD24+CD38- diminuiu em pacientes (todos) quando comparados aos doadores saudáveis. Além disso, vimos que frequência de células B CD19+CD24+CD38- em pacientes MB foi significativamente menor que os pacientes PB. Esses dados talvez possam ser aplicados em diferenciação de perfis clínicos de hanseníase. Além disso, pacientes com maior carga bacilar apresentaram os menores níveis de células B CD19+CD24+CD38-, sugerindo um impacto do antígeno circulante na frequência desta subpopulação. Em relação aos plasmoblastos CD24-CD38+, observamos diferença significativa entre doadores saudáveis e pacientes PB. E vimos também que pacientes PB possuem menor frequência de plasmoblastos CD24-CD38+ quando comparados aos MB (figura 9B). Apesar dos dados não terem significância estatística e o grupo dos pacientes MB com ENL ser bastante heterogêneo, foi visto que há uma tendência de estes pacientes terem frequência maior de plasmoblastos CD24-CD38+, quando comparados aos pacientes PB (figura 9B). Diferentemente das células B de memória, os plasmoblastos possuem a função de produzir imunoglobulina. Pacientes PB, que possuem resposta imune do tipo celular, apresentam maior frequência de células de memória. Pacientes com a forma MB com e sem ENL, que possuem um perfil de resposta humoral mais elevada, têm maior frequência de plasmoblastos.

As células em transição CD24+CD38+ são a ligação crítica entre células B que estão na medula óssea e o repertório de células B maduras periféricas que são selecionadas para os compartimentos foliculares ou zona marginal (92). Esse subgrupo, junto com plasmoblastos, dependendo dos estímulos, pode ser direcionado para um perfil regulador. As células B reguladoras são células imunossupressoras que contribuem para tolerância imunológica. Através da produção IL-10, IL-35 e TGF- β , suprimem a imunopatologia inibindo a expansão de células T CD4+ e CD8+(93, 94). A IL-10 produzida por essas células pode estimular o desenvolvimento de outras células B reguladoras, converter células T CD4+ em células T CD4+ FoxP3 (T reguladoras) e pode aumentar a suscetibilidade a agentes patogênicos (46). A frequência de células B de transição CD24+CD38+ foi avaliada em pacientes e doadores saudáveis, e não foram observadas diferenças estatísticas entre diferentes perfis da doença e doadores saudáveis (figura 10B).

Na segunda parte do trabalho, buscou-se entender o papel dos linfócitos B quando estimulados por ligantes de TLR9, e posteriormente interagindo com populações de linfócitos T. TLR9, assim como outros TLRs, pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento e manutenção de células B, uma vez que TLRs em células B maduras

(especialmente TLR7 e TLR9) desencadeiam uma gama de respostas funcionais, incluindo proliferação, produção de citocinas, quimiocinas, *switch* de isotipos e diferenciação terminal (95, 96). Na hanseníase, um trabalho do nosso grupo mostrou que a expressão dessa molécula é aumentada em pacientes MB e MB com ENL (39). Os complexos de DNA-Hlp derivados de *M. leprae* constituem provavelmente um dos principais gatilhos de ativação endossomal de TLR9 (97). Em algumas situações, a produção de IL10 por Bregs em resposta a células apoptóticas era dependente do reconhecimento de complexos contendo DNA através de TLR9 e as células B humanas CD27⁺ respondem a células apoptóticas portadoras de DNA secretando IL-10 (98, 99). Para entender o papel dos linfócitos B estimulados por ligantes de TLR9 modulando funcionalmente linfócitos T, foi realizada uma co-cultura de 72 horas em CMS de paciente MB estimuladas ou não com *M. leprae* e CpG-HLp. Na figura 11B, observa-se que a frequência de linfócitos T em culturas estimuladas com *M. leprae* e CpG-HLp foi quase o dobro da observada e co-cultura estimulada somente com *M. leprae* (figura 11C). Previamente, Gelman e colaboradores demonstraram que a estimulação de células T CD4⁺ com agonistas de TLR9 desencadeia nessas células aumento na proliferação, sobrevivência e secreção de IL-2 (100). Os nossos resultados mostram uma maior frequência de células T em paciente MB em um ambiente com células B estimuladas com ligantes de TLR9. Não podemos excluir que o carreamento de CpG/Hlp da fase inicial da cultura de linfócitos B tenha aumentado a sobrevivência de linfócitos T após co-cultura, porém, alternativamente, linfócitos B expostos a ligantes de TLR9 poderiam induzir modificações funcionais em linfócitos T respondedores a *M. leprae*. Esta hipótese nos fornece um elemento adicional para investigar na patogênese do ENL.

