

Expressão de FoxP3 em diferentes formas de hanseníase e reações hansênicas

Expression of FoxP3 in different forms of leprosy and reactions

Chalita Patricia Lima; Elisa M. Costa; Lucas F. Sampaio

Universidade Estadual de Goiás (UEG), Anápolis, Goiás, Brasil.

RESUMO

Embora as células T reguladoras (Treg) sejam importantes na regulação imunológica de vários processos patológicos, o papel delas na imunologia da hanseníase ainda precisa ser mais bem avaliado. O objetivo deste trabalho é quantificar o nuclear transcription factor P3 (FoxP3), principal marcador de células Treg, nas diferentes formas de hanseníase, com e sem reação hansênica. A expressão de células Treg foi investigada utilizando o método de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) para medir o marcador FoxP3 em plasma não estimulado, assim como no sobrenadante de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) após incubação com antígeno sonicado de M. leprae (MLSA) durante 72 horas. Após estimulação com MLSA, um forte aumento da expressão de FoxP3 foi observado em pacientes com lepra multibacilar (LM) com reação do tipo 1 e 2. No entanto, o grupo que apresentou maior expressão de FoxP3 foi o de pacientes com reação do tipo 1, com cerca de seis vezes mais pacientes do que o de indivíduos saudáveis e duas vezes mais que os com reação do tipo 2. Portanto, este estudo sugere que o Treg desempenha um papel importante na etiopatogenia das reações hansênicas, regulando o processo inflamatório agudo exacerbado e evitando lesões graves e incapacitantes. Este estudo também demonstra que o ELISA, uma tecnologia simples e acessível, pode ser usado na medição de rotina do marcador FoxP3.

Unitermos: *Mycobacterium leprae*; eritema nodoso; Treg.

ABSTRACT

Although regulatory T cells (Treg) are important in the immune regulation of various pathological processes, the role of these cells in the immunology of leprosy still needs to be better evaluated. The objective of this work is to quantify the FoxP3, the main marker of Treg cells, in the different forms of leprosy, with and without leprosy reaction. Expression of Treg cells was investigated using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method to measure the FoxP3 marker in unstimulated plasma as well as in the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) supernatant after incubation with *M. leprae* sonicated antigen (MLSA) for 72 hours. After stimulation with MLSA, a strong increase in FoxP3 expression was observed in multibacillary leprosy (MB), type 1 leprosy reaction (T1R) and type 2 leprosy reaction (T2R) patients. However, the group that presented the highest expression of FoxP3 was T1R, about six times more than that of healthy individuals and twice as many as T2R patients. Thus, this study suggests that Treg plays an important role in the etiopathogenesis of leprosy reactions, regulating the exacerbated acute inflammatory process, avoiding severe and incapacitating lesions. This study also demonstrates that ELISA, a simple and affordable technology, can be used in routine measurement of the FoxP3 marker.

Key words: *Mycobacterium leprae*; erythema nodosum; Treg.

RESUMEN

*Aunque las células T reguladoras sean importantes en la regulación inmunológica de varios procesos patológicos, su papel en la inmunología de la enfermedad de Hansen, o lepra, todavía necesita ser correctamente evaluado. El objetivo de este trabajo es cuantificar el factor de transcripción nuclear P3 (FoxP3), principal marcador de células Treg, en las diferentes formas de lepra, con y sin reacción leprosa. La expresión de células Treg fue investigada con el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para medición del marcador FoxP3 en plasma no estimulado así como en el sobrenadante de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) luego de incubación con antígeno sonicado de *M. leprae* (MLSA) por 72 horas. Después de estimulación con MLSA, un fuerte aumento en la expresión de FoxP3 fue observado en pacientes con lepra multibacilar (MB) con reacción del tipo 1 y 2. Sin embargo, el grupo que presentó mayor expresión de FoxP3 fue el grupo de pacientes con reacción tipo 1, con alrededor de seis veces más pacientes que el de sujetos sanos y dos veces más que con los de reacción tipo 2. Por consiguiente, este estudio sugiere que Treg desempeña un papel importante en la etiopatogenia de las reacciones leprosas, regulando el proceso inflamatorio agudo agravado y evitando daños graves e incapacitantes. Este estudio también demuestra que ELISA, una técnica simple y accesible, puede ser usada en la medición de rutina del marcador FoxP3.*