É importante que todos esses ensaios sejam feitos com um número maior de doadores. No entanto os resultados atuais apresentam evidências preliminares de que os linfócitos B podem estar atuando na modulação da resposta imune em pacientes com hanseníase, e de que esta modulação está ligada à capacidade que o paciente tem de responder ao *M. leprae*. Nossa expectativa futura é avaliar o papel de cada subgrupo na modulação da resposta imune, assim como entender a interação dessas células com macrófagos, células dendríticas plasmocitoides e células T CD4⁺. E, por fim, buscar o entendimento dos mecanismos envolvidos no aumento progressivo de resposta humoral da hanseníase, associado ao maior risco de adoecimento em indivíduos expostos ao *M. leprae*, e aumento de carga bacilar em pacientes.

REFERÊNCIAS

1. Tan SY, Graham C. Armauer Hansen (1841-1912): discoverer of the cause of leprosy. *Singapore Med J*. 2008;49(7):520-1.
2. Monot M, Honoré N, Garnier T, Araoz R, Coppée JY, Lacroix C, et al. On the origin of leprosy. *Science*. 2005;308(5724):1040-2.
3. Monot M, Honoré N, Garnier T, Zidane N, Sherafi D, Paniz-Mondolfi A, et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nat Genet*. 2009;41(12):1282-9.
4. CASTRO SANTOS LAd, Lina Faria, and Ricardo Fernandes de Menezes. Contrapontos da história da hanseníase no Brasil: cenários de estigma e confinamento. *Revista Brasileira de Estudos de População*. 2008:167-90.
5. Mira MT, Alcaïs A, Nguyen VT, Moraes MO, Di Flumeri C, Vu HT, et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature*. 2004;427(6975):636-40.
6. Robbins G, Tripathy VM, Misra VN, Mohanty RK, Shinde VS, Gray KM, et al. Ancient skeletal evidence for leprosy in India (2000 B.C.). *PLoS One*. 2009;4(5):e5669.
7. Alcaïs A, Alter A, Antoni G, Orlova M, Nguyen VT, Singh M, et al. Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin-alpha allele as a major risk factor for early-onset leprosy. *Nat Genet*. 2007;39(4):517-22.
8. Sharma R, Singh P, Loughry WJ, Lockhart JM, Inman WB, Duthie MS, et al. Zoonotic Leprosy in the Southeastern United States. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(12):2127-34.
9. Avanzi C, Del-Pozo J, Benjak A, Stevenson K, Simpson VR, Busso P, et al. Red squirrels in the British Isles are infected with leprosy bacilli. *Science*. 2016;354(6313):744-7.
10. Saúde Md. Hanseníase 2017 [Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/705-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/hanseníase/11298-situacao-epidemiologica-dados>].
11. organization wh. Leprosy 2017 [Available from: <http://www.who.int/lep/en/>].
12. Dupnik KM, Bair TB, Maia AO, Amorim FM, Costa MR, Keesen TS, et al. Transcriptional changes that characterize the immune reactions of leprosy. *J Infect Dis*. 2015;211(10):1658-76.
13. Misch EA, Berrington WR, Vary JC, Hawn TR. Leprosy and the human genome. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010;74(4):589-620.
14. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1966;34(3):255-73.
15. Talhari C, Talhari S, Penna GO. Clinical aspects of leprosy. *Clin Dermatol*. 2015;33(1):26-37.