Palabras clave: *Mycobacterium leprae; eritema nudoso; Treg.*

INTRODUÇÃO

As células T regulatórias (Tregs) são um subconjunto de células caracterizado pelo fator de transcrição nuclear P3 (*forkhead box P3* ou FoxP3)^(1, 2). Embora as Tregs desempenhem um papel importante na maioria das doenças infecciosas, seu papel na imunopatologia da hanseníase ainda não foi elucidado. Alguns estudos mostram um aumento no número de células Treg na forma paucibacilar (PB)^(3, 4) da hanseníase, enquanto outros pesquisadores têm observado altos níveis de Treg em formas multibacilares (MB)^(5, 6). Em relação a estudos com reações hansênicas, os pesquisadores observaram um aumento estatisticamente significativo na expressão de FoxP3 em pacientes com reação hansênica tipo 1 (RT1) quando comparados com reação hansênica tipo 2 (RT2)^(7, 8). Em contraste, outros pesquisadores encontraram maior aumento na expressão de FoxP3 em RT2⁽³⁾. Desse modo, neste estudo, investigamos a frequência de FoxP3, um marcador de células Treg, em diferentes formas de hanseníase e reações hansênicas. Também investigamos a possibilidade de usar o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), um método simples e bastante acessível na determinação do marcador FoxP3.

MÉTODOS

Para quantificação do marcador FoxP3 no sangue periférico, foram recrutados cinco grupos. Os grupos 1 e 2 consistiam em

pacientes com hanseníase PB e MB, respectivamente, sem reação, recentemente diagnosticados e que nunca receberam terapia multidrogas. Os grupos 3 e 4 tinham pacientes com RT1 e RT2, respectivamente. Amostras de todos os pacientes com reação foram coletadas no início do episódio de reação, antes do uso de corticosteroides ou talidomida. Os pacientes foram distribuídos para grupos de hanseníase com base em seu diagnóstico imediato, e mais tarde foram minuciosamente caracterizados de acordo com os critérios de Ridley-Joplin, levando em conta achados histopatológicos, baciloscópicos e clínicos. Para o grupo 5, foram recrutados controles endêmicos saudáveis (CES), indivíduos sem sinais clínicos ou história familiar de hanseníase ou tuberculose. Todos os grupos compreendiam 10 indivíduos. O recrutamento de pacientes com hanseníase, com ou sem reação, foi feito em seis unidades de saúde básica em Goiânia, Brasil. A coleta de sangue de todos os pacientes ocorreu entre os meses de janeiro e setembro de 2017. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Goiânia (protocolo nº 12962).

A concentração de FoxP3 no plasma (na ausência de estímulo) e o sobrenadante de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), estimulados pelo antígeno sonicado de *M. leprae* (MLSA), foi determinada pelo ELISA com o *kit* humano FoxP3, de acordo com as instruções do fabricante (LifeSpan BioSciences – Seattle). Culturas de PBMC foram preparadas de acordo com protocolo explicado em Chaduvula *et al.* (2012)⁽⁹⁾. A análise estatística foi feita com Graphpad Prism v.5. O teste de Mann-Whitney foi usado para comparação entre dois grupos de pacientes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão do marcador FoxP3 foi investigada com o uso de ELISA, primeiramente no plasma, sem estímulo, e depois no sobrenadante de PBMC estimulado com antígeno bruto sonicado de *M. leprae* (MLCS). Os resultados mostram que não houve diferença na expressão de FoxP3 medida diretamente no plasma, na ausência de estímulos entre os grupos analisados.

Após estimulação com o antígeno MLCS, PBMCs de todos os grupos demonstraram aumento estatisticamente significativo na expressão de FoxP3 quando comparada com indivíduos saudáveis (**Figura**). A mediana de FoxP3 no grupo MB foi 16,06 ng/ml. Esse valor é significativamente mais alto que nos grupos CES e PB, como mostrado na Figura. Embora este estudo tenha usado um método diferente dos estudos anteriores, nosso trabalho está de acordo com a maioria dos estudos que já pesquisaram Tregs em hanseníase, demonstrando um número maior de células FoxP3+ em pacientes MB do que em pacientes PB⁽¹⁰⁻¹³⁾. Acreditamos que esse aumento está relacionado com a anergia de células T observada na forma MB da doença. As células FoxP3+ teriam então um papel patogênico crucial nos indivíduos MB, já que a elevação dessas células poderia aumentar a supressão da resposta Th1, reduzindo a liberação de interferon gama (IFN- γ) e outras citocinas Th1, que favoreceriam a sobrevivência e a proliferação dos bacilos. Os resultados deste estudo divergem de um estudo

anterior mostrando mais células FoxP3 em pacientes PB do que em pacientes MB⁽³⁾. Acreditamos que a diferença se relacione com o fato de que Attia *et al.* (2010)⁽³⁾ investigaram células FoxP3+ circulantes, mas não as cultivaram, como foi feito em nosso estudo.