16. Miyamoto Y, Mukai T, Matsuoka M, Kai M, Maeda Y, Makino M. Profiling of Intracellular Metabolites: An Approach to Understanding the Characteristic Physiology of *Mycobacterium leprae*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(8):e0004881.
17. Shepard CC. Temperature optimum of *Mycobacterium leprae* in mice. *J Bacteriol*. 1965;90(5):1271-5.
18. Lastória JC, Abreu MA. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - part 1. *An Bras Dermatol*. 2014;89(2):205-18.
19. Desikan KV, Sreevatsa. Extended studies on the viability of *Mycobacterium leprae* outside the human body. *Lepr Rev*. 1995;66(4):287-95.
20. Lancaster RD, Colston MJ, Hilson GR, Turner SM. The effect of body temperature and cell-mediated immunity on the growth of *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium leprae* in mice. *J Med Microbiol*. 1981;14(4):493-500.
21. Kirchheimer WF, Storrs EE. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1971;39(3):693-702.
22. Colston MJ, Hilson GR. Growth of *Mycobacterium leprae* and *M. marinum* in congenitally athymic (nude) mice. *Nature*. 1976;262(5567):399-401.
23. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*. 2001;409(6823):1007-11.
24. Singh P, Cole ST. *Mycobacterium leprae*: genes, pseudogenes and genetic diversity. *Future Microbiol*. 2011;6(1):57-71.
25. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(2):338-81.
26. Spencer JS, Brennan PJ. The role of *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I (PGL-I) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. *Lepr Rev*. 2011;82(4):344-57.
27. Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev*. 2012;249(1):158-75.
28. Hunter SW, Fujiwara T, Brennan PJ. Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae*. *J Biol Chem*. 1982;257(24):15072-8.
29. Tabouret G, Astarie-Dequeker C, Demangel C, Malaga W, Constant P, Ray A, et al. *Mycobacterium leprae* phenolglycolipid-1 expressed by engineered *M. bovis* BCG modulates early interaction with human phagocytes. *PLoS Pathog*. 2010;6(10):e1001159.
30. Ng V, Zanazzi G, Timpl R, Talts JF, Salzer JL, Brennan PJ, et al. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cell*. 2000;103(3):511-24.
31. Bhat RM, Prakash C. Leprosy: an overview of pathophysiology. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2012;2012:181089.
32. Shepard CC. THE EXPERIMENTAL DISEASE THAT FOLLOWS THE INJECTION OF HUMAN LEPROSY BACILLI INTO FOOT-PADS OF MICE. *J Exp Med*. 1960;112(3):445-54.

33. Fine PE, Sterne JA, Pönnighaus JM, Bliss L, Sauj J, Chihana A, et al. Household and dwelling contact as risk factors for leprosy in northern Malawi. *Am J Epidemiol.* 1997;146(1):91-102.
34. Van Dyken SJ, Nussbaum JC, Lee J, Molofsky AB, Liang HE, Pollack JL, et al. A tissue checkpoint regulates type 2 immunity. *Nat Immunol.* 2016;17(12):1381-7.
35. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(7):499-511.
36. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev.* 2003;8(3):223-46.
37. Montoya D, Modlin RL. Learning from leprosy: insight into the human innate immune response. *Adv Immunol.* 2010;105:1-24.
38. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, van der Zanden L, Ottenhoff TH. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *J Leukoc Biol.* 2006;79(2):285-93.
39. Dias AA, Silva CO, Santos JP, Batista-Silva LR, Acosta CC, Fontes AN, et al. DNA Sensing via TLR-9 Constitutes a Major Innate Immunity Pathway Activated during Erythema Nodosum Leprosum. *J Immunol.* 2016;197(5):1905-13.
40. Guiducci C, Coffman RL, Barrat FJ. Signalling pathways leading to IFN-alpha production in human plasmacytoid dendritic cell and the possible use of agonists or antagonists of TLR7 and TLR9 in clinical indications. *J Intern Med.* 2009;265(1):43-57.
41. Fonseca AB, Simon MD, Cazzaniga RA, de Moura TR, de Almeida RP, Duthie MS, et al. The influence of innate and adaptative immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy. *Infect Dis Poverty.* 2017;6(1):5.
42. Bleharski JR, Li H, Meinken C, Graeber TG, Ochoa MT, Yamamura M, et al. Use of genetic profiling in leprosy to discriminate clinical forms of the disease. *Science.* 2003;301(5639):1527-30.
43. Muñoz-Elías EJ, McKinney JD. Mycobacterium tuberculosis isocitrate lyases 1 and 2 are jointly required for in vivo growth and virulence. *Nat Med.* 2005;11(6):638-44.
44. Bobosha K, Wilson L, van Meijgaarden KE, Bekele Y, Zewdie M, van der Ploeg-van Schip JJ, et al. T-cell regulation in lepromatous leprosy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(4):e2773.
45. 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.
46. Tarique M, Saini C, Naqvi RA, Khanna N, Sharma A, Rao DN. IL-12 and IL-23 modulate plasticity of FoxP3(+) regulatory T cells in human Leprosy. *Mol Immunol.* 2017;83:72-81.
47. Park AJ, Rendini T, Martiniuk F, Levis WR. Leprosy as a model to understand cancer immunosurveillance and T cell anergy. *J Leukoc Biol.* 2016;100(1):47-54.
48. Tiselius A, Kabat EA. AN ELECTROPHORETIC STUDY OF IMMUNE SERA AND PURIFIED ANTIBODY PREPARATIONS. *J Exp Med.* 1939;69(1):119-31.
49. Bruton OC. Agammaglobulinemia. *Pediatrics.* 61952. p. 722-8.

50. PORTER RR. The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem J.* 1959;73:119-26.
51. Weigert MG, Cesari IM, Yonkovich SJ, Cohn M. Variability in the lambda light chain sequences of mouse antibody. *Nature.* 1970;228(5276):1045-7.
52. Cooper MD. The early history of B cells. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(3):191-7.
53. Medvinsky A, Dzierzak E. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell.* 1996;86(6):897-906.
54. Burrows N, Maxwell PH. Hypoxia and B cells. *Exp Cell Res.* 2017.
55. Pone EJ, Lou Z, Lam T, Greenberg ML, Wang R, Xu Z, et al. B cell TLR1/2, TLR4, TLR7 and TLR9 interact in induction of class switch DNA recombination: modulation by BCR and CD40, and relevance to T-independent antibody responses. *Autoimmunity.* 2015;48(1):1-12.
56. Kathrin Pieper BG, Hermann Eibel,. B-cell biology and development. Mechanisms of allergic diseases. 2013:959-71.
57. Geherin SA, Gómez D, Glabman RA, Ruthel G, Hamann A, Debes GF. IL-10+ Innate-like B Cells Are Part of the Skin Immune System and Require $\alpha 4\beta 1$ Integrin To Migrate between the Peritoneum and Inflamed Skin. *J Immunol.* 2016;196(6):2514-25.
58. Menon M, Blair PA, Isenberg DA, Mauri C. A Regulatory Feedback between Plasmacytoid Dendritic Cells and Regulatory B Cells Is Aberrant in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity.* 2016;44(3):683-97.
59. Siewe B, Stapleton JT, Martinson J, Keshavarzian A, Kazmi N, Demarais PM, et al. Regulatory B cell frequency correlates with markers of HIV disease progression and attenuates anti-HIV CD8⁺ T cell function in vitro. *J Leukoc Biol.* 2013;93(5):811-8.
60. Wortel CM, Heidt S. Regulatory B cells: Phenotype, function and role in transplantation. *Transpl Immunol.* 2017.
61. B cell [Internet]. 2017.
62. Morbach H, Eichhorn EM, Liese JG, Girschick HJ. Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clin Exp Immunol.* 2010;162(2):271-9.
63. Burton H, Dorling A. Transitional B cell subsets-a convincing predictive biomarker for allograft loss? *Kidney Int.* 2017;91(1):18-20.
64. Sanz I, Wei C, Lee FE, Anolik J. Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. *Semin Immunol.* 2008;20(1):67-82.
65. Fink K. Origin and Function of Circulating Plasmablasts during Acute Viral Infections. *Front Immunol.* 2012;3:78.
66. Tarte K, De Vos J, Thykjaer T, Zhan F, Fiol G, Costes V, et al. Generation of polyclonal plasmablasts from peripheral blood B cells: a normal counterpart of malignant plasmablasts. *Blood.* 2002;100(4):1113-22.
67. Sebina I, Biraro IA, Dockrell HM, Elliott AM, Cose S. Circulating B-lymphocytes as potential biomarkers of tuberculosis infection activity. *PLoS One.* 2014;9(9):e106796.
68. Czarnowicki T, Gonzalez J, Bonifacio KM, Shemer A, Xiangyu P, Kunjravia N, et al. Diverse activation and differentiation of multiple B-cell subsets in patients with atopic