O grupo com a mais alta quantidade de FoxP3 foi RT1. As quantidades de FoxP3 em pacientes RT1 foram cerca de seis vezes maiores que no grupo PB e quase o dobro da quantidade observada em pacientes MB e RT2 (Figura). Essa mesma tendência de maiores quantidades de células Treg em RT1 também foi observada em estudos anteriores, que mostraram mais células FoxP3 em pacientes RT1 tanto *in situ* quanto em culturas de células sanguíneas circulantes^(4, 8, 14). Um estudo de 2018, também realizado em pacientes de Goiânia com hanseníase, demonstrou *in situ* que indivíduos com hanseníase tipo 1 têm mais células FoxP3+ do que pacientes RT2. Segundo Costa *et al.* (2018)⁽¹⁴⁾, a pequena quantidade de células FoxP3+ durante RT2, em comparação com RT1, é compatível com as amplas e de algum modo incontroladas manifestações clínicas associadas com RT2. Sob as circunstâncias de expressão reduzida das células Treg, pode ocorrer maior dano a tecidos e nervos⁽¹⁵⁾. Por outro lado, nossos resultados de células FoxP3+ aumentadas durante RT1 sugerem uma possível Treg supressiva para controlar a imunidade mediada por célula exacerbada em RT1. Essa supressão é benéfica. Em outras palavras, o aumento de Tregs durante RT1 parece estar relacionado com o dano neural que ocorre nesse tipo de reação. Embora não seja a intenção do presente estudo, verificamos que após o final do tratamento, somente um dos 10 pacientes RT1 apresentaram neurite e incapacidades físicas relacionadas com a reação. Em contrapartida, seis dos 10 pacientes RT2 tiveram neurite e/ou incapacidades físicas relacionadas com a hanseníase.

O equilíbrio entre células Treg e Th17 parece ser diretamente relacionado com a manifestação de reações tipo 1 ou 2 de hanseníase. Estudos anteriores mostraram que pacientes RT2 têm mais células Th17 que pacientes RT1. Contudo, pacientes RT1 têm mais Tregs^(12, 14, 15). Embora não tenhamos avaliado células Th17 em nosso estudo, acreditamos que pacientes RT2 apresentariam mais daquela subpopulação de células que pacientes com reação reversa, o que também ajudaria a explicar porque a reação de tipo 2 geralmente é mais severa e prejudicial aos nervos periféricos que RT1, já que altas quantidades de Th17 podem ser nocivas ao próprio tecido. Acreditamos que num futuro próximo seja possível controlar as reações da hanseníase regulando as células Treg e Th17.

No atual estudo, medimos o marcador FoxP3 por ELISA nas células circulantes, enquanto a maioria dos estudos pesquisou FoxP3 em hanseníase usando ensaios mais sofisticados, como citometria de fluxo^(3, 5, 6, 10, 15). O método de citometria de fluxo é

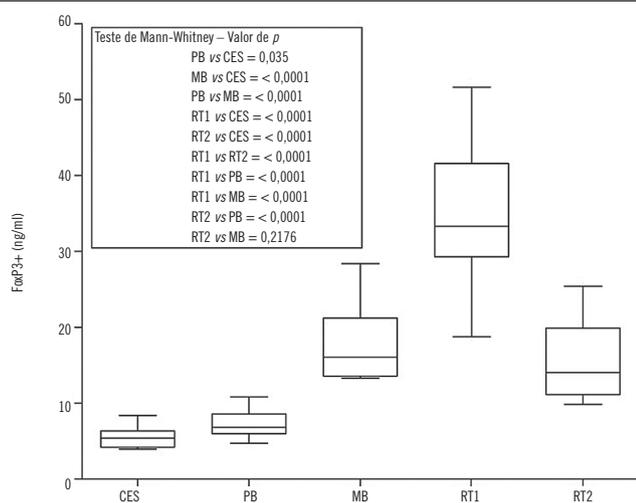


FIGURA – Determinação, através do ELISA, do marcador FoxP3 em PBMCs de pacientes e indivíduos saudáveis após estímulo

As PBMC de pacientes com hanseníase e controles foram estimuladas *in vitro* com MLCS. O número total de células Treg FoxP3 foi determinado por ELISA. Os resultados são apresentados como diagrama de caixa, interquartil (25%-75%) e a linha preta dentro de cada caixa indica o valor da mediana; n = 10 por grupo.

PBMC: células mononucleares do sangue periférico; MLCS: antígeno bruto sonicado de *M. leprae*; FoxP3: fator de transcrição nuclear P3; Treg: células T reguladoras; ELISA: ensaio de imunoabsorção enzimática; CES: controles endêmicos saudáveis; PB: hanseníase paucibacilar; MB: hanseníase multibacilar; RT1: reação tipo 1; RT2: reação tipo 2.

uma técnica cara, não muito acessível e disponível em poucos laboratórios do Brasil. Entretanto, os resultados do presente estudo demonstram eficácia em medir o marcador FoxP3 por testes de ELISA, um ensaio simples e muito mais barato, que é capaz de substituir os testes mais complexos e caros.