- dermatitis but not in patients with psoriasis. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137(1):118-29.e5.
69. Lou Z, Casali P, Xu Z. Regulation of B Cell Differentiation by Intracellular Membrane-Associated Proteins and microRNAs: Role in the Antibody Response. *Front Immunol.* 2015;6:537.
 70. Bourke E, Bosisio D, Golay J, Polentarutti N, Mantovani A. The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood.* 2003;102(3):956-63.
 71. Hartmann G, Battiany J, Poeck H, Wagner M, Kerkmann M, Lubenow N, et al. Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN- α induction in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2003;33(6):1633-41.
 72. Browne EP. Regulation of B-cell responses by Toll-like receptors. *Immunology.* 2012;136(4):370-9.
 73. van de Veen W, Stanic B, Yaman G, Wawrzyniak M, Söllner S, Akdis DG, et al. IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(4):1204-12.
 74. Dubois Cauwelaert N, Baldwin SL, Orr MT, Desbien AL, Gage E, Hofmeyer KA, et al. Antigen presentation by B cells guides programming of memory CD4(+) T-cell responses to a TLR4-agonist containing vaccine in mice. *Eur J Immunol.* 2016;46(12):2719-29.
 75. dickinson b. Supporting B-Cell Research: Providing Innovative and Flexible Ways to Study B-Cell Phenotypes and Functions 2016 [
 76. Iyer AM, Mohanty KK, van Egmond D, Katoch K, Faber WR, Das PK, et al. Leprosy-specific B-cells within cellular infiltrates in active leprosy lesions. *Hum Pathol.* 2007;38(7):1065-73.
 77. Matsumoto M, Baba A, Yokota T, Nishikawa H, Ohkawa Y, Kayama H, et al. Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity.* 2014;41(6):1040-51.
 78. Sakaguchi S, Wing K, Miyara M. Regulatory T cells - a brief history and perspective. *Eur J Immunol.* 2007;37 Suppl 1:S116-23.
 79. Paulo R. L. Machado MIASA, Lucas Carvalho, Edgar M. Carvalho. Mecanismos de resposta imune às infecções*Immune response mechanisms to infections. *An bras Dermatol.* 2004:647-64.
 80. Saini C, Ramesh V, Nath I. CD4+ Th17 cells discriminate clinical types and constitute a third subset of non Th1, Non Th2 T cells in human leprosy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(7):e2338.
 81. 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.
 82. Ait-Oufella H, Sage AP, Mallat Z, Tedgui A. Adaptive (T and B cells) immunity and control by dendritic cells in atherosclerosis. *Circ Res.* 2014;114(10):1640-60.
 83. Mari N, Hercor M, Denanglaire S, Leo O, Andris F. The capacity of Th2 lymphocytes to deliver B-cell help requires expression of the transcription factor STAT3. *Eur J Immunol.* 2013;43(6):1489-98.

84. Stanic B, van de Veen W, Wirz OF, Rückert B, Morita H, Söllner S, et al. IL-10-overexpressing B cells regulate innate and adaptive immune responses. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(3):771-80.e8.
85. Portugal S, Tipton CM, Sohn H, Kone Y, Wang J, Li S, et al. Malaria-associated atypical memory B cells exhibit markedly reduced B cell receptor signaling and effector function. *Elife*. 2015;4.
86. Nemazee D. Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nat Rev Immunol*. 2017.
87. Bosio CM, Gardner D, Elkins KL. Infection of B cell-deficient mice with CDC 1551, a clinical isolate of *Mycobacterium tuberculosis*: delay in dissemination and development of lung pathology. *J Immunol*. 2000;164(12):6417-25.
88. Manca F, Fenoglio D, Li Pira G, Kunkl A, Celada F. Effect of antigen/antibody ratio on macrophage uptake, processing, and presentation to T cells of antigen complexed with polyclonal antibodies. *J Exp Med*. 1991;173(1):37-48.
89. Kurosaki T, Kometani K, Ise W. Memory B cells. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(3):149-59.
90. Li S, Plebanski M, Smooker P, Gowans EJ. Editorial: Why Vaccines to HIV, HCV, and Malaria Have So Far Failed-Challenges to Developing Vaccines Against Immunoregulating Pathogens. *Front Microbiol*. 2015;6:1318.
91. du Plessis WJ, Keyser A, Walzl G, Loxton AG. Phenotypic analysis of peripheral B cell populations during *Mycobacterium tuberculosis* infection and disease. *J Inflamm (Lond)*. 2016;13:23.
92. Palanichamy A, Barnard J, Zheng B, Owen T, Quach T, Wei C, et al. Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy. *J Immunol*. 2009;182(10):5982-93.
93. Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity*. 2015;42(4):607-12.
94. Audo R, Hua C, Hahne M, Combe B, Morel J, Daien CI. Phosphatidylserine Outer Layer Translocation Is Implicated in IL-10 Secretion by Human Regulatory B Cells. *PLoS One*. 2017;12(1):e0169755.
95. Weller S, Bonnet M, Delagrevierie H, Israel L, Chrabieh M, Maródi L, et al. IgM+IgD+CD27+ B cells are markedly reduced in IRAK-4-, MyD88-, and TIRAP- but not UNC-93B-deficient patients. *Blood*. 2012;120(25):4992-5001.
96. Barrat FJ, Coffman RL. Development of TLR inhibitors for the treatment of autoimmune diseases. *Immunol Rev*. 2008;223:271-83.
97. Matsumoto S, Matsumoto M, Umemori K, Ozeki Y, Furugen M, Tatsuo T, et al. DNA augments antigenicity of mycobacterial DNA-binding protein 1 and confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol*. 2005;175(1):441-9.
98. Miles K, Heaney J, Sibinska Z, Salter D, Savill J, Gray D, et al. A tolerogenic role for Toll-like receptor 9 is revealed by B-cell interaction with DNA complexes expressed on apoptotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(3):887-92.
99. Bird AK, Meednu N, Anolik JH. New insights into B cell biology in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol*. 2015;27(5):461-7.

100. Gelman AE, LaRosa DF, Zhang J, Walsh PT, Choi Y, Sunyer JO, et al. The adaptor molecule MyD88 activates PI-3 kinase signaling in CD4+ T cells and enables CpG oligodeoxynucleotide-mediated costimulation. *Immunity*. 2006;25(5):783-93.