A grande limitação deste estudo foi a não avaliação de outros marcadores Treg, como CD25 e o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), provando que as células FoxP3+ medidas eram na verdade células T reguladoras. Estudos com maior número de pacientes e controles usando outros marcadores deveriam ser feitos para uma análise mais detalhada de Treg em hanseníase. Outra limitação deste estudo foi não comparar a técnica ELISA com outros métodos para medição de FoxP3. Portanto, acreditamos que estudos adicionais comparando a técnica ELISA diretamente com citometria de fluxo e imuno-histoquímica deveriam ser realizados para confirmar o uso potencial e a eficácia de ELISA na medição de células FoxP3+.

REFERÊNCIAS

1. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995; 155: 1151-64.
2. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med.* 1998; 188: 287-96.
3. Attia EA, Abdallah M, Saad AA, et al. Circulating CD4+ CD25 high FoxP3+ T cells vary in different clinical forms of leprosy. *Int J Dermatol.* 2010; 49: 1152-8.
4. Abdallah M, Attia EA, Saad AA, et al. Serum Th1/Th2 and macrophage lineage cytokines in leprosy; correlation with circulating CD4+ CD25^{high} FoxP3+T-reg cells. *Exp Dermatol.* 2014; 23: 742-7.
5. Palermo ML, Pagliari C, Trindade MA, et al. Increased expression of regulatory T cells and downregulatory molecules in lepromatous leprosy. *Am J Trop Med Hyg.* 2012; 86: 878-83.
6. Fernandes C, Gonçalves HS, Cabral PB, Pinto HC, Pinto MI, Câmara LM. Increased frequency of CD4 and CD8 regulatory T cells in individuals under 15 years with multibacillary leprosy. *PLoS ONE.* 2013; 8: e79072.
7. Massone C, Nunzi E, Ribeiro-Rodrigues R, et al. T regulatory cells and plasmacytoid dendritic cells in hansen disease: a new insight into pathogenesis? *Am J Dermatopathol.* 2010; 32: 251-6.

AUTOR CORRESPONDENTE

Lucas Henrique Sampaio  0000-0002-2256-1883
e-mail: lucas.sampaio@ueg.br or lucashfs@gmail.com



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.

CONCLUSÃO

Os dados aqui apresentados oferecem informações importantes sobre o envolvimento das células FoxP3 nas diferentes formas de hanseníase e reações hanseníase, demonstrando o papel relevante dessas células na imunopatologia da doença. Nossos resultados sugerem que o número aumentado de células FoxP3+ em pacientes RT1 poderia ser benéfico para o hospedeiro como um mecanismo de proteção, em uma tentativa de regular uma possível resposta imune exacerbada contra o *M. leprae*. Isto é, as células FoxP3+ regulariam o processo inflamatório agudo, evitando uma inflamação muito forte, que poderia causar lesões sérias e incapacitantes nos nervos. Os resultados deste estudo também sugerem que as células FoxP3+ reduzem a resposta imune em pacientes MB, o que pode permitir a sobrevivência e a dispersão dos bacilos nessas formas de hanseníase. Além do mais, o estudo também mostra que um simples ensaio ELISA pode ser usado para medir o marcador FoxP3, já que substitui técnicas mais caras e menos acessíveis, como a citometria de fluxo.

8. Vieira AP, Trindade MA, Pagliari C, et al. Development of type 2, but not type 1, leprosy reactions is associated with a severe reduction of circulating and in situ regulatory T-cells. *Am J Trop Med Hyg.* 2016; 94: 721-7.
9. Chaduvula M, Murtaza A, Misra N, et al. Lsr2 peptides of *M. leprae* show hierarchical responses in lymphoproliferative assays with selective recognition by patients with anergic lepromatous leprosy. *Infect Immun.* 2012; 80: 742-52.
10. Kumar S, Naqvi RA, Ali R, Rani R, Khanna N, Rao DN. CD4+CD25+ T regs with acetylated FoxP3 are associated with immune suppression in human leprosy. *Mol Immunol.* 2013; 56: 513-20.
11. Bobosha K, Wilson L, van Meijgaarden KE, et al. T-cell regulation in lepromatous leprosy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8: e2773.
12. 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: e0004338.
13. Chaves AT, Ribeiro-Junior AF, Lyon S, et al. Regulatory T cells: friends or foe in human *Mycobacterium leprae* infection? *Immunobiology.* 2018; 223: 397-404.
14. Costa MB, Hungria EM, Freitas AA, et al. In situ T regulatory cells and Th17 cytokines in paired samples of leprosy type 1 and type 2 reactions. *PLoS One.* 2018; 6: e0196853.
15. 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: e2338.